ウイルス第一部

１．ウイルス第一部

部　長　　倉　根　一　郎

概　　要

ウイルス第一部は、平成１４年４月１日より、村山分室にある第一室（外来性ウイルス室)、戸山庁舎にある第二室（節足動物媒介性ウイルス室)、第三室（神経系ウイルス室)、第四室（ヘルペスウイルス室)、第五室（リケッチア、クラミジア室）５室で構成されることとなった。
本年度は以下の人事異動があった。平成１４年４月１日付で伊藤美佳子が第二室研究員として採用され就任した。平成１５年１月１日付で中道一生が第三室研究員として明海大学より就任した。また、平成１４年７月１日付で森本金次郎主任研究官が第三室室長として発令された。平成１５年３月３１日付で主任研究官山田堅一郎、主任研究官高山道子が定年退職した。また、同日付で第一室研究員前田秋彦が帯広畜産大学に転出した。
研究業務としては、出血熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、狂犬病ウイルス、EB ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、リケッチア、クラミジア等の病原体の研究、血清及び分子疫学、および感染症発症病理機構の解析と診断、治療、予防方法の研究を行った。それぞれの研究成果は論文及び国内外の学会等を通して発表された。
第一室においては､P４実験室を使用しない出血熱ウイルスの診断体制の確立を目的とした研究を行っており、エボラ出血熱、マールブルク病、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサ熱に対する診断法を開発した。特に本年度はクリミアコンゴ出血熱ウイルスに対する抗原抗体診断法の有用性を中国での疫学調査において確認した。またリフトバレーウイルスとフニンウイルスの診断法の開発を開始した。さらに痘瘡ワクチンの品質管理に関する研究を行った。
第二室においては、日本各地のブタ血清から日本脳炎ウイルスの分離を行い国内に分布する日本脳炎ウイルスの比較解析を行った。また、これまで確立したウエストナイルウイルス熱の診断法を用いてのサーベイランス体制の確立を行った。また熱帯、亜熱帯地域から

の帰国者における輸入デング熱について、迅速、簡便且つ特異的な血清病原体診断法を開発して他のフラビウイルスとの鑑別法を確立した。
第三室においては、世界各地で分離された狂犬病ウイルスや新たに中央アジアでコウモリから分離されたリッサウイルスについて遺伝子解析をおこなった。また、HEP-Flury 株を用いた cDNA 発現系を開発し、この系を用いて P 遺伝子を欠損した増殖欠損ウイルスを作製した。また cDNA 発現系を用いて作製した変異ウイルスを用いての神経病原性の解析を行った。
第四室においては、エプスタイン・バールウイルス（EBV）の潜伏感染に関する研究と疫学的研究を進展させた。特に EBV 潜伏感染の維持に必須で、治療と予防のため最適の標的である EBV 核抗原-１（EBNA-1）の核内における細胞タンパク質との共局在について新知見を得、潜伏感染の新しいメカニズムを示した。また、EBNA-LP、EBNA-2 に関しては、相互作用する細胞蛋白の同定と転写活性化における機能解析の研究を進展させた。水痘ウイルスについては分離株の遺伝子構造の比較を行い、野生株とワクチン株の識別法を開発した。
第五室においてはクラミジア感染症の血清・病原体診断法を確立し、国内各地での肺炎クラミジア感染症、オウム病の集団発生例に関して対応し調査を行った。また、分離されたクラミジア株について分子生物学的解析を行った。リケッチア感染症については Q 熱の血清・病原体診断法を確立し、国内外の検体を用いて有用性を確認した。
以上の研究活動に対して、厚生労働省、ＨＳ財団、文部科学省、環境省等から研究費の援助を受けた。日本脳炎ワクチン、黄熱ワクチン、狂犬病ワクチン、水痘ワクチン、水痘皮内抗原について国家検定及び依頼検査を行った。また、各ウイルス及び患者材料に関する多数の行政検査、依頼検査を行った。さらに各病原体に関するレファレンス活動を行った。また各室において多数の協力研究員、研究生、実習生を受け入れた.

研 究 業 績

I. 第一室

1. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの組換え核蛋白を用いたIgM抗体の検出と診断における有用性

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスの組換え核蛋白（CCHFV-rNP）を抗原としたIgG ELISAによる特異的抗体検出システムが高い精度と感度を有していることは、これまでの検討で明らかにされた。平成14年度は、昨年度に引き続きCCHFV-rNPを抗原としたIgM-捕捉ELISAの診断における有用性を検討した。2001年と2002年の中国新疆ウイグル自治区におけるCCHF流行においては、10名の患者からCCHFウイルスゲノムが検出された。この10名の患者から発症11日以内に血液が採取され、組換え核蛋白を抗原としたIgM-捕捉ELISAを用いて、それらの血清におけるIgM抗体の推移を検討した。発症11日以内の患者6名から採取された血清がIgM-補足ELISA陽性を呈した。対象としての日本人血清96検体はすべて陰性を呈することが確かめられていることから、CCHFウイルス組換え核蛋白を抗原としたIgM-補足ELISAの診断における有用性が確認された。［西條政幸、唐青（中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所）、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎、森川茂］

2. 抗原検出ELISAによるクリミア・コンゴ出血熱の診断

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスの組換え核蛋白（中国分離株8402株）に対する単クローン抗体を樹立し、その単クローン抗体を用いた抗原検出ELISAを開発した。この抗原検出ELISAでは，組換え核蛋白だけでなくCCHFウイルス中国分離株である66019株をはじめ、中国で分離されたCCHFウイルス6株の核蛋白をそれぞれ高感度に検出できることが明らかにされた。Nested RT-PCRでCCHFと診断されたCCHF患者の急性期血清（IgG抗体およびIgM抗体ともに陰性）は、この抗原検出ELISAで陽性を呈した。平成14年度の新疆ウイグル自治区のCCHF流行期には6名の患者からウイルスゲノムが検出され、そのうち2名の患者から採取された血清がこの抗原検出ELISAで陽性を呈した。平成13年度の流行時における検討と総合すると、RT-PCR法でウイルスゲノム陽性で、IgG抗体、IgM抗体が陰性の血清7検体中3検体がこのELISAで陽性を呈した。これらのことから、RT-PCR法よりも感度が低いものの診断に有用であることが明らかにされた。今回の検討では、検体に血清を用いたが、CCHFウイルスの感染ターゲット細胞のひとつに単核球が含まれていることから、検体として全血を用いると、抗原検出ELISAの診断における感度を高めることが可能と考えられる。さらなる検討が必要である。［西條政幸、唐青（中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所）、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎、森川茂］

3. 中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学的研究

平成13年度には新疆ウイグル自治区における2001年のCCHF流行に関与したCCHFウイルスのS-遺伝子の塩基配列を決定し、これまで中国で分離されているCCHFウイルス（66019株，7001株，75024株，7803株，79121株，8402株）やNigeria分離株IbAr10200株のS-遺伝子塩基配列と比較して系統樹解析を行った。平成14年度は、さらに2002年の流行時の患者から得られたウイルスゲノムおよびダニから得られたウイルスゲノムを加えて、分子疫学的解析を行った。2001年度の流行は、66019株に近縁のCCHFウイルスによる流行であり、2002年の流行は、66019株近縁のCCHFウイルスおよび7803株に近縁のCCHFウイルスによる流行であることが明らかにされた。上記の中国分離株は系統樹解析上3つのクラスター（クラスターA：7001株，79121株；クラスターB：66019株；クラスターCa：88166株，HY13株，75024株，7803株；クラスターCb：8402株）に分類されるが、2002年度に採取されたダニから得られたウイルスゲノムには、これらの3つのクラスターに分類されない新しいクラスターに分類されるものが存在した。［西條政幸、唐青（中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所）、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎、森川茂］

4. リフトバレー熱ウイルス（RVFV）の組換え核蛋白の発現と精製

N-末端側にhistidineタグが付加された組換えRVFV核蛋白を発現する組換えバキュロウイルスを作製した。このウイルス感染細胞ではRVFVの組換え核蛋白が強く発現されることが確認された。その蛋白は比較的不溶性の蛋白であることが確認された。2Mの尿素で十分溶解させることができ、この条件でRVFVの組換え核蛋白を精製することが可能であった。今後は、RVFVを抗原とした抗体検出法と組換えRVFV核蛋白を抗原とした抗体検出法を比較して、後者の精度と感度を調べRVFV感染症の診断や疫学的研究における有用性を検討する予定である。［西條政幸、Brigden Kakonkanya (The Virology Laboratory, UTH, University of Zambia)、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎、森川茂］

5. フニンウイルスNPとラッサウイルスNPの血清学的交叉

ラッサウイルス、LCMウイルス、フニンウイルスの精製組換えNPと、それぞれのウサギ免疫血清、ラッサ熱患

者血清、アルゼンチン出血熱患者血清との反応性を ELISA 法で調べた。その結果、ラッサ免疫血清は LCM ウイルス NP と強く交叉しフニンウイルス NP とも比較的強く交叉した。LCM ウイルス NP 免疫血清も同様に、ラッサウイルス NP と強く交叉し、フニンウイルス NP とも比較的強く交叉した。フニンウイルス NP 免疫血清は、ラッサウイルス、LCM ウイルスの NP とは殆ど交叉しなかった。一方、ラッサ熱患者回復期血清は、LCM ウイルス NP と若干交叉したが、アルゼンチン出血熱患者血清は、ラッサ、LCM ウイルス NP とは交叉しなかった。この結果から、アルゼンチン出血熱の血清学的診断においては、近縁のアレナウイルスとの交叉に関しては問題にならないと考えられる。［森川 茂、Victor Romanowski (アルゼンチン、ラプラタ大学)、西條政幸、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎］

6. 痘そうワクチンの副作用予防に関する研究：痘そうワクチン Lister 株の抗ウイルス剤に対する感受性

天然痘ウイルスによるバイオテロリズムに備えて、我が国においても痘そうワクチンの生産が再開され、世界中から根絶されたはずの天然痘の再来に備えている。痘そうワクチン接種による副作用として、特に致死率の高い脳炎、播種性痘瘡疹などが挙げられる。この副作用に対する治療法は確立されていない。そこで、作用機序の異なるいくつかの抗ウイルス剤の痘そうワクチン（Lister 株）に対する増殖抑制効果を検討した。シドフォビル、ビダラビン、S2242 が痘そうワクチン（Lister 株）の増殖を選択的に抑制し、一方、DNA ポリメラーゼ阻害剤であるフォスカルネットとグアノシンアナログであるガンシクロビルは同ウイルスの増殖を全く抑制しなかった。また、carbocyclic oxetanocin-G、carbobyclic oxetanocin-A、リバビリンは同ウイルスの増殖を中等度に抑制をした。米国で使用が認可されているシドフォビル、我が国で抗ヘルペス剤として広く用いられているビダラビンは、痘そうワクチンの副作用に有用である可能性がある。また、S2242 も有望な薬剤である。［西條政幸、森川茂、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎］

7. グロブリン製剤のワクシニアウイルス中和抗体に関する研究

天然痘によるバイオテロリズム対策として、日本でも痘そうワクチンの製造が平成 13 年度に再開された。このワクチンに使用される LC16m8 株は、副反応が極めて低い株と考えられている。しかし、実際に臨床応用され広く用いられる場合、痘そうワクチンによる副作用の出現が懸念される。痘そうワクチンによる副作用や合併症の治療のひとつとして、ワクシニア免疫ヒトグロブリン(VIG)投与が挙げられる。しかし、現在、その入手は困難である。そこで、現在入手可能な通常のヒト免疫グロブリン製剤中に含まれるワクシニアウイルスに対する中和抗体価を測定した。その結果、50 から 100 国際単位の中和抗体が、通常のヒト免疫グロブリン製剤に含まれていることが確認された。VIG の中和抗体価は 500 国際単位と定められているため、この基準に照らして考慮すると、VIG の代用としてはヒト免疫グロブリン製剤を 10 倍量使用する必要がある。［前田秋彦、西條政幸、森川茂、緒方もも子、倉根一郎］

8. 細胞培養痘そうワクチンの B5R 欠損と有効性に関する研究

天然痘（痘そう）は、バイオテロに用いられた場合の危険度等から米国で category A に分類される。このため、日本でも痘そうワクチンの製造が平成 13 年に再開された。このワクチンに使用される LC16m8 株は、副作用の極めて低いワクチン株と考えられているが、B5R 遺伝子に一塩基（G）の欠失があるため欠失型の B5R 蛋白がコードされている。他の 5 種類の細胞外エンベロープウイルス（EEV）表面蛋白には、問題となる欠失はなかった。組換え蛋白免疫実験によると、欠失型 B5R は免疫原性が弱く抗原性も低いことが明らかにされた。また、通常の接種者には B5R 抗体は検出されなかった。ワクチニアウイルス高度免疫ウサギ血清では、B5R 抗体が検出されたが、その抗体価は低かった。マウスでは、Lister 株 B5R 免疫マウスでは致死量の WR 株感染に抵抗性を示したが、LC16m8 型 B5R 免疫マウスでは抵抗性を示さなかった。［森川 茂、長谷川秀樹・永田典代（感染病理部）、網康至（実験動物管理室）、前田秋彦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎］

9. アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）のチミジンキナーゼ（TK）における変異

近年、アシクロビルなどに対する薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症の報告が増加している。アシクロビル耐性 HSV-1 の迅速診断および同ウイルス感染症の治療に対する基礎的研究として、in vitro で作製した 24 株のアシクロビル耐性 HSV-1 の性状を解析した。また、23 株のペンシクロビル耐性 HSV-1 についても同様の検討を行った。アシクロビル耐性の 24 株中 12 株に TK 遺伝子に framshift 変異が、12 株に 1 塩基置換によるアミノ酸変異が認められた。後者の 12 株においては、8 株で 1 アミノ酸変異の伴う TK が、4 株で早期ストップコドン出現による C-末端のペプチドが欠損している TK が発現されることが確認された。一方、in vitro で作製された 23 株のペンシクロビル耐性 HSV-1 の 22 株で framshift 変異が認められ、1 株で 1 塩基置換に伴う早期ストップコドン出現により C-末端のペプチドが欠損している TK が発現されることが認められ、アミノ酸変異を伴う TK を発現する HSV-1 は認められなかった。アシクロビル耐性ヘルペスウイルスのアシ

クロビルに対する感受性とシドフォビルに対する感受性には負の相関が認められた。［西條政幸、錫谷達夫（福島県立医科大学微生物学教室)、前田秋彦、緒方もも子、森川茂］

Ⅱ．第二室

1. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス

日本脳炎ワクチンの効果評価をねらいの１つとして、11 都県の地方衛研との共同研究の形で、「日本脳炎ウイルスのサーベイランス」を開始した。各県の養豚場において新鮮感染が確認された時から遡って 1-2 週間前に採血、冷凍保存され、当研究室に送られた 8 県のブタ血清から日本脳炎ウイルスが分離された。その内で 6 株の E タンパク領域の遺伝子解析の結果、それらは、ワクチン株（北京１株）とは異なる遺伝子型Ⅰ型に分類された。[根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎、小川知子（千葉県衛研)、尾西一（石川県保環センター)、池ヶ谷朝香（静岡県西部食肉衛検）佐原啓二（静岡県環衛科研)、渋谷香（高知県衛研)、吉田靖子（東京都衛研)、杉山明（三重県科技振センター)、寺杣文男（和歌山県衛公研センター)、山西重機（香川県衛研)、小野哲郎（大分県衛環研センター)、田端康二（熊本県保環科研)、糸数清正（沖縄県衛環研）]

2. 細胞（Vero 細胞、C6/36 細胞）による、分離ウイルスの性状の比較解析

分離に用いる細胞により、産生される日本脳炎ウイルスの感染ウイルス量に明らかな違いが見られた。現在、その抗原性、遺伝子配列、病原性についての解析を進めている。[根路銘令子、野村秀和、高崎智彦、倉根一郎]

3. 日本脳炎を疑われる患者検体からのウイルス分離

日本脳炎を疑われる重篤な患者の髄液より、日本脳炎ウイルスが分離された。部分的な遺伝子配列の解析の結果、分離ウイルス JEV/Hu/Hiroshima/1/2002 と標準株 JEV/Mo/Gunma/01/1959(JaGAr01)とは、E 蛋白 2136-2458 領域の僅かに１塩基が異なるのみで、同じく遺伝子型Ⅲ型に属することが明らかになった。その他、４症例からのウイルス分離を確認試験中である。[根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎]

4. WHO collaborative study on assess the suitability of candidate reference material to serve as the International Standard for JE virus antibody.

日本脳炎に関する診断上きわめて重要である中和試験に関する世界的な標準ヒト血清、攻撃ウイルス株を統一するための６カ国８施設による研究事業を開始した。[根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、NIBSC(UK)、WHO)]

5. ウエストナイル熱･脳炎診断法の確立とサーベイランス体制の構築

1999 年 8 月に西半球で初めてニューヨークで発生した西ナイル脳炎の原因ウイルスである西ナイルウイルスは、日本脳炎ウイルスに近いウイルスである。そのため日本国内に侵入した場合、日本脳炎との鑑別が極めて重要となる。ウイルス遺伝子の検出のため、ニューヨークで分離されたウイルス株の遺伝子配列から、新たにプライマーを作製しその感度を検討した。また、CDC より分与された IgM 抗体陽性患者血清を用いて、IgM 捕捉 ELISA を開発し、成田空港における水際作戦を展開し、検査希望者に対し抗体検査、PCR 検査を実施した。その結果は全例陰性であった。その他、2002 年に発生した日本脳炎患者 7 例に関して検査を実施したが、いずれも陰性であった。また、米国における大流行を受けて、各地方衛生研究所等に対する病原体診断法に関する講習会を実施した（10 月 28 日)。［高崎智彦、伊藤美佳子、野村秀和、倉根一郎、松本泰治・横田勉・田中絹枝（成田空港検疫所)］

6. 現行日本脳炎ワクチンのウエストナイルウイルスに対する防御効果の検討

ヒトに対するワクチンの実用化の目途が立たないウエストナイルウイルスに対して、抗原性で極めて近似である日本脳炎ウイルスの現行不活化ワクチンの有効性をマウスにより評価した。その結果、日本脳炎不活化ワクチンで免疫したマウスは、ウエストナイルウイルス脳内接種に対しては効果が無かったが、腹腔接種である程度の防御効果を確認した。[高崎智彦、伊藤美佳子、野村秀和、根路銘令子、山田堅一郎、倉根一郎]

7. 黄熱ワクチンの副作用に関する研究

黄熱ワクチンは、流行地域に渡航する人に対して接種している、海外から輸入している旅行ワクチンであるが、近年多臓器不全により死亡した副作用報告があった。このため、弱毒生ワクチン株１７D 株が、野生株に変異する可能性を細胞培養法･乳のみマウス脳内接種法により、それぞれ５継代することにより検討した。その結果 E 領域に関して、遺伝子配列は変化が無かった。しかしながら、1985 年にサイエンスに報告された遺伝子配列と比較して 1 アミノ酸の変異があることを確認した。[高崎智彦、伊藤美佳子、野村秀和、根路銘令子、山田堅一郎、倉根一郎]

8. １９９６年－２００２年における輸入デング熱患者から分離されたウイルスの遺伝子解析

１９９６年から２００２年にデング流行地からの入・帰国者で、検査依頼のあった不明熱患者検体について輸入デングウイルス感染症を検討した。感染患者の大半はタイ、インド、フィリピン、インドネシアなど東南アジアからの帰国者であるが、タヒチ、グアテマラ、ナイジェリア、コートジボアール、ブラジルなどオセアニア、中南米、アフリカからの帰国者からも陽性例が検出されており、日本人旅行者が熱帯地域のどの地区でもデングウイルス感染を受けていると思われる。これらの輸入デング熱／デング出血熱患者から分離されたデングウイルス 36 株（1 型１７株、2 型７株、3 型５株、4 型４株）に関して E 領域の遺伝子解析を実施した。[伊藤美佳子、山田堅一郎、野村秀和、高崎智彦、倉根一郎、三輪俊樹・高橋正樹・横田勉・田中絹枝（成田空港検疫所)］

9. デングウイルス感染症の実験室内診断―種々の測定法による抗体価の検討―

デングウイルス感染症の実験室内診断としては、主として RT-PCR 法と ELISA 法による抗体測定等が行われている。そこで RT-PCR 法で型別を確定された患者血清を用いて、種々の抗体測定法について比較検討を行った。プラック法による中和抗体価が、PCR 法による血清型別と一致したものは、10/13 例（77%）であり、血清型別における特異性の高さを示した。また、プラック法による中和抗体価は、8 病日から 70 病日まで、PCR 法による血清型別と一致しており、抗体測定における血清型別の有用性が示された。[山田堅一郎、高崎　智彦、倉根　一郎、田部井由紀子・吉田　靖子・平田　一郎（東京都立衛生研究所　微生物部)、名和　優（埼玉医科大学・微生物学）]

10. 日本人デングウイルス感染者における日本脳炎ウイルスとの抗体交差反応性の検討

日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有する日本人デング患者（輸入症例）の血清を用いて、赤血球凝集抑制（HI）抗体および中和抗体の交叉反応性を解析し、中和試験がより信頼性があることが確認されたが、中和抗体が十分上昇する 8 病日以降であれば、日本脳炎とデングウイルス感染症を鑑別することが可能であることが明らかとなった。[山田堅一郎、矢部貞雄、高崎智彦、倉根一郎、名和　優（埼玉医科大学微生物学）]

11. 日本脳炎ウイルス中和様式の解析

日本脳炎ウイルス(JEV)のエンベロープ(E)タンパクに対するモノクローナル抗体には、(1)ウイルス中和(N)活性と血球凝集抑制(HI)活性を共に示す抗体。(2)N 活性は示すが HI 活性を示さない抗体がある。これら生物学的性状の異なる抗体と JEV との反応を解析することにより、JEV の宿主細胞への感染様式につき検討した。ウイルス中和活性が①細胞への吸着抑制による場合、②ウイルスの吸着以後の感染初期過程の抑制による場合が考えられ、実験結果より、N 活性と HI 活性をともに有する抗体は、ウイルスの細胞への吸着を抑制した。N 活性を有するが HI 活性を示さない抗体は、ウイルスの細胞への吸着を抑制しなかった[高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎、名和　優・赤塚俊隆（埼玉医科大学微生物学）]

12. 針無圧力注射器を用いた日本脳炎不活化ワクチン接種による中和抗体誘導

現行日本脳炎ワクチンの免疫誘導効果を高めるために、注入液が広範囲に筋肉内に拡散する特徴のあるインシュリン注射用の針無圧力注射器（医療器具として現在使用されている）を用いてマウスに筋注し、その効果を検討したところ、5 倍程度の高い中和抗体誘導能を示した。[高崎智彦、伊藤美佳子、根路銘令子、山田堅一郎、倉根一郎]

13. RT-PCR および RFLP 法によるブラジル各種動物由来の狂犬病ウイルスの鑑別診断

ブラジルにおいて特異的に維持されている Dog-related rabies virus (DRRV)と Vampire-bat related rabies virus (VRRV)伝播サイクルを解明するため、DRRV および VRRV27 検体をヌクレオプロテイン遺伝子 1396 塩基を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。塩基配列情報に基づいて由来ウイルスに特異的に反応するプライマーを作製して RT-PCR 解析を行うと共に、3 種類の制限酵素(*Blp*Ⅰ、 *Bsu*36Ⅰおよび *Bsp*EⅠ)を用いた PCR 産物の消化パターンを解析する RFLP 法により、狂犬病ウイルスを分類した。DRRV および VRRV は制限酵素 *Blp*Ⅰおよび *Bsu*36Ⅰを用いることによって明確に分類され、由来ウイルスに特異なプライマーを用いた RT-PCR 解析の結果と一致した。　由来ウイルスに特異なプライマーを用いた RT-PCR 法および制限酵素を用いた RFLP 法は、遺伝子解析を行わなくてもブラジルの狂犬病ウイルスの由来を特定できる迅速かつ簡便な分子疫学的解析法であることが明らかとなった。[伊藤美佳子、伊藤琢也（日大・獣医衛生)、新井陽子、Itou.　H. Fumio(University of Sao Paulo)、 高崎智彦、倉根一郎、酒井健夫（日大・獣医衛生）]

Ⅲ. 第三室

1. 日本の狂犬病ウイルスの起源に関する解析

日本での狂犬病は 1970 年にネパールで野犬にかまれ発症死亡した症例以外には、1957 年以降発生していない。われわれは、過去の日本の狂犬病ウイルスがどのような経路によって侵入し流行したかを知る目的で、世界の狂犬病ウイルスの N 遺伝子 133 株と実験室で保存されている日本の株と比較解析した。その結果、これらのウイルスは少なくとも９のクラスターに分けられた。過去の日本の狂犬病ウイルス高免（高橋株由来)、西ヶ原株はヨーロッパ、中近東、アフリカ等と最も広い地域で分離されたウイルスのグループに属し、そのうちの中国の株と同じクラスターを形成した。小松川株は北極、ロシア、カナダ等のグループに属し、そのなかのハバロフスク、バイカル湖地域で分離されたウイルス株と同じクラスターを形成した。過去の日本の狂犬病ウイルスは、中国とロシアで分離されたウイルスに近く、これらの地域から日本に入ったと考えられた。[新井陽子、亀岡洋祐（遺伝子資源室）]

2. 中央アジアのキルギスタンとタジキスタンのコウモリ（Myotis genus）から分離された２つのリッサウイルスの解析

昨年に引き続き中央アジアのコウモリからのリッサウイルスの分離同定をおこなった。Aravan ウイルスは、1991 年キルギスタンで、Khujand ウイルスは、2001 年にタジキスタンのコウモリから分離された。この 2 種類のリッサウイルスの N、G、P 遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析をおこなった。これらのウイルスは、アジアにおける狂犬病ウイルス以外のはじめてのリッサウイルスであり、新しい遺伝子型が示唆された。また 1983 年にノボシビルスク、1995 年にオムスクのコウモリから分離されたウイルスは狂犬病ウイルス CVS 株と一致し、実験室内での継代によるコンタミが考えられた。今後、コウモリからのリッサウイルスが、アジアの地域でも公衆衛生上問題となる可能性があり、またリッサウイルスの分類学においても重要となろう。[新井陽子、亀岡洋祐（遺伝子資源室)、米国 CDC との共同研究]

3. 狂犬病ウイルス HEP-Flury 株を用いた cDNA 発現系の開発

狂犬病ウイルスの組換えウイルス作製法を目指し、ヒト用ワクチン株である HEP-Flury 株の cDNA 発現系を確立した。先ず、HEP-Flury 株各蛋白質遺伝子の cDNA クローニング、発現プラスミドへの組込みを行ない。さらにゲノム完全長 cDNA のクローニング、プラスミドへの構築を行なった。それら cDNA プラスミドを培養細胞にトランスフェクトし狂犬病ウイルスが産生されるよう種々の条件検討を行ない。cDNA プラスミドより狂犬病ウイルスを産生させる系を確立した。この系を利用することにより、狂犬病ウイルスに容易に変異を導入することやいろいろな遺伝子を挿入したりすることが可能となった。狂犬病ウイルスの病原性機構を分子レベルで解析することさらにはより安全で有効な組換えウイルスワクチンの作製が可能となる。[森本金次郎、井上智（獣医科学部)、井上謙一、飯島敏夫（東北大・生命科学)、庄司洋子、酒井健夫（日大・獣医衛生)、倉根一郎]

4. 狂犬病ウイルス cDNA 発現系を利用した増殖欠損ウイルスの作製

狂犬病ウイルスのヒト用ワクチン株である HEP-Flury 株の cDNA 発現系を利用して。狂犬病ウイルスの P 遺伝子を欠損したウイルスを作製し、そのウイルスの性状を in vitro 及び in vivo で解析した。この P 遺伝子欠損ウイルスは P 蛋白質発現細胞でのみ増殖可能で、マウスでの病原性が全くないことが分かった。さらに、ワクチンとしての防御効果があることが示された。より安全で有効な組換えウイルスワクチンとしての利用や遺伝子発現ベクターとしての応用が考えられる。また、この P 遺伝子欠損ウイルスは狂犬病ウイルス標品の感染性のないポジティブ検体としての利用にも有用である。[森本金次郎、中道一生、倉根一郎、井上智（獣医科学部)、庄司洋子、酒井健夫（日大・獣医衛生)]

5. 狂犬病ウイルス cDNA 発現系を利用した神経病原性の解析

狂犬病ウイルス固定毒の中には末梢感染からでも病原性を持つものから、脳内感染においても発症しないものまで、病原性の強弱に様々な程度の差がある。狂犬病ウイルスのヒト用ワクチン株である HEP-Flury 株の cDNA 発現系を利用して、cDNA 上で変異を導入することにより変異ウイルスを作製し、あるいは異なる株の遺伝子と取り替えることにより、いろいろ組換え狂犬病ウイルスを作製した。さらに発光遺伝子(GFP, DsRed)を持つ様々な組換え狂犬病ウイルスの作製を行なった。このような組換え狂犬病ウイルスを利用して、狂犬病ウイルスの神経病原性の機構を解析中である。[森本金次郎、中道一生、倉根一郎、庄司洋子、酒井健夫（日大・獣医衛生)]

6. 狂犬病ウイルスを利用した神経伝達機構の解析

狂犬病ウイルスは逆向性に軸索を伝って伝播することが分かっている。この性質を利用し、狂犬病ウイルス HEP-Flury 株を用いた cDNA 発現系を利用して、神経伝達の解析に適するよう狂犬病ウイルスの改変を行ない。神経伝達のトレーサーとしての有用性を解析している。[森本金次郎、倉根一郎、井上謙一、飯島敏夫（東北大・生命科学)]

IV. 第四室

１．EB ウイルス（EBV）の潜伏感染に必須な EBV 核抗原-１は細胞 DNA の複製部位が集合する場“複製フォーカス”に局在するー潜伏感染の新しいメカニズム

細胞核に局在する EBNA-1(Ito et al., 2000)は、EBV 潜伏感染の維持に必須な唯一つの EBV タンパク質である。EBNA-1 は潜伏感染 EBV DNA の複製起点領域 *oriP* と分裂期細胞染色体に結合する。我々は EBNA-1 が間期細胞クロマチン特にその新生領域に局在することを報告した(Ito et al., 2002)。細胞周期あたり一回だけ起こる EBV プラスミドの複製に、EBNA-1 が決定的役割を果たすメカニズムを明らかにするために、S 期細胞核内の EBNA-1 の局在の場を探った。EBNA-1 タンパク質およびその欠損変異体と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質（GFP-EBNA-1）発現ベクターを構築した。Ｓ期同調培養およびフローサイトメトリー、Cy3-dUTP（赤色蛍光）DNA パルス標識、DNA 複製タンパク質の免疫染色、レーザー顕微鏡による共焦点顕微鏡分析、免疫沈降分析などを行った。共焦点顕微鏡観察により、GFP-EBNA-1 が細胞 DNA の複製フォーカスに高度に局在することを発見した。EBNA-1 変異体分析の結果は、この共局在には RP-A 以外の細胞核タンパク質が介在するであろうことを示唆した。本研究は、EBV が潜伏感染していない細胞において、EBNA-1 が細胞 DNA の複製フォーカスに局在することを明らかにした。EBNA-1 の *oriP* 配列への結合（Fujita et al., 2001; Kusano et al., 2001）と合わせて考察すると、以上の結果は EBNA-1 が潜伏感染 EBV DNA を細胞 DNA の複製の場に取り込む可能性を示す。本研究は、ウイルスが細胞周期の制御を受けつつ潜伏感染を持続するための新しいストラテジーを示唆する(Ito & Yanagi, 2003)。[伊藤さゆり、柳　壹夫]

２．EBV 核抗原-１は細胞核ラミナ(nuclear lamina)の成分であるラミン B1 タンパク質と核質および核膜沿いに局在するーEBNA-1 の新しい局在性

EBNA-1 が細胞核の核質内の多くの顆粒状に高密度に局在することは広く観察されてきたがその実体は全く不明であった。我々はその顆粒構造が S 期の細胞においては細胞 DNA の複製フォーカスであることを上記の研究で解明し報告した（Ito et al., 2003）。EBNA-1 タンパク質の核内における局在と存在状態の探索を進める過程で、我々は EBNA-1 タンパク質が核膜に沿った局在のパターンを示す細胞が観察されることを見出し、その性質を分析した。EBV 核抗原-１が、細胞核ラミナ(nuclear lamina)の構成成分でありかつ核質にもスポット状に存在するラミン B1 タンパク質と核膜沿いおよび核質に局在することを明らかにし、報告した（Ito et al., 2003）。最近、核ラミナおよびその成分は細胞核の構造と機能に重要な役割を果たしていることが示唆されており、本研究は EBNA-1 の作用メカニズムの解明に意義を有する。[伊藤さゆり、柳　壹夫]

３．EB ウイルス（EBV）核抗原-１の細胞核内輸送のメカニズムの研究

我々は数年前に、EBV 核抗原-１(EBNA-1)が、細胞核タンパク質の細胞質から細胞核内への移行に重要な役割を果たす核輸送因子カリオフェリンアルファー１（NPI-1）とカリオフェリンアルファー２（Rch1）と結合することを報告した（Ito, S. et al., 2000）。その後、これらの因子が実際に EBNA-1 タンパク質の核内輸送に寄与しているかどうかの検討を進めてきた。その目的で部位特異的点変異法により EBNA-1 のアミノ酸置換変異体を作成した。EBNA-1 点変異体の性質の分析により、EBNA-1 の核内移行の調節メカニズムに関する研究を行った。[伊藤さゆり、北村　亮、柳　壹夫]

４．EB ウイルス（EBV）核抗原-２と EBV 核抗原-１に対する IgG 抗体の健康人年齢分布および伝染性単核症患者の EBV 抗体応答—EBV 感染の動態

EBV 核抗原-２(EBNA-2)と EBV 核抗原—１(EBNA-1)を個別かつ高率に発現する種々の細胞株を作成した（Harada and Yanagi, 1992）。その応用として蛍光抗体法によるヒト血清抗体の分析系の開発と血清疫学的研究を行ってきた。我が国の EBV 感染は、幼少期における高率の初感染に特徴があることに着目し、健康人の EBNA-2 と EBNA-1 に対する IgG 抗体の年齢群別分析を進めた。さらに、比較のために EBV 初感染によって発症する伝染性単核症患者における EBV 抗体応答を分析した。（投稿中）[原田志津子、北村　亮、柳　壹夫]

５．EB ウイルス核蛋白 EBNA-LP の相互作用蛋白同定

EB ウイルス感染のごく初期に発現する核蛋白 EBNA-2 と EBNA-LP はウイルス潜伏感染成立に必須の蛋白である。EBNA-LP が EBNA-2 の転写活性化補助因子として機能する事を筆者はすでに報告しているが、その機構の解明の為、EBNA-LP と相互作用する細胞性蛋白の解析を続けている。酵母２ハイブリッド法や免疫沈降法で作用蛋白を検索したところ、いくつかの候補蛋白が得られた。そのうちのアポトーシス関連蛋白等について機能解析をおこなった。[原田志津子]

６．EB ウイルス核蛋白 EBNA-LP 変異体のドミナントネガティブ効果

いくつかの EBNA-LP 変異体を作成し機能を解析する過

程で、あるカルボキシ末端欠損変異型 EBNA-LP が自身の補因子機能に関して抑制の働きをする事を発見した。このドミナントネガティブ効果が導入遺伝子量に比例することや、変異型 EBNA-LP が野生型分子と多量体を形成することなどを明らかにした。EB ウイルス感染によるリンパ腫細胞の遺伝子発現解析に関してこの変異体の応用利用を検討している。[原田志津子]

７．水痘ウイルス ORF6ーPCR と RFLP 解析による Oka ワクチン株識別法の開発

VZV の野生株と Oka ワクチン株を正確に区別する新しい方法を開発した。野生株、Oka 親株、Oka ワクチン株 DNA の ORF1-37 領域を PCR で増幅し、産物の RFLP を比較した。ORF6,ORF10,ORF35 でワクチン株と親株や他の野生株との間にヌクレオチドの変異がみられた。Oka 親株と Oka ワクチン株をプラック精製し、いくつかのクローンについてこれらの変異点の塩基配列を調べた。Oka ワクチン株の 11 クローンには少なくても３遺伝子型があり、全 11 クローンで変異が認められたのは ORF6 の AluI 切断点（nt5745）だけであった。一方 Oka 親株の４クローンは単一の塩基配列を示した。VZV の ORF6 を増幅しその産物を AluI で切断すると、Oka ワクチン株をその親株や 60 株以上の日本および国外の野生分離株から正確に区別することができた。ORF6 領域は、GC 含量が多い ORF62 領域より容易な条件で増幅できるので、ORF6 の AluI 切断点は、ORF62 の SmaI 切断点に代わりうる有力なマーカー であることが判明した。[高山道子]

Ｖ．第五室

1. 動物園職員オウム病集団発生事例の感染源についての検討

2001 年 6 月に神奈川県の動物園で飼育しているヘラジカの出産介助に起因する *C.psittaci* 感染症集団感染事例で、分離株の生物学的特徴の詳細について引き続き検討した。ヘラジカからの分離株の生物学的特徴と感染経路の特定については、ヘラジカからの分離株は *C.psittaci* であり、また周辺の鳥の関与が疑われたが、分子生物学的解析ではハトの株に最も近いことが判明した。そこでヘラジカへの感染経路を特定するため、動物園のヘラジカ舎付近のハトとカラスを捕獲し、その中のハトの１羽の総排泄腔スワブから検出された遺伝子の解析を行なっているが、現在までの解析でヘラジカ *C.psittaci* からの株とほぼ一致しており、ハトが動物への感染源になり得るかさらに詳細な検討を行なう予定である。[小川基彦、蔡　燕、岸本寿男、志賀定祠、多田有希（川崎市健康福祉局健康部疾病対策課)、福士秀人（岐阜大学獣医学家畜微生物）]

2. ヘラジカ出産介助に起因するオウム病5症例の臨床像の解析

集団発生事例の 5 症例はそれぞれ獣医師の 52 歳男性。飼育係の 45 歳男性。獣医師の 29 歳男性。飼育係の 37 歳男性。飼育係の 52 歳男性で、潜伏期間は 6～10 日で、高熱と悪寒、頭痛などで全例発症し、2 例で咳嗽を伴い、うち 1 例は肺炎であった。背部痛または腰痛を 3 例に認めた。抗クラミジア薬が使用された 4 例では奏効し、1 例は自然治癒した。全例 CRP 上昇を認めるも白血球増多はなかった。症状はオウム病の臨床像に一致していた。[岸本寿男、小川基彦、蔡　燕、志賀定祠、倉根一郎、吉川　徹（労働科学研究所研究部）、多田有希（川崎市健康福祉局健康部疾病対策課）、藤井逸人･中島一敏･大山　卓（感染症情報センター実地疫学調査チーム(FETP)）、新井　智･岡部信彦（感染症情報センター）]

3. オウム病の動植物展示施設における集団発生事例の検討-検出クラミジアの分子生物学的検討

2001 年 12 月、島根県の動植物展示 A 施設において発生したオウム病集団感染事例でトリから得られた株について、A 施設で得られた病原体と他の C 施設国内分離株を含めて分子生物学的に比較検討した。鳥の総排泄腔スワブの PCR 検査でクラミジア遺伝子陽性であった 18 検体(A 施設９検体、C 施設９検体)の PCR 産物、および同材料から分離したクラミジア７株(A 施設６株、C 施設１株)について、主要外膜蛋白(MOMP)遺伝子配列を決定し比較した。分離株の基本小体(EB)を精製し、SDS-PAGE による泳動パターンを比較すると同時に、鳥由来標準株 6BC や、従来の国内発症オウム病症例の鳥分離株とも比較した。A 施設由来株の遺伝子配列は他施設の株や従来の国内株と 14～18 塩基対の相違があり、大きく異なっていた。また、EB 蛋白質の SDS-PAGE 泳動パターンを比較した結果、A 施設株の MOMP 分子量は約 42kDa、一方、他施設株および国内標準株 Budgerigar No.1 の MOMP 分子量は 40kDa で、これらの株間で差が見られた。[蔡　燕、岸本寿男、小川基彦、志賀定祠、倉根一郎、田原研司・板垣朝夫（島根県環境保健科学研究所)、福士秀人（岐阜大学獣医学家畜微生物）]

4. オウム病集団発生分離株と患者血清との免疫学的反応性についての検討

島根県の A 施設で感染した患者の血清を用いて、A 施設と他施設由来株の精製 EB 蛋白との反応性についてウエスタンブロッティング法(WB)にて比較解析した。A 施設で感染し発症した患者血清の MOMP に対する反応性は、１７例中３例で A 施設由来株に対しては特徴的に反応するバンドが認められたが、C 施設由来株および Budgerigar No.1

では１例も認められなかった。一方、過去に国内で発生したオウム病患者血清の MOMP に対する反応性は、C 施設由来株および Budgerigar No.1 に対しては特徴的な反応バンドが認められ、A 施設由来株に対しては認められなかった。以上のことから、今回 A 施設で分離されたクラミジア株が集団発生の原因菌の一つである可能性は高いと考えられた。他の株によるものも含まれている可能性も否定できないため、さらに検討する必要があると考えている。[蔡　燕、岸本寿男、小川基彦、志賀定祠、倉根一郎、田原研司・板垣朝夫（島根県環境保健科学研究所)、福士秀人（岐阜大学獣医学家畜微生物)、松井珠乃・中島一敏（感染症情報センター実地疫学調査チーム(FETP))、岡部信彦（感染症情報センター）]

5.　トリに対するオウム病クラミジア治療法の検討

トリに対するオウム病クラミジアの治療効果を検討するため、オウム病集団発生事例の起こった A 施設の全てのトリに約 3 週間の TC 系抗菌薬（クロールオキシテトラサイクリン）を投与し,その治療前後のトリ由来検体で PCR による検出を試みた。治療後、3 週間以上経過した時点で検体採取を行ったが PCR 法では陰性であった。また投薬前に *C.psittaci* 遺伝子が検出された鳥については、さらに６ヶ月後の陰性の維持を確認した。[岸本寿男、小川基彦、蔡　燕、志賀定祠、アグス・セティヨノ、倉根一郎、田原研司・板垣朝夫（島根県環境保健科学研究所)、福士秀人（岐阜大学獣医学家畜微生物)、松井珠乃・中島一敏（感染症情報センター実地疫学調査チーム(FETP))、岡部信彦（感染症情報センター）]

6.　肺炎クラミジア感染症の血清診断における特異 IgM 測定の有用性の検討

肺炎クラミジア感染症の血清診断において、適切な時期のペア血清を得ることが困難なため、IgG 並びに IgA の測定意義は必ずしも高くない。そこでシングルでも診断的意義が高いとされる特異 IgM 測定の有用性を、ペア血清が得られた市中肺炎例 168 例を対象に、ELISA 法ヒタザイム C.ニューモニエ(日立化成)、micro-IF 法を比較し検討した。それぞれ IgG,A,M (IgM は RF を除去処理後測定)について比較した。IgG では ELISA、micro-IF ともに急性感染の基準を満たしたものはなく、IgA でも ELISA が２例のみで、micro-IF では有意な上昇を認めたものはなかった。一方 IgM では ELISA で ID1.60 以上が 25 例、micro-IF で 32 倍以上が 14 例あり確定診断の診断率が高かった。IgM 測定は、成人市中肺炎例において、ELISA 法、micro-IF 法ともに確定診断に有用であり、ELISA 法は micro-IF 法に比べより診断率は高かった。[志賀定祠、岸本寿男、小川基彦、中浜　力（中浜医院)、川越清隆・増田周子（日立化成）]

7.　本邦における Simkania の血清疫学

Simkania negavensis(S.negavensis)はイスラエルの Kahane らが 1993 年に分離報告し、現在クラミジア目シムカニア科に分類されている微生物である。欧米で気道感染症との関連が報告されているが、本邦での疫学データはない。そこで S.negavensis (ATCCVR-1471)を抗原として micro-IF による Simkania の血清疫学を行った。対象は健常成人 280 人で血清 IgG 抗体価が 8 倍以上を陽性とした。陽性は 39 人(13.9%)で、本邦においても Simkania 感染が存在することが明らかになった。今後さらに年齢別抗体保有率や呼吸器感染症での関与について検討するとともに、ELISA や感染細胞を使った抗体価測定を行い比較する予定である。[山口徹也、岸本寿男、山崎　勉、小川基彦、蔡　燕、アグスセティヨノ、志賀定祠]

8.　成人市中肺炎でのクラミジア及びＱ熱の関与についての多施設検討

全国の一次医療機関 20 施設を受診した成人市中肺炎の軽・中等症の症例で、2000 年 11 月以来、現在までに集積された 168 例の臨床的検討を行なった。当室ではクラミジア 3 種、Ｑ熱の各種検査を実施した。起炎菌診断率は 74%で、細菌性 36%、細菌とクラミジアの混合型が 12%、非定型菌が 26％であった。クラミジアの関与では *C.pneumoniae* が単独では 17%と肺炎球菌、マイコプラズマについで多かったが、複数菌の関与としては *C.pneumoniae* が最もも多かった。Ｑ熱は３例で関与が疑われた。市中肺炎での肺炎クラミジアの重要性が再確認された。[岸本寿男、小川基彦、志賀定祠、中浜　力(中浜医院)、斉藤　厚(琉球大学第一内科)、松岡喜美子(大阪府立病院臨床検査部)、川越清隆・増田周子(日立化成)]

9.　ヒノキチオールの抗クラミジア効果についての検討―形態学的検討

ヒバより抽出され、種々の細菌に対して増殖抑制効果を有することが報告されているヒノキチオールについて、in vitro での *C.trachomatis* に対する抑制作用について検討し、電子顕微鏡による形態学的変化を観察した。32μg/ml で封入体の形成は完全に抑制された。また感染 10 数時間経過した後に同じ濃度のヒノキチオールを加え、80 時間後に電子顕微鏡で観察したところ、薬剤を加えた時点で増殖が停止しており、ヒノキチオールの抗クラミジア効果が認められた。[山野宏晃、岸本寿男、山崎　勉、小川基彦、志賀定祠]

10.　急性Ｑ熱患者における血清抗体価の推移と *Coxiella burnetii* 遺伝子の検出

オーストラリアの農場視察旅行に参加した畜産関係者３名が現地で感染し，帰国後発症した典型的な急性Q熱の症例を経験したので，患者の抗体価推移および血中からの遺伝子検出を長期間検討した.3症例すべてで,*Coxiella burnetii* 2相菌に対するIgMおよびIgG抗体がともに急性期と比較して回復期で 4 倍以上上昇し，IgM および IgG 抗体価の最高値は，それぞれ 1024～2048 倍および 512～4096 倍であった．仮の診断基準として「IgM≧64 かつ IgG≧512」をあてはめると，患者 A では 45 病日間，患者 B では 199 病日間および患者 C では 122 病日間で陽性と診断され，診断基準として実用的であることが示唆された．また，症状が重い患者Aのみから*C. burnetii*遺伝子が検出された．一方で，患者 B および C からは検出されず，発症直後の急性極期の検体を用いて検討する必要性が示唆された．今回の解析で，実験室診断法の適切化および標準化を行う上で重要な情報が得られた．今後は，国内症例との比較・検討を行い，わが国に適した血清診断法および遺伝子検出法の確立を行っていく予定である．[小川基彦、岸本寿男、志賀定祠、河本知秀（河本医院)、 川本 歩（鳥取県衛生研究所)、山下照夫（愛知県衛生研究所)、打田裕一（協立病院)、加藤活大（厚生連加茂病院）]

11. 急性Q熱の血清診断における ELISA キットの応用についての検討

Q熱の簡便な血清診断法の標準化のため，今回, 急性Q熱の輸入 3 症例の血清を用いて,欧米で使用されている ELISA キット（PanBio 社）を使用し IFA 法と比較した.急性感染の判定基準は IgG については ELISA キットではインデックス値(ID)>11 で,IFA は 1:512 以上,また IgM では ELISA キット ID>11 で,IFA は 1:64 以上とした.この判定基準を満たした血清は,それぞれ IgG で ELISA が 15 検体,IFA が 16 検体で,IFA に対する ELISA の感度は 93%であった.一方 IgM では ELISA が 17 検体,IFA も同じく 17 検体で,IFA に対する ELISA の感度は 100%であった.しかし,各抗体価での特異性(ELISA 陰性/IF 陰性)をみると,IgG では 100%,IgM では 40%であった.次に 3 症例の経時的な血清にて,2 つの測定法で抗体検出の時期と推移を見たところ,IgG についてはほとんど差はなかったが,IgM では 2 例で ELISA がより長期間にわたって検出可能であった.今回用いた血清では,本 ELISA キットによるQ熱抗体測定はほぼ IFA 法と同様の推移を示し,また感度も同等と思われた.今後検体数を増やしてさらに臨床使用の有用性を検討する予定である．[アグス・セティヨノ、小川基彦、志賀定祠、蔡 燕、岸本寿男、倉根一郎、高橋 洋（坂総合病院）渡辺 彰（東北大学加齢医学研究所）]

12. トルコのダニ媒介性不明疾患におけるリケッチア症に関する調査

トルコ中央部やや北よりの県で、不明疾患が問題になり、５月下旬患者１４名集中的に発生し，４名が死亡した．ある河にそって発生し、周辺地区に注意を促した結果、把握患者数２０名が確認された。季節的に例年この時期に発生し、多くの患者にダニ刺口が認められ，doxycycline が有効であった。また，患者には，血小板減少,発疹,発熱， ALT 上昇、AST 上昇、出血、出血傾向などが認められたため，エーリキア症，リケッチア症を疑い，トルコの保健省から検査依頼があった．血清診断の結果,*Ehrlichia chaffeensis*，*Orientia tsutsugamushi* Karp および Gilliam 株,*Rickettsia typhi* に対する抗体価は認められなかった．紅斑熱リケッチアの *R.japonica, R.conori, R.akari* に対する 32～64 倍程度（polyvalent）の抗体価が認められた．また，全てのエーリキアを増幅可能なＰＣＲ法の結果，23 検体中 9 検体に陽性コントロールと同じサイズの産物がみられたが，シークエンスの結果，他の菌の混入であった．顆粒球エーリキアに特異的なＰＣＲ法の結果は，全て陰性であった．次に紅斑熱群およびチフス群リケッチアを増幅可能なＰＣＲ法の結果，23 検体中 9 検体に陽性コントロールと同じサイズの産物がみられたが，シークエンスの結果，非特異反応であった．また，紅斑熱群リケッチアに特異的な 2 つのＰＣＲ法の結果は，全て陰性であった．以上の結果から，ツツガ虫病，紅斑熱群，チフス群リケッチア，エーリキアが，今回のアウトブレイクの原因とは断定できなかった．[小川基彦、アグスセティヨノ、岸本寿男、海保郁男（千葉県衛生研究所）]

13. Q熱と慢性疲労症候群に関する研究

2002 年 3 月から慢性疲労症候群様患者を対象にQ熱の血清診断および PCR 法による遺伝子検出を行った．37 名中，IgG が 2～64 倍認められた患者が 2 名，IgM が 32 倍認められた患者が 1 名であった．また，いずれの患者からも PCR 法による遺伝子は検出されなかった．今回の結果からは，抗体価が高い症例はなく，遺伝子も検出されなかったので，Q熱と慢性疲労症候群の関係は強く示唆されなかった．今後も，慢性疲労症候群とQ熱の関係について継続して検討していく予定である．[小川基彦、袴田泰弘（静岡県立病院）]

VI. 検定、検査及びレファレンス業務

1. 日本脳炎不活化ワクチンの国家検定および依頼検査

平成１４年度は42ロットの日本脳炎ワクチンの国家検定を実施し、41ロットを合格と判定した。1ロットについては、再抜き後再試験を実施した結果、不合格と判定した。[根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎]

2. 黄熱ワクチンの依頼検査

平成１４年度２ロットの黄熱ワクチン行政検査を実施した。[高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎]

3. 日本脳炎、ウエストナイル熱、デング熱、黄熱の行政検査

日本脳炎の行政検査は5件、いずれもウエストナイルウイルスとの鑑別診断もその目的であり、ウエストナイルウイルスの検査も実施した。デング熱は１件、黄熱のワクチン接種後の症例に関して１件、それぞれ検査を実施した。ウエストナイル熱に関しては、骨髄移植ドナーに関する行政検査を一件実施した。[高崎智彦、根路銘令子、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎]

4. ウエストナイルウイルスの行政検査

カラスの集団死亡事例に関して、神奈川県からと外務省からの依頼により、それぞれ行政検査を実施した。[高崎智彦、野村秀和、倉根一郎、山田章雄・棚林　清・井上　智（獣医科学部)、佐多徹太郎・岩田奈織子（感染病理部)、倉田　毅]

5. 狂犬病ワクチンの検定

乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン2ロット(1302、1401)について、生物学的製剤基準に基づいて、力価試験及び不活化試験を行い、合格と判定した。[新井陽子、森本金次郎、倉根一郎]

6. 水痘ワクチンおよび水痘抗原の国家検定

乾燥弱毒生水痘ワクチン製剤６ロットの国家検定品を受理した。メーカー自家試験記録を検討し、生物学的製剤基準に沿って力価試験と表示確認試験を行った。乾燥弱毒生水痘ワクチン製剤の依頼検査品９ロットを受理し、国家検定に準拠して自家試験記録を検討し、依頼検査指定項目について試験を行った。以上の合計１５ロットの全てについて合格と総合判定した。[高山道子、原田志津子、柳　壹夫、倉根一郎]

7. 体外診断薬の依頼検査

クラミジアトラコマチスの体外診断試薬の依頼検査として遺伝子検出キット２件について感度、特異性、再現性の試験を行った。[小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、倉根一郎]

8. リケッチア及びクラミジア感染症に関する検査業務

オウム病クラミジアの血清診断について行政検査を１７例について行った。肺炎クラミジア、オウム病クラミジア、クラミジアトラコマチスの血清診断と分離培養、PCR について依頼検査を計約 300 例 600 検体行った。ツツガ虫病，紅斑熱群リケッチア症，Q熱に関する検査を計約50例100検体行った.紅斑熱群リケッチア陽性が1例、ツツガ虫病陽性が１例であった．いずれも、血清診断は陽性であったが、PCR 法により遺伝子は検出されなかった．[小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、倉根一郎]

9. リケッチア及びクラミジア感染症に関するレファレンス業務

クラミジア分離培養用の細胞を国内 6 施設、海外１施設に分与した。肺炎クラミジア、オウム病クラミジア、クラミジアトラコマチスの血清診断用の抗原、分与用生菌の作成及び調整を行った。それらを国内 9 施設、海外 2 施設の共同研究機関に分与した。ツツガ虫病、紅斑熱群リケッチア症、Q熱および発疹チフスの血清診断用抗原および分与用生菌の作成および調整を行った．また地方衛生研究所および海外（韓国，オーストラリア）の共同研究機関への分与を行った．[小川基彦、志賀定祠、岸本寿男]

VII. 協力研究員、研究生、実習生等

・第一室
協力研究員　　４名（樗木俊聡、小安重夫、池上徹郎、Brighden Kakonkanya）
実習生　　１名（石橋智子）
・ 第二室
協力研究員　　７名(名和　優、吉田靖子、山本　晃、原田　誠、飯塚信二、中山幹男、矢部貞雄）
客員研究員　　１名（鈴木隆二）
研究生　　１名（Beti Ernawatti Dewi）
・ 第三室
協力研究員　　１名（森　茂俊）
研究生　　１名（井上謙一）
実習生　　１名（庄司洋子）
・ 第四室
協力研究員　　５名（伊藤さゆり、青塚新一、大川雅子、小澤　茂、関沢　剛）
実習生　　１名（北沢　亮）
・第五室
協力研究員　　10 名(山野宏晃、山口徹也、井筒　浩、萩原敏且、大口純人、竹村　弘、山崎　勉、宮野昭弘、麻生宣子、タフィール・ラフィール・ブッタ）
流動研究員　　2 名（アグス・セティヨノ、蔡燕）
研究生　　１名（野坂忠政）

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Takaoka, H., Matsumoto, A., Uchida, K., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K., and Kurane I.: Biologia y epidemiologia molecular del mosquito vector del virus de dengue. Cemadoja Cientifica (Centro de Educacion Medica de Amistad Dominica-Japonesa) 1(2): 28-31, 2002.

2) Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K., and Kurane I.: Competencia del mosquito como vector del virus de Dengue. Cemadoja Cientifica (Centro de Educacion Medica de Amistad Dominica-Japonesa) 1(2): 32-34, 2002.

3) Takasaki, T., Nawa, M.,Yamada, K., Takeda, A., and Kurane, I.: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. Journal of Virological Methods. 102:61-66, 2002

4) Saijo, M., Suzutani, T., Niikura, M., Morikawa, S. and Kurane, I.: Importance of C-terminus of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for maintaining thymidine kinase and acyclovir-phosphorylation activities. Journal of Medical Virology. 66:388-393, 2002

5) Saijo, M., Qing, T., Niikura, M., Maeda, A., Ikegami, T., Sakai, K., Prehaud, C., Kurane, I., and Morikawa, S.: Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology. 40:372-375, 2002

6) Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I., Li, T.C., Takeda, N., and Yasutomi, Y.: Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. Virology. 293: 273-280, 2002

7) Kurane, I.: Editorial: “A clinical, serological and immunological study in a Japanese traveler with dengue fever” Journal of Infection and Chemotherapy. 8:378, 2002

8) Takahashi, M., Miwa, T., Yamada, K., Sato, Y., Ikawa, K., Matsumoto, Y., Sano, T., Takasaki, T., Nerome, R., Ito, M., and Kurane, I.: Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo international airport. Japanese Journal of Infectious Diseases. 55: 215-216, 2002

9) Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Nerome, R., Arai, Y., Morimoto, K. and Kurane, I.: The features of imported dengue fever cases confirmed at National Institute of Infectious diseases, Japan, during 2001. Dengue Bulletin. 26:168-172, 2002

10) Kurane, I., West, K.,Tuazon, C.U., Zeng, W.L. and Ennis, F.A.: Definition of two new epitopes on human immunodeficiency virus type I gag protein recognized by human CD8+ cytotoxic T Iymphocytes. Journal of Clinical Virology. 27: 38-43, 2003

11) Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Kurane, I., and Akatsuka, T.:Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. Journal of General Virology. 84: 1737-1741, 2003

12) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Ami, Y., Mukai, R., Yamada, A., Kurane, I., Yoshikawa, Y., and Morikawa, S.: Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. Epidemiology and Infection. 130: 533-539, 2003

13) Qing, T., Saijo, M., Yuzhen, Z., Muer, A., Dong, T., Lei, H., Ma, S., Maeda, A., Kurane, I., and Morikawa, S.: A patient with Crimian-Congo hemorrhagic fever serologically diagnosed by recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10: 489-491, 2003

14) Tanabayashi, K., Mukai, R., Yamada, A., Takasaki, T., Kurane, I., Yamaoka, M., Terazawa, A., and Konishi, E.: Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. Vaccine. 21: 2338-2345, 2003

15) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S.: Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobuline G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Journal of Clinical Microbiology 40:1587-1591, 2002

16) Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, E de Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.: Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus. Journal of Medical Virology 68:99-104, 2002

17) Saijo M, Suzutani T, De Clercq E, Maeda A, Morikawa S, Kurane I.: Genotypic and phenotypic characterization of the thymidine kinase of ACV-resistant HSV-1 derived from an acyclovir-sensitive herpes simplex virus type 1 strain. Antiviral Research 56:253-262, 2002.

18) Ikegami T, Saijo M, Niikura M, Miranda MEG, Calaor AB, Hernandez M, Manalo DL, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S.: Development of an immunofluorescence method for detection of antibodies to Ebola virus subtype Reston by the use of recombinant nucleoprotein-expressing HeLa cells. Microbiology and Immunolology 46:633-638, 2002

19) Niikura M, Ikegami T , Saijo M, Kurata T, Kurane I, Morikawa S.: Linear B cell epitopes on the nucleoprotein of Ebola virus that distinguish Ebola subtypes. Clinical and Diagnostic Laboratory and Immunology 10:83-87, 2003

20) Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I.: Genetic Diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. Virology, 296: 159-164, 2002

21) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S.: The intracellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1). Virology 305, 288-297, 2003

22) Ikegami T, Miranda ME, Calaor AB, Manalo DL, Miranda NJ, Niikura M, Saijo M, Une Y, Nomura Y, Kurane I, Ksiazek TG, Yoshikawa Y, Morikawa S.: Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in Cynomolgus Macaques during the Philippine outbreak in 1996. Experimental Animals 51: 447-455, 2002

23) Han L, Tang Q, Zhao X, Saijo M, Tao X.: Serologic studies of Xinjiang hemorrhagic fever in Bachu county, 2001. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 3:179-181, 2002

24) Tang Q, Saijo M, Lei H, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S.: Detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immunofluorescence assays. Journal of Virological Methods 108:111-116, 2003

25) Eshita Y., Takasaki T., Yamada K., Kurane I.: Anthology of Biosafety: VI. Arthropod Borne Diseases. Editor: Jonathan Y. Richmond; Chapter 6; Isolation of Arboviruses from Field-collected mosquitoes. American Biological Safety Association. 63-71, 2003

26) Yamada K., Takasaki T., Nawa M., Kurane I.: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. Journal of Clinical Virology 24:203-209, 2002

27) Yamamoto Y., Takasaki T., Yamada K., Kimura M., Washizaki K., Yoshikawa H., Hitani A., Nakamura T., Iwamoto A.: A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. Journal of Infection and Chemotherapy 8:175-177, 2002

28) Nerome K., Nerome R., S.E. Lindstrom, Hiromoto Y. and Sugita S.: Characteristic evolutionary mechanisms of the influenza B virus: It's dynamic deletion – insertion rotation mechanisms and frequent occurrence of genomic reassortment. Recent Advances in Influenza Virus Research: 169-185, 2002

29) Ito M, Itou T, Sakai T, Ito FH. Arai YT, Takasaki T, Kurane I.: Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Clinical Virology, 26:317-330, 2003

30) Irie T., Matsuda Y., Honda Y., Morimoto K., Kawai A.: Studies on the escape mutants of rabies virus which are resistant to neutralization by a highly conserved conformational epitope-specific monoclonal antibody #1-46-12. Microbiology and Immunology 46: 449-461, 2002

31) Toriumi H., Honda Y., Morimoto K., Tochikura T. S., Kawai A.: Structural relationship between nucleocapsid-bindin g activity of the rabies virus phosphoprotein (P) and exposure of epitope 402-13 located at the C terminus. Journal of General Virology 83: 3035-3043, 2002

32) Inoue K., Shoji Y., Kurane I., Iijima T., Sakai T., Morimoto K.: An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. Journal of Virological Methods 107: 229-236, 2003

33) Nakamichi K, Matsumoto Y, Tohya Y, Otsuka H.: Induction of apoptosis in rabbit kidney cell under high-level expression of bovine herpesvirus 1 Us ORF8 product. Intervirology 45: 85-93, 2002

34) Nakamichi K, Matsumoto Y, Otsuka H.: Bovine herpesvirus 1 Us ORF8 protein induces apoptosis in infected cells and facilitates virus egress. Virology 304: 24-32, 2002

35) Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada KI, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I.: Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbend assay. Vaccine 20: 2448-2453, 2002

36) Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y,, Botvinkin AD.: New Lyssavirus Genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (Myotis blythi), Kyrghyzstan. Emerging Infectious Diseases 9: 333-337, 2003

37) Ito, S., Eda, H., Ban, F., and Yanagi, K.: Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 colocalizes with lamin B1 in the nucleoplasm and along the nuclear rim. Archives of Virology 148: 1633-1641, 2003.

38) Ito, S. and Yanagi, K.: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 colocalizes with cellular replication foci in the absence of EBV plasmids. Journal of Virology 77: 3824-3831, 2003.

39) Ito, S., Gotoh, E., and Yanagi, K.: Epstein-virus nuclear antigten-1 is highly colocalized with

interphase chromatin and its newly replicated reions in particular. Journal of General Virology 83: 2377-2383, 2002

40) Takahashi, M., Okada, S., Miyagawa, H., Amo, K., Yoshikawa, K., Asada, H., Kamiya, H., Torigoe, S., Asano, Y., Ozaki, T., Terada, K., Muraki, R., Higa, K., Iwasaki, H., Akiyama, M., Takamizawa, A., Shiraki, K., Yanagi, K., Yamanishi, K.: Enhancement of immunity against VZV by giving live varicella vaccine to the elderly assessed by VZV skin test and IAHA, gpELISA antibody assay. Vaccine 21: 3845-3853, 2003

41) Harada, S, Kamata, Y, Ishii,Y, Eda, H, Kitamura, R, Ban, F, Kuranari, J, Nakajima, H, Hayashi, M, Obayashi, M, Ito, S, Okabe, N, Senpuku, H, Miyasaka, N, Nakamura, Y, Kanegane, H, Yanagi, K.: Maintenance of serum IgG antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen-2 throughout life in healthy individuals from a population with a high childhood incidence of asymptomatic primary EBV infection. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, in press

42) Han I, Xue Y, Harada S, Orstavik S, Skalhegg B, and Kieff E.: Protein Kinase A associates with HA95 and affects transcriptional co-actovation by Epstein-Barr virus nuclear proteins. Molecular and Cellular Biology 22: 2136-2146, 2002

43) Takayama, M., Takayama, N.: New method of differentiating wild-type varicella-zoster virus (VZV) strains from Oka varicella vaccine strain by VZV ORF 6-based PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Virol, In press.

44) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S., Kurane I., Tada Y., Yoshikawa T., Fujii I., Nakashima K., Arai T., Oyama T., Okabe N., Fukushi H.: An outbreak of *Chlamydia psittaci* infection in zoo staff members involved in delivery assistance to a siberian elk. Chlamydial Infections –Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections. (Edited by Schchter J et al.) 131-134, 2002.

45) Peeling R. W, Wang S. P, Grayston J. T, Kuo C. C, Blasi F, Boman J, Desk J, Fields B, Freidank H, Gaydos C, Harrison T, Kihlstrom E, Kishimoto T., Jones R. B, Persson K, Peterson E, Ridgway G, Saiku P, Schachter J, Stamm W.: Standardization of Chlamydia serology: Improvement in inter-laboratory agreement of micro-immunofluorescence assay results after a workshop. Chlamydial Infections –Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections. (Edited by Schchter J et al.)429-432, 2002.

46) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S., Yamazaki T., Kurane I., Nakashima K., Tanaka T., Takahashi H., Ohyama T., Okabe N., Toshima H., Tsumura N., Ouchi K.: *Chlamydia pneumoniae* pneumonia outbreak in a health facility for the elderly in Japan. Chlamydial Infections–Proceedings of the Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections. (Edited by Schchter J et al.) 479-482, 2002.

47) Lee S. J, Lee M. G, Jeon M. J, Jung K. S, Lee H. K, Kishimoto T.: Atypical pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia in Korea. Japanese Journal of Infectious Diseases 55: 157-159, 2002.

2. 和文発表

1）倉根一郎：デング出血熱の病態解明の進展とワクチン開発の現状. ウイルス 52: 15-20, 2002

2）倉根一郎：脳炎・脳症：序論. 化学療法の領域 19 : 761, 2003

3）倉根一郎：西ナイル熱・西ナイル脳炎　新版・感染症マニュアル（山崎修道監修、小早川隆俊編集）スパイラル出版　154-155, 2002

4）前田秋彦、倉根一郎：ニパウイルス感染症. 動物由来感染症ーその診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）真興交易医書出版部　101-105, 2003

5）倉根一郎：日本脳炎. 動物由来感染症ーその診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）真興交易医書出版部　106-109, 2003

6）前田秋彦、倉根一郎：ヘンドラウイルス感染症. 動物由来感染症ーその診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）真興交易医書出版部　110-114, 2003

7）西條政幸：セミナー：ダニ媒介性ウイルス性出血熱ークリミア・コンゴ出血熱. 感染症 33:83-93, 2003

8）西條政幸：クリミア・コンゴ出血熱. 総合臨床 52:1241-1244, 2003

9）森川 茂：天然痘　化学療法の領域　18 (3):343 – 346, 2002

10）森川 茂：ラッサウイルス　日本臨床 61 巻（増刊号 3）：539－543, 2003

11）森川 茂：フィロウイルス　日本臨床 61 巻（増刊号 3）：544－549, 2003

12）高崎智彦：黄熱, その他のアルボウイルス感染症　小児科診療 65:2077-2081, 2002

13）伊藤美佳子、倉根一郎：デング熱・デング出血熱　総合臨床 52:459~465, 2003

14）伊藤美佳子、倉根一郎：特集　輸入感染症　II　各論　西ナイル熱、西ナイル脳炎　小児科診療 65：71-74, 2002

15）高崎智彦：新世紀の感染症学「ウエストナイル熱／脳炎」日本臨床 61:288-291, 2003

16）高崎智彦：日本脳炎、その他の脳炎ウイルス　今日の治療指針 2003 年版（医学書院）143-144, 2003

17）多賀賢一郎、井村俊郎、林　昭宏、鎌倉和政、橋本智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲：日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討　感染症学雑誌 76:738-746, 2002

18）徳田敦子、多部田弘士、杉戸一寿、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎：フィリピへの団体旅行で感染したデング熱の３症例　感染症学雑誌 76:953-957, 2002
19）高崎智彦：ウエストナイル熱／脳炎　東獣ジャーナル 441:14-16, 2002
20）高崎智彦：ウエストナイル熱／脳炎　Modern Media 49:1-6, 2003
21）桑山勝、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦、山田堅一郎、根路銘令子、伊藤美佳子、笠松純也、中村就一、宮脇弘幸、香川治子、青山範子、越智一秀、原田和歌子、時信弘：2002 年に発生した日本脳炎の 3 事例について－広島県　病原微生物検出情報（月報）24:63-64, 2003
22）高崎智彦：ウエストナイルウイルス感染症の動向. Medicament News 1759：4-6, 2003
23）高崎智彦：ウエストナイル熱　動物由来感染症– その診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）真興交易医書出版部　77-82, 2003
24）高崎智彦：ウエストナイル熱　総合臨床 52:351-355, 2003
25）原田志津子：EB ウイルス（基礎系）－EB ウイルス潜伏感染に関与するウイルス遺伝子産物の機能解析　ウイルス 52: 129-134, 2002
26）柳　壹夫、伊藤さゆり：EB ウイルスの構造と遺伝子、「EB ウイルス」（共著）（高田賢蔵監修） pp. 5-22, 診断と治療社　2003
27）原田志津子：EBNA.「EB ウイルス」（共著）（高田賢蔵監修）pp. 23-32, 診断と治療社　2003
28）柳　壹夫：分子生物学歯科小事典（共著）（西澤俊樹監修）口腔保険協会　2003
29）小川基彦，河本知秀，川本　歩，山下照夫，打田裕一，加藤活大，アグス・セティヨノ，志賀定祠，岸本寿男：急性Q熱の輸入 3 症例における血清抗体価の推移と *Coxiella burnetii* 遺伝子検出の長期検討. 感染症学雑誌 77(3)：127-32，2003
30）岸本寿男、蔡燕、小川基彦：動物・ヒト共通感染症の実際 2)オウム病　感染と抗菌薬 5(4)：357-361, 2002.
31）岸本寿男：肺炎クラミジア　医学のあゆみ 200(13)：1228-1229, 2002.
32）山崎勉、岸本寿男：異型肺炎の検査法　検査と技術 30(5)：449-453, 2002.
33）山崎勉、岸本寿男：動脈硬化とマクロライド　臨床医 28(5)：641-643, 2002.
34）山崎勉、岸本寿男：クラミジア抗原・抗体　臨床医 28：1243-1245, 2002.
35）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：肺炎クラミジア肺炎の確定診断法は？　成人病と生活習慣病 32(7):884-886, 2002.
36）岸本寿男：各科領域におけるクラミジア感染症－はじめに　医学のあゆみ 203(6)：405, 2002.
37）岸本寿男、小川基彦：各科領域におけるクラミジア感染症－内科領域におけるクラミジア感染症　医学のあゆみ 203(6)：407-410, 2002.
38）小川基彦：ツツガムシ病．感染症等情報 WORLD FOCUS No. 37：1-4，2002
39）小川基彦：日本紅斑熱．感染症発生動向調査週報 25 号，2002
40）岸本寿男：オウム病 1999～2002　病原微生物検出情報 23(10)：245-251, 2002.
41）河本和秀、小川基彦、岸本寿男、打田裕一、加藤活大、川本歩、山下照夫：海外の屠蓄場および農場を視察後同時に発症した Q 熱患者 3 症例　感染症学雑誌 76(12)：1030-1034, 2002.
42）山崎勉、岸本寿男：肺炎クラミジア感染症　小児科臨床 55(12)：2455-2460, 2002.
岸本寿男、山木健市：Q 熱コクシエラ感染症の問題点と展望－司会にあたり　感染と抗菌薬 6(1)：103-104, 2003.
43）小川基彦、河本和秀、川本歩、山下照夫、打田裕一、加藤活大、アグス セティヨノ、志賀定祠、岸本寿男：Q 熱コクシエラ感染症の問題点と展望－急性 Q 熱患者における血清抗体価の推移と *Coxiella burnetii* 遺伝子の検出　感染と抗菌薬 6(1)：114-115, 2003.
44）岸本寿男、蔡燕、小川基彦、志賀定祠：人畜共通感染症－オウム病　呼吸 22(1)：38-44, 2003.
45）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：クラミジア（クラミドフィラ）・ニューモニエ肺炎　日本臨牀 61：490-495, 2003.
46）岸本寿男：第 10 回呼吸器疾患・感染症研究会　肺炎クラミジア感染症の本邦における現状と今後の展開 Prog. Med. 23(3)：1008-1019, 2003.
47）岸本寿男：ペットと安全に暮らす　NHK　きょうの健康 4：91-93, 2003.
48）岸本寿男：最近の感染症のトピックス　ドクターサロン 47(4)：294-298, 2003.
49）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：22. クラミジア肺炎（オウム病を除く）綜合臨牀 52：942-948, 2003.
50）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：オウム病　綜合臨牀 52：1012-9481016, 2003.
51）岸本寿男、蔡燕、小川基彦、志賀定祠：ペットを介する病気－オウム病　小児科 44(5)：781-788, 2003.
52）岸本寿男：オウム病クラミジア　細菌学　竹田美文、林英生編：665-668, 2002.
53）岸本寿男：家族内感染　呼吸器病 New Approach 6 肺感染症（河野茂 等編）160-164, 2002.
54）岸本寿男、小川基彦：クラミジア感染症　内科学書（島田馨編）1110-1112, 2002.
55）岸本寿男：オウム病　動物由来感染症－その診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）133-139, 2003.
56）小川基彦：ツツガムシ病　動物由来感染症－その診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）140-145, 2003.

57）小川基彦：日本紅斑熱　動物由来感染症－その診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）146-150, 2003.
58）小川基彦：Q 熱　動物由来感染症－その診断と対策（神山恒夫、山田章雄編）151-155, 2003.

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

1) Kurane I.: Laboratory diagnosis of dengue fever and dengue hemorrhagic fever. In 2nd Training Course of the Laboratory Diagnosis of Dengue Fever. China, June 10-13, 2002

2) Kurane I.: Current situation of Japanese encephalitis vaccines. In Japanese Encephalitis Meeting: Setting the Global Agenda on Public Health Solutions and National Needs. Bangkok, Thailand. June 18-19, 2002.

3) Kurane I.: Cellular immune responses in patients with dengue fever and denmgue hemorrhagic fever. P36, In 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases. Pattaya, Thailand November 10-13, 2002.

4) Maeda A, Hee LB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S.: The interacellular association of the nucleocapsid protein (NP) of Hantaan virus (HTNV) with small ubiquitin-like modifier (SUMO-1) conjugating enzyme 9 (UBC9). 36th US-Japan Joint working conference on viral diseases. Matsumoto, Japan. June 16-18, 2002

5) Saijo M, Tang Q, Morikawa S, Maeda A, Kurane I.: Recent outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in China. 36th US-Japan Joint working conference on viral diseases. Matsumoto, Japan. June 16-18, 2002

6) Morikawa S, Tang Q, Xinqin Z, Saijo M, Kurane I.: Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolates in China. 12th International Congress of Virology. Paris, France. July 27-August 1, 2002

7) Saijo M, Tang Q, Hay L, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.: Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic feverr using a recombinant viral nucleoprotein. 12th International Congress of Virology. Paris, France. July 27-August 1, 2002

8) Maeda A, Lee HB, Yoshimatsu K, Saijo M, Kurane I, Arikawa J, Morikawa S. The nucleocapsid protein (NP) of hantaan virus (HTNV) itegrated with small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 conjugating enzyme (UBC9). 12th International Congress of Virology. Paris, France. July 27-August 1, 2002

9) Yamada K., Takasaki T., Nawa M., Kurene I.: The future of dengue fever cases during 1998-2001 at National Institute of Infectious Diseases, Japan. XIIth International Congress of Virology Paris. July 27-August 1, 2002

10) Ito M., Itou T., Sakai T., Ito F. H., Arai Y. T., Takasaki T. and Kurane I.：Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific RT-PCR and RFLP analysis. Thirty-sixth Joint Working Conference on Viral Diseases. The US-Japan Cooperative Medical Science Program. Matsumoto, Japan. May 16-18, 2002.

11) Takasaki T., Yabe S., Reiko Nerome, Ken-ichiro Yamada, Mikako Ito and Ichiro Kurane Effect of Japanese encephalitis vaccine on the lethal challenge of mice by West Nile virus. Thirty-sixth Joint Working Conference on Viral Diseases. The US-Japan Cooperative Medical Science Program. Matumoto, Japan. May 16-18, 2002.

12) Arai YT, Kuzmin IV: Characterization of Aravan virus isolated from the bat (Myotis blythi) Central Asia : evidence of new genotype in lyssaviruses. 12th International Congress Virology. Paris, France. July 27 - August 1, 2002

13) Kuzmin IV, Botvinkin AD, Arai Y.T: Bat lyssaviruses in Central Asia: New evidence for genus diversity and potential significance for public health. 13th International Meeting of Rabies in the Americas. Mexico. November 3-8, 2002

14) Ito S., Gotoh E., and Yanagi K. : Epatein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with chromatin ‘prematurely condensed’ during interphase and its newly replicated regions in particular. Tumour Associated Herpesiruses 10th International Symposium on Epstein-Barr Virus & Associated Malignant Diseases. July 16-21, 2002, Cairns, Australia.

15) Ito S. and Yanagi K. : Epstein-virus nuclear antigten-1 is highly colocalized with interphase chromatin and its newly replicated reions in particular. 27th International Herpesvirus Workshop. July 20-26, 2002, Cairns, Australia.

16) Ito S., Gotoh E. and Yanagi K.: Epatein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with cellular interphase chromatin and its newly replicated regions in particular in the absence of EBV DNA. International Workshop on Nuclear Dynamics – Approaches from Molecular, Biochemical and Visual Biology Yokohama, Japan Dec 15, 2002

17) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S., Kurane I., Tada Y., Yoshikawa T., Fujii I., Nakashima K., Arai T., Oyama T., Okabe N., Fukushi H.: An outbreak of Chlamydia psittaci infection in zoo staff members involved in delivery assistance to a siberian elk. The Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Antalya, Turkey, June 17-21 2002.

18) Peeling R. W, Wang S. P, Grayston J. T, Kuo C. C, Blasi F, Boman J, Desk J, Fields B, Freidank H, Gaydos C, Harrison T, Kihlstrom E, Kishimoto T., Jones R. B, Persson K, Peterson E,

Ridgway G, Saiku P, Schachter J, Stamm W.: Standardization of Chlamydia serology: Improvement in inter-laboratory agreement of micro-immunofluorescence assay results after a workshop. The Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections,Antalya,Turkey,June 17-21 2002.

19) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S., Yamazaki T., Kurane I., Nakashima K., Tanaka T., Takahashi H., Ohyama T., Okabe N., Toshima H., Tsumura N., Ouchi K.: Chlamydia pneumoniae pneumonia outbreak in a health facility for the elderly in Japan. The Tenth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Antalya, Turkey, June 17-21 2002.

20) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S., Matsui T., Nakashima K., Itagaki A., Nitta N., Fukushi H., Matsumoto A.: Psittacosis outbreak related to a bird park in Japan. Joint Auspices of Japan Society for Chlamydia Research and Department of Pathobiology, University of Washington. Seattle, Washington, USA. September 23, 2002.

21) Oguchi S., Kishimoto T., Nosaka T., Ouchi K., Kanmatsuse K.: Infection with accelerates neointimal formation after and treatment with clarithromycin prevents it in a murine model. Joint Auspices of Japan Society for Chlamydia Research and Department of Pathobiology, University of Washington. Seattle, Washington, USA. September 23, 2002.

22) Kishimoto T., Ogawa M., Shiga S, Cai Y, Setiyono A, Kurane I., Ouchi K., Nakahama C., Toshima H.: *Chlamydophila pneumoniae* infections in Japan. Joint International Tropical Medicine Meeting 2002. Bangkok, Thailand. November 20-22, 2002.

23) Ogawa M.: Current situation of Tsutsugamushi Disease in Japan; Epidemiology and clinical features of the cases reported in 1998, International symposium of Strategy for Tsutsugamushi disease prevention, Soul, Korea, 2002.

2. 国内学会

1) 福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚　靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎: 蚊類のアルボウイルス媒介能（３）PCRを用いたデングウイルス媒介蚊２種の識別. 第54回日本衛生動物学会大会大会、東京、一橋記念講堂、2002年4月

2) 高崎智彦、倉根一郎：ウエストナイル熱と血清診断法, 第 2 回抗体測定法研究会、2003 年 2 月 13 日

3）倉根一郎：ウイルス感染症の脅威と日本の対策：節足動物媒介性ウイルスの脅威。北里医学会総会特別講演、北里大学、相模原市、2002年11月2日

4）倉根一郎：ウエストナイルウイルスと防疫体制、近未来危機管理研究会、東京都、2003 年 1 月 24 日

5）倉根一郎：ウエストナイル熱について。神奈川県感染症医療従事者等研修会、横浜市、2003 年 1 月 28 日

6）倉根一郎：ウエストナイルウイルス：日本にくるか？診断法は？ワクチンは？　第 2 回抗体測定法研究会、東京都、2003 年 2 月 13 日

7）倉根一郎：節足動物媒介性ウイルス感染症．第 4 回感染症フォーラム、大阪市、2003 年 2 月 19 日

8）倉根一郎：ウエストナイル熱．日本医師会第 14 回危機管理対策協議会,　東京都、2003 年 3 月 12 日

9）池上徹郎、新倉昌浩、西條政幸、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎、吉川泰弘、森川茂：エボラウイルスレストン株を特異的に検出する抗原捕捉 ELISA の開発．第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

10）錫谷達夫、西條政幸、石岡賢、石橋啓、金子久俊、森修一、大橋一孝、吉良俊彦：アシクロビル，ペンシクロビルは単純ヘルペスウイルスの突然変異を誘導するか？第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

11）前田秋彦、Lee Byoung-Hee、吉松組子、西條政幸、緒方もも子、有川二郎、倉根一郎、森川茂：ハンタウイルスの核蛋白質（NP）と small ubiquitin-like modifier-1（SUMO-1）結合酵素（Ubc9）との結合．第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

12）西條政幸、森川茂、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎：クリミア・コンゴ出血熱の抗原検出 ELISA による診断の有用性と問題点．第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

13）西條政幸、森川茂、前田秋彦、緒方もも子、倉根一郎：中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱の分子疫学的解析．第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

14）西條政幸、唐青、森川茂、前田秋彦、倉根一郎：クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験．第 13 回抗ウイルス化学療法研究会　津田沼　2003 年 1 月 27-29 日

15）西條政幸、錫谷達夫、森川茂、前田秋彦、倉根一郎：2 番目のメチオニンから翻訳されるチミジンリン酸化酵素を発現する単純ヘルペスウイルス 1 型の薬剤感受性．第 13 回抗ウイルス化学療法研究会　津田沼　2003 年 1 月 27-29 日

16）中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎:日本脳炎ウイルス分離株の遺伝学的変異と, その抗原性解析．第 50 回日本ウイルス学会．札幌　2002 年 10 月 13-15 日．

17）根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎:フラビウイルス科、フラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案．第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会．大分　2002 年 7 月 4-5 日．

18）高崎智彦、根路銘令子、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎:針無圧力注射器を用いた日本脳炎不活化ワクチ

ン接種による中和抗体誘導. 第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 大分　2002 年 7 月 4-5 日.

19）山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、伊藤美佳子、Atchareeya A-Nuegoonpipat,田部井由紀子、吉田靖子、名和　優、三輪俊樹、高橋正樹、倉根一郎:輸入デングウイルス感染症(1998－2001). 第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 大分　2002 年 7 月 4-5 日.

20）伊藤美佳子、高崎智彦、山田堅一郎、根路銘令子、野村秀和、Atchareeya　A-Nuegoonpipat、倉根一郎：わが国における輸入感染症から分離されたデングウイルスの遺伝子解析　トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会　札幌　2002 年　10 月 15 日

21）新井智、高崎智彦、多屋馨子、倉根一郎、岡部信彦:流行予測調査事業グループ. 小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況～2000 年度感染症流行予測調査より～　第 34 回小児感染症学会　(札幌)　11 月. 2002 年 11 月 8-9 日

22）高崎智彦、倉根一郎:シンポジウム：新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状. 第 43 回日本熱帯医学会大会　高知　2002 年 11 月 21-22 日

23）新井　智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦:2000 年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況　第 6 回日本ワクチン学会　千葉　2002 年 11 月 30 日－12 月 1 日

24）中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎：組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究－Vero 細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討－　第 6 回日本ワクチン学会　千葉　2002 年 11 月 30 日－12 月 1 日

25）近藤　愛、国重　誠、七条加奈、大島康志、三ツ井貴夫、松本俊夫、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎: 灰白質を中心とした重篤な脳脊髄炎を呈したデング熱の 1 例」日本神経学会中四国地方会　岡山　2002 年 12 月 7 日

26）高崎智彦:バイオエマージェンシーとしてのウイルス感染症　平成14年度４回　阪神地区感染症懇話会講演会　大阪　2003 年 1 月 31 日

27）高崎智彦:バイオエマージェンシーとしての米国のアルボウイルス感染症 関西実験動物研究会第 77 回研究会　京都　2003 年 3 月 7 日

28）高崎智彦:ウエストナイルウイルス感染症とその対策（教育講演）第 42 回感染性腸炎研究会総会　東京都　2003 年 3 月 8 日

29）井上謙一、一條宏、小山真恵、筧慎治、森本金次郎、飯島敏夫：海馬皮質領域における transneuronal tracer としての狂犬病ウイルスの動態解析 Transneuronal tracing with rabies virus in the rat hippocampal neural circuit.　第２５回日本神経科学大会　東京　２００２年７月７－９日

30）井上謙一、庄司洋子、酒井健夫、倉根一郎、森本金次郎：新規狂犬病ウイルス cDNA 発現法による組換え HEP-Flury 株の作製及び同法の有用性の解析　第５０回日本ウイルス学会総会　札幌　２００２年１０月１６－１８日

31）本井ゆり恵、井上智、井上さやか、八田一、佐藤こずえ、森本金次郎、山田章雄：免疫鶏卵法で作製した抗狂犬病ウイルスリコンビナント蛋白 IgY の反応性と有用性　第１３５回日本獣医学会学術集会　東京２００３年３月３０日－４月１日

32）森本金次郎：リバースジェネティクスを用いた狂犬病ウイルス病原性の解析　第１３５回日本獣医学会学術集会　微生物分科会シンポジウム　東京　２００３年３月３０日

33）新井陽子、亀岡洋祐：中央アジア、キルギスタンのコウモリ（Myotis blythi）から分離された Aravan virus の性状：リッサウイルスの新しい genotype の可能性　日本ウイルス学会総会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

34）柳　壹夫、伊藤さゆ：EB ウイルス核抗原―１は細胞染色体 DNA の新たに複製した領域に局在する　第５０回日本ウイルス学会学術集会　札幌　2002 年 10 月 16-18 日

35）柳　壹夫、伊藤さゆり：EB ウイルス核抗原―１は細胞の新生クロマチン領域に局在する　第２５回日本分子生物学会年回　横浜　2002 年 12 月 11-14 日

36）伊藤さゆり、後藤英介、柳　壹夫：EB ウイルスの潜伏感染の維持に必要な EB ウイルス核抗原―１（EBNA-1）は EBV DNA が存在しない細胞において細胞クロマチンの新生領域に共局在する　公開シンポジウム　バイオイメージングとナノテクノロジー　東京　2003 年２月 20-21 日

37）高山道子、高山直秀：日本で長期間に分離された水痘・帯状疱疹ウイルスの分子疫学. 第４３回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002 年

38）中村賢二、中島正光、大島美紀、岩本博志、平本雄彦、岸本寿男、河野修興：鳥類展示施設への団体旅行にて発症したオウム病の 2 例　第 37 回日本呼吸器学会中国四国地方会・第 41 回日本肺癌学会中国四国地方会　徳島　2002 年 7 月 26-27 日

39）蔡燕、小川基彦、志賀定祠、アグス セティヨノ、岸本寿男、倉根一郎、新田則之、田原研司、板垣朝夫、福士秀人：オウム病集団発生事例に関連した病原体の分子生物学的検討　第 20 回日本クラミジア研究会・第 9 回リッケチア研究会合同研究発表会　岐阜　2002 年 9 月 21 日

40）岸本寿男：シンポジウム１．オウム病：オウム病の臨床疫学的検討―集団発生 2 事例から　第 20 回日本クラミジア研究会・第 9 回リッケチア研究会合同研究発表会　岐阜　2002 年 9 月 21 日

41）小川基彦、蔡燕、志賀定祠、アグス セティヨノ、岸本寿男、倉根一郎、田原研司、板垣朝夫、福士秀人：シンポジウム１．オウム病：鳥獣施設におけるオウム病集団発生時の病原診断と病原体解析について　第 20 回日本クラミジア研究会・第 9 回リッケチア研究会合同研究発表会　岐阜　2002 年 9 月 21 日

42）岸本寿男：シンポジウム　動物由来感染症の疫学、診療、予防各論：オウム病　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
43）松本哲哉、松村克己、岸本寿男、志賀定祠、村上日奈子、川越清隆、小林寅喆、舘田一博、山口惠三：バングラディッシュの小児における急性呼吸器感染(ARI)の起炎病原体の検討　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
44）小川基彦、河本知秀、川本歩、山下照夫、打田裕一、加藤活大、アグス セティヨノ、志賀定祠、岸本寿男：急性 Q 熱患者における血清抗体価の推移と Coxiella burnetii 遺伝子の検出　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
45）アグス セティヨノ、小川基彦、蔡燕、志賀定祠、岸本寿男、倉根一郎、高橋洋、渡辺彰：急性 Q 熱の血清診断における ELISA キットの応用についての検討　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
46）小川基彦、岸本寿男、志賀定祠、倉根一郎、佐多徹太郎、吉川徹、多田有希、福士秀人、中島一敏、新井智、大山卓、岡部信彦：ヘラジカの出産介助に起因する動物園職員のオウム病クラミジア感染症集団発生　～第一報原因クラミジアの同定～　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
47）多田有希、吉川徹、中島一敏、新井智、大山卓、岡部信彦、岸本寿男、小川基彦、志賀定祠、倉根一郎：ヘラジカの出産介助に起因する動物園職員のクラミジア感染症集団発生 第二報－5 症例の臨床像－　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
48）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠、蔡燕、アグス セティヨノ、倉根一郎、新田則之、田原研司、板垣朝夫、福士秀人、松本明、松井珠乃、中島一敏、岡部信彦：島根県の鳥展示施設に関連したオウム病集団発生事例　第 1 報－臨床疫学的検討　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
49）蔡燕、小川基彦、志賀定祠、アグス セティヨノ、岸本寿男、倉根一郎、新田則之、田原研司、板垣朝夫、福士秀人、松本明、松井珠乃、中島一敏、岡部信彦：島根県の鳥展示施設に関連したオウム病集団発生事例　第 2 報－感染源の調査、検査法、治療および病原体の検討　第 51 回日本感染症学会東日本地方総会・第 49 回日本化学療法学会東日本支部総会　仙台　2002 年 10 月 31 日－11 月 1 日
50）岸本寿男：ペット等動物由来感染症の最新情報と対策　第 29 回公衆衛生学会　山形　2003 年 3 月 5 日
51）岸本寿男：シンポジウム 2)　肺炎クラミジア感染症の最近の話題と検査診断法の展開　肺炎クラミジアによる感染症と疫学　第 14 回日本臨床微生物学会総会　名古屋　2003 年 1 月 31 日－2 月 2 日
52）北沢貴利、太田康男、上田久仁子、奥川周、塚田訓久、岸本寿男、木村哲：マクロファージにおける *Chlamydia trachomatis* LPS 刺激による炎症サイトカイン発現　第 76 回日本感染症学会総会　東京　2002 年 4 月 11-12 日

2. ウイルス第二部

部 長　宮 村 達 男

概　要

平成14年4月の組織再編により、当部は旧ウイルス製剤部の腸内ウイルスワクチン室および不活化ワクチン室の業務を引き継ぎ、人員も配置転換となった。対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、また検定、検査対象となるワクチンは A 、B 型肝炎ワクチン、ポリオ生ワクチンである。

第1室の最重要課題はポリオ経口生ワクチンの検査、検定である。本年は全く新しい人員体制で小分製品1件、中間段階製品1件の検定を無事おこなった。また不活化ワクチンの特別審査をふくめ、ポリオワクチンの免疫学的研究をスタートした。

当グループでは従来からの下痢症ウイルスの研究を継続させている。特にわが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスの研究が大きく進展した。レセプターの検索，ウイルスプロテアーゼの構造と機能に関する地道な研究も進んだ．また全国地研との連携も良くいき、レファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。

またE型肝炎ウイルスの研究が着実に進行している。ウイルス中空粒子を用いた、感度の良い診断系の開発、ワクチン開発という応用研究が進む一方、構造解析によるウイルス粒子形成メカニズムの地道な研究へと発展している。

第2室では総力を挙げて WHO 世界ポリオ根絶計画に参画している。WHO の指定をうけて，世界の特殊専門ラボとして，また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析をおこなった．課題はまだ地球上に残る野生株ウイルスの解析と、ワクチンの変異株によるポリオ流行の解析である。根絶計画はいよいよ最終段階にはいり、もっとも重大で困難な局面を迎えた。また国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査を行なった。

第3室ではヒト腫瘍に関わると考えられているヒト乳頭腫ウイルス、パポバウイルス、B、C 型肝炎ウイルスそしてポックスウイルスを研究対象としている。中で、ヒト乳頭腫ウイルスの発癌メカニズムにかかる研究、発現ベクターとしてのポックスウイルス、BK ウイルスの粒子解析などの研究が進展をみせた。

第4室のC型肝炎ウイルスの研究は，着実にすすんでいる。とくに懸案であった培養細胞系でのウイルス増殖が確立し、感染性を持つ粒子産生をみたことが大きい。“アダプト”したクローンが採れて、増殖の効率が高まればブレークスルーとなる。

第5室では、旧ウイルス製剤部の不活化ワクチン室の業務を引き継ぎ、不活化 A 型肝炎ワクチン、組み換え沈降 B 型肝炎ワクチンの検定、検査をおこなっている。これらのワクチンの品質管理について国際的和合についての調査を開始した。また A 型肝炎ウイルスの粒子構造解析研究が始まった。

各室で国際的な共同研究が継続している.これらが従来の技術移転から真の共同研究へと発展することを期待している。

1) Berhane Beyene and Anjelo Asha Adlo（エチオピア、保健栄養研究所）、<JICA フェロー> 平成 15 年 3 月 16 日～4 月 25 日、ポリオウイルスおよびエンテロウイルスの実験室診断。
1) Nguyen Thi Thanh Thao（ベトナム、パスツール研究所）、<WHO/JSPS フェロー> 平成15年3月16日～3月28日、同上。
1) Nguyen Binh（ベトナム、国立衛生疫学研究所）、<WHO フェロー> 平成 15 年 3 月 16 日～3 月 28 日、同上。
1) Sarijlou Mahboobeh（イラン、テヘラン医科大学）、<WHO フェロー> 平成 15 年 3 月 16 日～3 月 28 日、同上。
1) Napa Onvimala（タイ、国立衛生研究所）、<JICA フェロー> 平成 14 年 9 月 30 日～12 月 19 日、エンテロウイルスの実験室診断研修。
1) Chen Li（中国、中国疾病予防センター）、<JICA フェロー> 平成 14 年 12 月 16 日～平成 15 年 11 月 14 日、ポリオウイルス分子学診断技術。

研究費としては経常研究費の他に、厚生労働科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス振興財団、ウイルス肝炎研究財団、文部省科学研究費，医薬品機構等の援助を受けた。

.

人事面では、勝二郁夫がウイルス第3室長として着任（平成 14 年 4 月 1 日）、米山徹夫主任研究官がウイルス第5室室長に昇任した（平成 14 年 7 月 1 日）。また有田峰太郎がウイルス第2室研究員（平成 14 年 4 月 1 日）、岡 智一郎がウイルス第1室研究員（平成 14 年 7 月 1 日）、李 天成がウイルス第1室主任研究官として（平成 14 年 10 月 1 日）それぞれ採用された。相崎英樹主任研究官がC型肝炎ウイルスの分子生物学的研究の為，南カリフォルニア大学医学部 M.Lai 研究室に長期出張している（平成14年5月より）。

研 究 業 績

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス(NV)に関する研究

(1) チバウイルス3C様プロテアーゼの生化学的性状

ノロウイルス属に属するチバウイルスが有する3C様プロテアーゼを精製し、3C/3D切断部位を含むタンパク質を基質として酵素反応を行った。チバウイルス3C様プロテアーゼの至適pHは8.6付近で、生理的pHよりもアルカリ側にあった。至適温度は37度であった。Na+あるいはK+イオンにより活性が阻害されたが、Mg2+およびCa2+イオンには非感受性であった。Zn2+およびHg2+イオンにより完全に活性が阻害された。また種々のSH修飾試薬感受性であり、プロテアーゼ活性にCys残基が必須であることが示された。これらのデータは治療薬開発に有用な情報になると期待される。

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(2) チバウイルス3C様プロテアーゼの結晶構造解析

精製したチバウイルス3C様プロテアーゼより3次元結晶を作成した。この結晶と、これに重金属試薬を浸潤させた結晶を用いて、X線結晶構造解析を行った。その結果、3Å程度の解像度のデータを得ることができた。さらなる解像度向上のため、結晶化条件の詳細な検討を行っている。3次元立体構造の解明はコンピュータを用いた理論的な治療薬開発に有用である。(東京工業大学生命理工学部田中信夫教授との共同研究)

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(3) ノロウイルス(NV)と型物質との結合

NVが糖鎖である型物質をレセプターとして用いるとの報告がなされている。しかし、プロトタイプであるNorwalk virusのみ、またはそれを含むほんの数株でしか解析が行われていない。そこで、型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討するため、NV16株のウイルス様中空粒子(VLPs)と唾液中の型物質との結合を解析した。その結果、11株のVLPsはdose-dependentに唾液と結合した。型物質量の少ない唾液への結合量は低かったことから、これらの株の結合に型物質が関与していることが示唆された。一方、唾液に全く結合しないウイルスが4株、また、その結合量が唾液中の型物質量と相関しない株が1株認められ、結合に型物質以外の因子を必要とするウイルス株の存在が示唆された。

[白土東子、名取克郎、鎌田公仁夫(デンカ生研)、影山努(BML)、小川智子、宮村達男、武田直和]

(4) NVの吸着しない細胞と吸着する細胞の細胞表面分子の比較

NVは細胞株が由来する動物種、臓器にかかわらずほとんど全ての培養細胞に吸着する。これまでに吸着しない細胞の同定はなされていない。そこで、NVの吸着しない細胞の同定、解析を行うため、NVとの結合について報告のないヒトリンパ球細胞(MOLT-4、MT-2、Jurkat、U937)とVLPsとの結合をBinding assayにより検討した。その結果、MT-2以外の細胞にはほとんど結合しなかった。つぎに、136種類の抗CD抗体を用いて、NVの吸着しないMOLT-4と吸着するMT-2の細胞表面分子の発現をFlow cytometryにより比較検討した。その結果、MT-2で発現の高い分子が36種類選択されてきた。これらの中にはNVの結合に関与する分子が含まれる可能性がある。今後、抗体によるVLPs結合阻害実験などを行い結合に関与する分子を絞り込み、糖鎖以外の因子の関与についても検討していきたい。

[白土東子、名取克郎、宮村達男、武田直和]

(5) NV粒子形成機構の解析

NVのゲノムには3つのORFが存在する。ORF2は構造蛋白質をコードしており、本領域をバキュロウイルスで発現させるとウイルス様粒子VLPを作出することができる。ORF3は、ウイルス粒子を形成する構造蛋白質ではないかと考えられている。また、ORF1にはVPgがコードされており、核酸に結合して粒子内に取り込まれると考えられているが、詳細は明らかにされていない。本研究ではORF1, ORF2, ORF3を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、これらを共感染させることで、昆虫細胞内に各種ORF蛋白質を供給し、粒子形成にどのような影響を与えるかを検討した。

[松原尚子、片山和彦、白土東子、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

(6) NV VLP産生機構の解析

NVのORF2を組換えバキュロウイルスで発現すると、VLPを作出することができる。しかし、同じ株から作出した組換えバキュロウイルスでも、VLPを大量に産生するクローンと、細胞内にはORF2蛋白質を大量に発現するがVLPは産生しないクローンが存在する。我々は、これらクローンの塩基配列を解析し、わずか数アミノ酸残基の変異がこの差を生み出していることを見いだした。現在、VLP産生クロー

ンと非産生クローンのキメラを作製し、どのアミノ酸がどのような機構で VLP 産生に影響を与えるのかを調べている。
［高井　聡、松原尚子、白土東子、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子（感染病理部）］

（7）NV の病原性に関する研究
NV は非細菌性食中毒の主要な原因であるが、その病原性発現機構については調べられていない。我々は、NV 蛋白質が真核生物の細胞に与える影響を昆虫細胞を用いて調べた。ORF1, ORF2, ORF3 を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、これらを昆虫細胞に感染させてそれぞれの ORF にコードされる NV 蛋白質を発現させた。感染細胞における細胞の増殖速度、アポトーシスおよびネクローシス誘導能について正常細胞と比較して調べ、どの ORF が細胞に対する毒性を有するかを検討した。
［林　薫、松原尚子、白土東子、片山和彦、宮村達男、武田直和］

（8）NV の分子系統解析
我々は NV のゲノム全塩基配列を複数本決定し、それらを用いた分子遺伝学的解析により、構造蛋白質領域の遺伝子配列を用いた NV のタイピング法を構築した。NV には、2003 年現在、GI に 14 種類、GII に 17 種類のゲノタイプが存在することを明らかにした。現在、これらのデータを日本全国の衛生研究所などで疫学調査に利用できるよう、データーベースを構築している。
［片山和彦、名取克郎、影山努（BML）、福士秀悦（BML）、宮村達男、武田直和］

（9）NV 複製機構の研究
NV には培養細胞を用いた増殖系、実験動物系が構築されていない。NV の複製機構を解明するため、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列下流に、NV ゲノム全長を組み込んだプラスミドクローンを作製し、T7 RNA ポリメラーゼを用いてゲノム RNA を大量に細胞内に供給した。5’末端をキャッピングした RNA を供給した場合、ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が翻訳され、それぞれ機能を有する蛋白質に切断された。特にウイルス RNA ポリメラーゼは供給した（＋）鎖ゲノム RNA より、（－）鎖 RNA を合成し、かつ約 2.6 Kb のサブゲノム RNA を合成することが明らかになった。
［片山和彦、岡智一郎、小川智子、小嶋慈之（BML）、宮村達男、武田直和］

（10）NV RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の研究
NV の ORF1 にはポリ蛋白がコードされており、その C 末端側に位置する 57 KDa の蛋白質は、アミノ酸モチーフから RdRp であると考えられている。我々は、本酵素のコード領域を大腸菌及び組換えバキュロウイルスで発現させ RdRp の性状を調べた。大腸菌で発現させた RdRp はポリ A よりも、NV3’末端領域にポリ A を含む鋳型に強く反応し、（－）鎖を伸張した。RdRp の活性中心である YGDD モチーフを壊すと、RdRp の活性は消失した。この結果はバキュロウイルスで発現させた RdRp でも同様であった。
［片山和彦、岡智一郎、小川智子、小嶋慈之（BML）、高井玲子（BML）宮村達男、武田直和］

（11）NV の中空粒子の発現と血清学的解析
昨年までに、遺伝子型 I（GI）で 5 株、遺伝子型 II（GII）で 15 株のウイルス様中空粒子（VLPs）は発現に成功した。これらは血清学的には 13-14 に分類された。しかし遺伝子の解析からノロウイルスはまだまだ多くの血清型が存在することが考えられる。本年度は、GI に属す 1 株の VLP 発現に成功し、さらに GII の 3 株で発現を試みている。昨年度に発現した GI 株および今回の GI 株は共に新しい血清型に分類された。また、同様に Alphatron 株は血清学的にも GI、GII とは異なっていた。この株は GII の 2 株とやや強い交叉反応を示したが、このことによって Alphatron 株が GII グループに属すか、または新たな GIII として分類できるかどうかはまだ断定できない。Alphatron ウイルスの血清疫学の結果は低抗体保有率を示した。他のノロウイルス株と異なって Alphatron 株はあまり浸潤していないと考えられた。
［名取克郎、片山和彦、白土東子、瀬戸祥介（大阪市立大）、永田典代、松尾恵子（感染病理部）、武田直和、宮村達男］

（12）連続発生集団胃腸炎事例からの NV 遺伝子の検出と遺伝子配列の解析
2001 年 4 月に修学旅行生徒、教員 100 名中 81 名発症した食中毒事例（A 事例）と同年 5 月 S 市近郊の N 小学校で生徒、教員、調理従事者 117 名中 70 名発症の食中毒（B 事例）について病原体検索を行い NV 遺伝子を検出した。A 事例では患者便 21 検体、吐物 3 検体、旅館従業員及び調理従事者 51 検体、1 施設の検食、また B 事例では患者便 13 検体、吐物 2 検体、調理従事者便 7 検体の検体について電子顕微鏡（EM）、RT-PCR、EIA 検査を行った。さらに、A 事例では検出遺伝子 2 検体をプローブにしてサザンブロットハイブリダイゼーション検査、また B 事例では検出遺伝子のダイレクトシークエン

スを行った。
［石川和子、筒井理華、三上稔之、大友良光、宇田川悦子］

(13) NV が結合する細胞表面分子の検索
NVが結合する細胞表面分子を同定するために、様々な結合阻害剤を用いた結合阻害効果を調べた。実験には^{35}Sで標識したUeno virus (UEV) の中空粒子およびIntestine 407細胞株を用いた。その結果、ヘパリン、スラミン、プロタミン硫酸、およびポリリジンで顕著な阻害効果が観察され、^{35}S-UEVが細胞表面のグリコサミノグリカンと結合することが推測された。
［田村　克（東京大学大学院）、名取克郎、宮村達男、武田直和］

(14) NV が結合する細胞表面分子の同定
グリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、およびヒアルロン酸を用いて^{35}S-UEVの結合阻害効果を調べた。その結果、ヒアルロン酸以外の3種類のグリコサミノグリカンで顕著な結合阻害効果が認められた。そこで、Intestine 407 におけるUEV結合性細胞表面分子を特定するために、ヘパリナーゼI、III、およびコンドロイチナーゼABCでそれぞれ細胞表面を処理し、^{35}S-UEVの吸着を観察した。その結果、ヘパリナーゼIおよびIIIで処理した場合のみ濃度依存的に顕著な結合阻害効果が認められた。以上の結果から、細胞表面のヘパラン硫酸が特異的にNVの結合分子として働くことが示された。
［田村　克（東京大学大学院）、名取克郎、宮村達男、武田直和］

2. サポウイルスに関する研究

(1) サポウイルス (SV) がコードするポリペプチドの網羅的発現
SV は2つのオープンリーディングフレーム (ORF)) をコードする。ORF1 については翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼによって複数の機能タンパク質に切断されると考えられている。SV のポリペプチドの切断様式について検討するための第一段階として、SV (チェンマイ株) の ORF1 の 83%、ORF2 の 100%の領域に対応する 9 種類のリコンビナントタンパク質を発現、精製し、SV ゲノムのほぼ全域にわたり部位特異抗体を作製した。
［岡　智一郎、小川智子、Grant S. Hansman、片山和彦、宮村達男、武田直和］

(2) SV 遺伝子の解析
SV の全塩基配列はデーターベース上にわずか3株しか報告されておらず、現状ではSV遺伝子の特徴及び多様性を十分に解析できない。そこで、新たに4株の SV 全塩基配列を決定し、解析を行った。SV で最も保存された領域は、近縁のノロウイルス (NV) と同様、RdRp コード領域 3'側から構造蛋白質コード領域 5'側に存在した。この領域の塩基配列はゲノグループ内はもとより、ゲノグループを超えて保存されており、NV と同様に SV でもゲノムの組換えが、この配列を起点に起きている可能性がある。今後、この領域をターゲットにしたリアルタイム PCR 検出系を構築する予定である。
［片山和彦、Grant S. Hansman、岡智一郎、宮村達男、武田直和］

(3) SV VLP 作出の試み
SV の遺伝子解析の進展に伴い、SV でも NV 同様複数のゲノグループとそれらに内包されたゲノタイプの存在が示唆されている。つまり、SV にも NV 同様抗原性の異なる複数の株が存在する可能性がある。我々は、SV の構造蛋白質領域上流約 80 塩基からゲノム末端までをクローニングし、幾つかの欠失ミュータントクローンを作製して、バキュロウイルス発現系を用いた VLP 作出を試みた。構造蛋白質開始コドンからゲノム末端までを組み込んだ組換えバキュロウイルスは、表面構造を持った VLP を作出したが、その収量は NV の場合と比較し 1/10 にも満たなかった。現在、VLP の発現量をコントロールする方法を検討中である。
［Grant S. Hansman、片山和彦、小川智子、名取克郎、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子（感染病理部）］

3. 疫学等に関する研究

(1) 小児科外来における小型球形ウイルス散発事例―1
昨年に引き続き、2001 年 3 月から 2002 年2月までに埼玉県の春日部厚生病院小児科外来へ来院し非細菌性ウイルス性下痢症と診断された小児患者由来便89例について、従来検査されている下痢症ウイルス検出法に加え電顕法、RT-PCR 法により小型球形ウイルス（ノロウイルス、サポウイルスおよびアストロウイルス）の検出を行った。昨年と同様ノロウイルスGII 型 (85%) が一番多く検出されており例年の傾向と一致していた。
［宇田川悦子、藤田靖子（春日部厚生病院小児科）］

(2) 小児科外来における小型球形ウイルス散発事例―2
昨年に引き続き、2001 年 3 月から 2002 年2月までに大阪府中野子供病院小児科外来へ来院し非細菌性ウイルス性下痢症と診断された小児患者由来便 50 例について、従来検査されている下痢症ウイルス検出法に加え電顕法、RT-PCR 法により小型球形ウイルス（ノロウイルス、サポウイルスおよびアストロウイルス）の検出を行った。電顕検査できた 33 例中ウイルス陽性は 51%、PCR (P1/P2,3 プライマ

ー) 検査可能であった 48 例中陽性は 21% (GII 型のみ)、電顕及び PCR とも陽性は 13%であった。電顕陽性で PCR 陰性の検体がまだ多く存在している事が明らかである。今後は種々のプライマーで検出率の比較を検討する。
[宇田川悦子、圀府寺美 (中野こども病院小児科)]

(3) 電子顕微鏡 (EM) を用いた小型球形ウイルス・サーチ画像処理技術開発

小型球形ウイルス粒子は電子顕微鏡観察で多様な形態を示す。夫々に特徴的な表面構造を有するウイルス粒子を画像として蓄積し、実際の観察時に照合することで、従来から懸案の電子顕微鏡観察における小型球形ウイルスの高感度検出・高速処理、および検査法の簡素化を目指す。実際に電子顕微鏡下で検出され、遺伝子検査等で分類がなされたロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの典型的な粒子画像を高感度カメラで収集する。ウイルス粒子画像の微細な特徴を解析する画像処理法を用いて、電子顕微鏡像からウイルス粒子の検出及び種類同定を高速高感度で自動的に行う。これに必要な高解像度カメラシステムと画像取り込みインターフェースを研究開発する。
[宇田川悦子]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. レファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保有し、要望に応じて地研等に配付した。2002 年は、ウイルス標準株 10 株、抗血清 46 種類、プール抗血清 EP95 を 30 セット、コクサッキーA 群同定用 CF 腹水を 4 セットを配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別の検査は行政検査として実施され、検査したポリオウイルスすべてがワクチン由来株であった。

(2) ポリオ実験室診断技術研修会の開催

第 12 回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。本年度は、新たに完成した村山庁舎新 6 号館研修施設において研修を行った。研修期間は 2002 年 2 月 24 日～3 月 14 日、研修参加者は、バングラディシュ、ラオス、ミャンマー、パキスタン、イランから各 1 名、ベトナムおよびエチオピアからそれぞれ2名の計 9 名であった。ポリオウイルスの分離・同定・型内鑑別等に関する技術研修およびポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義を行った。

(3) WHO Global Specialized Laboratory としての活動

ア) ナショナル・ポリオラボラトリーが存在しないラオス・カンボジアのナショナル・ラボラトリーとして実験室診断を行った。AFP 由来検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

イ) WHO Global Specialized Laboratory として、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム・モンゴルで分離されたポリオウイルスについて型内鑑別を行った。すべてのポリオウイルスがワクチン由来株であることを明らかにし、この地域における野生株ポリオフリーを確認した。

ウ) フィリピンで 2001 年に分離された 1 型ポリオウイルスが一定期間同地域で伝播していたワクチン由来株 (VDPV)であることを、フィリピン RITM、オーストラリア VIDRL 等との共同研究で明らかにし、ウイルス学的解析を行った。過去のエジプトのポリオ流行から分離された 2 型ポリオウイルスが、同様の病原性復帰した VDPV であることを CDC との共同研究により明らかにした。

エ) ポリオ根絶過程で重要性が増している VDPV のスクリーニング法の検討を行った。PCR-RFLP に加え、ELISA 法・モノクローナル抗体法等について、検出精度の評価を行なっている。

オ) 東アジア地域における非ポリオエンテロウイルス感染症のサーベイランスおよび実験室診断を行った。特にエンテロウイルス 71 の実験室診断法についての研究を行った。

2. 西太平洋地域の 2002 年のウイルス分離状況

2002 年にラオス、カンボジアから送付された AFP 症例 255 例由来の糞便検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。3 株のポリオウイルスが分離され、すべてワクチン由来株であった。非ポリオエンテロウイルスは 74 検体から分離された。その他、ベトナム、香港、ニュージーランド、韓国等で AFP および非 AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別および塩基配列の解析を行なった。
[清水博之、米山徹夫、吉田弘、有田峰太郎、名取克郎、宮村達男]

3. 世界ポリオ根絶計画に沿ったポリオウイルスの分子疫学

(1) 環境から分離された1型ポリオウイルスの性状解析

環境より分離された13株の 1 型ポリオワクチン由来株について MAPREC 法を用いて神経毒性を推定するとともに mAb を用いて抗原解析を行った。抗 Sabin-mAb、抗 Mahoney-mAb を用いて中和抗

体価を測定したところ、4/13 株は抗 Sabin-mAb に対し難中和性を示し、かつ MAPREC の結果は強毒変異タイプだった。易中和性を示した 5 株は MAPREC の結果強毒変異タイプだった。即ち抗原的に Sabin 株と類似していても神経毒性の異なる 2 つのタイプが存在していることを示した。一方抗 Sabin-mAb に対し難中和の株は抗 Mahoney-mAb で中和できたこと、逆に易中和性を示した株には抗 Mahoney-mAb が反応しなかったことを示した。mAb を用いた抗原解析及び MAPREC の結果は、VP-1 領域における塩基置換は 1%に満たなくとも、抗原性、神経毒性が変化することを示した。

［吉田 弘、宮村達男、堀江均（日本ポリオ研究所）、松浦久美子（富山県衛生研究所）］

（2）フィリピンで分離された 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

フィリピンで分離された4株の1型cVDPVの全塩基配列を、他のポリオおよびクラスターC コクサッキーA ウイルス（C-CAV)と比較解析した、フィリピンの 1 型 VDPV のカプシド領域の塩基配列はワクチン株由来であるがワクチン株との相同性は 97%程度であり、ワクチン投与から 1.5 から 2 年程度伝播していた可能性が高い。非構造蛋白質領域の P3 領域は、クラスターC コクサッキーA ウイルス（C-CAV）の多くと相同性が高く、P2 領域は CAV-13,17,18,20 等と、特にアミノ酸レベルでの相同性が高かった。cVDPV の組み換え対象のエンテロウイルスは、いまだに不明であるが、CAV-13, 17, 18, 20 等一部の C-CAV とポリオウイルスが組み換えを起こす可能性は高いと考えられる。

［清水博之、有田峰太郎、Andi Utama, 吉田 弘、田野良夫、宮村達男、Fem J. Paladin（RITM, the Philippines), Bruce Thorley（VIDRL, Australia)］

（3）エジプトで分離された 2 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

1988 年から 1993 年にかけて、エジプトで広範囲に発生したポリオ流行において分離された 2 型ポリオウイルス解析を行い、この流行が野生株ポリオでなく cVDPV によることを明らかにした。VP1 領域の遺伝子解析によると親株からの変異は、3〜7%程度であり、OPV ウイルスが 10 年近くにわたり伝播し、ポリオ流行に関与していた可能性が示された。分離された 2 型 cVDPV は、抗原性、温度感受性および Tg マウスにおける神経毒力試験等において野生株と類似したウイルス学的特徴を有していた。また、長期間にわたる伝播の過程で、Sabin 株以外のエンテロウイルスとの間で複数回の組み換えを起こしていたことが示唆された。

［Chen-Fu Yang, Mark Pallansch, Olen Kew (CDC), 清水博之、米山徹夫、宮村達男］

（4）カンボジアにおける AFP 症例から分離された組み換えポリオウイルスの解析

2002 年度のカンボジアにおける AFP 症例から分離されたポリオウイルスの解析を行ったところ、非構造タンパク質をコードする領域に未知の配列を持った Sabin 3 型ワクチン株由来の組み換えウイルスが見いだされた。Sabin 3 型ワクチン由来の配列中の変異が少ないことから（親株とのホモロジーが 99.5%）、組み換えが生じた後短期間の間に分離されたウイルスであることが示唆された。現在、非構造タンパク質領域の相同性解析により、ポリオウイルスと組み換えを起こしたエンテロウイルスの同定を進めている。

［有田峰太郎、吉田弘、清水博之、米山徹夫、宮村達男］

（5）エンテロウイルス試験管内組み換えシステムの確立

ポリオウイルスと組み換えを起こしうるエンテロウイルスを同定するためには様々な組み換えウイルスを作製する必要がある。そのため、Long PCR 法を用いた効率の良い組み換えウイルスの作製系を確立した。始めにフィリピンで流行を起こしたワクチン由来ポリオウイルス（PJ156）と Sabin 1 型との組み換えウイルス（PJ156/Sabin 1）を作製した。各ウイルス RNA を鋳型にして逆転写酵素で目的cDNA を増幅した。これらの cDNA 断片を DNA polymerase で繋ぎ合わせ、最後に PCR により full-length cDNA を増幅させた。full-length cDNA を RNA に転写した後、HEp-2 細胞にトランスフェクションしウイルス増殖を確認した。CPE 出現を観察したところ、24 時間後に僅かな CPE が観察され、48 時間後に全ての細胞が CPE を発現し死滅した。ウイルスを回収し、再度 HEp-2 細胞に感染させ、ウイルスの感染性を確認した。同様な方法で作製した PJ156/Sabin 2、PJ156/Sabin 3 及び PJ156/Mahoney も回収できたことより、この系は組み換えウイルスの作製に有用であることを確認した。

［Andi Utama, 清水博之、宮村達男］

（6）ポリオウイルスと組み換えを起こすエンテロウイルスの同定

試験管内組み換えシステムを用いて、PJ156 とクラスターC に属するコックサッキー A ウイルス（CAV11, CAV13, CAV17, CAV18, CAV21）との組み換えウイルスの作製を試みた。この実験では組み換え部位は 2C 領域に設定した。試験したウイルスのうち、CAV11 と CAV17 との組み換えウイルス（PJ156/CAV11 と PJ156/CAV17）を回

収できたのに対し、他のウイルスとの組み換えウイルスを回収できなかった。また、組み換え部位を2C領域の3'末端にするとCAV18との組み換えが起こることも明らかになった。CAV11及びCAV17の2Bまたは2Cの遺伝子を解析すると、ポリオウイルスとアミノ酸レベルでの相同性が高いことが分かった。それに対して、他のCAVはポリオウイルスと異なるクループに属していた。また、2C領域の3'末端のアミノ酸配列は全てのコックサッキーAウイルスではポリオウイルスとほぼ同じことから、ポリオウイルスは非構造タンパク質のアミノ酸配列がポリオウイルスと高い相同性をもつコックサッキーAウイルスと自然界で組み換えを起こすことが示唆された。

［Andi Utama, 清水博之、宮村達男］

(7) IPV導入後のニュージーランドにおけるOPV分離株の解析

2002年2月にIPVを導入したニュージーランドにおいてIPV導入後に分離されたOPVについて解析を行い、OPVからIPVにワクチンを変更した後のOPV伝播について検討した。小児科入院患者、エンテロウイルス、AFPおよび環境中の各サーベイランスより分離されたポリオウイルスを解析した。小児科入院患者、エンテロウイルスおよびAFPサーベイランスからは、IPV導入後比較的速やかにOPVが検出されなくなったが、環境中サーベイランスからはOPVが継続して分離された。しかし、分離ウイルスの遺伝子解析により、ニュージーランドで伝播しているウイルスもしくは長期排泄者に由来するウイルスではないことが示唆された。オーストラリア等OPV使用国からの輸入ウイルスであると考えられるが、今後もサーベイランスを継続する予定である。

［Sue Huang (IESR, New Zealand), 清水博之、宮村達男、Mark Pallansch (CDC)］

(8) 台湾における免疫不全患者から分離されたVDPVの神経毒力

免疫不全患者等に認められるポリウイルス長期排泄者から排泄されるポリオウイルスによるポリオ流行のリスクをいかにして減らしていくかは、ポリオ根絶後の重要な課題となっている。2001年、台湾において確認された免疫不全ポリオウイルス長期排泄者から継続的に分離された1型ポリオウイルスの神経毒力をポリオウイルスレセプター発現Tgマウスを用いて検討した。持続感染者の麻痺発症後、5, 17, 52, 337日後に分離されたウイルスについて検討したところ、いずれのウイルスもSabin 1型と比較して病原性復帰が認められた。しかし、発症後1ヶ月以内に分離されたウイルスは、それ以降に分離されたウイルスと比較してより強い神経毒性を示したことから、持続感染による変異の蓄積は単純に神経毒力の上昇につながらないことが示唆された。

［楊 志元、陳 豪勇 (TCDC, Taiwan), 清水博之、Andi Utama、有田峰太郎、宮村達男、Olen Kew (CDC)］

(9) 中国の2型ポリオワクチン関連麻痺の解析

中国雲南省・貴州省における2型ポリオワクチンウイルスの伝播の可能性を疫学的および分子疫学的に解析した。対象地域には麻痺患者の集中発生を推測させる事例が存在したが、分離されたウイルスの遺伝子解析によると、ほとんどの2型ウイルス分離株のVP1領域の変異は1%以下であり、1年以上の期間2型ポリオワクチンウイルスが伝播しポリオ流行に関与していた可能性は低いものと考えられた。また、分離株間の分子疫学的関連性も認められなかったため、多くの症例は孤発のワクチン麻痺症例であることが示唆された。

［千葉靖男、帖佐 徹（国際医療センター）、山本悌司（福島医大）、許 分波、張 礼壁（中国疾病予防センター）、清水博之］

(10) 中国四川省の2型ポリオワクチン株の解析

2002年に中国四川省において2型ポリオワクチンによる麻痺患者の集中発生を推測させる事例が発生した。3例のAFP症例および3例のコンタクトから分離された2型ワクチン由来ウイルスを解析したところ、4株はSabin2/Sabin 3の組み換えウイルス、2株はSabin2/Sabin 1型の組み換えウイルスであった。VP1全領域の塩基置換は、ワクチン株と比較して3カ所のみであり長期間伝播していた可能性は低いが、6株すべてが共通の部位に塩基置換を有しており、分離株間の関連性が示唆された。現在、神経毒力等ウイルス学的特徴についての比較解析を行っている。

［陳 立、許 分波（中国疾病予防センター）、Andi Utama, 清水博之、宮村達男］

4. ポリオウイルスの分子生物学

(1) ポリオウイルスの神経毒性発現の解析

ウイルスタンパク合成を下げたポリオウイルスの一連の変異株を作製し、Tg21マウスを用いて神経毒力を測定した。その結果、親株のウイルスタンパク合成能の20%以下に下げた変異株では弱いながらも弱毒化が認められた。この変異株は、脳から脊髄への感染経路においては不安定であるが、脊髄内では比較的安定に増殖することが観察された。今後、ウイルス複製においてウイルスタンパク合成の低

下が重要となる脳内の部位を同定する予定である。
［有田峰太郎、清水博之］

(2) Sabin-IPV の抗原性に関する研究

弱毒ポリオウイルス Sabin 株を用いた不活化ポリオワクチン (Sabin-IPV) を日本ポリオ研究所が開発した。ホルマリン不活化工程でどのエピトープ構造が変化するかについて、抗原認識部位特異的モノクローナル抗体 (MAb) を用いた ELISA 法により調べた。Sabin 1 では site 1 を認識する Mab による、ELISA 反応が低下していたことから、ホルマリン不活化によって site 1 の構造変化が起きたことが示唆された。Sabin 2 ではホルマリン不活化によって大きな抗原性変化は認められなかった。Sabin 3 ではいくつかのモノクローナル抗体に対してホルマリン不活化後に反応性が失われており、一部の抗原認識部位がホルマリン不活化によって変化したと考えられる。今回の実験は、Sabin-IPV の有効性を評価する D 抗原価測定の改良や、さらに効果的なワクチンを開発する上で役に立つと考えられる。
［田野良夫（ポリオ研）、清水博之、宮村達男、Javier Martin (NIBSC)］

5. エコーウイルスに関する研究

(1) エコーウイルス30型のゲノタイプに関するモニタリング

日本ではほぼ7−8年周期でエコー30型による無菌性髄膜炎の流行が見られ、ウイルスのゲノタイプが異なっていることをこれまでに明らかにしてきた。前回の流行は 1997-98 年であり、次の流行予測のために、1998 年以降分離された株の分子系統解析を行った。その結果2001年に新潟で分離された株は過去の流行株と若干の塩基置換が見られるものの同一のクラスターに属していた。一方 2002 年に広島にて分離された株は過去国内で報告された株と別のクラスターを形成した。しかし標準抗血清により中和可能であり、大きな抗原変異は伴っていないと考えられた。
［吉田 弘、高尾信一（広島県保健環境センター）、渡辺香奈子（新潟県保健環境科学研究所）］

6. エンテロウイルス71 (EV71) に関する研究

(1) モノクローナル抗体を用いた EV71 抗原性の解析

EV71 粒子構造および抗原性決定部位を解析するために、特異的モノクローナル抗体 (Mab) を作製した。ホルマリン不活化 EV71 (1095/Shiga 株) を抗原とし、アジュバントとともに BALB/C マウス 2 匹に免疫し、最終的に、ELISA 活性の高い 5 クローンと中和活性を有する 2 クローンのハイブリドーマを樹立した。得られた Mab による中和活性は、EV71 分離株型特異的中和反応性を示した。中和 Mab による抗原認識部位を同定するため Mab 存在下で、エスケープミュータントを選択し、アミノ酸置換部位を同定した。他のエンテロウイルスのカプシド蛋白質とのホモロジーによりカプシド蛋白の立体構造を推測すると、アミノ酸置換の多くは VP1 の NAg-1 およびその周辺に位置することが示唆された。
［田野良夫、清水博之］

(2) EV71 温度感受性株のカニクイザルにおける神経毒力の解析

前年度までに作製した EV71 温度感受性株をサルに接種し、神経毒性の解析を行った。その結果、ポリオウイルスのワクチン株の弱毒性変異を導入した変異株では、接種したサルの脊髄からのみウイルスが分離され、脳内からは分離されなかった。一方、親株である BrCr 株を接種したサルでは、回収した脳内の各組織及び脊髄からウイルスが分離された。今後さらに強い弱毒性を持った EV71 を作製する予定である。
［有田峰太郎、清水博之、永田典代（感染病理部）、網 康至、須崎百合子（動物管理室）、岩崎琢也（長崎大学）］

(3) EV71 の神経毒性の発現機序の研究

EV71 は、非ポリオエンテロウイルスの中では、中枢神経合併症を引き起こしやすいウイルスとして知られている。近年、東アジアで多くの死亡例を含む手足口病重症例が多発し、EV71 感染による中枢神経症状が重篤化の主因であると考えられている。EV71 感染動物モデルとして唯一確立されているカニクイザル感染系を用いて EV71 の神経病原性を解析した。静注感染による EV71 の神経病原性をポリオウイルスと比較したところ、EV71 による病変およびウイルス増殖部位は、ポリオと比較してより広い範囲の中枢神経組織に認められた。EV71 感染による広い範囲の中枢神経病変は、EV71 感染重症例に認められる麻痺以外の多様な中枢神経症状の発現に関与すると考えられる。
［永田典代（感染病理部）、清水博之、有田峰太郎、網 康至、須崎百合子（動物管理室）、岩崎琢也（長崎大学）］

(4) 東アジアの EV71 の分子疫学解析

近年東アジア諸国では、大規模な手足口病流行の際に死亡例を伴う重篤な中枢神経疾患の多発が報告されている。その多くは

EV71 流行によるものであることが示されているが、手足口病あるいはエンテロウイルス感染症に対する適切なサーベイランスおよび実験室診断が行われていない国における EV71 伝播の実態は明らかではなかった。そこで、いままで EV71 分離の報告が無かったタイおよび系統解析が行われていなかった中国の EV71 分離株の分子系統解析を行った。VP1 領域の解析の結果、タイの分離株はマレーシア等で報告されている subgenogroup C1 に属しており、中国本土の分離株は、これまで報告されていない新たな subgenogroup である C4 に分類されることが示された。

［清水博之、Andi Utama, 宮村達男、Napa Onnimala, Yaowapa Pongsuwanna (NIH, Thailand), 張 礼壁、陳 立（中国疾病予防センター）］

7. A 群エンテロウイルスに属する新規エンテロウイルスの遺伝子解析

2002 年にカンボジアの AFP 患者から分離された非ポリオエンテロウイルスの同定および遺伝子解析を行ったところ、カプシド領域（VP4 および VP1）の分子系統解析により、4 株のエンテロウイルスは既知のエンテロウイルスとは独立した単一のクラスターを形成することが明らかとなった。4 株のエンテロウイルスは、cluster A エンテロウイルスに分類されるが、既知のヒト由来の cluster A エンテロウイルスとの相同性は低く、むしろ一部のサル由来エンテロウイルスとの関連性が認められた。新規ヒトエンテロウイルスであることが強く示唆されるが、今後、他の領域の遺伝子解析および抗原性解析により確認する必要がある。

［陳 立、清水博之、Andi Utama, 宮村達男］

Ⅲ. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス（HAV）に関する研究

（1）HAV の細胞感染を阻害する抗イディオタイプ抗体について

抗 HAV 中和抗体をマウスに免疫して得た抗イディオタイプ抗体 Ab2:94-7 は HAV 感受性細胞 GL37 への HAV 感染を阻害した。Ab2:94-7 は既知の抗 HAV レセプター抗体と GL37 細胞の結合を競合抑制した。この結果から Ab2:94-7 が細胞表面の HAV レセプターに結合して HAV の感染を阻害すると推察された。また、Ab2:94-7 は GL37 細胞以外の HAV 感受性細胞 CMK、Huh7、Vero いずれにも結合し、感受性細胞に共通の HAV レセプターに対するリガンドである可能性が示唆された。Ab2:94-7 の可変領域のアミノ酸配列を解析し、感染阻害能のない Ab2:94-2 の配列と比較したところ、H鎖、L鎖ともに相補性決定領域（CDR）3 に差が認められた。

［清原知子、戸塚敦子］

（2）細胞培養 HAV 粒子の精製

クリオ電顕法による HAV 粒子の構造解析を目的とした協力研究を Karolinska Institute の Dr. Holland Cheng と行っている。当室は素材となる A 型肝炎ウイルス粒子の精製を担当した。

［清原知子、戸塚敦子、Holland Cheng（Karolinska Institute、スウェーデン）］

（3）単クローン抗体とその中和抵抗性変異株を用いた HAV の抗原構造の解析

遺伝子1A 型、1B 型、3B 型免疫によって今までに作製した 39 種類の抗 HAV 単クローン抗体（mAb）を用いた。遺伝子 3B 型 KRM003Gp72 株を各 mAb で中和継代することによって 42 種類の抵抗性変異株を得て、構造蛋白部位遺伝子塩基配列を調べ、置換アミノ酸を同定した。さらに変異導入株 4 株も用いて、競合抑制型の ELISA 反応により変異株の mAb 抵抗性パターンを調べた。大部分の変異株は作製に用いた以外の一群の mAb に対しても抵抗性となっており、4 群への分類がほぼ可能であった。変異株によっては、別の群の単クローン抗体との結合性の変化（主として低下でまれに増強）も多少認められた。A 群変異株は VP1 の 217 と 221 のアミノ酸置換を主とするが、VP2-178 の置換も VP1-217 置換と同様な抵抗性を獲得した。また継代中に両方の変異株が混在することから、両アミノ酸は立体構造上非常に近い位置にあると考えられた。VP2-178 の置換は C 群の VP2-189、VP2-198 の置換とは抗原的に関連していなかった。B 群は VP1 の 100 および 170 位付近のアミノ酸置換をもち、D 群は VP3 の 65 から 74 に変異を認めた。こうした研究は HAV 粒子立体構造の解明に有用となろう。

［戸塚敦子、清原知子、佐藤知子］

（4）無血清培地を用いた培養細胞による A 型肝炎ワクチン製造の開発

A 型肝炎ワクチン作製には培養細胞を用いる。この細胞の培養に用いる FBS を通して、ワクチンにプリオンが混入する可能性を取り除くため、ウイルス増殖に用いる細胞を無血清で培養する手法の確立

を試みた。その結果、無血清培地 VP-SFM でこの細胞は増殖し、更にこの培地で HAV が増殖することが明らかとなった。しかし、ウイルス増殖は FBS 入り培地に比べ良くなかったので、VP-SFM 培地に欠けている何らかの細胞増殖、また、ウイルス増殖に必要な因子の同定を進めている。

［下池貴志、戸塚敦子、武田直和、田代眞人（ウイルス第三部）］

2．B型肝炎ウイルス（HBV）に関する研究

（1）B型肝炎ワクチン参照品素材としての精製 HBs 抗原の作製（継続）

中間段階精製 HBs 抗原プールを限外濾過で濃縮、バッファー置換後、ショ糖濃度勾配遠心法で更に精製し、約650mg の HBs 抗原を得た。総タンパク量に対する HBs 抗原の含有率は 54%と低く、SDS-PAGE でも夾雑タンパクのバンドが認められた。現在。夾雑タンパクの除去方法を検討中である。

［清原知子、下池貴志、戸塚敦子、米山徹夫］

（2）国際参照沈降B型肝炎ワクチン（International Reference Reagent for adsorbed Hepatitis B Vaccine）の力価測定

「海外において製造・使用されているワクチンの品質評価に関する研究班」の一環として、国内参照沈降B型肝炎ワクチンと NIBSC から提供されている国際参照沈降B型肝炎ワクチンを比較した。平成 14 年 9 月と平成 15 年 2 月に国際参照沈降B型肝炎ワクチンを輸入し、生物学的製剤基準に準拠した方法で力価を測定した。平成 14 年 9 月に輸入したワクチンの力価は adr: 2.79、adw: 2.42 であった。一方平成 15 年 2 月に輸入したワクチンは adr: 7.04、adw: 5.64 と、いずれも同じロットでありながら異なる結果となった。これが輸入の際の温度管理の不備等によるアクシデントなのか製剤の性質なのかを特定するため、平成 15 年度に温度管理下でワクチンを輸入し、再評価することにした。

［清原知子、下池貴志、戸塚敦子、佐藤知子、米山徹夫］

3．C型肝炎ウイルス（HCV）に関する研究

（1）HCV コア蛋白質による HCV RNA の翻訳抑制機構の解析

これまでに、HCV のコア蛋白質が自身の 5'非翻訳領域（5'UTR）内の stem-loop IIId 領域に相互作用し 5'UTR 依存的翻訳を抑制することを見出した。更にこの翻訳抑制は stem-loop IIId の loop 領域の構造が重要であることを示唆する結果を得た。今回我々はコア蛋白質の N 末端の 57 アミノ酸領域が翻訳抑制に重要であることを示唆する結果を得た。更に、この 57 アミノ酸領域内のどのアミノ酸が重要かの同定を進めている。また、昨年に続きこの翻訳抑制に重要な細胞因子の同定も進めている。

［下池貴志、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男］

（2）バイオリアクター（RFB）三次元培養肝細胞による HCV 感染系の改良

感染実験に適した HCV 血清を選抜するため、複数の患者血清を同一ウイルス濃度に混合し RFB 培養系に感染させた。経時的に培養上清中の RNA、抗原を測定したところ、感染後、3, 9, 19, 33 日目をピークとする間欠的なウイルスの増減が認められた。各ピーク時の HCV 遺伝子配列を決定した結果、感染初期からウイルスクローンが選択され、33 日目では1クローンに収束することが明らかとなった。

［村上恭子、小俣和彦、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男］

（3）RFB 三次元培養肝細胞を用いた HCV 粒子の作製と性状解析

HCV 全遺伝子と薬剤耐性マーカーを持つダイシストロニック RNA レプリコンを、ヒト肝癌由来細胞 Huh7 に導入して、HCV RNA 複製細胞（RC-YM1）を作製した。この RC-YM1 細胞を単層培養した場合、細胞内でウイルス RNA の複製と抗原発現は認められるが、ウイルス粒子形成は観察されていない。そこで、RC-YM1 細胞を RFB で培養し上清から HCV 粒子の回収を試みた。ショ糖密度勾配遠心の結果、約 1.1 及び 1.2g/mL の分画にウイルス RNA、構造蛋白のピークを観察した。

［村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男］

（4）HCV RNA 複製に関与する Huh7 細胞因子の検索

あらかじめサブクローン化しておいた種々の Huh7 細胞株に対して RNA レプリコンを導入し複製効率が最大 50 倍程度異なる細胞株を得た。cDNA マイクロアレイ法により各細胞株の遺伝子発現プロファイリングを比較し、HCV 複製効率に相関する遺伝子を数十種類同定した。特に細胞周期関連遺伝子群が特徴的であり、複製効率の高い細胞株では、S 期から G2 期を正に制御する cyclinA、cdc2 及び G1 初期を負に制御する p18ink6 等の発現がそれぞれ亢進していることが明らかとなった。

［村上恭子、染谷友美、石井孝司、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗］

(5) FLC4 を用いた HCV 遺伝子複製に関わる因子の検索

FLC4 細胞のサブクローン 10 種について HCV レプリコンを導入し、コロニー形成能で複製活性を評価した。その結果、1種のみが HCV 遺伝子を複製でき、ウェスタンブロッティングで HCV タンパク質が検出された。定量的 PCR で HCV RNA 量を定量したところ、Huh7 株での複製量に匹敵した。この FLC4 サブクローンと、HCV 遺伝子を複製できないサブクローンとの間で発現量の差がある遺伝子を、マイクロアレイ解析で調べた。これらのうち実際に HCV 遺伝子複製に関わっている因子を、RNAi 等を用いて同定する。

[染谷友美、村上恭子、石井孝司、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

(6) HCV 遺伝子型2b 由来 RNA レプリコンの作製

現在、遺伝子型1b 以外の HCV クローンを用いた HCV レプリコンは報告されていない。1b 型に比べ IFN に対する感受性の高い 2b 型由来レプリコンの作製を試みた。RNA 導入細胞を G418 処理し薬剤耐性細胞株を選択した。得られた細胞株に2b型HCV遺伝子が維持されていることを IRES 領域の遺伝子解析から確認した。現在、Adaptive mutation の存在を検討するため、全遺伝子配列の解析を行っている。

[江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(7) HCV IRES IIId 領域に結合する宿主因子の検索

HCV 5'非構造領域内の IIId 領域にはコア蛋白質が結合すること、及び同蛋白が HCV IRES 依存的翻訳を抑制する事が報告されている。翻訳抑制の機構として IIId に結合する宿主因子とコア蛋白質の拮抗作用が考えられた。そこで、IIId 領域特異的に結合する宿主因子を検索したところ、p54-nrb、hnRNP-H、PSF 等が同定された。現在これらの蛋白が HCV-IRES 依存的翻訳効率に及ぼす影響、及び、HCV 複製過程に与える影響を検討している。

[村上恭子、松田麻未、下池貴志、宮村達男、鈴木哲朗]

(8) HCV の新たな翻訳調節機構の解明

HCV ゲノム RNA の5'-UTR に存在する IRES 活性は、ウイルス蛋白質およびゲノム配列によって調節されていることが報告されているが、新たな翻訳調節機構が存在する可能性に着目し、検討を行なった。その結果、E1 領域遺伝子から cap 非依存的な翻訳が開始されること、その翻訳活性が NS2 蛋白質によって抑制されることが明らかとなった。

[鈴木亮介、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(9) レプリコンを持つ細胞への HCV 構造蛋白の供給による粒子形成

HCV レプリコンを持つ細胞に構造蛋白を供給することで、レプリコン RNA を中に持つ粒子を形成できる可能性があると考えられる。レプリコンを持つ Huh7 細胞である 9-13 株に、HCV の構造蛋白領域を発現する組換えワクチニアウイルス DIs を感染させ、1週間培養後上清及び細胞を分画して調べたところ、蔗糖密度勾配で構造蛋白、HCV レプリコンは同一の画分に存在し、この RNA は RNase に抵抗性であったことから、レプリコン RNA を含む粒子形成が示唆された。

[石井孝司、村上恭子、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男]

(10) HCV コア蛋白質によるヌクレオキャプシド様粒子の作成

HCV コア蛋白質はウイルス RNA と結合しヌクレオキャプシドを構成すると考えられるが、粒子形成の分子機構は明らかにされていない。コア蛋白遺伝子 (type 1b 及び 3a) を in vitro の転写翻訳系で発現させ、ショ糖密度勾配遠心にかけたところ、コア蛋白質は二つの密度 (約 1.1 と 1.2 g/mL) に収束した。それぞれをネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察したところ、特に 1.2 g/mL 分画で直径約 30—40 nm の粒子構造が観察された。現在、抗コア抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により確認を行っている。

[坂本真一郎、白木和子、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗]

(11) HCV コア蛋白質の細胞内局在化機構の解析

HCV コア蛋白質は細胞内で、ER、ミトコンドリア及び核に存在することを免疫電子顕微鏡法等で確認した。また protease protection assay より、ミトコンドリアでは外膜に存在する可能性が示された。これらの細胞内局在を規定するシグナルの同定を試み、コア蛋白-GFP 融合蛋白を用いた解析から、ER 局在には aa 112-152 領域が、ミトコンドリア局在には aa 112-123 領域がそれぞれ重要であることが明らかとなった。

[鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、下池貴志、松尾恵子 (感染病理部)、岩崎琢也 (長崎大)、鈴木哲朗、宮村達男]

(12) HCV コア蛋白質の核における機能の解明

HCV コア蛋白質は C 末端側の疎水性領域がプロセシングされると

細胞質から核に移行する。コア蛋白質の核内での機能を明らかにするために、C 末端側の疎水性領域を欠損させたコア蛋白質を一過性に発現させ、核タンパク質のプロテオーム解析を行なった。その結果、コア蛋白質の発現に伴い、等電点が変化するタンパク質を同定した。またこの等電点の変化は、リン酸化によるものであることが明らかとなった。現在この核タンパク質の機能解析を行っている。

[鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男]

(13) HCV コア蛋白質によるアポトーシス抑制とその調節機構

Ecdysone 添加によってコア蛋白質を誘導発現する Hep191 細胞株は、肝炎患者肝組織と同レベルにコア蛋白質を産生する。Hep191 細胞では、抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスがコア蛋白発現により抑制されるが、この時カスパーゼ 3 の活性化が抑制されること、アポトーシス抑制蛋白 ICAD の発現が増加すること、を見出している。今回、ルシフェラーゼレポーターを用いた解析から、コア蛋白質による ICAD promoter 活性の亢進作用を観察した。

[堤 武也、Rodolfo Sacco、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(14) HCV コア蛋白発現トランスジェニック (TG) マウスを用いた遺伝子発現プロファイリング

マイクロアレイ、ドットブロット解析の結果、TG マウスの肝組織で発現が上昇する 16 遺伝子、低下する 15 遺伝子を同定した。発現が低下していた遺伝子群のうち IGFBP1 は細胞増殖に関与する IGF の活性を調節すること、lipocalin は血液中でレチノールなどと結合し免疫反応や細胞のホメオスターシスに関与すること、からこれらの遺伝子の発現低下が、HCV コア蛋白による細胞増殖、細胞環境撹乱に寄与している可能性が考えられる。

[堤 武也、鈴木哲朗、小池和彦(東大感染症内科)、宮村達男]

(15) HCV コア蛋白発現 TG マウスにおけるアルコール摂取の影響

コア蛋白発現 TG マウスにエタノール含有食を与えると肝臓内の Reactive Oxygen Species が増加し、p38 MAPK、ERK 等の細胞内シグナル伝達系が活性化する。マイクロアレイ、TaqMan PCR 解析の結果、コア TG マウスで発現が亢進する遺伝子の中で、特に galectin-1 ではエタノール摂取によりさらに発現の上昇が認められた。逆に発現の低下する GST-P1 遺伝子はエタノール摂取によって低下傾向が顕著となった。

[堤 武也、鈴木哲朗、小池和彦(東大感染症内科)、宮村達男]

(16) HCV コア蛋白質とミトコンドリア蛋白 prohibitin との相互作用

コア蛋白発現、及び非発現 HepG2 細胞よりミトコンドリアを抽出し、二次元電気泳動によりプロテオーム解析を行った。その結果、コア発現細胞で増加するミトコンドリア蛋白 14 種類、低下する蛋白 6 種類を同定した。発現の増加する蛋白の中で、chaperone として働き細胞増殖調節にも関与する prohibitin について更に解析した結果、コア蛋白質は prohibitin の翻訳後プロセスに作用すること、prohibitin の N 末端領域と直接結合しうること、を見出した。

[堤 武也、松田麻未、宮村達男、鈴木哲朗]

(17) HCV コア蛋白質による IL-8 の発現調節機構の解析

IL-8 のプロモーター活性は、HCV コア蛋白質によって増強され、実際に内因性 IL-8 の発現も亢進することを見出している。その作用機構を検討するため、IL8 プロモーターの各転写因子結合部位の変異体(置換、欠損)を含む reporter を作製し、プロモーター活性に対するコア蛋白質の影響を検討した。その結果、NF- κB 及び ER ストレス応答によって活性化される ATF6 の結合部位の変異体でそれぞれコア蛋白質によるプロモーター活性の増強が顕著に減少する傾向を示した。

[友部 賢、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗]

(18) HCV コア蛋白質による ER ストレスへの影響の解析

IL8 プロモーターの解析から、コア蛋白質が ER ストレスを介した転写調節系に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、ATF6 の Western blotting を行ったところ、コア発現細胞では、ATF6 の前駆体から活性化型へのプロセシングが促進されていることが明らかとなった。更に、ATF6 により発現調節される GRP78 及び GRP94 遺伝子のプロモーター活性がコア蛋白質によって亢進することを見出した。

[友部 賢、堤 武也、森 和俊(京都大学)、宮村達男、鈴木哲朗]

(19) HCV E1 タンパク質の膜トポロジー

HCV のエンベロープタンパク質 E1 のトポロジー解析を行うため、E1 の 8 つの Cys 残基を全て Ala に置換した Cys-less mutant を構築し、これを基に、Cys 残基を 1 つずつ導入した Cys 走査変異体を作成した。いずれの変異体も野生型と変わらない発現を示した。従って、Cys 変異によりタンパク質構造に大きな影響が及んでいないと考えられる。今後、膜透過性及び膜不透過性の蛍光性 SH 修飾試薬を各変異体に作用させた後、修飾の有無を調べ、Cys 導入位置が小胞体

膜の内側と外側のどちらに存在するかを決定していく。
［染谷友美、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治］

（20）HCV NS5A 蛋白のリン酸化がウイルス RNA 複製へ及ぼす影響
HCV NS5A 蛋白はリン酸化蛋白質であり、インターフェロンに対する感受性や細胞増殖制御に関与することなどが知られているが、HCV の複製増殖に果たす役割は不明である。これまでに、NS5A を部分欠損またはリン酸化部位を点変異させた HCV レプリコンを用いた解析から、ウイルス複製に影響する NS5A 領域が明らかにされつつある。現在、これらの NS5A 変異が他の HCV 蛋白との相互作用、あるいはウイルス翻訳効率へ及ぼす影響について検討を行っている。
［坂本真一郎、根岸英雄、鈴木亮介、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男］

（21）HCV 蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析
HCV コア蛋白質は小胞体、核の他にミトコンドリアに存在し、reactive oxygen species の蓄積などミトコンドリアの機能に影響を与えることが示されている。そこで、コア蛋白を持続発現する細胞株及び対照細胞株から調製したミトコンドリア画分について二次元電気泳動法によりプロファイリングを行った。再現性よく発現変化を認めたスポットを質量分析に供したところ、電子伝達系、細胞周期調節、ストレス応答などに関連する蛋白群を同定することができた。現在、HCV 全蛋白発現細胞を用いて同様の解析を行っている。
［松田麻未、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗］

（22）B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析
HCV 患者の肝外病変のひとつにクリオグロブリン血症がある。これは、HCV 感染した B 細胞の異常増殖が原因とされている。HCV 抗原が B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア発現ヒト B 細胞株の表面分子変化を検索し、HCV コア蛋白発現細胞において CD48 抗原の発現が低下していることが判明した。リアルタイム RT-PCR でも RNA レベルの低下を確認した。一過性にコアを発現させた EBV-B cell line でも同様の結果を得た。CD48 promoter 活性に対するコア蛋白の影響を解析している。
［町田早苗、鈴木亮介、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗］

（23）HCV 陽性糸球体腎炎腎組織における HCV 抗原発現の免疫組織学的検討
HCV 陽性糸球体腎炎患者の腎組織における HCV コア蛋白質の発現を、免疫電子顕微鏡法によって解析した。これまで 6 例検討し、内 5 例の腎組織でコア蛋白陽性であった。染色陽性部は、糸球体基底膜とメサンギウム領域であり、両者とも長径が約 50nm から 150nm の凝集状を呈していた。現在、症例数を増やし検討中である。
［岩堀 徹、中尾俊之（東京医大）、宮村達男、鈴木哲朗］

（24）ヒト不死化メサンギウム細胞（HMC）を用いた HCV 腎症の研究
HCV による腎臓への直接的な障害のメカニズムを調べるため、HMC に対する HCV コア蛋白質の影響を検討した。HMC では、endothelin-1 添加によって MAPK のリン酸化が亢進し、TGF- β添加によって細胞外マトリックスの発現が誘導されるが、コア蛋白質の発現により、これらが増強されることを観察した。現在、HMC の細胞増殖、細胞死等への影響を検討中であるが、HCV コア蛋白質の発現によって、HMC はメサンギウム硬化性変化を来し、HCV が腎障害の病態形成へ直接関与する可能性が考えられる。
［岩堀 徹、宮村達男、鈴木哲朗］

（25）高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs を用いた HCV 蛋白の発現と液性免疫誘導能の検討
ワクチニアウイルスは、その強い免疫誘導能から、組換え生ワクチンとしての応用が考えられており、弱毒化された DIs は安全性の面でも有望な候補である。HCV の構造蛋白領域を DIs に組み込み、培養細胞での HCV 蛋白の発現とプロセシングを確認した。この DIs をマウスに静注あるいは腹腔投与したところ、コア、E1、E2 蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。現在、非構造領域を組み込んだ数種の組換え DIs を作成し、それらの免疫誘導能の比較を行っている。
［石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、赤塚俊隆（埼玉医大）、鈴木哲朗、宮村達男］

（26）HCV 構造蛋白を発現する組み換え DIs による細胞性免疫の誘導
DIsは自身に対する免疫は誘導しないものの、組み込んだ外来蛋白に対する細胞性免疫を強く誘導することが知られており、組み換えDIsは高率に細胞障害性T細胞（CTL）を誘導するワクチン候補として期待される。HCV構造蛋白を発現する組み換えDIsをマウスに免

疫し、overlapping peptideを用いてELISPOT法と^{51}Cr release assayでCTL活性を測定した。特にE2 領域に相当するpeptideに対して強いCTL活性を認めた。

［町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、赤塚俊隆（埼玉医科大学）、宮村達男］

（27）高ペプチド化型HCV コア蛋白発現系によるCTL 誘導の試み

これまでにコア蛋白質はC 末端側の疎水性領域がプロセシングされると、ユビキチン-プロテアソーム系により選択的分解を受けることを明らかにした。一方でCTLの誘導には抗原のプロテアソームによる分解が必須である事から、コア蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系により選択的分解を受けるという性質が、効率的にコア蛋白質のエピトープに対するCTL を誘導しうるかどうかを調べる為に、組換えワクシニアDIs ウイルスを作成し、マウスに免疫し、そのCTL 活性を解析している。

［鈴木亮介、町田早苗、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男］

（28）RNA 干渉技術を用いたHCV 複製阻害剤の検討

近年RNA 干渉を用いたgene silencing が報告されている。HCV はRNA ウイルスであり、RNAi による複製阻害も十分に可能であると考えられる。現在、いくつかのRNAiをデザインし、HCV レプリコン維持細胞を用いてRNA 複製におよぼす影響を検討している。

［江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男］

（29）C 型肝炎の発症進展に関与する宿主遺伝子の解析

日本人健常者及びC 型肝炎患者についてアレル特異的SNP 検出プローブを用いて走査し、染色体1 番にC 型肝炎発症に関連すると思われる2領域を検出した。この領域に存在する遺伝子にはこれまで報告されてきたC 型肝炎関与遺伝子は存在せず、新規関与遺伝子の検出の可能性が示唆された。2 番染色体では有意に偏りを示す部位を8 領域検出した。その分布状態は、2番染色体全体に散在しており、クラスターの形成は認められなかった。2番染色体にはC 型肝炎発症に関与する宿主遺伝子が多数存在することが推察された。

［鈴木哲朗、亀岡洋祐（遺伝子資源室）、吉崎佐矢香、岩堀　徹、宮村達男］

（30）HCV 感染価評価法の開発

生物由来製品におけるHCV の除去、不活化の評価法となりうるHCV 感染実験系の構築を目的とした。ヒト肝由来または非肝臓培養細胞にHCV 陽性血漿を感染させ、細胞に吸着、侵入したHCV 量をリアルタイムRT-PCR 法により定量した。HeLa 細胞では細胞内HCV は検出限界以下であったが、ヒト肝癌細胞HepG2 では、感染2時間後の細胞内HCV レベルは感染ウイルス量とよく相関していた。本法は、HCV の感染性を短時間で定量的に評価できる実験系であり、ウイルスリスク評価技術に資するものと考えられる。

［相崎英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男］

（31）歯科用器具器材のHCV 汚染除去に関する研究

歯科診療において、印象採得時に印象材がHCV に汚染される可能性がある。印象採得物からのHCV 除去法について検討し以下の成績を得た。1) アルジネート印象採得物からは印象直後の水洗で約80%の付着HCV が除去できる。2) 印象後のアルジネート材を、血清が風乾するまで放置し水洗処理を行うと洗浄効果が落ちる。3) アルジネート印象材に付着したウイルスを完全に除去するには流水のみによる物理的な洗浄処理では不十分である。4) ビニルシリコーン印象材の場合は流水処理が十分有効である。

［小俣和彦、鈴木哲朗、佐藤田鶴子（日本歯科大）、古屋英毅（日本歯科大）］

（32）C 型肝炎症例の口腔内滲出液中からのHCV の検出

HCVの院内感染予防対策の一環として、HCVキャリアの口腔内体液中にウイルスがどの程度存在しているのか把握する必要がある。本研究では、HCV抗体陽性者の歯科診療に際して、血液、唾液、歯肉溝滲出液を同時に採取し、各試料中のHCV遺伝子を定量した。血中ウイルスRNA濃度が10^5—10^6copies/mLの場合、唾液中に10^2—10^4、歯肉溝滲出液に10^3—10^5copies/mL程度のHCV RNAが存在する可能性が示された。

［小俣和彦、鈴木哲朗、佐藤田鶴子（日本歯科大）、古屋英毅（日本歯科大）］

4. E 型肝炎ウイルス（HEV）に関する研究

（1）輸入感染症としてのE 型肝炎

98 例の非A 非B 非C 型急性肝炎患者血清を用い、抗HEV-IgM およびIgG 抗体を測定した。ORF1 とORF2 の一部をRT-PCR で増幅後、塩基配列の解読及び系統解析により、HEV の遺伝子型を決定した。海外渡航歴がある56 検体のうち17 検体（30.4%）からIgM 抗

体が検出された。これに対してまったく渡航歴のない32検体のうち3検体(9.4%)からIgM抗体が検出された。塩基配列解析の結果、輸入感染からのHEVはGenotype IとGenotype IVに属し、渡航歴のない3例の遺伝子型は全てGenotype IIIであった。最近のわが国における散発的なE型肝炎は、大部分が輸入例であるが、国内感染と思われる例も検出されるようになってきた。E型肝炎の診断の強化、ワクチンの開発が急務である。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

(2) Genotype III (GIII) 及びGenotype IV (GIV) の構造蛋白の発現

現在、HEVには少なくとも四つのgenotypeが存在する。HEVの血清型は全て同一であろうと推測されているが、明確な実験データはない。HEVの血清型の違いの有無を確認することは、ワクチンの開発、ならびに高感度抗体検査法の樹立に有用である。急性E型肝炎患者血清中からGIIIとGIVの遺伝子を抽出し、構造蛋白をコードするORF2の全長及びORF2のN末端から111アミノ酸を欠失した領域をRT-PCR法で増幅し、定法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を感染して構造蛋白を発現した。現在、GIVのウイルス様中空粒子(VLP)の形成が確認されている。GIIIの発現が進行中である。

[李 天成、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

(3) Genotype I (GI) とGenogroup IV (GIV) の構造蛋白の抗原性の比較

組換えバキュロウイルス発現システムを用い、GIとGIVの構造蛋白ORF2のN末端から111アミノ酸を欠失した領域を発現させ、ウイルス様中空粒子を作製した。GIのウイルス様中空粒子をマウスに免疫し、単クローン抗体を作製した。エピトープが同定された単クローン抗体を用い、それぞれ、GIとGIVのウイルス様中空粒子と反応させ、反応性の違いから抗原性を評価した。その結果、genotype間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存する事が明らかになった。

[李 天成、落合 晋、石古博昭(三菱化学BCL)、武田直和、宮村達男]

5. TTウイルス(TTV)に関する研究

(1) TTVの転写調節機構

TTVの感染増殖における宿主指向性を規定するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。本研究では、種々の培養細胞株におけるTTV遺伝子の転写活性を比較検討し、TTVの転写活性には細胞選択性があること、サル、マウスなどの動物種、また腎臓などの非肝臓細胞でも高い活性を示す細胞が存在すること、を明らかにした。また、非翻訳遺伝子内にコアプロモーター及びエンハンサー領域を同定してきたが、さらにエンハンサーの上流に、転写活性を負に制御するリプレッサー領域が存在する可能性が示唆された。

[鈴木哲朗、鈴木亮介、李 天成、宮村達男]

(2) 輸血後肝炎におけるTTV抗体の臨床的意義

TTV ORF1蛋白に対するIgG抗体を測定するELISA系を確立した。このELISA法を用いて、16―66歳の健康成人血清中の抗TTV抗体を測定した結果、一般健常者でのTTV抗体保有率は1―2%と推定された。また、輸血後肝炎症例における肝機能変化とTTVマーカーとの相関解析を開始した。非B非C型肝炎例において、輸血によって新たにtransmitされたTTV遺伝子を同定するとともに、肝機能マーカーとTTV遺伝子量の変動、及びTTV抗体価との関連を明らかにしていく予定である。

[鈴木哲朗、李 天成、鈴木亮介、宮村達男]

IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. ヒトパピローマウイルスに関する研究

(1) HPV16E6蛋白と結合する宿主蛋白E6APの新規標的蛋白の探索

ヒトパピローマウイルス16型(HPV16)E6蛋白は宿主蛋白であるE6APと複合体を形成しE3ユビキチンリガーゼとして機能し、p53をユビキチン化する。ユビキチン化されたp53はプロテアソームにより分解され、不活化される。E6APはE6非存在下でもE3ユビキチンリガーゼ活性を有する。E6非依存性の基質として、hHR23A, Blk, Cskなどがこれまでに同定されている。E6APの新規標的蛋白を同定するために、PD-MS (Pull down- Mass Spectrometry)法を用いて解析した。E6APに特異的に結合する蛋白として新たに2種類の蛋白を同定した。MALDI/TOFMS法による質量分析の結果、新規標的蛋白である可能性が考えられ、現在、詳細に検討中である。

[椙山裕一、松田麻未、勝二郁夫]

(2) E6AP による Csk の認識機構の解析

Csk は Src ファミリーチロシンキナーゼの抑制性制御因子である。これまでに、E6AP は Csk をユビキチン化しプロテアソーム依存性に分解することを見いだしている。Hect ファミリーE3 ユビキチンリガーゼは基質と直接結合することが知られており、E6AP による Csk の認識機構を解析するために、各蛋白をバキュロウイルスベクターを用い GST または His-tag 融合蛋白として発現、精製し、GST-pull down assay を行った。E6AP と Csk は in vitro においても結合が確認され、直接的に結合するものと考えられた。各蛋白の欠失変異体を作製し、結合領域のマッピングを行っている。

[椙山裕一、勝二郁夫]

2. ヒトポリオーマウイルス BK に関する研究

(1) BK ウイルスのウイルス様粒子の三次構造解析

組換えバキュロウイルス発現システムを応用し、BK ウイルスの構造蛋白領域 (VP1) を発現し、BK ウイルス様粒子 (rBK-VLPs) を作成した。この rBK-VLPs は直径 45nm と 20nm 二種類あり、それぞれクリオ電子顕微鏡撮影と画像解析によって三次構造解析をおこない、直径が 45nm である粒子は T=7 であり、360 のサブユニットが集合して形成されていることを明らかにした。これは他のポリオーマウイルス SV40、PyV と類似する。直径 20nm の粒子は T=1 であった。

[李 天成, 武田直和, 宮村達男, R.H.Cheng (Karolinska Institute, スウェーデン)]

3. ポックスウイルスに関する研究

(1) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の全塩基配列決定

DIs の塩基配列については、制限酵素消化パターンを親株と比較することにより、左端に約 15kBp の欠損が存在することをすでに明らかにしているが、他に小さな欠損や重複が存在する可能性がある。そのためゲノム DNA を精製後ショットガンクローニングを行い、約 190kBp のゲノム全配列の決定を行っている。その結果、左端の欠損以外はほぼ親株と同じであることが明らかとなり、DIs の弱毒化はこの大きな欠損のみに由来するものであることが判明した。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(2) DIs を用いた GBV-B 蛋白の発現

GBV-B はタマリンに慢性肝炎を発症させるフラビウイルスで、その遺伝子構造の類似性からC型肝炎のサロゲート動物モデルとしての応用が考えられている。本研究では、GBV-B の蛋白の一部を組み込んだ組換え DIs を作成し、タマリンに投与することで GBV-B に対する免疫を誘導することができるか、また、免疫を誘導することで GBV-B 感染を防御することができるかどうかの研究を行う。現在までに組換えウイルスを作成して目的蛋白の発現を確認した。

[石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、八木慎太郎(先端生命科学研)、明里宏文(霊長類センター)、鈴木哲朗、宮村達男]

(3) Yaba モンキー腫瘍ウイルス遺伝子の全塩基配列決定

全長134, 721塩基対の Yaba モンキー腫瘍ウイルス遺伝子の塩基配列を決めた。すくなくとも140の ORF について、他のポックスウイルスと比較した。配列がよく保存されている領域にはプロモーター活性が証明された。

[天野浩子、上田良昭、鈴木哲朗、宮村達男、Craig Brunetti, Grant McFadden (西オンタリオ大学、カナダ)]

V. その他の研究

1. RFB 三次元培養系を用いた肝臓特異的転写因子の検討

RFB で高機能肝細胞を培養するとチトクローム P450 (CYP) 3A4 mRNA の発現が単層培養に比べ最大約 100 倍まで増加した。CYP3A4 発現誘導に関与する転写因子 PXR の mRNA も同様の傾向を示した。PXR/RXR、及び PXR の発現を調節する HNF-4 αについてゲルシフトアッセイを行った結果、RFB 培養では、PXR/RXR、HNF-4 α共、単層培養系に比べ大分子量の DNA-蛋白複合体の存在が明らかとなった。現在新規複合体構成因子の探索を進行中である。

[岩堀 徹、相崎英樹、松浦知和(慈恵医大)、鈴木哲朗]

2. 小型／簡易型バイオリアクターの開発

現行のバイオリアクター肝細胞培養系は1) 多量の細胞を必要とする、2) 操作が煩雑である、3) 経時的に細胞を採取できない、などの問題点がある。そこで、これらの問題点を解決するため、バイオット社と共同で 5ml サイズの小型カラムを並列に連結した連結型リアクター、及び一体成型の担体の開発を行っている。現在、各カラムを用いて FLC4、Huh7 細胞が安定に長期培養可能かどうか、確認を行っている。

[村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達

男]

3. 新規三次元マトリックス Mebiol Gel を用いた肝細胞三次元培養系の開発

Mebiol Gel は温度感応性疎水高分子と親水性高分子の共重合体であり、低温でゾル、25℃以上でゲル化する性質を持つ。HepG2、Huh7 細胞は、この Mebiol Gel 中でスフェロイドを形成しながら増殖しうることを見出した。形成されたスフェロイドでは単層培養に比べ、ギャップジャンクション構成蛋白 Connexin 32 の発現が亢進し、細胞膜への局在化がより顕著であった。現在、プロテオーム解析により Mebiol Gel 培養細胞で発現の変化する蛋白群の同定を行っている。[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗]

＜別＞ 検査業務

第1室:

行政検査

ノロウイルス確認検査 3 件、42 検体

E 型肝炎確認検査 13 件、13 検体

研究検査

E 型肝炎検査 21 件、21 検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1 件

同上 中間段階 1 件

第2室:

行政検査

7 名の被験者から分離された 7 株のポリオウイルスが検査され、中和による同定試験、PCR-RFLP 法による型内株鑑別試験の結果、すべてワクチン株であった。

第4室:

依頼試験

B 型肝炎ウイルス体外診断薬 1件

C 型肝炎ウイルス体外診断薬 1件

行政検査

C 型肝炎ウイルス遺伝子解析 1件、33検体

B 型肝炎ウイルス遺伝子解析 1件、5検体

研究検査

TTV 遺伝子解析 1件、10検体

HGV 遺伝子解析 1件、10検体

第5室:

検定業務

乾燥組織培養不活化 A 型肝炎ワクチン 2件

組換沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 6件

組換沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14 細胞由来) 6件

依頼試験

A 型肝炎ウイルス抗体検出用キットの感度･特異性試験 1件

A 型肝炎ワクチン抗原含量試験･原液及び最終バルク 各1件

発表業績一覧

誌 上 発 表

1. 欧文発表

原 著

1) Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, and Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 721-724, 2002.

2) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, and Takeda N: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 299: 225-239, 2002.

3) Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, and Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. Intervirology 45: 136-141, 2002.

4) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, and Miyamura T: Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. Virology 304: 415-24, 2002.

5) Matsui M, Moriya O, Abdel-Aziz N, Matsuura Y, Miyamura T, and Akatsuka T: Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. Vaccine 21: 211-220, 2002.

6) Ishii K, Moss B: Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex. Virology 303: 232-239, 2002.

7) Tano Y, Shimizu H, Shiomi M, Nakano T, and Miyamura T: Rapid serological diagnosis of enterovirus 71 infection by IgM ELISA. Jpn. J. Infect. Dis. 55: 133-135, 2002.

8) Aizaki H, Otsuka M, Matsuda M, Li YW, Harada T, Kawakami H, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T: Expression profiling of liver cell lines expressing entire polyprotein of hepatitis C virus. Hepatology 36: 1431-1438, 2002.

9) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, and Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys. J. Med. Virol. 67: 207-216, 2002.

10) Hatsu M, Tanaka M, Utama A, Shimizu H, and Takamizawa K: A Japanese encephalitis virus NS3 inhibitor produced by streptomyces sp. actinomycetologica 16: 6-8, 2002.

11) Huang S, Greening G, Baker M, Grimwood K, Webber L, Fitzsimons A, Garret N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Pallansch M: OPV virus circulation and evolution investigated in New Zealand. Polio Lab Network IX, 2-3, 2003.

12) Matsuura Y, Burioni R, Mancini N, Tani H, Miyamura T, Varaldo PE, and Clementi M: Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. J. Virol. 76: 11775-11779, 2002.

13) Miyamura T, and Matsuura Y: Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In Viral Hepatitis and Liver Disease. (Margolis HS, Alter MJ, Liang TJ, and Dienstag JL. ed.), International Medical Press, Atlanta 289-293, 2002.

14) Horie H, Yoshida H, Matsuura K, Miyazawa M, Ota Y, Nakayama T, Doi Y, and Hashizume S: Neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from sewage in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 68: 138-142, 2002.

15) Munemura T, Saikusa, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, and Miyamura T: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. Arch. Virol. 148: 253-263, 2003.

16) Pelletier I, Ouzilou L, Arita M, Nomoto A, and Colbere-Garapin F: Characterization of the poliovirus 147S particle: new insights into poliovirus uncoating. Virology 305: 55-65, 2003.

17) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, and Seki N: Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 443-7, 2003.

18) Ding X, Gu H, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li T-C, Sata T, and Abe K: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. Jpn. J. Infect. Dis. 56: 19-22, 2003.

19) Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, Sata T, Nakamura S, and Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (Macaca fuscata). Jpn. J. Infect. Dis. 56: 8-11, 2003.

20) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, and Suzuki T: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug “metabolism using a bioartificial liver”. Hepatology 37: 665-673, 2003.

21) Uno-Furuta S, Matsuo K, Tamaki S, Takamura S, Kamei A, Kuromatsu I, Kaito M, Matsuura Y, Miyamura T, Adachi Y, and

Yasutomi Y: Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. Vaccine 21: 3149-3156, 2003.

22) Shi ST, Lee K, Aizaki H, Hwang SB, and Lai MMC: Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane rich in caveolin-2. J. Virol. 77: 4160-8, 2003.

23) Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba A, Ahmed N, Campagnoli R, Van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, and Kew O: Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. J. Virol. 77: 8366-8377, 2003.

24) Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, and Kawata S: Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. J. Med. Virol. 71: 56-61, 2003.

25) Li T-C, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L, Cheng HR, and Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. Virology 311: 115-124, 2003.

26) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, and Katayama K: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 41: 1548-1557, 2003.

27) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Suzuki T, and Miyamura T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein in the ecdysone-inducible system of human liver cells. Virology 317: 24-35, 2003.

和文発表

1) 石川和子, 筒井理華, 三上稔之, 大友良光, 畑山一郎, 宇田川悦子: 修学旅行中に発生した Norwalk Virus による食中毒. 青森県環境保健センター所報, 5-8, 2002.

2) 清水博之: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. 臨床とウイルス 30: 329-335, 2002.

3) 染谷雄一: SRSV (Small Round-Structured Virus). 小児科 2003 年第 44 巻3月増刊号.

4) 染谷雄一: ウイルス性腸炎. 診断と治療 2003 年 91 巻 7 号.

5) 片山和彦: ノーウォークウイルス診断法の進歩. ワールドフォーカス 43: 1～2, 2003.

6) 片山和彦: 新世紀の感染症学: カリシウイルス. 日本臨牀 61 増刊号:3: 468～474, 2003.

7) 白土東子, 片山和彦: 新世紀の感染症学: ノロウイルス. 日本臨牀 61 増刊号 3: 475～479, 2003.

8) 武田直和: E 型肝炎騒動. インフェクションコントロール 12: 1, 2003.

9) 田中智之, 斎藤博之, 原みゆき, 東方美保, 武田直和: 嘔吐下痢症の対応と予防.月刊健. 31: 42-44, 2003.

10) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ウイルス粒子と抗体検出系. 化学療法の領域. 19: 327-333, 2003.

11) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎. 日本臨床 61: 640-646, 2003.

12) 武田直和: ノーウォークウイルス (NV) 性下痢症の概要. 日本臨床 60: 1138-1142, 2002.

13) 武田直和. 感染症の話: 急性出血性結膜炎. 感染症週報 (IDWR) 4: 13-15, 2002.

14) 武田直和: ウイルス性胃腸炎. 山崎修道 (監修) , 小早川隆敏 (編集) 新版･感染症マニュアル, スパイラル出版, pp 98-100, 2002.

15) 宮村達男: ポリオ (急性灰白髄炎) Poliomyelitis. 感染症マニュアル, スパイラル出版 pp 210-213, 2002.

16) 宮村達男: ポリオ根絶の戦略. 最新医学 57: 23-29, 2002.

17) 宮村達男: ポリオワクチン. からだの科学 227: 102, 2002.

18) 清水博之: 手足口病. 綜合臨床 52: 192-197, 2003.

19) 遠田耕平、清水博之、宮村達男. インドのポリオ根絶の現状。醫事新報 (印刷中) 2003.

20) 下池貴志: 知っていますか？ 食べ物でおこるA型肝炎. 食と健康 561: 8-17, 2002.

21) 永森静志, 金井好克, 宮崎正博, 本間正充, 宮村達男, 鈴木哲朗, 相崎英樹, 梅田 誠, 田中憲穂, 佐々木澄志, 千葉 寛, 細川正清, 松浦知和, 小田裕昭, 吉田 彪: ヒト培養細胞の肝機能発現とその利用法 —バイオ人口肝の多角的な応用をめざして—. 細胞,ニュー･サイエンス社 pp 2-9, 2002.

22) 石井孝司, 宮村達男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株のウイルス学的解析とウイルスベクターとしての応用. 感染 炎症 免疫, 医薬の門社, pp68-71, 2002.
23) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: E型肝炎ウイルス. 血液フロンティア, 13: 21-28, 2003.
24) 宮村達男: 世界ポリオ根絶計画と日本のワクチン戦略. バイオサイエンスとインダストリー 61: 192-198, 2003.
25) 岩崎琢也, 清水博之, 永田典代: 新興･再興感染症, 輸入感染症の臨床と病理: エンテロウイルス 71. 病理と臨床 21: 110-114, 2003.
26) 宮村達男: 新世紀の感染症学―その病態解明と治療に挑む: C型肝炎の問題と最新研究. 埼玉医科大学雑誌 30: 74-79, 2003.

学 会 発 表

国際学会

1) Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-based assay for the detection and genogrouping of Norwalk-like virus in stools using genogroup I and II-specific monoclonal antibodies. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, May 20-23, 2002.
2) Utagawa ET, Nakazawa E, Nagaoki I: Application of an automated particle search system to transmission electron microscopy for the detection of caliciviruses in clinical specimens. XIIth International Congress of Virology, Paris, France July 27-Aug 1, 2002.
3) Li TC, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, RH., Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. ibid.
4) Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda T: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. ibid..
5) Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses"based on phylogenetic analyses of 18 full genome sequences. ibid.
6) Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequemce of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. ibid.
7) Ishii K, Moss B: III-1 mapping interaction sites of the A20R protein, a component of the vaccinia vivus DNA replication complex. XIVth International Poxvirus and Iridovirus Workshop, Lake Placid, USA, Sep 20-25, 2002.
8) Shimizu H: Enterovirus surveillance and laboratory diagnosis -before and after the eradication of poliomyelitis -. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious, Hanoi, Viet Nam, Nov 28-30, 2002.
9) Yatsuhashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan-incidence and comparison of HEV markers between Japan and Bangladesh-. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002, Taipei, Taiwan, Sept 26-29, 2002.
10) Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, Jan 11-13, 2003.
11) Yatsuhashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan : National hospital report. ibid.
12) Suzuki T, Suzuki R, Matsuura Y. Miyamura T: Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein. ibid.
13) Miyamura T. HCV infection and hepatocellular carcinoma. 11th International Symposium on Viral Hepatitis & Liver Disease. Sydney, Australia, Apr 6-10, 2003.
14) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, and Miyamura T: An outbreak of hepatitis C in an outpatient clinic in Japan. ibid.
15) Miyamura T.: Global and national polio control: Vaccine strategy. International Symposium on Vaccination at the beginning of the 21st century, Tokyo, Japan, Jul 11-13, 2003.
16) Utagawa ET: New developed an automated particle search (ASS) system with TEM for the detection of Gastroenteritis viruses. Robert Koch Institute, Berlin, Garman Aug 2, 2002.

17) Miyamura T: Molecular epidemiology of non-polio enteroviruses. National Institute of Health, Thailand, Feb 19, 2003.

国内学会

1) 小林慎一, 榮 賢司, 宮崎 豊, 田中智之, 名取克郎, 武田直和: Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出. 第 23 回衛生微生物技術協議会, 2002 年 7 月, 奈良.
2) 田中智之, 内野清子, 岩上泰雄, 吉田永祥, 鎌田公仁夫, 名取克郎, 武田直和: NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義. 同上.
3) 實方剛, 堀田博, 谷口孝喜, 和久田光毅, 宇田川悦子: インドネシアにおける A 群ロタウイルスの流行状況. 第 50 回日本ウイルス学会, 2002 年 10 月, 札幌市.
4) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: HEV そのウイルス学. 宮川庚子記念研究財団ワークショップ: 日本の E 型肝炎, 2002 年 10 月, 横浜.
5) 高村史記, 新倉昌浩, 武田直和, 宮村達男, 保富康宏: HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導. 第50回日本ウイルス学会学術集会, 2002年10月16-18日, 札幌.
6) 石古博昭, 三浦里香, 島田康司, 山崎修道, 武田直和: VP4 塩基配列に基づく系統解析によって, ヒトライノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された. 同上.
7) 内野清子, 岩上泰雄, 三好龍也, 吉田永祥, 前田章子, 田中智之, 鎌田公仁夫, 北本憲利, 名取克郎, 武田直和: NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点. 同上.
8) 影山 努, 小嶋慈之, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 白土東子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製. 同上.
9) 勢戸祥介, 入谷展弘, 名取克郎, 武田直和, 久保英幸, 綾田 稔, 小倉 壽, 青木孝祐: 大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析. 同上.
10) 植木 洋, 有田富和, 後藤郁男, 山木紀彦, 佐藤千鶴子, 渡邉 節, 沖村容子, 秋山和夫, 山本俊夫, 白石廣行, 武田直和: 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出した NV の遺伝子解析. 同上.
11) 入谷展弘, 勢戸祥介, 久保英幸, 青木孝祐, 名取克郎, 武田直和, 瀬戸俊之, 服部英司, 綾田 稔, 小倉 壽: 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答. 同上.
12) 白土(堀越)東子, 片山和彦, 田村 克, 名取克郎, 岡智一郎, 武田直和, 宮村達男: ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討. 同上.
13) 片山和彦, 白土(堀越)東子, 岡智一郎, 小嶋慈之, 影山 努, 福士秀悦, 武田直和: Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 同上.
14) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: BK ウイルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用. 同上.
15) 保富康宏, 高村史記, 新倉昌浩, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ウイルス (HEV) ウイルス様中空粒子 (VLP) をベクターとして用いた経口ワクチンの開発. 同上.
16) 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: ポリオウイルスの神経毒性現象におけるウイルスタンパク質合成の役割. 同上.
17) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 宗村徹也, 西尾 治, 吉田 弘: 脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出されたコクサッキーA 群ウイルス. 同上.
18) 山崎謙治, 横田陽子, 左近直美, 吉田智子, 吉田 弘: 滋賀・大阪の無菌性髄膜炎患者から分離されたエコーウイルス4型の抗原性についての検討. 同上.
19) 勝二郁夫, Peter Howley: E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解. 同上.
20) 森石恒司, 岡林環樹, 中井康介, 鈴木亮介, 宮村達男, 松浦善治: HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構. 同上.
21) 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男: 弱毒ワクシニアウイルス DIs を用いたC型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 同上.
22) 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男: HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の検索. 同上.
23) 石井孝司, Bernard Moss: Clustered charge-to-alanine mutagenesis を用いたワクチニアウイルス蛋白 A20R の機能解析. 同上.
24) 林 昌宏, 谷 英樹, 鈴木健介, 菰田泰正, 森石恒司, 鈴木亮介, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプ VSV の感染初期過程の解析. 同上.

25) 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 エンベロープタンパク質の小胞体における膜トポロジー. 同上.

26) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗; C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.

27) 中井康介, 森石恒司, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析. 同上.

28) 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 馨, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男: C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上.

29) 清原知子, 戸塚敦子: 抗イディオタイプ抗体を用いたA型肝炎ウイルス中和エピトープの研究. 同上.

30) 武田直和: Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性, 第14回ウイルス性下痢症研究会, 2002年10月, 札幌.

31) 勝二郁夫, ハウリー ピーター: E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解. 第61回日本癌学会総会, 2002年10月, 東京.

32) 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男: C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における MAPK の活性化の検討. 同上

33) 宮村達男: ポリオ根絶計画と野生株ウイルスの封じ込め. 第 2 回日本バイオセーフティー学会総会, 2002年11月, 東京.

34) 宮村達男: 新世紀の感染症学—その病態解明と治療に挑む. C型肝炎の問題と最新研究. 埼玉医科大学医学会総会公開シンポジウム 2002年11月, 埼玉県入間郡.

35) 片山和彦: ウイルスの遺伝子解析の現状と今後の展望. 衛生検査専門技術研修学術講演会, 学術講演, 2002年12月, 横浜.

36) 松原尚子, 片山和彦, 白土東子, 岡智一郎, 小川智子, 武田直和, 浜野国勝, 影山 努, 福士秀悦, 小嶋滋之, 影山 努, 高井礼子, 星野文則, 宮村達男: バキュロウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現. 第25回日本分子生物学会, 2002年12月, 横浜.

37) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammaliam cells. 同上.

38) 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治: PA28 γによるC型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 同上.

39) 亀岡洋祐, Persad Amanda, 小池和彦, 堤 武也, 松浦知和, 須藤 勉, 井出達也, 田中一雄, 佐田通夫, 日野邦彦, 神代正道, 橋本雄之, 宮村達男, 鈴木哲朗: G型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索. 同上.

40) 勝二郁夫、Peter Howley. E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解。同上.

41) 染谷雄一, 武田直和, 宮村達男: ノロウイルス（ノーウォーク様ウイルス）3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と生化学的性状の解析. 日本薬学会第123年会, 2003年3月, 長崎市.

42) 染谷雄一: ノロウイルスタンパク質の構造と機能. 平成15年度日本生化学会関東支部シンポジウム, 独創的パイオニアによる生化学フロンティア研究, 2003年4月, 東京.

43) 宮村達男: C型肝炎ウイルスと肝発がん. 第7回がん分子標的治療研究会総会, 2003年6月, 東京.

44) 黒岩宙司, 山中美紀, 宮沢美和子, 堀江 均, 吉田 弘: 根絶宣言前後のラオスにおけるポリオ抗体価の検討. 第 44 回日本臨床ウイルス学会, 2003年6月, 鹿児島.

45) 宗村徹也, 七種美和子, 川上千春, 野口有三, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 吉田 弘: 分子系統計学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定. 同上.

46) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: E 型肝炎について：輸入感染症としての E 型肝炎. 衛生微生物技術協議会第 24 回研究会, 2003年7月, 福岡市.

47) 瀬戸祥介, 綾田 稔, 小倉 壽, 入谷展弘, 久保英幸, 春木孝祐, 名取克郎, 武田直和: Alphatron type NV について. 同上.

48) 片山和彦: カリシウイルスの分子疫学. 同上.

49) 吉田弘: ポリオ根絶への長く困難な道、第5回日本進化学会、2003年8月、福岡.

3．ウイルス第三部

部　長　　田　代　眞　人

概　要

当部は、平成 14 年 4 月 1 日の組織再編によって、旧ウイルス第 1 部の呼吸器系ウイルス室がインフルエンザ担当の第 1 室に、ウイルス製剤部の風疹・水痘ウイルス室が風疹担当の第 2 室に、同麻疹ウイルス室が第 3 室に、同ムンプスウイルス室が第 4 室に、同サイトカイン室がインフルエンザ以外のウイルス性呼吸器感染症およびサイトカイン担当の第 5 室として、新たに構成された。全ての室は村山支所に配置され、平成 14 年 9 月からは第 1、第 2、第 3 室が新築された技術研究棟に移転した。12 月からは、5 号棟の一室を麻疹・風疹・ムンプス各ワクチンの検定用として専用に用いている。

旧ウイルス製剤部の組織細則・業務規定では、担当するワクチン製剤の品質管理業務及びそれに関する研究のみが業務と規定されていたが、今回の組織再編に伴って、当部の研究業務は、従来の品質管理業務に加えて、当該疾患の病原・病因・予防・診断・治療法等に関する研究およびレファランス業務および国際協力が加えられた。

人事異動では、平成 14 年 4 月 1 日付けで久保田耐研究官、同年 11 月 1 日付けで木所稔主任研究官の 2 名が第 4 室に採用された。一方、平成 15 年 3 月 31 日付けで、中島節子第 2 室長、坂田宏子第 3 室主任研究官が定年退官した。

当部は、インフルエンザワクチン、風疹ワクチン、麻しんワクチン、おたふくかぜワクチン、γ-グロブリン製剤に関する国家検定、検査、研究業務を担当し、生物学的製剤 GMP 査察にも協力している。国家検定・検査項目から外されたインターフェロン製剤については収去検査を行った。現行の品質管理体制に関しては、検定項目や検査方法を科学の進歩に応じて見直して、生物学的製剤基準の改定作業を進めた。また GMP を中心とする新たな品質管理体制の構築と国際的に通用する近代的な品質管理体制への転換を図るための議論・研究も進めた。

7 月には、ユニセフ買い上げ麻疹ワクチンに関する WHO の査察が行われ、同年 4 月に WHO が定めた新品質管理体制の基準に照らして、我が国における従来の検定検査実施体制が評価され問題点が指摘された。これを機に、当部における従来の検定実施に関して再検討を行い、感染研および当部で対応出来るものについては改善を行った。特に作業手順、作業記録、構造設備等については、WHO新基準に準拠した国際的対応可能な体制に改めた。ワクチン製剤の安全性と有効性の確保という国民の付託と National Control Laboratory としての責任を果たすために、部内外で開かれた検討を行い、限られた施設、人員、予算の中で、実施品目、項目の必要性、優先順位を明確にして、基本方針の意思統一を図っている。

研究活動としては、インフルエンザについては、流行動向調査事業として、全国地衛研と協力して流行ウイルスの抗原・遺伝子解析と流行予測を行い、ワクチン製造株を選定した。また抗原解析およびワクチン品質管理用の各種標準品を製造して配布した。更に新型インフルエンザ対策・準備・ワクチン緊急開発体制の確立を進めた。麻疹に関しては、WHO 拡大予防接種計画に応じて、麻疹における免疫抑制機構の解析、ワクチンの安全性と有効性、成人麻疹の実態と原因、2 次性ワクチン効果不全の鑑別と実態解明、およびこれらに基づいた国及び WHO ワクチン政策見直しへの提言、IgM 抗体簡易診断法の実用化、麻疹ウイルスの分子疫学等を地方衛生研究所等および諸外国、WHO と連携して進めた。風疹ウイルスでは母児感染・先天性風疹症候群の分子疫学及び血清診断法の標準化、風疹ウイルス病原性機序の研究を進めた。ムンプスウイルスでは、分子疫学的研究を地方衛生研究等と連絡して進め、またワクチンについては細胞由来レトロウイルスの検出方法の改良、検定方法の合理化が行われた。サイトカインでは、麻疹ウイルス感染によるサイトカイン産生動態およびインターフェロン感受性・抵抗性の解析、二重鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素の研究を進めた。その他、パラミクソウイルスの標的細胞特異性と病原性に関する分子機構について、センダイウイルスを用いてリバース・ジェネティクスを駆使した研究を進め、P/V/C 遺伝子・蛋白による宿主防御機構からの逃避など病原性発現機構への意義付けを明確化した。

国際協力では、WHOインフルエンザ協力センターとして世界各国から送付された分離ウィルスの解析および候補ワクチンの効果予測を行い、WHOインフルエンザワクチン推奨株を決定した。更にWHO世界インフルエンザ計画に参画し、地球レベルでの監視体制、被害算定、大流行対応

計画を推進した。また中国におけるインフルエンザ計画を援助した。麻疹、風疹に関しては、WHOの要請で中国、ガーナ、トルコ等に出張して研修等を行い、また途上国からも研修生を受け入れて、サーベイランスとワクチン品質管理に関する研修を行った。

重症急性呼吸器症候群(SARS)に関する対応としては、WHO協力センターとして、2月末に中国に対して情報提供とWHO調査団受け入れに関する交渉等を行うとともに、ウイルス第1部外来性ウイルス室と協力して、SARSが未知の病原体によることをWHOに報告した。3月17日からはWHO SARS研究ネットワークの一員として、病原体の特定と検査方法の確立に参画し、新発見されたコロナウイルスをSARS病原体として特定し、各種検査方法を開発した。更に、国内における検査診断体制を確立するとともに、WHO西太平洋地域のSARSレファランス研究所として、当該地域のウイルス診断、血清診断および技術支援を担った。

研 究 業 績

Ⅰ インフルエンザウイルスに関する研究

1. インフルエンザウイルス流行株のサーベイランス

全国の74地方衛生研究所および関連施設の協力のもとに、インフルエンザウイルスの分離を実施した。2002/2003シーズンには総数約7125株のインフルエンザウイルスが分離され、分離株数からみた流行規模は昨シーズンなみであった。今シーズンの流行の形態はA/香港型67%、B型33%で、A/ロシア型の流行はなかった。A/香港型ではワクチン株のA/パナマ/2007/99類似株が68%を占めたが、HA蛋白上に特徴的なアミノ酸置換（H155TおよびQ156H）をもち、抗原性がA/パナマ/2007/99から4倍以上変化した株が徐々に増加してきた。一方、B型ウイルスには抗原的に異なる2つの系統（B/山形系統とB/ビクトリア系統）が存在するが、今シーズンは昨シーズンと同様に分離株の大半はB/ビクトリア系統でB/山形系統の分離株は少なかった。これら、解析結果は定期的にWISH-NETを通じてまたは個別に地衛研に報告された。また解析結果はウイルス学会、臨床ウイルス学会、衛生微生物協議会等の研究集会などを通じて研究機関や臨床医へも還元され、さらに感染研HPで一般にも還元された。［西藤岳彦、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、板村繁之、今井正樹、二宮愛、渡辺真治、金子睦子、小田切孝人、田代眞人］

2. WHOインフルエンザ協力センターとの共同研究

WHOインフルエンザ協力センターはウイルス第3部第1室を含めて欧米諸外国に4カ所存在する。当室では東アジア地区のインフルエンザ株サーベイランスを担当しており、日本における分離株のみならず、中国、ベトナム、フィリピンからも分離株や分離検体を入手して流行状況を解析した。これらの結果は、適宜、検体送付国へ報告し、それぞれの株サーベイランスに貢献した。また、国内での主流行株や変異株、それらに対するフェレット抗血清および解析情報は随時WHOセンター間で交換され、年2回（9月、2月）開催されるWHOインフルエンザワクチン株選定会議でも報告された。［西藤岳彦、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、板村繁之、今井正樹、二宮愛、渡辺真治、金子睦子、小田切孝人、田代眞人］

3. 動物インフルエンザウイルス系統保存

新型インフルエンザウイルスの出現時に、それに抗原性が近似したワクチン製造株を速やかに供給できるように、自然界に存在する15種類全ての亜型のウイルスの収集・系統的分類およびそれらに対する抗血清の作製を完了させた。また、新たにトリからは9株分離され、それらの抗原解析の結果、H1N1,1株、H1N6,1株、H3N8,2株、H3N6,1株、H5N3,2株、H8N3,1株、H11N9,1株であった。また、ブタからは2株が分離され、トリのウイルスとともに感染研の動物インフルエンザウイルス保存バンクに組み込まれた。［今井正樹、二宮愛、渡辺真治、
西藤岳彦、斉藤利憲、板村繁之、小田切孝人、田代眞人］

4. 新型インフルエンザワクチン（H9N2）の力価測定系の確立

トリから由来する新型インフルエンザが流行した場合に備えて、これまで人に感染したことのあるトリウイルスでワクチン製造株の種ウイルスを作製し、その力価を一元免疫拡散(SRD)法で測定できるシステムを確立することは重要である。今年度は1999年に中国で人に感染し、H5N1ウイルスの遺伝子供与体となったH9N2ウイルスについて、その準備を行い、SRD用の抗血清試薬を作製し、力価測定が可能になった。［二宮愛、
今井正樹、渡辺真治、板村繁之、西藤岳彦、斉藤利憲、
金子睦子、伊東玲子、中矢陽子、小田切孝人、田代眞人］

5. 国内で最初に確認されたA/H1N2型インフルエンザウイルスの分離・同定

2002年2月、横浜市泉区の中学校でインフルエンザ様疾患の集団発生報告があり患者うがい液から２株のA/H1型インフルエンザウイルスが分離された。感染抗血清を用いて分離株の赤血球凝集素(HA)タンパクの抗原性を解析したところ、両株とも2001/2002シーズンのワクチン株であるA/New Caledonia/20/99に類似した抗原性を示すことが明らかとなった。本集団かぜ由来分離株のNA亜型同定をRT-PCRにより行ったところN2型であることが明らかになり、H1N2ウイルスが国内で初めて分離されたことが示唆された。一方、01/02シーズンはA/H3型が混合流行していたことから、被検患者がA/H1、A/H3両亜型のウイルスに混合感染し、ウイルス分離過程において遺伝子再集合が起こった可能性を否定するため、うがい液からの直接RT-PCRやプラーククローニングによる確認作業を行った。また、横浜市衛研と感染研で同一検体からそれぞれ独立に行なったウイルス分離と亜型の同定の結果も一致したことから、本集団かぜ事例から分離されたA/横浜/22/2002およびA/横浜/47/2002の２株が、我が国で最初のH1N2型インフルエンザウイルスの分離例である事が確認された。また、HA, NAおよび内部遺伝子の塩基配列を海外で分離されたH1N2型ウイルスと比較し、その遺伝的由来が海外の分離株と同じであることを明らかにした。[西藤岳彦、川上千春（横浜市衛生研究所）、斎藤利憲、中矢陽子、伊東玲子、小田切孝人、
田代眞人]

6. B型インフルエンザウイルスNS2蛋白の性状と機能に関する研究

B型インフルエンザウイルスのNS2（BNS2）は第８分節RNAによってコードされている分子量14kDの蛋白である。NS2蛋白の性状や機能についてはA型ウイルスではよく知られているが、B型ウイルスについては殆ど分かっていない。我々は、BNS2に特異的な抗血清を作製し、感染細胞内およびウイルス粒子中におけるBNS2の性状解析を行った。その結果、B型ウイルスもA型ウイルスと同様に、BNS2は合成後は速やかに核へ移行し、ウイルスヌクレオカプシド（vRNP）に直接結合して複合体を形成することが分かった。しかし、A型とB型ウイルスではvRNPとの複合体形成機序が異なり、BNS2はvRNPに直接結合していることが明らかになった。
［今井正樹、渡辺真治、小田切孝人］

7. B型インフルエンザウイルスBM2蛋白の性状と機能に関する研究

B型インフルエンザウイルスの第７分節RNAは、２種類の膜蛋白質M1、BM2をコードしている。BM2はB型ウイルスのみに存在する蛋白質であるが、その機能は不明である。我々はBM2の機能を明らかにするために、リバースジェネティクス法を用いてBM2欠損変異株を作製し、その性状を解析した。BM2の開始コドンをACCに変換したBM2欠損変異株（BM2 ΔATG）は野生株と同等の感染価をもつウイルスとして回収された。BM2 ΔATG変異株を感染させた細胞内では、BM2は検出されなかった。しかし、精製ウイルス粒子中には、ごく少量のBM2が検出された。このことから、BM2の合成には通常のAUGコドンを用いない別の開始機構も存在する可能性があること、さらに、少量のBM2でもウイルス増殖は維持されることを明らかにした。[渡辺真治、今井正樹、二宮愛、小田切孝人]

8. インフルエンザワクチンの効果指標としてのHI抗体価と中和抗体価の比較

インフルエンザワクチンの効果判定の有用な指標としてHI抗体価が主に使用されてきた。新型インフルエンザ(A/H5N1)に対するワクチン株開発の過程で、ワクチンによって誘導された抗体応答を中和抗体とHI抗体について1997年と2001年に流行したウイルス株で比較したところHI抗体価と中和抗体価に大きな乖離があることを見出した。1997年に流行した株に対する中和抗体とHI抗体を、いくつかの条件でワクチンを免疫またはウイルス株を感染させたマウスの血清について調べたところ、HI抗体価と中和抗体価には相関関係が認められたが抗体価は中和抗体の方が高かった。従って1997年と2001年のウイルス株によってHI抗体価と中和抗体価に大きな乖離があることは、ウイルス株特異的に中和抗体とHI抗体の検出感度が異なることによると考えられる。従来ウイルスの抗原性の変異はHI試験によって解析され、ワクチンの変異株に対する有効性はその結果に基づいて推測されていた。新型インフルエンザウイルスで見られたこの現象が、毎年ヒトに流行を起こしているA/H1、A/H3、B型ウイルスについても見られるのか検討を進めている。
[板村繁之・田代眞人]

9. 新型インフルエンザに対する経鼻接種ワクチンの開発

新型インフルエンザに対するワクチン開発を目的として、1997年に香港で流行を起こした新型インフルエンザ(A/H5N1)に対する不活化ワクチンの臨床試験を実施したが抗体応答が極めて低く、免疫原性を増強する必要のあることが明らかになった。現行の製造方法に基づいた新型インフルエンザ(A/ H5N1)に対するワクチンを使用して免疫応答を高める方法としてコレラトキシンBサブユニットと併用した経鼻接種ワクチンをマウスを用いて検討した。その結果、H5ウイルスの致死的感染から防御する免疫応答が誘導できた。通常のインフルエンザワクチンでは抗体応答が低い系統のマウスでも比較的高い応答が得られた。用量及び免疫回数等について皮下接種との比較を進めている。また、経鼻接種によって得られる鼻腔洗浄液中の感染防御に必要なHAに対する特異的最小IgA抗体の定量化を行った。この特異的IgA抗体を測定することによって感染防御に必要な免疫応答を簡便に測定してワクチン開発を効率的に進めることが可能になった。[板村繁之・尾崎泰子（感染病理部）・田村慎一（感染病理部）・佐多徹太郎（感染病理部）・田代眞人]

10. 重症急性呼吸器症候群（SARS）の実験室診断と国際協力

2003年3月に香港から世界中に流行が広がったSARSは、7月5日にWHOから終息宣言が出されるまでの間に、世界32か国で8422人の感染者と916人の死者を出した。SARSが出現する１ヶ月前の２月には、香港および中国福建省でトリの新型インフルエンザウイルスH5N1がヒトに感染し、感染者2名のうち１名が死亡する事例が発生し、当初は病因として新型インフルエンザウイルスが疑われたことから、感染研においてはウイルス第３部第１室がSARSを担当することとなった。一方、WHOはSARS流行発生と同時に、感染研を含む世界13研究施設からなるWHO-SARS共同研究ネットワークを設立し、原因ウイルスの同定を最優先課題として取り組み、流行発生から約１ヶ月という驚異的な早さで病因のSARS-コロナウイルスを同定した。感染研ウイルス１部、３部SARS共同研究チームは、WHO共同研究ネットワークの一員として、ベトナム、フィリピン、モンゴル、香港、韓国などから患者検体を受け入れ、RT-PCRによるSARS-CoV遺伝子の検出、培養細胞によるウイルス分離、間接蛍光抗体法、中和反応、ELISA法による抗体検出などの検査を行い、数例の陽性例を検出した。これらの結果は、検体採取国やWHOに逐一報告され、当該国でのSARS対策に役立てられた。一方、国内においては、厚生労働省、感染研情報センター、ウイルス３部第１室間で情報収集、発信の１本化を行い、検査対応方針および地衛研から感染研への検体送付方法の統一化を図った。感染研に送付された検体約160あまりの疑い例、可能性例について検査を行った結果、全例陰性であった。また、これら検査と並行して、海外から検査法に関する最新の情報が入るたびに、診断系の改良を行い、検査対応マニュアルとして感染研HPに掲載した。さらに、ウイルス３部第１室では、要望のあった地衛研にはRT-PCR陽性cDNA、ウイルス分離用細胞などを配布し、地衛研におけるSARS検査への支援を行った。[小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、金子睦子、宮嶋直子、森川茂（ウイルス１部）、西條政幸（ウイルス１部）、田代眞人]

II 風疹ウイルスに関する研究

1. 無血清Vero細胞を用いた風疹ウイルス増殖系の確立と増殖ウイルスの生物学的性状の解析

Vero細胞をDM-201培地に馴化させ、無血清培養系を確立した。その際、培地中に大豆由来ペプトンを1%に添加すると細胞増殖が早まり効率良く無血清培養が可能になった。細胞の分散にはトリプシンの代わりに植物由来のパパインが使用できることがわかった。風疹ワクチンウイルスを無血清Vero細胞に接種し、血清を含む培養系とウイルス増殖性を比較したところ、同等の増殖性が得られ、動物由来物質を含まない風疹ワクチンの開発の可能性が示された。[中島節子、海野幸子、加藤宏幸、大良勇治]

2. 風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子構造の比較

1994、2001、2002、2003年の風疹患者材料或いはそれらから分離したウイルスを用いて、RT-PCRにより増幅させたPCR産物からE1遺伝子(1443塩基)の全塩基配列を決定した。現在の日本の流行株はワクチン株と比較してE1遺伝子の塩基配列では約96-97%、E1ポリペプチドのアミノ酸配列では約99%のホモロジーを示した。E1タンパク上の中和と赤血球凝集抑制に関する主な抗原領域であると報告されているE1-195-296ではワクチン株と流行株の間では株特異的な０～２個のアミノ酸の違いしか認められなかった。[中島節子、海野幸子、加藤宏幸、大良勇治]

3. ミャンマーの風疹ウイルスの分子疫学

2002年の先天性風疹症候群(CRS)の患者材料72例からRT-PCRに

より 13 例に風疹ウイルスの E1 遺伝子が検出された。そのうち 8 株の E1 遺伝子配列を決定し、既知のウイルスとの系統関係を解析した。それらは３群に分かれ、その内２つはこれまでと同様遺伝子型Ⅰに属したが、残る１つは遺伝子型Ⅱに近く位置した。このことから 2002 年のミャンマーでは二つの遺伝子型のウイルスが同時に流行していたことが示唆された。 [Kyaw-Zin-Thant（ミャンマー医科学局)、加藤宏幸、
海野幸子、中島節子]

III　麻疹ウイルスに関する研究

1.　患者材料からの麻疹ウイルスの分離と同定

血液、咽頭ぬぐい液などから B95a 細胞、Vero/SLAM 細胞を用いて麻疹ウイルス分離を行った。麻疹の分離率は B95a 細胞と Vero/SLAM 細胞でほぼ同等であった。分離された麻疹ウイルスの遺伝子型別は WHO が推奨する方法に従って行った。本年度に入り、H1 型が北茨城、東京、愛媛などから頻繁に分離されるようになり、本邦における麻疹ウイルスの遺伝子型は D5 型から H1 型に置き換わる傾向が認められた。［荻野倫子、
齋藤義弘、佐藤威、田代眞人］

2.　Vero/SLAM 細胞を用いた麻疹中和試験法の確立

麻疹中和抗体価の測定にはこれまで Vero 細胞や B95a 細胞が用いられてきた。Vero 細胞では、野外株に対する中和抗体価は測定できず、B95a 細胞では EB ウイルスが放出されバイオセイフテイー上問題があった。そこで麻疹ウイルス実験室株と野外株の双方のレセプターを有する Vero/SLAM 細胞を用いた麻疹中和試験法の確立を試みた。Vero/SLAM 細胞を用いた中和試験は、CPE の判定が容易で、従来の中和試験とよく相関していた。麻疹ウイルス株間の抗原性の違いを比較するのに本法は使用できる。［齋藤義弘、坂田宏子、田代眞人、柳雄介*：*九大大学院］

3.　ヒト免疫グロブリン製剤の麻疹発症予防効果に関する研究

麻疹ワクチン接種政策の推進によって麻疹の流行がおこらなくなると、血中の麻疹抗体価が低下することが予想され、献血を原材料とする γグロブリン製剤の麻疹に対する発症予防効果の減弱が危惧される。過去 20 年間に製造された筋注用 γグロブリン製剤の麻疹抗体価を継年的に比較検討した。その結果、筋注用 γグロブリン製剤中の麻疹 HI 価および中和抗体価には、この 20 年間大きな変化は認められなかった。しかし今後ワクチン世代の献血が原料として使用されるようになると γグロブリン製剤の効果が減弱する可能性が考えられる。［齋藤義弘、
坂田宏子、田代眞人］

4.　牛血清を使用しない麻疹ワクチン製造法の開発に関する研究

弱毒生麻疹ワクチンは鶏初代胚細胞を用いて製造される。異常プリオンをはじめ未知の動物由来の感染性因子の迷入を防ぐためには、ワクチン製造過程から完全に動物由来物質を排除することが不可欠である。そこでワクチンの増殖に用いる培地を牛血清を含まない無血清培地に変更することによって弱毒生麻疹ワクチンの製造が可能かどうかの検討を行った。その結果、無血清培地でもウイルスの増殖効率は良好であり、牛由来成分を含まない弱毒生麻疹ワクチンの開発が可能であることが示唆された。［齋藤義弘、田代眞人、関谷成則］

5.　成人麻疹における初感染と二次性ワクチン効果不全(SVF)の病態比較解析

成人麻疹患者には、ワクチンを接種された者と、麻疹に初感染した患者とが含まれる。我々は成人麻疹と診断された患者について麻疹 IgG 抗体のアビディティの解析により、初感染と SVF に分けて、抗体価の上昇等血清学的、ウイルス学的検査を行い、同時に臨床症状等とを比較検討した。調べた成人麻疹患者の中で、IgG 抗体のアビディティの値より、SVF が確認できた。成人の SVF の症例では、初期から高い抗体価を示し、IgG 抗体のアビディティも高値を取りもながらも、初感染と同程度の臨床症状を呈する傾向が見られた。[岡田晴恵、佐藤威、田代眞人]

6.　中高生および成人における二次性ワクチン効果不全

二次性ワクチン効果不全(SVF)とワクチン接種歴のない初感染患者とを区別するために血清学的鑑別方法の確立し、初感染患者と SVF の患者を同定した。これらの患者の血清抗体価の上昇、リンパ球絶対数の動向、麻疹ウイルスゲノムの消長、ウイルス分離状況を検索し、有熱期間、最高体温、合併症の有無などの臨床症状と比較検討した。中高生年代の SVF では、臨床症状やリンパ球減少などには初感染患者と比較して軽症化傾向が認められたが、

成人においては、軽症で済む修飾麻疹から初感染と同程度の重症なものまで多岐に及んだ。また、 感染源としてウイルスの伝播に関わる可能性もある。[岡田晴恵、佐藤威、
田代眞人]

7. 麻疹の大学キャンパス内流行の調査について

某大学では平成１３年６月より８月にかけて、学内で麻疹流行が起きた。学生５０００名に対して、この時期の健康状態と麻疹罹患歴、ワクチン接種歴に関するアンケート調査を行い、その罹患者の実態を明らかにした。麻疹と診断された学生は１０名で、ほとんどが入院加療を要し、重症化していた。同時期に約６%の学生が麻疹の前診断にしばしば指摘される風邪、上気道炎、薬疹、風疹などの症状を示したり、臨床診断を受けていた。またアンケートより、一般学生には麻疹の罹患歴やワクチン接種歴の記憶も薄く、ワクチンへの知識、興味も極めて希薄であることが明らかになった。[岡田晴恵、秋元未来、
田代眞人]

Ⅳ ムンプスウイルスに関する研究

1. ムンプスウイルスの分離状況

平成 12 年度後半から 14 年度始めにかけて全国的にムンプスが流行した。そこで、どのような株が流行したのかを調べる目的で各県の地研から近年分離株の分与を受け、SH 遺伝子を基にした遺伝子亜系を決定するとともに各亜型から代表株として１株を選び主要なウイルス中和抗原を担う HN 遺伝子の配列を決定した。ワクチン株は1980 年以前から本邦で流行していたB型を基に作られているが、1999-2003 年分離株はG 型とJ 型(後にK 型と再名命)が主であり、B 型はごくわずかにしか認められなかった。このことから、全国的にムンプスウイルス株の入れ替えが起こったものと推定された。新型株の抗原性について推測するために HN のアミノ酸配列をもとに株間の比較を行ったところ、SH 遺伝子を用いた型別結果と同じ型別結果になり HN 遺伝子にも変異が蓄積していることが明らかになった。そこで、新遺伝子型ウイルスの抗原性がワクチン株の属するB型と変った可能性があるのかを調べるために、B 型に対して作製した抗血清を用いて、ウイルス中和試験を行った。その結果、新型ウイルスは、B 型血清によりB 型ウイルスと同様に中和され、新型ウイルスに対してワクチンの効果が不足したために、今回の流行が起こったとは考えられなかった。むしろ、ワクチン摂取率の低下が今回の流行を招いた可能性が高い。 [加藤篤、
久保田耐、田代眞人]

2. ムンプスウイルスV 蛋白質のIFN 作用抑制機構

ムンプスウイルス(MuV)感染細胞ではV 蛋白質により宿主インターフェロン(IFN)情報伝達系に関わる STAT1 タンパク質が減少しIFN による抗ウイルス効果が抑制されている。MuV-V 発現細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると STAT1 量が増加したことから、MuV-V はユビキチン/プロテアソーム経路を介してSTAT1 を分解していることが明かになった。MuV-V および STAT1 の変異体を作成し、STAT1 分解について検討したところ、MuV-V のC 末端システインリッチ領域を変異させるとSTAT1 分解能が消失したが、STAT1 のC 末端領域を削ってもMuV-V による分解に変化はみられなかった。MuV-V のシステインリッチ領域を含むC 末端に結合する宿主因子を酵母の系を用いてスクリーニングしたところ、RACK1 蛋白質を得た。MuV 感染細胞ではMuV-V とRACK1 が結合しており、この結合により I 型IFN 受容体複合体に変化が起きていることが示唆された。[久保田耐、横沢紀子*、横田伸一*、藤井暢弘*、
田代眞人、加藤篤：*札幌医大]

3. ムンプスウイルスワクチン株の増殖条件に関する研究

初代培養細胞を用いて製造され、特に不活化操作を伴わない生ワクチン製剤には如何に製品の製造ラインを無菌化しても常に細胞を採取した動物、あるいは培養に用いた動物性物質に由来する感染性因子迷入の危険がつきまとう。おたふくかぜ生ワクチンは発育卵から採取したニワトリ胚繊維芽細胞(CEF)に種ウイルス(ムンプスウイルスワクチン株)を接種、増殖させて製造される。この過程で、他動物由来物質としてトリプシン、牛血清が用いられており、将来的にはこれらの物質を用いずに培養できるようになることが望ましい。そこでCEF を、牛血清を含んだ従来の培地(MEM＋10%TPB, 5%BS)と血清を含まない合成培地で培養し、CEF の増殖力を比較した。細胞増殖力に有意な差が認められず、初代培養細胞も無血清培地が使えることが明らかになった。次に、このようにして培養したCEF に国内で市販されているおたふくかぜワクチンウイルスのうちの2 株を接種し、細胞の状態、ウイルスの産生速度と最終到達ウイルス産生量の比較を行ったところ、どちらのワクチン株も従来の培地に劣ることもなく無血清培地でよく

増殖し、ウイルスの安定性にも大差は認められなかった。このことから合成培地は、CEF の培養とワクチンウイルスの増殖に利用できると考えられた。
[加藤篤、久保田耐、木所稔、田代眞人]

V インターフェロン･サイトカインに関する研究

1. センダイウイルス(SeV) C 蛋白発現細胞での IFN 作用抑制機構の研究

センダイウイルス(SeV) C 蛋白発現 HeLa 細胞は３種のインターフェロン（IFN α,β,γ）のいずれに対しても完全な抵抗性を示すことがわかっている。昨年までに引き続き IFN に対する抵抗性のメカニズムについて検討を加えた結果、正常 HeLa 細胞では一時的に起きる STAT1 のリン酸化が SeV -C 蛋白発現 HeLa 細胞では IFNγ 処理後にもリン酸化された STAT1 が巨大分子を形成して蓄積していくこと、IFN αのときと同様に STAT1 の脱リン酸化が起きなくなっていることがわかった。STAT1 の脱リン酸化に異常があることが伺われるので、その機構について検討を加えている。[斉藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、
加藤篤、小長谷昌功]

2. 二本鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素（PKR）について

古細菌のもつタンパク合成開始因子 aIF2αがヒトの PKR の基質になりうるかどうかを調べた。天然型の aIF2αとスレオニン、セリンの置換体を大腸菌に発現させ、精製、濃縮したものを基質として用意し、部分生成した PKR を用いてリン酸化反応を行ったところ、天然型の aIF2a は弱いながらもヒト PKR によってリン酸化されること、また aIF2αの 48 番目のセリンがリン酸化されることがわかった。[斎藤早久良、田原舞乃*、木村誠*、加藤篤、小長谷昌功 : *九州大学]

3. EGF ファミリーによる IFN 産生抑制性

FS-4 細胞では EGF および、そのファミリーの TGF α、ヘパリン結合性の HB-EGF によっても２重鎖 RNA (Poly I:C) による IFN 誘導が顕著に抑制された。これらサイトカインによる FS-4 細胞における IFN シグナル伝達として IRF3 のリン酸化によるホモダイマー形成、核内移行を調べたが正常細胞と差はなかった。2-5AS の誘導も差がなかった。即ち、EGF 処理細胞では IFN 作用より産生が抑制されているらしい。[小長谷昌功、
宮嶋直子、荻野利夫、井上君夫、斉藤早久良]

4. センダイウイルス(SeV) C 蛋白発現 L 細胞での IFN 産生抑制

センダイウイルス(SeV) C 蛋白発現 L 細胞でも IFN 感受性は全くみられなかった。 Poly(I):Poly(C)、ニューカッスル病ウイルス、ムンプスウイルスでの IFN 誘導に付いて検討したところ、80%以上の産生抑制がみられた。IRF3 のリン酸化によるホモダイマー形成、核内移行を調べたが正常細胞と差がなかった。Poly(I):Poly(C)、TNF+Cycloheximide による細胞死も C 蛋白発現細胞で抑制された。[小長谷昌功、宮嶋直子、荻野利夫、
井上君夫、斉藤早久良、加藤篤]

VI その他の研究

1. ワクチンの品質管理に関する検討

麻しん及びおたふくかぜ生ワクチンの製造にはニワトリ胚細胞(CEF)が、風疹生ワクチンの一部にはウズラ胚細胞が用いられている。そのため素材である細胞に由来するトリ白血病ウイルスの迷入を否定する検査が品質管理上行われている。従来この検査は Resistance Inducing Factor (RIF)試験により行なわれてきた。しかしこの方法は極めて煩雑であることから、より直接的でかつ簡便な方法の開発・導入が望まれている。そこで、トリ白血病ウイルスに内在する逆転写酵素活性を検出する試験として人工鋳型 RNA を加えて逆転写反応を行い、その DNA 産物を PCR にかけて増幅し、これを検出 するという PERT (product enhanced RTase)法に注目し、品質管理の現場にも応用できるかどうかを検討した。その結果、RIF 試験で検出限界以下のものであっても、PERT 法であれば検出できることが判明した。[大槻紀之*、加藤篤、田代眞人 : *農林水産省動物医薬品検査所]

2. パラミクソウイルスのアクセサリー遺伝子の機能

パラミクソウイルスのアクセサリー遺伝子である V や C 蛋白質

の機能についてはまだよくは理解されていない。しかしながら、センダイウイルス(SeV)のC蛋白質、ムンプスウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス２型のV蛋白質がインターフェロン(IFN)のシグナル伝達を阻害し、細胞が抗ウイルス状態になるのを妨げていることが明らかになっている。そこで、SeVのC蛋白質のどの部分が抗IFN効果にとって重要かを調べるために荷電アミノ酸をアラニンに置換した変異C蛋白質を作製し、その抗IFN能を調べたところ、151/153/154のアミノ酸が関わっていることが判明した。[加藤篤、斉藤早久良、小長谷昌功、田代眞人]

検定、検査、審査

検　定

インフルエンザワクチン	小分製品	51件
乾燥弱毒生風しんワクチン	中間段階	1件
	小分製品	28件
弱毒生麻疹ワクチン	中間段階	3件
	小分製品	22件
γグロブリン製剤の麻疹抗体力価測定		162件
乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン	中間段階	1件
	小分製品	14件

試　験　検　査

[ウイルス行政検査]

インフルエンザウイルスの抗原解析	16件
風疹ウイルスの遺伝子検出	2件
麻疹ウイルスの分離、同定	4件
分離ムンプスウイルスの野外株かワクチン株かの同定	6件

[収去検査]

インターフェロン製剤の収去検査

(製造所)	(IFN型)	(ロット数)
大塚製薬	IFN-α	1
ロッシュ	IFN-α2a	3
武田薬品	IFN-α2a	1
シェーリング	IFN-α2b	3
山之内製薬	IFN-αcon	2
塩野義製薬	IFN-rγ	3
サントリー	IFN-rγ	1
大塚製薬	IFN-γ	1

発表業績一覧

Ⅰ　誌上発表

１．欧文発表

1. Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, Takada A, and Kida H, : Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. Vaccine. 20:3123-3129 (2002)

2. Ninomiya A, Takada A, Okazaki K, Shortridge KF, and Kida H, : Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. Vet Microbiol. 88:107-114 (2002)

3. Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyama H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, and Watanabe T, : Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. Genome Res. 12:595-601 (2002)

4. Sugieda M, and Nakajima S, : Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup Ⅱ of the genus 'Norwalk-like viruses'. Virus Res. 87: 165-172 (2002)

5. Mori K, and Kato H, : A putative nuclear receptor coactivator (TMF/ARA160) associates with hbrm/hSNF2 and BRG-1/hSNF2 and localizes in the Golgi apparatus. FEBS lett. 520: 127-132 (2002)

6. Estable M. C, Naghavi, M. H, Kato, H, Xiao, H, Qin, J, Vahlne, A, and Roeder: R. G, : MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. J Biomed. Sci. 9: 234-245 (2002)

7. Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, and Shinkai Y, : G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. Genes & Dev. 16: 1779-1791 (2002)

8. Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, and Fujii N, : Association of mumps Virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. J Virol. **76**:12676-12682 (2002)

9. Kato A, Ohnishi Y, Hishiyama M, Kohase M, Saito S, Tashiro M, and Nagai Y, : The amino-terminal half of Sendai virus C protein is not responsible for either counteracting the antiviral action of interferons or down-regulating viral RNA synthesis. J Virol. **76**:7114-7124 (2002)

10. Yokosawa N, Yokota S, Kubota T, and Fujii N, : C-terminal region of STAT-1 α is not necessary for its ubiquitination and degradation cased by mumps virus V protein. J Virol. **76**: 12683-12690 (2002)

11. Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Shioda T, Kato A, Nakayama EE, Nakamura T, Nagai Y, and Iwamoto A, : An efficient and versatile mammalian viral vector system for major histocompatibility complex class I/peptide complexes. J Virol. **76**:11982-11988 (2002)

12. Bousse T, Matrosovich T, Portner A, Kato A, Nagai, Y, and Takimoto T, : The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 F gene contributes to the read-through transcription at the M-F gene junction. J Virol. **76**:8244-8251 (2002)

13. Ikeda Y, Yonemitsu Y, Sakamoto T, Ishibashi T, Ueno H, Kato A, Nagai Y, Fukumura M, Inomata H, Hasegawa M, and Sueishi K, : Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue: Efficient Gene Transfer by Brief Exposure. Exp Eye Res. **75**:39-48 (2002)

14. Hirata T, Iida A, Iida T, Kitazato K, Kato A, Nagai Y, and Hasegawa M, : An improved method for recovery of F-defective Sendai virus expressing foreign genes from cloned cDNA. J Virol Methods. **104**:125-133 (2002)

15. Kano M, Matano T, Kato A, Shioda T and Nagai Y, : Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. J. J. of I. D. **55**:59-60 (2002)

16. Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, and Hasegawa M, : Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. Virus Res. **86**:33-38 (2002)

17. Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzaki Y, Ami Y, Terao YK, and Nagai Y, : Primary replication of a recombinant Sendai virus vector in macaques. J Gen Virol. **83**:1377-1386 (2002)

18. Masumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, and Seya T, : Establishment of a monoclonal antibody against Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. BBRC 293:1364-1369 (2002)

19. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Kobune F, Tanabayashi K, and Tashiro M, : Recombinant wild-type and Edmonston strain measles viruses bearing heterologous H protein in cell specificity. J Virol. 76: 4891-4900 (2002)

20. Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, :Toward understanding the pathogenicity of wild-type measles virus by reverse genetics. J. J. of I. D. 55: 143-149(2002)

21. Saika S, Kidokoro M, Ohkawa T, Aoki A, and Suzuki K, : Pathogenicity of mumps virus in the marmoset. J Med Virol. 66:115-122 (2002)

22. Kidokoro M, Aoki A, Horiuchi K, and Shida H, :Large-scale preparation of biologically active measles virus haemagglutinin expressed by attenuated vaccinia virus vectors. Microbes Infect. 4:1035-1044 (2002)

2. 和文発表

1. 小田切孝人：インフルエンザウイルスの世界の動向と今冬の日本の予測。 The Medical Test Journal 836: 5（2002）

2. 小田切孝人: 新型インフルエンザウイルス対策サーベイランス状況も踏まえて, 化学療法の領域 18:1735-1740（2002）

3. 小田切孝人: 感染症サーベイランスからわかること, 臨床と研究 79:2140-2144（2002）

4. 細谷佳行、佐原啓二、池ヶ谷朝香、秋山眞人、中島節子：静

岡県内の一養豚場の豚におけるＨ３インフルエンザＡウイルスの蔓延状況　日本獣医公衆衛生学会誌 55: 605-608 (2002)

5. 田代眞人：新型インフルエンザ, 小児科臨床 55:2251-2256 (2002)

6. 中島節子、海野幸子、加藤宏幸、田代眞人、木添和博、濱野雅子、三春範夫 風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子構造の比較,　病原微生物検出情報 24: 61-62 (2003)

7. 加藤茂孝、海野幸子: 妊婦の風疹感染診断における抗体測定の現況と限界　51: 263-267 (2003)

8. 岡田晴恵：麻疹の病態とワクチン接種　臨床とウイルス、31:19-29 (2003)

9. 岡田晴恵：成人麻疹　綜合臨床、52:234-239 (2003)

10. 菱山美智子、小浜友昭、竹内薫、加藤篤、田代眞人 生ワクチンに混入する可能性のあるトリ白血病ウイルスの簡便な検出方法について　臨床とウイルス　30:172-179 (2002)

II　学会発表

１．国際学会

1. Watanabe S, Imai M, and Odagiri T,　; The influenza B virus BM2 is transported in cytoplasm by the trans Golgi network and is integrated into plasma membrane. The First European Influenza Conference, Malta October 20-23, 2002

2. Odagiri T,　; Detecting human emergence. 7th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Shanghai, October 31-November 1, 2002

3. Odagiri T,　; Detecting human and novel influenza viruses for vaccine preparation and pandemic preparedness. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Acute Respiratory Infections Panel, Yokohama, January 8-10, 2003

4. Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, ; An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibody to influenza H5 haemagglutinin (HA) by using recombinant HA produced in a silkworm-baculovirus vector system, Scientific workshop on "Laboratory Correlates of Immunity to Influenza : A reassessment", Norway, May 2-3, 2002

5. Itamura S, ; Discrepancies in titers of HI and NT antibody in animal sera for H5 viruses and different sensitivity of　HI and NT assays for the antibody titres in human　sera against influenza A and B viruses, Scientific　workshop on neutralizing
antibody assays for　influenza virus,　Germany,
March 18-19, 2003

6. Okada H, Akimoto M, Sato T, Takayama N, Takeuchi Y, Tashiro M,　;Age-dependent host responses related to immunosuppression among measles vaccine　recipients,　XIIth International Congress of Virology, Paris, France, July 27-August 1,2002

7. Kato A, Ohnishi Y, Tashiro M, Nagai Y, ; Carboxy-terminal half of the Sendai virus C protein is responsible for both counteracting the antiviral action of interferons and down-regulating the viral synthesis, XIIth International Congress of Virology, Paris, France, July 27 - August 1, 2002

8. Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M, ;Development of a new class of the vectors for gene therapy the cytoplasmic RNA vectors based on Sendai virus, XIIth International Congress of Virology, Paris, France, July 27 - August 1, 2002

9. Kohase M, Saito S, Ogino T, Miyajima N, Fujita T, Kato A, ;Suppression of IFN production and apoptosis in Sendai virus C protein expressed mouse L cells. Meeting the ISICR, Torino, Italy, October 6-11, 2002

２．国内学会

1. 川上千春、宗村徹也、七種美和子、野口有三、西藤岳彦、小田切孝人、田代眞人：横浜市で分離された AH1N2 型ウイルスの性状, 第 50 回日本ウイルス学会学術集会
札幌, 2002 年 10 月

ウイルス第三部

2. 高橋忠伸、鈴木隆、西藤岳彦、左一八、鈴木康夫：パンデミックヒトインフルエンザウイルス株を含む N2 ノイラミニダーゼの系統解析と低 pH 安定性の比較および低 pH 安定性の分子機構, 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002 年 10 月

3. 西藤岳彦、田代眞人：ヒト由来 H9N2 型インフルエンザウルスとトリ由来ウイルスの遺伝子再集合によるワクチン株開発, 第50回日本ウイルス学会学術集会 札幌 2002年10月

4. 今井正樹、渡辺真治、小田切孝人:B 型インフルエンザウイルス NS2 蛋白の性状、第 17 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、兵庫、2002 年 4 月

5. 渡辺真治、今井正樹、小田切孝人:B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白質の性状と細胞質内輸送、第 17 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、兵庫、2002 年 4 月

6. 今井正樹、渡辺真治、小田切孝人:B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白質の細胞内輸送機序の解析、第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年10 月

7. 川崎一則、今井正樹:インフルエンザウイルスと DMPC リポソームの低 pH における相互作用の電子顕微鏡観察、
第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年10 月

8. 小田切孝人、西藤岳彦、斉藤利憲、板村繁之、渡辺真治、今井正樹、伊東玲子、中矢陽子、金子睦子、田代眞人: 2001/2002 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株, 第17回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、兵庫県淡路、2002 年４月

9. 小田切孝人、感染研と地衛研の協力体制 :インフルエンザへの対応, 第 12 回感染研シンポジウム、新宿区戸山、
2002 年５月

10. 小田切孝人、岡部信彦、田代眞人、斉藤玲子、鈴木宏、柏木征三郎 :わが国のインフルエンザ株サーベイランスとワクチン株選定, 第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田、
2002 年 6 月

11. 小田切孝人、渡辺真治、今井正樹、斉藤利憲、板村繁之、西藤岳彦、多屋慧子、新井智、岡部信彦、田代眞人 :わが国のインフルエンザ株サーベイランスと新型インフルエンザ対策, 第 23 回衛生微生物技術協議会研究会。奈良市、
2002 年７月

12. 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、渡辺真治、今井正樹、二宮愛、田代眞人 : 2001/2002 シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月

13. 海野幸子: 妊婦の風疹感染診断における抗体測定の現況と限界, 第 49 回日本臨床検査医学会総会、大阪、2002 年 11 月

14. 齋藤義弘、坂田宏子、田代眞人：SLAM/Vero 細胞を用いた麻疹中和抗体価の測定, 第 3 回抗体測定法研究会
東京、2003 年 2 月

15. 栗田伸一、大石和徳、黒木麗喜、岡田晴恵、田代眞人、野口英太郎、永武毅 ：高校生における麻疹集団感染の背景とその感染予防対策, 日本感染症学会、札幌、2002 年 11 月

16. 岡田晴恵：麻疹の病態とワクチン接種, 第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002 年 6 月

17. 岡田晴恵、佐藤威、田代眞人：小児麻疹患者の免疫・生体応答における男女差の検討、第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002 年 6 月

18. 岡田晴恵、佐藤威、田代眞人、高山直秀、岡田賢司、新里敬：成人における麻疹生ワクチン接種の有効性、
第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田、2002 年 6 月

19. 岡田晴恵、秋元未来、佐藤威、田代眞人、柏木玲一、直井高歩、浜野健三： 中学校の麻疹集団発生例における二次性ワクチン不全(SVF)の病態解析、第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年 10 月

20. 中野貴司、庵原俊昭、神谷齊、渡辺正博、岡田晴恵、秋元未来、田代眞人：共同生活施設での麻疹の伝播に関する検討、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002年11月

21. 岡田晴恵、秋元未来、佐藤威、田代眞人、知念正雄、浜端宏英、高良聰子、安次嶺馨：乳児に対する麻疹生ワクチン接種の有効性と安全性の検討、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002年11月

22. 横沢紀子、横田伸一、久保田耐、岡林環樹、藤井暢弘：ムンプスウイルス感染細胞におけるSTAT1および3の減少メカニズム、 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

23. 久保田耐、横沢紀子、加藤篤、横田伸一、田代眞人、藤井暢弘：ムンプスウイルスVタンパク質と宿主因子RACK1の結合がIFNシグナル伝達に及ぼす影響について, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

24. 岡林環樹、横田伸一、横沢紀子、久保田耐、斉藤博之、天野憲一、藤井暢弘：麻疹ウイルスによるI型インターフェロン細胞内情報伝達経路の抑制機構, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

25. 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤篤、須崎百合子、網康至、永井美之、俣野哲郎 Gag発現組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる解析, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

26. 加藤篤、小長谷昌功、菅原文博、久保田耐、坂口剛正、吉田哲也、田代眞人、永井美之 センダイウイルスアクセサリー蛋白質の抗インターフェロン効果, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

27. 竹内薫、宮嶋直子、竹田誠、加藤篤、門田伸一、永田恭介、田代眞人 麻疹ウイルスV、Cタンパク質の機能解析, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

28. 井上誠、徳炭由美子、加藤篤、永井美之、飯田章博、長谷川護 :センダイウイルスベクターの転写複製制御による細胞障害性の減弱, 第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

29. 加藤篤、久保田耐、田代眞人 ムンプスウイルスの国内分離状況 第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002年11月

30. 加藤篤、小長谷昌功、菅原文博、清谷克博、久保田耐、坂口剛正、吉田哲也、田代眞人、永井美之 宿主防御機構に対抗するセンダイウイルスアクセサリー蛋白質 第25回日本分子生物学会年会、横浜、2002年12月.

31. 木所稔、青木敦子、堀内清、志田壽利、ワクシニアウイルス発現ベクターによる麻疹ウイルス抗原の高度発現とヒスチジンタグによる1段階精製法の確立（第2報)、第50回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

32. 木所稔、江下倉重、堀内清 :LC16m8株由来リバータントウイルスの生物学的性状の検討、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002年11月

33. 齋加志津子、木所稔、大川時忠、青木敦子、堀内清 :ムンプスウイルスの神経病原性試験、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002年12月

34. 斎藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、加藤篤、小長谷昌功：SeV C-HeLa細胞におけるIFNα、γ処理後のシグナル伝達, 第67回日本インターフェロン・サイトカイン学会、東京、2002年7 月

35. 斎藤早久良、荻野利夫, 加藤篤、小長谷昌功：センダイウイルス Cタンパク 発現HeLa細胞におけるインターフェロン抵抗性の機構, 第５０回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

36. 小長谷昌功、斎藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、久保田耐、加藤篤：センダイウイルス Cタンパク 発現L細胞におけるIFNシステム、アポトーシス抑制, 第５０回日本ウイルス学会総会、札幌、2002年10月

37. 小長谷昌功、斎藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、藤田尚志、加藤篤：SeV C発現マウスL細胞におけるIFN産生抑制, 第6

７回日本インターフェロン・サイトカイン学会,
東京、2002 年7 月

38. 竹内薫、宮嶋直子、永田典代、竹田誠、田代真人
：麻疹ウイルスの上皮系細胞感染機構の解析, 第50 回
日本ウイルス学会総会、札幌、2002 年10 月

39. 門田伸一、宮嶋直子、竹田誠、竹内薫、永田恭介 ： 麻疹
ウイルスV タンパク質によるIFN 効果抑制の分子機構, 第２
５回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年12 月

4. 細　菌　第　一　部

部長　渡　辺　治　雄

概要

本年度（平成１４年）４月から組織再編により旧細菌部を母胎にして、細菌第一部が編成された。業務内容は、旧細菌部のほとんどを引き継ぎ、新たに、旧口腔科学部から口腔細菌を担当する室が加わり、第六室としてその業務を担当することとなった。また、細菌・血液製剤部が細菌第二部として新たに組織されることになり、国立感染症研究所に細菌を担当する部が名実ともに２部構成となったことは喜ばしいことであり、細菌関係のいっそうの重要性が確認されたものである。思えば、平成４年７月にそれまであった細菌関連部（細菌部、体液性免疫部の一部、細胞性免疫部の一部）が、細菌部と細菌・血液製剤部に再編されたときにはイメージ的にも、細菌関係部の縮小を意味するものであった。だが、1990年代に起こった O157 の集団発生、耐性菌の蔓延、セラチア等による院内感染、炭疽菌によるバイオテロ等の問題で、再び細菌感染症の重要性が表舞台に引きずり出されることになった。これを機に、細菌関係の仕事に携わるものは、再度自分の置かれている立場を顧み、我が国から更には世界から要求および期待される事柄に真摯に対応し、その責務を十分に果たすべきことを自覚する必要があろう。

本年度の研究業務としては昨年度と同様、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、ビブリオ、赤痢菌、レジオネラ、レプトスピラ、髄膜炎菌、ボレリア、ブドウ球菌、レンサ球菌、結核菌、ボツリヌス菌等に関わる感染症の研究；特に疫学的解析および集団事件等への科学的対応、迅速診断法の開発、病原性のメカニズムの解析およびその応用的研究を中心に行った。本年度から、第六室として、口腔細菌を取り扱う室が加わり、口腔内細菌感染症（齲蝕、歯周病等）に関わる研究を行っている。研究成果を世の中に発表する（特に論文として）ことも、我々の重要な任務でありかつ義務である。原著英文論文；31 編、和文論文（総説を含む）；５９編が発表された。

研究費としては、厚生労働省科学研究費新興・再興研究事業（パルスネット、劇症型レンサ球菌感染症の発症機構、レプトスピラ症の解析、人畜共通感染症，薬剤耐性機序、検査の精度管理に関する研究等を担当)、国際医療協力事業費、文科省科研費，および広域食中毒対策事業費等を得た。

本年度の人事としては、塚野尋子、新井秀雄が退官した。Somjai Phaisomboon(JICA)，山崎剛，常　彬（流動研究員)、谷屋貴之、三浦雅史、小林静史、C.P.Giri(JSPS),茂木瑞穂、浜田具之、M.A.Salam，津覇雄三、中尾龍馬、松本直子、北迫雄一、前田朋子、荒川正嘉、川田真祐、嶋川真木、黒木俊郎，竹下清香、正木春彦、大澤朗，久代明，橋本れい子、須藤啓子，財津法子、浅原純代、松永聡子、野尻直未、斉藤康憲，石川美里、鈴木玲子、星野真西、武居貴祐、佐藤裕美、高井信子らが協力研究員，研究生、臨職等で研究に参加した。

研　究　業　績

Ⅰ．腸管出血性大腸菌に関する研究

1．平成 14 年度における腸管出血性大腸菌(EHEC)の血清型別分布に関する調査研究

平成14年度に疫学的解析のため国立感研に送菌されてきた株は総数2,341株で、その内で O157:H7 および O157:H- は1,829株、それ以外の大腸菌血清型は512株であった。O157以外の血清型は32種類に型別され、優勢を占めた血清型は O26:H11，O26:H-，O111:H- ,O121:H19，O103:H2，O91:H14，O91:H-，O165:H-であった。（田村和満、寺島淳、伊豫田淳）

２．平成14年度における動物由来の腸管出血性大腸菌(EHEC)の血清型別

平成 14 年度に動物由来 EHEC の血清型別依頼はウシ糞便由来株 252 株、カラスの糞便由来 35 株、合計 287 株であったそれらの血清型は25種類に型別されたが、それらの血清型はヒトのEHECとの相関性が認められなかった。（田村和満、寺島淳、伊豫田淳）

３．腸管出血性大腸菌の PFGE による DNA 型別

2002 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 のうち 2245 株および O26，O111 等を含むその他の血清型 544 株、また 2001 年以前に分離された腸管出血性大腸菌 249 株に対して、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を用いて、患者由来株、食品由来株、環境由来株等について解析を行った。9 名の死者を出した集団事例由来の O157:H7 が示す PFGE パターンは、2001 年の広域流行株と同一パターンと考えられ、これと同一と考えられる PFGE パターンを示す株が全国 15 都道府県から分離されていた。しかしこれらの株はすべて散発事例由来で感染源は不明であった。2001 年に引き続き同一 PFGE タイプを示す株が広域から分離されたことは、汚染源が広範に存在することを示唆すると考えられるが、食材等からの菌分離はまだ報告されていない。（寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄）

４．PFGE の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

PFGE による解析方法の標準化を行うために、統一した PFGE 方法の提示を行った。感染研に送付された腸管出血性大腸菌（EHEC）及び赤痢菌等の分離株を用いて PFGE を各条件に基づいて行い、PFGE 解析ソフトによる解析及びデータベースの構築を行った。同一施設における解析結果の蓄積においては上記の条件で支障なくデータベースが構築可能であり、平成 14 年度まで解析を継続中である。感染研で構築したデータベースの一部について、これらの結果を PDF の書類として、厚生労働行政総合情報システム（WISH）上の個別システム「PulseNet Japan」でほぼ１ヶ月おきにデータを更新しながら公開するシステムを構築した。平成 14 年度までのデータベース構築の過程において、EHEC や赤痢菌による diffuse outbreak の探知に PFGE 解析が有効であることが示された。（寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田　淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄）

５．腸管出血性大腸菌の接着性に関する研究

腸管出血性大腸菌および腸管病原性大腸菌が腸管

上皮細胞に接着する際に必須の役割を果たしている intimin および Tir について、そのアクチン凝集との関連を調べることにより、機能解析を行っている。（泉谷秀昌、渡辺治雄）

６．STEC 0157:H7 の LEE 遺伝子群の発現調節機構

1) LEE 遺伝子群の正の転写制御遺伝子 *ybjN* の突然変異体の解析

STEC 0157 において、宿主細胞への初期接着に関わる遺伝子（LEE）群の発現を上昇させる機能を持つ遺伝子としてこれまでに単離したもののうち、二成分制御系の調節遺伝子と部分的に相同性を示す *ybjN* について、カナマイシン耐性遺伝子カセットの挿入失活突然変異体を作製した。LEE 領域にコードされる宿主細胞への作用因子の発現量を解析したところ、野生株と比較して *ybjN* 突然変異によってそれらの発現量が著しく低下し、この表現型は *ybjN* だけを運ぶプラスミドによって相補されることが明らかとなった。[伊豫田淳、渡辺治雄]

2) ゲノム上に複数個存在する転写制御遺伝子 *perC* による LEE 遺伝子群の発現調節機構

LEE の発現を上昇させる活性を持つその他のクローンの一つに、腸管病原性大腸菌（EPEC）に特異的に存在すると考えられていた転写調節遺伝子群 *perABC* のうち、*perC* と相同性の高い配列を持つものが含まれることが判明した。0157 Sakai 株のゲノムに *perC* 様遺伝子は合計 5 つ存在することから、これらすべての遺伝子をマルチコピーベクターにクローン化し、LEE の発現への影響を解析した。その結果、EPEC の PerC と相同性が特に高い蛋白質をコードする３つの *perC* 様遺伝子（*perC104a, b, c*）が STEC 0157 における LEE の正の転写制御遺伝子として機能する可能性が示唆された。[伊豫田淳、渡辺治雄]

７．LEE 非保有型 STEC が保有する病原性遺伝子の解析

日本国内でヒトから単離された STEC における LEE の保有状況を *eaeA* 遺伝子の PCR 法および Southern hybridization 法で解析したところ、国内で単離頻度の高い血清群 0157，026，および 0111 の STEC では、そのほとんどすべてが LEE を保有している一方、その他の血清群においては、その約 40%が LEE を保有しないことが判明した。これらの LEE 非保有型 STEC が保有する病原性遺伝子についてさらに解析を行ったところ、他のカテゴリーに属する下痢原性大腸菌のマーカーとなっている病原性遺伝子を併せ持つ新しいタイプの STEC が複数単離されていることが明らかとなった。[伊豫田淳、田村和満、伊藤健一郎（感染症情報センター）、渡辺治雄]

II． サルモネラに関する研究

1．平成 14 年度におけるサルモネラ血清型別分布に関する調査研究

平成 14 年度にサルモネラセンターに血清型別依頼のあった菌株は 131 株で、それらは 19 血清型に分けられた。優勢を占めた血清型は例年どおり *S.*Enteritidis，*S.*Typhimurium，*S.*Heidelberg であった。稀な血清型として *S.* Bovismobificans，*S.*Nagoya，*S.*Amsterdam， *S.*Manhattan であった。

（田村和満、、泉谷秀昌）

２．*Salmonella* Typhimurium のファージ型別による解析

2002 年に当研究所に送付された多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium の菌株 137 株について、ファージ型別を行った（患者、環境、動物由来を含む）。近年欧米を中心に注目されているファージ型、DT104 はこのうち 98 株（72%）を占めた。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

３．*Salmonella* Enteritidis のファージ型別による解析

2002 年に当研究所に送付された *Salmonella* Enteritidis 836 株（うち、2002 年分離株は 629 株）に対し、ファージ型別を行った。このうち集団事例由来株に関する解析結果は以下の通りである。解析された 2002 年の集団事例 61 件のファージ型（PT）の内訳としては、PT4 が 17 件（28%）、PT1 が 12 件（20%）、PT47 が 8 件（13%）、RDNC が 7 件（11%）、PT6a および 36 がそれぞれ 4 件（6.6%）、その他 9 件であった。依然として PT4 の割合が多いが、PT1 は減少傾向にあり、PT47 および RDNC の増加傾向が見られた。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

４．フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium 株の解析

フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium 株について、薬剤耐性パターン、ファージ型別、耐性遺伝子の塩基配列、パルスフィールドゲル電気泳動法などによる解析を行った。薬剤感受性試験をディスク（KB）法で行うと、ABPC，CP，SM，TC，サルファ剤，NA および CPFX に耐性を示すもの、並びに、ABPC，CP，SM，TC，ST（サルファ剤およびトリメトプリム），GM，NA および CPFX に耐性を示すものの 2 種類が存在した。ファージ型別に関しては、DT12、および DT193 が同定された。キノロン耐性に関与しているとされている *gyrA* および *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域に関しては、いずれも同様の変異が同定された（GyrA:83 番目のセリンがフェニルアラニンに、87 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに、ParC: 80 番目のセリンがアルギニンに置換）。パルスフィールドゲル電気泳動のパターンに関しては、いずれもほぼ同様の泳動パターンを示すことが明らかとなった。（泉谷秀昌、田村和満、渡辺治雄）

５．日本国内で分離された *Salmonella* Typhi（チフス菌），*Salmonella* Paratyphi A（パラチフスＡ菌）のファージ型別法による疫学的解析

2001 年に国内で分離され地方衛生研究所・保健所から送付されたチフス菌株、パラチフス A 菌株についてファージ型別、薬剤感受性試験を行った。今年は集団発生などはなく、送付された菌株数は例年と同様の、チフス菌６７株、パラチフス A 菌２９株であった。ファージ型別試験で主に検出されたファージ型はチフス菌では、E1，D2 であった。パラチフス A 菌では、１、４型であった。（広瀬健二、田村和満、高井信子、渡辺治雄）

６．日本国内で分離されたチフス菌、パラチフスＡ菌の各種抗菌薬に対する感受性試験

2001 年に日本で分離されたチフス菌、パラチフス A

菌のニューキノロン薬及び第３世代セフェム系薬剤などに対するＭＩＣを測定し感受性を検討した。薬剤は、ニューキノロン系薬剤６薬剤，第３世代セフェム系薬剤３薬剤、その他に従来の治療薬等合計18剤を検討した。検査した株のうちニューキノロン低感受性菌はチフス菌で約２８％と昨年と同程度であったが、パラチフスＡ菌では約６８％に増加した。（広瀬健二、田村和満、高井信子、渡辺治雄）

７．腸チフスの迅速診断法の開発に関する研究

血液中から直接チフス菌を検出し PCR 法で同定診断できる方法を開発する。現在までに multiplex PCR でチフス菌の同定方法を開発し臨床分離株を用いてチフス菌の同定を確認した。抗サルモネラ抗体を使用して血液中から菌を取り出す方法を組み合わせ直接チフス菌の同定を可能にする方法の開発を試みた。約 10 の 6 乗個以上では PCR により検出ができたが菌数がそれ以下になると検出はできなかった。血液中には不純物がありこれらが PCR 反応を阻害する。今後これら問題を解決できるように再検討を行いたいと考えている。（広瀬健二、渡辺治雄）

８．サルモネラ SipC 蛋白の機能解析

サルモネラの病原性に関与した蛋白質 SipC を INT４０７細胞の中で発現し SipC の局在を蛍光顕微鏡で観察した。SipC は細胞内の細胞骨格である何らかの繊維と結合している様子が観察できた。今後発現した SipC が細胞内でどのような働きをしているかを解析する予定である。（広瀬健二、高橋英之、泉谷秀昌、荒川英二、寺島淳、渡辺治雄）

９．サルモネラ侵入性遺伝子群の発現制御についての研究

Salmonella enterica Serovar Typhimurium の細胞侵入性遺伝子群発現の統括的 activator である *hilA* 自体の発現制御について、これまで報告してきた 2 成分制御系 sensor、*cpxA* による低 pH 条件での *hilA* 発現活性化の具体的機構を解明するため、以下のアプローチをおこなった。

a) *cpxA* 変異株、低 pH 条件での *hilA* 発現を回復する multi copy suppressor をサルモネラの total DNA library から選択した。それらは、１)、SPI-1 にコードされ、既に *hilA* の activator として報告のある *hilC*、２) *hilC* と高い相同性を持つ新規転写因子（以下、*hilF* と仮称する)、３）NADH-dependent type glycerol dehydrogenase 群と高い相同性を持つ遺伝子（以下、*gdh* と仮称する）のいずれかであった。上記の遺伝子について、実際の single copy 状態での *hilA* 発現への関与を調べる目的でそれぞれの変異株を作製した。

b) *hilC*、*hilF* について

hilC 変異株における *hilA* 発現量は野生株の 50%程度であり、既報通りであった。*hilF* 変異株での効果はさらに小さく、野生株の 70%程度の発現量が維持されていた。*hilC*、*hilF* の２重変異株では野生株の 20%まで発現量が低下した。これらのことから、*hilC*、*hilF* はいずれか一方は *hilA* 発現に必須であるが、一方が欠けても他方が代替的に機能し得る、という仮説を提出する。

c) *gdh* について

gdh 変異株では *hilA* 発現量は野生株と差が認められなかった。この原因として、サルモネラでは、

glycerol dehydrogenase と考えられる遺伝子が、*gdh* と *gldA* の２種類存在するため、*gdh* が欠損しても *gldA* が代替的に機能する可能性が考えられる。この可能性の検討のため、*gldA* 変異株、*gdh*、*gldA* の２重変異株の作製とその解析を計画している。（中山周一、久代明＊、田中隆一郎＊、渡辺治雄）（＊＝ヤクルト中研）

III． 赤痢菌に関する研究

１．赤痢菌病原遺伝子の発現調節機構の解析

赤痢菌の病原性に必須な TypeIII 分泌装置 を構成する Mxi-Spa,Ipa 蛋白は病原性プラスミドにコードされており、プラスミド上のアクチベーター である VirF 及び InvE を介して転写が活性化される。当研究は *mxi* 遺伝子の転写が低下する Tn*10* 変異体を分離し、二成分制御系 CpxRA のセンサーをコードする *cpxA* 遺伝子を同定した。この変異体では InvE の mRNA は正常な一方、蛋白の発現が低下しており、解析の結果 *cpxA* 変異体では InvE の mRNA の安定性が低下していることが示され、転写後調節を介した赤痢菌の病原遺伝子の発現という新たな調節機構が明らかになった。（三戸部治郎,渡辺治雄）

IV． ビブリオに関する研究

1．平成 14 年度に同定、血清型別などを依頼された *Vibrionaceae* および *Aeromonadaceae* 菌株

平成 13 年度に同定、血清型別、生物型、遺伝子型別および病原因子の検索の依頼を受けた *Vibrionaceae* および *Aeromonadaceae* 菌株は 217 株で *Vibrio cholerae*、*V. mimicus*、*V. fluvialis*、*V. furnissii*、*V. vulnificus* 、 *V. parahaemolyticus* 、 *V. metchnikovii* および *Aeromonas* spp.が含まれ、81.6%(177)は国外（イスラエル-107、インド-45、バングラデシュ-15、スペイン-8、タイ-2）から依頼された。国内株はコレラ菌(*V. cholerae* 01)が主で、海外渡航歴のない患者より分離された菌株である。1997 年にも海外渡航歴のない患者からの検出が多く認められたが、今回は血清型が 1997 年とは異なり、患者 17 名から検出された菌はすべて稲葉型であった。PFGE 解析では、その電気泳動パターンが 1997 年の発生のパターンとほとんど同一であった。（荒川英二、田村和満；沖津忠行、鈴木理恵子（神奈川衛研））

2．*V. vulnificus* の PCR による病原因子の探索

V.vulnificus は汽水域などの環境中からも多数分離される菌である。また、分離された菌株のほとんどが、ヒトに対する病原因子と考えられる cytolysin-hemolysin を保持している。環境の当該菌による汚染度に対する患者発生数は、腸炎ビブリオと比較してもはるかに少ない。他の病原因子がヒトに対して、直接的な作用を持っている可能性もあり、これまでに報告されている病原性関連遺伝子を、患者株、環境株について PCR によって探索してみた。siderophore(*vuuA*) 、metalloprotease(*vvpE*)、phospholipase(*vpl*)については、調べた株では患者株と環境株間には有意な差は認められなかった。（荒川英二，渡辺治雄）

V． レジオネラに関する研究

1．レジオネラの肺胞上皮細胞への接着因子

レジオネラ菌は肺炎やポンティアック熱の起炎菌である。レジオネラ患者の回復血清と特異的に反応するタンパクを同定した。このタンパクをコードする遺伝子に薬剤カセットを挿入することによって、変異株を作成した。野生株及び変異株との比較研究を行った結果、このタンパクはレジオネラの肺胞上皮細胞への接着及びマウスへの病原性に関わること、しかしマクロファージ系細胞内の増殖には関与しないことが明らかになった。[常　彬、渡辺治雄]

２.ミエロペルオキシダーゼのレジオネラ感染における意義

A/J 系の MPO(+/+) および MPO(-/-) マウスの *Legionella pneumophila*に対する易感染性を比較した。高感染量 10^6 CFU量で投与した場合、MPO(+/+)は全く死亡しなかったが、MPO(-/-)マウス 7 日までに 8 割のマウスが死亡した。肺の生菌数は、感染 1～2 日後にピークに達した後に減少し、最大 10^7まで増殖した。感染 2 日目からMPO(+/+)およびMPO(-/-)マウスの間で有為差が見られ、差はlogで 1～2 に達した。〔倉　文明、小林静史、前川純子、渡辺治雄；荒谷康昭（横浜市大)〕

３． B10.A/SgSn Slc マウスのレジオネラ高感受性について

B10 系 H2 コンジェニックマウスに *L. pneumophila* を鼻腔内投与したところ､B10.A のみ肺からの菌の排除が遅れた。このことは、B10.A マウスの感染後の肺における IFN-γ、IL-12、TNF の少ないこととよく対応していた。〔小林静史、倉　文明、塚野尋子、前川純子、高橋朋子（星薬科大)、渡辺治雄〕

４.*Legionella gormanii* の catalase-peroxidase 遺伝子の解析

レジオネラ症の起因菌のひとつである *L. gormanii* の catalase-peroxidase は、宿主の respiratory burst に抵抗する因子として働いていると考えられる。そこで *L. gormanii* の catalase-peroxidase 欠損株を作製し、マクロファージ内での増殖、マウスの致死性などを調べたが、野生型との差は見られなかった。 （前川純子、倉　文明、渡辺治雄）

VI.　レンサ球菌に関する研究

１.日本における 2001 年の溶レン菌感染症サーベイランス

2001 年に全国の衛生研究所に収集された A 群レンサ球菌の菌株総数は、2581 株であり、すべての株に対して T 型別が行われた。分離頻度の高かった T 型は、T1(679/2581，26.3%)、T12 (617/2581，23.9%)、T4 (313/2581， 12.1%) 、 T28(189/2581， 7.3%) 、 T25 (185/2581，7.2%)であり、2000 年における上位 5 つの型と変化はなかった。劇症型/重症 A 群レンサ球菌感染症の起因株 23 株について型別を行った。このうち劇症型 A 群レンサ球菌感染症を引き起こした株は、17 株であった。17 株中、6 株（35.3%）が T1 型であり、最も多かった。この分離比率は、咽頭炎由来株のもの（26.3%）に比べ、依然高い分離比率を示している。しかしながら、2000 年と比べて分離比率は減少している（2000 年，52.9%; 2001 年，35.3%)。一方、咽頭炎起因菌で分離比率の高かった T12 および

T4 型はともに 0 症例であった。T3 および T22 型は 2000 年には分離されなかった。2001 年にそれぞれ 3 株(17.6%)および 2 株(11.8%)が分離された。[池辺忠義、須釜久美子（福島衛研），鈴木理恵子（神奈川衛研），遠藤美代子（東京都健康安全研究センター），田中大祐（富山衛研），田丸亜貴（大阪公衛研），冨田正章（山口環境保健研究センター），緒方喜久代（大分衛生環境研究センター），渡辺治雄，The Working Group for Group A Streptococci in Japan]

２．日本における劇症型/重症 G 群レンサ球菌感染症のサーベイランスと起因株の分子型別

1995 から 2001 年までの日本における発症した劇症型/重症劇症型 G 群レンサ球菌感染症の起因株 16 株について解析した。*emm* 遺伝子型、および *Sma*I で染色体 DNA を切断後のパルスフィールド電気泳動プロファイルを調べた結果、それらは株間で多様であった。このことは、クローナルに広がっていないことが考えられる。しかしながら、すべての株において、*slo*，*sagA*，*ska*，*scpA* 等の病原性遺伝子が保有されていることが確認された。[池辺忠義，村山尚子（山形衛研），斉藤公男（福島衛研），山井志朗（神奈川衛研），鈴木理恵子（神奈川衛研），磯部順子（富山衛研），田中大祐（富山衛研），勝川千尋（大阪公衛研），田丸亜貴（大阪公衛研），片山淳（山口環境保健研究センター），藤永良博（山口環境保健研究センター），帆足喜久雄（大分衛生環境研究センター），渡辺治雄，The Working Group for Streptococci in Japan]

VII． ブドウ球菌に関する研究

1．黄色ブドウ球菌のグリコペプタイド耐性に関する研究

黄色ブドウ球菌のグリコペプタイド耐性、特にテイコプラニンに耐性を与える遺伝子として、1) *tcaAB*, 2) *msrR*, 3) *marR* を同定した。1)は転写調節因子 *tcaR* とともにオペロン *tcaRAB* をなし、その産物は、膜に存在し、薬剤進入または排泄に係っている蛋白であろうと予想された。このオペロンを壊すことにより、COL 株のテイコプラニンの MIC には 3-4 倍の上昇が見られ、*tcaAB* の双方または、どちらか片方により MIC の変化を相補することができた。2)は病原因子の転写調節因子である *sar* の調節を、その上流で行っている因子であり、これを破壊することにより、テイコプラニンの MIC は 1/2 に低下した。3)は多剤耐性薬剤排出ポンプの調節因子と相同性をもち、これの破壊株のテイコプラニンに対する MIC は、1/3-1/4 に低下していた。（和田昭仁、J. Rossi, M. Bichoff, B. Berger-Bächi[Univ. Zürich]）

VIII．レプトスピラに関する研究

1．全国規模での野鼠由来人畜共通感染症・サーベイランスシステム，リスク評価．レプトスピラ感染症

北海道から沖縄に至る野鼠の調査システム・感染リスクの評価に関わる基礎作業を行った。一部の検疫所、地方衛生研究所、大学の協力を得て３年間で約 1,968 頭の野鼠を捕獲、うち 2.5%(50 株)からレプトスピラ病病原体を分離した。このことは、本邦においても依然、自然災害などがひきがねとなってレプトスピラ流行が起こる可能性が存在していることを示している。また、一部の株は本邦でこれまで見出

されたことのない血清型であった。今後はこの分離株の性状解析が必要である。この他、血清型 poi が初めて北海道で捕獲された野鼠から分離されている。（川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄,増沢俊幸(静岡県立大学)、平良勝也・中村正治(沖縄衛研),角坂照貴（愛知医大)、後藤郁夫（名古屋検疫所））

２．病原性レプトスピラの新規リポタンパク質の同定

レプトスピラの新規外膜タンパク質の探索のために，大腸菌のシグナル配列を欠損した PhoA タンパク質との融合タンパク質をつくらせることで，レプトスピラの分泌シグナルを持つタンパク質の探索を行った．その結果，新規のリポタンパク質 Loa22 を同定することができた．Loa22 は，一部がレプトスピラ細胞表面に露出しており，また，非病原性レプトスピラでは発現が認められず，病原性レプトスピラでは広く抗原性が保存されていることが明らかとなった。感染動物血清中には,Loa22 に対する抗体も誘導されていることから，レプトスピラ感染に対するワクチン候補になりうるものと考えられる．（小泉信夫，渡辺治雄）

３．レプトスピラ感染防御活性を持つ病原性レプトスピラの新規抗原タンパク質の同定

レプトスピラ感染マウス血清およびヒト患者血清に認識される，レプトスピラ抗原タンパク質の探索を行った．その結果，２種類の新規抗原タンパク質 LigA-m，LigB-m が同定された．LigA-m，LigB-m は，レプトスピラ細胞表面に露出しているリポタンパク質であり，これら遺伝子は多くの病原性レプトスピラに存在していた．さらに LigA-m，LigB-m は，マウスにおいてレプトスピラ感染防御活性を示し，また異なる血清型のレプトスピラに感染したヒト患者血清中にも，LigA-m，LigB-m に対する抗体が誘導されていた．以上の結果から，LigA-m，LigB-m は，多くの血清型のレプトスピラ感染に有効なワクチン候補になりうると考えられる．（小泉信夫，渡辺治雄）

４．レプトスピラ抗体価測定キットの評価

現在国内で入手可能なレプトスピラ抗体測定キットの評価を行った．その結果，1.レプトスピラ属特異的抗原を用いた IgM 測定キット（Dipstick，ELISA）は,国内流行血清型を抗原としたキット（RPLA，MCAT）に比べて感度が低い．2.RPLA は，他の 3 種類のキットに比べて特異性が低く，偽陽性を生じやすい．3.いずれのキットも，早期診断を行うには感度が不十分である，ことが明らかとなった．（小泉信夫，渡辺治雄）

５．東京都内で捕獲したドブネズミからのレプトスピラの分離

レプトスピラの主要な保菌動物であるドブネズミからのレプトスピラの分離を試みた．東京都内 5 ケ所で捕獲されたドブネズミ 51 頭中 11 頭から，*Leptospira interrogans* が分離された．また，分離はできなかったものの,培養液中から PCR によって，これまで本邦で報告のなかった遺伝種 *santarosai* の遺伝子断片が増幅された．（小泉信夫，谷川力（イカリ消毒技術研究所），林栄治（東京医科歯科大），川端寛樹，渡辺治雄）

６．アライグマからのレプトスピラの分離

アライグマはレプトスピラの保菌体となることが海外では知られていた．神奈川県では，輸入アライグマの野生化が問題となっているため，アライグマがレプトスピラの国内での新たな保菌体となっているか否かを調査するために，レプトスピラの分離を試みた．同時にある野外展示施設のアライグマからの分離も試みた．神奈川県で捕獲された 67 頭のアライグマから *L. interrogans* 2 株が分離された．また野外展示施設のアライグマ 53 頭中 1 頭から *L. interrogans* が分離され，33 頭の血清中にこの分離株に対する抗体価の上昇が認められた．アライグマからのレプトスピラの分離は本邦初である．（小泉信夫，牧野敬（神奈川県自然環境保全センター），黒木俊郎（神奈川県衛生研究所），川中正憲（寄生動物部），田栗利紹（長崎県衛生公害研究所），渡辺治雄）

７．レプトスピラ病疑いの検体の抗体価測定

レプトスピラ病疑いの 22 検体について、顕微鏡下凝集試験によって抗体価の測定を行なった。このうち 2 検体で抗体価が陽性となった。（小泉信夫，渡辺治雄）

IX.　ボレリアに関する研究

１．ライム病ボレリアへの遺伝子導入に関する研究

ライム病ボレリアの感染メカニズム解明のための基盤として、遺伝子破壊・遺伝子導入などの遺伝学的ツールの開発が必須である。本研究では、形質転換効率を低下させる因子がコードされる２個の plasmid のうち、感染に必須の遺伝子と同じプラスミドにコードされている推定制限修飾遺伝子 bbe02 破壊株を作成、この遺伝子が明らかに形質転換効率を低下させていることを明らかにした。さらに bbe02 破壊による感染性の変化は見出されなかったことは、in vivo での病原性研究ツールが確立できたことを示しており、ライム病の慢性化メカニズム解明などに応用可能であると考えられる。（川端寛樹、渡辺治雄）

２．ライム病輸入例

2002 年６月～８月末にかけて米国・ニューヨーク州山中で開催された国際キャンプに参加した日本人高校生２名がライム病と診断され、現地で治療を受けた。同国際キャンプには欧州、アフリカ、南米各国、日本等から参加者があり、キャンプ地では屋外でのログキャビン作り等で国際交流を行っている。各国からの参加者数は約 60 名程度で、うち 20 名ほどに同様の症状があり、現地病院にて治療を受けていることから、ライム病の集団事例であったと考えられる。本事例を受けて、感染症研究所ではホームページを通じて医療機関・海外渡航者への注意を喚起した。（川端寛樹、渡辺治雄；相楽裕子、足立拓也（横浜市立市民病院））

3．全国規模での野鼠由来人畜共通感染症・サーベイランスシステム，リスク評価．ボレリア感染症

南西諸島を中心に、ライム病関連ボレリアが野鼠から高率で分離されることを明らかにした。これら分離株は韓国南部、揚子江流域、タイ、ネパールで見出される *B.valaisiana* 近縁種とおなじグループに属

することも明らかにした。現在までにこれらボレリアに起因する疾患が南西諸島で見出されるか否かは不明である。(川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄；増沢俊幸(静岡県立大学)；平良勝也、中村正治(沖縄衛研)、角坂照貴（愛知医大)、後藤郁夫（名古屋検疫所))

X. 髄膜炎菌に関する研究

1. MLST による国内分離髄膜炎菌株の分子疫学的解析

昨年度に国内への導入を確立した MLST (Multilocus sequence typing)を用いて 1974 年から 2002 年までに収集された国内分離髄膜炎菌 183 株の分子疫学的解析を行なった。その結果、43 種の日本固有の Sequence type (ST)を含む 63 種の ST が同定された。それらは 7 つの ST グループとグループに属さない ST に大別され、特に ST-44 complex は非常に大きなクラスターを形成していることが明らかとなった。また分離された年のフォローアップと ST を対比させた結果、過去の早い時期に分離された株と近年単離された株が MLST の分類でお互いに近位にある傾向が認められ、現在の日本国内においては過去 30 年間前から存在する国内古来の株と海外での流行株が混在する状況であることが推測された。また、1970 年代に日本で分類された株の中には同時期にヨーロッパや西アジア、アフリカで大流行した髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌であった ST-32（ET-5 complex)、ST-44（Lineage III）と同タイプの株が既に国内に存在していたことが明らかになり、1970 年代には日本国内に海外流行株が既に流入している状況が推測された。[高橋英之、渡辺治雄；黒木俊郎、渡辺祐子、山井志郎（神奈川衛研）]

２．テトラサイクリン耐性臨床分離髄膜炎菌の耐性因子の同定

テトラサイクリンに対して 32 μg/ml（希釈法)、24 μg/ml（E-test）の耐性を示す髄膜炎菌臨床分離株の耐性決定因子の同定を行なった。その結果、従来同定されているテトラサイクリン耐性因子である *tet*(M)とは異なり、Tn*10* と同属の *tet*(B) が染色体上に挿入されていることが明らかになり、*tet*(B)によるテトラサイクリン耐性髄膜炎菌株を初めて同定した。[高橋英之、渡辺治雄；黒木俊郎、渡辺祐子、山井志郎（神奈川衛研）]

3. 髄膜炎菌識別マーカー、γ-glutamylaminopeptidase の生物学的機能の解析

細菌分類学的にも注目されている GGT の生物学的機能は全く明らかとなっていなかったためにその解析を行なった。その結果、GGT 欠損 (*Δggt*) 髄膜炎菌はヒト血管内皮細胞 HUVEC 及びヒト上皮細胞 Hep-2、A-549 への付着能、侵入能、ヒト血中での生存率、ラット血中での増殖は野生株に比べて優位な差を見出すことは出来なかったが、ラット髄液中の増殖能には野生株に比べて著しい低下が見出された。さらに髄膜炎菌に必須の 4 amino acids（Arg、Cys 、Gly、Glu） 及び 3 γ-glutamyl peptides (γ-Glu-Glu、γ-Glu-Cys、Glutathione)を髄液と同じ濃度に調製した人工培地で解析を行なった結果、*Δggt* 株は野生株に比べ、有意な成育の欠損が認められ、その成育の欠損は 60μM のシステインの添加で抑圧された。この結果は髄膜炎菌が中枢神経系に侵入してシステイン濃度が限定された髄液の様な中での増殖をより活

発にする際にγ-glutamyl peptides を分解し、システイン源を確保している可能性が示唆された。これは今まで分類学上でしか注目されてこなかった GGT の生物学的存在意義を推測させるものであり、進化論上でも淋菌や近類 *Neisseria* 属には存在しない理由としても有意義だと考えられた。[高橋英之、廣瀬健二、渡辺治雄]

XI. エルシニアに関する研究

1. 仮性結核菌感染症における感染防御因子としての好中球と NADPH oxidase の役割

NADPH oxidase 欠損『chronic granulomatous disease(CGD)』マウスの本菌に対する抵抗性が親マウスと比較しての 1.8×10^{-5} 以下まで低下することから、仮性結核菌に対するマウスの主要な感染防御因子は、NADPH Oxidaseであることが明らかになった。NADPH oxidaseは好中球、ＭΦだけでなく免疫誘導に関与する樹状細胞やＢ細胞にも存在するのでそのターゲット細胞を特定するため、好中球除去マウス（好中球特異抗体を用いて除去）に仮性結核菌を種々の濃度で感染させ、その抵抗性をCGDマウス、親マウス双方と比較した結果、CGDマウスの生存カーブは好中球除去マウスのそれらと極めて酷似することから、仮性結核菌の殺菌に好中球が主に作用し、好中球のNADPH oxidase活性が重要な働きをしていることが明らかになった。（塚野尋子、倉文明、渡邊治雄）

2. *Yersinia pestis* リポ多糖リピド A 部分の化学構造と生物活性

ペスト菌が強力な毒力を持つ原因を病原因子リポ多糖(LPS)の特殊性から解明するため、まずその構造と活性について検討した。27℃と 37℃で培養した本菌の LPS を精製し、構造を調べると、O 抗原のないラフ型で、Lipid A-27℃は,3,4,5,6-acyl Lipid A の複合体で、中でも 4-acyl Lipid A が最も多く存在した。Lipid A-37℃は 3,4-acyl Lipid A が主要で、5-acyl Lipid A は少く、6-acyl Lipid A は検出できなかった。 LPS-Lipid A のマクロファージー活性化能を TNF- を指標として、マウスと人由来細胞で調べたところ、LPS-Lipid A-27℃は LPS-Lipid A-37℃より強く誘導し、そのことは特に人由来細胞で顕著に現れた。これらの結果から、ペスト菌が acylated Lipid A を 37℃でより少なく産生した方が、人マクロファージの活性化を弱めるためにより有利になるかも知れない。(川原一芳(北研)；塚野尋子、渡邊治雄；松浦基博（自治医大）

XII. 口腔内細菌に関する研究

1. 母子（３歳児と母親）により分離された *S. mutans* の相同性について

う蝕の主な原因菌である *Streptococcus mutans* は、乳幼児期に母親などの養育者から子へ伝播すると考えられている。しかし、実際に親子同時に *S. mutans* の検出を行った研究報告は少ない。そこで本研究では、横浜市在住の親子（３歳児と母親）の口腔より *S.mutans* の検出を行うとともに、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いて *S. mutans* の相同性を調べ、母子感染率を明らかにして乳幼児う蝕予防の一助とすることを目的にし検討を行った。その結果、検討が可能であった親子 11 ペア中、*S. mutans* の遺伝子が一致したのは 5 ペア（45.5%）であった。また

親子から分離された *S. mutans* の遺伝子は、17 の異なった PFGE パターンを示した。横浜市のような大都市における 3 歳児の *S. mutans* 感染率は低いものの、母から子への感染率は比較的に高いことが示唆された。[茂木瑞穂、寺嶋淳、渡辺治雄、泉福英信]

2. *Streptococcus sanguis* の唾液成分への結合を制御するペプチドの解析

口腔バイオフィルム形成には、他の口腔細菌とともに Streptococci の歯表面への付着が重要な役割を果たしている。なかでも *Streptococcus sanguis* は歯表面への初期付着能が高い細菌として知られている。そこで本研究では、*S. sanguis* の付着能を制御する菌体分子や唾液成分を明らかにするために、菌体表層分子ペプチドを合成し、そのペプチドの唾液成分への結合を検討した。*Streptococcus gordonii* M5 の菌体表層蛋白質(SSP-5)由来ペプチド（390-402）は、BIAcore において唾液成分と強く結合することが明らかとなった。またそのペプチドによる *S. sanguis* の唾液成分への結合競合阻害率は、約 50%であった。そのペプチドは、200kDa 以上の唾液蛋白質やアグルチニンペプチド（SRCRP2）と強く結合することも明らかとなった。*S. sanguis* の初期付着には、SSP-5(390-402)の領域と唾液アグルチニンの SRCRP2 領域との相互作用が関与していることが示唆された.[泉福英信、浜田具之、渡辺治雄]

3. ヒト型 PAc peptide 抗体の誘導に関与する調節因子の検討

う蝕の発症は、*Streptococcus mutans* の菌体表層蛋白質抗原（PAc）を介する歯表面付着が深く関与している。その付着阻害抗体が認識するエピト- プと様々な MHC class II 分子と結合するアグレト- プを含む PAc(361-386)ペプチドが明らかにされ、そのペプチドがヒトにおいても免疫原性を有するか検討を行った。実際にヒト唾液においてこのペプチドに対する抗体が認められるか ELISA により検討を行うと、多く抗体を有するヒトと少なく抗体を有するヒトが存在し、また抗体の濃度に依存して唾液中 *S. mutans* 量も変化することも明かとなった。その抗体量の変動に関係のある因子は、年齢、HLA-*DRB1* 遺伝子多型性であった。ペプチドの免疫によるヒト特異抗体の誘導の検討は、ヒト末梢血単核細胞(PBMC) を腹腔に移植した NOD-Scid マウスを用いて行った。その結果、ペプチドのマウスへの免疫によりヒト型特異抗体が誘導されることが明かとなった。以上の検討により、PAc(361-386)ペプチドはヒトにおいて免疫原性を有し、その抗体の誘導は年齢や HLA-*DRB1* 遺伝子多型性に影響を受けることが示唆された。 [津覇雄三、M. A. Salam、泉福英信]

４. 唾液分泌が減少したマウスを用いた口腔バイオフィルム形成モデルの作製

口腔バイオフィルム形成に感受性の高いモデル動物を作製するために、唾液分泌が減少したマウスを作製することを検討した。その結果、B10.D2 マウスの MHC Class II 遺伝子と組み換えを起した NOD マウス（NOD.*B10D2*）、E2F-1 ノックアウトマウスおよび NOD.*E2F-1* ノックアウトマウスが唾液分泌低下マウスであることが明らかとなった。これらのマウスを候補モデルマウスとし、様々な Streptococci を用いた口腔感染実験を行った。NOD.*B10D2* マウスでは、*Streptococcus sanguis* を口腔内に接種した場合、他

のStreptococciに比べ歯表面への付着量が一番多いことが明かとなった。また E2F-1 ノックアウトマウスでは、*Streptococcus saliverius* が歯表面における付着量の多いことが明らかとなった。現在、NOD.*E2F-1* ノックアウトマウスにおけるStreptococci の付着の検討を行っている。[サラムアブドウス、松本直子、泉福英信]

5. *Streptococcus mutans* の口腔バイオフィルム形成に対する乳酸菌の有効性の検討

プロバイオティクスとして食品や医薬品で広く用いられている乳酸菌は，整腸効果の他，免疫力の増強，血清コレステロール低下作用を有している．そこで歯科口腔領域における乳酸菌の効果について明らかにするため，齲蝕発症に深く関わる *S. mutans* によるプラーク（バイオフィルム）形成が乳酸菌により影響をうけるか検討を行った。本研究は，菌を接種したセル内に，培養液を連続的に供給して培養できるフローセルシステムを用いた．スクロース含有培養液を流速約 3mL/h に設定し菌を接種する。37℃で一晩培養後，形成されたバイオフィルムを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した．乳酸菌の *Streptococcus faecalis* と *S. mutans* を混合すると，*S. mutans* が形成するバイオフィルム内部の空洞化，間隙増加が見られた．一方，乳酸菌 *L. casei* を用いた場合では，接種量を増加させても *S. mutans* のバイオフィルム形状に変化は認められなかった．これらの結果から，*S. faecalis* は *S. mutans* のバイオフィルム形成に協同的に作用せず，むしろバイオフィルム形成を抑制することが示唆された．[川田真裕、嶋川真木、渡辺治雄、泉福英信]

6. 口腔レンサ球菌に対するハイドロキシアパタイトペーストの除菌効果

ハイドロキシアパタイトは、歯や骨などの生体硬組織の主成分として知られている。ハイドロキシアパタイトの特徴の一つに、その結晶構造と化学特性によりタンパク質に対する物理的な吸着能力が高いことが挙げられる。このことから、口腔細菌に対しても高い吸着能力を有することが期待される。そこで、本研究では口腔細菌との吸着力の高かったハイドロキシアパタイト粒子を用いたペーストを作製し、これらのハイドロキシアパタイトペーストの口腔細菌に対する除菌効果について検討した。ドラッグレテーナーの内面にこのペーストを少量乗せ、歯列に密着するようにドラッグリテーナーを装着した。ペーストが歯表面に万遍なく行き渡っていることを確認し 5 分後取り外した。口腔内を洗浄後、1 週間おきに唾液中の *S. mutans* と Streptococci を測定しハイドロキシアパタイトペーストの効果を検討した。その結果、15 名中 8 名（53.3%）の *S. mutans* への除菌効果が認められた。今後、プラセボペーストの使用した場合との比較検討を含め、ハイドロキシアパタイトペーストの除菌効果の検証を行う予定である。[荒川正嘉、花田信弘（国立保健医療科学院）、泉福英信]

XIII. 結核菌に関する研究

１．結核菌の迅速薬剤感受性試験法に関する研究

（１）RFP と INH の併用効果の検討

ブロスミック MTB-1 の各 1～11 列のウエルに RFP 0.016 と 0.008μg/ml、INH 0.25～0.03125μg/ml の

濃度にそれぞれ加え、各参照菌株の発育を調べた。各薬剤に耐性を持つ参照菌株の発育は、RFP 0.008μg/ml の系では、INH 0.064μg/ml の濃度以上では完全に抑制された。RFP 0.004μg/ml の系では、INH 0.125μg/ml の濃度で完全に抑制された。
[山崎利雄；佐藤直樹、山下研也（極東製薬工業）]

（２）RFP と INH と SM（または EB）の併用効果
主要 5 薬剤に耐性を持つ ATCC 参照菌株を用いて、RFP･INH･SM、RFP･INH･EB の薬剤混合の併用効果を調べた。各耐性菌を完全に抑制した薬剤の組み合わせは、RFP0.008μg/ml、INH0.125μg/ml、SM1μg/ml (あるいは EB1μg/ml)であった。しかし、再現性や判定日、血中濃度等を考慮したところ、RFP0.010μg/ml、INH0.10μg/ml、SM1.0μg/ml（あるいは EB1μg/ml）が適当と思われた。[山崎利雄；佐藤直樹、山下研也（極東製薬工業）]

（３）臨床分離菌株を用いた RFP・INH・SM（または EB）の併用効果
RFP0.010μg/ml、INH0.10μg/ml、SM1.0μg/ml（あるいは EB1μg/ml)の混合薬剤に対する併用効果を、臨床分離菌 16 株について調べた。RFP と INH の両薬剤耐性菌株でなければ、単剤試験法にて耐性菌と判定された菌株であっても、本法では感性菌と判定された。このことは、多剤併用療法による実際の治療結果と一致し、新しい迅速薬剤感受性試験法の確立が可能であることを示唆している。 [山崎利雄；佐藤直樹、山下研也、（極東製薬工業）]

２、結核菌薬剤感受性試験用市販培地の精度管理

結核病学会の抗酸菌検査法検討委員会の一員として、結研より提供された精度管理用菌 20 株を用いて、3 社製 5 種類の結核菌薬剤感受性試験用として市販されている卵培地の精度を調べた。普通法による培地の成績は、甲乙つけがたい性能を有していた。しかし、マイクロタイター法による培地は、判定が難しく、個人差が生じる場合があり得る旨結核病学会に報告した。[山崎利雄]

3. 結核菌非加熱培養ろ液から分離精製した MPT63 蛋白の結核生菌感染モルモットにおける皮膚 DTH 反応

MPT63 を皮内注射した 24 時間目の反応値は、0.2μgの時0で、1μgの時11.3±0.4㎜,SD n=7であったが、発赤を主体とするものであった。この時のPPDの値は16.3±1.5(0.05μg)、結核菌分泌蛋白のMPT64は15.3±3.1（0.05μg）であった。MPT63 はBCG東京株非加熱培養ろ液から分離精製したMPB63 とアミノ酸配列が同じであることが知られている。MPB63 は 2μgの皮内注射でもBCG東京株生菌を注射したモルモットで皮膚DTH反応が認められないことが知られている。なおMPB63 は結核感染患者の血中抗体に有意に反応するという報告もある。[芳賀伸治、山崎剛、山崎利雄、永井定*、(*元細菌部客員研究員)]

4. 国内市販 BCG ワクチンの RD16 領域の異なりについて

BCGワクチン株についてPCRにてRD16 領域を増幅させたところ、379bp又は 401bpのバンドを示すコロニーを確認した。つぎに、BCGワクチンをモルモットに静注後 24 時間目に脾臓を取り出し、BCGを還元培養した。2 匹から都合 60 個のコロニーを釣菌し、それぞ

れの株についてPCR後にバンドを調べたところ、379bpのバンドを示す株が 56 株、401bpのバンドを示す株が 1 株、379bpと 401bpの 2 本のバンドを示す株が 3 株確認できた。現在、これらの株間の毒力又は抗結核防御能の差異についてモルモットを用いて検討している。[芳賀伸治、井関博*、山崎利雄、山本三郎**(*日大獣医臨床病理学研究室学生)(**細菌第二部)]

５．モルモット IFNγ-ELISA，-ELISPOT の確立による BCG 特異的 CD4 および CD8 陽性 T 細胞の同定

これまでにモルモット・インターフェロン-γのELISAおよびELISPOT法による測定法を確立してきた。この手法を用いてBCG接種により誘導された特異的CD4 およびCD8 陽性 T細胞の同定とその頻度をあきらかにした。すなわち、BCGで生菌免疫したモルモットではインターフェロンγの産生が認められたが、BCG死菌免疫では認められなかった。両者共ツ反は陽性だった。又、BCG生菌免疫動物のWhole LymphocytesをPPDで刺激するとインターフェロン-γが陽性となった。CD4+ 細胞 をdeplete すると陰性となり、 CD8+細胞をdepleteすると陽性となった。CD4+ 及びCD8+ 細胞を共にDepleteすると陰性となった。このことからインターフェロン-γはCD4+細胞が産生していることが分かった。この方法を用いたワクチン評価の可能性についても検討している。[山崎剛、芳賀伸治、浜武牧子*、本多三男*(*エイズ研究センター)、山本三郎(細菌第二部)]

XIV. ボツリヌスに関する研究

1．ボツリヌス複合毒素分子の生体内での解離

ボツリヌス菌はボツリヌス複合毒素分子（神経毒と非神経毒蛋白質との会合体）の形で産生される。この複合毒素は経口摂取された時は酸性の胃液により失活することなく腸管に到達し、そこで神経毒と非神経毒蛋白質に解離する。神経毒は腸管内で分解されることなくリンパ管に直接侵入する。創傷ボツリヌス症の場合は傷口より複合毒素が直接体内に侵入するがこの複合毒素が血管の中でどのような形体を取っているかは不明であった。そこで A と E 型複合毒素をマウス静脈または腹腔に投与し血流中の毒素の分子サイズを、蔗糖密度勾配遠心法を用いて解析した。その結果複合毒素は速やかに 7S の神経毒へ解離していることが明らかになった。これらの結果は今後の創傷ボツリヌス症の対処に対し参考になると思われる。（北村勝）

XV．その他の研究

1．全国規模での野鼠由来人畜共通感染症・サーベイランスシステム，リスク評価．E 型肝炎

野鼠由来人獣共通感染症の調査研究の一環として、国内に生息する野ネズミにおける HEV 感染の有無を血清疫学的に調査した．日本国内の 5 地域（沖縄、宮崎、愛知、神奈川、東京）で 2000 年～2002 年にかけて捕獲された野ネズミ由来計 507 血清サンプルを調査対象とし、沖縄（19/44; 43%）で、次いで愛知（97/313; 31%）、東京（4/24; 17%）、神奈川（4/36; 11%）、宮崎（1/35; 3%）で抗体陽性個体を見出した。

また陽性率は個体の体重（＝加齢）と比例関係が見られた。本研究は、感染病理部・阿部先生を中心とするHEV研究グループに協力する形で行われている。（川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄、阿部賢治・平野真・丁　欣・Tran T　T Huy・佐多徹太郎（感染病理部)、李　天成・武田直和（ウイルス２部）角坂照貴（愛知医科大学)、後藤郁夫（名古屋検疫所)、増沢俊幸（静岡県立大学)、中村正治・平良勝也（沖縄県衛生環境研究所微生物)、黒木俊郎（神奈川県衛生研究所)、谷川力（イカリ消毒)）

XVI．検査等に関すること

1．　レジオネラの検査

24 症例由来の 2 株、菌株以外の 43 検体（血清、尿、血液、心嚢液、髄液、胸水、肺）および環境由来の 63 株、菌株以外の 2 検体（循環式浴槽のろ過材）の検査を行った。*L．pneumophila* SG1 および *L．dumoffii* による宮崎県のレジオネラ症の本邦最大の集団発生、*L．pneumophila* SG5 による世界で初めての客船の循環式浴槽における集団発生が特筆され、患者分離株と浴槽水/ろ材由来株との間で PFGE による DNA 型が一致した。〔前川純子、倉文明、渡辺治雄〕

2．体外診断薬

(1)「医薬品製造（輸入）承認許可申請」中、輸血に関するものとして、の梅毒血清検査用キットの試験検査を行った。１件のラテックス凝集法によるキット、１件の比色 EIA 法によるキット、１件の化学発光 EIA 法によるキット、いずれも規格試験に合格した。（中山周一、芳賀伸治、渡辺治雄）

(2) 通常、当所では淋菌検出用体外診断薬の性能試験は行なっていないが、特例的に１件の TMA 法による検出キットの試験検査を受け入れた。本キットは規格試験に合格した。（中山周一、芳賀伸治、渡辺治雄）

３．ペストワクチンの製造

ペストワクチンの製造および検定（力価試験、安全試験)：ペストワクチンを 1000 人分作製した。（塚野尋子、川端寛樹、高橋英之、小泉信夫）

４.レファレンス、サーベーランス

（1）　*Legionella pneumohila* 血清群 7-15 に対する免疫血清の市販

過去 2 年にわたって、これまで市販されていない上記の一部血清を地研の地方ブロックのレファレンスセンターに配布してきた。これにより温泉、公衆浴場、冷却塔（その他プール、地下の噴水）から、*L．pneumohila* 血清群 7-10 が検出できた。さらに地研からの要望をとりまとめ、特注品としてデンカ生研から新たに市販されることになった。〔倉　文明、前川純子、渡辺治雄〕

（２）レジオネラ標準菌株の選定

2 年前に設定した日本の臨床分離 4 株に、さらにタイの環境分離株 *L．erythra* を追加して 5 株とした。これらの株は、*mip* プライマーによる PCR で増幅される DNA 配列をもつ *L．pneumophila* と増幅される DNA 配列をもたないその他の株、青白自発蛍光を有する株

（*L. dumoffii*）および赤色自発蛍光を有する株（*L. erythra*）と自発蛍光を有しないその他の株、*L. pneumophila*でも血清群の異なるSG1およびSG3である。これらは衛生微生物協議会内で配布可能である。〔倉　文明、前川純子、渡辺治雄〕

５．JICA国際協力・研修生受け入れ

地方衛生研究所の職員1名を2日間、レジオネラの検査法（IFAによる血清抗体価の測定）について研修を行った。宮崎県衛生環境研究所　微生物部細菌科技師　東　美香　10月7日-8日〔倉　文明〕

発表業績一覧

Ⅰ．欧文発表

1) Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., and Hayashi, T. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(26): 17043–17048, 2002

2) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of repeated subculturing and prolonged room temperature storage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 40(8): 3079-3081, 2002

3) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. Japanese Journal of Infectious Diseases, 55, 19-22, 2002

4) Yamaguchi T., Yokota Y., Terajima J., Hayashi T., Aepfelbacher M., Ohara M., Komatsuzawa H., Watanabe H., Sugai M. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. Journal of Infectious Diseases, 185, 1511-6, 2002

5) Hirose, K., Hashimoto, A., Tamura, K., Kawamura, Y., Ezaki, T., Sagara, H., Watanabe, H. DNA sequence analysis of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi, and Paratyphi A. Anitmicro. Agent. Chemo. 46: 3249-3252. 2002.

6) Takahashi,H., H. Tanaka, H. Inouye, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Isolation and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain from healthy carrier that is deficient in γ-glutamyl aminopeptidase activity. Journal of Clinical Microbiology 40: 3035-3037, 2002.

7) Takahashi,H., T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Identification of *tet*(B), encoding high-level tetracycline resistance, in *Neisseria meningitidis*.Antimicrobial Agents Chemotherapy.46: 4045-4046, 2002.

8) Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question.J.Clin. Microbiol; 40: 2708-2709. 2002

9) Zhang, Y. L., Arakawa, E., Leung, K. Y. Novel

Aeromonas hydrophila PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. Infect. Immun. 70(5): 2326-2335, 2002

10) Kawahara,K., H Tsukano, H Watanabe, B Lindner,M Matsuura. Modification of the structure and activity of the lipid A *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature.Infection and Immunity.70:4092-4098. 2002.

11) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H.: Critical role of myeloperoxidase and NADPH oxidase in high burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. J Infect Dis 185:1833-1837, 2002.

12) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H：Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 40: 557-563, 2002.

13) Ikebe, T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D.,Tamaru, A., Fujinaga, Y., Abe Y., Shimizu Y., Watanabe, H. and the WorkingGroup for Group A Streptococci in Japan. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive Streptococcus pyogenes M3/T3 isolates in Japan. Infect. Immun.70: 3227-3233. 2002.

14) Takahashi, H. and Watanabe, H. Transconjugation of incompatibility group Q- broad host range vector into *Neisseria meningitides* and its availability as genetical tools. Microbiology. 148：229-236. 2002.

15) Hirose,K., Itoh, K., Nakajima,H., Kurazono,T., Moriya,K., Ezaki,T., Tamura,K., and Watanabe,H. Selective amplication of *rfbE, rfbS* and *fliC* by multiplrx PCR for identification and detection for *Salmonella* enetrica serovar Typhi and Paratyphi A. J. Clinic Microbiol. 40：633-636.2002

16) Kaito,C. Akimitsu,N., Watanabe,H., Sekimizu,K. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. Microbial Pathogenes.32:183-190. 2002.

17)Fujita,O.,Inoue,S.,Tatsumi,M., Kamiyama,T., Akaishi,S., Ootan,S, Kawai,T., Hiroch,T., Sakamoto,Y., Tamura,K.,Watanabe,H., and Yamada,A. Amplification of irrelevant sequence from *Bacillus subtilis* using primer set designed for detection of *pag* gene of *Bacillus anthracis*. Jpn. J. Infect. Diseas.55: 99-100. 2002

18) Watanabe,H., Terajima, J., Izumiya,H., and Iyoda,S. Molecular typing methods for STEC; Methods in Molecular Medicine. Vol.73: *E. coli* Shiga toxin methods and protocols. Edited by; D. Philpott and F. Ebel. Humana Press Inc., Totowa, NJ. P.55-65. 2002

19) Senpuku,H., A. Tada, M. Takada, T. Satoh, N. Hanada.Reproducibility of oral bacterial isolation in elderly. J. J. Infect. Dis. 55: 61-62. 2002.

20) Nomura,Y., H. Takeuchi, H. Senpuku, H. Ida,

E. Yoshikawa, K. Koyama, N. Kanazawa, N. Hanada. Survey of dental hygenists and health care workers for microorganisms in the oral cavity. J Infect Chemother. 8:163-167 2002.

21) Sato,Y., H. Senpuku, K. Okamoto, N. Hanada, H. Kizaki Expression of GbpC protein in *S. mutans* and its glucan-binding. Oral Microbiol Immunol. 17: 252-6. 2002.

22) Nomura,Y., A. Eto, N. Hanada and H. Senpuku. Identification of motif binding with HLA-DR 8 (*DRB1*0802*) for peptide vaccine against *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol. Immunol. 17: 209-14. 2002.

23) Matin,K., S. Md. Abdus, J. Akhter, N. Hanada and H. Senpuku. Role of Stromal Cell derived factor-1 (SDF-1) in the development of autoimmune diseases in nonobese diabetic (NOD) mice. Immunology 107: 222-232. 2002.

24) Senpuku, H., T. Asano, K. Matin, S. Md. Abdus, Y. Tsuha, Y. Horibata, N. Shimazu, Y. Yoeno, T. Aoba, T. Sata, N. HANADA, and M. HONDA. Effects of human IL-18 and IL-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 107: 232-242. 2002.

25) Lawrenz MB, Kawabata H, Purser JE, Norris SJ: Decreased electroporation efficiency containing linear plasmids lp25 and lp56: Impact on transformation of infectious *B.burgdorferi*. Infection and Immunity.70, 4798-4804, 2002.

26) Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H. Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. Microbial. Immunol. 47: 305-306.2003

27) Nakaya,H., A. Yasuhara, K. Yoshimura, Y. Oshihoi, H. Izumiya, and H. Watanabe : Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. Emerg.Infect.Diseas. 9, 255-257, 2003.

28) Rossi, J., M. Bichoff, A. Wada, and B. Berger-Bächi. MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus sarA* attenuation. Antimicrob. Agents Chemother. 47:2558-2564, 2003

29) Hirose, K., Tamura, K., Watanabe, H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. Microbiol. Immunol. 47(2), 161-165, 2003.

30) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. Current Microbiology, 46(3):224-7, 2003

31) Ushijima Y, Keirans JE, Oliver Jr JH, Tsurumi M, Kawabata H, Watanabe H, Fukunaga M.: Mitochondrial sequence variation in *Carios capensis* (NEUMANN), a parasite of seabirds, collected on Torishima island in Japan. Journal of Parasitology. 89(1), 196-198, 2003

II．和文発表

1) 渡辺治雄、寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、田村和満。分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制；パルスネットの構築。感染症学雑誌、76，842-848，2002

2) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、渡辺治雄。腸管出血性大腸菌 - 0157 を中心として。SRL 宝函、26，24-28，2002

3) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、渡辺治雄。パルスフィールドゲル電気泳動法による食中毒菌の分子疫学的解析。食肉の科学、43，9-17，2002

4) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、田村和満、渡辺治雄。パルスネット-疫学調査と DNA 解析。日本臨床，60，1070-1076，2002

5) 渡辺治雄、寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎。細菌ゲノム配列の多様性を利用した分子疫学的解析-パルスネットの構築。現代医療、34，29-35，2002

6) 保科　健、田原研司、板垣朝夫、関　龍太郎、足立　行、奥野　栄、村上佳子、松本紹生、伊藤耕、坂根英子、柳　俊徳、笹木正夫、斉藤真理子、泉谷秀昌、寺嶋　淳、渡辺治雄。島根県西部で発生した A 養鶏場の卵が原因と推定された *Salmonella* Enteritidis による食中毒の疫学的考察。日本食品微生物学会雑誌、19，27-31，2002

7) 中村雅子、石畝史、村田健、浅田恒夫、堀川武夫、泉谷秀昌、渡辺治雄：下水から分離された *Salmonella* Typhimurium DT104 の分子疫学的検討。北陸公衛誌、第 29 巻、第一号、17-21、2002。

8) 松井珠乃、鈴木里和、柴田和顯、木島秀雄、瀬尾幸嗣、塚田真樹、松橋利奈子、泉谷秀昌、渡辺治雄、大山卓昭、岡部信彦、高橋央：市内一円で発生した *Salmonella* Enteritidis 食中毒の集団発生事例-豊橋市、2001 年。食品衛生研究、第 52 巻第 9 号、29-34、2002。

9) 寺嶋　淳　田村和満　廣瀬健二　泉谷秀昌　渡辺治雄　宮原美知子　小沼博隆．輸入カキが原因と推定される *Shigella sonnei* による食中毒の発生．病原微生物検出情報 IASR　2002　Vol.24 p 3．

10) 廣瀬健二．基礎講座・感染症６・腸チフス・パラチフス．ＳＲＬ宝函 Vol.26(3)，p142-147，2002．

11) 小泉信夫，渡辺治雄．レプトスピラ病．小児科診療 65 (12)：2145-2148 2002．

12) 小泉信夫，渡辺治雄．レプトスピラ抗体．検査値異常から読む病態と診断計画 28（増刊号）1252-1253 2002．

13) 小泉信夫，渡辺治雄　レプトスピラ感染症．治療 84 (6)：1831-1833 2002．

14) 小泉信夫，渡辺治雄．ラテックス凝集試験によるレプトスピラ抗体検査に関する注意の呼びかけ．病原微生物検出情報 22(1)：13 2002．

15)高橋英之、渡辺治雄、図説　病原性細菌、髄膜炎菌、ヴァンメディカル　5（3)、198-199　2002

16) 鶴見みや古，川端寛樹，佐藤文男：伊豆諸島鳥島のクロアシアホウドリのコロニーにみる *Carios (Ornithodoros) capensis* の生息状況およびその疫学調査．Journal of Yamashina Institute Ornithology．34：250-256，2002．

17) 前川純子、渡辺治雄：基礎から臨床へ.レジオネラ症。診断と治療、90，2219-2225.2002．

18) 久高潤，平良勝也，安里龍二，下地實夫，宮城朝光，滝沢公章，小嶋一，田島隆，阿部義昭，池辺忠義．平成 13 年度に多発した T22 型による劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症- 沖縄県．病原微生物検出情報 23：200-201 .2002．

19）渡辺治雄。細菌性腸管感染症。化学療法の領域。18：34-41.2002.

20）渡辺治雄，寺嶋淳，泉谷秀昌。パルスネットの構築；細菌の DNA 解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステム。　食品衛生研究 52：7-13.2002

21）渡辺治雄。腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向。Medical Tribune. p.44-45. 2002.

22）松本慶蔵，渡辺治雄，中山　昇。感染症成立の新しい考え方。化学療法の領域。18:19-25.2002.

23）渡辺治雄。食物，水系感染症。Medical Technology. 30:301-302.2002.

24）渡辺治雄。炭疽。医学のあゆみ。200:1199.2002。

25）野本明男，渡辺治雄，岩本愛吉。微生物ゲノムと病原性。現代医療。34：984-999.　2002.

26）渡辺治雄。下痢原性大腸菌群。小児科学，第２班。監修；白木和夫等。医学書院。2002 年。

27）田中毬子，岩谷雅子，大河原信人，山崎明，今井由美子，須釜久美子，池辺忠義．劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症による新生児死亡例- 新潟市．病原微生物検出情報 23:146.2002.

28）池辺忠義．感染症の話- 劇症型溶血性レンサ球菌感染症．感染症発生動向調査週報（IDWR）第 4 巻 46 号 .2002.

29）武内博朗、野村義明、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 1；本コーナーの企画趣旨と連載の概要、デンタルダイヤモンド.27: 48 - 51. 2002.

30）野村義明、武内博朗、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用２；口腔バイオフィルム（歯垢）の性状と解明、デンタルダイヤモンド. 27: 46 - 49. 2002.

31）武内博朗、野村義明、西川原総生、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用２；遺伝子工学的技術 1，PCR を利用した診断法、デンタルダイヤモンド. 27: 52 - 57. 2002.

32）泉福英信、花田信弘：やってみよう微生物・生化学検査；歯科微生物・生化学検査、デンタルハイジーン、22: 498-503. 2002.

33）泉福英信、由川英二：やってみよう微生物・生化学検査；微生物検査の実態、デンタルハイジーン、22: 504-510. 2002.

34）野村義明、泉福英信：やってみよう微生物・生化学検査；検査の活かし方、デンタルハイジーン、22: 511-514. 2002.

35）泉福英信、荒川正嘉：ハイドロキシアパタイトペーストは、う蝕撲滅の救世主になるか、デンタルダイヤモンド. 379: 62 - 66. 2002.

36）武内博朗、野村義明、泉福英信、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 7;モノクローナル抗体を利用したう蝕予防法、デンタルダ　イヤモンド. 377: 52 - 57. 2002.

37）津覇雄三、松本直子、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 8；エライザ、ウエスタンブロット法を用いた歯科疾患のリスク診断法、デンタルダイヤモンド. 378: 46 - 49. 2002.

38）泉福英信、津覇雄三、野村義明、武内博朗、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 9;う蝕予防用ワクチンの現状、デンタルダイヤモンド. 382: 48 - 51. 2002.

39）中尾龍馬、茂木瑞穂、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の

臨床研究とその応用 10；DNA ワクチン技術と歯科医療、デンタルダイヤモンド. 383: 52 - 55. 2002.

40) 松本直子、中尾龍馬、武内博朗、花田信弘、泉福英信：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 11；口腔疾患研究に利用できるモデル動物、デタルダイヤモンド. 385: 50 - 54. 2002.

41) 泉福英信、野村義明、武内博朗、花田信弘：バイオテクノロジーを利用した歯科の臨床研究とその応用 12;宇宙環境における口腔感染症の研究、デンタルダイヤモンド. 386: 48 - 51. 2002.

42) 泉福英信、花田信弘: 改定版 病気がわかる本；なぜ、人は虫歯になるのか？Newton 別冊, pp.170 - 175. 2002.

43) 廣瀬健二 江崎孝行. 腸チフス・パラチフス. 病原菌の今日的意味(第３版) 医薬ジャーナル社(大阪) p496-501. 2003.

44) 田村和満、荒川英二、廣瀬健二. 他の腸内細菌による感染症(エンテロバクター、シトロバクター、プロテウス) 新世紀の感染症学(上)ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート、日本臨床６１巻増刊２、390-394.2003.

45) 廣瀬健二 渡辺治雄. キノロン剤. 治療薬マニュアル 2003-2004. p576-582. 文光堂、東京、2003.

46) 高橋英之、渡辺治雄、新世紀の感染症学（下)、細菌の遺伝学、ナイセリア属、髄膜炎菌、日本臨牀 61 増刊号 3、683-688、2003

47) 高橋英之、渡辺治雄、新世紀の感染症学（下)、細菌の遺伝学、ナイセリア属、淋菌、日本臨牀 61 増刊号 3、689-695、2003

48) 山崎利雄、佐藤直樹、山下研也、岡沢 豊、荒木 一、三輪昭成：生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法（第 IV 報）改良した ATP 法と参照法との比較. 臨床病理、51：194-200、2003

49) 山崎利雄：生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性測定. 臨床検査、47：197-199、2003

50) 山崎利雄：山田章雄偏、動物由来感染症-その診断と対策、結核、真興交易（株）医書出版部、東京、169-173、2003

51) 三戸部治郎 渡辺治雄.細菌感染が疑われる原因不明疾患.日本臨床増刊号＜ 新世紀の感染症学（下巻）, vol.61, p285-289,2003.

52) 川端寛樹：ライム病. 理解して実践する感染症診療・投薬ガイド. 綜合臨床増刊. 52, 533-540, 2003.

53) 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄：レプトスピラ症､動物由来感染症―その診断と対策. 227-231. 2003.

54) 塚野尋子、新世紀の感染症学（下)、感染症の遺伝学、エルシニア属のヴィルレンス遺伝子、日本臨床, 61 巻、増刊号 3、709-715、2003。

55) 塚野尋子、理解して実践する感染症診断・投薬ガイド、第Ⅱ部 疾患各論、3.ペスト、綜合臨床、52 巻、増刊号、595-600、2003。

56) 倉 文明：レジオネラ症、理解して実践する感染症診療・投薬ガイド、総合臨床増刊号、1191-1195、2003.

57) 河野喜美子、東 美香、斎藤信弘、鈴木 泉、宮崎県日向保健所、宮崎県福祉保健部、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎：循環式温泉入浴施設を発生源としたレジオネラ症集団感染事例---宮崎県、病原微生物検出情報、24:29-31.2003.

58) 前川純子、倉 文明：レジオネラ症の検査法、

病原微生物検出情報、24:29.2003.

59) 前川純子、倉　文明：レジオネラ症の検査法、LABEAM 15(3):10-11.2003.

学会発表

Ⅰ. 国際学会

1) Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H.: Outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with eating imported oysters in Japan. 37th Joint conference on Cholera and other bacterial enteric infections panel,Okinawa,Dec. 2002.

2) Terajima, J.: Outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with consumption of imported oysters in Japan. 6th annual Enter-net workshop, Bilthoven, Netherlands. Nov., 2002,

3) Iyoda, S., Tamura, K., and Watanabe, H. Serotype of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated in Japan.The 6th annual Enter-Net workshop, Bilthoven, Netherlands, Nov. 2002.

4) Huang, X., Hirose, K., Li, Y., Liu, H., Kawamura, Y., Ezaki, T.Identification of the gene encoding the z66 antigen: phase II flagellin gene, *fljB* of *Salmonella enterica* serovar Typhi.US-Japan Cholera meeting 2002. Naha, 2002.

5) Yanagihara Y, Villanueva SAVM, Dancel LA, Barzaga NG, Masuzaw T, Imai Y, Kawabata H, Koizumi N, and Watanabe H. Leptospirosis investigation in the Philippines. International Leptospirosis Society 3rd Scientific Meeting. Barbados, Oct. 2002.

6) Lawrenz MB, Kawabata H, Norris SJ. Plasmid content determines the ability to transform *Borrelia burgdorferi*. American Society of Microbiology. 102th General meeting. Salt Lake, Utah, USA. May. 2002.

7) Miyake,T. ,Ishikawa, M. ,Naganawa, H. ,Shomura,T. ,Omoto, S. ,Yano, I. ,Hamada, M. and Takeuchi, T. : Caprazamaycins A-F, novel anti-TB antibiotics, from *streptomyces* sp. . The 42th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy , Sandiego, California, USA, September 2002.

8) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H.: Critical role of myeloperoxidase and NADPH oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans,* The 8th MPO Meeting - 2002, October 2002, Miyazaki.

9) Kura, F. and Krause, K. H.: Legionnaires' disease; Involvement of microglia cells in encephalopathy?, Workshop on dysfunctions of host defense -2002, November 2002, Kyoto.

10) Ikebe, T., Miyoshi-Akiyama, T., Wada, A., Kato, H., Inagaki, Y., Sugama, K.,Suzuki, R., Tanaka, D., Tamaru, A., Fujinaga, Y., Abe, Y., Shimizu, Y.,Uchiyama, T. and Watanabe, H. The dissemination of the novel superantigen gene speL in M3/T3 Streptococcus pyogenes isolates in Japan. 6th ASM Conference on Streptococcal Genetics, Asheville .2002.

11) Hotta,K., N. Tsuchizaki, K. Ishino, A. Wada

and Y. Akarawa. Arbekacin, a semisynthetic aminoglycoside, continues to be a good anti-MRSA drug in Japan. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, Ca., USA, 2002.

12) Watanabe,H., Shaikh,N., Nakayama,S. and Terajima,J. Function and gene regulation of effector molecule of *Shigella* invasion. Forum for Infectious Diseases of the 21th Century. Osaka（invited speaker）. 2002.

13) Matsui,T., S. Suzuki, H. Takahashi, J. Kobayashi, T. Ohyama, H. Izumiya, H. Watanabe, H. Kijima, K. Shibata, and N. Okabe. *Salmonella* Enteritidis Outbreak Associated with a School Lunch Dessert – Japan, 2001: Involving Cross-contamination and a Long Incubation Period. EIS. Conference. VDV. Atlanta.2002.

14) Izumiya,H., Hirose,K., And Watanabe,H. Current issues in *Salmonella* and EHEC O157 infections in Japan- a fluoroquinolone resistant *S.* Typhimurium isolate and O157 outbreaks. 5th Annual Enter-net workshop. Greece. 2002.

15) Watanabe,H. E. coli O157: understanding a potentially deadly food-borne diseases. 10th International Congrtess on Infectious Diseases (invited speaker). Singapore. 2002.

16) Kaito,C., Kurokawa,K., Akimitsu,N., Watanabe,H. and Sekimizu,H. Larvae as an Animal Model of Infection with *Staphylococcus aureus*. The 10th Internatinal *Staphylococcus aureus* sympojium. Tsukuba. November .2002.

II．国内学会

1) 寺嶋 淳：2001 年末に輸入カキを原因として発生した赤痢事例について。第 42 回感染性腸炎研究会総会、2003 年 3 月、東京

2) 寺嶋 淳： 病原性大腸菌及び腸管出血性大腸菌 O-157, JICA 第 14 回臨床感染症学研修講義、2003 年 2 月、東京

3) 寺嶋 淳：パルスフィールドゲル電気泳動法に基づく腸管出血性大腸菌の遺伝子型別について。「EGBT(根拠に基づく遺伝子検査）を目指して」文部科学省 平成 14 年度科学研究費補助金基盤研究(C) 主催 公開講演会、2002 年 12 月、東京

4) 寺嶋 淳: 細菌性食中毒における分子生物学。JICA 臨床検査技術研修講義、2002 年 11 月、東京

5) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：腸管出血性大腸菌感染症 --O157 を中心として。第 134 回日本獣医学会学術集会、2002 年 9 月、岐阜

6) 大澤 朗、井口 純、河野潤一、清水 晃、寺嶋 淳、渡辺治雄：連続的継代および長期室温保存による腸管出血性大腸菌 O157 のパルスフィールドゲル電気泳動パターンへの影響。第 134 回日本獣医学会学術集会、2002 年 9 月、岐阜

7) 井口 純、大澤 朗、河野潤一、清水 晃、寺嶋 淳、渡辺治雄：志賀毒素 2 型転換ファージ溶原化による大腸菌 K-12 株の遺伝子型と表現型への影響。第 134 回日本獣医学会学術集会、2002 年 9 月、岐阜

8) 寺嶋 淳：パルスネットジャパンの導入。第 23 回衛生微生物技術協議会、2002 年 7 月、奈良

9) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：パルスネットについて。第 6

回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2002 年 6 月、東京

10) 森屋一雄、増本喜美子、隅元星子、藤原義行、山口博之、寺嶋　淳、田村和満、渡辺治雄：保育園における腸管出血性大腸菌 O121:H19 の集団発生事例について。第 6 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2002 年 6 月、東京

11) 大西　真、黒川　顕、寺嶋　淳、中山恵介、渡辺治雄、林　哲也：全ゲノム PCR スキャニング法を用いた腸管出血性大腸菌 O157:H7 株ゲノムの比較解析。第 6 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2002 年 6 月、東京

12) 井口　純、大澤　朗、河野潤一、清水　晃、寺嶋　淳、渡辺治雄：連続的継代および長期室温保存による腸管出血性大腸菌 O157 のパルスフィールドゲル電気泳動パターンへの影響。第 6 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2002 年 6 月、東京

13) 寺嶋　淳：腸管出血性大腸菌の最近の動向 - O157 を中心として。第 25 回ウォーター研究会、2002 年 6 月、東京

14) 寺嶋　淳:赤痢。第 12 回感染研シンポジウム、2002 年 5 月、東京

15) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2001 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜

16) 山口隆之、寺嶋　淳、林　哲也、小原　勝、小松澤均、渡辺治雄、菅井基行：伝染性膿痂疹患者より分離された黄色ブドウ球菌の分子疫学的解析。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜

17) 大西　真、黒川　顕、寺嶋　淳、中山恵介、村田敬寛、渡辺治雄、林　哲也：Whole genome PCR scanning 法を用いた腸管出血性大腸菌 O157:H7 株ゲノムの比較解析。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜.

18) 三戸部治郎　渡辺治雄. 赤痢菌 *mxi-spa, ipa* 遺伝子の転写調節機構の解析. 2002 年 4 月,第 75 回日本細菌学会総会.横浜.

19) 伊豫田淳、渡辺 治雄：志賀毒素産生性大腸菌 O157 における LEE 遺伝子群の発現を制御する遺伝子の単離と解析、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜

20) 伊豫田淳、渡辺治雄：志賀毒素産生性大腸菌 O157 における LEE 遺伝子群のマスターオペロン *ler* の発現制御機構、第６回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2002 年６月、東京

21) 廣瀬健二　伊藤健一郎　中嶋洋　森屋一雄　倉園貴至　田村和満　渡辺治. Multiplex-PCR を利用したチフス菌・パラチフスＡ菌の同定と PCR-RFLP 法によるニューキノロン低感受性菌のスクリーニング法の検討. 日本細菌学会総会、横浜、2002.

22) 松下　秀　廣瀬健二. 感染症から「２類感染症起因菌の薬剤耐性状況」.衛生微生物協議会、奈良、2002.

23) 泉谷秀昌、田村和満、渡辺治雄：薬剤耐性の疫学「食中毒から」、衛生微生物技術協議会第 23 回研究会、2002 年 7 月、奈良県奈良市。

24) 佐藤恵美子、鎌田真知、堀川栄子、遠藤重喜、釋文雄、阿部憲男、清水博、泉谷秀昌、渡辺治雄：遅延して発症した *Salmonella* Enteritidis による集団食中毒の細菌学的検討、第 57 回国立病院療養所総合医学会、2002 年 10 月、福岡県福岡市。

25) 橋渡佳子、河本秀一、平崎和孝、荻野武雄、泉谷秀昌、渡辺治雄：広島市で分離された特異な

ファージ型を示す *Salmonella* Enteritidis の疫学マーカー解析、第 72 回日本感染症学会西日本地方総会、2002 年 11 月、大分県大分市。

26)小泉信夫，渡辺治雄．2001 年度感染研レプトスピラ抗体検査結果報告．第 51 回日本感染症学会東日本地方会総会．仙台，2002 年

27) 小泉信夫，川端寛樹，渡辺治雄.病原性レプトスピラの新規タンパク質抗原の探索.第 39 回レプトスピラシンポジウム．東京，2002 年

28）小泉信夫，川端寛樹，渡辺治雄．2001-2002 年感染研レプトスピラ抗体検査結果．第 39 回レプトスピラシンポジウム．東京，2002 年

29）増澤俊幸，余勤，角坂照貴，小泉信夫，川端寛樹，後藤郁夫，中村正治，秋山和夫．レプトスピラ保有野鼠の疫学的全国調査-中間報告．第 39 回レプトスピラシンポジウム．東京，2002 年

30）増澤俊幸，橋本直弥，今井康之，角坂照貴，小泉信夫，川端寛樹，中村正治，平良勝也．沖縄由来野鼠より見出されたライム病関連ボレリアの性状と分類．第 39 回レプトスピラシンポジウム．東京，2002 年

31）山崎　剛、山崎利雄、赤川清子、芳賀伸治：BCG の肺局所への接種は結核菌エアロゾル感染防御に有効である、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜

32）山崎利雄、芳賀伸治、佐藤直樹、山下研也、岡沢　豊、三輪昭成、田村俊秀：結核菌のアデノシン三リン酸測定法を用いた多剤併用感受性試験法の検討．　第 77 回日本結核病学会総会、2002 年 4 月、東京

33）山崎　剛、山崎利雄、赤川清子、芳賀伸治：BCG の経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果．　第 77 回日本結核病学会総会､2002 年 4 月、東京

34）山崎利雄、松岡正典、儀同政一、生物発光法による薬剤感受性試験法のらい菌への適用．　第 75 回ハンセン病学会、2002 年 5 月、三島

35）山崎利雄、三輪昭成：生物発光を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法ーマイクロプレート法の検討、第 27 回 結核・非定型抗酸菌症治療研究会、2002 年 6 月、東京

36）山崎利雄：結核菌の新しい検査法、衛生微生物協議会第 23 回研究会、2002 年 7 月、奈良

37）高橋英之、渡辺治雄。髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* のγ-glutamyl aminopeptidase の機能解析。第 75 回日本細菌学会　2002 年 4 月

38）荒川英二　腸炎ビブリオの分子疫学に関する研究，第 29 回日本防菌防黴学会，2002，5 月，東京

39) 荒川英二，田村和満　*Vibrio vulnificus* の細菌学的検査法について，第 23 回衛生微生物技術協議会，2002，7 月，奈良

40）大倉正稔，大澤朗，井口純，荒川英二，渡邊治雄　新興型および旧型腸炎ビブリオ O3:K6 の遺伝子型，第 36 回腸炎ビブリオシンポジウム，2002，11 月，京都

41）鈴木理恵子，沖津忠行，楠本正博，荒川英二，新川隆康　魚介類の腸炎ビブリオおよび *Vibrio vulnificus* 定量調査-培養法と PCR 法による遺伝子検出法との比較，第 36 回腸炎ビブリオシンポジウム，2002，11 月，京都

42）塚野尋子、倉　文明、渡邊治雄：　仮性結核菌感染症における感染防御因子としての NADPH oxidase の役割、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4。横浜。

43）川原一芳、塚野尋子、渡邊治雄、松浦基博：

(2)*Yersinia pestis* リポ多糖リピド A 部分の化学構造と生物活性、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4。

44) 荒谷康昭，倉　文明，渡辺治雄，赤川久義，高野幸枝，鈴木和男，小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能異常，第 75 回日本生化学会大会，2002 年 10 月，京都。

45) 遠藤　良，小野洋一，菅生紀之，倉　文明，Nobuyo Maeda，Mary Dinauer，小山 秀機，荒谷康昭：炎症性腸疾患における好中球由来の活性酸素の関与,第 75 回日本生化学会大会,2002 年 10 月，京都。

46) 道券 秀雄,小山 秀機,倉 文明,Mary Dinauer，Nobuyo Maeda，荒谷 康昭：好中球のアポトーシスにおけるミエロペルオキシダーゼと NADPH オキシダーゼの関与，第 75 回日本生化学会大会，2002 年 10 月，京都。

47) 荒谷康昭，倉　文明，鈴木和男，小山秀機：*Candida albicans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼと NADPH オ キシダーゼの重要性の比較，第回 32 回日本免疫学会総会・学術集会、2002 年 12 月，東京。

48) 前川純子，倉　文明，渡辺治雄：*Legionella dumoffii* の青白色蛍光の解析,第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月，横浜。

49) 大坪栄一、崔　先柱、韓　昌均、 雨村純子、渡辺治雄：大腸菌株の遺伝的再編成による変異の同定と変異の有無による分類と近縁関係の解析。第 25 回日本分子生物学会年会、2002 年。

50) 清水由紀子、前川純子、高橋朋子、渡辺治雄：*L. dumoffii, L. gormanii* の　*katB* 遺伝子の検出とクローニング。第 75　回日本細菌学会総会、2002 年。

51) 池辺忠義，山井志朗，鈴木理恵子，磯部順子，田中大祐，田丸亜貴，片山淳，藤永良博，帆足喜久雄，渡辺治雄．日本における A 群溶血レンサ球菌サーベイランス，1996-2000．日本細菌学会、横浜.2002．

52) 中山周一、久代明＊、田中隆一郎、渡辺治雄．サルモネラ *cpxA* 変異を多コピーで相補する *hilF*、*gdh* 遺伝子の破壊とキャラクタリゼーション、第７５回日本細菌学会総会、２００２年４月、横浜

53) 谷家貴之、三戸部治郎、中山周一、奥田研爾、渡辺治雄．D 群赤痢菌 *S. sonnei* の細胞侵入因子 IpaB 発現に関与するシス領域の解析.第７５回日本細菌学会総会、２００２年４月、横浜

54) 野村義明、西川原総生、泉福英信、花田信弘、口腔内日和見病原菌の検出者率調査、第 76 回日本感染症学会、2002 年 4 月、東京．

55) 西川原総生、野村義明、泉福英信、花田信弘、ミュータンスレンサ球菌の検出者率調査、第 76 回日本感染症学会、2002 年 4 月、東京．

56) 松本直子、MD．A．SALAM、野村義明、花田信弘、泉福英信:　唾液分泌低下マウスを用いた *Streptococcus mutans* による口腔感染のモデル実験系の確立、第 75 回日本細菌学会、2002 年 4 月、東京．

57) 泉福英信、MD．A．SALAM、野村義明、花田信弘、微小重力環境における *Streptococcus mutans* の口腔感染に関する研究、第 75 回日本細菌学会、2002 年 4 月、東京．

58) 西川原総生、野村義明、金子昇、泉福英信、花田信弘:　簡易キットによるう蝕原性菌測定結果の対応、第 75 回日本細菌学会、2002 年 4 月、東京．

59) 津覇雄三、泉福英信、花田信弘、黒崎紀正、

う蝕予防用ワクチンのための Hu-PBL-NOD-Scid mouse を用いたヒト型 PAc peptide 抗体の誘導、第１１６回日本歯科保存学会、2002 年 5 月、東京.

60) 濱田具之、泉福英信、花田信弘、田上順次、*Streptococcus sanguis* 由来ペプチドを用いた歯面への初期付着の解析、第１１６回日本歯科保存学会、2002 年 5 月、東京.

61) 竹原直道、花田信弘、熊谷崇、安細敏弘、安部井寿人、稲葉大輔、宮崎秀夫、豊島義博、野村義明、佐藤　勉、泉福英信、田中宗男、雫石聡、由川英二、口腔保健のための総合的検査項目の検討-歯科医療における臨床検査の使い方-、自由集会, 第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

62) 田中とも子、北田加代美、佐藤　勉、由川英二、泉福英信、花田信弘、3 歳児の口腔における *Streptococcus mutans* の感染状況について、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

63) 金子　昇、泉福英信、花田信弘、宮崎秀夫、80 際高齢者における血漿中抗 PAc(361-386) peptide 抗体価と DMFT との関連、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

64) 安部井寿人、山口幸子、花田信弘、泉福英信、PMTC+3DS によるミュータタンスレンサ球菌除菌の臨床研究、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

65) 山中克之、佐藤拓也、吉居英一、花田信弘、泉福英信、微少重力環境における歯磨剤を使用した口腔バイオフィルムの除去技術の開発　その１、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

66) 泉福英信、山崎統資、山中克之、佐藤拓也、吉居英一、花田信弘、微少重力環境における歯磨剤を使用した口腔バイオフィルムの除去技術の開発　その 2、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

67) 荒川正嘉、石崎　勉、花田信弘、泉福英信、口腔レンサ球菌に対するハイドロキシアパタイトの付着効果に関する研究、第 51 回口腔衛生学会総会、2002 年 9 月、大阪.

68) 津覇雄三、花田信弘、Saiam Mohammed Abdus、泉福英信、ヒト型 PAc peptide 抗体の誘導と DRB1 遺伝子多型性との相関関係、第 44 回日本歯科基礎医学会、2002 年 10 月、東京.

69) Saiam Mohammed Abdus、花田信弘、Khirul Matin、松本直子、津覇雄三、泉福英信、Establishment of E2F-1 deficient NOD mice model for oral disaese、第 44 回日本歯科基礎医学会、2002 年 10 月、東京.

70) 中尾龍馬、天笠光雄、浅野敏彦、花田信弘、本多三男、泉福英信、hu-PBL を移植したマウスの HIV-1 経口感染に対する抵抗性、第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年 11 月、名古屋.

71) 泉福英信、津覇雄三、Saiam Mohammed Abdus、花田信弘、ヒト PAc peptide 抗体の誘導とワクチン感受性の検討、第 32 回日本免疫学会、2002 年 12 月、東京.

72) 泉福英信、渡辺治雄: *Streptococcus sanguis* の唾液成分への結合を制御するペプチドの解析、第 76 回日本細菌学会、2002 年 4 月、熊本.

73) 茂木瑞穂、泉福英信、高木裕三、佐藤勉、花田信弘、寺嶋淳、渡辺治雄: 母子（3 歳児と母親）により分離された *S. mutans* の相関性について、第 76 回日本細菌　　学会、2002 年 4 月、熊本.

74) 渡辺治雄。２１世紀の感染症対策。炭疽菌ボーダーレス時代への対応。第４０回全国大学保健管理研究集会。東京。2002 年 10 月。

75) 渡辺治雄。PFGE 解析の有効利用とネットワークの構築。平成１４年度希少感染症診断技術研修

会。2003 年 2 月
76) 渡辺治雄。感染症法の改正に向けて。第４２回感染性腸炎研究会。2003 年３月
77) 渡辺治雄。耐性菌の現状と問題点。第２回領域横断ワークショップ。日本獣医学会。2003 年３月
78) 北村　勝：ボツリヌス E 型毒素（特に RNA 結合毒素）の分子構造　第 49 回毒素シンポジウム、2003 年 7 月 10 日　岐阜県
79) 廣瀬健二、田村和満、相楽裕子、渡辺治雄．ニューキノロン低感受性チフス菌及び パラチフスＡ菌の日本国内での分離状況．第４２回感染性腸炎研究会総会　東京　2003
80) 足立拓也，三浦健次、相楽裕子、廣瀬健二、渡辺治雄．ニューキノロン高度耐性パラチフス A 菌胆嚢内保菌者の治療例．第４２回感染性腸炎研究会総会　東京　2003
81) 川端寛樹、足立拓也、相楽裕子、渡辺治雄：ライム病の輸入例。第 40 回レプトスピラシンポジウム。2003 年．
82) 川端寛樹、渡辺治雄：ライム病ボレリアの New type-restriction/modification system：遺伝子導入可能な感染性ボレリア作成の可能性について。第 40 回レプトスピラシンポジウム。2003 年．
83) 増沢俊幸、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、後藤郁夫、中村正治：レプトスピラ病疫学調査結果　最終報告。第40回レプトスピラシンポジウム。2003 年．
84) 小泉信夫、星野真酉、谷川力、牧野敬、川端寛樹、黒木俊郎、渡辺治雄：野生動物のレプトスピラ保有状況調査　-東京都内ドブネズミ及びアライグマの場合-。第 40 回レプトスピラシンポジウム。2003 年
85) 山崎　剛，山本三郎，芳賀伸治，ERISA 及び ELISPOT によるモルモット･インターフェロンガンマ検出法の確立,第 78 回日本結核病学会総会,2003，4 月，倉敷
86) Tuyoshi Yamazaki，Makiko Hamatake，Saburou Yamamoto，Mituo Honda，Shinji Haga，IFN-γ ELISPOT assai analysis of the lymphocytes in guinea pigs vaccinated with BCG Tokyo，第 73 回実験結核研究会総会，2003，4 月，倉敷

細菌第一部

5. 細菌第二部

部 長　　荒川 宜親

概　　要

平成14年度の感染研の組織再編に伴い、旧細菌・血液製剤部と旧安全性研究部との間で一部の室の移動が行われ、新たに細菌第二部が発足した。細菌第二部は、第一室（旧抗生物質製剤室）、第二室（旧、安全性研究部無菌性制御室）、第三室（旧細菌製剤第三室）、第四室（旧細菌製剤第一室）、第五室（旧、安全性研究部生物統計室）の5つの室から構成され、抗生物質製剤、DPTワクチン、BCG製剤、精製ツベルクリンなどの力価試験などの品質管理業務（国家検定、国家検査、一斉監視指導収去検査、特別審査、依頼検査など）ならびにそれに必要な標準品の製造を行った。また、ウイルスワクチンを含む生物学的製剤の無菌試験、エンドトキシン試験、生物統計などに従事、協力した。さらに、これれらの生物製剤等の品質の向上に関わる各種の研究業務に従事した。他方、国内的には、抗生物質製剤の管理基準が日本抗生物質医薬品基準から日本薬局方に切り替えられるのに伴い、国立医薬品食品研究所などと協力し、切り替え作業に参加した。さらに、日本薬局方の無菌試験、エンドトキシン試験法などの改定に専門的な視点から協力し注射用水などの改定に支援を行った。他方、国際協力の面では、WHO、JICA、国立国際医療センターの各種海外プロジェクトに協力し、研修生等の受入れや技術研修など支援を行った。

また、細菌第二部への組織再編に伴い、細菌学、細菌感染症学の研究部として細菌の病原性（薬剤耐性を含む）、細菌感染症の病態、細菌感染症の診断・予防・治療など広範にわたる研究が推進された。また、生物学的製剤の品質管理技術の向上を目指して、種々検討や研究が行われた。

品質管理業務及び研究実績の詳細については各製剤担当室毎に後述するが、部として取り組んだ主要な業務や代表的な研究課題などを以下に示す。

1. 厚生労働省による「院内感染対策サ　ベイランス事業」への専門的な視点からの支援
2. 遺伝子組み替え食品の安全性評価に関する研究への協力
3. 特定疾患のIgA腎症と微生物感染症の関連についての研究
4.アジア諸国における細菌ワクチン製剤の品質管理に関する国際共同研究（国立国際医療センターの研究事業費）
5. WHO（WPRO）による細菌製剤の品質管理等に関するコラボレーションセンターとしての協力
6. 新しい結核ワクチンの開発等に関わる研究
7. 輸入鶏肉のVRE付着状況の調査研究

その他、ジフテリア菌、百日咳菌、*Helicobacter pylori*、*Baltonella quintana*、*Hemophilus influenzae*などの病原細菌の病原性や病原因子、検査法などにかかわる様々な研究を行った。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金による諸研究事業に協力し、新興・再興感染症研究事業、医薬安全総合研究事業、ヒトゲノム・再生医療等研究事業、ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント事業、国際医療協力研究委託事業、高度先端医療研究事業、エイズ対策研究事業など各種の研究事業による研究に参加した。また、文部科学研究費補助金による研究等も実施された。

平成14年度には、常勤職員の異動、退職は無かったが、細菌第二部に客員研究員として木ノ本雅通、協力研究員として黒川博史、横山佳子、川端敏之、山本十糸子、大石和恵、高塚尚和、高橋好春、井上雅可、粕谷裕子、久保田眞理美、研究生・実習生として和知野純一、金井京子、児玉温子、三枝智美、猪股夢乃らが在籍し、細菌感染症に関する様々な研究を行った。臨時職員（事務補助、研究補助）として、瀬川晶子、甲斐久美子、南條友子、松村昭子、増田まり子、長岡芳昭、岡宮洋子、井口由美子、豊生幸子、豊泉裕美、片岡紀代（村山分室庶務課在籍）らが在籍し、事務補助、研究補助等に従事した。

研　究　業　績

Ⅰ．抗生物質医薬品の品質管理に関する研究

1. 抗生物質医薬品標準品の日本薬局方微生物学的力価試験での定量法評価に関する研究

日本抗生物質医薬品基準から日本薬局方への完全移行(2003 年 1 月 1 日付)に伴い、日局各条原薬収載の円筒平板法による微生物学的力価試験(Bioassay)に準拠した定量法による標準品力価の評価を行った。今年度末までに 11 品目の評価が完了し新規標準品の交付を開始した。また、日局各条原薬収載の吸光度法に準拠した 1 品目の評価も完了し新規標準品の交付を開始した。[柴田尚宏、加藤はる、南條友子、土井洋平、山根一和、粕谷裕子、近田俊文]

2. 抗生物質医薬品標準品の日本薬局方液体クロマトグラム法での定量法評価に関する研究

日本抗生物質医薬品基準の日本薬局方への完全移行(2003 年 1 月 1 日付)に伴い、日局各条薬収載の液体クロマトグラム法(HPLC)に準拠した定量法による標準品力価の評価を行った。今年度末までに 28 品目の評価が完了し新規標準品の交付を開始した。[山根一和、土井洋平、柴田尚宏、加藤はる、南條友子、粕谷裕子、近田俊文]

3. 抗生物質の微生物学的力価試験法の改良に関する研究

昨年度に改良した方法を用いて標準品作製並びに各種検査(収去検査、依頼検査、特別審査)を行った。その結果、力価試験の再現性が向上した。更に、力価算出については統計学的な検討も加えて行い、試験法改良の基礎的なデータの集積を行った。一方、使用微生物の管理については、凍結乾燥品も製造して菌株交付業務がスムーズに行えるように改良した。[加藤はる、南條友子、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、粕谷裕子、近田俊文]

4. 抗生物質の日本薬局方標準品の整備に関する研究

日本薬局方抗生物質標準品(全 136 品目)のより良い整備を目的に、新規候補品の安定した入手システムの改良(感染研所長名依頼文の改訂)、交付用標準品の小分製品の改良(窒素置換バイアル充填法の採用と改良)、日局収載原薬定量法に準拠した品質評価実施(Bioassay 法、HPLC 法、吸光度法)、標準品の保存法改良(システム的なフリーザー保存管理)、標準品の交付並びに準備状況の把握改善及びメーカーへの照会と回答の連絡手順の整備(検定係との情報交換改善)の各項目について実行あるいはその準備を行った。その結果、かなり整備されたが、よりスムーズに実施できるように更なる改良、改善を行う予定である。[土井洋平、柴田尚宏、加藤はる、山根一和、南條友子、粕谷裕子、近田俊文]

5. 収去検査による抗生物質医薬品の品質管理研究

平成 14 年度の医薬品等一斉監視指導での収去検査は、抗生物質医薬品の経口剤(アムホテリシンB:4ロット、セファトリジンプロピレングリコール:7ロット)ついて力価試験、確認試験(IR 及び NMR 解析)を、注射剤(硫酸ゲンタマイシン:5ロット、塩酸バンコマイシン:3ロット)について力価試験、確認試験(IR 及び NMR 解析)、エンドトキシン試験、無菌試験を行い検査結果を報告した。なお、収去製剤の全ての試験で「適合」と判定された。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、南條友子、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

6. 特別審査による抗生物質医薬品の品質管理研究

(1) 前年度に受け付けた特別審査4件、注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)、アジスロマイシン水和物錠 600mg、ファンガード(ミカファンギンナトリウム)、ストロメクトール錠3(イベルメクチン)について、申請書品質管理試験法の精査後、申請された方法で各試験の確認を行い、総合結果を報告した。ファンガードとストロメクトール錠3は総合的に「適合」と判定された。注射用シナシッドは力価試験(比濁法)、純度試験・類縁物質で「判定保留」あるいは「規格値を満たさない」の結果となったことにより、総合的に試験法の一部変更申請等を行うことを条件にして「条件付き適合」と判定された。アジスロマイシン水和物錠 600mg は定量法試験、含量均一性試験、純度試験及び溶出試験で「規格値を満たさない」あるいは「判定保留」の結果となったこと及び先行認可済の同種製剤と異なる品質管理試験法を規定していること等の理由により、総合的に「判定保留」と判定された。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

(2) 今年度に受け付けた特別審査2件、パッカム(塩酸セフチゾキシムアラピボキシル)、ケテック(テリスロマイシン)について、申請書品質管理試験法の精査後、申請された方法で各試験の確認を行い、総合結果を報告した。両方とも総合的に「適合」と判定された。[近田俊文、土井洋平、山根一和、加藤はる、柴田尚宏、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、血液・安全性研究

部第三室〕

Ⅱ．抗生物質に対する耐性菌の研究及び検査

1．メルカプト酢酸ナトリウムを用いたディスク拡散法と PCR 法による IMP-1 型、IMP-2型、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出、解析

メタロ-β-ラクタマーゼの中でも IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼなどプラスミド性に遺伝子がコードされているタイプは、臨床的に菌種を超えた拡散が問題となる。その迅速検出法として、2-メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸ナトリウムなどチオール化合物を利用したディスク拡散法を用い、全国各地に臨床分離株におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を検出した。さらに IMP-1 型、IMP-2型、VIM-2型特異的プライマーを作製し、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の遺伝子保有状況を調べた。その結果、IMP-1 型は全国的に拡がりを見せているだけでなく、我が国ではまだ稀である、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が一部の地域では院内感染の様相を呈しているケースも認められることが示唆された。また、緑膿菌からだけでなく、新たに *Pseudomonas putida* からも VIM-2型が検出され、今後もブドウ糖非発酵菌や腸内細菌において、こうした耐性菌の監視が必要であると考えられた。〔柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親〕

2．メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌におけるクラス3型インテグラーゼ遺伝子型別の検討

メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子やアミノグリコシド耐性遺伝子、消毒剤耐性遺伝子などには、インテグロン構造に担われ、多剤耐性の一因であることが明らかとなっている。しかし、近年の臨床分離株におけるインテグロン構造の保有状況は不明である。昨年度までに検出した臨床分離グラム陰性桿菌において、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の確定した菌株を用い、インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーによる PCR 法により、遺伝子の保有状況を解析した。その結果、約 290 株のメタロ-β-ラクタマーゼ産生株の殆どはクラス1型インテグラーゼ遺伝子を保有していたが、特定の2施設から分離された4株のみクラス 3 型インテグラーゼ遺伝子を保有していた。菌種は *Pseudomonas putida* であり、クラス 3 型インテグラーゼ遺伝子保有株では、海外でも例がなく、初めての検出であった。検出した1施設の分離株では、パルスフィールドゲル電気泳動による解析により、院内感染が示唆された。このようにプラスミド性メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子が我が国で多く報告され問題となっているが、院内感染も引き起こす可能性もあり、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を検出した場合は、臨床上注意を要すると考えられた。〔柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親〕

3．新規 16S rRNA メチラーゼ MagrB の同定

アミノ配糖体系抗生物質に高度耐性を示す *Serratia marcescens* 臨床分離株より新しい 16S rRNA メチラーゼ MagrB を同定した。MagrB は当室で昨年度 *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株より同定した 16S rRNA メチラーゼ MagrA とアミノ酸配列で 82%一致した。さらに機能解析により MagrB が実際に 16S rRNA をメチル化しアミノ配糖体系抗生物質に高度耐性を付与していることが明らかになった。腸内細菌科の細菌に同種のタンパク質が存在することが示されたのは今回が初めてである。〔土井洋平、山根一和、荒川宜親〕

4．大腸菌臨床分離株が産生する阻害剤感受性 AmpC β-ラクタマーゼの解析

大腸菌が生来産生する AmpC β-ラクタマーゼは一般に β-ラクタマーゼ阻害剤に耐性を示すことが知られている。今回、阻害剤感受性の大腸菌臨床分離株を入手したのでその AmpC をクローニングしたところ、阻害剤感受性の表現型を示した。この AmpC は通常の AmpC と比較し H-10 ヘリックスに 3 アミノ酸の欠失を有しており、変異導入実験によりこの欠失が阻害剤感受性を惹起していることが確認された。現在基質拡張型 β-ラクタマーゼ（ESBL）のスクリーニングには阻害剤への感受性が利用されているが、阻害剤感受性 AmpC は ESBL と誤判定される可能性があるため、現在さらに検討中である。〔土井洋平、山根一和、荒川宜親〕

5．アルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *mgarA* の周辺領域の遺伝子配列の解析

臨床分離されたアルベカシン（ABK）高度耐性緑膿菌（AR-2株）の保有する *mgarA* の周辺領域の遺伝子配列を調べた。*magrA* とその周辺構造は水銀耐性遺伝子群を保有する

Tn5041 に挿入される形で存在した。両端には Tn5041 内に存在する IS 様の構造である κγ element が存在し、トランスポゼース様の配列をもち、magrA とその周辺構造はトランスポゾン類似の構造をしていることが判明した。magrA の周辺構造の塩基配列は臨床で問題となる病原菌と相同性は低く、環境中の細菌と比較的相同性を持っており緑膿菌が環境中の細菌からこの遺伝子を獲得した可能性が示唆された。［山根一和、土井洋平、横山佳子、荒川宜親］

6. アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析

臨床分離されたアルベカシン（ABK）高度耐性緑膿菌（AR-2 株）の耐性機構について、昨年クローニングした ABK 耐性遺伝子の産物（MagrA）が、16S rRNA メチル化酵素としての機能を有するかどうかを検討した。酵素反応を行うため、magrA 遺伝子を保有した緑膿菌クローンの菌体から粗酵素抽出液を得た。またアイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とし、緑膿菌 PAO1 からリボソームの 30S サブユニットを抽出し、反応基質とした。以上を用いて酵素反応を行った結果、放射活性の取りこみが認められ、MagrA は 16S rRNA メチル化酵素であることが強く示唆された。［横山佳子、土井洋平、山根一和、荒川宜親］

7. 臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の依頼検査

臨床分離株の薬剤耐性遺伝子検査依頼があり、主に PCR 検査を中心としておこなった。総数は、全国約 50 施設より約 550 件であった。菌種は大腸菌、クレブシエラ、セラチアなど腸内細菌群、緑膿菌、アシネトバクターなどブドウ糖非発酵菌群は、ESBL（基質拡張型β-ラクタマーゼ）産生菌やメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出を、腸球菌などは VRE を対象として、主に Van 遺伝子検出を行った。特に大腸菌、クレブシエラなどでは、CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ産生菌が多く検出されていた。メタロ-β-ラクタマーゼ産生株は殆どが IMP-1 型であったが、稀ではあるが VIM-2 型も新たな施設で検出され、こうした耐性菌の拡散防止に努めることが必要と考えられた。［柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親］

8. バンコマイシン耐性腸球菌の院内集団発生事例の検査

バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の院内集団発生事例について、感染症症例、キャリア、および病院環境から分離された VRE 菌株約 120 株について、同定、耐性遺伝子の検討、biotyping を行った。［加藤はる、山根一和、土井洋平、甲斐久美子、荒川宜親］

III．院内感染対策サーベイランスシステム構築に関する業務

昨年と同様に、院内感染対策サーベイランス事業における、現在検査部門、集中治療部門、全入院部門の３部門についてデータを参加施設から収集し解析を行った上で感染症情報センターのホームページ上（http://idsc.nih.go.jp/index-j.html）にデータの還元を行った。［山根一和、荒川宜親］

IV．*Clostridium difficile* に関する研究及び検査

１．Toxin A 陰性 toxin B 陽性(A-B+)*Clostridium difficile* の日本の病院における臨床分離についての検討

Toxin A 陰性 toxin B 陽性(A-B+)C. *difficile* が、ヒト消化管において toxin A 陽性 toxin B 陽性(A+B+)株と同様に消化管感染症を引き起こす可能性が最近報告され始めた。日本の複数の病院における分離株を見当したところ、A-B+株の臨床分離が稀ではないことがわかった。さらに 2 病院においては、A-B+株の分離頻度が高く、PCR ribotyping およびパルスフィールド電気泳動による検討から同一クローンの院内集団発生であったことが明らかとなった。さらに、院内集団発生の流行株となった A-B+株に特徴はないか検討した。［加藤はる、小松方（天理よろず相談所病院）、佐藤洋子（千葉県立がんセンター）］

２．*Clostridium difficile* の院内集団発生事例の調査及び検査

Clostridium difficile の院内集団発生事例について、主に無症候キャリアの調査を行った。院内感染の中心とな

ったと考えられた病棟の入院患者、入院歴のある患者から採取した約 100 検体の糞便検体について、細胞培養および酵素免疫法による検体中の毒素検出、C. *difficile*、*Clostridium perfringens* およびメチシリン耐性ブドウ球菌の分離培養、さらに分離菌株の毒素産生性の検討とタイピングを行った。［加藤はる、山根一和、甲斐久美子、柴山恵吾、新谷美春、沼田昇（仙台市衛生研究所）、荒川宜親］

３．*Clostridium difficile* の院内感染を疑わせる事例への指導

問い合わせのあった病院における *Clostridium difficile* の院内感染を疑わせる事例について、菌株の解析、分離培養の指導、院内感染対策に関する指導、を行った。［加藤はる］

Ⅴ．マイコプラズマに関する研究

１．全ゲノム配列から予測される *Mycoplasma penetrans* の特徴と感染因子

重度の呼吸器窮迫を呈した *Mycoplasma penetrans* 感染症患者の気道吸引液より分離された HF-2 株の全ゲノム配列を決定したことにより、予測される代謝経路ならびにヒトへの感染因子を、昨年度に引き続き解析した。これまでに全ゲノムが解析された他のマイコプラズマ属の種と比較して得られる *M. penetrans* の特徴は、以下のようであった。1）ピリミジン代謝に必須と考えられていた酵素の遺伝子を欠いている、2）Arginine dihydrolase Orotate 経路による ATP 産生が可能である、3）マイコプラズマ属ではじめて見つかった two-component system とみられる遺伝子セットを持つ、4）ヒトへの感染に関わる因子として接着器官の細胞骨格を形成する蛋白（*M. pneumoniae* の HMW2 のオーソログ）、溶血素、抗活性酸素物質、膜表面の抗原変異を担うリポ蛋白 P35 群（44 遺伝子より構成される）等が予測された。系統解析で近縁なニューモニエグループの中でも *M. penetrans* の比較的大きなゲノムには、*M. pneumoniae, M. genitalium* や *Ureaplasma urealyticum* など小型ゲノムを有する種には無い特徴が認められ、一般細菌と共通の祖先である大きなゲノムサイズを持つ種の特徴を、残していると考えられた。今後、予測されたヒトへの感染因子の同定が必要である。

［佐々木裕子、石川 淳[1]、山下敦士[2]、大島健志朗[2]、見理 剛、古谷恵子[2]、吉野智絵[2]、堀野敦子、柴 忠義[2]、佐々木次雄、服部正平[2,3]（[1]生物活性物質部、[2]北里、理学部、[3]理化学研究所、ゲノム総合研究センター）］

２．特定疾患の成立あるいは病状悪化へのマイコプラズマ感染の関与についての検討

ギラン、バレー症候群（GBS）の中の脱髄型 GBS と細菌感染の関連が示唆されている。*Mycoplasma pneumoniae* 感染後 GBS 患者では、血清中に各種糖脂質すなわち、抗ガラクトセレブロシド（GalC）や抗 GM1 抗体が存在し、これらの抗体が、ヒト末梢神経の髄鞘に存在する GalC 等糖脂質を損傷するのではないかと考えられている。我々は、*M. pneumoniae* 以外のマイコプラズマ感染が GBS の先行感染になっている可能性を考え、感染を調べる為に、GBS 患者血清中の *M. pneumoniae*、*M. fermentans* ならびに *M. penetrans* に対する抗体価を ELISA 法で測定した。結果は、抗 *M. pneumoniae*-IgG 抗体陽性 1.7%、同 IgM 抗体陽性 6%で、両陽性 1.7%が非 GBS 患者群の 0%と比べて高く、*M. pneumoniae* 感染との関連が示唆された。抗 *M. fermentans*-IgG 抗体については、低い率で陽性者はいたものの、非 GBS 患者群との大きな違いは無かった。GBS の一亜型であるフィッシャー症候群の中に IgG 抗体陽性者は居なかった。抗 *M. penetrans* 抗体は、全員陰性であった。

［佐々木裕子、荒川宜親（細菌・血液製剤部）、古賀道昭、結城伸泰（獨協医科大・神経内科）］

３．*Mycoplasma penetrans* への遺伝子導入法の検討

M. penetrans は昨年、我々のグループによって全ゲノム配列の解析が終了し、その情報を利用して次の研究を進める段階に入っている。今後 *M. penetrans* の病原性や遺伝学的な検討を行う上で、*M. penetrans* の遺伝子操作法が必要な手段となる。しかし、*M. penetrans* ではプラスミドの存在も知られておらず、現時点では遺伝子導入などの操作は成功していない。Mycoplasma 属においては、全般的に遺伝子操作が困難であるが、近年、いくつかの種では、transposon を利用した遺伝子導入が可能になっている。そこで、今回我々は、*M. penetrans* に対して transposon を利用した遺伝子導入法の検討を行った。

M. pneumoniae, M. genitalium 等の種で現在有効に利用

されている transposon Tn*4001* を *M. penetrans* に試したところ、Tn*4001* をそのまま *M. penetrans* に導入することはできなかった。原因として、1) *M. penetrans* では Tn*4001* 上の薬剤耐性遺伝子が働かない可能性、2) *M. penetrans* では Tn*4001* 上の transposase が働かない可能性などが考えられた。このため、Tn*4001* の耐性遺伝子、並びに transposase 遺伝子のプロモーターを *M. penetrans* のプロモーターに置き換えた組換え Tn*4001* を構築し、現在、検討を継続中である。また、最近、*ori*C plasmid による相同組み換えの成功例が *M. pulmonis* で報告されたことから、この方法による遺伝子導入法も検討中である。
［堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄］

４．GFP を使用した *M. pneumoniae* の接着器官観察の検討

M. pneumoniae は、菌体の一端に存在する接着器官（attachment organelle）によってヒトの気道粘膜上皮細胞に接着し、肺炎や気管支炎を起こす。この *M. pneumoniae* の細胞接着の過程をさらに詳しく理解するために、*M. pneumoniae* 生細胞の接着器官を GFP (green fluorescent protein) を使用して観察する検討を行った。接着器官は多数のタンパク質が集合して形成されているが、今回はその構成タンパク質の一である P65 を GFP の誘導体である EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) で標識した。P65 と EYFP の遺伝子を連結して、トランスポゾン Tn*4001* によって *M. pneumoniae* に導入すると、発現した EYFP-P65 タンパク質は蛍光顕微鏡によって接着器官に強く局在していることが観察できた。この方法で、生きた *M. pneumoniae* の接着器官を直接観察することが可能になった。この系を利用して、滑走運動する *M. pneumoniae* 細胞の接着器官の観察や、接着変異株における、P65 タンパク質の局在性についての検討をおこなった。
［見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、瀬戸真太郎（大阪市大・院理）、宮田真人（大阪市大・院理）

５．マイコプラズマ肺炎の迅速早期診断法の開発研究

マイコプラズマ肺炎にはβ－ラクタム剤が無効であり、適切な薬剤を選択し治療に反映するためにも、簡便な早期確定診断法が望まれている。しかし、マイコプラズマ肺炎の早期確定診断は現在も容易ではない。早期診断法としては、IgM 抗体を検出する方法や PCR 法があげられるが、感度や特異性あるいはコスト面での問題点も残されている。我々はこれらの方法に加えて、*M. pneumoniae* の抗原を特異的、高感度に検出する方法を検討している。この目的で昨年作製した抗 *M. pneumoniae* 抗原モノクローナル抗体を使用して特異検出系の検討を行った。
［見理 剛、富山哲雄（富山研究所）］

６．薬剤耐性肺炎マイコプラズマに関する研究

マクロライド系抗生物質に対する *M. pneumoniae* の薬剤耐性機構獲得には、23S rRNA の 2063 又は 2064 の A が G か C に点変異がある。これまで患者から分離された耐性菌は全て A2063G であったが A2063C も今年度分離された。低度の薬剤耐性を示す分離菌の中には、23S rRNA の第5ドメインに点変異を起こしていないものもあり、他の領域で変異を引き起こしている可能性もある。また近年、薬剤耐性 *M. pneumoniae* が増えつつあるので、早期診断法の確立とともに薬剤投与についても見直しが必要かも知れない。
[佐々木次雄、成田光生（札幌病院）、岡崎則男（神奈川県衛生研究所）、見理剛、荒川宜親]

VI. *Haemophilus influenzae* に関する研究

１．*H. influenzae* の産生するβ-ラクタマーゼの PCR による型別

前年度にβ-ラクタマーゼ活性陽性株についてβ-ラクタマーゼ遺伝子型別を行った。今年度はβ-ラクタマーゼ活性陰性株についても PCR を行い、526bp（TEM 型）或いは 692bp（ROB 型）付近にバンドの出た株についてさらにサザンハイブリダイゼーションを行って確認したところハイブリダイズしたバンドはなかった。β-ラクタマーゼに関して表現型と遺伝子型とは一致していた。［川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親］

２．*H. influenzae* 臨床分離株の薬剤感受性

H. influenzae 臨床分離株（主に呼吸器由来）を用いて薬剤感受性の分布を調べた。ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, aztreonam, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, cefaclor,

cefpodoxime, ceftazidime, cefditoren, cefcapen, azithromycin, clarithromycin, chloramphenicol, levofloxacin の 16 薬剤(各 6 濃度)を含むﾄﾞﾗｲﾌﾟﾚｰﾄを用い微量液体希釈法を用いた。596 株で MIC が得られた。aztreonam, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefditoren, cefcapen, azithromycin, levofloxacin に対しては殆どの株が感受性であった。ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefaclor, clarithromycin, chloramphenicol に対してはそれぞれ 14.7、7.0、17.0、1.0、3.5%の株が耐性であった。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

３．*H. influenzae* 臨床分離株のアンピシリン耐性の解析

596 株のうち 29 株(4.9%)が BLNAR(ampicillin の MIC を 4 μg/ml 以上とする)であった。市販ｷｯﾄ(ｲﾝﾌﾙｴﾝｻﾞ菌遺伝子検出試薬、湧永製薬)を用いてβ-ラクタマーゼ産生株について PBP3 変異を調べたところ BLPACR(β-ラクタマーゼ産生かつ PBP3 変異)も 15 株(2.5%)検出された。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

４．ｷﾉﾛﾝ低感受性 *H. influenzae* の解析

596 株のうち 3 株のキノロン低感受性株が見つかり、*gyrA,, parC, gyrB, parE* の QRDR の塩基配列を調べたところ 2 株では GyrA と ParC の 1 箇所ずつに、他の 1 株では GyrA の 1 箇所のみにアミノ酸変異が見られた。前年度に調べたキノロン耐性株(4 株)に比べ変異箇所は少なく、耐性の程度と平行していた。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

５．外膜蛋白(outer membrane proteins, OMP)の解析

病原因子のひとつであり、variation があるため疫学マーカーとしても利用し得る OMP の単離、SDS-PAGE によるﾌﾟﾛﾌｧｲﾙ解析を行った。Carlone 等(1986)の迅速微量調製法(rapid outer menbrane protein [ROMP] procedure) に従って OMP を調製した。Nontypeable 株間では biotype が同じでもパターンが異なった。莢膜保有株では biotype が違っても serotype が同じだとパターンは似ていた。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

６．PRP 定量法の検討

PRP の定量法について免疫化学的方法(ｻﾝﾄﾞｲｯﾁ ELISA)と化学的方法(構成成分であるﾘﾝの比色定量)を検討した。ｻﾝﾄﾞｲｯﾁ ELISA については捕捉抗体にまだ問題があることがわかった。ﾘﾝの比色定量については Hib conjugate ﾜｸﾁﾝを検体として前処理(過塩素酸ー硫酸混液を用いる湿式灰化)により完全に酸化分解して無機ﾘﾝとして定量し、PRP 量に換算した。[新谷三春、川端敏之、矢野茂生(血液･安全性研究部)、佐々木次雄、荒川宜親]

７．Hib conjugate ﾜｸﾁﾝ同定法の検討

Hib conjugate ﾜｸﾁﾝ同定法として PRP 及びｷｬﾘｱｰ蛋白である破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞとそれぞれに対する特異抗体との反応によりﾘ沈降線を作らせるオクタロニー法を検討した。破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞについては明瞭な沈降線が得られたが、PRP については明瞭な沈降線が得られず、さらに検討が必要である。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

Ⅶ. バルトネラ感染症に関する研究

１．路上生活者における *Bartonella quintana* 感染の疫学調査

前年度に引き続き、東京都豊島区の路上生活者対策において、コロモジラミ症及びバルﾄﾈﾗ感染症の疫学調査を国立感染症研究所、豊島区池袋保健所、豊島区中央保健福祉センターの共同研究として 2 回行った。ｲﾝﾌｫｰﾑﾄﾞｺﾝｾﾝﾄを十分行った上で採血し、血液からの *B. quintana* DNA 検出、血清抗体価及びｲﾑﾉﾌﾞﾛｯﾃｨﾝｸﾞで抗体パターンを調べた。計 146 人の受診者中、コロモジラミ寄生者は 6 名(4.1%)、コロモジラミ中から *B. quintana* DNA 検出者はなく、血液中からの *B. quintana* DNA 検出者は 7 名(4.8%)、IgG 抗体価(IFA>128)は 56 名(38.3%)であった。血清抗体価は特異性がなく、実験室診断法としては、現在のところ血液からの *B. quintana* DNA 検出が感染傍証にはなる。しかし、臨床所見との相関性がなく、更なる検討が必要である。

[佐々木次雄、関なおみ(豊島区池袋保健所)、佐々木年則、小林睦生、荒川宜親]

Ⅷ. 行政科学に関する研究

1. 国際規格の作成

ISO/TC198（ヘルスケア製品の滅菌及び無菌性保証に関する技術委員会）の WG9（無菌操作法）で、定置洗浄（CIP）、定置滅菌（SIP）、凍結乾燥、アイソレータに関する国際規格の作成に従事した。
[佐々木次雄]

2. 日本薬局方活動

日本薬局方調査会「生物試験法委員会」で、無菌試験法の国際調和及び日局無菌試験法の改正作業、保存効力試験法の改正作業、遺伝子解析による微生物の迅速同定法のドラフト作成を担当した。その他、エンドトキシン試験法の一部改正作業、発熱試験法の改正作業の審議に参加した。
[佐々木次雄

IX．ジフテリアに関する研究

1. ジフテリア菌新規抗原遺伝子"1-1 ORF2 蛋白質"の一次構造の解析

ジフテリア菌ワクチン株 PW8 から見出された分子量約 26kDa の新規抗原蛋白質("1-1 ORF2")の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列からその構造を推定した。この蛋白質は N 末端側に典型的な分泌シグナル配列と C 末端側に膜貫通部分を持つ膜蛋白質であり、他のジフテリア菌菌株から単離された相同遺伝子との比較により、中央部分に抗原性を有すると予想された。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

2. ジフテリア菌新規抗原遺伝子"1-1 ORF2 蛋白質"の多様性

新規抗原蛋白質"1-1 ORF2"遺伝子の相同遺伝子は、ワクチン株 PW8 だけでなく 10 株のジフテリア菌臨床分離株（東京都衛生研究所より分与）にも存在したがその大きさが互いに異なっていた（昨年度年報）。これらの相同遺伝子の塩基配列を決定したところ、遺伝子間の相違は ORF の中央部分で大きく、両端部分は相同性が高いことが判明した。推定アミノ酸配列の解析により、いくつかの菌株では"1-1 ORF2 蛋白質"の中央部分にプロリンに富む高度反復配列が存在することが明らかになった。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

3. ジフテリア菌に広く存在する新規抗原の探索

ジフテリアの血清診断のためには、ジフテリア菌に広く存在し、他の菌には存在しない新規抗原を見出すことが重要である。しかし、"1-1 ORF2 蛋白質"は、由来する菌株によって抗原性が異なると予想されるためこの目的には適していない。そこで、診断ツールとして応用可能な新たな抗原蛋白質の探索を開始した。"1-1 ORF2 蛋白質"以外の新規抗原蛋白質の遺伝子を含むジフテリア菌染色体 DNA 断片を遺伝子ライブラリーから選び、その塩基配列から抗原遺伝子の ORF7 種を新たに推定した。それらがジフテリア菌臨床分離株に広く存在するかどうかを、臨床分離株 10 菌株の総 DNA を鋳型とした PCR で調べたところ、"10-1 ORFN3F"、"10-1 ORFN6R"の 2 種の ORF は中それぞれ 9 菌株、8 菌株から検出され、*C. diphtheriae* 以外のコリネバクテリウム属 10 菌種の DNA を鋳型とした PCR では検出されなかった。ジフテリア菌特異的と考えられるこれらの ORF がコードする蛋白質の診断への応用が期待される。
[猪股夢乃、三枝智美、岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

4. ヒト細胞に対する付着能を指標にしたジフテリア菌付着因子の遺伝子クローニングの試み

ジフテリア菌の感染初期に必須と考えられる宿主細胞への付着の機構は、防圧の戦略を考える上で重要であるにもかかわらずほとんど知見がない。我々は、株化ヒト頬粘膜上皮細胞 HO-1-N-1 に付着することがわかっているジフテリア菌 C7 株(毒素非産生)のコスミドライブラリーを大腸菌 VCS257 株を用いて作成し HO-1-N-1 細胞に加えて、付着するクローンを回収しまた細胞に加えるというサイクルを繰り返すことにより、高い細胞付着能を持つクローンを複数得ることができた。これらのクローンの性質について解析中である。[三枝智美、猪股夢乃、岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

5. 遺伝子組換え作物の安全性に関する研究：遺伝子組換え作

物の安全性に関する研究

遺伝子組換え作物の作出時にマーカーとして用いられるカナマイシン耐性遺伝子*nptII*が、自然形質転換能を持つ細菌を形質転換して薬剤耐性を与えうるかどうかを調べる目的で研究を行なっている。前年度までに*Acinetobacter* sp. BD413 株の高頻度自然形質転換系を構築し、本年度は、*nptII*遺伝子をマーカーとして持つ遺伝子組換えジャガイモとパパイヤ由来DNAによる形質転換を試みた。遺伝子組換え*Acinetobacter* sp. BD413 株に、フレームシフト変異により不活化した*nptII*遺伝子を持つプラスミドpKT230neoKm^{S}を保持させ、組換え植物DNAによる自然形質転換を試みたところ、最大でも 30/μgDNAの低頻度ではあるが、形質転換体を得ることができた。しかしこれらの実験は高頻度の自然形質転換のために最適化された受容菌を用い実験室内の条件下で行なわれたものであり、自然界での条件を完全に反映したものではない。実際に、最適化されていない*Acinetobacter* sp.を用いた実験では形質転換頻度はその 3×10^{5}分の 1 であった。組換え植物にマーカーとして用いられるKm耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。[岩城正昭、荒川宜親]

6. 平成 13 年と 14 年に千葉県旭市でジフテリア毒素産生性*Corynebacterium ulcerans*によるジフテリア症患者が2名発生した。この菌の国内分布状況の調査と実験室内診断法（現行のジフテリア検査法使用）の妥当性を調べるため、昨年度に引き続き検討を行った。平成 14 年4月～平成 15 年 3 月に、ヒト、イヌ、ネコ、ウシの鼻腔及び咽頭スワブ総計 261 検体とイヌ、ネコの血清総計 270 検体を検査した。更に平成 15 年 2 月～3 月に、千葉県獣医師会の山武、海匝、香取支部地域のネコ鼻腔及び咽頭スワブ 207 検体と血清 200 検体を検査した。合計 468 検体のスワブからコリネバクテリウム属 13 種 76 菌株、その他のグラム陽性桿菌 11 種 43 菌株が分離された。コリネバクテリウム属の中で、千葉県動物病院の1匹のネコ鼻腔スワブからジフテリア毒素原性陰性の *C. ulcerans* が 1 株検出された。その他、今回分離された全菌株も、ジフテリア毒素原性は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は 470 検体全て検出レベル以下であった。以上の結果より、現行法は *C. ulcerans* の診断に有効と思われるが、今回の検体からはジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* は検出されなかった。[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀、千葉、秋田、大分、福岡の各衛生研究所、旭中央病院、千葉県動物愛護センター、海浜動物医療センター]

Ｘ．破傷風に関する研究

1. 破傷風モノクローナル抗体による破傷風トキソイド抗原の評価

ウェスタンブロッティング法により、異なる抗原認識部位を持つ 6 種類の破傷風モノクローナル抗体を用い、破傷風トキソイド抗原の評価を試みた。その結果、これらのモノクローナル抗体とトキソイドにより得られたバンド像では、使用するモノクローナル抗体により濃淡の差は認められたが、大きく異なっていなかった。そこで、今回使用したモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、破傷風トキソイド抗原を評価できないと考えられた。[福田靖、岩城正昭、高橋元秀]

．抗毒素に関する研究

1. まむし毒素の投与経路（静脈内と腹腔内）によるマウスに対する致死毒性の予備検討

マウスを用いたまむし抗毒素の抗致死価の測定方法は、日本では静脈内投与法であるが、中国と韓国では腹腔内投与法である。そこで、投与経路によるマウスに対する致死毒性の違いを検討するために、日本のまむし試験毒素（Lot 4）を用いて予備的な検討を実施した結果、静脈内投与では、腹腔内投与に比較して、毒素はマウスに対し 1　1.5 倍高い致死活性を示した。今度、さらに厳密に致死活性の違いを測定するとともに、各国に生息するマムシが産生するそれぞれのまむし毒素で同様な試験を実施する。[福田　靖、高橋元秀]

2. 国内でバイオテロなどにより大量に必要となり、将来、枯渇が予想されるボツリヌスウマ抗毒素製剤の緊急対応策として、国内需給体制の再構築が必要となった。昨年度までに海外の抗毒素製剤の品質管理、需給体制を調査して得た実績を基に、本研究班で得られた成績では中国製のボツリヌス抗毒素の品質は国内製剤に劣らないことが確認できたため、緊急対策用として各型（A,B,E 及び F 型）のウマ免疫血清を酵素処理、部分精製した原液を輸入し、国内の抗毒素を永続的に確保することを目的として

検討した。具体的には、中国蘭州研究所への委託製造としてボツリヌス抗毒素の製造用の原血清製造を2年間で完了し、国内の唯一の抗毒素製造所（化血研）で約 250 本の ABEF 型多価ウマ抗毒素を最終製剤として完成させた。製剤の品質管理試験は、現行のボツリヌスウマ抗毒素の生物学的製剤基準の試験項目について実施し、各試験成績は問題のないことが確認されている。[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、小宮貴子、中国蘭州生物製品研究所、（財）化学及血清療法研究所、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

3．わが国ではガス壊疽抗毒素を現在もなお国家事業として生産・備蓄しており、毎年ほぼ一定量（約200本）のガス壊疽抗毒素が臨床現場からの要請に従って供給されている。このガス壊疽抗毒素がわが国で現在どのように利用されているかについて明らかにするために、ガス壊疽抗毒素を実際に使用した医療機関を対象にアンケート調査を行なった。その結果、非クロストリディウム性ガス壊疽患者の治療に利用されている例が約半数に上ることが明らかになった。ガス壊疽抗毒素の医療現場での使用が適正に使用されていないことが判明した。本製剤の約半分が適応疾患の誤認により使用されているため、国家備蓄品である本製剤の出庫要請時の内容確認、製剤の使用書への追加説明、医療現場への本疾患の治療方法の啓蒙等について適切且つ具体的な施策が必要である。
[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、杉本 央 大阪大学大学院、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

4．海外の抗毒素製剤に関する情報のデータベース化のために、WHO より入手した「International List on Availability of Vaccine and Sera」（1999）に基づいた海外の抗毒素製剤情報及び国内で製造されている抗毒素製剤情報について、製造している海外企業名、連絡先等を再調査し、可能だけ新しいデータベースに修正した。整理した情報は CD に焼き付けて関係機関に配布すると伴に情報の提供依頼があった場合には CD を分与できる体制が整った。 [桑原 靖、高橋元秀、細菌製剤協会、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

．BCG・ツベルクリン及び結核免疫に関する研究

1．BCG 経鼻投与モルモットの抗結核作用に及ぼす CpG DNA の免疫アジュバント効果

細菌 DNA や CpG DNA が感染症・癌・アレルギーに対する治療効果やワクチンのアジュバント効果を有することが報告されている。そこで結核ワクチンである BCG の免疫誘導における CpG DNA のアジュバント効果を結核感受性の高いモルモットを用いて検討した。有効配列として AACGTT を含む 30 塩基鎖長 CpG DNA を BCG とともにモルモットに経鼻投与し、8 週後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv を噴霧感染した。BCG＋CpG DNA を経鼻投与した場合、脾臓・肺臓の臓器内菌数は BCG のみ投与に比べ減少が認められた。
〔山本十糸子、山本三郎、David N. McMurray (Texas A&M 大学)〕

2．結核菌噴霧感染モルモットのサイトカイン産生と BCG 免疫の影響

モルモットは結核菌に対する感受性や遅延型アレルギー反応などがヒトと類似であるため結核のモデル動物として適している。今回は BCG で免疫したモルモットの感染初期の結核抵抗性を解明するため、結核菌噴霧感染 5 週後のモルモットから脾細胞、BAL 細胞、腹腔細胞をとりだし、抗原特異的な *in vitro* TNF-α産生を検討した。その結果、結核菌感染モルモットでは非常に高いレベルの TNF-α産生が認められたが、BCG 免疫モルモットの TNF-α産生は非感染モルモットと同レベルに低下した。BCG による免疫は菌の増殖を抑えるばかりでなく TNF-α の過剰産生を調節することが示唆された。〔山本十糸子、山本三郎、David N. McMurray (Texas A&M 大学)〕

3．BCG ワクチンの多様性に関する研究

（1）ATCC-ブラジル株に関する研究
BCG はフランス・パスツール研究所から世界各国に分与され、それぞれの分与先で継代培養を続けるうちに多くの BCG 亜株が派生し今日に至っている。近年、結核菌の全塩基配列が解明され、結核菌と BCG の遺伝子の比較から、BCG の欠損領域が明らかとなりつつある。BCG 亜株間で違いが見られる領域のうち、RD2 には *mpb64* 遺伝子などが含まれる。RD2 は初期に分与されたブラジル株、ロシア株、日本株には存在するが、後期に分与された Connnaught 株、Pasteur 株などには存在しない。RD8 は Frappier 株及

びそれに由来する Connnaught 株では欠損している。RD14 は Pasteur 株でのみ欠損している。RD16 はブラジル株で欠損する以外の全ての株に存在し、401bp の PCR 産物が認められる。日本株では 401bp のほか 379bp の産物も認められる。今回、ATCC-ブラジル株について MPB64 のタンパク発現をキャピリア TB で、RD16 を PCR で調べたところ、MPB64 の産生は認められず、RD16 欠損がないことが確認された。感染研及び結核研保有のブラジル株では、MPB64 は産生されず、RD16 は欠損していた。これらの結果はこの ATCC 株がブラジル株とは異なることを強く示唆している。[山本三郎、瀧井猛将、小野崎菊夫（名市大）、高橋光良（結核研）]

（2）日本株 BCG ワクチンに関する研究

日本株 BCG ワクチンの RD16 部位に変異が存在することが報告されている。この遺伝子変異を検定に合格した製品 12 ロットについて調べた結果、ほとんどのロットで変異株優位であるが、変異株/非変異株の存在比に差が認められた。これまでの力価検定では存在比の違いによる力価の差異は認められないが、製品の品質管理上、存在比率のバラツキを明らかにする必要があると考え、両株の分離、精製、判別のための定量法の開発を行った。本年度は両株の分離、株の質的安定性の確認を行った。 [持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、山本三郎]

4. 北西太平洋に棲息する鯨類の抗酸菌症・ブルセラ症に関する研究

海棲哺乳動物の大量死やストランディングの報告あるいは野生生物のヒトや家畜に与える影響などから、海棲哺乳動物を含む感染症研究の重要性が指摘されている。試料は 2000 年の北西太平洋調査捕鯨で捕獲したミンククジラ 40 頭、ニタリクジラ 43 頭、マッコウクジラ 5 頭ならびに 2000/2001 年の南極海鯨類捕獲調査において捕獲したクロミンククジラ 440 頭を対象とした。その結果、ミンククジラの 35%、ニタリクジラの 5%の生殖器に抗酸菌あるいはブルセラ菌に特徴的な乾酪化、石灰化病変や間質の繊維化、肉芽腫病変が種々の程度に観察された。マッコウクジラ、クロミンククジラでは病変は認められなかった。全症例について Ziel-Neelsen 染色を行ったが抗酸菌は確認できなかった。また症例の一部はブルセラ抗体陽性であったため、PCR によるブルセラ菌検出を試みている。[大石和恵、山本三郎、後藤義孝（宮崎大）、坂東武治（鯨類研）]

5. 抗酸菌細胞壁アラビノガラクタン(AG)とペプチドグリカン(PG)の結合反応

Mycobacterium smegmatis の cell envelope 分画を用いて UDP-[14C]Galactose または 5-phospho-[14C]ribose pyrophosphate によるラベリングで AG の合成経路及び PG との結合反応を解析した。AG のアラビナンはガラクタン合成中間体にアラビノースが付加されていく形で合成されることが示唆された。また *in vitro* ではじめて、AG と PG の結合反応を実現した。〔八木哲也〕

6. 緑膿菌由来の抗抗酸菌物質の精製

スクリーニングにより、一部の緑膿菌分離株は抗酸菌 *M. smegmatis* に対して発育阻止作用のある物質を分泌していることが示唆された。そこで、最も発育阻止作用の強かった緑膿菌 NCB244 の培養上清から薄相クロマトグラフィー・シリカゲルカラムなどを用いてこの抗抗酸菌物質の精製したところラムノリピドが見い出された。緑膿菌 NCB244 でラムノシルトランスフェラーゼ遺伝子(rhlA)を破壊すると、ラムノリピドが産生されなくなると共に、抗抗酸菌活性が消失した。〔八木哲也、荒川宜親〕

7. *M. bovis* BCG 日本株のトランスポゾン変異株の作製

結核菌の病原性を解析するため遺伝学的に、結核菌に非常に近縁である *M. bovis* BCG をもちいてトランスポゾン変異株を作製した。得られた 27 株の変異株において、その破壊された遺伝子を特定したところ、脂質代謝に関連する遺伝子の変異株が 9 株、細胞への侵入に関わると考えられる遺伝子の変異株が 2 株、トランスポーター遺伝子変異株が 2 株、プロテアーゼ遺伝子変異株が 2 株、PPE family 遺伝子変異株が 1 株、その他の遺伝子変異株が 12 株であった。〔八木哲也〕

8. 結核菌のもつ fadD6 の解析

結核菌のゲノム上には脂肪酸の代謝に関係すると考えられる fadD と名のつく遺伝子が 34 個も存在する。結核菌が人の体内で潜伏感染している場合の栄養源は、脂肪酸ではないかとも考えられており fadD 遺伝子産物の中でも fatty acid-CoA synthetase と命名されている遺伝子産物の機能を解析する事は、結核菌の病原性の解明や、新しい抗結核剤の開発の上で重要と考えられる。我々は、その中でもほ乳類の very long chain fatty acid-CoA

synthetase 蛋白と相同性がある fadD6 に注目し解析を行った。この蛋白を大腸菌で発現させると、脂肪酸の取込みが増加し、半精製した蛋白の解析により fadD6 も very long chain fatty acid-CoA synthetase 活性がある事が示された。現在 fadD6 の *M. bovis* BCG での発現、結核菌でのノックアウトも検討中である。〔八木哲也〕

9. ガンマー線不活化結核ワクチン開発に関する研究

ガンマー線照射により不活化したBCGの免疫効果をBCG生菌および加熱処理 BCG と比較した。PPD に対する遅延型過敏症誘導能はすべての BCG 免疫群で認められ、群間での有意差は認められなかった。一方、生菌およびガンマー線照射 BCG 免疫後 8 週目に比べ 12 週目での TNFα産生、IFN-γ mRNA 発現、殺菌活性は顕著に低下したが、加熱 BCG 免疫群ではこのような活性の低下は認められず、両者での質的差が明らかとなった。今後、生および半生 BCG ワクチンによる宿主応答低下の機序を検討する予定である。 [持田恵子、荒川宜親]

10. *Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導機序の解析

H. pylori の γ-glutamyltranspeptidase がアポトーシス誘導活性を持ち、この蛋白がこの菌の持つアポトーシス誘導活性において主要な役割を果たすものの一つであることを明らかにした。[柴山恵吾、土井洋平、柴田尚宏、八木哲也、加藤はる、山根一和、荒川宜親]

11. 乾燥 BCG 製剤及び精製ツベルクリン製剤の品質管理

平成 14 年度に実施したBCGワクチン 9 ロット及び膀胱内用BCG 6 ロット計 15 ロットの定量培養による力価試験成績は 212.8 ± 50.3 (昨年は 205.9 ± 41.3 ; 0.5 x 10^{-5} mg中のCFU)であった。浮遊菌液 1 mg/ml のODによる菌量測定試験は 0.134 ± 0.013 (昨年は 0.131 ± 0.010)であった。精製ツベルクリンは一般診断用 10 ロット、確認診断用 2 ロット計 12 ロットについて力価試験を行った平均値は＋0.79 ± 1.05 (昨年は+0.68 ± 3.11)であった。[山本三郎、持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、井口由美子]

XIII. 生物学的製剤の品質管理に関する研究

1. DPT ワクチンに関する研究

(1) 海外で製造された沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合(DTaP)ワクチンの品質評価に関する研究

現在、西欧諸国を中心に広く使われている DTaP のうち、3製造所(Chiron 製1ロット、SmithKline Beecham 製2ロット、Aventis Pasteur 製2ロットの計5ロット)のワクチンについて国内基準による評価を行った。いずれのワクチンもマウス白血球数増加試験およびマウスヒスタミン増感試験に適合したが、マウス体重減少試験ではかつての全菌ワクチン並の強い毒性を示し不適合と評価された。〔落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(2) 海外製 DTaP ワクチン中のエンドトキシン量の評価に関する研究

海外製 DTaP ワクチン(3製造所、計5ロット)は、かつての全菌ワクチン並の強いマウス体重減少(BWD)毒性を示した。そこで、これらのワクチン中のエンドトキシン含量をリムルス試験により評価したところ、2製造所のワクチンで添加したエンドトキシンのリムルス活性が強く阻害されリムルス試験による評価は困難であった。Aventis 製ワクチン中のエンドトキシン量はリムルス試験による評価が可能であったが、BWD 試験で示唆されたような大量のエンドトキシン汚染は認められなかった。また、これらのワクチンはウサギ発熱試験ですべて陰性であった。〔落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(3) 海外で製造された DTaP ワクチンの局所反応源性に関する研究

現在、西欧諸国を中心に広く使われている DTaP のうち、3製造所のワクチンについて入手する機会を得たので、マウスの足蹠反応系を用いて局所反応原性の検討を行った。日本のワクチンに比較して、いずれの海外ワクチンもマウスに著しい足蹠反応を強く惹起し、局所の腫脹は持続した。

〔山本明彦、片岡紀代、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(4) 変異百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究

新規百日咳ワクチンの開発を目的に、変異百日咳毒素遺伝子を用いたDNAワクチンを作製し、その有効性について検討を行った。変異導入は毒素活性ドメインである C180 の R9 (R9K), E129 (E129G)について行い、毒素活性が消失する3種の DNA ワクチン (pcDNA/C180-9K, /C180-129G, /C180-9K/129G) を試作した。試作 DNA ワクチンの有効性をマウスを用いた動物実験により評価

したところ、3種の DNA ワクチンはいずれも変異導入による免疫原性の低下は認められず、毒素攻撃に対し有効なワクチンとなることが判明した。

［蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親］

(5)DTaP ワクチン局所反応の定量的動物モデルを用いた局所腫脹反応の評価

当研究室にて開発された DTaP ワクチンによる、2回目感作あるいは12歳時の DT トキソイド追加接種の際の強い局所反応を予測可能な定量的動物実験モデルについてその局所腫脹反応の作用機作を明らかにするための実験を行った。今回は、百日咳毒素の用量を変えてマウスに1ヶ月間隔で免疫し、その2週間後にジフテリアトキソイドを足蹠に投与する直前、投与後6、12、24時間後に採血してその血清中のサイトカインを定量したが変化はなかった。

［山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信］

2. その他のワクチンに関する研究

(1)インフルエンザb型菌(Hib)ワクチン中のエンドトキシン量の評価に関する研究

Aventis Pasteur 製の破傷風トキソイドをキャリアーとした Hib ワクチン中のエンドトキシン量を評価した。リムルス試験によりワクチン中には 300 EU/ml を超える強いリムルス活性が認められた。そこでウサギ末梢血を用いた *in vitro* 試験法およびウサギ発熱試験により生物活性の確認をしたところ、リムルス試験と同様、強い発熱活性が認められ、相当量のエンドトキシンが汚染していることが確認された。［落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信］

(2)インフルエンザ HA(HA)ワクチンのマウス白血球数減少試験に関する研究

近年、HA ワクチンのマウス白血球数減少活性が増加し、その品質管理試験における高精度判定が必要となってきた。一昨年度急遽参照品を作成し定量試験法の導入を行ったが、なお精度および施設間での再現性等の問題点があったため、これらの問題解決のための試験法の精度向上を試みた。接種部位、マウス系統および採血時の加温等の条件検討を行った。その結果、ddY4週齢マウスに比較して ICR6週齢マウスにおいて精度および感度が向上する傾向が認められた。また採血直前のマウス加温により、かなりの精度および感度の向上が見込めることがわかった。

［落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信］

3. エンドトキシンに関する研究

(1)抗毒素製剤中のエンドトキシン量の評価に関する研究

インドネシアおよびブルガリアで製造された各種抗毒素の混入エンドトキシンの評価を試みた。インドネシア製の抗毒素は概してリムルス試験に強い阻害作用を認めた。しかし大部分の製剤で検体の希釈によりエンドトキシン試験の適用が可能であると考えられた。一方、ブルガリア製の抗毒素製剤の中には強いリムルス活性を示すものが認められた。しかし、このリムルス活性はポリミキシンB処理に抵抗性であり、リムルス試験擬陽性物質による活性であると考えられた。今回試験した抗毒素製剤には顕著なエンドトキシン汚染は認められなかったものの、一部の抗毒素製剤にエンドトキシンの混入が認められた。［落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、高橋元秀］

(2)日本薬局方(日局)エンドトキシン 100 標準品の標準化

日本公定書協会で日局エンドトキシン 100 標準品(Lot 4, 5)候補品が調製され、前回同様、当研究室で作成した標準プロトコールに準じて、日本公定書協会、当研究室他 計7施設の参加の下に、米国薬局方エンドトキシン標準品、日局標準エンドトキシン 10000 標準品(Lot 5)を用いて標準化を行った。結果として、エンドトキシン 100 標準品の単位は Lot 4 候補品が 140 EU/vial、Lot 5 候補品が 120 EU/vial と計算された。[堀内善信、山本明彦、蒲地一成、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、村井敏美(日本公定書協会)、中川ゆかり(国立医薬品食品衛生研究所)]

(3) 内毒素の *in vitro* 生物活性測定法の定量的評価

内毒素の *in vitro* 生物活性測定法の定量的評価のためにマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いた TNF-α産生系を用いて抗生物質製剤とエンドトキシンとの協同作用を評価した。今年度はβラクタム系抗生物質5種を調べた。臨床濃度に希釈したこれらの抗生物質とエンドトキシンを段階希釈したものとを同時に TNF-α産生系に加えて20時間後の培養上清のマウス TNF-α産生量を ELISA で定量した。その結果、これらの抗生物質には TNF-α産生の増強はみられなかった。

［山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信］

(4) 内毒素のヒト由来細胞株を用いた *in vitro* 生物活性測定系の作成

昨年に引き続いてヒトに特異的な作用を示す生物製剤の内毒素との協同作用を測定するために、ヒト由来細胞を用いてエンドトキシンに対するサイトカイン産生系を用いる検討を行った。本年は、ま

ずヒト特異的と言うことに注目してヒト末梢血でのヒトインターフェロン製剤によるエンドトキシンのサイトカイン産生増強についてヒト由来細胞と反応性を比較した。その結果、両者の間にはよい相関が得られた。

［山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信］

4. 百日咳菌に関する研究

(1) 百日咳死亡事例において分離された百日咳菌の細菌学的解析

百日咳死亡事例において分離された百日咳菌について細菌学的解析を行った。死亡患児から分離された2種の百日咳菌 (A1-, A2-type) について解析を行った結果、A1-type に 40 kb のサイズを持つプラスミドの存在が確認された。プラスミド解析の結果、本プラスミドは大腸菌の F-plasmid 上にコードされる *traI* 遺伝子を有することが判明し、このプラスミドは他菌から百日咳菌に水平伝播したものと考えられた。現在、患児死亡原因とプラスミドの関係を明らかにするため、プラスミドの全塩基配列決定を進めている。

［蒲地一成、永田典代、近田俊文、玉井友治、井上敏郎 (大分県立病院)、荒川宜親］

(2) 2001ー2002 年に日本で分離された百日咳臨床分離株の分子疫学的解析

日本における百日咳感染症の発生動向を把握することを目的に、2001 年から 2002 年に我が国で発生した百日咳臨床分離株 (29 株) の遺伝子型を解析した。PFGE 解析の結果、1) 解析菌株は2タイプ (A-, B-type) に分類され、その分離率は A-type が 52%、B-type が 48%であること、2) B-type の遺伝子型を有する百日咳菌の分離率が近年上昇傾向にあることが確認された。B-type の分離率上昇理由を考察するため、発生状況について疫学的解析を加えたところ、発生地域、患者年齢、発生時期、ワクチン歴との間に相関は認められなかった。

［蒲地一成、大塚正之 (江東微研)、児玉温子、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、荒川宜親］

(3) 福岡県内で発生した百日咳流行の分子疫学的解析

1991 年を中心に福岡県内で百日咳の outbreak が認められた。この outbreak を解析するため、百日咳様患者より分離された 29 株の百日咳菌について PFGE による遺伝子型解析を行った。解析の結果、29 株の百日咳菌は3タイプに大別され、Ⅰ型が 23 株 (79 %)、Ⅱ型が 4 株 (14 %)、Ⅲ型が 2 株 (7 %) であった。遺伝子型と分離時期との関係を解析したところ、1) 1991 年の流行時には全ての遺伝子型 (Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型) の百日咳菌が分離されていること、2) Ⅰ型の百日咳菌は 1990、1992、1995 年にも分離されていることが示された。分離菌株について百日咳毒素遺伝子のコピー数を解析したところ、解析を行った菌株はすべて1コピーであった。以上の結果から、福岡県内で認められた百日咳 outbreak は主にⅠ型の遺伝子型を有する百日咳菌の伝播により発生したものと結論された。

［蒲地一成、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀川和美 (福岡県保環研)、岡田賢司 (南福岡病院)、堀内善信］

5. 薬剤耐性菌の感染事例解析

(1) 北九州市内の病院で発生した VRE 感染事例の解析

北九州市内の K 病院において我が国最大の VRE 感染事例が発生した。本感染事例の実態を細菌学的見地より把握するため、1998 年から 2002 年にかけて入院患者・職員・環境より分離された VRE (*E. faecalis*：65 株、*E. faecium*：14 株、*E. avium*：32 株、*E. casseliflavus*：1 株) について PFGE 解析を行った。遺伝子型解析の結果、同一の遺伝子型を有する VRE が異なる入院患者から多数分離されていることが判明し、患者間で VRE の伝播が生じていた可能性が指摘された。また、同一の *vanA* fragment size を有する VRE が異なる菌種間で見出されたことから、異菌種間において *vanA* 遺伝子の伝達が生じていたものと考えられた。

［蒲地一成、加藤はる、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、近田俊文、甲斐久美子、八木哲也、柴山恵吾、荒川宜親］

(2) NICU で発生した新生児 MRSA 感染事例の分子疫学的解析

2002 年に大阪府内の小児専門病院の NICU において7例の新生児に MRSA が感染し、7 例中4例がブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) を発症した。患児より分離された MRSA の遺伝子型を PFGE により解析したところ、7株の MRSA は全て同一の遺伝子型に分類され、NICU 内での施設内伝播の可能性が強く示唆された。また、病院が実施した疫学的調査から病院内に勤務する助産婦が感染源である可能性が指摘され、助産婦からは新生児から分離された MRSA と同一の遺伝子型を有する MRSA が分離された。以上の結果から、本感染事例は助産婦を感染源とする新生児 MRSA 感染事例であると考えられた。

［蒲地一成、山本明彦、荒川宜親］

◆研究課題一覧

1. 新興・再興感染症研究事業

a. 薬剤耐性菌の発生動向のﾈｯﾄﾜｰｸに関する研究（主任：荒川宜親）

b. 新型の薬剤耐性菌のﾚﾌｧﾚﾝｽ並びに薬剤耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究（主任：池康嘉）
分担研究課題：カルバペネム耐性グラム陰性桿菌から分離された新しいﾀｲﾌﾟのﾒﾀﾛ-β-ラクタマーゼ IMP-2 に関する解析（分担：荒川宜親、研究協力者：柴田尚宏他）

c. 院内感染の発症ﾘｽｸの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究（主任：倉辻忠俊）
分担研究課題：海外におけるセラチア等グラム陰性桿菌による血流感染症等の報告状況に関する研究（分担：荒川宜親）

d. 感染症診断・検査手法の精度管理並びに標準化及びその普及に関する研究（主任：倉田毅）
分担研究課題：通常の細菌学的同定検査により同定不能な菌種の同定法に関する検討（分担：荒川宜親、研究協力者：柴田尚宏他）

f. ツベルクﾘﾝ検査・BCG 等に代わる結核等の好酸菌症に係る新世代の診断技術および予防技術の開発に関する研究（主任：牧野正彦）
分担研究課題：g-線照射処理好酸菌による感染防御免疫の誘導（分担：荒川宜親、研究協力者：八木哲也、持田恵子）

g. 効果的な感染症発生動向調査のための国及び県の発生動向調査の開発に関する研究（主任：岡部信彦）
分担研究課題：百日咳・ジフテリア及びﾏｲｺﾌﾟﾗｽﾞﾏの病原体分離等調査研究

日本における百日咳菌臨床分離株の染色体パターン解析と分子疫学 （分担：荒川宜親、研究協力者：児玉温子、蒲地一成他）

h. 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究
（主任：佐多徹太郎）
分担研究課題：ボツリヌスの迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発（分担：高橋元秀、研究協力者：岩城正昭、小宮貴子、福田 靖

2. 医薬安全総合研究事業

a. 新生児および乳幼児の MRSA 感染等の院内感染ﾘｽｸ評価および対策に関する研究（主任：武澤 純）
分担研究課題：NICU で院内感染を引き起こす細菌に関する検討（分担：荒川宜親）

b. 海外において製造、使用されているワクチンの品質評価に関する研究（主任：倉田毅）
分担研究課題：細菌ワクチンの検討（分担：荒川宜親、研究協力者：近田俊文他）

c. 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究（主任：高橋元秀）
主任研究課題：総 括 抗毒素の有効性に関する研究（研究協力者：岩城正昭、小宮貴子、福田 靖）
分担研究課題：中国における生物学的製剤の製造と品質管理の現状調査（分担：佐々木次雄）

d. 医薬品、医療用具等の無菌性保証及びその妥当性に関する研究(主任：棚元憲一（国立医薬品食品衛生研究所）)
分担研究課題：日本薬局方「製薬用水」の在り方に関する研究（分担：佐々木次雄、他）
分担研究課題：日本薬局方導入を目指す試験法及び手法の科学的妥当性に関する研究（分担：佐々木次雄、見理剛）
分担研究課題：医薬品製造におけるﾊﾞｲｵｾｰﾌﾃｨ対策に関する研究（分担：佐々木学（北里研究所）、
佐々木次雄）

e. 人工ﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ Fv グロブﾘﾝ製剤の開発に関する研究（主任：鈴木和男）
分担研究課題：MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究（分担：新井孝夫、佐々木次雄）

f. 院内感染を防止するための医療用具及び院内環境の管理及び運用に関する研究（主任：山口恵三（東邦大学医学部））
分担研究課題：医療現場での滅菌に関する指針案作成に関する研究（分担：佐々木次雄、大久保憲、他11名）
分担研究課題：医療用具・環境関連感染症への対応及び無菌保証：院内環境関連感染症への対応（分担：大久保憲、佐々木次雄）

3. 特定疾患対策研究事業
特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究
（主任：佐多徹太郎）
分担研究課題：微生物の慢性感染が関与する特定疾患におけるﾏｲｺﾌﾟﾗｽﾞﾏの探索（分担：荒川宜親、研究協力者：佐々木裕子他）

4. ﾋﾄｹﾞﾉﾑ・再生医療等研究事業

a. ﾊﾞｲｵﾃｸﾉﾛｼﾞｰ応用食品の安全性確保および高機能食品の開発に関する
研究（主任：首藤紘一）
研究協力課題：薬剤耐性の伝達性に関する研究（研究協力者：荒川宜親、岩城正昭）

5. ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ財団国際研究ｸﾞﾗﾝﾄ事業

a. 結核防御粘膜免疫誘導性ﾜｸﾁﾝに関する研究（主任：山本三郎）

6. 国際医療協力研究委託事業

a. 開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究（主任：堀内善信）
分担研究課題名：百日せきﾜｸﾁﾝの品質管理（力価試験法））［分担：近田俊文］
分担研究課題：ジフテﾘｱ・破傷風ﾄｷｿｲﾄﾞの品質管理（分担：岩城正昭、研究協力者：高橋元秀、小宮貴子、福田　靖）
分担研究課題：ﾍﾞﾄﾅﾑに対する微生物管理試験法の技術指導とGMP指導（分担：佐々木次雄）

b. ﾎﾟﾘｵ根絶達成の実証とその他 EPI 疾患サーベｲランス手法強化に関する研究（主任：山本悌司（福島県立医科大学医学部））
分担研究課題：ジフテﾘｱと破傷風の実験室診断と疫学解析（分担：高橋元秀、研究協力者：岩城正昭、小宮貴子、福田靖）

7. 高度先端医療研究事業

a. 各種疾患の治療に役立つﾋﾄ抗体の単離調整（主任：黒沢良和）
分担研究課題：各種毒素の調整と抗体の検定（分担：高橋元秀）

8. 創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業

a. ﾎﾞﾂﾘﾇｽ A　F 型神経毒素を用いたｼﾞｽﾄﾆｱ等の治療方法の確立（主任：小熊恵二（岡山大学医学部細菌学教室・教授））
分担研究課題：ﾎﾞﾂﾘﾇｽ毒素・抗毒素の微量定量法と品質管理（分担：高橋元秀、研究協力者：岩城正昭、小宮貴子、福田靖）

9. 文部科学研究費

a. 遺伝子解析技術を用いたﾃﾞｨﾌｨｼﾙ菌院内感染発生時における流行株の解明［加藤はる］

b. カルバペネム耐性グラム陰性桿菌におけるﾒﾀﾛβ-ラクタマーゼ遺伝子および基質拡張型β-ﾗｸﾀﾏｰｾﾞ遺伝子の解析［柴田尚宏］

c. 腸内細菌群におけるﾌﾟﾗｽﾐﾄﾞ性クラス Cβ-ラクタマーゼの解析と簡易検出法の検討［土井洋平］

d. ﾍﾘｺﾊﾞｸﾀｰﾋﾟﾛﾘのｱﾎﾟﾄｰｼｽ誘導因子の精製（主任：柴山恵吾）

その他、業務に関連する事項

第1室

Ⅰ. 生物学的製剤と抗生物質製剤の品質管理に関する業務

1. 国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼試験等の実績

(1) 収去検査

抗生物質：経口剤（アムホテリシンB） 4ロット

抗生物質：経口剤（セファトリジンプロピレングリコール） 7ロット

抗生物質：注射剤（硫酸ゲンタマイシン） 5ロット

抗生物質：注射剤（塩酸バンコマイシン） 3ロット

(2) 特別審査

抗生物質：注射用シナシッド（キヌプリスチン/ダルホプリスチン） 1件

抗生物質：アジスロマイシン水和物錠600mg 1件

抗生物質：ファンガード（ミカファンギンナトリウム） 1件

抗生物質：ストロメクトール錠3（イベルメクチン） 1件

抗生物質：パッカム（塩酸セフチゾキシムアラビボキシル） 1件

抗生物質：ケテック（テリスロマイシン） 1件

(3) 依頼試験

抗生物質：標準品（硫酸ペプロマイシン）の力価試験 1件

2. 標準品、参照品等の作製状況（交付、分与の実績）

(1) 交付

抗生物質医薬品標準品 39品目 計401本

3. 標準菌株等（交付、分与の実績）

(1) 交付

抗生物質試験用菌株 1品目 計1本

4. 行政関係の各種委員会等への委員等としての参加協力

(1) 日本薬局方調査会・抗生物質委員会へ委員として参加協力［委員：荒川宜親、代理：近田俊文］

(2) 財団法人日本公定書協会・公定書標準品整備検討委員会へ委員として参加協力［委員：荒川宜親、代理：近田俊文］

第2室

1. 無菌試験

(1) 生物学的製剤

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	55	55	0	0	0
5	83	83	0	0	0
6	62	62	0	0	0
7	51	51	0	0	0
8	81	81	0	0	0
9	144	144	0	0	0
10	79	79	0	0	0
11	65	65	0	0	0
12	60	60	0	0	0
1	59	59	0	0	0
2	58	58	0	0	0
3	67	67	0	0	0
計	864	864	0	0	0

(2) 抗生物質製剤

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		適	不適		
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0

10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0			
1	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	6	6	0	0	0

2002 年度（平成 14 年度）

(3)　マイコプラズマ否定試験

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0
6	1	1	0	0	0
7	1	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0
11	1	1	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	6	6	0	0	0

第3室

Ⅰ. 生物学的製剤の品質管理に関する業務

1.国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼検査等の実績

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（最終段階）
30ロット
沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド　7ロット
沈降破傷風トキソイド　8ロット
成人用沈降ジフテリアトキソイド　1ロット
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに使用するジフテリアトキソイド原液　7ロット
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに使用する破傷風トキソイド原液　9ロット
乾燥まむしウマ抗毒素　2ロット
乾燥はぶウマ抗毒素　1ロット
抗破傷風人免疫グロブリン　5ロット

2．標準品、参照品等の作成状況　（交付、分与の実績）

（1）交付

標準ジフテリアトキソイド　5本
標準沈降ジフテリアトキソイド　16本
参照沈降ジフテリアトキソイド（混合ワクチン用）
60本
標準ジフテリア抗毒素　2本
参照ジフテリア抗毒素（フロキュラシオン用）　5本
ジフテリア試験毒素（ウサギ試験用）　2本
シック試験毒素（動物用）　6本
ジフテリア試験毒素（培養細胞法用）　18本
標準破傷風トキソイド　5本
標準沈降破傷風トキソイド　29本
参照沈降破傷風トキソイド（混合ワクチン用）　31本
標準破傷風抗毒素　14本
参照破傷風抗毒素（フロキュラシオン用）　13本
破傷風試験毒素　11本
標準はぶ抗毒素　17本
はぶ試験毒素（出血Ⅰ）　8本
はぶ試験毒素（出血Ⅱ）　12本
標準まむし抗毒素　3本
まむし試験毒素（致死）　8本

（2）分与

標準沈降ジフテリアトキソイド　台湾 FDA　4本
標準ジフテリア抗毒素　計　6本
（台湾2本、甲子園大学2本、東京都都立衛生研究所2本）
ジフテリア試験毒素（培養細胞法用）　計　15本
（台湾5本、甲子園大学2本、タイ5本、東京都都立　衛生研究所3本）
参照沈降破傷風トキソイド（混合ワクチン用）

中国　2本

標準破傷風抗毒素　　計　3本

(中国2本、阪大微研1本)

破傷風試験毒素　　計　6本

(中国2本、ﾀｲ2本、ｲﾝﾄﾞﾈｼｱ2本)

標準まむし抗毒素　　韓国 FDA　2本

まむし試験毒素(出血)　　韓国 FDA　3本

まむし試験毒素(致死)　　韓国 FDA　3本

3.標準菌株等(交付、分与の実績)

Corynebacterium diphtheriae(PW8 株)　　1本

Corynebacterium ulcerans(ジフテリア毒素産生性)

4本

4. GMP 査察等への協力

平成 15 年 1 月 9-10 日の間、厚生労働省医薬局血液対策課長の要請により、(財)化血研主催で開催されたウマ抗毒素等に関する住民説明会に専門家として参加し意見を述べた。[高橋元秀]

行政検査の受入れ状況

ジフテリア関係[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

①平成 14 年 6 月 22 日、藤田保健衛生大学病院よりジフテリア診断のため、患者1名からの扁桃白苔、分離培養菌株、血清について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は 0.668 単位/ml であった。

②平成 15 年 1 月 16 日、横浜衛生研究所よりジフテリア診断のため、患者1名からの偽膜、咽頭スワブ、左右の鼻腔スワブを血液寒天培地に塗抹培養された検体と血清 3 本(平成 14 年 12 月 12 日、16 日、25 日採血)について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は採血日順に、0.0905、0.256、0.181 単位/ml であった。

③平成 15 年 1 月 17 日、島根県保健環境科学研究所よりジフテリア診断のため、患者1名から咽頭スワブ、咽頭スワブ分離培養菌株、血清 2 本(平成 15 年 1 月 15 日、1 月 20 日採血)について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。分離培養菌株は *Corynebacterium striatum* であった。血中ジフテリア抗毒素価は採血日順に、0.0288、0.0407 単位/ml であった。

④平成 15 年 1 月 29 日、王子生協病院より *Corynebacterium ulcerans* 診断のため、分離培養菌株1検体について検査依頼を受けた。この菌株は *Corynebacterium striatum* であり、ジフテリア毒素原性試験は陰性であった。

破傷風関係[福田　靖、岩城正昭、高橋元秀]

平成 14 年 10 月 16 日、常滑市民病院 臨床検査センターより、破傷風菌の疑いがある患者由来菌株からの破傷風毒素遺伝子検出試験と毒素産生能試験の依頼があった。検査の結果、依頼菌株より破傷風毒素遺伝子と破傷風毒素検出されなかった。

平成 14 年 11 月 14 日、秋田県衛生科学研究所より、破傷風菌の疑いがある患者由来菌株からの破傷風毒素遺伝子検出試験と毒素産生能試験の依頼があった。検査の結果、依頼菌株より破傷風毒素遺伝子と破傷風毒素が検出された。

平成 15年 1月 30日、旭中央病院 内科より、破傷風菌の疑いがある患者血清からの破傷風毒素と破傷風抗体の検査依頼があった。検査の結果、依頼血清より破傷風毒素と破傷風抗体は検出されなかった。

平成 15 年 2 月 25 日、九州労災病院 神経内科より、破傷風菌の疑いがある患者血清(7 検体)からの破傷風毒素と破傷風抗体の検査依頼があった。検査の結果、1検体の依頼血清より破傷風毒素が検出され、他の6検体から破傷風抗体が検出された。

6. その他、行政関係の各種委員会等への委員等としての参加協力

・薬事・食品衛生審議会薬事分科会　動物用医薬品等部会動物用生物学的製剤調査会の委員等して、年 3～4 回開催される調査会に出席した[高橋元秀]

第4室

Ⅰ. 生物学的製剤の品質管理に関する業務

1. 国家検定等

(1)国家検定

細菌第二部

乾燥 BCG ワクチン（最終製品）	9 ロット
内訳　80mg	4 ロット
40mg	1 ロット
12mg	4 ロット
乾燥 BCG ワクチン（中間段階）	5 ロット
乾燥 BCG（膀胱内用）（最終製品）	6 ロット
乾燥 BCG（膀胱内用）（中間段階）	5 ロット
精製ツベルクリン	12 ロット
内訳　一般診断用（5μg）	1 ロット
一般診断用（1μg）	1 ロット
一般診断用（一人用）	8 ロット
確認診断用（一人用）	1 ロット
確認診断用	1 ロット
ウイルスワクチン（結核菌否定試験）	6 ロット
内訳　乾燥弱毒生風しんワクチン	1 ロット
乾燥弱毒生麻しんワクチン	3 ロット
乾燥弱毒生おたふくカゼワクチン	1 ロット
経口生ポリオワクチン	1 ロット

書類審査

乾燥 BCG ワクチン（皮内用　0.5 mg）　49 ロット

2. 標準品等

交付

標準精製ツベルクリン	10　本
BCG Tokyo-172 株	40　本

標準化

標準精製ツベルクリン（小分製品）Lot40-2 の在庫減少に伴い日本ビーシージー製造（株）に依頼して標準精製ツベルクリン原末 Lot40 から小分製品を 3000 本作成し標準精製ツベルクリン（小分製品）Lot40-3 とした。感作モルモットによる力価試験の結果 Lot40-3 は Lot40 及び Lot40-2 と等力価であることが確認された。

第5室

1. 国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼検査等の実績

（1）沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（最終段階）　30 ロット

（2）血液製剤のエンドトキシン試験　504件

（3）インフルエンザワクチン

マウス白血球数減少試験　51件

（4）コレラワクチン

マウス体重減少試験　1件

（5）抗生物質

エンドトキシン試験　8件

2. 標準品、参照品等の作成状況（交付、分与の実績）

（1）交付

ア　標準百日せきワクチン　58 本

イ　標準百日せきワクチン毒性参照品　111 本

（2）分与

ア　標準百日せきワクチン（韓国 FDA）　10 本

イ　標準百日せきワクチン（台湾 NLFD）　10 本

Ⅱ. 国際協力

第1室

1. JICA プロジェクトへ協力

JICA トルコ感染症プロジェクト（宮村紀久子専門家）に対して百日咳抗体価測定に関する技術的な情報提供を行った。［近田俊文］

2. 国際医療協力研究委託費による国際共同研究

研究事業「開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究」の一環として、2002 年 11 月 18-19 日に開催された「DTP 及び DTaP ワクチン品質管理試験と臨床相関」の会議に参加し、中国、台湾、韓国、タイ、インドネシアの各国研究者と百日咳ワクチン及び百日咳菌の研究成果について情報交換を行った。［堀内善信、蒲地一成、近田俊文］

第3室

1.　JICA 等研修生、実習生等受け入れ

(1)平成 13 年 9 月 1 日より1ヶ年の予定で、中国蘭州生物製品研究所　陳　平紆研究員を当部協力研究員として受け入れ、DPT ワクチン関連の品質管理の研究を実施中である。[第三室]

(2)平成 15 年月日

2. JICA 等プロジェクトへの参加、協力

①国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 14 年 9 月 22 日～10 月 1 日の間、韓国 FDA にてジフテリアトキソイド力価試験法の技術指導を行った。[小宮貴子、高橋元秀]

②国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 14 年 6 月 13 日～18 日の間、中国薬品生物製品検定所にてジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験法の協議、技術指導を行った。[福田 靖]

③国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 15 年 2 月 18 日～26 日の間、タイ国 NIH にてジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験法の協議、技術指導を行った。[岩城正昭]

④国際医療協力事業団の要請を受けて、平成 14 年 7 月 20～31 日の間、モンゴル国母と子のプロジェクトの技術支援として、ジフテリアの調査に係わる技術指導のために赴いた。[高橋元秀]

⑤厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業に関する研究活動として、平成 14 年 10 月 8～17 日の間、中国上海生物製品研究と蘭州生物製品研究所に研究打ち合わせおよび技術指導のために出張した。[高橋元秀]

3. WHO 等による国際標準化作業等への参加協力

アジア地域内の参照まむし抗毒素の作製：厚生労働科学研究費補助金を受けて、日本（感染研と化学及血清療法研究所）、韓国（食品医薬品検査所）と中国（中国薬品生物製品検定所と上海生物製品研究所）で、共通に使用する参照まむし抗毒素の標準化を実施した。標準化の結果、参照まむし抗毒素 1 バイアル当たりの抗致死価は 32,000 単位、抗出血価は 36,000 単位と決定した。[福田 靖、高橋元秀]

4. WHO 等国際的公的機関が主催する会議等への参加

平成 14 年 12 月 16-17 日にオランダで開催された“WHO meeting on harmonization of potency assays and consistency measurement" に参加し、ジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験について討議した。[高橋元秀]

5. その他

平成 14 年 7 月 18 日、国際保健医療交流センターの要請により、感染症対策専門家養成研究のために、海外 8 名、国内 2 名の研修生に、DPT の診断とその対策について講義した[高橋元秀]。

第 5 室

国際医療協力研究事業「開発途上国の生物製剤品質管理に関する研究」を、中国、韓国、台湾、タイ、インドネシアの国立品質管理研究所と実施し、DPT ワクチンの品質管理試験の国際調和と関連する臨床データ収集・解析システムを導入した。

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Maja Rupnik, Naoki Kato, Miklavz Grabnar, Haru Kato: New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolated from Asia. Journal of Clinical Microbiology. 41:1118-1125, 2003.

2) Doi Y, N Shibata, K Shibayama, K Kamachi, H Kurokawa, K Yokayama, T Yagi, Y Arakawa: Characterization of a Novel plasmid-mediated cepharosporimase(CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolates.: Antimicro. Agent and Chemotherapy, 46(8): 2427-34, 2002.

3) Ohkawa T, M Yoshinaga, N Ikarimoto, H Miyanohara, K Miyata, Y Doi, N Shibata, Y Arakawa: Characterization of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains that produce CTX-M-2-type broad spectrum beta-lactamase isolated from a child with leukemia..: The Pediatric Infect. Dis. J. 21(3): 260-62, 2002.

4) Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 2002 Dec;68(12):6457-61.

5) Kurosaki H, Yasuzawa H, Yamaguchi Y, Jin W, Arakawa Y, Goto M. Detection of a metallo-beta-lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol groups. Org. Biomol. Chem. 2003 Jan 7;1(1):17-20.

6) Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., Sasaki T. and Hattori M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research* 30(23): 5293-5300 , 2002.

7) Horino A., Sasaki Y., Sasaki T., and Kenri T. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. J. Bacteriol. 185: 231-242, 2003.

8) Sasaki T. Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. PDA J. GMP and Validation, 4: 7-10, 2002.

9) Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. PDA J. GMP and Validation, 4: 80-84, 2002.

10) Yasushi Torii, Yoichi Tokumarua, Seijirou Kawaguchia, Nanae Izumia, Seika Maruyamaa, Masafumi Mukamotoc, Shunji Kozaki, and Motohide Takahashi : Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine 20, 2556-2561, 2002

11) TAKAHASHI, M. OMORI-SATOH, T. : What is the rabbit skin test method by Kondo et al.(1960) for determining hemorrhagic activities of snake venom? Toxicon 40, 2002

12) Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Noriyo Nagata, Seishiro Naio, Hiroshi Kato, Maiko Taniguchi, Motohide Takahashi, Takako Komiya, Sachihiro Satoh, Fumio Gondaira, Junichi Sugiyama, Yoshio Nakano, Masahito Mori, Katsutoshi Komuro and Tetsuya Uchida: Protection of Monkeys against Shiga Toxin Induced by Shiga Toxin-Liposome Conjugates. International Archives of Allergy and Immuology 127:294-298, 2002

13) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Nojima, Y., Umemori, K., Phalen, S., McMurray, D.N., Kuramoto, E., Iho, S., Takauji, R., Sato, Y., Yamada, T., Ohara, N., Matsumoto, S., Goto, Y., Matsuo, K. and Tokunaga, T.: Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. Jpn. J. Infect. Dis. 55, 37-44, 2002.

14) Yamomoto, S., Yamamoto, T., Tokunaga, T.: Historical Perspectives. Microbial DNA and Host Immunity". Edited by Ras, E. pp9-14. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2002.

15) Yamomoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Iho, S. Tokunaga, T.: Activation of NK cell by immunostimulatory Oligo-DNA in mouse and human. "Microbial DNA and Host Immunity". Edited by Ras, E. pp81-89. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2002.

16) Takauji, R., Iho, S., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Kitagawa, H., Iwasaki, H., Iida, R., Yokochi, T., Matsuki, T.: CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. J. Leukoc. Biol. 72(5):1011-1019, 2002.

17) Ohishi, K., Zenitani, R., Bando, T., Goto, Y., Uchida, K., Maruyama, T., Yamamoto, S., Miyazaki, N., Fujise, Y.: Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 26:125-136, 2003.

18) Shibayama K., Kamachi K., Nagata N., Yagi T., Nada T., Doi Y., Shibata N., Yokoyama K., Yamane K., Kato H., Iinuma Y., Arakawa Y.: Novel Apoptosis-inducing Protein from *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol. 47(2):443-51, 2003.

19) Ochiai, M., Tamura H., Yamamoto, A., Aizawa M., Kataoka, M., Toyoizumi, H. and Horiuchi, Y. A Limulus amoebocyte lysate activating activity (LAL activity) that lacks biological activities of endotoxin found in biological products. Microbiol. Immunol., 46, 527-533, 2002

20) Kataoka, M., Toyoizumi, H., Yamamoto, A., Ochiai, M. and Horiuchi, Y. Chinese Hamster Ovary (CHO) cell clustering does not correlate with *in vivo* histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). Biologicals, 30, 297-302, 2002

21) Yamamoto, A., Ochiai, M., Kataoka, M., Toyoizumi, H. and Horiuchi Y.: Development of a highly sensitive in vitro assay method for biological activity of endotoxin contamination in biological products. Biologicals. 30, 85-92, 2002.

22) Yamamoto, A., Nagata, N., Ochiai, M., Kataoka, M., Toyoizumi, H., Okada, K. and Horiuchi, Y. Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunization. Vaccine, 20, 3088-94, 2002.

2. 和文発表

1) 加藤はる、加藤直樹: *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査。日本臨床微生物学会誌 12(3):115-122, 2002.

2) 加藤はる:病原微生物の迅速検査 - 各論、消化管感染症起因菌の迅速検査、クロストリディウムディフィシル毒素。臨床検査 47(2):169-174, 2003.

3）柴田尚宏、荒川宜親：誰でもわかる遺伝子検査：薬剤耐性菌。検査と技術，増刊号，Vol. 30, No. 10, 1043-1052, 2002.
4）佐々木裕子、石川　淳、山下敦士、大島健志朗、見理　剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野敦子、柴　忠義、佐々木次雄、服部正平、*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の解析、日本マイコプラズマ学会雑誌 29、59-62、2002.
5）堀野敦子、見理　剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子発現機構、日本マイコプラズマ学会誌、29：63-67, 2002
6）見理　剛：マイコプラズマの遺伝子学、日本臨牀増刊号、新世紀の感染症学（下）ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート，61: 772-778, 2003.
7）佐竹元吉、関田節子、佐々木次雄、有本恵子、熊倉秀樹、国定孝夫、川西利昭、新邦夫、清水袈裟光、大橋眞一、谷健次、林三千夫、阪本光男、庄司雄三、久保利之、白鳥誠、宮沢愛夫、杉浦昭夫：生薬の腸内細菌とその他のグラム陰性菌試験、防菌防黴、30: 525-530, 2002.
8）曲田純二、佐々木次雄：濾過滅菌について、Infection Control, 11: 34-38, 2002.
9）佐々木次雄、棚元憲一：遺伝子解析による微生物の迅速同定法、医薬研究、33: 763-769, 2002.
10）高橋元秀、岩城正昭、荒川宜親：ボツリヌス症　感染症の診断・医療ガイドライン（生涯教育シリーズ 51）　日本医師会雑誌 第 128 巻、第1号 2002.7.1
11）　戸井田一郎、高松勇、菅原勇、芳賀伸治、山本三郎：BCG 基礎研究の過去、現在、未来. 資料と展望 42：49-56, 2002
12）山本三郎：細菌性 CpG DNA による免疫系の活性化.血液・免疫・腫瘍　7(4):41-46, 2002
13）山本三郎：CpG DNA の免疫活性とその臨床応用.臨床免疫 39(1):104-108, 2003

Ⅱ. 学会発表

1.　国際学会

1）Haru Kato, Naoki Kato: Multicenter typing analysis of *Clostridium difficile* isolates from geographically diverse hospital. 12th Europian Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002, April, Milan Italy.
2）Naohiro Shibata, T. Nakamura, Y. Doi, T. Yagi, H. Kato, K. Shibayama, K. Yokoyama, Y. Arakawa: Detection of Both IMP-1 and IMP-2 Metallo-beta-Lactamases Producing *Serratia marcescens* Isolated in Japan.:American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
3）Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kurokawa,　Naohiro Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa: Prevalence of Putative 16S rRNA Methylase Gene Conferring Consistent Resistance to All Aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Japan.:American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
4）K. Shibayama, K. Kamachi, Y. Doi, Naohiro Shibata, T. Yagi, Y. Arakawa: Purification of Apoptosis-inducing Agent from *Helicobacter pylori*.:American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
5）Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K.,　Kenri T.,　Furuya K., Yoshino C.,　Horino A.,　Shiba T.,　Sasaki T. and Hattori M. : Determination of the complete genome sequence of *Mycoplasma penetrans* HF-2 strain.　14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
6）Horino A., Sasaki Y., Sasaki T. and Kenri T. : Promoter inversion is involved in phase variable expression of P46 (pepIMP13) lipoprotein of *Mycoplasma penetrans*.
14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
7）Kenri T., Seto S., Sasaki Y., Horino A., Sasaki T. and, Miyata M. : Visualization of the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae* by yellow fluorescent protein fusion.
14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
8）Sasaki T. : Sterile product manufacturing in Japan. PDA-USP Joint Conference, 20-22 May, 2002, Florida.
9）Yamamoto, T., Lasco, T.M., Yamamoto, S., McMurray, D.N.:BCG-vaccinated guinea pigs modulate TNF-α production after pulmonary challenge with virulent *M. tuberculosis*. 4th World Congress on Tuberculosis, Washington, D.C., U.S.A., June, 2002.
10）　Yamamoto, S., Yamamoto, T., Nojima, Y., Umemori, K., Goto, N., Maeyama, J., Yamada, T., Ohara, N., Toida, I., Iho, S., Takauji, R.: Protective efficacy of BCG and rBCG on guinea pig pulmonary

tuberculosis and its modification with unmethylated CpG-DNA. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, Japan, August, 2002.

11) Saburo Yamamoto, Shinji Haga, Toshio Yamazaki, Tsuyoshi Yamazaki, Toshiko Yamamoto, Maiko Taneichi, Kazunari Kamachi, Ichiro Toida, Takeru Hashimoto, Takeshi Yamada : Safety, Stability and Protective Efficacy of Recombinant BCG. International Symposium on Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus-Based HIV Vaccine, Tokyo, Japan, February 2003

12) K. Shibayama, K. Kamachi, Y. Doi, N. Shibata, T. Yagi, Y. Arakawa : Purification of Apoptosis-inducing Agent from *Helicobacter pylori*. American Society for Microbiology 102nd General Meeting, Salt Lake City, U.S.A., May 2003

2. 国内学会

1) 加藤はる、荒川宜親、小松方、佐藤洋子：*Clostridium difficile* toxin A 陰性 variant 株による院内集団発生。第 51 回日本感染症学会東日本地方会 2002 年 10 月。

2) 加藤はる、加藤直樹、荒川宜親、小松方、相原雅典、佐藤洋子：*Clostridium difficile* 毒素遺伝子変異株の臨床分離。第 14 回日本臨床微生物学会総会 2003 年 2 月。

3) 加藤はる、荒川宜親、加藤直樹：Toxin A 陰性 toxin B 陽性 *Clostridium difficile* 臨床分離株の解析。第 33 回日本嫌気性菌感染症研究会 2003 年 2 月。

4) 黒川博史 、山田大輔、柴田尚宏、土井洋平、柴山恵吾、八木哲也、荒川宣親：CTX-M-2 タイプβ-ラクタマーゼ産生菌の薬剤耐性パターンと分子遺伝学的な解析。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

5) 横山佳子 、土井洋平、柴田尚宏、黒川博史、山根一和、柴山恵吾、八木哲也、加藤はる、荒川宣親：アルベカシン高度耐性緑膿菌から新規に発見されたプラスミド性 16SrRNA メチル化酵素。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

6) 柴山恵吾、蒲池一成、八木哲也、土井洋平、柴田尚宏、荒川宣親：*Helicobacter pyroli* のアポトーシス誘導因子の精製。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

7) 鈴木知子、佐々木辰也、畠山朝夫、内藤由子、柴田尚宏、荒川宜親：尿路感染症の 1 症例より検出した CTX-M-1 タイプβ-ラクタマーゼ産生 *Esherichia coli* について。第 51 回日本医学検査学会総会、5 月 15 日、2002 年、仙台。

8) 松田眞澄、桑原澄江、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-1type の ESBLs 産生 *Serratia marcescens* の 1 症例。第 41 回中部医学検査学会、10 月 5 日、2002 年、富山。

9) 山根一和、土井洋平、横山佳子、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親：アルベカシン高度耐性緑膿菌から分離された 16S rRNA メチル化酵素遺伝子の周辺構造の解析。日本感染症学会東日本支部会、10 月 31 日、2002 年、東京。

10) 柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、黒川博史、八木哲也、加藤はる、荒川宜親：クラス 3 型インテグロンに担われた IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas putida* の検討。日本感染症学会東日本支部会、10 月 31 日、2002 年、東京。

11) 柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、黒川博史、八木哲也、荒川宜親：メルカプト酢酸ナトリウムを使用したディスク法と PCR 法による各種メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の比較検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

12) 中野学、平井克典、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-9 型 BL 産生 *K. pneumoniae* と IMP-1 型 MBL 産生 *Pseudomonas putida* を同時に分離し得た敗血症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

13) 藤田良浩、結城千恵美、小林圭二、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-3 型β-ラクタマーゼ産生 *Serratia marcescens* による敗血症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

14) 山田友紀、小畑律子、野々宮百合子、三浦明子、辻村正雪、山端久美子、黒田牧子、小笠原理恵、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親：院内感染対策上の対応が問題となったメタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌を検出した小児水頭症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

15) 黒川博史、若松篤、山田大輔、勝又一成、柴田尚宏、土井洋平、八木哲也、柴山恵吾、荒川宜親：臨床分離 *Esherichia coli* と *Serratia marcescens* β-ラクタム薬耐性株の分離状況調査。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

16) 松田真澄、柴田尚宏、荒川宜親：IMP-1 型 metallo-β-lactamase 産生 *Pseudomonas putida* の 3 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

17) 杉本直樹、遠藤三佳、柴田尚宏、荒川宜親：菌血症改善後の尿分離例を含む SHV-型 ESBLs 産生 *Serratia marcescens* の 3

症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

18) 徳永幸子、新粥葉子、吉村玲子、大谷佳代、坂森よしみ、柴田尚宏、荒川宜親：当院で経験したメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *P. aeruginosa* の3症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

19) 林卓司、竹内千智、越村真紀、柴田尚宏、荒川宜親：当院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検出状況。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

20) 小林治、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離した CTX-M-type β-lactamase 産生大腸菌の2症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

21) 塩田量子、武下公子、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌4症例について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

22) 松波充子、鈴木更織、大嶽宏幸、奈田俊、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Alcaligenes xylosoxidans, Pseudomonas putida* について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

23) 志田原郁子、佐藤恵子、澄川孝之、藤井千登勢、元井信、柴田尚宏、荒川宜親：尿から検出した IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Serratia marcescens*3症例の臨床的検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

24) 本間操、土井洋平、柴田尚宏、荒川宜親：当院における ESBL 産生グラム陰性桿菌の検査法および検出状況について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

25) 畑中公基、吉田順子、鈴木隆幸、三田正行、柴田尚宏、荒川宜親：腸内細菌群における ESBL 産生菌の簡易判定法に関する検討および解析結果。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

26) 松永克美、八木恵子、朝妻義徳、星周一郎、柳田良子、永井久美子、佐藤誠子、柴田尚宏、荒川宜親：メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Alcaligenes xylosoxidans* を検出した3症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

27) 樋口元弥、名古屋洋、森山美昭、柴田尚宏、荒川宜親：急性骨髄性白血病に発症した CTX-M タイプβ-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 敗血症の一例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

28) 浅野裕子、石郷潮美、柴田尚宏、荒川宜親：血液培養由来の CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ産生菌の臨床細菌学的検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

29) 小林裕美、柴田尚宏、土井洋平、荒川宜親：当院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出状況。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

30) 沢辺悦子、千田俊雄、岡村登、武部功、角田千能、遠井初子、古畑紀子、西堀眞弘、宮坂信之、三宅修司、吉澤靖之、柴田尚宏、荒川宜親：同一病棟内から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生株ニ株を含む *Serratia marcescens* の分子疫学的解析。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

31) 嶋村浩市、田中継朗、中島崇智、山内貴雄、河口正雄、板垣智之、山根一和：本邦初と考えられた *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* による僧帽弁置換術後心内膜炎の 1 例。日本循環器学会関東甲信越地方会、2002 年 6 月。

32) 佐々木裕子、石川　淳、山下敦士、大島健志朗、見理剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野敦子、柴　忠義、佐々木次雄、服部正平：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の決定、第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜.

33) 佐々木裕子、石川　淳、山下敦士、大島健志朗、見理剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野敦子、柴　忠義、佐々木次雄、服部正平：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の解析、第 29 回日本マイコプラズマ学会、2002 年 5 月、札幌.

34) 佐々木裕子、見理　剛、堀野敦子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の決定、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜.

35) 見理　剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄：Global transposon mutagenesis による *Mycoplasma pneunomiae* の細胞吸着関連因子の検索、第 75 回日本細菌学会総会、2001 年　4 月、横浜.

36) 堀野敦子、見理　剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子発現機構について、第29回日本マイコプラズマ学会学術集会、2001 年　5月、札幌.

37) 堀野敦子、見理　剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子の発現は多数の逆位可能なプロモーターによって調節される、第 25 回日本分

子生物学会年会、2002 年 12 月、横浜.

38) 佐々木次雄：無菌製造法に関する ISO 13408 の一般要件と局方との関係について、微生物管理（無菌操作法）に関する ISO/TC198 京都国際会議報告会、日本 PDA、2002 年6月、東京.

39) 佐々木次雄：国内製薬企業の製薬用水の実態と JP の課題、第 10 回日本 PDA 年会、2002 年 11 月、東京.

40) 川端敏之、新谷三春、黒川博史、佐々木次雄、荒川宜親：*Haemophilus influenzae* 臨床分離株の疫学とニューキノロン耐性菌株の解析、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜.

41) 新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親：*Haemophilus influenzae* type b 莢膜多糖体 PRP の分離精製とその性状並びに免疫化学的測定法への利用、第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉.

42) 岩城正昭、小宮貴子、福田靖、高橋元秀：ジフテリア菌から見いだされた新規抗原の解析。第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜。

43) 岩城正昭、三枝智美、小宮貴子、高橋元秀：ジフテリア菌新規抗原遺伝子：5 塩基単位の繰り返し構造による多形性。第 85 会日本細菌学会関東支部総会、2002 年 10 月、東京。

44) 岩城正昭、三枝智美、小宮貴子、高橋元秀：ジフテリア菌の新規抗原遺伝子に見られた繰り返し構造。日本分子生物学会第 25 回年会、2002 年 12 月、横浜。

45) 小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親、高橋元秀：ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の実験室内診断法の確立―試験法確認のための予備的調査報告―。 第6回日本ワクチン学会学術集会、平成14年11月、千葉。

46) 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田 毅：ワクチン国際化の潮流に関する一考察。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、平成 14 年 11 月、千葉。

47) 高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田 靖：モンゴル国内における健康人の血中のジフテリア、破傷風抗体の調査結果。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、平成 14 年 11 月、千葉。

48) 井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、高橋元秀、後藤紀久、朽久保邦夫：組換えコレラ毒素Bサブユニットを添加した試作調整 DPT ワクチンの経鼻投与におけるジフテリアと破傷風の毒素中和抗体誘導について。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、平成 14 年 11 月、千葉。

49) 柿田麻衣、鈴木和宏、高橋剛、森野和彦、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀：ヒト抗体ライブラリーからのジフテリア毒素中和抗体の単離。第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 横浜。

50) 高橋 剛、柿田麻衣、鈴木和宏、森野和彦、辻 孝雄、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀：ヒト抗体ライブラリーからクローニングされた抗ジフテリア毒素中和抗体の検定。
第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 横浜。

51) 伊保澄子、山本三郎：細菌 DNA の免疫賦活作用。日本細菌学会、2002 年 4 月、横浜市。

52) 前山順一、山本三郎、安田陽子、井坂雅徳、谷口暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久：BCG 鼻粘膜投与における組換えコレラ毒素 B サブユニットのアジュバント効果について。日本細菌学会、2002 年 4 月、横浜市。

53) 戸井田一郎、高松勇、菅原勇、芳賀伸治、山本三郎：BCG 基礎研究の過去、現在、未来。第 72 回実験結核研究会シンポジウム、2002 年 4 月、東京都。

54) 山本三郎：結核菌 DNA による免疫賦活の機序と応用。第 77 回日本結核病学会総会、2002 年4月、東京都。

55) 山本三郎、山本十糸子：BCG 免疫結核菌噴霧感染モルモットの抗原特異的 TNF-α 産生の動態。第 77 回日本結核病学会総会、2002 年4月、東京都。

56) 山崎剛、山崎利雄、山本三郎、赤川清子、芳賀伸治：BCG の経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果。第 77 回日本結核病学会総会、2002 年4月、東京都。

57) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫、山本三郎、後藤紀久：組換えコレラ毒素 B サブユニットによるマウスマクロファージの IL-1β 産生誘導機構の解析。第 67 回日本インターフェロン／サイトカイン学会、2002 年 7 月、東京都。

58) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久：粘膜ワクチン用組換え CTB アジュバントの BCG 経鼻投与に対する効果。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉市。

59) 高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、星野孝、山本三郎、松木孝澄：Plasmacytoid 樹状細胞における CpG DNA 刺激によるケモカインの産生。日本免疫学会総会、2002 年、12 月、東京都。

60) 八木哲也、荒川宜親：*Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 のトランスポゾン変異株の作製と解析 第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜

61) 八木哲也:抗酸菌細胞壁アラビノガラクタンの生合成経路の解析ー特にアラビノガラクタンとペプチドグリカンの結合について一　第77回日本結核病学会総会、2002 年 4 月、東京

62) 柴山恵吾、蒲地一成、八木哲也、奈田俊、土井洋平、柴田尚宏、横山佳子、山根一和、加藤はる、飯沼由嗣、荒川宜親:*Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導蛋白の精製、同定。第85 回日本細菌学会関東支部総会、2002 年 11 月、東京

63) 落合雅樹、山本明彦、堀内善信、沈降精製 DPT ワクチン(DPT ワクチン)中のエンドトキシン定量法について、第75回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜

64) 落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究 ー wP、aP ワクチンに関して ー、第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉

65) 蒲地一成、児玉温子、堀内善信、荒川宜親:百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11

66) 児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親:児玉温子日本における百
日臨床分離株の染色体パターン解析と分子疫学、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11

67) 蒲地一成、児玉温子、堀内善信、荒川宜親:変異百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究、第76回日本細菌学会総会、熊本、2003、4

68) 児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親:日本で分離された百日咳
臨床分離株の遺伝子型と病原性の関係、第76回日本細菌学会総会、熊本、2003、4

69) 山本明彦、落合雅樹、永田典代、堀内善信: 沈降精製DPTワクチンによる局所腫脹作用の動物モデルによる評価の試み、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002、4.

70) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信:ワクチン類へのエンドトキシン試験におけるヒト由来株価細胞の適用の検討、第 6 回日本ワクチン学会学術集会、千葉、 2002、11.

71) 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田 毅:ワクチン国際化の潮流に関する一考察、第 6 回日本ワクチン学会学術集会、千葉、 2002、11.

III　その他の研究発表

1) 柴田尚宏:本邦における薬剤耐性菌の分離状況について。第9回関東甲信越マイクロスキャン研究会、東京、7 月 13 日、2002 年。

2) A. Kodama, K. Kamachi, T. Konda, and Y. Arakawa: Genomic DNA analysis of Bordetella pertussis strains clinically isolated in Japan. Conference of Quality Control Tests for DTP and DTaP Vaccines and Clinical Relevance. November 2002, Tokyo, Japan.

3) 堀内善信　韓国食品医薬品局 (KFDA)
“ KFDA International Symposium on Biological Standardization”
(2002年11月28－29日) での講演

4) 堀内善信　韓国食品医薬品局 (KFDA) “International Symposium on Pertussis : Current status and Prospect”(2003年2月24日)での講演

研 究 業 績

Ⅰ. 疫 学

1. クリプトスポリジウム症の血清疫学に関する研究

⑴ ELISA における *C. parvum* の抗原特異性

ヒトクリプトスポリジウム感染症の主要病原種である *C. parvum* には、ヒト特異的な genotype 1 とヒトを含む多種類の哺乳動物に感染する genotype 2 があり、集団感染は主にこの両者によって引き起こされる。今回、genotype 1 および genotype 2 の抗原と各 genotype に感染した患者血清を用いて、ELISA による IgG 抗体価の比較を行った。その結果、スポロゾイトの PBS 抽出抗原を用いるかぎり両者の間で反応性に差が認められないことが確認された。

[八木田健司、黒木俊郎（神奈川県衛生研究所）、河橋幸恵（埼玉県衛生研究所）、遠藤 卓郎]

⑵ 埼玉県越生のクリプトスポリジウム集団感染に関する血清抗体価調査

平成 8 年、埼玉県越生で発生したクリプトスポリジウム集団感染事例に関して、ELISA による血清抗体価調査を行った。感染初期および感染1ヶ月後に採取されたペア血清を調べた結果、この間に顕著な IgG 抗体価の上昇が認められ、クリプトスポリジウム感染と IgG 抗体価の関係が明確となった。また、同地域における血清疫学調査によると1ヶ月目の抗体価が最も高く、一年後にはすでに抗体価の著しい減少が観察された。以上のことより、ELISA による抗体検出では、比較的新しい感染が把握されるものと思われ、今後の疫学調査に有効な手法として期待される。

[八木田健司、河橋幸恵（埼玉県衛生研究所）、砂押克彦（埼玉県衛生研究所）、遠藤 卓郎]

2. レジオネラの宿主アメーバに関する研究

レジオネラ集団感染に関連したアメーバ調査

平成14年夏季、宮崎県ならびに鹿児島県において大規模公衆浴場を感染源とするレジオネラ集団感染が発生した。感染源の調査の一環として、浴槽水、ろ過装置等を対象としたレジオネラ宿主アメーバの検査を行った。両事例とも、循環式浴槽ユニットの一部であるろ過装置より極めて多量のアメーバが検出され、ろ過装置内の環境がレジオネラ増殖に極めて有利な状態にあったことが示された。さらに、源泉の貯留・加温タンク等からもアメーバならびにレジオネラが検出され、循環系全体の管理の重要性が指摘された。また、両県の事例とも開設間もない時点での事故であることから、この期間における微生物学的な挙動に注目する必要がある。

[八木田健司、河野喜美子（宮崎県衛生研究所）、吉國謙一郎（鹿児島県衛生研究所）、遠藤 卓郎]

3. 温水環境における病原性アメーバ *Naegleria fowleri* の疫学ならびに病原性に関する研究

⑴ 温水環境における *Naegleria* 属アメーバ実態調査

前年度に引き続き、国内温水環境からの *Naegleria* 属アメーバ検出を目的とした調査を行った。培養方法の改良と PCR によるマススクリーニングを導入し、*Naegleria* 属アメーバ検出の効率化を図った。得られた 2184 株の分離株のうち、*Naegleria* 属アメーバは約54.2%を占め、その優占種は *N. lovaniensis* であったが、新たに *N. australiensis* が分離された。本種は文献上病原性が指摘されているもので、わが国では初めてその存在が示された。今回の調査に用いた試料水 626 検体のうちアメーバ陽性となった試料は 212 検体で、そのうち *Naegleria* 属アメーバが陽性であった試料は 141 検体（67%）におよんだ。*N. australiensis* またはそれと極めて近縁の種が検出された試料水は 54 検体を数えアメーバ陽性試料の 25%、試料水全体のおよそ 9%に相当した。その他に遺伝子型として *N. italica, N. philippinensis, N. clarki* あるいはその近縁種の存在が示されたが *N. fowleri* は不検出であった。*N. fowleri* の分布については引き続き検討している。

[八木田 健司、下河原理江子、小村麻子、泉山信司、烏谷竜哉（愛媛県立衛生環境研究所）、黒木俊郎（神奈川県衛生研究所）、遠藤卓郎]

⑵ *Cryptosporidium* 集団感染の遺伝子型別

平成14年3月に淡路島の高校生が修学旅行で北海道に訪れた際、*Cryptosporidium* に集団感染したことが報告されているが、感染経路は未だ不明である。集団感染より得られた *Cryptosporidium* の塩基配列決定による遺伝子型別を行い、これらの集団感染に係る分子疫学的解析を試みた。その結果、複数の遺伝子座より *C. parvum*（Genotype Ⅰ）に特有の配列が得られ、ヒト由来のオーシストの摂取による感染であることが明らかとなった。多型性が高いとされる Microsatellite 領域の塩基配列を用いた解析により汚染源の特定を試みたが、特定には至らなかった。

[押部智宏（兵庫県立健康環境科学研究センター）、泉山信司、

八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

4. アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視

(1) 動物園、観光施設におけるアライグマ回虫卵汚染問題

既に報告したように社団法人日本動物園水族館協会（動水協）所属の98動物園宛に「アライグマとアライグマ回虫に関するアンケート」を送付し84の動物園から回答を得た（回答率86%）。本年度は、新たに動水協非所属の動物展示飼育施設 238 施設に対して同様のアンケート調査を行い 159 施設から回答を得た（回答率 67%）。全体を集計すると、82 施設でアライグマが展示用に飼育されその合計頭数は約425頭に及ぶ事が分った。保有頭数は施設によって 1 頭から 61 頭までの幅があり、5 頭以下を飼育しているのが 50 施設で 6 割を占めていた。アライグマ回虫に関しては 82 施設のうち 33 施設が陰性と答え、残る 49 施設では不明との回答があった。その後、46 施設より実際にアライグマの糞便・排出虫体或は土壌等の送付を受けてそれらの検査を実施したところ、現在までに 7 施設（合計 145 頭保有）で寄生例が確認された。
[川中正憲、荒川京子、杉山 広、森嶋康之]

(2) 野生化アライグマの糞便内虫卵検査

野生化アライグマによるアライグマ回虫幼虫移行症の発生予防と監視の為に、捕獲個体の糞便内虫卵検査を実施した。検査には神奈川県と愛知県の自治体或はアライグマ駆除業者から直接送付された糞便を用いた。最近 2 ヵ年の検査件数を県別に挙げると、平成13年度：神奈川県158件、愛知県27件、平成14年度：神奈川県115件、愛知県2件であった。現在までのところ、これらの糞便からはアライグマ回虫卵は検出されていない。
[荒川京子、川中正憲、杉山 広、森嶋康之]

5. スカンク由来 *Baylisascaris* 属回虫の病原性の検討

Baylisascaris 属には非固有宿主に致死的な神経幼虫移行症を引き起こすアライグマ回虫 *B. procyonis* が含まれ、本属の回虫類はアライグマ回虫と同様に神経幼虫移行症の原因になると推定されている。今回、シマスカンク（動物展示施設飼育個体）から *Baylisascaris* 属の回虫を得たので、神経幼虫移行症の原因種となりうるかどうかについてマウスへの感染実験によって検討した。その結果、今回の実験ではスカンク由来 *Baylisascaris* の回収虫体はアライグマ回虫と同等の発育程度を示したにもかかわらず、アライグマ回虫の感染実験で認められたような特徴的な神経症状は発現しなかった。現在、その原因を検討中である。
[森嶋康之、杉山 広、荒川京子、川中正憲]

6. 東京都における肺吸虫の発生分布に関する研究

(1) 荒川で採集したクロベンケイガニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出

大平肺吸虫のメタセルカリアは、関東地方では九十九里浜で太平洋に注ぐ河川の汽水産カニから見出されているが、東京湾に注ぐ河川のカニについては報告がない。そこで荒川下流にある東京都の7つの区に12の調査地区を定め、クロベンケイガニの採集と肺吸虫メタセルカリアの検出を試みた。その結果、採集した692匹のうち177匹（26%）が大平肺吸虫メタセルカリア陽性であることが分かった。寄生率は葛飾区四ツ木地区が最も高く（89%）、190個ものメタセルカリアが検出されたカニもいた。足立区、墨田区、江戸川区にも陽性地区が見出された。カニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出は、東京都ではこれが初めての報告となる。
[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲]

7. 横浜市港湾地区の広東住血線虫に関する調査

広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* はネズミを終宿主，軟体動物を中間宿主とし，ヒトに感染すると好酸球性髄膜脳炎を引き起こす。わが国では 1964 年に沖縄県のネズミから初めて検出されて以来，全国各地から陽性の終宿主・中間宿主が見出されている。2001～2002 年、横浜市の港湾地区で捕獲されたドブネズミを検査したところ，ネズミ族捕獲調査が実施されたすべての地区から広東住血線虫に感染した個体が発見された。これに加えて 1 頭のドブネズミから近縁種のマレー住血線虫 *A. malaysiensis* が検出された。マレー住血線虫は，国内では北九州市内で捕獲されたドブネズミから寄生が報告されているが，九州以北では発見されていない。現在，横浜市への移入時期を推定するため，横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターに保管されていた過去の検体を再検討中である。
[森嶋康之、川中正憲、杉山 広、今成敏夫（成田空港検疫所）、飯塚信二、青木英雄（横浜検疫所）]

8. 中国西部三省の寄生虫事情

平成 14 年 3 月に青海省、広西チワン族自治区、貴州省の中国西部に位置する三省を訪れて寄生蠕虫症についての現地視察を行った。広大な牧畜地域をもつ青海省ではエキノコックス症及びテニア症などの条虫疾患が重要であり、元日本住血吸虫症流行地の広西チワン族自治区においては肝吸虫症・肺吸虫症

などの吸虫疾患が重要である。また貴州省では回虫の感染率が中国第1位(71.1%)で全国平均(44.5%)を大きく上まわり、土壌媒介線虫症が重要である。最近におけるこれら三省の寄生虫事情について感染症の専門家向けに3回分けてレポートを作成した。
[川中正憲、森嶋康之、余森海(中国予防医学科学院寄生虫病研究所)]

9. 赤痢アメーバの遺伝的多型に関する研究

わが国に浸淫する赤痢アメーバ株の多様性を明らかにし、その多様性のもつ生物学的・病因学的意味を理解するために、わが国と人的交流の深い東南アジア(タイ・バングラデッシュ・インドネシア)からの赤痢アメーバ分離株の遺伝的多型を解析した。継代培養された赤痢アメーバ分離株及び患者の糞便並びに肝膿瘍の穿刺液からゲノムDNAを分離し、赤痢アメーバ特異的プライマーを用いてPCRを行った。繰り返し配列を含みtRNA遺伝子座にリンクした2種類の多型領域(遺伝子座1/2、5/6)及び表面タンパク質serine-rich *E. histolytica* protein (SREHP)並びにキチナーゼの核酸並びにアミノ酸レベルでの多型性を解析した。これら4種類の遺伝子座を組み合わせることで東南アジアの分離株は多くのサブタイプに分類された。特にSREHPの多型性が最も高く、ほとんどの分離株が異なった遺伝子型を示した。東南アジアの分離株の遺伝型とわが国の分離株の遺伝型を比較したところ、同一の遺伝型は見られなかった。
[Ali Haghighi、Nitaya Thammapalerd (Mahidol大学)、今村顕史(都立墨東病院)、増田剛太(都立清瀬小児病院)、今田美穂子(JICA、インドネシア)、小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内勤(同)、野崎智義]

10. アメーバ症集団感染の評価

精神障害者収容施設内における集団感染例の診断・感染源の特定・感染拡大防止措置の策定・指導を行った。更に、この集団感染例10検体から分離された赤痢アメーバ株のタイピングを行った。この結果、感染源となった赤痢アメーバ株は1種類であり、10年以上前に他の他府県で発見された株と同一の遺伝子型を示すことが明らかになり、障害者施設におけるアメーバ症治療・根絶の難しさが明らかとなった。
[Ali Haghighi、小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内 勤(同)、野崎智義]

11. 赤痢アメーバ感染の易感染性に影響を与える宿主側因子の特定に関する研究

他の多くの感染症と同様に、赤痢アメーバ感染者もその発症は感染者のうち5-10%に限られる。このことは宿主側の感染抵抗性、有症性に多様性がある可能性を示唆している。これまでの我々の研究により、ヒト白血球抗原(HLA)の多型が赤痢アメーバに対する宿主側の易感染性・抵抗性と関与していることが示唆されている。昨年に引き続いて、障害者施設並びにHIV陽性の男性同性愛者からの検体からHLAのタイピングを行った。赤痢アメーバ感染者及び感染既往歴のある患者血液からインフォームドコンセントを確認した上で血液の供与を受けた。これらの血液から抽出されたゲノムDNAを用い、PCRとシーケンス特異的ハイブリダイゼーションによりタイピングを行った。これまでの結果によれば、HLAのDR9及びA2に易感染性の可能性が、DR15及びDR13に感染抵抗性の可能性が示された。
[Ali Haghighi、小林正規(慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室)、竹内勤(同)、佐治博夫(HLA研究所)、尾林博(京都微生物研究所)、野崎智義]

12. 新規に同定された150/166 kDaのマンソン住血吸虫虫卵由来T細胞刺激誘導抗原

マンソン住血吸虫症は虫卵特異的ヘルパーT細胞を介在して惹起される虫卵周囲肉芽腫形成及びそれに続いて起こる組織の線維化が主要な病因となる。本研究の趣旨は抗原特異的なT細胞応答の改変・調節を介して本症の重症化抑制を目指すもので、これまでT細胞刺激誘導抗原の特定を行い、いくつか主要抗原について明らかにしてきた。今回さらにSDS-ポリアクリルアミドゲル上で150/166 kDaとして検出される画分がT細胞刺激を誘導する抗原である事が判明した。この成分は重症タイプ及び軽症タイプ双方の系統マウスでCD4+ヘルパー細胞の増殖を刺激誘導し、Th1及びTh2タイプのサイトカイン産生をバランスよく促した。
[朝日博子、Stadecker, M.J.(タフツ大学)]

13. *Schistotoma mansoni*由来アルブミンプレカーサーのクローニングとレコンビナント蛋白の作製

マンソン住血吸虫感染マウスにおいてヘルパーT細胞を刺激誘導する抗原分子として見出された150/166 kDa画分は、プロテネース処理後の内部アミノ酸配列に各種のアルブミン前駆体と高い相同性が認められた。*S. mansoni*のESTデータベース検索から、いくつかのクローンがアルブミン前駆体ホモログをコードしていた事から、そのうちの一つをプローブとして用いて608のアミノ酸をコードしている領域の配列を決定した。さらに本分子のレコンビナント蛋白を作製し、免疫学的特性を調べたところ、CBA, C3H, BALB/c及びC57Bl/6の系統マウスを用いた感染実験において強いT細胞刺激活性を示した。
[朝日博子、Stadecker, M.J.(タフツ大学)、LoVerde, P.T.(SUNY)]

II. 分 類

1. クリプトスポリジウムに関する分子疫学的研究

⑴ ハ虫類の *Cryptosporidium*

*Cryptosporidium*は塩素消毒に強い抵抗を示すことから水道を介した集団感染が問題とされている。*Cryptosporidium* の宿主特異性は明らかにではなく、ヒト以外の宿主に感染するとされる *Cryptosporidium* による人への日和見感染が徐々にではあるが知られるようになっている。*Cryptosporidium* 感染に対する効果的な治療法は現時点で存在せず、免疫不全者での感染は致死的となる状況は改善されていない。現在、ペットショップあるいは動物園等で飼育されているハ虫類の一部が斃死する事例が多発しており、それらは蛍光抗体染色および形態観察により *Cryptosporidium* 症と診断されていた。単離された *Cryptosporidium* より 18SrDNA 及び Actin 遺伝子を標的としたPCR を行い、後者より得られた産物 1kbp の塩基配列がハ虫類由来の *C. saurophilum* Genbank (No.AF382349) と一致した。ヒトへの感染の可能性は低いと考えられるもののその取り扱いは注意が必要である。

[黒木敏郎 (神奈川衛研) 、宇根有美 (麻布大学) 、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎]

⑵ アメーバ同定の補助手段として用いる簡便で確実なアイソザイム分析の確立

病原性アメーバ実態調査で得られたアメーバ環境株のうち、無作為抽出による 154 株と、*N. lovaniennsis* を除く *Naegleria* 50 株を対象として、PE (propionyl esterase) および ACP (acid phosphatase) のアイソザイム分析を実施した。調査で得られた分離株の約半数は *N. .lovaniensis* であり、PE での指標となるアルカリ側に見られるバンドの存在を確認した。その他として *N. australiensis*、*N. philipinennsis*、*N. italica*、*N. gruberi*、*Naegleria* spp と判断される泳動像を得た。 *N. australiensis* に関しては、ACP のパターンにおけるアルカリ側の 2 本のバンドが特徴的で同定の指標とした。また、どの種とも一致しない、または PCR による種分類とは整合性のとれないパターンを示すクローンも検出されており、これらの詳細な検討には、malate dehydrogenase などアイソザイムの種類を増やして解析中である。

[下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

⑶ わが国で初めて分離された *N. austlariensis* 株の生物学的性状ならびに病原性

本年度調査において温泉試料等から *Naegleria* 属を分離したところ、各地の入浴施設からマウスに対し実験的に病原性が報告されている *N. australiensis* が分離されることが明らかとなった。その分離株について DNA 塩基配列の決定を行なった。その結果、標準株と塩基配列が 100%一致する株と、ITS 領域＋304 の位置に 2 つの T 塩基の挿入 (99.8%) がある株の 2 種類の存在が明らかとなった。双方についてマウスへの感染実験を行なったところ、標準株に一致する 1 分離株は、脳内接種により発症し、致死に至らしめることが確認された。他の分離株については病原性を示す株は認められなかった。病原性についてはさらに詳細に検討中である。

[泉山信司、朝倉登喜子、小村麻子、下河原理江子、烏谷竜哉 (愛媛県立衛生環境研究所) 、八木田健司、遠藤卓郎]

2. 分子生物学的手法によるアライグマ回虫の同定と他種回虫との鑑別

アライグマ回虫の寄生状況を調査中に、神奈川県の野生化アライグマからタヌキ回虫 *Toxocara tanuki* が検出されたことは既に報告した。両種の虫卵は共に回虫類に特徴的なタンパク膜を持つが、その表面に違いがあり、形態からの虫種鑑別が可能であった。しかしながら、保存状況が悪い少数の虫卵しか観察できない場合には形態に基づく虫種判別が容易でないことを経験した。そこで種の正確な鑑別に分子生物学的手法が利用できないか、リボソーム DNA をターゲットとした PCR 法の適用を検討した。

⑴ 塩基配列解読によるタヌキ回虫との虫卵での鑑別

糞便からアライグマ回虫及びタヌキ回虫の虫卵を回収し DNA を調整した。線虫のリボソーム DNA に対するコンセンサスなプライマー (NC13 および NC2) で当該領域を PCR 増幅させ、その塩基配列を解読した。その結果、1 個の虫卵を出発材料としても PCR 増幅・配列解読ができること、虫卵由来の配列は虫体由来のものと完全に一致すること、配列は種内で良く保存されていること、両種の配列は ITS2 領域で明らかに異なること、などが分かった。すなわち、虫卵から DNA を調整してリボゾーム DNA を増幅して ITS2 領域の塩基配列を解読することで種の同定・鑑別が可能であることが明らかとなった。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐 (遺伝子資源)]

⑵ 制限酵素切断パターン (PCR-RFLP) に基づくタヌキ回虫との虫卵での鑑別

アライグマ回虫およびタヌキ回虫の虫卵を出発材料として得たリボゾーム DNA･ITS2 領域の配列をもとに制限酵素地図を作成したところ、制限酵素 MseI が両者の鑑別に有用であると予想された。そこで PCR 産物を MseI で処理したところ、予想どおり各々の種に特異的なサイズの断片に切断されることが分かった。塩基配列を解読しなくとも、PCR 産物の制限酵素処理で両種を迅速･正確に鑑別できることが明らかとなった。
[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐（遺伝子資源）]

⑶ 種特異的プライマーを用いた PCR によるタヌキ回虫との虫卵での鑑別

アライグマ回虫及びタヌキ回虫の ITS2 領域における塩基配列の違いを利用して、各々の種に特異的なプライマーを設計した。両種の虫卵から DNA を調整し、種特異的プライマーをコンセンサスなプライマー（NC2）と組み合わせて PCR 増幅させたところ、DNA の由来種とプライマーの標的種とが一致した場合にのみ、予想サイズの産物が得られることが分かった。今回設計した種特異的プライマーを用いることにより、一回の PCR で迅速･正確に両者を鑑別できることが明らかとなった。
[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐（遺伝子資源）]

III. 生理･生化学･分子生物学

1. *N. fowleri* のモノクローナル抗体と総タンパクとの反応性

N. fowleri の病原性の究明、さらには診断法の確立のために、必須であるモノクローナル抗体の作成を進めている。*N. fowleri* 固定虫体および未固定虫体の腹腔感染マウスを用いたモノクローナル抗体作成を試み、得られた 11 クローンについて、アメーバ虫体との反応性および反応タンパクの特定を試みている。本年は、7クローンにつき、検討したところ、1 クローンが、ウエスタンブロット法で *N. lovaniensis* 等の異種との交叉反応がみられず、*N. fowleri* に 特異的な反応パターンを示した。反応タンパクの特定のために2D-PAGE を用いた解析では複数の spot に反応していた。現在さらに糖鎖に対する反応性を検討するとともに抗体の特徴の詳細を分析中である。
[原 樹（久留米大学）、下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

2. アメーバの定量的解析法の検討

アメーバ調査のプロジェクトにおいて、すでに簡便なアメーバ検出の方法を確立し各地で実施中である。しかし、多様な試料に忠実に対応し、定量的なデータが得られる方法に至っていないのが現状である。簡便で定量性に富む方法の基礎データを得る目的で、アメーバの成長曲線の作成を試みた。環境中の主要アメーバである *Acnathamoeba*、*Naegleria* ならびに *Hartmannella* に関して調べた結果、アメーバによりコロニーの計数のしやすさや形成に差がみられ、1 種の曲線に収束するに至らなかった。*Hartmannella* の分裂速度は2 - 3時間/回という活発なものであった。一方、*Naegleria* の接種量と検出量であるプラーク数には大きな差が生じており、その原因究明とともに検出方法の改良に着手している。
[下河原理江子、泉山信司、長谷川賢（玉川大学）、遠藤卓郎]

3. *N. fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較

原発性アメーバ性髄膜脳炎を引き起こす *N. fowleri* と、形態的同一種非病原性の *N. lovaniensis* との類似点および相違点を網羅的に比較する手段として 2D-PAGE を用い、両者の比較を行った。これまでに *N. fowleri* 特異的あるいは 2 種間共通な約50個のタンパクスポットについてN末端アミノ酸配列解析を行い、その結果30個のタンパクスポットについてアミノ酸配列を得た。ホモロジー検索の結果、糖代謝に関与する酵素や HSP 70 等と高い相同性を認めるスポットを分離した。さらに *N. fowleri* membrane protein MP2Cl5 の 2D-PAGE による分離に成功した。
[小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、山河芳夫(細胞化学)、遠藤卓郎]

4. ジアルジアの紫外線不活化に関する研究

Giardia は強い塩素耐性を有することから、水道水を介した集団感染が世界的に報告されている。これまでの研究で *Giardia* シストは紫外線に対する抵抗性が低いことが明らかにされており、汚染防止の観点から紫外線の利用が期待されている。本研究では設置･運用に際して予見される問題点として、光回復および濁質の影響について検討を行った。紫外線を照射した *Giardia* 嚢子の光回復を試みたところ、光回復はほとんど見られないか無視できる範囲と考えられた。一方、濁質として抗体磁気ビーズを使用した、ビーズを付着させた嚢子への紫外線効果について検討を行った結果、その効果は著しく減少した。嚢子が付着物により紫外線から保護された場合、見かけの濁度が小さく紫外線透過率の減少がほとんど生じない条件下であっても、紫外線の効果は著しく減少することが実験的に示された。
[泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

⑵ *Eimeria* の紫外線感受性

*Giardia*等の耐塩素性微生物による汚染防止対策として、水道水での紫外線の利用が期待されている。一方で、紫外線に耐性を持つ病原性原虫の出現が懸念される。本研究ではイソスポーラに近縁の*Eimeria*を用いて紫外線の感受性について検討を行った。*Eimeria*のオーシストは自家蛍光を発することが知られており、紫外線を受けて青く蛍光を発する様子が蛍光顕微鏡で観察される。*Eimeria*の紫外線感受性はオーシストのsporulationを指標として判定を行ったが、2-log阻止には、10mJ/cm^{2}の線量を必要とした。この線量は*Giardia*シストの不活化に要する線量の10 倍にあたる。抵抗性の差に関して今後とも微生物種ごとでの検証が必要である。
[泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎]

⑶ マンソン住血吸虫卵殻前駆体タンパク遺伝子（SmP34）の発現状況の検索⑵

住血吸虫の卵殻タンパクをコードする遺伝子については、我々が見出した SmP34 を含めてマンソン住血吸虫で数種類がクローニングされている。この SmP34 の発現状況を成虫について検討し、*in situ* ハイブリダイゼーション法で雌の卵黄腺にのみシグナルが認められることを報告してきた。本年度は幼虫（ミラシジウム・セルカリア）からも材料を調整し、RT-PCR 法で SmP34 の発現状況を検討した。その結果、雌成虫からテンプレートを調整した場合は、予想サイズの PCR 産物が得られることが分かった。一方、ミラシジウムあるいはセルカリアでは雄成虫と同様に PCR 産物は得られなかった。以上の検討により、幼虫では SmP34 は発現していないことが確認された。日本住血吸虫でも同様の知見が得られており、住血吸虫の卵殻タンパク遺伝子は成虫特異的発現と云う特徴を持つことが明らかになった。
［杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐（遺伝子資源）、中村正彦（阪大）］

4. 原虫における含硫アミノ酸合成・分解経路の解析

⑴ 赤痢アメーバ含硫アミノ酸分解酵素メチオニンガンマリアーゼの解析

哺乳動物に存在せず原虫に選択的に存在する酵素は創薬の合理的標的となる。赤痢アメーバの含硫アミノ酸の分解において中心的な役割を果たすメチオニンガンマリアーゼは赤痢アメーバにおいて 2 種のアイソエンザイム（EhMGL1、EhMGL2）として存在した。本酵素はプロパジルグリシンにより阻害されたが、細胞の増殖は影響を受けなかった。また、メチオニンガンマリアーゼの基質となると考えられるメチオニンアナログのトリフルオロメチオニンを赤痢アメーバ栄養型の培養虫体に加えたところ 10 マイクロモル濃度で不可逆的に原虫の増殖を阻害した。従ってメチオニンガンマリアーゼが抗赤痢アメーバ薬剤開発のための有望な標的であると考えられた。
[所正治（慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室）、浅井隆志（同）、竹内勤（同）、野崎智義]

⑵ 赤痢アメーバのセリン生合成経路の解析

赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸合成は特殊である。哺乳動物で活発に機能するメチオニンとシステインの間の転換は行われず、システインは解糖経路、セリン生合成経路、システイン合成経路を経て、メチオニンからではなく、解糖系の中間代謝産物と硫化物とから合成される。我々は既に赤痢アメーバにおけるシステイン生合成の重要性を明らかにしているが、その上流のセリン生合成の分子機構は全く不明である。この 2 つの経路はリン酸化セリン合成経路並び非リン酸化セリン合成経路と呼ばれる。これまで、赤痢アメーバのゲノムデータベースから、リン酸化セリン合成経路の主要酵素であるグリセリン酸リン酸デヒドロゲナーゼ（PGDH）、セリンリン酸アミノ転移酵素（PSAT）、更に、非リン酸化セリン合成経路のグリセリン酸キナーゼ（GK）、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）の遺伝子を特定している。本年度はこのうち GDH について酵素学的解明を行った。赤痢アメーバの GDH はイプシロンプロテオバクテリアから水平転移によって遺伝子を獲得したと考えられた。赤痢アメーバの GDH は NADPH 依存性であり、一般に哺乳動物の GDH と似た酵素学的性状を示したが、細菌・哺乳動物の GDH と異なりグリオキシル酸還元活性をもたなかった。赤痢アメーバの GDH はセリン生合成でなく分解に寄与すると考えられた。
[Vahab Ali、繁田泰男、野崎智義]

2. 原虫における鉄硫黄タンパク質生合成の解析

全ての細胞において鉄硫黄クラスターを活性中心とする鉄硫黄タンパク質の生合成は必須である。嫌気性原虫赤痢アメーバにおける電子伝達の中心的役者であるフェレドキシン・ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素はいずれも鉄硫黄タンパク質である。我々は赤痢アメーバにおける鉄硫黄クラスター合成の機構を分子レベルで明らかにするために、まず中心的役割を果たすシステインから硫黄原子を遊離させる活性をもつ酵素コンポーネント NifS と遊離した硫黄原子を一時的に捕捉する足場コンポーネント NifU のクローニングを行った。ゲノムデータベース解析によると、大腸菌などにみられる多コンポーネントの系は赤痢アメーバには存在せず、NifS, NifU のみが唯一の分子であることが示唆された。現在、組換えタンパク質を作成してこれらタ

ンパク質の生化学的解析を行っている。
[Vahab Ali、繁田泰男、徳本梅千代（大阪大学理学系大学院）、高橋康弘（大阪大学理学系大学院）、野崎智義]

3. 赤痢アメーバの貪食の分子機構の解明

(1) プロテオーム解析による貪食の網羅的解明

赤痢アメーバの貪食に関わるタンパク質を網羅的に獲得することを目的として、ラテックスビーズを貪食させた赤痢アメーバ虫体からショ糖密度勾配法を用いてファゴソームを単離した。精製されたファゴソームの純度を電顕を用いて確認した上で、ファゴソームタンパク質を de novo シーケンスによって網羅的に解析した。その結果、低分子量 GTP 結合タンパク質、システインプロテアーゼなど多くのタンパク質が時間依存的に動員されることが明らかとなった。現在、それぞれのタンパク質の細胞内での挙動を免疫蛍光抗体法により確認している。
[岡田麻美、保田友義、徳丸文恵、櫛島麻衣、Chris Huston (University of Virginia)、Barbara Mann (University of Virginia)、野崎智義]

(2) 貪食・病原機構に関与する Rab の機能解析

ァ 肝膿瘍形成における *Eh*Rab5 の機能解析

赤痢アメーバの病原性は、貪食と大きな相関があると報告されているが、実際にはどのような因子が関与しているかは明確ではない。*Eh*Rab5 大量発現株では赤血球の取込みが促進し、逆に *Eh*Rab5Q67L 変異発現株では取り込み効率が低下するため、これらの形質転換株ではハムスターにおける肝膿瘍形成効率にも影響を及ぼすと考えられた。その結果、*Eh*Rab5 大量発現株ではコントロールよりも大きな膿瘍を形成する事が分かり、貪食効率と病原性の相関を支持していた。しかしながら、貪食が低下していた *Eh*Rab5Q67L 変異発現株でも中程度の膿瘍を形成する事が分かった。このことは *Eh*Rab5 の大量発現が、貪食だけでなく、組織内での生き残りなど別の径路にも影響を及ぼしている事を示す。現在、培養細胞への組織障害性などを解析している。
[中野由美子、岡田麻美、櫛島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義]

ィ 貪食における *Eh*Rab7 アイソタイプの機能解析

赤痢アメーバがファゴサイトーシスを効率良く進めるためには、*Eh*Rab5 と *Eh*Rab7 の機能が重要であることを明らかにしてきたが、近年の赤痢アメーバゲノムプロジェクトの終了により、赤痢アメーバはこれまで解析してきた *Eh*Rab7 (*Eh*Rab7A) の他に 5 つのアイソタイプ (B-F) が存在することが判明した。まず、クローニングに成功した *Eh*Rab7B ならびに *Eh*Rab7D のファゴサイトーシスにおける機能を解析した。*Eh*Rab7A と共局在する事が分かっている Vps26 をマーカーとして細胞内局在を観察した結果、*Eh*Rab7B と *Eh*Rab7D は *Eh*Rab7A と共局在しないことが分かった。また、*Eh*Rab7B は定常状態でも大きな空胞上に局在し、空胞内にはアメーバポアが入っていることが容易に観察された。また、*Eh*Rab7D の大量発現が赤血球の取込み効率を低下させた。このことは、少なくとも 2 つの *Eh*Rab7 アイソタイプがファゴサイトーシスの異なる場所で別々の機能を担っている事を示している。
[中野由美子、岡田麻美、櫛島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義]

ウ ファゴソーム形成における *Eh*Rab11 アイソタイプの機能解析

赤痢アメーバのエンドソーム系には *Eh*Rab11 が局在することが報告されていたが、我々は *Eh*Rab11B, *Eh*Rab11C という 2 つのアイソタイプを RT-PCR 法によってすでに同定している。またラテックスビーズを用いて精製したファゴソーム上には *Eh*Rab11B が特異的に検出されているため、*Eh*Rab11 アイソタイプの機能についても明らかにしようと試みた。まず、3 種の *Eh*Rab11 アイソタイプをそれぞれ発現する形質転換株を作製した。間接蛍光抗体法をもちいた観察により、*Eh*Rab11 アイソタイプのいずれも *Eh*Rab7, Vps26, アメーバポア、など既知のマーカータンパク質との共局在は観察されず、*Eh*Rab11 アイソタイプがこれまで解析してきたコンパートメントと異なる場所に局在していることが分かった。また、*Eh*Rab11B の大量発現は他の 2 種の *Eh*Rab11 アイソタイプと異なり、エンドサイトーシスも活性化させることも分かった。現在、*Eh*Rab11B が特異的に 2 つの径路に関与する意味について解析を進めている。
[中野由美子、岡田麻美、櫛島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義]

4. トリパノソーマ・リーシュマニア原虫におけるプロスタグランジン生合成の解析

我々は既にキネトプラスチド科に属する原虫にプロスタグランジンを合成する能力があることを明らかにしてきた。本年度はトリパノソーマクルージ並びにリーシュマニアにおけるプロスタグランジン F2 シンターゼ (PGFS) の精製と機能解析を継続して行った。その結果、トリパノソーマクルージ昆虫型虫体エピマスチゴートから PGFS を精製し、その遺伝子を特定した。得られたトリパノソーマクルージの PGFS は細菌の Old Yellow Enzyme と高い相同性を示した。このタンパク質はこれまでプロスタグラ

ンジン合成との関与が全く推測されていなかった新規のチアミン依存性タンパク質であった。更に、酵素学的な解析を行い、本酵素がキノンなど抗トリパノソーマ薬剤の標的であることを明らかにした。また、リーシュマニア原虫からもトリパノソーマブルセイPGFSのホモログを同定し、その酵素学的解析を行った。更に、PCR、免疫蛍光抗体法により *L. major, L. mexicana, L. amazonensis, L.donovani* で細胞質内の発現を確認した。
[Bruno K. Kubata (大阪バイオサイエンス研究所)、Zakai Kubata (大阪バイオサイエンス研究所)、裏出良博 (同)、早石修 (同)、河津信一郎 (国立国際医療センター)、野崎智義]

5. トリパノソーマクルージ細胞表面主要糖タンパク質の機能解析

トリパノソーマクルージの 72kDa 糖タンパク質 (Gp72) は細胞表面、特に鞭毛と細胞体の接合部分に存在し、両者の接着に寄与している。Gp72 の細胞における機能を明らかにするために、我々は欠損変異体を作成し、実験動物への感染性の変化を観察した。通常の BALB/c マウスに対する感染は両者ともほとんど見られなかった。BALB/c 胸腺除去マウスを用いると、Gp72 欠損変異体では、野生型虫体に比べて、これら免疫不全マウスへの感染性が著しく減弱していた。以上のことから、Gp72 は免疫力のあるマウスへの潜在的感染の確立に不可欠であることが示唆された。
[Miguel A. Basombrio (Universidad Nacional de Salta)、野崎智義、George A. M. Cross (The Rockefeller University)]

6. マラリア原虫における抗酸素機構の解析

マラリア原虫のヘモグロビン代謝・抗酸化ストレス応答に重要な働きをする新規抗酸化物ペロキシレドキシンの生理機能を明らかにすることを目的として、ネズミマラリア原虫の発現プロファイルの解析を行った。ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* では熱帯熱マラリア原虫と同様に、二種類のアイソタイプが存在した。組換えタンパク質を用いてインビトロにおけるペルオキシダーゼ活性を確認した。更に組換えタンパク質に対する抗血清を用いて発現を調べた。2-cys 型ペロキシレドキシンはほ乳類型虫体並びに蚊内型虫体のどの細胞型にもあまねく発現していた。一方、1-cys 型ペロキシレドキシンは赤血球内型の栄養体に高い発現が認められた。以上の結果から、マラリア原虫が生理機能を異にする多様な抗酸化機構を利用していることが明らかとなった。
[河津信一郎 (国立国際医療センター)、坪井敬文 (愛媛大学医学部寄生虫学教室)、鳥居本美 (同)、野崎智義]

7. 日本住血吸虫症の肝線維化評価に有用な血清マーカーの検討

日本住血吸虫症においてその重症度を評価する手段として、血清マーカーを使用して門脈域を中心とした肝線維化を測定する方法が応用されている。いくつかのマーカーがこの目的に有用であると報告されているが、本症の病態を最も良く反映するマーカーについて検討した。フィリピン国の日本住血吸虫感染者を対象として、血中の P-III-P (プロコラーゲン) もしくは IV 型コラーゲン、ヒアルロン酸等との相関、ウイルス性肝炎との関連について調べた結果、P-III-P や IV 型コラーゲンのマーカーが日本住血吸虫症の病態を早期から評価するのに適していると考えられた。
[大前比呂思 (筑波大学), 朝日博子、Orlando S. Sy (フィリッピン国、住血吸虫症コントロール病院), 松田 肇 (獨協医科大学)]

IV. 免疫

1. 新規に同定された25kDa のマンソン住血吸虫虫卵由来T細胞抗原

マンソン住血吸虫症は虫卵特異的ヘルパーT 細胞を介在して惹起される虫卵周囲肉芽腫形成およびそれに続いて起こる組織の線維化が主要な病因となる。この事から特異的ヘルパーT 細胞を刺激誘導する抗原分子に着目し、これまでにいくつかの抗原を特定し、一部は抗原エピトープまで解析した。今回更に見かけ上25kDaとして検出される成分がT細胞刺激性の抗原である事が判明した。この抗原は感染マウス由来 CD4 陽性のヘルパーT 細胞の増殖を促したが、マウスの系統により特徴的に異なる免疫応答を誘導した。
[朝日博子、Stadecker, M.J. (タフツ大学)]

2. マンソン住血吸虫虫卵由来25 kDa のT細胞抗原の1次構造と免疫学的特性

マンソン住血吸虫感染マウスにおいてヘルパーT 細胞を刺激誘導する虫卵由来抗原分子として見い出された 25kDa の成分 (Sm-p25) はその部分アミノ酸配列から、ヒトの好塩基球から IL-4 産生を誘導する物質 (IPSE) であることが判明した。134 アミノ酸からなる全配列をマルトース結合型にしてレコンビナント蛋白を作製し、免疫学的特性を調べた。レコンビナント Sm-p25 はヘルパーT 細胞を刺激してその増殖を促し、病態が重症化することで知られる CBA マウスにおいてより強い応答が認められた。B 細胞応答は、感染後 5-6 週の産卵開始時期と一致して上昇を始め、9-15 週で最高値に達した。
[朝日博子、Williams, D(イリノイ大学)、Stadecker, M.J. (タフツ大学)]

Ⅴ. 検査･診断

1. ポリ塩化アルミニウム凝集剤および炭酸カルシウムを用いた病原微生物濃縮装置

水道水中に混入する病原微生物、特にクリプトスポリジウムオーシストや細菌芽胞等の濃縮回収を目的とした装置の開発を行った。基本原理はポリ塩化アルミニウム凝集剤を用いて水中の濁質を凝集沈殿させ、連続的に遠心回収するもので、フロック形成を促すために炭酸カルシウムを添加した。本システムでは、回収されたフロックを酸処理により凝集剤と炭酸カルシウムを溶解･除去することで、濁質の単離･回収が可能となる。得られた試料を PCR、顕微鏡観察、培養等に供し、病原体検出を行う。
[泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎]

2. クリプトスポリジウム症の血清診断法の開発

クリプトスポリジウム症の ELISA による血清診断法の開発を行った。陽性血清としては平成 6 年の神奈川県平塚市における集団発生事例ならびに国内散発例のものを、また陰性血清としては下痢症を示さない一般健常者の血清を用いた。抗原、ブロッキング試薬、検出用抗体、洗浄等の諸条件を検討した結果、抗原としては仔牛由来のオーシスト（遺伝型はウシ型）より分離したスポロゾイト抽出抗原を用いること、被検血清は 200 倍希釈とし、検出用二次抗体（抗ヒト IgG－POD 標識抗体）は 4000 倍で使用すること、ブロッキング試薬にカゼイン系タンパク質溶液を用いることで良好な成績を得た。患者血清及び陰性血清の抗体価分布からカットオフ値を OD=0.3（感度 92%、特異度 100%）に設定した。本法では、既に糞便中オーシストが陰転した後しばらくの期間にわたり高い抗体価が見られ、疫学調査への有用性も示された。
[八木田健司、黒木俊郎（神奈川県衛生研究所）、遠藤卓郎]

3. 平成14 年度･依頼血清の寄生虫抗体の検査

検査に際して毎回使用する抗原は、線虫類5種（日本顎口虫、犬回虫成熟虫卵、アニサキス、豚回虫、犬糸状虫）、条虫類3種（広節裂頭条虫、マンソン孤虫、エキノコックス）、吸虫類4種（ウエステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、肝蛭、日本住血吸虫）の 12 種類で、方法は酵素抗体法（DOT-ELISA）を用いている。結果の確認のため場合によっては上記以外の抗原も含め、ウエスタンブロット法、ゲル内沈降反応、あるいは薄切標本を用いた酵素抗体法なども実施した。本年度は 36 検体（29 人）の検査を実施し、そのうち抗体陽性が 8 件（8 人）、陰性が 28 件（21 人）であった。陽性の内訳はウエステルマン又は宮崎肺吸虫：5 件（5 人）、エキノコックス：1件（1人）、有鉤嚢虫症：1件（1人）、旋尾線虫症：1件（1人）であった。
[荒川京子、杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

4. ホタルイカからの旋尾線虫幼虫 TypeX の検出状況

富山県を中心とする生食用ホタルイカの水揚げは、毎年 3 月中旬から 5 月下旬までの概ね 12 週間に限定されている。2002 年と 2003 年のこの時期、都内で市販された生食用ホタルイカから旋尾線虫幼虫 TypeX の検出を試みた。検査はこの期間中毎週 1 回行い、各回ごとに約 100 尾、各年で 11 回にわたった。その結果、2002 年は 1.7%、2003 年は 2.2%という平均寄生率が得られた。
[荒川京子、川中正憲、杉山 広、森嶋康之]

5. エキノコックス症新規診断法の開発

エキノコックス症の新規診断法を開発することを目的として、多胞虫の主要抗原遺伝子･タンパク質を解析･応用した。一昨年度得られた6つの新規抗原遺伝子のうち、抗原性が高く、診断抗原としての価値の高いと考えられるペロキシレドキシンの虫体における局在、組換えタンパク質を用いた酵素活性を明らかにした。多胞虫のペロキシレドキシンは 2-cys 型であり、チオレドキシン系と共役することでペルオキシダーゼ活性を示した。現在、組換えペロキシレドキシンを抗原とした ELISA 法を用いて、診断抗原としての感度および特異性を評価している。
[藤田修（獣医科学部）、荒木國興（国立公衆衛生院衛生微生物学部）、神谷晴男（弘前大学医学部寄生虫学教室）、野崎智義]

6. 日本住血吸虫症の簡易診断法の開発：レコンビナント蛋白抗原の利用

日本住血吸虫感染者の尿中には抗成虫及び虫卵特異抗体が検出でき、簡易診断法に尿を利用出来る可能性が高い事を先に報告した。診断用抗原として十分量を維持する事が困難な成虫および虫卵の代わりに、成虫の tegument 成分である 22.6kDa のレコンビナント蛋白の有用性を試験した。その結果、血清抗体との反応では陽性率は 37.1%と低い率に留まるのに対し、尿を用いた場合には 97.3%で陽性反応を得た。すなわち、本レコンビナント抗原は尿中に出現する抗体とよく反応し、新たな抗体検出系として適用が期待される。
[朝日博子、山下隆夫（山形県立保健医療大学）、大前比呂思（筑波大学）]

Ⅵ. その他

1. 浴槽モデルを用いたアメーバ汚染のモニタリング

循環式浴槽のレジオネラ汚染防止対策の一環として、実験プラントを用いてアメーバならびにレジオネラ等細菌類による汚染状況の継時変化を追った。モニタリングは入浴終了後、塩素を不活化した時点から開始した。塩素消失直後より一般細菌数の急激な上昇、次いでアメーバ数の上昇、さらにレジオネラ菌数の上昇という一連の現象が再現された。この間、レジオネラの増殖に要する日数は、わずか 3 日程度であった。現在、各種配管素材表面への着生、膜による微生物除去、紫外線その他による消毒効果等に関する検討を行っている。
[八木田健司、下河原理江子、杉山寛治（静岡県衛生研究所）、遠藤　卓郎]

2. 疫学調査マニュアル完成を目指したアメーバ株の保存法の改良について

アメーバの疫学調査において、生態学的・衛生学的に注目される *N. fowleri* 以外のクローンを多数得ている。大多数は現在寒天プレート上での継代培養により維持されているが、Virulence の変化に関する問題やクローン数増加に伴い、しかるべく保存法の検討を試みた。すでに、アメーバの保存に関しては、多くの報告があり、Glycerol 溶液での保存は 6 ヵ月以上の保存が可能であることを確認した。さらに操作の簡略化と効率の向上をはかるため、DMSO を用いた方法を検討している。現在のところ、10%DMSO、および 20%FBS を加えた系で良好な結果を得ている。解凍の手順は、迅速解凍後ただちに大腸菌プレートに移殖し、滅菌水を加える。
[下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎]

3. 植物由来殺貝剤の検討

(1) 茶種子由来精製サポニンのミヤイリガイ殺滅作用

茶種子由来の粗サポニンから2種の精製サポニンが精製され、それぞれTeasaponinE1及びTeasaponinE2と同定された。これらのミヤイリガイに対する殺滅活性を求めたところ、前者のLC50は2.2ppm[95％信頼限界：[1.34, 3.36]であるのに対して、後者は8.9ppm [6.38, 13.33] であった。二つのサポニンは立体構造にわずかな差異しかない構造異性体であるが、両者の間で4〜5倍もの活性濃度の差異がある。化学構造と殺貝活性との関連を解明する上で興味ある知見であると思われた。
[川中正憲、荒川京子、大東肇（京大・農）]

(2) フィリピン産植物（*Jatropha curcas*）殺貝剤由来のEBV活性化試験

フィリピンの日本住血吸虫症有病地においては、この土地に自生する *Jatropha curcas* の抽出物を殺貝剤として応用する事が推奨されている。近年タイ産の *Jatropha curcas* について、発癌プロモーターであるホルボールエステルの含有の事実が報告された。そこで、フィリピンのレイテ島産 *Jatropha curcus* の種子、果実、葉を採集しそれぞれのエタノール、ブタノール抽出成分について EBV(Epstein-Barr virus)活性化試験を行った.その結果、種子では両方の抽出成分に、果実及び葉ではブタノール抽出成分だけに発癌プロモーター活性が認められた。この事は殺貝剤として *Jatropha curcas* の種子を取り扱うに際して相応の注意が必要である事を示している。
[川中正憲、荒川京子、大東肇（京大・農）]

VII　症例

1. 開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種を同定した肺吸虫の腹腔内異所寄生の 1 例

急性虫垂炎の疑いで開腹術が施行された外国人女性から、術中に大網に付着する楕円形の構造物（赤褐色・長径約 3mm）が採取された。組織学的検索により構造物は寄生蠕虫であることが明らかにされたので、虫種の正確な同定を試みた。連続薄切標本を新たに作製して観察したところ、構造物は肺吸虫の成虫であり、卵巣が複雑に分岐する種であることが分かった。そこで薄切虫体を出発材料にしてリボゾーム DNA・ITS2 領域の塩基配列を解読・検索したところ、宮崎肺吸虫の配列と完全に一致することが分かった。本種は本邦固有の人体寄生性肺吸虫で卵巣は複雑に分岐する特徴的な形態を有し、上述の観察結果とよく符号する。以上の結果から、患者の腹腔から摘出された寄生蠕虫を宮崎肺吸虫と同定した。本例は本虫成虫によることが明らかにされた腹腔内異所寄生の初めて症例となる。
[杉山　広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐（遺伝子資源室）、鈴木雄二郎、西山秀樹（日赤和歌山医療センター呼吸器）]

発表業績一覧

Ⅰ. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Shinji Izumiyama, Ichiro Furukawa, Toshiro Kuroki, Shiro Yamai, Hiromu Sugiyama, Kenji Yagita and Takuro Endo. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porkers in Kanagawa Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Disease. 54:23-26, 2001.

2) Kazuo Ono, Hidetaka Tsuji, Shiba K. Rai, Akio Yamamoto,

Kuniyoshi Masuda, Takuro Endo, Hak Hotta, Takashi Kwamura and Shoji Uga. Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. Applied and Environmental Microbiology. 67(9):3832-3836, 2001.

3) Szenasi Zsuzsanna dr., Endo Takuro dr., Yagita Kenji dr., Vereb Ilona dr. es Nagy Erzsebet dr. A legionellak epidemiologiaja es laboratoriumi diagnosztikaja (Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae. Orvosi Hetilap. 142(20):1035-1043, 2001.

4) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: Polymerasechain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. Mol. Cell. Probes, 16, 229-234 (2002).

5) Tsukada, H., Hamazaki, K., Ganzorig, S., Iwaki, T., Konno, K., Lagapa, J.T., Matsuo, K., Ono, A., Shimizu, M., Sakai, H., Morishima, Y., Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. 2002. Potential remedy against *Echinococcus multilocularis* in wild red foxes using baits with anthelminthic distributed around fox breeding dens in Hokkaido, Japan. Parasitology 125, 119–129.

6) Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Gasquet, M., Blansard, G., Ohigashi, H. *In vitro* anti-tumor promoting and ant-parasitic activities of the quassinoids from *Eurycoma longifolia,* a medical plant in Southeast Asia.J. Ethnopharmacol, 82, 55-58 (2002)

7) Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Bunno, Y., Jouni, Z. E., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., Tssuchida, K., Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. J. Biolgical Chemistry, 277(35), 32133-32140 (2002)

8) Okamoto, M.,Lo, C.T., Tiu, W.U., Qui, D.C., Hadidjaja, P., Upatham, S.,Sugiyama, H., Taguchi, T., Hirai, H., Saitoh, Y., Habe, S., Kawanaka, M., Hirata, M., Agatsuma, T. Phylogenetic relationships of the genera *Oncomelania* and *Tricula* infected from the mitochondrial 12S rRNA gene. Jpn. J. Trop. Med. Hyg., 31(1), 5-10 (2003)

9) Saito, T., Maeda, T., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T., and Asai, T. Characterization of hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Int. J. Parasitol. 32, 961-967. (2002)

10) Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkble genetic polymorphism among *Entamoeba histoltyica* isolates from a limited geographic area. J. Clin. Microbiol. 40, 4081-90.

11) Basombrio, M., Gomez, L., Padilla, A.M., Ciaccio, M., Nozaki, T., and Cross, G.A.M. (2002) Targeted deletion of the Gp72 gene decreases the infectivity of Trypanosoma Cruzi for mice and insect vectors. J.Paraistol. 88, 489-493

12) Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T.,Munday, C.J., Duszenko, M., Lazarus, M., Urade, Y., and Kubata, B.K. (2002) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H_2 in *Leishmania*. Int. J. Parasitol. 32, 1693-1700

13) Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O.S., Tanage, M., Matsuda, H., Kanazawa, T. Yamada, K., Kajima, J., and Ohta, N. Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *Schistotoma Japonicum* Infection. Proceedings of the 10th International Congress of Parasitology, 303-305, 2002.

14) Asahi, H., Stadecker, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schitosome infection (review). Parasitology International 52, inpress.

和文発表

1) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 原虫類と食品衛生（Protozoa and Food Hygine）食品衛生学雑誌. 43(6):J343-J347, 2002.

2) 鈴木敦子、市瀬正之、松江隆之、天野祐次、寺山 武、泉山信司、遠藤卓郎. 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況. 感染症学雑誌. 76(9):703-710, 2002.

3) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 飲料水と健康―現在問題となっている飲料水を介した感染症― 公衆衛生. 66(6): 458-461,2002.

4) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 水系によるクリプトス

ポリジウムとジアルジア感染の実態. 用水と廃水. 44(4):14-18, 2002.

5) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、小澤武文、赤尾信明、虫体の薄切標本を抗原とした酵素抗体法による旋尾線虫症の血清診断、Clinical Parasitology, 13(1), 98-101 (2002)

6) 川中正憲、杉山広、坂本京子、森嶋康之、升秀夫、村田以和夫、鈴木淳、霞ヶ浦地方のシラウオに寄生する横川吸虫メタセルカリアの調査、Clinical Parasitology, 13(1), 132-135 (2002)

7) 川中正憲、坂本京子、杉山広、森嶋康之、動物園、観光施設でのアライグマ回虫卵汚染問題、病原微生物検出情報、Vol.23, No8, 10-11, 2002

8) 川中正憲、杉山広、森嶋康之、アライグマ回虫による幼虫移行症、IDWR、通巻第4巻第42号、16-18、2002

9) 杉山 広、気をつけたい食品寄生虫、 食と健康、Vol.46(7) 8-15、2002

10) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(1)青海省のエキノコックス、BMSA会誌、Vol.14, No.2, 15-20, 2002

11) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(2)日本住血吸虫症の元流行地:広西チワン族自治区の寄生虫症、BMSA会誌、Vol.14, No.3, 15-21, 2002

12) 川中正憲、森嶋康之、中国西部寄生虫紀行(3)貴州省の土壌媒介線虫対策とバイオガストイレ、BMSA会誌、Vol.14, No.4, 19-25, 2003,

13) 川中正憲、「アライグマに寄生するアライグマ回虫の検査等のガイドライン」(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン」作成に関する研究) 分担研究報告書、 平成15年3月

14) 野崎智義 (2002) アメーバ症 小児科診療 診断と治療社 第65巻, 12号, 2132-2135.

15) 野崎智義 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012, 2002.

学会発表

1. 国際学会・集会

1) Izumiyama, S., Yagita, K., Hirata, T., Fujiwara, M. and Endo T. Inactivation of Girardia lamblia cycts by Ultraviolet Irradiation. 1st Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies for Water, Wastewater & Environmental Applications.(Singapore) Nov. 2002.

2) Kawanaka, M. and Ohigashi, H., Laboratory evaluation of potential plant molluscicides using *Oncomelania nosophora* . Emerging & Reemerging Parasitic Zoonosis in the Pacific Rim, Shanghai, 30.Oct – 2. Nov. 2002

2) Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondriate Protozoan Genome Sequnceing Projects: *Entamoeba histolytica, Trichomonas vaginalis,* and *Giardia lamblia.* Cambridge, U.K., May 20-21, 2002

3) Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nudeshima, M., Shigeta, Y., Hughes, M.A., Huston, C.D., Mann, B.M., and Petri, Jr., W.A. (2002) Isolation and partial characterization of Rab-interacting proteins from *Entamoeba histolytica*: toward the molecular understanding of Rab functions during phagocytosis. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.

4) Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) DNA fingerprinting of *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.

5) Okada, M., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., and Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.

6) Nozaki, T. and Ali, V. (2002) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in parasitic protozoa. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.

7) Kubata, B., Kabututu, Z., Nozaki, T., Lazarus, M., and Urade, Y. (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.

8) Nozaki, T. (2002) Proteomic analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Forum Cheju –8, The 5th Korea-Japan Parasitologists' Seminar, Oct 5-6, 2002

9) Asahi, H., Osman, A., LoVerde, P.T., and Stadecker, M.J. : Albumin precursor homologue is a novel T helper cell immunogenic egg component in murine infection with *Schistotoma mansoni*. The 50th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine nd Hygiene, USA, November 2001.

2. 国内発表

1) 八木田健司、泉山信司、相楽裕子、坂本光男、黒木俊郎、遠藤卓郎. C.parvum 遺伝子型 1 および遺伝子型 2 によるヒト重複感染例. 第 76 回日本感染症学会 2002 年 4 月.

2) 泉山信司、下河原理江子、八木田健司、遠藤卓郎. 高温耐性アメーバ類の浴槽からの検出. 第 2 回環境技術研究協会 2002 年 6 月.

3) 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. クリプトスポリジウムと遺伝子型別. 衛生微生物技術協議会第 23 回研究会 2002 年 7 月.

4) 下河原理江子、八木田健司、泉山信司、小村麻子、朝倉登喜子、遠藤卓郎. PCR と IEF による温水環境から得られた自由生活性 Naegleria 属アメーバの検出法の検討とその実際. 第 75 回日本生化学学会 2002 年 10 月.

5) 泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、遠藤卓郎. 紫外線によるジアルジアシストの不活化試験. 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.

6) 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. *Naegleria fowleri* と *N.lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較(2). 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.

7) 朝倉登喜子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. わが国で初めて分離された *Naegleria australiensis*. 第 35 回日本原生動物学会 2002 年 11 月.

8) 八木田健司、泉山信司、黒木俊郎、遠藤卓郎. 国内クリプトスポリジウム集団感染事例に関連した ELISA による抗体価調査. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.

9) 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎. *Naegleria fowleri* と *N.lovaniensis* のタンパク質の 2D-PAGE による比較(2). 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.

10) 泉山信司、八木田健司、朝倉登喜子、平田 強、藤原正弘、遠藤卓郎. 紫外線による *Giardia* シストの不活化試験. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.

11) 遠藤卓郎、朝倉登喜子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、小村麻子. わが国の温水環境より初めて分離された *Naegleria australiensis*. 第 72 回日本寄生虫学会大会 2003 年 3 月.

12) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、小澤武文、赤尾信明:虫体の薄切標本を抗原とした酵素抗体法による旋尾線虫症の血清診断、第 13 回日本臨床寄生虫学会大会, 2002 年 6 月

13) 川中正憲、坂本京子、杉山 広、森嶋康之、ミヤイリガイの実験室内殺貝効果試験法の改良、第 62 回日本寄生虫学会東日本大会、2002 年 10 月、新潟

14) 森嶋康之, 杉山 広, 川中正憲, アライグマ回虫による幼虫移行症の病原性:移行部位による発育差の検討, 第 72 回日本寄生虫学会大会, 2003 年 3 月, 久留米

15) 川中正憲、坂本京子、杉山 広、森嶋康之、動物園、観光施設におけるアライグマ回虫卵汚染問題、第 72 回日本寄生虫学会大会、2003 年 3 月、久留米

16) 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、東京 23 区を流れる荒川でのクロベンケイガニの採集と大平肺吸虫の検出、第 72 回日本寄生虫学会大会、2003 年 3 月、久留米

17) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内勤、野崎智義 (2002) ファゴサイトーシス初期に形成される EhRab5 と EhRab7 が局在する空砲は病原性因子の輸送に関与する 第 55 回日本細胞生物学会大会 May 22, 2002

18) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバ貪食における Rab エフェクター分子の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.

19) 岡田麻美 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバ貪食機構の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.

20) 岡田麻美、中野由美子、保田友義、野崎智義 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバの貪食機構の解析 第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (口頭、ポスター)

21) 所正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析:腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝 第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (ポスター)

22) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析第 75 回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002. (ポスター)

23) 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバにおける鉄ー硫黄クラスター生合成の特殊性 第 1 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、Oct 12-13, 2002

24) 中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおける Rab 機能の特殊性 第 25 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜、Dec 11-14, 2002

25) 中野由美子、保田友義、岡田麻美、櫛島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバに特異的なファゴサイトーシスを調節する Rab GTPase の解析 感染症若手研究者沖縄フォーラム 宜野湾、沖縄 平成 15 年 1 月 22-23 日

7. 感 染 病 理 部

部 長　佐 多 徹 太 郎

概　要

1. 人事等

平成 14 年 4 月の組織改編により、旧安全性研究部毒性病理室が感染病理部に移管され、第二室（感染病理室）となった。それとともに永田典代研究官と原嶋綾子が感染病理部に配置転換となった。ほか第一室（診断病理室）、第三室（実験病理室）、第四室（分子病理室）と改称された。旧免疫病理室は廃止されたので、４室体制のままである。第二室は村山分室に置かれ、ほか 3 室は戸山庁舎に置かれている。

平成 14 年 4 月から村山分室の透過型および走査型電子顕微鏡は村山庁舎の中央電顕機能を持つことになり、感染病理部第二室が運営にあたることとなった。平成 14 年 3 月に定年退職した波多野煜持氏に臨時職員としてオペレーターをお願いした。運営方法は戸山庁舎の電子顕微鏡と同様とした。

HS 流動研究員の田中道子研究官を４月１日付けで、北大獣医から 10 月 1 日付けで岩田奈織子研究官を採用した。また 10 月 1 日付けで片野晴隆主任研究官が第一室室長に昇任した。片野室長は平成 15 年 8 月 31 日まで米国 NIH に留学中である。徳永研三主任研究官は平成 14 年 1 月から平成 15 年１月までガーナ野口記念医学研究所に JICA expert として出張した。

2. 感染病理部の研究業務

感染病理部で行われた研究･業務の概要は次のとおりである。

I. 感染病理に関する研究
   1. 人体由来の病理検体におけるウイルス感染に関する研究
   2. ピコルナウイルスに関する研究
   3. HIV および SHIV の病理学的研究
   4. 血液疾患における起因ウイルスの解明
   5. ウイルス肝炎に関する研究
   6. ヘリコバクター・ピロリに関する研究
   7. 麻疹に関する研究

II. ウイルス感染の発症機序に関する研究
   1. ヘルペスウイルスに関する研究
   2. インフルエンザウイルスに関する研究
   3. HIV に関する研究
   4. ポックスウイルスに関する研究

III. ワクチンに関する研究
   1. インフルエンザワクチンに関する研究
   2. 痘瘡ワクチンに関する研究
   3. おたふくかぜワクチンに関する研究
   4. ポリオワクチンに関する研究
   5. 遺伝子組換えワクチンに関する研究

IV. プリオンに関する研究
   1. プリオン病診断系に関する研究
   2. プリオン病の病理学的研究

V. 厚生労働省共同利用機器
   1. 高分解能走査電子顕微鏡 S-5000 の運用

VI. 機器管理運営委員会機器
   1. 戸山庁舎透過型電子顕微鏡の運用
   2. 村山分室透過及び走査電子顕微鏡の運用

VII. 厚生労働科学研究等への参加状況

VIII. 国際協力への参加状況

IX. 協力研究員等の受入状況

X. 検査業務等への参加状況
   1. 検定検査
   2. 行政検査

研 究 業 績

I. 感染病理に関する研究

1. 人体由来の病理検体におけるウイルス感染に関する研究

国内外の医療機関ならびに医学教育施設より共同研究として、生検、手術、剖検組織材料におけるウイルス感染の有無について病理学的に検討している。2002 年に解析を依頼された人体由来の検体数は 78 例であった。その結果、現在までに水痘.帯状疱疹ウイルス感染 5 例、麻疹ウイルス感染 4 例、ヒトヘルペスウイルス感染 4 例を同定し、さらにサイトメガロウイルス、インフルエンザウイルス、パルボウイルス B19、ウエストナイルウイルス等、またクロイツフェルト･ヤコブ病も免疫組織学的あるいは分子病理学的に解析した。

（佐藤由子、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、中島典子、尾崎泰子、高橋秀宗、佐多徹太郎）

2. ピコルナウイルスに関する研究

(1) ピコルナウイルス感染症の感染病理学的診断法の開発

ピコルナウイルス感染症のなかで中枢神経系に病原性を発揮するため重要視されているエンテロウイルス 71（EV71）の感染病理学的鑑別診断法の開発を目的とした。EV71 と同様に手足口病の原因となるコクサッキーA16（CA16）と弛緩性麻痺を発症するポリオウイルス（PV）に的を絞り、これらのウイルスについてパラフィン切片での病理組織学的診断に有用なポリクローナル抗体と陽性コントロール組織標本を作製した。また、パラフィン切片から RNA 抽出を行い、RT-PCR 法によるウイルスゲノムの検出方法も確立した。これらはエンテロウイルスの感染が疑われる患者検体の診断の際に陽性対照として有用である。

（永田典代、佐藤由子、原嶋綾子、岩崎琢也［長崎大学熱帯医学研究所］、佐多徹太郎）

(2) ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス（TgPVR21）の粘膜感染モデル

TgPVR21 を用いてポリオウイルス（PV）粘膜感染モデルを開発し、PVの感染動態、病原性を解析するためにPV1型強毒株（OM株）、弱毒Sabin1 株およびワクチン由来変異株VDPVの 5 株を$\log 5\text{-}7 CCID_{50}$量、鼻粘膜に接種した。その結果、OM株あるいはVDPV株接種群は 5-9 日目に神経症状を呈し、その後死亡した。接種液量の検討とRT-PCRによって、上気道内で感染が成立していることが明らかとなった。一方でSabin1 株接種群はRT-PCRにより上気道でのウイルス増殖が証明されたが、発症例はなかった。本実験系はPV臨床分離株の神経病原性の解析、粘膜免疫学的研究への活用が期待される。

（永田典代、清水博之［ウイルス第二部］、網 康至［動物管理室］、波多野煜持［臨時職員］、原嶋綾子、佐藤由子、須崎百合子［動物管理室］、佐多徹太郎、倉田 毅、岩崎琢也［長崎大学熱帯医学研究所］、野本明男［東京大学］）

(3) 乳のみマウスを用いたエンテロウイルス 71 実験感染モデルの開発

エンテロウイルス 71（EV71）の神経病原性に関する感染実験動物は霊長類と齧歯類が報告されている。カニクイザルがEV71 の神経病原性の評価に適する動物であることは昨年度までに明らかにした。今年度は乳のみマウスに対しEV71 を脳内接種し病態の観察と病理学的解析を行った。生後 24 時間以内の動物を用いて EV71 脳内接種を実施したところ、4-6 日目に哺乳がわるくなり、脱水症状をきたし死亡した。病理学的に舌筋をはじめとする骨格筋への感染が証明され、舌の機能不全から哺乳障害が引き起こされると推測された。それは脳病変よりも急性であった。この感染モデルにおける死因のひとつとして舌筋への感染が明らかとなった。

（永田典代、佐藤由子、原嶋綾子、岩崎琢也［長崎大学熱帯医学研究所］、網 康至［動物管理室］、清水博之［ウイルス第二部］）

3. HIV および SHIV の病理学的研究

(1) HIV および SHIV 感染病理標本におけるウイルス核酸の局在の検討

昨年度に引き続き、*in situ* Hybr-AT-CSA 法を用いて、HIV および SHIV 感染病理標本におけるウイルス核酸の局在を調べた。免疫染色法との二重染色や共焦点レーザー顕微鏡による解析によって詳細な病理学的解析が可能となった。従来の RNA probe を用いた *in situ* hybridization 法と比較して特異性および感度に優れていることを示した。

（中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎）

(2) レーザーマイクロダイセクション（LMD）法を用いたSIV 感染病変内 SIV-DNA 局在の解析

感染症の病理組織を LMD 法で解析した。SIV 感染サルリンパ節の胚中心（GC）部分には CD35 陽性細胞（FDC）が局在し、ウイルス抗原および SIV-RNA が陽性であった。LMD 後の PCR 法による SIV-DNA の検出は GC 部分と GC 周囲とで明らかな差がみられなかった。SHIV 感染サルの脳でミクログリア結節に一致してウイルス抗原および SHIV-RNA が局在していたが、LMD-PCR 法では SHIV-DNA は両者ともから同様に検出された。これは LMD 法で切り取った部分それぞれに様々な細胞が混在していたことが原因と考えられた。LMD 法は腫瘍組織などの同一集団からなる細胞塊の解析には適当であるが、感染症組織への応用は工夫が必要であると考えられた。

（岩田奈織子、中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎）

4. 血液疾患における起因ウイルスの解明

骨髄の造血機能障害に由来する特発性造血障害ならびに特発性血小板減少症の発症と経過に関与するウイルス性病原体を検索する目的で HHV-8 の関与について検討した。臨床検体（骨髄、末梢血）計 58 検体について DNA を抽出し、HHV-8 の minor capsid 遺伝子の 233-bp を増幅する 1st PCR とその内部の 153-bp の増幅産物を得る nested PCR により HHV-8 ゲノム DNA の検出を試みた。その結果 1st PCR では陽性産物は得られなかった。従って血液疾患と HHV-8 の関連性については低いと考えられた。

（尾崎泰子、佐藤由子、佐多徹太郎）

5. ウイルス肝炎に関する研究

(1) ベトナムにおける HBV core 遺伝子変異株の流行

HBV core 遺伝子の変異は、肝病態と関わっていることが報じられている。そこで、HBV 流行国の一つであるベトナムにおける調査を実施した。HBV 感染患者 112 例を対象とした。その結果、basal core promoter（BCP）における変異（A1762T/ G1764A）が 58.9%、pre-core（PC）領域における変異（G1896A: stop codon mutation）が 33%と高率に検出された。臨床所見から比較すると、急性肝炎 36 例では、BCP が 41.6%、PC が 27.7%だったのに対し、慢性肝障害 71 例では、各々70.4%、35.2%であった。BCP 変異は、ALT 高値例と肝硬変・肝癌患者で高率に出現した。また BCP 変異は、HBV ゲノタイプ C で有意に高率であっ

たのに対して、PC 変異はゲノタイプ B で高率であった。以上の成績から、core 遺伝子に変異を有する HBV 株がベトナムにおいて流行している実態が明らかとなった。この所見は、HBV 変異株と肝病態の関連を解明する上で、重要である。

（Huy TT Tran［協力研究員］、Vo Xuan Quang［ベトナム・ホーチミン市 チョーライ病院］、Trinh Thi Ngoc［ベトナム・ハノイ バックマイ病院］、阿部賢治）

(2) Occult HBV に関する研究

HBs 抗原陰性だが、PCR 法にて HBV DNA が陽性となる症例（occult HBV）の解析を実施した。HBs 抗原陰性 125 例の肝癌患者から得られた肝組織において、その 35.2%で肝内 HBV DNA が検出された。また血中 HBV 関連抗原抗体全陰性例においても、21.7%で肝内 HBV DNA が検出された。以上の成績から、臨床的に HBV 陰性肝癌と診断された症例であっても、肝内には HBV が潜んでいる事実が示された。

（丁 欣［流動研究員］、朴 永年［韓国・延世大学医学部病理］、Teresa C. Taltavull［スペイン・ベルビテェジュ病院肝移植科］、金 暁明［ハルピン医科大学病理］、Nguyen S. Trung［ベトナム・ホーチミン医科薬科大学病理］、Swan N. Thung［米国・マウントサイナイ医療センター病理部］、佐藤由子、阿部賢治）

(3) 東京地区住民における E 型肝炎ウイルス(HEV)感染の疫学調査

東京地区に在住する小児 246 例、健康成人 200 例、肝疾患患者 449 例、血液透析患者 60 例、医療従事者 87 例、計 1,042 例を対象とした。HEV 抗体測定は、李らにより開発された組換えウイルス様中空粒子（カプシド領域）を用いた ELISA 法で行った。その結果、HEV IgG 抗体が、小児はゼロ、健康成人 3%（6/200）であったのに対して、肝疾患患者では、15.6%（70/449）と有意に高率であった。血液透析患者では 30%（18/60）、医療従事者では 9.2%（8/87）と健康成人に比べて有意に高率であった。IgM 抗体は、小児の 1 例（急性胃腸炎＋肝機能異常）にのみ観察された。HEV IgG 抗体の年代別陽性率は、15 歳以下の小児ではゼロ、16〜30 歳が 6%（5/84）、31〜40 歳が 7.7%（10/130）、41〜50 歳が 11.8%（15/127）、51〜60 歳が 17.2%（25/145）、61 歳以上が 14.2%（17/120）であった。HEV 抗体陽性を示した症例において、HEV 流行地域への明らかな海外渡航歴は認められなかった。

（丁 欣［流動研究員］、李 天成［ウイルス 2 部］、正木尚彦［国立国際医療センター消化器科］、林 茂樹［国立病院東京災害医療センター］、阿部賢治）

(4) 国内野生ラットにおける HEV 抗体保有の実態調査

E 型肝炎ウイルス（HEV）の動物宿主を探り、ヒト肝炎との関連を明らかにすることを目的とした。本研究では、国内の野ネズミにおける HEV 感染の可能性について調査した。その結果、HEV IgG 抗体がドブネズミ 114/362（31.5%）及びクマネズミ 12/90（13.3%）で陽性を示した。ドブネズミにおける陽性率は、クマネズミと比べ有意に高率であった（$p<0.001$）。これに対し、マウス種では全例陰性であった。ドブネズミにおける感染率は、体重と共に増加した。つまり、体重 100g 以下では 16%であったが、101-200g で 34.2%、201g 以上では 44.9%と急激に上昇した。国内各地に生息する野生ラット種間において、HEV 感染が蔓延している可能性が示唆された。国内での HEV 感染源として、今後考慮する必要がある。

（平野 真［流動研究員］、李 天成［ウイルス 2 部］、川端寛樹［細菌 1 部］、阿部賢治）

(5) 各種霊長類における HEV 抗体保有の実態調査

最近国内で散発している E 型肝炎の感染経路解明の一環として、日本に生息する野生ザルおよび輸入ザルにおける HEV の感染実態を調査した。その結果、HEV IgG 抗体が以下の 4 種の霊長類に検出された。ニホンザル（84/232; 36.2%）、カニクイザル（2/19; 10.5%）、アカゲザル（3/83; 3.6%）、タイワンザル（1/1; 100%）である。ニホンザルの年齢別における抗体獲得率をみると、1〜2 歳 4.2%、3〜4 歳 21.1%、5〜6 歳 29.6%、7 歳以上 38.5%と加齢と共に上昇した。高い感染率を示したニホンザルの群別と捕獲された場所別での感染率を比較した結果、広い地域に亘り感染が認められたが、抗体陽性率（最高値 66.7%）は地域別で明らかに異なり、北部地域でやや高い傾向を示した。マカカ属サル類が自然界での HEV 宿主として重要と思われた。

（平野 真［流動研究員］、李 天成［ウイルス 2 部］、中村伸［京都大学霊長類研究所］、阿部賢治）

6. ヘリコバクター・ピロリに関する研究

胃癌発生とヘリコバクターピロリに関する感染病理学的研究

胃癌発生とヘリコバクターピロリ（HP）の間には、密接な関係があるとされている。特にアジアでは、全癌発生率中、胃癌が常に上位を占めており、その要因解明が重要な課題となっている。そこで、まず日本人における胃癌患者から外科的に摘出されたホルマリン固定パラフィン包埋組織 54 例を用いて、HP ゲノムの検出を試みた。その結果、48 例（89%）で HP DNA（16S 領域）が検出された。PCR 産物の特異性は塩基配列解析によって確認できた。病理組織所見は、adenocarcinoma 44 例（early 4 例、advanced 6 例）、signet ring cell carcinoma 2 例、scirrhous carcinoma 1 例、mucinous carcinoma 1 例であった。この問題を更に発展させるために、現在韓国・中国・ベトナム・ミャンマーにおける両者の関係を地理病理学的観点から解析中である。民族的要因と病原体要因の両側面からアプローチしたい。（阿部賢治、岩城陽子［協力研究員］、佐藤由子、丁 欣［流動研究員］、Huy TT Tran［協力研究員］、斉藤 澄［国立国際医療センター臨床検査部病理］）

7. 麻疹に関する研究

麻疹母児感染例からのウイルス分離と遺伝子型の決定

近年日本では、成人麻疹例が問題となっている。そこで

最近経験した麻疹母子感染例について検討した。症例 1（2001 年）は妊娠 27 週で母親が麻疹に罹患し、早産児、極低出生体重児、呼吸窮迫症候群を合併、敗血症、痙攣などの重篤な中枢神経症状を呈して生後 4 ヶ月で死亡した。症例 2（2002 年）は、母親が妊娠 35 週で麻疹に罹患、早産児、低出生体重児を合併し、出生後に麻疹を発症した。両症例の胎盤組織に免疫染色で麻疹ウイルス抗原陽性を示した他、PCR 法にて、同ウイルス RNA が検出された。さらに、PCR 産物の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った結果、その遺伝子型は 2001 年に日本で初めて検出された H1 型であることが立証された。また症例１に関しては脳基底核よりウイルス RNA が分離され、胎盤由来ウイルスと全く同じ塩基配列を有していた。重篤な中枢神経症状が麻疹ウイルスによるものであることが強く示唆された。

（早川依里子［協力研究員］、佐藤由子、丁 欣［流動研究員］、Huy TT Tran［協力研究員］、佐多徹太郎、阿部賢治）

II. ウイルス感染の発症機序に関する研究

1. ヘルペスウイルスに関する研究

(1) 慢性活動性エプスタイン・バーウイルス（EBV）感染症の発症機序の解明

慢性活動性 EBV 感染症は持続感染している EBV が再活性化を繰り返すことにより発熱や全身リンパ節腫脹、肝脾腫などの症状が持続し、ときに T 細胞のクローン性増殖を伴う予後不良の疾患である。この疾患のひとりの患者に細胞溶解蛋白の一種である perforin をコードする遺伝子に変異があることを見出した。この変異は perforin 蛋白のプロセッシングを阻害し、細胞内にその前駆体の蓄積を引き起こす。このため患者の細胞障害性 T 細胞、NK 細胞の機能が低下していた。これらの事実は perforin の遺伝子異常が一部の慢性活動性 EBV 感染症患者において宿主側の要因になっていることを示唆する。

（片野晴隆、Jeffrey Cohen［NIH, U.S.A.］）

(2) HHV-8 の病原性の解明について

HHV-8 は AIDS に合併するカポジ肉腫や PEL の原因ウイルスであり、発ガンウイルスであることが強く示唆されている。HHV-8 の ORF は 80 個以上存在し、それぞれのタンパクの機能については不明なことが多い。 今回、潜伏感染関連遺伝子と融解感染関連の前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子から 7 種類の遺伝子を選択し、TaqMan real-time PCR 法による mRNA の発現定量システムを構築した。HHV-8 持続感染株化細胞（TY-1）に TPA を投与しガン化を誘導し経時的に mRNA の発現の動向を調べた結果、誘導直後に前初期遺伝子が高発現し後に初期遺伝子と後期遺伝子が発現すること、潜伏感染関連遺伝子は安定であることが観察された。このシステムを用いて HHV-8 陽性のカポジ肉腫患者 3 名の病変部組織から抽出した mRNA について HHV-8 の mRNA の発現動向を調べた結果、2 例で vIL-6 の高発現が観察された。

（尾崎泰子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎）

(3) HCMV 粒子中のテグメント蛋白質と特異的に結合する宿主細胞蛋白質の同定に関する研究

これまでに HCMV 粒子と結合する宿主細胞蛋白質の一つとして小胞体 p180 蛋白質を同定し、HCMV 感染許容細胞において p180 が高発現されていることを見いだした。さらに、p180 蛋白質と結合する HCMV 粒子中の蛋白質を overlay assay 法により検索したところ、ウイルス粒子中のテグメント構造に存在する分子量 250kDa の UL48 蛋白質（pUL48）との特異的相互作用が明らかになった。免疫沈降法によっても p180 と pUL48 の相互作用が、感染細胞及び pUL48 強制発現細胞の両方で観察された。その結果、p180 蛋白質はテグメント蛋白質との特異的相互作用を介して HCMV 粒子と結合することが判明した。

（後藤希代子［協力研究員］、佐多徹太郎、倉田 毅）

(4) より簡便で迅速な大腸菌内での組み換え単純ヘルペスウイルス（HSV-1）ゲノム作製法の開発

単純ヘルペスウイルス（HSV-1）は、遺伝子治療ベクターとしても注目されている。最近、巨大なウイルス遺伝子を大腸菌にクローニングする BAC system が開発された。我々は現段階ではまだ克服されていない HSV-BAC vector の持ついくつかの問題点を克服し、より簡単に作製でき、応用範囲の広い HSV-BAC vector を作製することを試みた。その結果、感染性 HSV-1 クローンを保持した大腸菌の作製に成功し、現在これをもとに大腸菌内での様々な HSV-1 ゲノム改変法の開発を試みている。

（田中道子、川口 寧［客員研究員、名大医ウイルス感染］、佐多徹太郎）

2. インフルエンザウイルスに関する研究

(1) インフルエンザウイルス感染阻害剤の開発

インフルエンザウイルスのヘムアグルチニンタンパク質（HA）に特異的に結合するペプチドを合成し、感染阻害薬として有効であるかをインフルエンザウイルスの上気道感染のマウスモデルを用いて検討した。*in vitro* の実験において感染阻害効果を示した 2 種類のペプチドを含有したリポソームを、HA1 亜型または HA3 亜型の HA をもつインフルエンザウイルスを上気道感染させたマウスに 8 回経鼻投与した。その結果、両方の亜型の HA を持つウイルス株に対して感染阻害効果が認められた。

（尾崎泰子、角 真智子［慶応大、実習生］、田村慎一［客員研究員］、佐多徹太郎）

(2) 自然免疫刺激によるインフルエンザウイルス感染の抑制

インフルエンザウイルス感染に対する宿主の防御反応は主に抗体応答及び CTL 等の獲得免疫が担っている。しかし感染の初期においては、上気道粘膜の自然免疫が感染予防に重要な働きをしていることが考えられる。今回自然免疫の刺激として TLR(Toll like receptor)3 の ligand である

合成 2 本鎖 RNA, poly(I:C)を用いた。BALB/c マウス（メス, 6 週齢）に poly(I:C), LPS, CTB*を経鼻接種し、その 6 時間、1 日、3 日、7 日後にインフルエンザウイルス（PR8, H1N1）を感染させた。感染 3 日後の鼻洗浄液を回収しウイルス感染価を plaque assay で測定した。同様に、マウスの鼻腔領域から mRNA を回収しウイルス感染防御に関連する遺伝子の発現を RT-PCR 法で調べた。Poly(I:C)、LPS 経鼻接種群においては投与後早い時期の 6 時間後、1 日後にインフルエンザウイルスを感染させた時に、CTB*では投与 3 日後に感染させた時に、最もウイルス感染価の抑制効果がみられた。また、RT-PCR 法の結果より、インフルエンザウイルスの感染を抑制した時期に一致して IFN-γ の発現量の増加がみられた。

（長谷川秀樹、渡邉 泉［研究生、東京理科大］、一戸猛志［研究生、東京理科大］、伊藤智史［実習生、東京理科大］、高橋秀宗、田村慎一［客員研究員、大阪大学微生物病研究所］、倉田 毅、佐多徹太郎）

(3) pIgR 欠損マウスを用いた分泌型 IgA 抗体の交叉感染防御における役割の検討

分泌型 IgA 抗体の粘膜上への輸送能に欠損のある pIgR ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて、異なる抗原性（B/Victoria 系統および B/Yamagata 系統）を持つ 5 株の B 型インフルエンザワクチンを経鼻免疫し 4 週後に B/Victoria 系統のウイルスをチャレンジし防御効果を比較した。野生型マウスでみられる抗原性の異なる株に対する交叉防御能がノックアウトマウスでは IgA 抗体分泌の欠損により成立しなくなることが明らかとなった。免疫方法を皮下接種にした場合は、血清中に IgG 抗体は誘導されるものの分泌型 IgA 抗体は検出されず交叉防御は全くみられなかった。B 型インフルエンザの抗原変異株に対する交叉防御には分泌型 IgA 抗体が重要であることが示唆された。

（尾崎泰子、田村慎一［客員研究員］、佐多徹太郎）

(4) リアルタイム定量 PCR 法を用いたインフルエンザウイルス感染動態の検討

インフルエンザウイルスゲノムを高感度に検出できる QPCR 法を用いて、感染マウスの上気道におけるウイルスの動態を分析した。マウスに A/PR/8/34 ウイルスを初感染、又は初感染後 4 週間経てから再感染させ鼻腔洗浄液を経時的に回収した。そしてウイルス RNA コピー数を QPCR 法で定量した。初感染 4 週間後のマウスに再感染すると、初感染の対照群と感染後 12 時間目までは差が無いが、24 時間目頃から再感染群ではウイルスの RNA コピー数が減少しはじめ、やがて検出されなくなった。事前にウイルス感染によって免疫が成立していたマウスは、ウイルスの再感染時には粘膜上に分泌されている抗体が速やかにウイルスと結合してその増殖を阻止することが示唆された。

（吉河智城［協力研究員、東大・医・院］、田村慎一［客員研究員］、佐多徹太郎）

(5) 老齢マウスにおけるインフルエンザ再感染に対する防御効果

若齢時（6 週齢）にインフルエンザウイルス PR8(H1N1)、A/山形（H1N1）、A/貴州（H3N2）もしくは B/茨城（B 型）を微量接種（40LD50; 1μlx2）した老齢 BALB/c マウス（メス）に PR8 を再感染（40LD50; 20μl）させた。このとき同時にそれぞれのウイルスに初感染させた若齢マウス群も設け、PR8 再感染 3 日後、上気道の指標として鼻腔の、下気道の指標として肺の洗浄液を採取し、それぞれのウイルス価をプラーク法により検討した。各洗浄液および血清中の抗体価は ELISA 法により解析した。その結果、①若齢時に PR8 を感染させたマウスでは、老齢時の PR8 再感染に対し完全な防御を示した。②若齢時に感染ウイルスと型が同じで異なる株の A/山形を感染させたマウスでは、老齢時の PR8 再感染に対し部分的な交叉防御を示した。③若齢時に亜型が異なる A/貴州や型の異なる B/茨城を感染させた群では、PR8 再感染に対する交叉防御は認められなかった。④若齢マウスにおいては、初感染に PR8 を用いた群では完全な、A/山形を用いた群では上気道では完全な、下気道では部分的な防御が認められた。⑤A/貴州を初感染させた群では下気道では交叉防御が認められなかったが、上気道では部分的な交叉防御が認められた。以上の結果から若齢時の感染による免疫記憶は老齢時まで維持されているが、交叉防御能は若齢マウスよりも低下していることが示唆された。

（浅沼秀樹［東海大・工、協力研究員］、田村慎一［客員研究員］、尾崎泰子、佐多徹太郎）

3. HIV に関する研究

(1) HIV-1 粒子出芽とゲノム RNA に関する研究

HIV-1 粒子出芽前後におけるゲノム RNA の性状変化と宿主因子の関係を解析した。ゲノム RNA は細胞中で安定であるが、粒子中ではニックにより断片化していることが判明した。ニックは RNase によるものではなく、ヘアピンループの一本鎖部分に特異的に生じ、ウイルスのヌクレオカプシド蛋白によってエンハンスされると考えられた。宿主因子として topoisomerase I の RNA ライゲース活性は安定性保持に重要であると考えられた。RNA ライゲース活性を失ったミュータントは細胞中のウイルス RNA の安定性、粒子の感染性を低下させた。mRNA の安定性を調節する機構により HIV-1 RNA も調節されていると考えられた。

（前田才恵［協力研究員、科学技術事業団］、高橋秀宗）

(2) SIV 脳症の *in vitro* 実験系の開発

サル胎児脳より神経幹細胞を分離培養し、これを用いて SIV 脳症の発症機序及び病態を解析する *in vitro* 実験系の開発を試みている。神経幹細胞を適当な培養条件で分化させるとアストロサイト、ニューロンを含む混合培養系が得られる。分化誘導前、後の神経幹細胞は mRNA レベルで CD4、CXCR4、CCR5、CCR3、APJ が陽性、FACS 解析では CXCR4 および CCR5 が陽性であった。また SHIV89.6PD が分化後の神経幹細胞に感染することがわかった。現在い

ろいろな tropism の env を有する SIV-GFP ウイルスを作製しており、これらの感染性を解析する予定である。脳固有細胞の中で唯一 productive な感染をすると考えられているマイクログリアが混在しない系で、ウイルスがどのような動態を示すか明らかにしたい。
（中島典子、岩田奈織子、佐藤由子、前田才恵、徳永研三、高橋秀宗、佐多徹太郎）

(3) HIV 侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性

HIV は Env とリセプターの結合・膜融合・脱殻を経て感染する。この侵入効率には種々のウイルス側・細胞側因子の関与が考えられるが、生細胞全体を用いた従来法での解析は困難である。そこで、*in vitro* 無細胞解析系の樹立を試み、①リセプター群を含む細胞膜画分を調整し、②非感染性粒子を除去した精製 HIV 画分とインキュベーションして、③Env 特異的に、④CD4 特異的に、⑤X4/R5 コリセプター特異的に、⑥温度依存的に、p24 が HIV 粒子から遊離する in vitro HIV 侵入反応系を確立した。
（原田貴之［流動研究員･HS 財団 RR］、巽 正志［獣医科学部］、佐多徹太郎、小島朝人）

(4) HIV-1 の逆転写酵素を阻害する抗体遺伝子を使った治療技術の開発

HIV-1 の逆転写酵素（RT）を阻害する一本鎖抗体断片（ScFv）を細胞内抗体（イントラボディー）として発現している昨年度報告の培養細胞株に HIV-1 を感染させ、ウイルス複製に対する阻害効果を解析した。抗体を発現している細胞では p24 産生と感染性ウイルスの産生が抑制されるのが明らかになった。細胞内抗体は感染後の逆転写、ウイルス粒子に組み込まれる RT の活性、あるいは組込みを阻害しているものと推察される。
（大場浩美［協力研究員］、千葉 丈［東京理科大学］、佐多徹太郎、小島朝人）

(5) HIV-1 感染における細胞形質膜主要成分スフィンゴミエリンの役割

これまで細胞形質膜の主要成分であるスフィンゴミエリン（SM）の無毒化プローブを開発してきた。このプローブを用いて細胞形質膜にある SM を集合させると、細胞の活性化が誘導され、7 回膜貫通受容体の下流に位置する GTP 結合蛋白質を経由することが示唆された。HIV-1 の感染にはコレステロールを主成分とする脂質ラフトの役割が重要であることも考え併せ、このプローブを用いて SM が HIV-1 感染にどのような役割を果たしているか検討を加えている。
（清川悦子［協力研究員］、佐多徹太郎、小島朝人）

(6) HIV-1 ガーナ株のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性に関する研究

従来のプロテアーゼ阻害剤がアフリカの HIV-1 サブタイプに対しても有効か否かを検証するため、患者由来のプロテアーゼ遺伝子が挿入可能なルシフェラーゼ HIV-1 カセットベクターを構築した。HIV-1 臨床分離株由来のプロテアーゼ遺伝子をカセットベクターに挿入してプロテアーゼ組み換えウイルス DNA を計 45 クローン作製した。同様に 7 人の患者血清より RT-PCR で各 5 クローンずつ計 35 クローン作製した。また gag 領域の Heteroduplex mobility assay を行ってサブタイピングを行ったところ、22 検体中サブタイプ A が 12、G が 4、A/G が 6 検体であった。更にプロテアーゼ遺伝子の系統樹解析の結果、グループ分けができることが明らかになった。即ちサブタイプ B・D・F および C は同じ近縁グループに属し、A・G および A/G はそれらのグループからかなり離れたところに別のグループを形成することが判明した。現在のプロテアーゼ阻害剤が遺伝子レベルでかなり異なるガーナタイプのプロテアーゼに対して、サブタイプ B 同様には効果を示さない可能性が高まった。
（徳永研三、Regina Appiah-Opong ［ガーナ野口研］、佐多徹太郎）

4. ポックスウイルスに関する研究

識別のための特異的 in situ ハイブリダイゼーション試験法の開発

ポックスウイルス（ワクシニアウイルス WR, LC 株、鶏痘、鳩痘）感染細胞中に形成される CPE, プラークがどのウイルス由来であるか識別するための一手法として、特異的な *in situ* ハイブリダイゼーション法の開発を進めている。これまでに、各ウイルスの遺伝子ゲノム解析を行なって特異的 DNA 配列を探索し、次いで、合成 DNA あるいはクローン化 DNA を順次調整した。現在、これらをプローブに用いてハイブリダイゼーションの特異性等を検討している。
（安田幹司［協力研究員］、佐多徹太郎、小島朝人）

III. ワクチンに関する研究

1. インフルエンザウイルスワクチンに関する研究

(1) 新型インフルエンザ H5N1 ウイルスワクチンの経鼻免疫による感染防御効果

新型インフルエンザ H5N1 のパンデミックに備えたワクチン開発の一環として、H5N1 型の不活化ワクチンを CTB*（微量のコレラトキシンを含むその B サブユニット）をアジュバントとして BALB/c および B10 マウスに経鼻投与し、強毒型 H5N1 ウイルス株のチャレンジ感染に対する防御効果と免疫応答性を検討した。経時的な体重変化と生存、鼻腔洗浄液と血清中の抗体価を調べた結果、少量のワクチン（蛋白量 0.1～0.5μg）投与で IgA および IgG 抗体価が上昇し、高い防御効果（90～100%生存率）が観察された。
（尾崎泰子、田村慎一［客員研究員］、板村繁之［ウイルス 3 部］、佐多徹太郎）

(2) ワクチンを投与したマウスの気道における抗 HA-IgA

および IgG 抗体のインフルエンザ肺炎に対する防御上の役割

インフルエンザウイルス不活化ワクチンをCTB*と共に経鼻投与したマウスの気道の様々な部位について抗HA-IgA および IgG 抗体の分布と濃度を測定した。その結果、致死的なインフルエンザ肺炎の防御には粘膜の IgA 抗体よりも肺胞上皮に分布する IgG 抗体が重要であることが明らかとなった。
（伊藤玲子［協力研究員］、尾崎泰子、田村慎一［客員研究員］、佐多徹太郎）

(3) 経鼻粘膜ワクチンの新規アジュバントの開発

経鼻インフルエンザワクチンは粘膜局所への交叉防御能を持つ特異的 IgA の誘導によりインフルエンザ感染の防御を行う。しかし効果的な粘膜免疫応答を誘導するには鼻粘膜に投与するアジュバントが必要である。インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)を補体成分である C3d と融合させた sHA-mC3d3 を作製し BALB/c マウスに 4 週間隔で 2 度経鼻接種した。補体分子 C3d を HA 抗原と融合させることにより CTB*を用いずに HA 特異的 IgA, IgG 抗体の誘導が可能となり、インフルエンザウイルスの感染に対して感染防御でき、C3d が新しい分子アジュバントとして有効であることが示された。
（長谷川秀樹、渡邉 泉［研究生、東京理科大］、一戸猛志［研究生、東京理科大］、伊藤智史［実習生、東京理科大］、高橋秀宗、田村慎一［客員研究員、大阪大学微生物学研究所］、倉田 毅、佐多徹太郎）

2. 痘瘡ワクチンに関する研究

組織培養弱毒痘瘡ワクチンの有効性に関する検討

我国 LC16m8 ワクチン株の分子遺伝学的及び感染免疫学的検討を試みた。LC16m8 株が WHO の痘瘡根絶採用株（Lister 株）から弱毒 LC16mO 株を経て樹立された過程をゲノム塩基配列変遷から解析するため、大量のウイルス培養・精製・ゲノム DNA 抽出を行い塩基配列解析チームに提供した。また、ワクチン効果を検討するため強毒・向神経性ワクシニア株に対するマウス感染防御比較実験を開始した。他方、巨大ウイルス全ゲノム DNA を部分化して安定にプラスミドに保存する事を試み、Lister、LC16m8 株各々7, 11 の Hind III クローンを回収した。
（小島朝人、長谷川秀樹、尾崎泰子）

3. おたふくかぜワクチンに関する研究

乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの神経毒力試験における問題点

弱毒生おたふくかぜワクチンの安全性確認試験のひとつである神経毒力試験の改良法について、海外のワクチン 1 株と日本のワクチン 1 株およびワクチン由来の継代株、また患者由来臨床分離株 2 株の合計 5 株の神経毒力について乳のみラットを用いて比較検討した。10^2PFU/10μlを脳内接種し、接種後 3, 6, 9 日目の脳乳剤のウイルス量測定と 6, 30 日目の病理組織学的検索を行った。患者由来 2 株とワクチン継代株接種群の脳組織で有意なウイルス増殖と病変の発現がみられ、30 日目には重度な脳室の拡張がみられた。弱毒生ワクチンと、患者分離株およびワクチン継代株接種群間でウイルス増殖と病変に差が認められ、本試験の妥当性が示唆された。また、海外の株と日本のワクチン株の弱毒化は同等であることが判明した。
（永田典代、佐藤由子、原嶋綾子、佐多徹太郎、加藤 篤［ウイルス第 3 部］、荻野倫子［ウイルス第 3 部］）

4. ポリオワクチンに関する研究

ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス（TgPVR21）を用いた Sabin 株由来不活化ポリオワクチンの免疫効果に関する研究

不活化した弱毒生ポリオワクチン Sabin1 株の免疫原性を明らかにするために、TgPVR21 を用いて免疫—攻撃実験を行った。不活化ポリオワクチン（IPV）を TgPVR21 の皮下に 3 回免疫した結果、免疫 3 週後の血中中和抗体価とポリオウイルス特異 IgG 抗体が誘導された。さらに PV1 強毒株である Mahoney 株の経鼻感染および脊髄内感染に対する防御効果を検討したところ、免疫群と非免疫群で有意な差がみられた。本研究によって、Sabin1 由来 IPV の効果が *in vivo* で初めて明らかとなり、強毒 Mahoney 株の感染防御に十分な免疫原性を有することが証明された。
（永田典代、波多野煜持［臨時職員］、原嶋綾子、岩崎琢也 ［長崎大学熱帯医学研究所］）

5. 遺伝子組換えワクチンに関する研究

中和抗原粒子持続産生 J12#26 細胞株を用いた新世代日本脳炎ワクチンの開発

製造にウイルス不使用の安全な次世代ワクチン開発のため、JEVcDNA 高発現 J12#26 細胞株の無血清培地馴化を試みた。馴化 J12#26SF 細胞は形態・増殖・継代安定性に変化なく、抗原産生量も馴化前と同等で、培地交換で同量以上を再生産した。無血清培養液 500ml から、限外濾過・Sephacryl S-300・蔗糖密度勾配・Sepadex G-25 分画で、蛋白量約 1mg、ELISA 抗原価約 10mg 現行ワクチン当量が回収され、SDS-PAGE・蛋白蛍光染色及びイムノブロットで高精製度が確認された。精製抗原の小型球形粒子形態が電子顕微鏡で観察された。
（小島朝人、武藤栄次［研究生］、田中恵子、安田斡司［協力研究員］、干川就可［協力研究員］、倉田 毅、佐多徹太郎）

IV. プリオンに関する研究

1. プリオン病診断系に関する研究

BSE のバイオアッセイおよび発症病理解析を目的としてウシプリオン蛋白発現トランスジェニックマウスの作製を目標とした。ウシ DNA よりプリオン cDNA となるエクソンを増幅しシークエンスを確認した。プリオン遺伝子のエクソン DNA を哺乳類細胞発現ベクターへ移し、

HeLa 細胞で発現をウエスタンブロットによって確認した。同じベクターを用いてトランスジェニックマウス作製を開始した。

一方、14-3-3 蛋白のガンマアイソタイプがプリオン病の患者脊髄液中において30ng/ml程度の異常高値をとることから、外部医療機関からの依頼脊髄液サンプル中の 14-3-3 蛋白を定量し、脳細胞の破壊状況を推測した。

（前田才恵［協力研究員、科学技術事業団］、高橋秀宗、佐多徹太郎）

2. プリオン病の病理学的研究

実験動物を用いたプリオンタンパクの存在様式及び動態についての病理学的解析

血液細胞によるプリオン伝播を実験動物において病理学的に解析することを目的とする。特に血液細胞とリンパ装置のろ胞樹状細胞 FDC、正常プリオン及び異常プリオンの相互関係について着目していく。今年度は感染実験に先立ち、実験動物であるマウス、ラット、カニクイザルにおける正常プリオンの局在について調べることを目的とし、免疫組織化学に使用する抗体を選択した。また、リンパ節、脾、脳組織における抗原局在を確認した。カニクイザル脾組織では正常プリオンの発現は B 細胞領域のろ胞中心で、FDC と関連することを示し、ヒトモデルとなり得ると考えられた。

（永田典代、原嶋綾子、岡田義昭［血液・安全性研究部］）

V. 厚生労働省共同利用機器

1. 高分解能走査電子顕微鏡 S-5000 の運用

平成 14 年度も順調に運用された。本年度中に処理した検体数は 262 検体で、その内訳は感染研内部 173 検体、外部との共同研究 54 検体、外部のみ 35 検体であった。外部のみが増えたのは組織（口腔科学部）の異動によるものである。（齋藤典子［臨時職員］）

VI. 機器管理運営委員会機器

1. 戸山庁舎透過型電子顕微鏡の運用

平成 14 年度は 23 件の検索を行った。うちネガテイブ染色検体は 52 件で、エポン包埋検体は 26 件でブロック数は 226 個となった。感染病理部、ウイルス１部、２部、遺伝子解析室、生物活性物質部、エイズ研究センター、筑波医学実験用霊長類センターが利用した。すべての検索は終了し写真を依頼者に返した。平成 15 年度からは消耗品を各依頼者に請求する予定である。

（田中恵子［流動研究員］、佐多徹太郎）

2. 村山分室透過及び走査電子顕微鏡の運用

村山分室会議の承認を得て、機器は研究所で維持し感染病理部第二室が運営を担当することになった。本年度から戸山庁舎電子顕微鏡利用方法に準じ、村山分室でも利用申請書の提出により職員が利用できるようになった。それに伴い利用者の幅が広がった。本年度の総依頼件数は 15 件であり、透過電子顕微鏡利用は 13 件、走査電子顕微鏡は 2 件であった。利用者は感染病理部の他、細菌第２部、ウイルス第２部、エイズセンターであった。走査電子顕微鏡の老朽化が激しく、観察に制限があったが平成 14 年度補正予算によって平成 15 年度の新規購入が決定した。

（波多野煜持［臨時職員］、永田典代、佐多徹太郎）

VII. 厚生労働科学研究等への参加状況

氏　名	研　究　事　業	課　題　名	主任研究者
佐多徹太郎	厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業	HIV 感染/AIDS の感染病態とその生体防御に関する研究班	竹森利忠
	厚生労働科学研究費 ヒトゲノム再生医療等研究事業	ウイルスベクターの安全性及び有効性を評価する実験系の開発及び標準化に関する研究	倉田　毅
	厚生労働科学研究費 がん克服戦略研究事業	ヒトがんウイルスによる発癌機序と免疫系によるがん細胞排除機構の解明	佐多徹太郎
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	感染症診断・検査手法の精度管理ならびに標準化およびその普及に関する研究	倉田　毅
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	食生活と環境の変化に伴う寄生虫・原虫疾患の対策と監視強化に関する研究	遠藤卓郎
	厚生労働科学研究費 医薬安全総合研究事業	海外において製造・使用されているワクチンの品質評価に関する研究	倉田　毅
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	大規模感染症発生時の緊急対応のあり方に関する研究	山本保博 (日本医大)
	創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業	エイズワクチン開発に関する研究	本多三男

	創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多徹太郎
	厚生労働科学研究費 特定疾患対策研究事業	特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究班	佐多徹太郎
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究	島田 馨 (東京専売病院)
	厚生労働科学研究費 肝炎等克服緊急対策研究事業	プリオン検出技術の高度化及び牛海綿状脳症の感染・発症機構に関する研究	佐多徹太郎
小島朝人	厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業	HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究	佐藤裕徳
	厚生労働科学研究費 エイズ医薬品等開発研究事業	HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究	本多三男
	創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人
	厚生労働科学研究費 特別研究事業	細胞培養痘瘡ワクチンの有効性に関する研究	倉根一郎
高橋秀宗	厚生科学研究費 特別研究事業エイズ対策研究事業	HIV-1 感染成立に関与する宿主因子の解析	佐藤裕徳
	厚生労働科学研究費 肝炎等克服緊急対策研究事業	プリオン病の高感度診断技術の開発	品川森一 (帯広畜産大学)
長谷川秀樹	文部科学省科学研究費 奨励研究 (B)	LIMPII、ユビキチン融合インフルエンザ DNA ワクチンによる免疫応答と感染防御	長谷川秀樹
	厚生労働科学研究費 特別研究事業	細胞培養痘瘡ワクチンの有効性に関する研究	倉根一郎
阿部賢治	創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢
	文部科学省科学研究費 基盤研究 (C) (2)	Simian TT ウイルス（s‐TTV）のヒト感染の分子疫学とその病態解明	阿部賢治
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	未知の感染症のリスク評価に関する研究	小室勝利
	厚生労働省 国際医療協力研究委託費	開発途上国におけるウイルス肝炎キャリアの実態および防御に関する研究	林 茂樹 (国際医療ｾﾝﾀｰ)
	文部科学省科学研究費 基盤研究 (B) 海外学術調査	アジアにおける母子感染症の分子疫学的研究（血液感染および経口感染ウイルスを中心にして）	牛島廣治 (東京大学)
田中道子	文部科学省科学研究費 基盤研究 (B)	BAC システムを用いた簡便な組み換えヘルペスウイルス作製法の開発	川口 寧 (東京医科歯科大学)
永田典代	厚生労働科学研究費 肝炎等克服緊急対策研究事業	血液中でのプリオンタンパク存在様式の解析と血液製剤からのプリオン除去の研究	岡田義昭
	文部科学省科学研究費 基盤研究 (B)	東アジア地域で流行しているエンテロウイルス 71 脳炎のウイルス学的・病理学的研究	清水博之

VIII. **国際協力への参加状況**

参加者	種 別	項 目	期 間
佐多徹太郎	JICA 国内委員	JICA ガーナ野口研感染症プロジェクト	1998-2003
	研修	第 5 回国際感染症等専門家養成研修講義(国立国際医療センター国際医療協力局)	2002.3.8
	研修	国際食品安全研修：BSE	2002.4.10, 10.10
	研修	第 9 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2002. 2.6
	研修	平成 14 年度ポリオ根絶計画ウイルス検査技術コース研修講師（国立感染研、JICA, WHO 西太平洋事務局）	2003.2.28

阿部賢治	厚生労働省・国際医療協力研究委託事業	「開発途上国におけるウイルス肝炎キャリアの実態および防御に関する研究」	2002.4－2003.3
高橋秀宗	研修	第 9 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2002. 2.6
徳永研三	JICA	ガーナ大学付属野口記念医学研究所での研究指導	2002.1.20-2003.1.20
長谷川秀樹	研修	第 9 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2002. 2.6
中島典子	研修	第 9 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2002. 2.6
永田典代	研修	平成 14 年度ポリオ根絶計画ウイルス検査技術コース研修講師（国立感染研、JICA, WHO 西太平洋事務局）	2003.2.28

IX. **協力研究員等の受入状況**

受入者	種　別	氏　名	研　究　課　題
佐多徹太郎	協力研究員	島崎加恵	感染症の病理学的研究
	協力研究員	熊坂利夫	呼吸器領域のウイルス病理学に関する研究
	協力研究員	小池　智	ピコルナウイルス感染の発症病理についての研究
	協力研究員	細沼美樹	ピコルナウイルス感染の発症病理についての研究
	協力研究員	安藤靖恭	眼科領域のウイルス感染に関する研究
	協力研究員	寺尾健一	眼科領域のウイルス感染に関する研究
	協力研究員	熊倉重人	眼科領域のウイルス感染に関する研究
	協力研究員	関　九美子	口腔内腫瘍のウイルス発がんについての研究
小島朝人	協力研究員	安田斡司	Gag VLP によるエイズワクチン開発について
	協力研究員	干川就可	組換えワクチン抗原の電子顕微鏡解析について
	協力研究員	大場浩美	抗-RT 単鎖抗体を用いた細胞内免疫法について
	協力研究員	清川悦子	HIV 感染における膜脂質の役割について
	流動研究員(平成 14 年 4 月―14 年 8 月)	原田貴之	HIV 感染の分子機構解析について
	協力研究員（平成 14 年 9 月―15 年 3 月）	原田貴之	同上
尾崎泰子	協力研究員	浅沼秀樹	老齢マウスのワクチンに対する免疫応答
	協力研究員	門脇信悦	粘膜インフルエンザ DNA ワクチンに関する研究
	協力研究員	伊藤玲子	小児ウイルス感染症の感染病理学的研究
	協力研究員	吉河智城	粘膜アレルギーの抑制に関する研究
	実習生	角真智子	インフルエンザウイルスの動物への感染阻害実験の手技・手法のトレーニングと阻害剤を用いた研究
高橋秀宗	協力研究員	前田才恵	ウイルス性脳障害の発症機構の解明と治療法の開発
長谷川秀樹	研究生	一戸猛志	インフルエンザ DNA ワクチンの開発に関する研究
	実習生	伊藤智史	インフルエンザ DNA ワクチンの開発に関する研究
	研究生	渡邉　泉	アジュバント併用経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発研究
阿部賢治	流動研究員	丁　　欣	肝炎ウイルスと肝癌発生に関する地理病理、分子病理学的研究
	流動研究員	平野　真	感染症領域における新しい遺伝子診断技術の開発
	協力研究員	Huy TT Tran	HBV 変異株の分子疫学的研究
	協力研究員	岩城陽子	TTV の感染病理学的研究
	協力研究員	早川依里子	小児科領域で重要な感染症に関する研究
	協力研究員	山口真理	感染症領域における新しい遺伝子診断技術の開発
	協力研究員	相羽直人	パルボウイルス B19 の感染病態に関する研究
	協力研究員	枝元良広	肝炎ウイルスと肝癌発生の関連に関する研究

X. 検査業務等への参加状況

1. 検定検査

神経毒力試験

２型ポリオワクチン１ロットについてサルによる神経毒力試験の病理組織学的検査を行い、試験品は合格した。この検定作業には第二室(感染病理室)を中心とし、感染病理部員全員が参加した。

2. 行政検査

本年度も引き続き BSE 確認試験（病理、免疫組織化学）を行った。平成 14 年 12 月末までにホルマリン固定されたウシ延髄組織計 60 検体を受付し、翌日には結果を返すことができた。ほとんどは陰性であったが、１例陽性例がみつかり、食肉衛生検査所の協力でほぼ全身の臓器組織について検討できた。その結果、大脳、小脳、脊髄灰白質、背根神経節、回腸にプリオンの沈着を認めた。全身諸臓器の検討はわが国第一例である。さらに平成 15 年 3 月までに３例受付し、うち１例が陽性であった。本例は大脳、小脳、脊髄にプリオンの沈着を認めた。

（樋口好美[非常勤職員]、佐藤由子、長谷川秀樹、岩田奈織子、田中道子、中島典子、高橋秀宗、永田典代、阿部賢治、佐多徹太郎）

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Limon A, Nakajima N, Lu R, Ghory HZ and Engelman A: Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. J Virol 76: 12078-12086, 2002
2) Rosales CM, McLaughlin MD, Sata T, Katano H, Veno PA, De Las Casas LE, Miranda RN: AIDS Presenting with Cutaneous Kaposi's Sarcoma and Bacillary Angiomatosis in the Bone Marrow Mimicking Kaposi's Sarcoma. AIDS Patient Care STDS 16: 573-577, 2002.
3) Kakiuchi C, Ishida T, Sato H, Katano H, Ishiko T, Mukai H, Kogi M, Kasuga N, Takeuchi K, Yamane K, Fukayama M, Mori S: Secretion of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor by spindle cell sarcoma complicating Castleman's disease (so-called 'vascular neoplasia'). J Pathol 197: 264-271, 2002.
4) Ayuthaya PI, Katano H, Inagi R, Auwanit W, Sata T, Kurata T, Yamanishi K: The seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in the Thai population. Southeast Asian J Trop Med Public Health 33: 297-305, 2002.
5) Ogawa-Goto K. Irie S, Omori A, Miura Y, Katano H, Hasegawa H, Kurata T, Sata T, Arao Y: An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus-permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48. J Virol 76: 2350-2362, 2002.
6) Tanaka M, Yokoyama A, Igarashi M, Matsuda G, Kato K, Kanamori M, Hirai K, Kawaguchi Y, Yamanashi Y: The conserved region CR2 of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein is multifunctional domain that mediates self-association as well as nuclear localization and nuclear matrix association. J Virol 76: 1025-1032, 2002.
7) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T: Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNAs. Biochem Biophys Res Commun 293: 1084-1091, 2002.
8) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T: Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Biochem Biophys Res Commun, 294: 509-517, 2002.
9) Okada Y, Sawa H, Endo S, Orba Y, Umemura T, Nishihara H, Stan AC, Tanaka S, Takahashi H, Nagashima K: Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. Acta Neuropathol (Berl) 1042: 130-136, 2002.
10) Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Nagashima K, Kurata T: Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication. Biochem Biophys Res Commun 297: 593-599, 2002.
11) Araujo A, Sheehy N, Takahashi H, Hall WW: Human Retroviruses: Concomitant Infections with Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-I) and Human T lymphotropic Viruses Type I (HTLV-I) and Type II (HTLV-II). In "Polymicrobial Infections" Ed KA Bogden & JM Guthmuller, American Society of Microbiology (ASM) Press, pp75-97, Washington DC, 2002.
12) Sasaki T, Igarashi Y, Saito N, Furumai T: Watasemycins A and B, new antibiotics produced by Streptomyces sp. TP-A0597. J Antibiotics 55: 249-255, 2002.
13) Igarashi Y, Iida T, Sasaki T, Saito N, Yoshida R, Furumai T: Isolation of actinomycetes from live plants and evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites. Actinomycetologica 16: 9-13, 2002.
14) Furumai T, Eto K, Sasaki T, Higuchi H, Onaka H, Saito N, Fujita T, Naoki H, Igarashi Y: TPU-0037-A, B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from Strepromyces platensis TP-A0598. J Antibiotics 55: 873-880, 2002.
15) Harada, T, Tsunetsugu-Yokota, Y, Koyanagi, Y, Sata, T, Kurata T, and Kojima A: Role of nucleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human immunodeficiency virus type 1 in macrophages. Virology 299: 192-203, 2002.
16) Yoshikawa T, Suzuki Y, Nomoto A, Sata T, Kurata T, Tamura S: Antibody responses and protection against influenza virus infection in different congenic strains of mice immunized intranasally with adjuvant-combined A/Beijing/262/95 (H1N1) virus hemagglutinin or neuraminidase. Vaccine 21: 60-66, 2002.
17) Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K and Hall WW: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. AIDS Res Hum Retroviruses 18: 1253-1260, 2002.
18) Ampofo W, Nii-Trebi N, Ansah J, Abe K, Naito H, Aidoo S, Nuvor V, Brandful J, Yamamoto N, Ofori-Adjei D, Ishikawa K: Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. Journal of Clinical Microbiology 40: 3523-3525: 2002.
19) Ito K, Kajiura T, Abe K: Effect of ethanol on antigenicity of hepatitis B virus envelope proteins. Jap J Infect Dis 55: 117-121, 2002.

20) Jin Y, Abe K, Sato Y, Aita K, Irie H, Shiga J: Hepatitis B and C virus infection and p53 mutations in human hepatocellular carcinoma in Harbin, Heilongjian Province, China. Hepatol Res 24: 379-384, 2002.
21) Mikuni M, Moriyama M, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y: SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. J Med Virol 67: 624-629, 2002.
22) Yamamoto A, Nagata N, Ochiai M, Kataoka M, Toyoizumu H, Okada K, Horiuchi Y: Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunisation. Vaccine 20: 3088-3094, 2002.
23) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys. J Med Virol 67: 207-216, 2002.
24) Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li H, Nagata N, Yonekawa H, Koike S: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns. J Gen Virol 83: 1095-1105, 2002
25) Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K, Uchida T: Protection of Monkeys Against Shiga Toxin Induced by Shiga Toxin-Liposome Conjugates. Int Arch Allergy Immunol 127: 294-298, 2002.
26) Kobayashi T, Ueda M, Nishino T, Moritani S, Hanada Y, Mito K, Kushima R, Sata T: Cytology of high-grade squamous intraepithelial lesion in Japanese-Brazilian women with HIV infection with polymerase chain reaction-assisted human papilloma virus detection. Diagn Cytopathol 26: 268-271, 2002.
27) Ashida M, Ueda M, Kunisada M, Ichihashi M, Terai M, Sata T, Matsukura T: Protean manifestations of human papillomavirus type 60 infection on the extremities. Br J Dermatol 146: 885-90, 2002.
28) Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T: Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis. Jpn J Ophthalmol 46: 254-260, 2002.
29) Senpuku H, Asano T, Matin K, Abdus Salam M, Tsuha Y, Horibata S, Shimazu Y, Soeno Y, Aoba T, Sata T, Hanada N, Honda M: Effects of human interleukin-18 and interleukin-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 107: 232-242, 2002.
30) Katano H, Sata T: Human herpesvirus 8 (HHV-8). In: Antimicrobial Therapy and Vaccine. 2nd Ed VL Yu, R Weber, & D Raoult, pp 1243-1247, Apple Trees Productions, LLC, 2002.

2. 和文発表

1) 田中道子、佐多徹太郎：HHV-8 が起こす腫瘍性病変. 医学のあゆみ 203: 227-229, 2002.
2) 高橋秀宗：牛海綿状脳症. 都臨技会誌 30: 394-395, 2002.
3) 高橋秀宗：狂牛病. 感染と抗菌薬 5: 68-70, 2002.
4) 高橋秀宗：プリオン蛋白と狂牛病. 感染防止 12: 2-9, 2002.
5) 高橋秀宗、倉田毅：プリオン病の診断技術. Medical Briefs in virus infection 15: 8-9, 2002.
6) 高橋秀宗､倉田毅:プリオン病総論. Medical Briefs in virus infection 15: 2-3, 2002.
7) 高橋秀宗、佐多徹太郎：プリオンとその病原性. Mebio 19: 48-53, 2002.
8) 岩崎琢也, 永田典代, 清水博之:エンテロウイルス 71 脳炎. 小児感染免疫 14: 101-106, 2002.
9) 中島典子、岩崎琢也：風疹，先天性風疹症候群．小児科診療（増刊号） 65: 134-136, 2002.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Ogawa-Goto K, Miurua Y, Katano H, Hasegawa H, Kurata T, Arao Y, Irie S, Sata T: Specific interaction between an endoplasmic reticulum protein, p180, and human cytomegalovirus UL48 tegument protein. International Herpes Workshop, Kairns, Australia, 2002.
2) Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y: Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of HSV-1: Virus reconstituted from the infectious clone exhibits wild-type properties in vitro and in vivo. 27th International Herpes Virus Workshop, Kairns, Australia, 2002.
3) Takahashi H: Cleavage of genomic RNA in HIV-1 virions. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, 15th Joint Meeting of the AIDS Panels, Okinawa, March 2003.
4) Hasegawa H, Hall WW: Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein, gp63 by furin is essential for cell fusion activity. 7th International HTLV Symposium, Brazil, July 2002.
5) Iwaki Y, Aiba N, Ding X, Huy TT, Hayakawa E, Hayashi S, Arakawa Y, Sata T, Abe K: Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver disease. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2002.
6) Huy TT, Ushijima H, Naito H, Ding X, Iwaki Y, Hayakawa E, Hayashi S, Sata T, Abe K: Geographic characterization of HBV pre-S mutant-Comparison in 11 different countries. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2002.
7) Ding X, Park YN, Taltavull TC, Thung SN, Jin X, Trung NS, Edamoto Y, Sata T, Abe K: Genotypic distribution of HBV and HCV and p53 mutation in hepatocellular carcinoma analyzed by in situ detection of viral genomes from carcinoma tissues: Comparison in six countries. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2002.
8) Hayakawa E, Sminov AV, Uchaikin VF, Huy TT, Ding X, Sata T, Abe K: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and GBV-C among children in Moscow, Russia. 53rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2002.
9) Iwasaki T, Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Miyamura T, Sata T, Kurata T: Pathology of experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys in comparison with that of poliovirus. 37th joint working comference on viral diseases. The Japan-United states cooperative medical science program. Matsumoto, Japan, August 2002.

2. 国内学会

1) 佐多徹太郎：BSE 病理検査．食品衛生技術講習会．国立公衆衛生院．2002.1.21.

2) 佐多徹太郎：HIV 脳炎の病理．長崎大学熱帯医学研究所．長崎大学．2002.2.8.
3) 佐多徹太郎：BSE. 東京都検査技術講習会. 2002.2.14.
4) 佐多徹太郎：BSE．安全協議会．感染研．2002.3.25.
5) 岩崎琢也、長谷川秀樹、小林庸次、小川　晃、岡崎悦夫、中山雅弘、佐藤由子、熊坂利夫、中島典子、佐多徹太郎、倉田　毅：小児のインフルエンザウイルス感染の病理像．第 91 回日本病理学会（横浜）2002.3.
6) 長谷川秀樹、門脇信悦、高橋秀宗、岩崎琢也、田村慎一、倉田　毅、佐多徹太郎：放射線照射とインフルエンザ感染によるマウスの感染免疫と肺病変の解析．第 91 回日本病理学会（横浜）2002.3.
7) 島崎加恵、佐藤由子、長谷川秀樹、倉田　毅、佐多徹太郎：エボラ出血熱ウイルス実験感染サルの感染病理-組み換え NP 蛋白単クローン抗体を用いた免疫組織化学-第 91 回日本病理学会（横浜）2002.3.
8) Huy TT, Win KM, Quang VX, Nakai K, Ushijima H, Hayashi S, Xin D, Sata T, Abe K: Molecular epidemiological characterization of hepatitis B, C, D, E viruses and GBV-C infections in Vietnam and Myanmar. 第 76 回日本感染症学会総会（東京）2002.4.
9) 丁　欣、朴　永年、Taltavull TC、金　毅、金　暁明、Trung NS、Thung SN、枝元良広、佐多徹太郎、阿部賢治：地理病理学的観点からみた肝発癌と HBV、HCV の感染および p53 遺伝子変異の関連．第 76 回日本感染症学会総会（東京）2002.4.
10) 岩城陽子、相羽直人、丁　欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、荒川泰行、林　茂樹、阿部賢治：ヒトにおける simian-TTV（s-TTV）の感染．第 76 回日本感染症学会総会（東京）2002.4.
11) 早川依里子、枝元良広、岩城陽子、丁　欣、Huy Tran、佐多徹太郎、阿部賢治：ヒト胆汁中からの TTV DNA の検出とウイルス様粒子の観察．第 76 回日本感染症学会総会（東京）2002.4.
12) 早川依里子、Andrei V. Smirnov、Vasily F. Uchaikin、Huy TT Tran、岩城陽子、丁　欣、佐多徹太郎、阿部賢治：モスクワの小児における HBV、HCV および GBV-C 感染の実態‐分子疫学的解析．第 76 回日本感染症学会総会（東京）2002.4.
13) 佐多徹太郎：BSE．科学技術週間講演．感染研．2002.5.23.
14) 五十嵐康弘、飯田貴子、佐々木智満、小川美緒、斎藤典子、尾仲宏康、葭田隆治、古米　保（富山県立大学、*国立感染症研究所）：植物由来放線菌からの新規生理活性物質の探索．2002 年度日本放線菌学会大会（つくば）2002.5.（ポスター発表）平成 14 年度日本放線菌学会ポスター賞受賞
15) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．長崎大学熱帯医学研修講義．長崎大学．2002.6.19.
16) 佐多徹太郎：脳炎と脳症．神奈川神経セミナー．北里大学医学部．2002.6.29.
17) 小林睦生、佐々木年則、斎藤典子、倉橋　弘、安居院宣昭（国立感染症研究所・昆虫医科学部、*感染病理部）：人親和性の高いイエバエにおける腸管出血性大腸菌 O157:H7 の播種能について．第６回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム（東京）2002.6.
18) Huy TT Tran、内藤秀夫、丁　欣、佐多徹太郎、牛島廣治、阿部賢治：HBV 変異株出現様式の国際間比較－第一報：HBV pre-S 変異株の流行．第 38 回日本肝臓学会総会（大阪）2002.6.
19) 丁　欣、朴　永年、Teresa C. Taltavull、金　暁明、Nguyen S. Trung、Swan N. Thung、佐多徹太郎、阿部賢治：肝発癌と HBV、HCV の感染および p53 ゲノム変異の関連 ―各国由来肝癌組織を用いた民族疫学、地理病理学的解析．第 38 回日本肝臓学会総会（大阪）2002.6.
20) 岩城陽子、相羽直人、林　茂樹、荒川泰行、佐多徹太郎、阿部賢治：Simian-TTV（s-TTV）の人体感染と臨床的意義．第 38 回日本肝臓学会総会（大阪）2002.6.
21) 早川依里子、Andrei V. Smirnov, Vasily F. Uchaikin、丁　欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、阿部賢治：モスクワの小児における肝炎ウイルスおよび GBV-C 感染の分子疫学．第 38 回日本肝臓学会総会（大阪）2002.6.
22) 田中道子、佐多徹太郎、川口　寧：野生株と同等の増殖性・病原性を保持した完全長感染性 HSV-1 クローンの作製とそれを用いた大腸菌内での HSV-1 組み換え系の確立．第 17 回ヘルペスウイルス研究会（東京） 2002.6.
23) 田中道子、小平　浩、佐多徹太郎、川口　寧：迅速で簡便な抗 HSV 薬スクリーニングを目指した HSV 増殖モニター系の確立．第 17 回ヘルペスウイルス研究会（東京）2002.6.
24) 後藤希代子、松尾恵子、三浦洋子、倉田　毅、入江伸吉、佐多徹太郎：ヒトサイトメガロウイルスの細胞侵入後の核膜への移行は微小管依存的である．第 17 回ヘルペスウイルス研究会（東京）2002.6.
25) 佐多徹太郎：感染症の病理学．浜松医科大学病理学講義．浜松医科大学．2002.7.2.
26) 徐聖旭、神山恒夫、佐多徹太郎、松田潤一郎、山田章雄、桑原正貴、局　博一、遠藤秀紀、糸原重美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節：シロオリックス PrP 遺伝子を有する Tg マウスにおけるプリオン高感受性及び過発現による心臓異常．日本神経ウイルス学会（三島）2002.7.
27) 佐多徹太郎：ウシ海綿状脳症を知る．伊勢原市講演会．伊勢原市役所．2002.9.10.
28) 佐多徹太郎：新興・再興感染症．日本獣医畜産大学公衆衛生学講義．日本獣医畜産大学．2002.10.11.
29) 片野晴隆：ヒトヘルペスウイルス８の感染病理．杉浦賞受賞講演. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
30) 後藤希代子、松尾恵子, 横田洋子、倉田　毅、入江伸吉、佐多徹太郎：ヒトサイトメガロウイルスの核膜へのカプシド移行は微小管ネットワークに依存する. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
31) 田中道子、小平　浩、佐多徹太郎、川口　寧：GFP 発現組み換え HSV を用いた抗 HSV 薬スクリーニング系確立の試み．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
32) 高橋秀宗, 前田才恵, 倉田　毅, 佐多徹太郎: HIV-1 ゲノム RNA 安定性調節と複製機構. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
33) 長谷川秀樹、門脇信悦、田村慎一、岩崎琢也、高橋秀宗、倉田　毅、佐多徹太郎：放射線照射とインフルエンザ感染により起こるマウスの alveolar tumor の解析．第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002.10.

34) 渡邉　泉、長谷川秀樹、田村慎一、倉田　毅、千葉丈、佐多徹太郎：C3d 融合 sHA 経鼻ワクチンによるインフルエンザウイルス感染防御の検討．第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002.10.
35) 尾崎泰子、吉河智城、佐多徹太郎、倉田　毅、田村慎一、南野昌信、岩倉洋一郎、鈴木雄次郎、相沢主税：B 型インフルエンザワクチンを経鼻免疫した pIgR 欠損マウスを用いた分泌型 IgA 抗体の感染防御上の役割の検討．第 50 回日本ウイルス学会（札幌）2002.10.
36) 吉河智城、田村慎一、野本明男、倉田　毅、佐多徹太郎：リアルタイム定量 PCR 法を用いたインフルエンザウイルス－抗体複合体の検出. 第 50 回日本ウイルス学会（札幌）2002.10.
37) 徐聖旭、神山恒夫、佐多徹太郎、松田潤一郎、山田章雄、桑原正貴、局　博一、遠藤秀紀、糸原重美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節：シロオリックス PrP 遺伝子を有する Tg マウスにおけるプリオン高感受性及び過発現による心臓異常．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
38) 倫文輝、狩野宗英、中村浩美、武田明子、森　一泰、佐多徹太郎、永井美之、俣野哲朗：Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials. 第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
39) 永田典代、清水博之、網　康至、波多野煜持、原嶋綾子、佐藤由子、須崎百合子、佐多徹太郎、倉田毅、野本明男、岩崎琢也：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス TgPVR21 の粘膜感染モデル．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
40) 永田典代、清水博之、網　康至、波多野煜持、原嶋綾子、佐藤由子、須崎百合子、倉田 毅、野本明男、岩崎琢也：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス（TgPVR21）を用いた経鼻接種によるポリオウイルスの病原性について．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
41) 杉本智恵、佐多徹太郎、吉川泰弘、森　一泰：Nef 遺伝子欠損変異株 SIV はリンパ節において B 細胞領域であるリンパ濾胞の CD4+T 細胞に感染していた．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
42) 浅沼秀樹、広川勝煜、鈴木雄次郎、小島直也、中田宗宏、倉田　毅、佐多徹太郎、田村慎一：老齢マウスにおけるインフルエンザウイルス再感染に対する交差防御能と免疫記憶誘導能の解析．第 50 回日本ウイルス学会総会（札幌）2002.10.
43) 原田貴之、横田恭子、小柳義夫、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV-1 R5 ウイルスの M-トロピズムにおける V3 ヌクレオチド配列の役割．第 50 回日本ウイルス学会学術集会（札幌）2002.10.
44) 佐多徹太郎：プリオン病．日本獣医畜産大学公衆衛生学講義．日本獣医畜産大学．2002.10.24.
45) 佐多徹太郎：新興・再興感染症と HHV-8 関連疾患．IAP 国際病理アカデミーシンポジウム．岡山大学．2002.11.16.
46) 原田貴之、佐多徹太郎、倉田　毅、小島朝人：HIV 侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性．第 16 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）2002. 11.
47) 武藤栄次、田中恵子、石川豊数、高見沢昭久、佐多徹太郎、倉田　毅、小島朝人：持続細胞株が大量に産生する日本脳炎ウイルス E 蛋白中和抗原粒子の精製と抗原性・免疫原性の解析．第 6 回日本ワクチン学会学術集会（千葉）2002.11.
48) 佐多徹太郎：新興・再興感染症．第一回ウイルス制御研究会．北里大学白金台キャンパス．2002.12.20.
49) 菊池俊彦、石川智美、宮崎　均、佐多徹太郎、向井鐐三郎：中枢神経脂向性 SIV (Simian immunodeficiency virus)の解析．第 25 回日本分子生物学会（横浜）2002.12.
50) 徳永研三：HIV-1 アフリカ分離株の抗レトロウイルス剤に対する感受性の検索．広島大学医歯薬学総合研究科・細胞分子生物学セミナー（広島）2003.3.
51) 徳永研三：HIV-1 アフリカ分離株の抗レトロウイルス剤に対する感受性の検索．大阪大学・微生物病研究所・微研セミナー（大阪）2003.3.

8. 免 疫 部

部 長　竹 森 利 忠

概　要

免疫部で行われている研究を大別すると以下の項目に分類される。以下トピックスを述べる。

I． 感染症に関する免疫学的研究
HIV、結核菌、肝炎、マラリア感染について研究を行っている。HIV 感染におけるウィルス活性化の機構、免疫不全発症の要因、及び感染抵抗性の免疫学的要因を明らかにすることを目標として研究を行い、マクロファージ感染ウィルスの活性増殖に関与するシグナル分子が同定され、また HIVnef 発現により成熟 T 細胞の免疫反応とケモカイン遊走能の低下が示唆された。結核菌感染においては、作製された遺伝子欠失菌がワクチン株として強い効果を示すことが明らかにされ、また結核菌由来抗原と IFNγを共発現したリコンビナント BCG が強い抗結核ワクチン効果を有することが明らかにされた。

II．免疫学的診断法に関する研究
ツベルクリン反応に代わる迅速で特異的な診断法の開発を目標として、結核菌/BCG 共通抗原遺伝子を発現するアデノウィルスを作製し、これを用いて BCG 感作 T 細胞が抗原特異的に活性される系を開発した。

III．ワクチンに関する研究
ワクチン接種後のアレルギー副反応の原因の一つとしてゼラチンがこれまでに同定されたが、このアレルゲンに反応する小児の多くで自己のコラーゲンに反応する可能性が認められ、副反応の作用機序を考察する上で興味深い結果が得られた。一方、ワクチン開発のための技術的な基盤の蓄積として、弱毒インフルエンザウィルスやサルモネラ菌をベクターとして用い、呼吸器及び消化器を対象としたワクチンデリバリーの開発を行っている。

IV．粘膜免疫・免疫記憶に関する研究
免疫防御に重要な免疫記憶の形成と維持に必要となる因子を明らかにする目的で記憶 B 細胞に強発現する遺伝子のクローニングを行い現在 7 種の遺伝子が同定されている。この内の 1 つが脊髄性筋萎縮症(SMA)の原因遺伝子である *SMN* であることが明らかにされた。

V．免疫学的疾患の病態、治療に関する研究
スギ花粉症治療に関してアレルゲン特異的 IgE 抗体産生抑制ワクチンの開発が行われた。

VI．免疫細胞機能発現に関する研究
骨髄前 B 細胞抗原受容体の発現制御に関する研究及び染色体転座部位に結合する Translin 遺伝子の機能解析が行われている。

人事では平成 14 年 3 月大竹かおり研究員が退職し現在名古屋大学医学部内科医師として勤務している。活躍を祈る。4 月、藤猪英樹博士が米国 Scripps 研究所より研究員として採用され、また 6 月には米国 NIH より大島正道博士が第 3 室室長として採用された。また高須賀直美研究員が平成 14 年 5 月より産休、育児休暇となった。

研　究　業　績

I． 感染症に関する免疫学的研究

1.　HIV 感染における免疫不全発症に関する研究

(1)　HIV-Nef の機能に関する研究
Nefによる成熟T細胞機能への影響を個体レベルで明らかにする目的で、OVA特異的T細胞レセプターを発現したDO11.10 マウスと、コクサキー・アデノウイルス受容体発現トランスジェニックマウスをかけあわせたdouble TgマウスよりCD4^{+}T 細胞を精製し、この細胞にnef発現アデノウイルスを感染させ、GFPとCD4 の発現量を指標にFACSを用いてnef発現細胞とnef非発現細胞とに分離した。Nef発現、非発現CD4^{+}T細胞にOVAペプチドで刺激を加えると両者とも経日的な増殖がみられたが、nef発現細胞の増殖は非発現細胞に比べて遅延した。いずれの細胞も刺激後にIFN-γ、IL-4 の両者を産生するが、その産生量はnef発現細胞は非発現細胞に比べて低かった。さらにSDF-1、MIP-1 への遊走がnef発現細胞では顕著に減弱しており、nefの発現がCD4^{+}T 細胞の生体内組織におけるダイナミクスや抗原刺激による免疫応答に影響を及ぼす可能性が推察された。
（藤猪英樹、中山俊憲（千葉大院医）、谷口克（千葉大院

医)、竹森利忠）

(2) HIV-Nef 発現によるアポトーシスの誘導
マクロファージや樹状細胞のような抗原提示細胞における Nef 発現の影響を解析するため、CAG およびテトラサイクリンで制御可能な T2 プロモーター下に Nef を発現するアデノウイルスを作製した。これらの細胞での効率よい発現と、ドキシサイクリンによる発現抑制を確認した。Nef を発現させた樹状細胞ではＴ細胞同様 CD4 や MHC Class I 分子の downmodulation が認められたが、樹状細胞の抗原提示に重要な MHC Class II や共刺激分子（CD40, CD80, CD86)、DC-SIGN などの発現には変化なく、LPS 刺激による成熟化も変わらなかった。しかしながら、Nef 発現アデノウイルスに感染した樹状細胞で高頻度に apoptosis が誘導された。また、LPS 刺激マクロファージに Nef を発現させた時の細胞遺伝子発現アレイ解析でも BID や Bax の発現が高かったことから、Nef と apoptosis シグナルの関係が強く示唆された。
（横田恭子、大竹かおり（名古屋大学医学部)、磯貝まや（協力研究員)、宮下恵(非常勤職員)、鎌形洋二郎（実習生、東京医薬専門学校)、竹森利忠）

2. HIV 感染における免疫応答

(1) HIV 感染症の病態進行に関わる免疫応答の解析
フランスの長期未発症者（LTNP）および発症者の HIV-1 Gag 抗原に対する CD8 陽性 T 細胞の機能的分化の違いについて比較解析するため、Yeast 由来 Gag 類似粒子（yeast VLP）抗原をパルスした DC を抗原提示細胞として、in vitro での cross-presentation による Gag 特異的 CD8 細胞の分化成熟化を解析した。慢性感染者は進行感染者においても Gag に反応する特異的 CD8 陽性 T 細胞は存在しているが、頻度は低くなる傾向にあった。また、LTNP の中で血中ウイルス量が制御できてない個体において、HIV 特異的 CTL の機能的分化が特に強く障害されていた。
（横田恭子、森川裕子(北里生命研)、Brigitte Autran(パリ大学 Pitié Salpêtrière Hospital）

(2) HIV Gag に対する免疫応答の解析
HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞機能を測定するため、樹状細胞（DC）に yeast VLP を添加、あるいは Gag や Nef を発現する adenovirus を感染させ、HIV 特異的な T 細胞反応性を ELISPOT 法で解析した。未治療の慢性感染者では、HIV 特異的な CD8 陽性Ｔ細胞の反応性は高いレベルで維持されている傾向があった。一方、HAART 治療においても血中ウイルス量を制御できていない感染者では、長期に渡って HIV 特異的な CD8 陽性Ｔ細胞の反応性が低レベルのまま維持されており、特異的 CD8 陽性Ｔ細胞がウイルスの増殖に対応できていないことが示された。
（横田恭子、森川裕子（北里生命研)、磯貝まや（協力研究員)、竹森利忠、川名(立川)愛（東大医科研)、岩本愛吉（東大医科研))

3. HIV ウィルス活性化に関与する分子の同定

(1) ヒト単球由来マクロファージにおけるマクロファージ指向性 HIV の増殖応答の解析
マクロファージ指向性 HIV-1 は、ヒト単球由来 M-MΦ で増殖が強くおきるが、GM-MΦ やヒト肺胞 MΦ では増殖が抑制されること、これら MΦ におけるウイルス増殖能の違いは Hck および転写因子 C/EBP β の発現の違いに一致し、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて Hck 蛋白の発現を特異的に抑制することにより、M-MΦ でのウイルス産生を完全に抑制できることをすでに報告した。そこで、今年度は、GM-MΦ の C/EBPβ の発現をアンチセンスを用いて人工的に変化させることで、これらマクロファージにおけるウイルスの増殖を誘導できるか否か検討した。その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、GM 型 MΦ の低分子型 C/EBPβ の発現を抑え、高分子型 C/EBPβ と低分子型 C/EBPβ の比を 1 以上にすることで、GM 型 MΦ における HIV-1 の増殖を誘導できた。これらの結果より、Hck と C/EBPβ のアイソフォームの発現パターンが MΦ における HIV-1 の増殖制御に重要なことが明らかになった。
（小室 巌(協力研究員)、横田恭子、岩本愛吉（東大医科研・感染)、赤川清子)

4. C 型肝炎ウイルス感染に見られる short RNA に関する研究

C型肝炎ウイルス(HCV)は培養細胞で効率よく増殖しない。Quadri & Negroの観察によるHCVの対ゲノム比 10^4 におよぶ過剰な 5’ subgenomic RNAの報告、及びパラインフルエンザウイルスにおけるmRNA転写停止機構に基づき吉倉は、HCVRNA 新生の default が A-rich region(nt.364-382) で起こるという仮説を提出した(Yoshikura H. Digest. Liver Dis. 33: 449-451, 2001)。仮説の予見するプラス鎖 5’ short HCV RNA は実際に感染肝組織や血清中に検出された。このshort RNA fragmentがウイルスコア蛋白と結合し増殖制御に関わる可能性また感染価に関する指標となりうるかについて検討を加えた。

(1) 感染肝臓ホモジェネートおよび血清を材料とし anti-HCV core 抗体でセレクトした分画から short RNA が検出された。コア蛋白結合 short RNA の 3’末端は A-rich region に存在した。

(2) 血漿 kiso#4 とFではチンパンジー感染価は低くともに 10^2以下と報告されている。これらの血漿における

short RNA fragmentの相対量はともに 25:1 であった。一方感染価の高い血漿H77 とkiso#6 (106.5, 105.5) ではshort RNAの相対量比は低くそれぞれ 1:1 および 5:1 であった。

コア蛋白は HCV ゲノムの 5'UTR と結合しヌクレオカプシドを形成すると報告されている。ウイルス感染で観察される HCVshort RNA もコア蛋白と結合していることが示唆される。ウイルスの感染性と short RNA の相対量比が逆相関する可能性が示された。現時点で利用可能な HCV replicon と肝臓癌由来細胞株（Hu-7）の系においても short RNA が観察されるか現在検討中である。
大島正道、清水洋子（国立医療センター）、土方美奈子（国立医療センター）、吉倉廣(所長)）

5. 結核菌感染と免疫に関する研究

(1) 遺伝子欠失結核菌の抗結核ワクチン効果の検討
結核症は、日本では高齢者の感染が目立ち毎年３千人が死亡しており、世界中では、毎年 300 万人が死亡する感染症である。結核の予防に BCG が投与されているが、その効果に疑問が持たれている。我々は、すでに、相同組み替え法で７種の異なる結核菌の遺伝子を欠失せた遺伝子欠失結核菌を作成できた。そこで、この欠失菌をあらかじめモルモットの皮下に接種し、その後、強毒結核菌のエアロゾル接種に対する防御効果を測定したところ、3 株に明らかな抗結核ワクチン効果があることを見いだした。
（谷山忠義、田島貴司（研究生・早稲田大学）、中山慶子（研究生・早稲田大学）、成田・雅（協力研究員、エスエス製薬）、菅原勇（結核研究所））

(2) リコンビナント BCG を用いた抗結核ワクチンの開発
現在唯一の抗結核ワクチン株であり、長期間ヒトに使用され、比較的安全性の確認された BCG を遺伝子工学的に改変することにより強力な抗結核菌ワクチンを作成すること目指している。染色体遺伝子に組み込む方法により BCG パスツール株に欠損している結核菌由来の Mpt64 抗原を大量に発現するクローンを樹立できた。また、マウスインターフェロンーガンマー遺伝子を自己増殖型による方法で BCG に導入した株、および Mpt64 抗原とマウスインターフェロンーガンマーの両者を発現する株を樹立できた。マウスにおいて、Mpt64 抗原とマウスインターフェロンーガンマーの両者を発現する株がもっとも強い抗結核防御効果がみられた。また、モルモットインターフェロンーガンマー遺伝子のクローニングを行い、Mpt64 抗原とモルモットインターフェロンーガンマー遺伝子の両者を発現するリコンビナント BCG の作成に成功した。
（谷山忠義、田島貴司（研究生・早稲田大学）、大井俊明（研究生･早稲田大学）、中山慶子（研究生･早稲田大学）、成田雅（協力研究員・エスエス製薬）、菅原勇（結核研究所））

6. 結核菌感染ヒトマクロファージにおけるシグナル伝達機構の解析

ヒト単球より M-CSF で誘導した M 型マクロファージ(MΦ)は、結核菌の殺菌を、また GM-CSF で誘導した GM 型 MΦ は、結核菌の増殖を促すことを報告した。今回、これら両MΦ の結核菌に対する感染感受性の違いが、結核菌感染後の MAP キナーゼの活性化の違いと関連するか否かについて検討した。結核菌感染時のMΦ 内の MAP キナーゼの活性化は、M型MΦ において p38MAPK、ERK1/2、JNK のいずれの MAP キナーゼにおいても活性化が認められたが、GM型MΦ では結核菌を感染してもこれらの MAP キナーゼの活性化は認められなかった。これらの結果より、結核菌感染に対するM型MΦ 及び GM 型MΦ の感受性の違いは、MAP キナーゼの活性化の違いに関連する可能性が示唆された。
（金沢裕子(協力研究員)、山崎利雄（細菌第一部）、芳賀伸治 (細菌第一部)、赤川清子）

7. マラリア感染防御に関与する免疫細胞の同定

(1) UV照射によりマラリヤ抵抗性を喪失したB-10マウスに対する感作脾細胞の移入に依る回復実験
UV を前照射したマラリヤ抵抗性の B-10 マウスは亜致死性のマラリヤ感染に対して感受性が増大し死亡するが、このマウスにマラリヤに高度感作された B-10 マウスの脾細胞を移入すると回復し致死を免れる。これまでに MACS カラムで吸着した T＋B 細胞をカラムより回収して得た分画に防御活性がみられることが判っているが、この分画には MΦ や Granulocyte の混入があり、またその逆に MΦ や Granulocyte をカラム吸着させた場合には、T や B が混入してくると云う状態で、まだ有効な因子の特定に至っていない。一方カラムを通過させた negative 分画では防御活性を示した例がなく、現在カラムの流速などを検討しながら、活性のある negative 分画を得ることに主眼をおいて進めている。
（山本紀一(協力研究員)、高橋宜聖、藤猪英樹、竹森利忠）

II．免疫学的診断法に関する研究

(1) 新しい結核診断法の開発
ツベルクリン反応に代わる結核菌感染補助診断方法を確立するため、結核菌特異抗原遺伝子を抗原提示細胞に発現させ、それに対する T 細胞の反応の有無を測定する系の確立を行った。樹状細胞をターゲットとする結核菌特

異的発現ベクター構築の第一ステップとして、コドンを高等真核動物での発現に適した仕様に変換した BCG／結核菌共通抗原 Ag85a をアデノウイルスベクターに組み込み、ウイルス粒子を得た。更にコドン変換 Ag85a を HIVgag 末端に融合させシャトルベクターGAP プロモーター下流に挿入し、酵母細胞を形質転換し最終的に Ag85a を発現する VLA（ウイルス様粒子）を得た。アデノウイルスベクター、VLP をマウスの樹状細胞に感染させ、BCG 接種マウスより得た T 細胞と試験管内で反応させ、活性の指標として培養上清中のインターフェロンガンマ（IFNg）を測定した。この結果、Ag85a 組み込みアデノウイルス感染樹状細胞を LPS 刺激で成熟させると強い T 細胞反応が惹起されることが明らかとなった。
（藤猪英樹、森川裕子(北里生命研)、竹森利忠）

III．ワクチンに関する研究

1. ワクチン接種後の即時型全身性アレルギー反応に関する研究

ゼラチンアレルギーの小児におけるヒトコラーゲンに対する反応性ワクチン接種後のアナフィラキシー等の即時型アレルギー反応を起こした小児の多くは牛コラーゲンに対する IgE 抗体を保有していることから、この副反応の原因が、ワクチンに含まれるゼラチン（コラーゲンが主要アレルゲン）であることが明らかになっている。本研究では、牛ゼラチンに対する IgE 抗体を保有している小児におけるヒトコラーゲンに対している反応性を検討した。ワクチン接種後のアナフィラキシー等の即時型アレルギー反応を起こし、牛ゼラチンに対する IgE 抗体を保有している小児 50 例はワクチン接種後の副反応をが認められなかった小児 50 例（陰性対照）に比べ、ヒトコラーゲンに対する IgE 抗体が有意に高かった($p<0.0001$)。同様にヒトコラーゲンに対する IgG 抗体も副反応群が対照群に比べ、有意に高かった($p<0.0001$)。このヒトコラーゲン特異 IgE 活性は牛コラーゲンによって、よく阻害されることから、ヒトコラーゲンに対する反応性は牛コラーゲンの交差反応と考えられた。上記の結果から牛コラーゲンに対するアレルギーを持つ小児は、自己抗体としてのヒトコラーゲンに対する抗体反応性を有することが明らかになった。
（阪口雅弘、堀　久江（東京医科歯科大学　難治研）服部俊治，入江伸吉（ニッピ））

2. ワクチンデリバリーに関する研究

(1) HIV-gag 蛋白に対する粘膜免疫応答についての基礎的検討

HIV-1 Gag p24 蛋白をコレラトキシンをアジュバントとして鼻粘膜を介して免疫することにより、全身性および鼻リンパ組織（NALT）と所属リンパ節（後頚部リンパ節（pCLN））に Gag に対する CTL を誘導できた。しかしながら、腸間膜リンパ組織（MLN）や腸管上皮リンパ球には CTL 活性を誘導しにくいことから、経口での免疫方法としてサルモネラ菌を担体とする delivery system の確立を試みた。まず組織でのサルモネラ菌の動態解析を可能にするため、HIV Gag と EGFP の融合蛋白を効率よく発現するベクターを作成し、経口投与のための基礎的検討を行った。
(横田恭子、宮下恵(非常勤職員)、石毛真行（協力研究員、天藤製薬株式会社)、原正和（研究生、東海大工学部)、村上正裕（客員研究員、天藤製薬株式会社)、竹森利忠)

(2) 呼吸器粘膜をターゲットとした抗結核ワクチンの開発

結核の好初発部位である肺の免疫を賦活することにより、より強力なワクチン効果を得ることができると考えられる。そこで BCG の防御抗原のひとつである Antigen 85A を NS segment に組込んだインフルエンザウイルスをマウス鼻腔に感染させる実験を行った。H1N1 および H3N2 の表面抗原の異なる２種の組換えインフルエンザウイルスは、いずれも弱毒で、マウス鼻腔・肺内での増殖はほとんど見られないか、非常に限られたものであった。今後、Antigen 85A に対する免疫応答や、抗結核ワクチンとしての効果を検討していく予定である。
（高須賀直美、榎並正芳（金沢大学)、藤猪英樹、竹森利忠）

(3) 腸管内ワクチンデリバリー効果の評価

腸管を経由したワクチン投与の効果を最適化するため、腸管における粘膜免疫応答活性化機序に関する基礎研究を行うとともに、腸管粘膜免疫系ターゲット微粒子による微小ワクチン・デリバリーシステム（VDS）の評価を行っている。モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を用い、キトサン分子の遊離アミノ基を架橋しないタイプのキトサンナノカプセルを作製した。キトサン分子はアジュバント活性を有することが知られている。VDS 機能として重要な粘膜組織内におけるゲスト分子（この場合 OVA）の放出性は、キトサン分子間の架橋の程度で制御できると考えられるため、架橋に用いる材料や架橋の程度の異なる微粒子を作成し、in vitro における VDS 機能の評価、およびラットを用いた in vivo における免疫機能賦活性の比較評価を行っている。これまでに作製した OVA-キトサン含有シームレスカプセルでは OVA 含量が不足しており、ナノカプセル製造工程を改良検討する必要性のあることが明らかとなっている。
（大西和夫、竹森利忠、村上正裕（天藤製薬㈱創薬センター））

IV．粘膜免疫・免疫記憶に関する研究

1. 免疫記憶の維持調節に関わる因子の同定

単独接種による長期持続ワクチンの開発が求められているが、そのためには免疫記憶の形成と維持の機構を明らかにすると共に、長期維持を促す因子を同定する事が必要とされる。これまで、記憶 B 細胞で特異的に発現が増加する遺伝子のスクリーニングを行なった結果、新規のものを含む６種類の完全長の cDNA をクローニングすることに成功した。解析の結果、その一つが脊髄性筋萎縮症(Spinal muscular atrophy; SMA)の原因遺伝子である脊髄運動神経生存遺伝子 *SMN1* であることが明かとなり、*SMN* 遺伝子機能ドメインである C 末側 7 番目のエクソンを B 細胞で欠失するモデルマウスを作製した。現在、このマウスを用い、免疫記憶に果たす SMN 分子の機能的役割を解析中である。
（高橋宜聖、島貫恵実(協力研究員)、宮下恵（非常勤職員)，稲嶺絢子（研究生・東京理科大)、吉岡絵美（研究生・東海大工)、Judith Melki(INSERM,フランス)、Klaus Rajewsky(Harvard Medical School，米国)、竹森利忠）

2. 記憶 B 細胞で高発現する細胞表面分子の同定

記憶 B 細胞は、産生後組織内において長期にわたり維持される。この維持には細胞外環境との相互作用が必要であるとの仮定に基づき、記憶 B 細胞で高発現する細胞表面分子の探索をおこなった。数千個の記憶 B 細胞からレトロウィルスベクターcDNA ライブラリーを作製する手法を確立し、これを用いて細胞表面分子をスクリーニングするシグナルシークエンストラップ法を行ったのち、得られた約 2000 のクローンをマイクロアレイ化して、記憶 B 細胞で発現量の高い分子を選別した。また同時に、マウスの約 8600 のｃDNA を含むマイクロアレイについて、記憶 B 細胞から調製したプローブを用いて発現解析を行った。これらの実験の結果、記憶 B 細胞において高発現する 11 の膜蛋白の同定に成功した。これらのうち特に発現に差のある 4 つの遺伝子に着目し、培養細胞における強制発現の実験を行ったところ、このうちの一つに細胞のアポトーシスを促進する効果が観察された。
（橋本修一、小村仁美（実習生・東邦大)、道祖土陽一（実習生・東海大)、佐野仁美（非常勤職員)、竹森利忠）

Ⅴ．免疫学的疾患の病態、治療に関する研究

1. スギ花粉症治療に関する研究

(1) CpG 結合スギ花粉アレルゲンにおけるスギ花粉特異 IgE 抗体の抑制

CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN)は Th1 優位の免疫応答を導くアジュバント様物質として注目されている。スギ花粉症に対する根治的な治療法の開発研究として、CpG-ODN をスギ花粉主要アレルゲン(Cry j 1)に結合させたワクチンをマウスに投与して Cry j 1 特異的 IgE、IgG サブクラスおよびサイトカインの産生を検討した。BALB/c マウスに CpG-ODN 結合 Cry j 1 (ワクチン) を毎週 3 回皮下投与した。陰性対照群として PBS、Cry j 1、GpC-ODN 結合 Cry j 1 を投与した。ワクチン投与群では、対照群に比べ、Cry j 1 特異的 IgE および IgG1 の産生が抑制され、一方、IgG2a の産生は増加した。さらに CD4 陽性 T 細胞を精製し、Cry j 1 とともに培養したときの細胞上清中では、ワクチン群は対照群と比べ、有意に高い IFN-γ の産生が認められた。以上の結果から、ワクチン投与により Th1 細胞への分化を誘導し、IgE 抗体産生を抑制することが示唆された。今後、CpG-ODN を用いた治療ワクチンの開発への応用も期待される。
（阪口雅弘、蕪木由紀子、蔵田圭吾、竹森利忠、安枝浩（国立相模原病院））

2. エリスロマイシン（EM）及び EM 生体内代謝産物 EM201 の IL-2 レセプター（IL-2R）シグナル伝達への影響

14 員環マクロライドである EM は抗菌作用の他、リンパ球や好中球の増殖抑制や炎症性サイトカインの産生抑制など抗炎症作用を示すことが知られている。昨年、EM 及びその誘導体が PHA 刺激によるヒト T 細胞の増殖を抑制し、IL-2 依存性活性化 T 細胞の増殖抑制がその抑制機構の一つであること、EM の生体内代謝産物である EM201 は、抗菌活性を示さず EM よりも強い増殖抑制を示すことを報告した。今回、EM や EM201 による IL-2 依存性活性化 T 細胞の増殖抑制機構を解明すべく、これら薬剤の IL-2R 下のシグナル伝達への影響を検討した結果、EM、EM201 は STAT5 のリン酸化を抑制しなかったが、ERK1/2 のリン酸化および P70S6 キナーゼのリン酸化を抑制し、その抑制作用は T 細胞の増殖抑制と同様に EM より EM201 の方が強いことが知られた。一方、Rapamycin 及び LY294002 は ERK1/2 のリン酸化には影響せず、p70S6K のリン酸化のみを抑制した。 また、PD98059 は、ERK1/2 のリン酸化のみを抑制し p70S6K のリン酸化は抑制しなかった。これらの結果より、EM 及び EM201 は、Rapamycin, LY294002 および PD98059 とは異なり IL-2R 下の増殖シグナル分子 ERK1/2 と p70S6K の両者のリン酸化を抑制することで細胞増殖を抑制している可能性が考えられる。
（大澤瑞穂(研究生・東京薬科大)、砂塚敏明 （北里研究所)、大村 智（北里研究所)、赤川清子）

3. CD34 陽性白血病細胞株 HPC-1 における樹状細胞前駆細胞の解析

白血病細胞より樹立した CD34 陽性細胞株 HPC-1 は、GM-CSF、TNFαおよび Stem cell factor (SCF) 存在下に CD1a 陽性、Lag 陽性、E-カドヘリン陽性の樹状細胞(DC)に分化する。しかしこの細胞株は、すべての細胞を DC に分化誘導することは不可能であり、その表面抗原の発現において不均一な集団である。従って DC の直接の前駆細胞は、どのような細胞集団に含まれるのか、FACSVantage で表面抗原の発現に応じて陽性細胞と陰性細胞に分離回収し、GM-CSF +TNFα＋SCF 存在下で培養し、CD1a 陽性 DC への誘導率を検討した。その結果、CD13 陽性細胞および CD114 陽性細胞から DC が分化誘導されることが知られた。また、DC の前駆細胞は CD114 を発現することと一致して、G-CSF 添加により DC の分化誘導が増強された。
（岩田汐理(実習生・東京薬科大)、正田絵里子（協力研究員）.青木克巳（東大・医・血液腫瘍)、赤川清子）

VI．免疫細胞機能発現に関する研究

1. プレB細胞受容体の機能に関する研究

プレ B 細胞受容体は抗体産生 B 細胞の分化・発生と免疫グロブリンのレパトア形成に中心的な役割を果たす。プレ B 細胞期において代替 L 鎖は、VDJ 再構成の結果新しく発現する H 鎖タンパク質の品質をチェックする機能があると考えられている。すなわち、VDJ 再構成・転写・翻訳された新生 H 鎖タンパク質は、その免疫グロブリンドメイン構造が妥当なものであれば代替 L 鎖が結合し、プレ B 細胞レセプターを形成する。これを介して B 細胞分化シグナルが伝達され、L 鎖の合成を経て H 鎖が抗体レパトアに組み込まれてゆく。一方、VDJ 組み替えの結果がフレームシフトを起こしている場合や、新生 H 鎖が代替 L 鎖と結合できない場合にはこの経路から排除される。しかし、このような H 鎖の多くは L 鎖と結合することが出来、抗体を形成できることが示唆された。すなわち、代替 L 鎖を介した新生 H 鎖の選択は、L 鎖と結合して抗体を形成できる H 鎖をも排除している可能性がある。
（柳沢有紀(実習生・筑波大)、山口沙由理(非常勤職員)、竹森利忠、大西和夫）

2. リンパ球に発現するカドヘリン分子に関する研究

我々が発見した BILL カドヘリンについて、この遺伝子を欠損したノックアウトマウスを作成し、各種免疫機能の解析を行った結果、以下のことが明らかになった。

(1) BILL カドヘリン欠損マウスにおいては、T 依存性抗原に対する応答性は変化がないものの、T 非依存性抗原に対する応答性が有意に低下していた。また、脾辺縁帯の性状に変化が見られたことから、B1 細胞の機能異常が疑われた。
(2) B 細胞の発生・分化を通じて BILL カドヘリン分子の発現量は大きく変異し、他のカドヘリン・スーパーファミリー分子と同様"spatiotemporal"な発現制御を受けている。B 細胞の活性化にともなう発現量の変化を検討した結果、CD40+IL7 刺激で低下し、LPS 刺激で増加した。両刺激後の発現量の差は 10 倍に達した。このことは、T 細胞類似の刺激と Toll 様レセプターを介した刺激の結果で細胞表面 BILL カドヘリン分子の発現が 10 倍異なることを示し、それぞれの刺激で活性化された B 細胞のその後の挙動に反映されることが予想された。
（大西和夫、山口沙由理(非常勤職員)、清水健之（東京理科大)、Fritz MELCHERS (Basel Univ.)）

3. Translin 遺伝子欠損マウスにおけるリンパ球の分裂や成熟の異常

Translin 蛋白は、リング状 Helicase ファミリーに類似した高次構造を呈しており、染色体分配機構を直接制御して細胞分裂に深く係わっていることが知られている。Translin 蛋白の機能の詳細を解明するために、Translin 遺伝子の targeting をおこなった。その結果、Translin の遺伝子を欠損したマウス（TSN KO）は、野生型マウスと比較して極めて小さく、約 1/2 の体重であった。また、ヒトの遺伝性疾患である重症複合免疫不全症モデルマウス(scid)と同様に、リンパ球の分裂や成熟の異常に起因する白血球数の激減が認められた。この事実は、Translin 蛋白の機能の一つが、染色体分配機構を直接制御して細胞分裂に深く係わっていることを立証するだけでなく、この遺伝子欠損マウスが、免疫不全症のモデルとしてウイルスの増殖、病原性、持続感染等、感染防御の制御機構を解析する上で有用であることを示唆している。
（福田裕子(非常勤職員)、石田礼子(非常勤職員)、青木克己（東大医血液腫瘍内科)、松田潤一郎 (獣医科学部)、葛西正孝）

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ．誌上発表

1. 欧文発表

2002 年

1) Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. and Tokuhisa, T. Generation of memory B cells independent of germinal center formation. ***Immunity 17: 329-339, 2002***
2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Tamura, H., Tachibana, M., Ogata, K., Honda, M. and Takemori, T. Selective expansion of perforin-positive $CD8^+$ T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria. ***J. Leuk. Biol. 72: 115-124, 2002***
3) Harada, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Koyanagi, Y., Sata, T., Kurata, T. and Kojima, A.: Role of nueleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human Immnodeficiency virus type 1 in macrophages. ***Virology, 299:192-203, 2002***
4) Toda, M., Kasai, M., Hosokawa, H., Nakano, N., Taniguchi, Y., Inouye, S., Kaminogawa, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of $CD4^+$ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. ***Eur. J. Immunol 32: 1631-1639, 2002***
5) Takasuka, N., Enami, M., Kuroda, K., Itamura, Y. and Takemori, T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. ***Vaccine 20: 1579-1585, 2002***
6) Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. ***J Exp Med., 196, 935-946, 2002***
7) Zhang X, Fujii H, Kishimoto H, LeRoy E, Surh CD, Sprent J. Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells. ***J Exp Med., 195, 283-293, 2002***
8) Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. ***Eur J Pharmacol., 441, 185-191, 2002***
9) Akagawa, K.S.: Functional heterogeneity of colony-stimulating factor induced human monocyte-derived macrophages. ***Int.J. Hematol. 76:27-34, 2002***
10) Terada, S., Takizawa, M., Yamamoto, S., Ezaki, O., Itakura H. and Akagawa K.S.: EPA inhibits CSF-induced human monocyte-survival and maturation into macrophage through the stimulation of H_2O_2 production. ***J. Leukocyte. Biol. 71:981-986, 2002***
11) Ishida, R., Okado, H., Sato, H., Shionoiri, C., Aoki, K., and Kasai, M. A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division. ***FEBS Lett. 525, 105-110, 2002***
12) Funatsu, T., Taniyama, T., Tajima, T., Tadakuma, H. and Namiki, H.: Rapid and sensitive detection Method of a bacterium by using a GFP reporter phage. ***Microbiol. Immunol., 46, 365-369, 2002***
13) Masuda, K., Sakaguchi, M., Saito, S., DeBoer D.J., Yamashita, K., Hasegawa, A., Ohno K. and Tsujumoto, H.: Seasonal atopic dermatitis in a dog sensitized to a major allergen of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. ***Vet. Dermatol., 13, 55-61, 2002.***
14) Siebers, R.W., Lane, J., Yasueda, H., Sakaguchi, M., Fitzharris, P. and Crane, J.: Reduction of allergen by occlusive covering. ***Allergy 57, 465, 2002.***
15) Sakaguchi1, M., Nakayama, T., Kaku, H., Taniguchi, K., Saito, S., Kimura, A., and Inouye, S.: Analysis of HLA in children with gelatin allergy. ***Tissue Antigens 59, 412-416, 2002.***
16) Hori, H., Hattori, S., S Inouye, S., Kimura, A., Irie, S., Miyazawa, H. and Sakaguchi, M.: Analysis of major epitope of α2 chain of bovine type I collagen in children with bovine gelatin allergy. ***J. Allergy Clin. Immunol., 110, 652-657, 2002.***
17) Futamura, N., Mukai, Y., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Inouye, S., Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R. M. and Shinohara, K.: Isolation and characterization of cDNA that encode homologs of a pathogenesis-related allergen from *Cryptomeria japonica*. ***Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2495-2500, 2002.***
18) Ohmori, K., Masuda, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Ohno, K., and Tsujimoto, H.: A retrospective study on adverse reactions to canine vaccines in Japan. ***J. Vet. Med. Sci., 64, 851-853, 2002.***
19) Fujimura, M., Ohmori, K., Masuda, K., Tsujimoto, H. and Sakaguchi, M.: Oral allergy syndrome induced tomoto in a dog with Japanese edar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis. ***J. Vet. Med. Sci., 64,1069-1070,***

2002.

20) Yoshitomi, T., Hirahara, K., Kawaguchi, J., Serizawa, N., Taniguchi, Y., Saito, S., Sakaguchi, M., Inouye, S. and Shiraishi, A.: Three T-cell determinants of Cry j 1 and Cry j 2, the major Japanese cedar pollen antigens, retain their immunogenicity and tolerogenicity in a linked peptide. ***Immunology, 107, 517-522, 2002.***

21) Maeda, S., Okayama, T., Omori, K., Masuda, K., Sakaguchi , M., Ohno, K. and Tsujimoto, H.: Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. ***Vet. Immunol. Immunopathol., 90, 145-54, 2002.***

2003 年

1) Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahahsi, Y., Takemori, T., Pan, X., Tohyama, C. and Nohara, K. Suppressive effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo -p-dioxin (TCDD) on the high-affinity antibody response in C57BL/6 mice. ***Toxicological Sci. 74: 315-324, 2003***

2) Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. ***Aids Res. Hum. Retro. 19: 469-479, 2003***

3) Fukuda, K., Yoshida, H., Sato, T., Furumoto, T., Mizutani-Koseki, Y., Suzuki, Y., Saito, Y., Takemori, T., Kimura, M., Sato, H., Taniguchi, M., Nishikawa, S., Nakayama, T. and Koseki, H. Mesenchymal expression of Foxll, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs. ***Dev. Biol. 255: 278-289, 2003***

4) Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., Nakayama, T. Taniguchi, M. Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's patch. ***Int. Immunol., 15: 393-402, 2003***

5) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizwa, N., Hirahara, K., Shiraishi, A., Nigi, H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M. Analysis of sequential immunoglobulin E-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen（Cry j 2）in human, monkeys and mice. ***Clin. Exp. Allergy 33: 211-217, 2003***

6) K. Ohnishi, F. Melchers. The nonimmunoglobulin portion of λ5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. ***Nat. Immunol. 4: 849-856, 2003.***

7) Komuro, I., Yokota, Y., Yasuda, S., Iwamoto, A., and Akagawa, K.S.: CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBPβ represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophages to M-tropic HIV-1 infection ***J. Exp. Med. in press, 2003***

8) Takahashi, Y., Sakaguchi, M., von-Pfaler, M. and el-Ghazaly, G. :Relationship between birch pollen count and different sizes of the pollen antigens in the air in Stockholm, Sweden. ***Allergol. Int., 52, 111-114, 2003.***

9) Ishida, R., Mauda, K., Sakaguchi, M., Kurata, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H.: Antigen-specific histamine release in dogs with food hypersensitivity. ***J. Vet. Med. Sci., 65: 435-438, 2003***

10) Ishida, R., Mauda, K., Sakaguchi, M., Kurata, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H.: Lymphocyte blastogeneic responses to food allergens in dogs with food hypersensitivity. ***J. Vet. Int. Med., in press.***

11) Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada,T: Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences in the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) ORF6 protein. ***Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., in press***

12) Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Sakaguchi, M., Kameoka, Y., Matsushita, S. and Inada,T.: Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF 5 and ORF 6 proteins. ***Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., in press***

13) Kurata, K., Yasunaga, S., MAsuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K., and Tsujimoto, H.:Expressions of IL-4 and IFN-γmRNA lymphocytes in 4 dogs with allergic rhinitis. ***J. Vet. Med. Sci., in press.***

2. 和文発表

1) 大西和夫：プレB細胞レセプターの役割とその機序、臨床免疫、38 巻 6 号、640-647, 2002

2) 赤川清子：マクロファージおよび樹状細胞と感染防御、(“感染症の宿主防御機構—理論と実際“（今西二郎編）編者：今西二郎、p 24-36, 医薬ジャーナル社、2002

3) 小室　巌、赤川清子：微生物によるマクロファージNO産生誘導機構、臨床免疫 37: 605-615, 2002

4) 藤村正人、岩崎利郎、阪口雅弘：犬のアトピー性皮膚炎における減感作療法の効果と副反応.　動物臨床医学　11,121-126, 2002

5) 高橋裕一, 安部悦子, 三浦直美, 荒木龍平, 安枝浩, 阪口雅弘: ４２年生スギにおける花粉中のCry ｊ 1 量の年較差およびCry j 1 定量法の検討. 日本花粉学会

雑誌　48, 103-107, 2002.
6) 阪口雅弘、増田健一、辻本　元、和　秀雄：スギ花粉症における自然発症動物モデル．Journal of Otolaryngology, Head and Neck Sugery, 18, 65-6, 2002.
7) 阪口雅弘、井上栄：スギ花粉症における自然発症動物．医学のあゆみ 200, 397-400, 2002.
8) 阪口雅弘：スギ花粉症における次世代の治療用ワクチン開発の現状と将来．医学のあゆみ 200,443-446, 2002.
9) 阪口雅弘、戸田雅子：スギ花粉症のDNAワクチン．Modern Physician 22, 213-217, 2002.
10) 阪口雅弘、平原一樹、白石明郎:スギ花粉症におけるペプチドワクチンの開発．アレルギー科 13, 75-79, 2002.
11) 平原一樹、戸田雅子、白石明郎、阪口雅弘：スギ花粉症に対する新しい特異的免疫療法．生物工学会誌 80, 152-155, 2002.
12) 阪口雅弘、戸田雅子、平原一樹、白石明郎：アレルギー性鼻炎における先端医療の将来ーワクチン療法．現代医療　34, 1257-1261, 2002.
13) 阪口雅弘、蟻川奈緒子、岩崎利郎：環境中のペットアレルゲンのモニターリングと環境整備．アレルギーの臨床　38, 692-696, 2002.
14) 阪口雅弘、井上　栄：ワクチンに含まれるゼラチンによるアナフィラキシー：その発生と解決．最新医学　57,1900-1904, 2002.

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

1) Takemori, T., Hashimoto, S. “The search for cell surface molecules associated with memory B cell maintenance” The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 2002
2) Isogai, M., Ohtake, K., Tsunetsugu-Yokota, Y. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef expression by adenovirus vector on monocyte-derived dendritic cells and macrophages. 11th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2002, 新潟, June, 2002.
3) Murakami, M., Yoshizawa, I., Tsunegsugu-Yokota, Y. :Evaluation and characterization of mucosal CTL response against HIV-1 Gag. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orland, Florida, USA, June, 2002.
4) Takahashi, Y., Inamine, J., Takemori, T. “Ras-mediated signaling pathway is required for the selection of high affinity memory B cells.” Keystone Symposia, B cells and Antibodies, 2003
5) Sugiura, I, Sasaki, C, Hasegawa, T, Kohno, T, Sugio, T, Moriyama, H, Kasai, M. and Matsuzaki, T. Crystal structure of human Translin at 2.2A resolution International Symposium on Diffraction Structural Biology, Yokohama, June 2003

2. 国内学会

（第 32 回日本免疫学会総会、東京、平成 14 年 12 月）
1) 高橋宜聖、稲嶺絢子、吉岡絵美、薄井正義、Wang Yatao、須田貴司、安達貴弘、鍔田武志、竹森利忠「Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells」
2) 稲嶺絢子、高橋宜聖、手塚克成、竹森利忠、安部良「AILIM/ICOSによる抗原特異的Ｂ細胞産生・分化の制御」
3) 横田（恒次）恭子、磯貝まや、立川（川名）愛、岩本愛吉、竹森利忠、Brigitte Autran。「HIV-1 感染者のCD8 陽性Ｔ細胞の機能に関する解析」
4) 橋本修一、竹森利忠「記憶B細胞に特異的に発現する細胞表面分子の探索」
5) 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口雅弘「B細胞特異的GANP欠損マウスにおけるB細胞分化異常」
6) Takahashi, Y., Shimanuki, E., Yoshioka, E., Hashimoto, S., Wang, Y., Suda, T., Takemori, T. ″Regulatory molecules for the maintenance of memory B cells″
7) Takemori, T., Takahashi, Y., Inamine, J., Hashimoto, S., R., Abe. ″Requirement of p21ras in B cell response″
8) 藤猪英樹、Jonathan Sprent「クラスII拘束性に起こる急性GVHDにおける$CD4^+$T細胞の傷害機能」
9) 大西和夫「Fab様プレB細胞レセプターの発現・精製と機能解析」
10) 金沢裕子、小室　巌、赤川清子「マクロファージの結核菌増殖とサイトカイン産生の解析」
11) 大澤瑞穂、赤川清子「エリスロマイシン（EM）及びEM生体内代謝産物EM201 のIL-2 レセプター（IL-2R）シグナル伝達への影響」
12) 成田雅、西村忠洋、吉崎和幸、谷山忠義「HSB-1 はSrc型チロシンキナーゼを介してTNF誘導アポトーシスを促進する」

(第 50 回日本ウイルス学会、札幌、平成 14 年 10 月)
1) 磯貝まや、大竹かおり、藤井陽一、竹森利忠、横田(恒次）恭子「HIV-1 Nefの発現が抗原提示細胞の機能に及ぼす影響の解析」
2) 横田(恒次)恭子、森川裕子、磯貝まや、細谷紀彰、立川（川名）愛、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉、Brigitte Autran。「樹状細胞によるHIV-1 Gag抗原提示とGag特異的Ｔ細胞の活性化に関する解析」

3) 飯島沙幸、庄文忠、横田恭子、三輪正直、間陽子「HIV-1 vpr遺伝子の機能とマクロファージ感染」
4) 原田貴之、横田恭子、小柳義夫、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人「HIV-1 R5 ウイルスのM－トロピズムにおけるV3 ヌクレオチド配列の役割」

(第 77 回日本結核病学会総会、東京、平成 14 年 4 月)
1) 山崎剛、山崎利雄、山本三郎、赤川清子、芳賀伸治「BCG の経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果」
2) 田島貴司、菅原勇、谷山忠義「遺伝子ノックアウト結核菌の作成による病原性の解析」
3) 大井俊明、中山慶子、田島貴司、菅原勇、谷山忠義「遺伝子組み換えＢＣＧを用いた新規抗結核ワクチンの開発」

(その他)
1) 山崎　剛、山崎利男、赤川清子、芳賀伸治：BCGの肺局所への接種は結核菌エアロゾル感染防御に有効である、第　回日本細菌学会総会、横浜、平成 14 年 4 月
2) 谷山忠義、田島貴司、大井俊明、中山慶子、並木秀男、菅原勇、C. Guilhot「リコンビナントBCGおよび結核菌を用いた新規抗結核ワクチンの開発」第 72 回実験結核研究会、東京、平成 14 年 4 月
3) 大澤瑞穂、砂塚敏明、澤井哲夫、大村　智、赤川清子：エリスロマイシン（EM）生体内代謝産物EM201のIL-2 レセプターシグナル伝達への影響，第 13 回日本生体防御学会、東京、平成 14 年 7 月
4) 大澤瑞穂、砂塚敏明、大村　智、赤川清子「エリスロマイシン（EM）及びその生体内代謝産物EM201のIL-2 レセプターシグナル伝達への影響」第９回マクロライド新作用研究会、東京、平成 14 年 7 月
5) 志田寿利、田中勇悦、横田恭子。HIV RNAの輸送因子CRM1 の末梢リンパ球における発現制御。第　回日本エイズ学会、名古屋、平成 14 年 11 月
6) Okado,H, Kawano,H, Terashima,T, and Kasai,M. Transcriptional repressor, RP58, is essential for development of subplate neurons and thalamocortical projections Annual Meeting of Japanese Physiology Society,Fukuoka, March, 2003
7) Kasai, M. Structure and functional analysis of a regulatory factor for cell proliferation. Annual Conference of Molecular Target Therapy of Cancer, Tokyo, June, 2003

9. 生 物 活 性 物 質 部

部 長　上 原 至 雅

概　　要

生物活性物質部は、感染症の制圧をめざし安全かつ有効な予防・治療薬開発に関する基礎研究を行うことを目的としている。平成12年度から新たな業務として真菌症の研究とサーベイランスをスタートさせてから3年を経過したが、部員の協力と新興・再興感染症研究事業等の支援などもあり、真菌症に対して体制が整えられ、また成果も着実に得られつつある。当部が取り扱う主な生物活性物質は、真菌制御物質、情報伝達制御物質、生体防御調節物質および抗生物質耐性菌制御物質等であり、これらの物質に関連して、生化学的、遺伝学的、分子生物学的手法を用いた新しい活性評価系の開発、新規生物活性物質の探索、作用機序等の研究、ならびに病原真菌の病因の検索、診断・治療法の研究、細胞内情報伝達の制御、生体防御の制御機構、および薬剤耐性菌の機構・迅速検出・制御等の研究を行っている。平成14年度は以下の項目について研究が行われた。

Ⅰ. 新しい活性評価系とスクリーニングおよび生物活性物質の研究
Ⅱ. 真菌の薬剤耐性機構と病原性因子及び感染防御に関する研究
Ⅲ. 好中球機能解析およびその機能不全の解析
Ⅳ. 骨髄系細胞の活性化
Ⅴ. サイトカイン LECT2 の解析
Ⅵ. 抗生物質耐性と遺伝子、放線菌ゲノムに関する研究
Ⅶ. 我が国における深在性真菌症のサーベイランス

研究費としては、基盤的研究費、特別研究費のほかに厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業、特定疾患対策研究事業、医薬安全総合研究事業）、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業及び文部科学省科学研究費補助金等の支援を受けた。厚生科学研究事業の「新興・再興感染症研究」では輸入真菌症等深在性真菌症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究を行い、「医薬安全総合研究」および「特定疾患対策研究」の2課題では感染症誘発の慢性疾患への対策研究を推進した。

新見室長らは、国際交流の一環としてヒューマンサイエンス振興財団「外国の研究機関等への委託研究事業」および「外国人研究者招へい事業」（新興・再興感染症研究事業プログラム、主任研究者：上原至雅）により、ニュージーランド、オタゴ大学分子微生物学教室（主任 Dr RD Cannon）と「真菌の薬剤耐性を克服するための薬剤開発システムの確立」の共同研究を行うとともに、同大学の Dr BC Monk を招へいして研究打ち合わせを行った。また新興・再興感染症研究事業プログラムに関連してヒューマンサイエンス振興財団「外国人研究者招へい事業」によりワシントン大学 GS Kobayashi 教授を招へいして、深在性真菌症／輸入真菌症シンポジウム「輸入真菌症を中心とした深在性真菌症に対する我が国の現状と取り組み」を開催した。日本学術振興会「外国人招へい研究者（長期）」により、Dr E Lamping （ニュージーランド、オタゴ大学）を招へいし、「*Saccharomyces cerevisiae* に発現した種々の ABC 輸送体の機能解析」の共同研究を行った。

鈴木室長らは、「ヒューマンサイエンス振興財団、（財）公定書協会、（財）医療機器センターより、S. Klebanoff 教授（米国・ワシントン大）、K-H. Krause 教授（スイス・ジュネーブ大）、D. Jayne 顧問（教授）（英国・ケンブリッジ大学）、F. Maxfield 主任教授（米国・コーネル大・医）、R. Hoffman（米国・カリフォルニア大）を招へいし、研究交流を推進した。さらに、（財）公定書協会「外国の研究機関等への委託研究事業」（医薬安全研究事業支援事業、主任研究者：鈴木和男）により、英国ケンブリッジ大学・医学部（D. Jayne 博士）と「血管炎のガンマグロブリン治療不応例における日本と英国での相違に関する解析」の共同研究を行った。また、文部科学省から外国人特別研究員として A. Persad が派遣され共同研究を推進した。

その他特記事項として、高GC%DNAをもつ放線菌ゲノムの遺伝子（ORF）探索・同定のために石川主任研究官らが開発した解析ソフトであるFramePlot （Ishikawa J. & Hotta K. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174: 251-253）は、2種の放線菌の全ゲノム解析に大きく貢献したが、さらに、米国のゲノム研究所のTIGR（The Institute for Genomic Research）が新たな遺伝子解析ソフトとして発表した Third Position GC Skew Display (http://tigrblast.tigr.org/cmrblast/GC_Skew.cgi) の作成の基になった。

以下に本年度の主な研究成果を記す。

研 究 業 績

I. 新しい活性評価系とスクリーニングおよび生物活性物質の研究

1. 酵母の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

アゾール剤耐性は主に排出ポンプの機能亢進が関与している。ポンプ阻害剤をアゾール剤と併用すれば、真菌細胞内で薬剤の有効濃度が保たれ、耐性菌の増殖を阻止することが期待される。16員環マクロライド構造を有する数種のミルベマイシンの排出ポンプ阻害作用を検討した。*Candida albicans*のポンプ遺伝子*CDR1*、*CDR2*または*BEN*^{R}を、7つの内在性輸送体が破壊されフルコナゾール高度感受性の*Saccharomyces cerevisiae*に導入・発現してフルコナゾール高度耐性株を作製し、排出ポンプ阻害活性をしらべた。ミルベマイシン単独では菌の増殖を阻止しなかったが、フルコナゾールとの併用によって*CDR1*および*CDR2*発現株は感受性化した。しかし*BEN*^{R}発現株には無効であった。ミルベマイシンはCdr1pおよびCdr2pのATPase活性を阻害したが、細胞膜[H^+]ATPaseの活性は阻害しなかった。これらの結果から、ある種のミルベマイシンは特異的にABC輸送体を阻害してアゾール剤耐性株を感受性化することが分った。

[新見昌一、高野幸枝、上原至雅；K Niimi、BC Monk、RD Cannon（オタゴ大学）]

2. がん細胞のシグナル伝達の解析と制御物質の探索

(1) MEK阻害剤によるヒト乳癌細胞のanoikis感受性誘導機構

大腸癌、乳癌の中にMEK阻害剤処理によってanoikis感受性になる細胞があることを報告した。anoikis感受性誘導を規定する因子を明らかにするため、apoptosis関連蛋白質に対する影響を調べ、MEK阻害剤処理により BH3-only proteinであるBimELの蛋白量が増加することを見いだした。電気泳動上の移動度の変化から、MEK阻害剤処理により BimELのリン酸化が低下することが予想された。in vitroで BimELは ERKによりリン酸化されたので、そのリン酸化部位を決定した。この残基は実際に細胞内でも ERKによりリン酸化されることが示唆された。乳癌細胞株間で Bim蛋白量の比較をすると、MEK阻害剤により anoikis感受性となる2株は Bimの量が特に少なく、これらの細胞では BimELのレベルが低く抑えられていることが、anoikis回避に必須であると考えられる。細胞によっては ERKによるリン酸化が Bim蛋白質の減少を引き起こし、anoikis回避に重要な役割を果たしているものと思われる。

[深澤秀輔、野口耕司、村上裕子、上原至雅]

(2) polyHEMA細胞培養法によるがん化シグナル抑制物質の探索

新規抗がん剤リードの発見を目指し、足場非依存性増殖阻害を指標に天然物の中に探索を行った。放線菌の生産する活性物質TT-2149の精製を行い、その一成分であるTT-2149-Cについて構造を解析し、septacidinまたはその立体異性体であるspicamycinの新規類縁体であると推定した。真菌ライブラリーからは、F2422株の産生する活性物質の単離精製を行った結果、hypothemycin類と同定された。hypothemycinに Rasがんの正常化活性が報告されていたが、最近、関連構造の化合物に MEK阻害活性が報告されたことより、誘導体化などによる開発の可能性を追求する。同じく真菌より見出した新規テルペノイド anicequolの作用機構は未だ不明な点が多いが、分子標的の解明が当面の課題である。

[上原至雅、福田恵子、和田俊一、深澤秀輔；五十嵐康宏、古米 保（富山県立大）；奥田 徹、石山忠之、沖 俊一（玉川大）]

(3) プロテインキナーゼ阻害物質の探索

文科省総合がん制がん剤スクリーニング委員会においてプロテインキナーゼ阻害剤の検定を担当しており、今年度は158検体（延べ48人）の評価を行った。その結果、有効と判定されたのは23検体であった。このうち、インドール、マレイミド、イミダゾール環を有する新規骨格の1物質（JCI-12149）に Srcと Flt-1のチロシンキナーゼに強力かつ特異的な阻害活性が見いだされたので、血管新生阻害剤の HUVECの高次検定を推薦した。本物質については関連の化合物が10検体ほど提供されており、その構造活性相関からさらに有効性の高い誘導体の創製を提供者に勧めることとした。

[上原至雅、近藤潤子、福山まり、深澤秀輔、村上裕子；矢守隆夫（癌研）]

3. 細胞周期関連プロテインキナーゼの同定と機能解析

(1) 新規細胞周期関連プロテインキナーゼ Nek11の同定と機能解析

真核細胞の細胞周期、特に G2/M期の制御において、CDK、AURORA、PLK等多くのキナーゼ群が機能することが良く知られているが、アスペルギルスでは、これらの他に NIMAキナーゼ（Never In Mitosis gene A）も G2/M期の制御に関わることが知られている。現在、ヒトを含む多くの生物種において、S/G2期で centrosomeを制御する Nek2 (NIMA-related protein kinase 2) を代表とする NIMAに類似するキナーゼファミリーの存在が明らかになっているが、ヒトでは、G2/M期に発現する NIMA類似キナーゼの存在は不明であった。我々は、NIMA ファミリーに属する新規プロテインキナーゼ Nek11の遺伝子を同定して発現状況を検討したところ、Nek11の mRNAと蛋白質の発現は G2/M期でピークを示し、Nek11が G2/M期で高発現する新規 NIMA ファミリーキナーゼであることが判明した。また特異的抗体を用いて解析したところ、内在性の Nek11は interphaseでは核に、prometaphaseでは polar tubulinと類似した局在を示したが、G2/M期以外でも DNA複製阻害剤や抗癌剤処理などで活性が上昇することを見出した。 [野口耕司、深澤秀輔、上原至雅]

(2) カンジダにおける細胞周期関連プロテインキナーゼの同定と機能解析

カンジダアルビカンスにおける NIMA ファミリーキナーゼの機能を探索するため、CaNek の遺伝子を同定した。リコンビナント CaNek蛋白質を作製、その生化学的解析を行い、スタウロスポリン系のキナーゼ阻害剤に感受性を示すことが明らかになった。同様に、幾つかの G2/M期に関わると推測される Calpl、CaCdc5の遺伝子をクローニングし、それらのリコンビナント蛋白質の解析も行った。現在、これらカンジダアルビカンスにおける細胞周期関連プロテインキナーゼの遺伝子破壊株の作製を進めており、これらの変異

株の解析が進めば、カンジダに対する新しい抗真菌分子標的薬剤の開発に貢献するものと期待される。

［野口耕司、能智禄弥、深澤秀輔、梅山隆、新見昌一、上原至雅］

4．ウイルス分子複合体の解析

(1) 様々な病因ウイルス蛋白質複合体検出の試み

ウイルスの病因を解明し創薬を目的とし、ウイルス蛋白質と宿主蛋白質の相互作用を解明するためにこれまで様々なヒトウイルス蛋白質に Flag などのタグをつけ、HeLa 細胞内で発現させ、アフィニティ精製後、相互作用をする宿主蛋白質の同定を試みてきた。HHV-8 の LANA, EBV の EBNA1, HIV-1 の nef ,tat, HPV-16 の E1, E6, E7 を試みた。tat, E1, E6, E7 では、蛋白質の同定のために必要な発現量のクローンが取得できなかった。

［村上裕子、山越　智、上原至雅、深澤秀輔］

(2) HIV の病原因子 Nef に結合する宿主分子の解析

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)の病原性を担う遺伝子 nef が細胞に働きかける作用メカニズムを解明することを目的として Nef 蛋白質の宿主細胞内結合分子を同定した。FLAGtag をつけた Nef を発現させるベクターをマクロファージ系の株化細胞 U937 に導入して安定発現させ、その細胞溶解液より FLAGtag の抗体を用いて Nef と共沈する結合蛋白質を溶出し、SDS-PAGE で分離したところ、約38KDa の蛋白質を見い出した。この蛋白質をゲルより切り出してトリプシン分解、フラグメントペプチドをアミノ酸分解して配列を決め、データベースより検索したところ、アシル　コエンザイム A チオエステラーゼであった。この蛋白質は Nef 結合蛋白質として既に報告されていて、CD4 のダウンレギュレーションに関与する機能をもつといわれているので、同じ方法を用い、別の結合蛋白質を探すことにした。

［村上裕子、近藤潤子、山越　智、上原至雅、深澤秀輔］

(3) カポジ肉腫ウイルスの遺伝子産物 LANA に結合する宿主分子の解析

ヒトヘルペスウイルス8型(HHV8)はカポジ肉腫の原因ウイルスであるが、このウイルス遺伝子産物LANAは癌原因子であると考えられている。タグをつけたLANAをHeLa 細胞に安定発現させて、タグの抗体で免疫沈降して得た約 120 KDaのLANA結合蛋白質を同定したところ、Daxxであった。GSTと融合したDaxxを大腸菌で生成し、^{35}SラベルしたLANAを用いてpull down実験をした結果、LANAはそのN末側 260-563 残基の領域でDaxxと結合し、DaxxはそのC末側 440-500 残基あたりがこの結合に重要であることがわかった。DaxxはFas結合蛋白質として見い出され、Fas依存のアポトーシスを促進する。293 細胞にFasとDaxxを発現させてアポトーシスを起こす系を作り、これにLANAも共発現させてその効果を見たところ、LANAはDaxxの有無に関わらず、Fas依存のアポトーシスを促進した。

［村上裕子、山越　智、近藤潤子、上原至雅、深澤秀輔］

(4) EBNA1 蛋白質複合体の解析

EBNA1蛋白質のN末端にタグをつけその遺伝子を HeLa 細胞に導入し安定発現株を得た。EBNA1 の Gly-Ala repeat の部分を除いた EB1NC1 にも N 末端にタグをつけて安定発現株を得た。両蛋白質を発現する株をそれぞれ2リッター培養し、M2-アガロースにより EBNA1 蛋白質複合体を精製した。その結果、両蛋白質ともほとんど同じ複数の蛋白質からなる複合体を形成することが判明した。検出されたおもな蛋白質は、130kDa, 76kDa, 38kDa, 42kDa の4種で他にも 7-8 種類のマイナーな量の蛋白質が検出された。

［山越　智、村上裕子、上原至雅、深澤秀輔］

5.　DNA 損傷応答における ATM 活性の調節

DNA 損傷で活性化され DNA 修復等の調節に関与する ATM (ataxia telangiectasia mutated)と PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase) が相互作用すると推測し、DNA 損傷を誘導するネオカルチノスタチン(NCS)で Parp-1 をノックアウトした細胞を処理し ATM 活性を検討し、さらに NCS 処理した HeLa 細胞のクロマチン画分への局在性を検討した。その結果、ノックアウト細胞における ATM 活性は NCS によって著しく亢進し、PARP-1 の局在性が既に報告されている ATM と同様に増加した。以上から、PARP-1 は ATM 活性を抑制的に制御する可能性が示された。

［渡邊文晶、深澤秀輔、上原至雅］

II.　真菌の薬剤耐性機構と病原性因子及び感染防御に関する研究

1. 真菌の薬剤耐性機構に関する研究

(1) *Candida glabrata* の ABC 輸送体 Cdr1p および Pdh1p のリン酸化と機能発現

C. glabrata の ABC transporter である CgCdr1p および Pdh1p は本菌のアゾール剤耐性に寄与するものと考えられている。両ポンプ遺伝子を7種の排出ポンプを欠如した *S. cerevisiae* AD1-8u- 株に発現させ、これらの薬剤排出機能とアゾール剤耐性機構についてしらべた。また、これらポンプのリン酸化の状態についても検討した。 Cdr1p は Pdh1p に比べて基質特異性が広く薬剤排出活性も強いので、本菌種の多剤耐性獲得に対してより重要であるものと考えられた。両ポンプともにグルコース依存的にリン酸化された。Pdh1p についてはリン酸化の一部が、プロテインキナーゼ A によりリン酸化された基質モチーフを認識する抗体によっても検出できた。またプロテインキナーゼ A の阻害剤で処理することにより、リン酸化の減少が見られた。Cdr1p についてはこの抗体によるリン酸化の検出はできなかった。Pdh1p の薬剤排出活性には、プロテインキナーゼ A によりリン酸化が必要であると思われる。Cdr1p については、担当するキナーゼは明らかでないが、そのリン酸化が NTP 加水分解活性を制御しているものと推測される。

[和田俊一、山崎亜希子、新見昌一、上原至雅]

(2) *S. cerevisiae* AD1–8u⁻株への *sec6-4* 変異の導入

Sec6p はパン酵母の分泌顆粒の構成成分で細胞増殖に必須である。細胞内で合成され機能的に完成した膜タンパクおよび分泌タンパクは分泌小胞を介して細胞膜に運ばれる。温度感受性 *sec6-4* 変異株は、37°C では分泌小胞が細胞膜と融合することが出来ず、細胞質内に多量の分泌小胞を蓄積して増殖を停

止する。精製した分泌小胞は目的のタンパクの機能解析に多大な威力を発揮する。我々はL633Pの点変異によって *sec6-4* 変異が得られることを見い出した。種々の薬剤排出ポンプの機能を比較解析するために、2種類のベクターpSK-sec6-4-URA3 とpSK-sec6-4-HIS1 を構築し、これまでに作製した薬剤排出ポンプ発現株にこの変異を導入して分泌小胞上に膜タンパクを発現する手法を確立した。

[新見昌一、上原至雅；E Lamping、BC Monk、RD Cannon（オタゴ大学）]

2. 真菌の病原性因子の解析

(1) *Candida albicans* における形態形成に関与するプロテインキナーゼ CaHSL1 の解析

深在性真菌症の中で最も頻発しているカンジダ症の主要原因菌である *Candida albicans* は酵母形および菌糸形の2つの形態を持つ二形性真菌である。我々は、出芽酵母において形態チェックポイントとして働いているプロテインキナーゼ *HSL1* の相同遺伝子（*CaHSL1*）の遺伝子破壊株を作製し、機能解析を行った。遺伝子破壊株は通常のYPD培地において細胞の異常伸長が観察された。血清による菌糸形誘導では、遺伝子破壊株は親株と同様の菌糸生育を行ったが、菌糸の伸長速度が親株よりも速かった。また、マウスの尾静脈より親株、遺伝子破壊株、プラスミド導入株をそれぞれ接種し致死率を比較観察したところ、親株、プラスミド導入株接種群よりも、遺伝子破壊株接種群の方が長く生存しており、臓器への定着率も低下していたことから、*CaHSL1* は *C. albicans* の病原性にも関与していることが明らかになった。

[梅山 隆、金子亜希、永井有紀、新見昌一、上原至雅]

(2) *Candida albicans* におけるサイクリン依存性プロテインキナーゼCDC28の発現抑制による形態変化への影響

カンジダ症の主要原因菌である*C. albicans*は酵母形および菌糸形の2つの形態を持つ二形性真菌であり、この形態変換が本菌の持つ病原性に深く関与していることが明らかにされている。我々は、細胞周期と形態変換との関連を調べるために、サイクリン依存性プロテインキナーゼ*CDC28*の発現抑制株を作製し、形態形成に与える影響について観察を行った。通常のYPD液体培地において*CDC28*の発現を抑制すると、増殖は可能であったが極端な細胞の伸長および肥大が観察された。また、*CDC28*の発現を抑制すると、菌糸誘導をしない培地においても、菌糸特異的に発現する遺伝子の発現が確認された。さらに、菌糸形成を制御する転写因子の発現低下が確認され、細胞周期の中心的役割を果たしている*CDC28*は菌糸形成にも関与していることが示唆された。

[梅山 隆、鳥海佳美、新見昌一、上原至雅；杉田 隆、西川朱實（明治薬科大）]

(3) *Candida albicans* における蛋白質脱リン酸化酵素の解析

蛋白質脱リン酸化反応は様々な細胞内過程において複雑なシグナル経路上で重要な役割を果たす。我々はプロテインフォスファターゼをコードする遺伝子を *C. albicans* ゲノム情報から見い出し、すべての遺伝子について遺伝子破壊を試み、*C. albicans*への影響を検討している。そのうち、PP2A をコードしている *SIT4* の遺伝子破壊株は親株と比較して成育の遅延が観察された。血清を用いた菌糸誘導では発芽管形成の遅延を示した。また、抗真菌剤等に対する感受性試験ではポリエン系およびアゾール系の抗真菌剤、高濃度のNaCl等に対して感受性が増大した。マウスに対する感染実験では *SIT4* 遺伝子欠失株は野生株に比べて病原性が低下した。以上の結果から、*SIT4* 遺伝子欠失が成育、菌糸形成、病原性に影響を与えることが示された。

[花岡 希、梅山 隆、上原至雅、新見昌一]

(4) *Candida albicans* のための蛋白質発現・精製方法の開発

カンジダ症の主要原因菌である*C. albicans*は分子生物学を行う道具が少なく、本菌における蛋白の発現・精製を容易にするために、新たに発現ベクターを構築した。具体的には、発現された蛋白質のC末端に6xHisタグ、およびFLAGタグが並列して付加されるようなベクターを構築し、発現した蛋白質をNiイオンアフィニティー担体、およびFLAG抗体アガロースを用いた二段階精製を行うことにより、容易に目的の蛋白質および相互作用する蛋白質を精製することができる。実際に、bud neckに局在するseptin ringの構成因子 Cdc11pをタンデムタグ付加蛋白質として発現させ、上記の方法で精製したところ、相互作用する蛋白質として、他のseptin ring構成因子であるCdc3p、Cdc10p、Cdc12pがTOF-MS解析によって同定でき、この新しく開発した系は*C. albicans*の蛋白質相互作用解析において有用なツールになりうることが示唆された。

[金子亜希、梅山 隆、上原至雅、新見昌一]

3. 真菌感染防御に関する研究

(1) *Candida albicans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼとNADPHオキシダーゼの重要性の比較

MPOはNADPHオキシダーゼ経路で産生された過酸化水素を基質として次亜塩素酸を産生して、*C. albicans*や*A. fumigatus*の殺菌を営んでいると解釈できた。

[鈴木和男、赤川久義、高野幸枝；倉 文明、渡辺治雄（細菌部）、荒谷康昭、小山秀機（横浜市大・木原研）；Nobuyo Maeda（米国・ノースキャロライナ大）、Mary C. Dinauer（米国・インディアナ大）]

(2) 病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来の mannoprotein-β-glucan complex, CAWS,による冠状動脈炎の発症と機序の解析

病原性真菌 *Candida albicans* 培養上清由来の mannoprotein-β-glucan complex, CAWS によって誘発される冠状動脈炎の発症機構を明らかにするために、血管炎誘発率の異なる系統のマウスを用い、細胞浸潤、リンパ球の活性化、サイトカイン産生を検討した。

[大川原明子、鈴木和男；新郷裕子、三浦典子、安達禎之、大野尚仁（東薬大・免疫）；大原関利章、高橋 啓、直江史郎（東邦大・医・大橋病院）]

(3) *Candida albicans*菌体外多糖CAWSの血管炎誘発活性におけ

るマウス系統差とその病態形成への関与の検討

表記物質によって誘発される冠状動脈炎の発症機構を明らかにするために，血管炎誘発率の異なる系統のマウスを用い、脾臓を中心にリンパ球のポピュレーション、活性化、サイトカイン産生などを比較検討した。

[大川原明子、鈴木和男；新郷裕子、三浦典子、安達禎之、大野尚仁（東薬大・免疫）；大原関利章、高橋　啓、直江史郎（東邦大・医・大橋病院）]

(4) 真菌由来物質誘導の冠状動脈炎発症における好中球の役割

血管炎の臨床マーカーのひとつであるMPO-ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) はそのエピトープ解析から特定のモノクローナル抗体が病態の重症化と関連していることが示唆されている。真菌を完全合成培地で培養した培養上清より精製した*C. Albicans* Water Soluble fraction (CAWS) をマウスの腹腔に接種することによって冠状動脈炎を誘発するモデルでは、CAWS接種後、早期において末梢好中球数は有意に増加し、刺激に対する反応性も増加する傾向を認めた。一方、単離した末梢好中球を用いたvitro assayではCAWSによる好中球の直接的な活性化を認めるとともに、CAWS接種マウス血漿中に存在する可溶性成分にも同様の効果を認めた。血管炎発症における好中球活性化のメカニズム、役割についてさらに検討を行う。

[大川原明子、鈴木和男；大原関利章、高橋　啓、山田仁美、村田久雄、直江史郎（東邦大・医・大橋）；三浦典子、大野尚仁（東薬大・免疫）]

(5) CBA/JN と C3H/HeN マウスの系統間較差を示す染色体マーカーの検索と川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング

昨年にひきつづき、CBA/JN と C3H/HeN マウスの系統間較差を示す染色体マーカーの検索を行い、約２００マーカーを選択した。また、これら系統内にも多型を示すマーカが存在した。カンジダアルカリ抽出物誘発の川崎病類似冠状動脈炎の冠状動脈炎発生率は、C3H/HeN では高く、CBA/JN では低いことから、このマーカーを用いて、冠状動脈炎抑制遺伝子の染色体マッピングを行った。

[鈴木和男、；亀岡洋祐（遺伝子資源）；倉　文明（細菌）；大原関　利章、高橋　啓、山田仁美、　直江史郎（東邦大・医・大橋病院）]

(6) ミエロペルオキシダーゼ不完全欠損症例の遺伝子解析

昨年にひきつづき、真菌感染防御に重要なmyeloperoxidase(MPO)の不完全欠損（Typeⅱ）の遺伝子の解析を行った。新たな、欠損が確認された。また、MPO 遺伝子エキソン9における遺伝子変異が確認された。

[Amanda Persad、鈴木和男；亀岡洋祐、橋本雄之（遺伝子資源）]

III.　好中球機能解析およびその機能不全の解析

(1) 腎炎発症における好中球の役割

MRL/lpr マウスは、ヒト SLE に類似した病態を示し、MPO-ANCA 関連腎炎を発症する。われわれは MPO-ANCA に着目し、その産生のメカニズム、腎炎発症への影響について明らかにするため、MRL/lpr を back ground とする MPO KO マウスを作成し、血球組成、自己抗体（MPO-ANCA、抗 DNA 抗体）産生、炎症性 cytokine 産生、腎臓組織について解析を行ったが、wild、KO マウス間に著しい違いは認めなかった。 予想と異なり、MPO KO マウスでも aging に伴い wild マウスと同じように MPO-ANCA 産生が認められたが、おそらく MPO に構造的類似性を有する EPO (Eosinophil peroxidase) を抗原として産生されていると考えられる。現在、MRL/lpr マウスの好中球機能について検討中である。

[大川原明子、鈴木和男；猪原登志子、小野孝彦（京大・院医）、武曾恵理(大阪・北野病院・内科)]

(2) 免疫異常による腎臓血管傷害のイメージング

好中球をはじめ炎症細胞の活性化は血管炎を誘導し、状況によっては多臓器不全を誘発する。これには、自己免疫疾患などの免疫異常によって生じる好中球自己抗体が好中球と連動して進行することが in vitro 系で確認されているが、いまだ生体内では明らかにされていない。そこで、好中球活性化による血管傷害機構の解明を目的として、in vivo で解析するシステムを開発してきた。腎微小血管傷害の誘導とその血流動態のを In-vivo Imaging によって観察することを可能にした。

[長尾朋和、鈴木和男；越尾　修（朝日生命糖尿病研）；馬渕綾子（日本医大）；大野尚仁（東京薬大）、高橋　啓（東邦大・医・大橋病院）；南谷晴之（慶応大・理工）]

(3) ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討

IVIg 治療は ANCA 関連血管炎症候群の有力な導入療法として期待される。MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎患者に、導入期治療として IVIg 施行後ステロイドを含む免疫抑制療法を行った。IVIg 治療前後の臨床的治療効果判定を BVAS スコア、血清 CRP、Cre および血中サイトカインの変化を測定した。治療前と比較し、IVIg 治療後の BVAS、CRP、血中 TNF および IL-6 は有意に低下し、1/Cre の変化率は治療後有意に増加し腎機能の改善を認めた。重篤な副作用の発現は認めず、感染症による予後不良症例は皆無であった。MPO-ANCA 関連腎炎・血管炎において導入期治療として有効であると考えられた。

[鈴木和男；猪原登志子（京都大・院医）、野垣文昭（同）、小野孝彦（同）；武曾恵理（北野病院）]

(4) 血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAPK と Caspase 8 の活性化に対する好中球および IL-1β の関与

血管内皮細胞傷害時の apoptosis signal 伝達と、insulin の作用をヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて検討し、TNF α と cycloheximide とを同時に(TC 処理)24 時間処理したところ、MAPK

family の ERK 1/2, p38 および SAPK/JNK いずれも TC 処理 15 分後に Thr185/Tyr187 が燐酸化された。また、HUVEC を IL-1β 刺激後、5～20 分後に p38 の燐酸化が誘導され、好中球自身は定常状態で p38 が燐酸化され、かつ Caspase 8 の 18kDa の活性化型(c-Cas8)が生成された。24 時間後には insulin 依存性に脱燐酸化されるようになった。血管内皮細胞の TC 処理によって起きる apoptosis に対し、insulin は Akt をはじめ MAPK family などの燐酸化蛋白質を脱燐酸化して apoptosis を促進する可能性が示唆された。

[鈴木和男、石田-大川原明子、長尾朋和；越尾 修（朝日生命糖尿病研）；馬渕綾子（日本医大）]

(5) 光化学反応による血小板血栓形成のイメージングを用いた CD69 機能の解析

光化学反応によって産生される活性酸素によって誘導される血小板血栓形成に CD69 が関与していることを明らかにした。

[長尾朋和、鈴木和男；中山俊憲、村田 薫、稲見真倫（千葉大・院医）]

(6) 植物のNoxの機能とCa^{2+}を介した活性調節機構

好中球活性酸素産生酵素NADPH oxidaseのホモログNOXが発見され、好中球にかぎらず種々の組織、さらに、種を越えて植物にもその存在が確認された。本研究により、植物のNOXの発現系ができ、O^{2-}産生を確認できた。このことは、NOXが植物の生体防御に関与すると推定される

[鈴木和男、山越 智；小笠原よう子、朽津和幸（東京理科大・理工）]

IV. 骨髄系細胞の活性化

(1) HIV-1 Nef たんぱく質と食細胞 NADPH oxidase の活性化

HIV-1 Nef たんぱく質をマウスミクログリアに発現させ HIV-1 Nef たんぱく質の機能を解析した。その結果、HIV-1 Nef たんぱく質は、NADPH oxidase を活性化する機能に関与することを明らかにした。

[鈴木和男；澤田 誠（藤田保健衛生大）；Vilhardt F, Plastre O, Wiznerowicz M, Kiyokawa E, Trono D, Krause K-H（スイス・ジュネーブ大）]

(2) Nef導入ミクログリアにおけるO^{2-}産生とMPO様活性の増大と神経障害作用の発現

Nef導入ミクログリアの活性化を検討し、O^{2-}産生がNef導入により増大し、神経障害作用の発現に関与することを認めた。

[鈴木和男；澤田 誠、川上真紀子（藤田保健衛生大）；Vilhardt F, Krause K-H（スイス・ジュネーブ大）]

(3) コンカナバリン A 惹起肝傷害に肝類洞内に出現する免疫応答抑制性細胞の同定と抑制因子 NO の産生動態

免疫応答抑制性細胞は肝非実質細胞画分に含まれる F4/80 陽性のマクロファージ様細胞であり、Con A 投与 24 時間後にもっとも強い抑制活性を示した。培養上清中の NO の増大と、NO 阻害剤 NG-monomethyl-L-arginine (NMMA) により抗原特異的 Th1 の増殖抑制活性が解除されたことから、この細胞よる Th1 増殖反応の抑制は NO を介したものであることが明らかにされた。したがって、ConA により誘導される一過性免疫抑制は F4/80 陽性マクロファージによるものであり、NO がその主たるメディエーターであると推測される。さらに、iNOS の発現は ConA によって誘導されることが明らかになった。

[鈴木和男、長尾朋和；馬渕綾子（日本医大）；越尾 修（朝日生命糖尿病研）]

V. サイトカイン LECT2 の解析

(1) LECT2 ノックアウトマウスを用いた肝炎モデルでの解析 1

Concanavalin A(Con A)による肝炎モデルにおいて、LECT2 ノックアウトマウス(B6) では重篤化することが明らかとなっている。ノックアウトマウスでは Con A 誘導肝炎の発症に重要である肝臓 NKT 細胞の増加しており、そのことが重篤化の原因であることが示唆された。

[斉藤 武、奥村彰規、大川原明子、鈴木和男、山越 智；渡部久美（琉球大遺伝子）；岩倉洋一郎（東大医科研）]

(2) LECT2 ノックアウトマウスを用いた肝炎モデルでの解析 2

ガラクトサミン/LPS 肝炎モデルでは、LECT2 ノックアウトマウスは低感受性を示した。様々な炎症性サイトカインの産生を調べたところ肝臓での IFN-gamma の産生量の低下が観察され、そのことが原因の 1 つとして考えられた。

[斉藤 武、奥村彰規、大川原明子、鈴木和男、山越 智]

(3) LECT2 ノックアウトマウスを用いた関節炎モデルでの解析

抗コラーゲン抗体を用いてノックアウトマウス(BALB/c)に関節炎を誘導すると、野生型に比べて関節炎が重篤化した。関節炎発症時においてノックアウトマウスの関節局所では関節炎発症に重要な IL-1beta と IL-6 が有意に亢進していた。また、野生型では関節炎発症時には LECT2 の発現量が亢進していた。

[奥村彰規、斉藤 武、大川原明子、鈴木和男、山越 智；大谷 功、金山喜一（日大獣医）]

(4) エンドトキシンショックにおける LECT2 ノックアウトマウスの解析

致死量のリポポリ多糖(LPS)投与により致死率を測定したところ、ノックアウトマウス(BALB/c)では LPS に対して抵抗性が増していた。

[奥村彰規、斉藤 武、大川原明子、鈴木和男、山越 智]

(5) LECT2 トランスジェニックマウスの作成

ニワトリアクチンプロモーターを利用した LECT2 トランスジェニックマウス(B6)の作成を行った。マウス LECT2 遺伝子がそれぞれ 1 コピー、数コピー、数十コピー導入された 3 系統のマウスが樹立できたが、もっともコピー数の多いマウス（雌）については野生型マウスと掛け合わせたところ出産 3 日後に死亡した。また、仔においても出産直後死亡した。その原因に関しては不明である。 [奥村彰規、斉藤 武、鈴木和男、山越 智]

(6) マウス LECT2 の ELISA 系の作成

動物細胞由来、大腸菌由来組換え体マウス LECT2 蛋白質を使い、ウサギよりポリクローナル抗体、マウスよりモノクローナル抗体を得、サンドイッチ ELISA 法を確立した。数百 pg/ml の濃度の動物細胞由来体マウス LECT2 を検出できた。また、B6 マウスの血清中の濃度は 60-80ng/ml であった。

[山越 智、奥村彰規、斉藤 武、鈴木和男；小島和夫（(株) MBL）]

(7) Kupffer cell 貪食能に対する LECT2 の関連についての検討

LECT2 の機能を解明するため、Indian ink,Microsphere を用いて wild type 及び knock out mouse における Kupffer cell の貪食能の差異を比較検討したところ LECT2 が Kupffer cell の貪食能を制御している可能性が示唆された。

[鈴木和男、山越 智；宮崎耕司、関塚永一、西田次郎、大塩力、織田正也、石井裕正（国立埼玉病院）]

(8) マウス脳における LECT2 の発現解析

ヒト脳には、LECT2 の発現が確認されているところから、マウス脳での LECT2 発現を in situ hybridization により、発現部位を調べ、海馬付近に強く発現しているのを確認した。

[山越 智、鈴木和男；古賀大輔、輿水洋平、大富美智子（東邦大・理）]

(9) サイトカイン LECT2 の X 線結晶構造解析

LECT2 の立体構造解析として X 線結晶構造解析を試みている。Crystal Screen ⅠとⅡ他、様々な結晶化条件を試み、いくつかのバッファー条件を最適化したところ、40μm 程度の太さの硬い棒状結晶が得られ、回折斑点も約 2Åと高分解能まで得られた。

[山越 智、鈴木和男；山本健二（国立国際医療センター）；小田佳史、伊藤三恵、田之倉優（東京大学・院農）]

(10) 分子動態解析による LECT2 の多型における構造の安定性の変化

分子動態解析により、LECT2 の多型の分子構造解析から安定性の変化を解析し、その安定性と慢性関節リウマチ病態との関連を示唆する結果を得た。

[Dawson, Wayne、山越 智、鈴木和男；山本健二（国立国際医療センター）；伊藤三恵、田之倉優（東京大学・院農）]

VI. 抗生物質耐性と遺伝子、放線菌ゲノムに関する研究

1. アミノグリコシド抗生物質（AG）耐性に関する研究

(1) MRSA の AG 耐性、コアグラーゼ遺伝子型およびエンテロトキシンのデータベース構築

これまでに解析した 1980 年～2000 年の臨床分離 MRSA（約 440 株）の AG 耐性［Kanamycin 系 4 種（KM, DKB, AMK, ABK）、Gentamicin 系 4 種(GM, SISO, NTL, ISP)および Streptomycin(SM)］、コアグラーゼ遺伝子型（3'末端繰返し領域の PCR-AluⅠ RFLP）およびエンテロトキシン（Enterotoxin A と C, および tsst）のデータベースを構築した。

[土崎尚史、石川 淳、堀田国元]

(2) 臨床分離 MRSA の AG 耐性の経年的変動

1980～2000 年に臨床分離された MRSA 約 440 株の AG 耐性（KM 系 4 種、GM 系 4 種および SM）に対する耐性の経年的変動を調べた。その結果、KM、DKB および AMK には経年通じて MRSA の 90%以上が耐性、ISP を除く GM 系には 80 年代初頭の 90%から 2000 年の 40%への耐性率の長期低落、ISP には 95 年以降 90%以上の MRSA が耐性を示した。ABK には、耐性率 10%以下で推移し、経年的に低下傾向が認められた。SM に関しては、80 年初頭の耐性率が高く、以後減少して 90 年代後半には耐性の消失が認められた。

［堀田国元、土崎尚史、斎藤文子、菊池 賢（東京女子医大）、大久保豊司（群馬大医）］

(3) GM 耐性 MRSA の長期低落傾向の要因

GM 耐性にとって、二機能 AG 修飾酵素 AAC(6')/APH(2")が唯一の耐性因子で、その遺伝子の保持と完全相関が認められた。この遺伝子を高率（80%以上）に保持する MRSA 菌株（コアグラーゼ遺伝子型で L22, L31, M22）が 80 年代に多く、90 年代の分離株ではもっとも低率（42%）に保持する菌株（コアグラーゼ遺伝子型 L21）の分布が支配的（90%以上）になっていることが決定的要因となっていると判断された。

[土崎尚史、石野敬子、堀田国元]

(4) SM 耐性 MRSA 消失の要因

SM 耐性は、アデニル化酵素 AAD(6)によってもたらされるが、その遺伝子はリン酸化酵素 APH(3')の遺伝子と共存（プラスミド）することが認められた。これらの遺伝子を保持する MRSA は特定のコアグラーゼ遺伝子型（L22）のものに限られており、80 年代初頭に高率に認められたが 90 年代には臨床分離されなくなったことが SM 耐性 MRSA の消失の要因である。

[土崎尚史、堀田国元]

(5) MRSA と MSSA における二機能 AG 修飾酵素 AAC(6')/APH(2") の分布

同一病院から得られた MRSA と MSSA（それぞれ入院患者と外来患者由来各 100 株）の GM 耐性、コアグラーゼ遺伝子型、二機能 AG 修飾酵素遺伝子 *aac(6')/aph(2")* の分布を調べた結果、MRSA では入院、外来問わずコアグラーゼ L21 型が支配的（80%以上）で、40%前後の GM 耐性率と *aac(6')/aph(2")* 保持率であった。MSSA では、L21 型は 10%未満で、GM 耐性率と *aac(6')/aph(2")* 保持率は 10~15%であった。以上のように、MRSA と MSSA において著しい相違が明らかとなった。

［堀田国元、土崎尚史、石野敬子、斎藤文子、朴 春成（東京女子医大）、菊池 賢（東京女子医大）］

(6) 同一患部由来 MRSA の ABK 耐性化

同一患者の同一患部から得られた MRSA の ABK 感受性株と耐性株の解析を行なった。AG 耐性遺伝子保持パターン、コアグラーゼ RFLP および *Sma*I 消化 PFGE パターンの比較により遺伝的背景は同一であると考えられた。サザンブロットの結果、ABK 耐性株では二機能 AG 修飾酵素遺伝子が、感受性株と同じ位置ともう 1 つクロモゾーム上の別の位置に存在していた。この結果から、ABK 耐性化は二機能 AG 修飾酵素遺伝子のコピー数増加によると考えられた。

[石野敬子、菊池 賢（東京女子医大）、堀田国元]

(7) ユニークなアミノグリコシド耐性パターンを示す MRSA の解析

lSP と NTL に特異な耐性を示す臨床分離 MRSA BG6010 株の耐性機構を検討した結果、二機能 AG 修飾酵素のアセチル化酵素領域に G35D のアミノ酸置換を伴う点変異が見出された。この変異型二機能酵素を RN4220 内に発現させ、AG 修飾活性を検討した結果、アセチル化活性の増加が認められた。また、この変異株の AG 耐性は、親株レベルまで上昇していた。以上、BG6010 株の耐性化は1アミノ酸変異による AG アセチル化活性亢進によることが示された。

[石野敬子、菊池 賢（東京女子医大）、堀田国元]

2. 酸性電解水に関する研究

(1) 酸性電解水の DNA に対する影響

酸性電解水（強酸性電解水と微酸性電解水； 有効塩素濃度 20ppm）で処理した細菌細胞中の DNA がどのような損傷を受けるかを PCR 法により比較検証した。その結果、強酸性電解水(pH3)の方が微酸性電解水(pH6)よりも DNA 分解能が高いことが明らかになった。両電解水の pH を同じに調整すると同じ分解能を示すことから、pH が DNA 分解能に重要な役割を果たすことがわかった。

[土崎尚史、宮木洋一、堀田国元]

(2) 酸性電解水の DNA に対する影響

酸性電解水（強酸性電解水と微酸性電解水）で処理したアミノ酸がどのような作用を受けるかを比較検証した。供試アミノ酸の多くは強酸性電解水によってニンヒドリン呈色が薄くなることが観察されたが、メチオニンやリジンでは異なる Rf 値のスポットが出現した。微酸性電解水も弱いながら同様の変化が認められ、強酸性電解水と同じ pH にすると強酸性電解水と同様の変化を与えた。メチオニンは 2 種の化合物に変化し、それらはメチオニンスルフォキシドおよびメチオニンスルフォンと同じ Rf 値であった。

[宮木洋一、堀田国元]

3. 放線菌等のゲノムに関する研究

(1) *Nocardia farcinica* IFM 10152のゲノム解析

千葉大学真菌医学研究センターに保存されている国内の臨床分離株7株とタイプ株3株について、パルスフィールド電気泳動法によるゲノムサイズの決定、サザンハイブリダイゼーションによるリボソームRNA遺伝子のコピー数の決定を行い、*N. farcinica* IFM 10152株を解析対象菌株に決定した。ゲノムショットガンライブラリーを作成し、そこから得た約115,000本の塩基配列をアセンブルした結果、667個のコンティグ(ドラフト配列)を得た。ゲノムサイズは約6.0Mb、GC含量は70.8%であり、データベース検索の結果、病原性因子をはじめ、多数の有用遺伝子の存在が明らかとなった。

[石川 淳、 三上 襄(千葉大)、柴 忠義(北里大)、山下敦士(北里生命科学研究所)、服部正平(北里生命科学研究所)]

VII. 我が国における深在性真菌症のサーベイランス

(1) 深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査 クリプトコックス症について

クリプトコックス症の発生動向および臨床現場で抱える問題点について調査した。全国の概ね 500 床以上の一般病院 508 施設にアンケートを依頼し、204 施設（40%）から回答があり、106 施設から 307 症例の報告があった。病型は髄膜炎、肺クリプトコックス症、全身性クリプトコックス症の順で、ステロイド投与、血液疾患などのリスクファクターが背景にあった。発症例の8%は HIV 感染患者であった。分離株 276 例のうち *Cryptococcus neoformans* が 80%以上を占めたが、non-*neoformans* spp が 11%あり、*C. neoformans* 以外の菌種による新興感染症も無視できないことが示された。菌要素は髄液、血液、気道内分泌液などから検出され、*C. neoformans* の約半数は髄液から、non-*neoformans* spp. は主として血液から分離された。過去 6 年間でクリプトコックス症発症率に増加傾向がみられた。

[上原至雅、鈴木和男、新見昌一；亀井克彦（千葉大真菌医学研究センター）、菊池 賢（東京女子医大・感染対策科）、槙村浩一（帝京大医真菌研究センター）]

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Umeyama, T., Nagai, Y., Niimi, M and Uehara, Y.: Construction of FLAG tagging vectors for *Candida albicans.* Yeast, 19, 611-618, 2002.

2) Niimi, M., Nagai, Y., Niimi, K., Wada, S., Cannon R.D., Uehara, Y. and Monk, B.C.: Identification of two proteins induced by exposure of the pathogenic fungus *Candida glabrata* to fluconazole. J. Chromatography B 782, 245-252, 2002.

3) Wada, S., Niimi, M., Niimi, K., Monk, B.C., Holmes, A.R., Cannon, R.D. and Uehara, Y.: *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. J. Biol. Chem. 277, 46809-46821, 2002.

4) Holmes, A.R., Niimi, M., Girgis, J.M.A., Boyd, D.H. and Cannon,

R.D.: Antifungal drug susceptibilities of commensal *Candida* isolates. New Zealand Dental Journal 98, 36-39, 2002.

5) Umeyama, T., Lee, P. C. and Horinouchi, S.: Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. Appl. Microbiol. Biotech. 59, 419-425, 2002.

6) Kojima, I., Kasuga, K., Kobayashi, M., Fukasawa, A., Mizuno, S., Arisawa, A. and Akagawa, H.: The rpoZ gene, encoding the RNA polymerase omega subunit, is required for antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. J. Bacteriol. 184, 6417-6423, 2002.

7) Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, M., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K., Miyaji, M.: The trend of imported mycoses in Japan. J. Infect. Chemotherapy 9, 16-20, 2003.

8) Hori, H., Kajiura, T., Igarashi, Y., Furumai, T., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T.: Biosynthesis of hibarimicins. I. ^{13}C-Labeling Experiments. J. Antibiotics 55, 46-52, 2002.

9) Kajiura, T., Furumai, T., Igarashi, Y., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T.: Biosynthesis of hibarimicins. II. Elucidation of biosynthetic pathway by cosynthesis using blocked mutants. J. Antibiotics 55, 53-60, 2002.

10) Igarashi, Y., Kajiura, T., Furumai, T., Hori, H., Higashi, K., Ishiyama, T., Uramoto, M., Uehara, Y. and Oki, T.: Biosynthesis of hibarimicins. III. Structures of new hibarimicin-related metabolites produced by blocked mutants. J. Antibiotics 55, 61-70, 2002.

11) Cho, S. I., Fukazawa, H., Honma, Y., Kajiura, T., Hori, H., Igarashi, Y., Furumai, T., Oki, T. and Uehara, Y.: Effects of hibarimicins and hibarimicin-related compounds produced by Microbispora on v-Src kinase activity and growth and differentiation of human myeloid leukemia HL-60 cells. J. Antibiotics 55, 270-278, 2002.

12) Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Andoh. T., Umemura, K. and Numata, A.: Leptosins M-N_1, cytotoxic metabolites from *Leptosphearia* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. Tetrahedron 58, 479-487, 2002.

13) Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., and Uehara, Y.: MEK Inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated ERK pathway. Mol. Cancer Ther. 1, 303-309, 2002.

14) Igarashi, Y., Sekine, A., Fukazawa, H., Uehara, Y., Yamaguchi, K., Endo, Y., Furumai, T. and Oki, T.: Anicequol, a novel inhibitor for anchorage-independent growth of tumor cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213. J. Antibiotics, 55, 371-376, 2002.

15) Ishino, K., Fukazawa, H., Shikano, M., Ohba, M., Kuroki, T. and Uehara, Y.: Enhancement of anchorage-independent growth of human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2 cells by signaling from PKC to MAP kinase. Mol. Carcino. 34, 180-186, 2002.

16) Murakami, Y., Fukazawa, H., Kobatake, T., Yamagoe, S., Takebe, Y., Tobiume, M., Matsuda, M., Uehara, Y.: A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. Antiviral Res. 55, 161-168, 2002

17) Hashimoto, S., Xu, Y., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Uehara, Y., Shibuya, M., Yamori, T. and Nakaya, K.: β-Hydroxyisovalerylshikonin is a novel and potent inhibitor of protein tyrosine kinases Jpn. J. Cancer Res. 93, 944-951, 2002

18) Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y. and Uehara, Y.: Nek11, a new member of the NIMA family kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. J. Biol. Chem. 277, 39655-39665, 2002.

19) Hori, H., Nagasawa, H., Ishibashi, M, Uto, Y., Hirata, A., Saijo, K., Ohkura, K., Kirk, K. L. and Uehara, Y.: TX-1123: An antitumor 2-hydrozyarylidene-4-cyclopentene-1, 3- dione as a protein tyrosine kinase inhibitor having low mitochondrial toxicity. Bioorganic Med. Chem. 10, 3257-3265, 2002.

20) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H.: Critical role of myeloperoxidase and nicotineamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. J. Infect. Dis. 185, 1833-1837, 2002.

21) Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., Suzuki, K., Wiznerowicz, M., Kiyokawa, E., Trono, D. and Krause, KH.: The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. J. Biol. Chem. 277, 42136-43, 2002.

22) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N. and Koyama, H.: Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 40, 1-7, 2002.

23) Ito, M., Kato, Y., Nagata, K., Oda, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K. and Tanokura, M.: Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. Protein Express. Purif. 27, 272-278, 2003.

24) Suzuki, T., Noro, T., Kawamura, Y., Fukunaga, K., Watanabe, M., Oht,a M., Sugiue, H., Sato, Y., Kohno, M. and Hotta K.: Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed NaCl anode solution. J. Agricult. Food Chem. 50, 633-641, 2002.

25) Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T.,Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. and Hattori, M.: The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. Nucl.

Acids Res. 30, 5293-5300, 2002.

2. 和文発表

1) 新見昌一、上原至雅：輸入真菌症ならびに深在性真菌症（真菌症研究班の活動）. 病原微生物検出情報 23 巻 3 号 3-4、2002.
2) 新見昌一：クリプトコックス症　動物由来感染症—その診断と対策. 真興交易 pp233-236, 2003.
3) 新見昌一：*C. albicans* の耐性遺伝子 *CDR1* -薬剤排出ポンプの発現制御と多様な基質特異性-. JAMA（日本語版）6 月号 pp77, 2002.
4) 新見昌一、新見京子：抗真菌薬耐性の問題. 臨床医、中外医学社 29, 214-218, 2003.
5) 亀井克彦、槙村浩一、菊池　賢、鈴木和男、新見昌一、上原至雅：輸入真菌症診断ハンドブック. pp 1-14, 2002.
6) 上原至雅、亀井克彦、菊池　賢、槙村浩一、鈴木和男、新見昌一 、上　昌広、馬場基男、堀田国元、渋谷和俊、直江史郎：深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査 -アスペルギルス症について- . Jpn. J. Antibiotics 55, 446-481, 2002.
7) 梅山　隆：*Candida albicans* の Ras は真菌症治療戦略のターゲットになるか？　ファルマシア 38, 686-687, 2002.
8) 野口耕司：p53 遺伝子の変異を利用してがん細胞を殺すウイルス. ファルマシア 38, 342-343, 2002.
9) 猪原登志子、渡邊壽規、三宅あかり、小林いけい、野村啓子、草野　仁、野垣文昭、陶山勝郎、渡部仁美、小野孝彦、鈴木和男、武曾恵理：経静脈的γグロブリン療法（IVIg）が効果的であった ANCA 関連急速進行性腎炎の1症例. Pharma Medica（薬学医療）20 (6), 118-120, 2002.
10) 堀田国元：抗生物質の光と影. バムサ会誌 14(1), 2-3, 2002.
11) 堀田国元：電解水の利用技術. 生命・フリーラジカル・環境研究会編「水と活性酸素」オーム社、pp.152-161, ,2002.
12) 池田治生、石川 淳、大村 智：放線菌の全ゲノム配列決定とその意義. 蛋白質核酸酵素 47, 1845-1850, 2002.
13) 堀田国元：電解水による殺菌の基礎と応用. 食品加工技術 22, 115-119, 2002.
14) 土崎尚史、堀田国元：Colony direct-PCR による黄色ブドウ球菌の遺伝子プロフィール解析. TOYOBO UPLOAD No. 69 pp.9-10, 2002.
15) 石野敬子：VRE(バンコマイシン耐性腸球菌). 畜産技術 570(11), p43 , 2002.
16) 堀田国元：我が国における新抗生物質の探索と創製－カナマイシンの発見とその系譜. バムサ会誌 14(3), 2-9 , 2002.
17) 堀田国元：日本機能水学会の設立と展望. 機能水研究 1(1), 3-6, 2002.
18) 堀田国元：強酸性電解水と感染症. 輸血栄養 24(10), 579-584, 2002.
19) 土崎尚史、堀田国元：Colony direct-PCR による各種微生物遺伝子の簡便・迅速検出. TOYOBO UPLOAD No.70 pp.15-16, 2003.
20) 堀田国元：抗生物質の光と影：抗生物質耐性菌－MRSA を中心に－. バムサ会誌 14(4), pp.2-9, 2003.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Wada, S., Niimi, M., Uehara, Y., Cannon, R.D., Monk, B.C. and Goffeau, A.: Functional expression of *Candida glabrata* drug efflux pumps CgCdr1p and Pdh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. 1st JBC Biofrontier Symposium. Membrane Transporter: Structure and function relatioship. Insihgts into ABC transporter. June 9-11, 2002, Yufuin, Japan.
2) Monk, B.C., Niimi, K., Lamping, E., Holmes, A.R. Cannon, R.D., Harding, D.R.K., Goffeau, A., Decottignies, A., Wada, S., Niimi, M., and Uehara, Y.: Functional hyper-expression of membrane proteins and discovery of chemosensitizers of fungal multidrug efflux. Symposium on "ABC proteins" and the 5th conference on ABC proteins and ion channels –From gene to disease-. January 24-26, 2003, Kyoto, Japan.
3) Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., and Uehara, Y.: Identification of Nek9 (Nek11), a new member of the mammalian NIMA family. Cold Spring Harbor Meeting on the Cell Cycle, May 15-19, 2002, New York, USA.
4) Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., and Uehara, Y.: Mechanism of induction of anoikis sensitivity in breast cancer cell lines by MEK inhibitors. Keystone Symposia "Molecular Targets for Cancer Therapy" March 19-24, 2003, Fairmont Banff Springs Hotel, Banff, Alberta, Canada
5) Ishida-Okawara, A., Ito-Ihara, T., Muso, T., Ono, T., Saiga, K., Nemoto, H. and Suzuki, K.: Role of Activated Neutrophils in Spontaneously Crescentic Glomerulonephritis Forming (SCG/Kj) Mice. 10 th International Vasculitis and ANCA Workshop, April 25-28, 2002, Cleveland, USA.
6) Suzuki, K., Matsuoka, T., Hashimoto, Y., Ishida-Okawara, A., Matsuo, K., Iwasaki, T., Kajiwara, H., Arai, T. and Ozato, K.: Contribution of abnormal differentiation and function of neutrophils to MPO-ANCA production: Analysis of ICSBP-KO mice. 10 th International Vasculitis and ANCA Workshop, April 25-28, 2002, Cleveland, USA.
7) Ito-Ihara, T., Nogaki, F., Ono, T., Suzuki, K. and Muso, E.: Intravenous immunoglobulin (IVIG) treatment of MPO-ANCA-related microscopic polyangiitis. 10 th International Vasculitis and ANCA Workshop. April 25-28, 2002, Cleveland, USA.
8) Ito-Ihara, T., Nogaki, F., Ono, T., Suzuki, K. and Muso, E.:

lntravenous immunoglobulin (lVIG) treatment on patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-related glomerulonephritis. 26th lnternational Congress of lnternal Medicine, May 26-30, 2002, Kyoto, Japan.

9) Dawson, W.K., Futamura, Y., Suzuki, K. and Yamamoto, K.: The role of entropy in domain size and evolution of RNA. Seventh Annual Meeting of the RNA society, May 28- June 2, 2002, Wisconsin, USA.

10) Ito-Ihara, T., Ishida-Okawara, A., Muso, E., Ono, T., Saiga, K. and Suzuki, K.: Role of Activated Neutrophil in Spontaneously Crescentic Glomerulonephritis Forming (SCG/Kj) Mice. 35th Annual Meeting of American Society of Nephrology, November 1-4, 2002, Philadelphia, PA, USA.

11) Suzuki, K.: Contribution of activated neutrophils in vasculitis development. Seminar in Department of Medicine, Addenbrooke's Hospital, November 27, 2002, Cambridge, UK.

12) Suzuki, K.: Aproach to mechanisms of vasculitis in kidney: Contribution of MPO-ANCA and neutophils. International Progressive Rennal Diseases Forum, February 8, 2003, Nagoya, Japan.

13) Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T., and Hattori, M.: Determination of complete genome sequence of *Mycoplasma penetrans* HF-2 strain. International congress of the international organization for mycoplasmology, July 8-12, 2002, Vienne, Austria.

14) Hotta K, Tsuchizaki N, Ishino K, Saitoh F, Wada A and Arakawa Y: Arbekacin, a semisynthetic aminoglycoside, continues to be a good anti-MRSA drug in Japan? 42nd ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy), Sep. 27-30, 2002, San Diego, USA.

15) Ishino K, Tsuchizaki N, Piao C, Kikuchi K, Totsuka K and Hotta K: Relationship between Aminoglycoside (AG) Resistance and AG Modifying Enzyme Gene Profiles in MRSA. 10th ISSSI (International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infection). Oct. 17-19, 2002, Tsukuba, Japan

16) Ikeda, H., Shiba, T., Hattori, M., Omura, S., Ishikawa, J., Kikuchi, H., and Sakaki, Y.: Complete genome sequence of 9-megabase linear chromosome of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. 7th Conference on the Biotechnology of Microbial Products, Oct. 27-30, 2002, Honolulu, Hawaii.

2. 国内学会等

1) 和田俊一、新見昌一：*Candida glabrata* 薬剤排出ポンプ CgCdr1p と Pdh1p のパン酵母での発現. 第 75 回日本細菌学会総会、平成 14 年 4 月 4-6 日、横浜.

2) 新見昌一、上原至雅：意識調査からみた真菌症への対応. 第23回関東医真菌懇話会、平成 14 年 6 月 1 日、東京.

3) 新見昌一：病原真菌の薬剤耐性との戦い. 酵母合同シンポジウム、平成 14 年 7 月 4, 5 日、東京.

4) 和田俊一、新見昌一、上原至雅：*Candida glabrata* 耐性遺伝子(*CgCDR1, PDH1*)：*Saccharomyces cerevisiae* での機能発現. 第 46 日本医真菌学会総会、平成 14 年 9 月 28, 29 日、東京.

5) 下川 修、新見昌一：*Candida albicans* ステロール14位脱メチル化欠損株における酢酸塩を介した増殖停止のシアンによる解除. 第 46 日本医真菌学会総会、平成 14 年 9 月 28, 29 日、東京.

6) 上原至雅、亀井克彦、菊池 賢、槙村浩一、鈴木和男、新見昌一、渋谷和俊、上 昌広、馬場基男、堀田国元、直江史郎：深在性真菌症の発生動向に関するアンケート調査-アスペルギルス症について. 第 46 日本医真菌学会総会、平成 14 年 9 月 28, 29 日、東京.

7) E Lamping, AR Holmes, BC Monk, K Niimi, M Niimi, RD Cannon: An efficient system for the heterologous hyper-expression of membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. 第 46 日本医真菌学会総会、平成 14 年 9 月 28, 29 日、東京.

8) 新見昌一：深在性真菌症に対する取り組みの現状 深在性真菌症／輸入真菌症シンポジウム、輸入真菌症を中心とした深在性真菌症に対する我が国の現状と取り組み. 平成 14 年 9 月 30 日、東京.

9) 梅山 隆、新見昌一、上原至雅：*Candida albicans* における形態チェックポイントキナーゼ CaHSL1 の解析. 特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」第 1 回感染症若手研究者沖縄フォーラム、平成 15 年 1 月 22-23 日、沖縄.

10) 上原至雅：プロテインキナーゼ阻害剤の探索から創薬へ. 第2回バイオファンクショナルマテリアル研究会公開講演会、平成14年6月14日、岐阜.

11) 野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：分子標的候補としての新規プロテインキナーゼ Nek9 の同定と細胞周期制御における機能解析. 平成14年6月27 28日、第6回がん分子標的治療研究会、札幌市.

12) 野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：新規プロテインキナーゼ Nek9 の同定と機能解析. 第61回日本癌学会総会、平成14年10月1 3日、東京.

13) 野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：Genotoxic stress による新規プロテインキナーゼ Nek11 の活性化. 第25回日本分子生物学会年会、平成14年12月11 14日、横浜市.

14) 上原至雅、深澤秀輔：がん細胞を anoikis 感受性にするシグナル伝達阻害剤の分子標的. 文部科学省特定領域研究がん公開合同シンポジウム、平成15年2月4日、東京.

15) 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、鈴木和男：自然発症半月体形成腎炎 SCG/Kj マウスにおける活性化好中球の役割. 第32回京都腎臓免疫研究会、平成14年5月11日、京都.

16) 猪原登志子、野垣文昭、小野孝彦、鈴木和男、武曾恵

理：抗好中球抗体 ANCA 関連顕腎炎患者における IVIG 治療. 第32回京都腎臓免疫研究会、平成14年5月11日、京都.

17) 猪原登志子、大川原明子、鈴木和男、小野孝彦、武曾恵理：SCG/Kj mice における腎組織学的病変と好中球機能との関係に関する検討. 第45回日本腎臓病学会総会、平成14年5月23－25日、大阪.

18) 鈴木和男：血液成分の新展開：血管炎治療用の人工グロブリン開発をめざして. 第9回日本血液代替物学会年次大会、平成14年9月4－5日、熊本.

19) 大原関利章、亀岡洋祐、倉　文明、直江史郎、高橋　啓、鈴木和男：川崎病類似マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング. 第22回日本川崎病研究会、平成14年9月27－28日、北九州.

20) 越尾　修、長尾朋和、馬渕綾子、鈴木和男：血管内皮細胞傷害時の apoptosis における signal 伝達と Insulin 効果. 第 75 回 日本生化学会大会、平成14年10月15－18日、京都.

21) 大川原明子, 大原関利章, 高橋　啓, 三浦典子, 大野尚仁, 荒谷康昭, 小山　秀機, Nobuyo Maeda, 直江史郎, 鈴木和男：カンジダ菌体由来物質誘導の血管炎モデルマウスにおける好中球の役割. 第 75 回 日本生化学会大会、平成14年10月15－18日、京都.

22) 荒谷康昭、倉　文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、Mary C. Dinauer、小山秀機：ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスの生体防御能異常. 第 75 回 日本生化学会大会、平成14年10月15－18日、京都.

23) 荒谷康昭、倉　文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Mary C. Dinauer、Nobuyo Maeda、小山秀機：MPO 欠損マウスと gp91phox 欠損マウスのカンジダ菌に対する感染防御能の比較. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

24) 澤田　誠、川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H Krause：Nef 導入ミクログリアにおける O2-産生と MPO 様活性の増大と神経障害作用の発現. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

25) 荒谷康昭、倉　文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Mary C. Dinauer、Nobuyo Maeda、小山秀機：MPO 欠損マウスと gp91phox 欠損マウスのカンジダ菌に対する感染防御能の比較. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

26) 小笠原よう子、山越　智、鈴木和男、朽津和幸：植物の Nox の機能と Ca2+を介した活性調節機構. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

27) 長尾朋和、越尾　修、馬渕綾子、大野尚仁、高橋　啓、南谷晴之、鈴木和男：. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

28) 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、北　徹、鈴木和男：ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

29) 越尾　修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬渕綾子、鈴木和男：血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAPK と Caspase 8 の活性化に対する好中球および IL-1β の関与. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

30) 大野尚仁、三浦典子、新郷裕子、安達禎之、大原関利章、高橋　啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男：病原性真菌 Candida albicans 培養上清由来の mannoprotein-β-glucan complex, CAWS,による冠状動脈炎の発症と機序の解析. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

31) 大川原明子、大原関利章、高橋　啓、三浦典子、大野尚仁、荒谷康昭、小山秀機、Maeda Nobuyo、直江史郎、鈴木和男：血管炎発症への活性化好中球の関与-カンジダ菌体由来物質 CAWS によって誘導される血管炎モデルマウスを用いた解析, 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

32) 大原関利章、大野尚仁、大川原明子、直江史郎、鈴木和男、高橋　啓：Candida albicans 菌体抽出物を用いた川崎病類似マウス動脈炎モデル. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

33) Persad A、亀岡洋祐、鈴木和男：MPO 完全欠損患者で見つかった ARG499CYS 変異. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

34) 亀岡洋祐、Persad A、鈴木和男：MPO 遺伝子エキソン9における遺伝子変異. 第8回 MPO 研究会、平成14年10月18－19日、宮崎.

35) 長尾朋和、越尾　修、馬渕綾子、大野尚仁、高橋　啓、南谷晴之、鈴木和男：免疫異常による腎臓血管傷害のイメージング. 第11回日本バイオイメージング学会、平成14年10月30－11月1日、名古屋.

36) 中山俊憲、長尾朋和、村田　薫、稲見真倫、鈴木和男：光化学反応による血小板血栓形成のイメージングを用いた CD69 機能の解析. 第11回日本バイオイメージング学会、平成14年10月30－11月1日、名古屋.

37) 大原関利章、亀岡洋祐、横内　幸、若山　恵、鈴木和男、直江史郎、高橋　啓：カンジダ菌体抽出物誘導の川崎病類似マウス動脈炎モデルにおける冠状動脈炎関連遺伝子の染色体マッピング. 第43回日本脈管学会総会、平成14年11月7－9日、東京.

38) 古賀大輔、輿水洋平、山越　智、鈴木和男、大富美智子：マウス脳における LECT2 の発現解析. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

39) 川上真紀子、澤田　誠、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H. Krause：Nef 導入ミクログリアにおける O2-産生の増大と神経障害作用の発現. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

40) 奥村彰規、斉藤　武、大川原明子、大谷　功、金山喜一、浅野雅秀、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越　智：関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

41) 宮崎耕司、関塚永一、西田次郎、鈴木和男：Kupffer cell 貪食能に対するLECT2の関連についての検討. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

42) 小田佳史、伊藤三恵、山越　智、永田宏次、山本健二、鈴木和男、田之倉優：NMR およびX線によるLECT2の構造解析. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

43) Dawson W、伊藤ー石田美恵、山越　智、山本健二、田之倉優、鈴木和男：LECT2 の多型におけるMDシミュレーションよる構造変化の解析. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

44) 越尾　修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬渕綾子、鈴木和男：血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAP kinase と Caspase 8 の活性化に対する好中球および Cytokine 類の関与. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

45) 馬渕綾子、越尾　修、長尾朋和、Wheatley A、 鈴木和男：Concanavalin A 静注により惹起されるマウス肝傷害の過程で肝類洞内に出現する F4/80high+ Mac-1high+ 細胞の免疫抑制活性. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

46) 鈴木和男：公開シンポジウムー血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG 治療をめぐって. 血管炎の発症機構の解析：ANCA 血管炎. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

47) 長尾朋和：公開シンポジウムー血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG 治療をめぐって. 血管炎の発症機構の解析：腎臓血管傷害のイメージング. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

48) 猪原登志子、小野孝彦、北　徹、鈴木和男、武曾恵理：公開シンポジウムー血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG 治療をめぐって. 生体防御機能異常ワークショップ－2002／第5回肝臓生物学研究会、平成14年11月8－9日、京都.

49) 斉藤　武、 奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、大川原明子、安保　徹、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越　智：肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析. 第32回日本免疫学会総会、平成14年12月4－6日、東京.

50) 奥村彰規、斉藤　武、大谷　功、大川原明子、金山喜一、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越　智：関節炎モデルを用いたLECT2の役割解析. 第32回日本免疫学会総会、平成14年12月4－6日、東京.

51) 新郷裕子、三浦典子、安達禎之、大野尚仁、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋　啓、直江史郎：*Candida albicans* 菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性におけるマウス系統差とその病態形成への関与の検討. 第 32 回日本免疫学会総会、平成14年12月4－6日、東京.

52) 荒谷康昭、倉　文明、鈴木和男、小山秀機：*Candida albicans* 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼとNADPH オキシダーゼの重要性の比較. 第32回日本免疫学会総会、平成14年12月4－6日、東京.

53) 越尾　修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬渕綾子、鈴木和男：血管内皮細胞の Apoptosis 誘導における p38 MAPK と Caspase 8 の活性化に対する好中球および IL-1β の関与. 第22回日本分子生物学会、平成14年12月12－15日、横浜.

54) Dawson, Wayne、伊藤ー石田美恵、山越　智、山本健二、田之倉優、鈴木和男：Polymorphism and changes in the structural stability of LECT2 as evidenced by molecular dynamics simulations. 第22回日本分子生物学会、平成14年12月12－15日、横浜.

55) Persad A, Kameoka Y, Kanda S, Suzuki K：Identification of a non-synomynous mutaiton in a patient with complete MPO deficiency. 第22回日本分子生物学会、平成14年12月12－15日、横浜.

56) 小田佳史、伊藤三恵、山越　智、山本健二、鈴木和男、田之倉優：サイトカイン LECT2 の X 線結晶構造解析. 第22回日本分子生物学会、平成14年12月12－15日、横浜.

57) 馬渕綾子、長尾朋和、越尾　修、鈴木和男：コンカナバリン A 惹起肝傷害に肝類洞内に出現する免疫応答抑制性細胞の同定と抑制因子 NO の産生動態. 第22回日本分子生物学会、平成14年12月12－15日、横浜.

58) 宮崎耕司、関塚永一、西田次郎、大塩　力、鈴木和男、織田正也、石井裕正：Kupffer cell 貪食能に対する LECT2 の関連についての検討. 第16回　肝類洞壁細胞研究会、平成14年12月14日、東京.

59) 三浦典子、新郷裕子、安達禎之、大川原明子、鈴木和男、大原関利章、高橋　啓、直江史郎、大野尚仁：*Candida albicans* 菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性に関する検討. 日本薬学会第123年会、平成15年3月27－29日、長崎市.

60) 堀田国元、土崎尚史、和田昭仁、荒川宜親：MRSA のアミノグリコシド修飾酵素遺伝子プロフィールとアミノグリコシド耐性の相関性. 第 75回日本細菌学会総会、平成 14 年 4 月 4～6 日、横浜市.

61) 土崎尚史、堀田国元：コロニーダイレクト PCR による MRSA アミノグリコシド耐性遺伝子プロフィールの迅速解析. 第 75 回日本細菌学会総会、平成14年4月4～6日、横浜市.

62) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、朴　春成、菊池　賢、戸塚恭一：黄色ブドウ球菌におけるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子と耐性の相関性からみたアルベカシンの特異性. 第50回日本化学療法学会総会、平成14年5月9～11日、神戸市.

63) 植木雅志、石川　淳、長田裕之、堀田国元：PCRを用いたランダム増幅による未知未利用遺伝得. 2002年度日本放線菌学会大会. 平成14年5月30～31日、つくば市.

64) 土崎尚史、石川　淳、堀田国元、宮道慎二：デジタル放線菌図鑑“Digital Atlas of Actinomycetes”の作成. 2002年度日本放線菌学会大会. 平成14年5月30～31日、つくば市.

65) 池田治生、石川　淳、菊池　久、柴　忠義、榊　佳之、服部正平、大村　智：放線菌 *S. avermitilis* のゲノム解析. 日本放線菌学会大会、平成14年5月30～31日、筑波.

66) 堀田国元、斎藤文子、土崎尚史、宮木洋一：新食品添加物殺菌料 酸性電解水の殺菌活性とその機序. 第6回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム.　平成14年6月24～26日、東京.

67) 池田治生、石川　淳、菊池　久、柴　忠義、榊　佳之、服部正平、大村　智：放線菌の抗生物質生産能のゲノムからの理解. 第75回日本生化学会大会、平成14年10月14～17日、京都.

68) 堀田国元：電解水をめぐる最近の動向. 日本機能水学会平成14年度第1回講演会、平成14年11月16日、東京.

69) 佐々木裕子、石川　淳、山下敦士、大島健志朗、見理剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野　敦、柴　忠義、佐々木次雄、服部正平：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の決定. 第25回日本分子生物学会年会、平成14年12月11～14日、横浜.

70) 堀田国元：機能水研究の歩みと日本機能水学会の役割. 日本機能水学会第1回学術大会、平成14年12月19日～20日、東京.

71) 土崎尚史、宮木洋一、斎藤文子、堀田国元：酸性電解水処理による菌体内DNAの損傷. 日本機能水学会第1回学術大会、平成14年12月19日～20日、東京.

72) 土崎尚史、宮木洋一、堀田国元：各種電解水の菌体成分（DNAおよびアミノ酸）に対する影響. 日本機能水学会平成14年度第2回講演会、平成15年2月15日、東京.

73) 石川　淳、山下敦士、三上　襄、星野泰隆、大島健志朗、古谷恵子、吉野智絵、山下恭江、中澤麻子、柴忠義、服部正平：*Nocardia farcinica* のゲノム解析. 文部省科学研究費補助金・特定領域研究「統合ゲノム」主催、第5回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」、平成15年3月1～2日、木更津.

74) 堀田国元：日本機能水学会の設立の経緯と最近の研究動向. 第3回日本分析化学会関東支部懇話会、平成15年3月27日、東京.

75) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、石川　淳：新しい耐性菌モニタリングシステムの展望：迅速簡便なゲノム解析による耐性菌出現の予測. 日本獣医学会第2回領域横断ワークショップ「日本の薬剤耐性菌モニタリング体制：その確立への課題」、平成15年3月30日、東京.

10. 細 胞 化 学 部

部 長　　西 島 正 弘

概　　要

細胞化学部の目的は､「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス等の病原微生物による感染症の発症要因をその宿主細胞の面から解析する方向で研究に取り組んでいる。特に、病原体の感染とその生体防御の様々な局面において重要な役割を担っている宿主細胞膜の機能解明を当部の研究主軸にしている。更に、感染症の分子レベルからの基礎研究の成果に立脚して、疾病の予防、診断、治療のための応用研究も行っている。

当部での主要研究課題としている高等動物細胞の膜構造とその機能解析の遺伝生化学的･細胞生物学的研究は、感染症研究を含む医学・生物学分野での幅広い応用面を有する課題である。本年度も、ホスファチジルセリン（PS）の細胞内輸送機構とシンドビスウィルス増殖における役割、スフィンゴ脂質の代謝と機能、マラリア原虫やクラミジアの細胞内寄生体およびその宿主細胞における脂質代謝､C 型肝炎ウイルス感染における膜脂質代謝、マクロファージ活性化と生体防御機構の解明、がん化に伴う細胞膜変化の解明など、幅広い分野で数多くの成果を挙げた。

プリオンに関する研究では、プリオン病の早期診断法の開発や異常プリオン産生の分子機構に関する研究を行った。さらに、平成 13 年 12 月からウェスタンブロティング法による牛海綿状脳症(BSE)の行政検査を担当することになり、平成 14 年度は 40 件の確定検査を行った。また、平成 12 年度から開始された科学技術振興事業団重点研究支援課題「プロテオーム解析（プロテオミクス）による感染症研究」は、当部を主軸に順調に行われた。

西島は､厚生労働省の薬事･食品衛生審議会臨時委員、薬事バイオテクノロジー部会員、医薬品副作用被害救済・研究新興調査機構の技術評価委員会専門委員、基礎研究委員会専門委員、GLP 評価委員会委員などの任を果たした。なお、深澤征義主任研究官は 4 月から米国スローンケテリング研究所へ、川崎清史主任研究官は 7 月から米国ワシントン大学医学部へそれぞれ 2 年間の予定で出張に出た。出張地における両氏の益々の研究発展を期待する次第である。

本年度も当研究部の研究に対し、経常研究費に加え、文部科学省、科学技術振興事業団（戦略的基礎研究推進事業）、HS 財団などから多くの研究費を頂く栄に浴した。なお、平成 9 年度から 6 年間に亘り西島が代表を務めた文部科学省科学技術振興調整費総合研究「生体膜脂質の新しい機能の解析技術と制御技術の開発に関する研究」を数多くの研究成果とともに平成 14 年をもって終了することができた。ここに感謝の意を表するとともに、今後とも、化学部以来の善き伝統を引き継ぎ、感染症研究所の基礎研究を担う部として、感染症研究の基盤となる独創性の高い研究成果がでるよう最善の努力をしたいと思う。各位のご理解と暖かいご支援をお願いしたい。

以下に本年度の成果を記す。

研　究　業　績

I.　生体膜の代謝・機能の解析とその感染症研究への応用

1.　動物培養細胞の膜変異株等を用いた膜機能の解析

1-1. 動物細胞におけるホスファチジルセリンの代謝及び生物学的役割に関する研究

（1）ホスファチジルセリンの生合成調節機構に関する研究

我々は以前、動物細胞の主要リン脂質の一つであるホスファチジルセリン（PS）の生合成が、PS によるフィードバックコントロールを受けることを見いだした。さらに、このコントロールでは、PS による PS 合成酵素活性のコントロールが重要であることを明らかにした。そこで本年度我々は､PS による PS 合成酵素活性の制御機構を精製酵素を用いて解析することを目的に、同酵素の精製を試みた。酵素の精製は、FLAG と HA ペプチドを連結した組み換え型の PS 合成酵素２を CHO 細胞において発現させ、それらペプチドに対する抗体を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより行った。その結果、同酵素を SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドになるまで活性を保ったまま精製することに成功した。さらに、精製酵素の活性が外因性の PS により阻害される

ことを明らかにした。従って、PS 合成酵素と PS の直接の相互作用が、細胞内の PS 量を正常に維持するために重要であることが示唆された。[久下　理、西島正弘]

（2）シンドビスウィルス(SIN)レプリカーゼによる遺伝子発現における宿主細胞膜ホスファチジルセリン(PS)の機能

ア．　PS 合成変異株における SIN レプリカーゼによる遺伝子発現の解析

SIN レプリカーゼによる遺伝子発現における PS の役割を明確にする目的で、レポーターとして lacZ 遺伝子を組み込んだ SIN レプリコン RNA を CHO 細胞の PS 合成変異株 PSA-3 に導入し、レプリカーゼによる転写産物（lacZmRNA）量を解析した。PSA-3 細胞は PS を添加して培養すると（PS+細胞）、正常なリン脂質組成を示すが、PS 無添加で培養すると（PS-細胞）、PS とホスファチジルエタノールアミン（PE）の含量が低下する。レプリコン RNA を導入した PS＋細胞と PS-細胞で lacZ mRNA レベルに差はなかったが、PS-細胞抽出液中の βガラクトシダーゼ活性は PS＋細胞の酵素活性の約３０％に低下していた。PS-細胞の蛋白質合成能は正常レベルであると示唆されていることから、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現において、RNA の合成後から翻訳までの過程に PS（または PE）が関与していることが考えられた。[齊藤恭子、久下　理、西島正弘]

イ．　mRNA キャッピング酵素 nsP1 の膜結合における PS の関与

SIN レプリカーゼを構成する mRNA キャッピング酵素 nsP1 は脂肪酸修飾されており、膜に強固に結合している。一方、脂肪酸修飾されない変異を導入した nsP1 も、膜に弱く結合することから、脂肪酸修飾以外の膜結合機構も存在する。nsP1 の膜結合における PS の関与を調べる目的で、SIN レプリコン RNA を PSA-3 株に導入し、膜画分（１０万 g 沈澱）と可溶性画分（１０万 g 上清）への nsP1 の分布を調べた。PS＋細胞と PS-細胞において、殆どの nsP1 は膜画分に存在しており、顕著な差はみられなかった。しかし脂肪酸修飾を受けない変異を導入した nsP1 の場合、 PS＋細胞では約８０％が膜画分に存在していたのに対し、PS-細胞では、膜画分への分布が約６０％へと減少した。以上から、nsP1 の膜結合に PS（または PE）が関与することが示唆された。[齊藤恭子、久下　理、西島正弘]

（3）ホスファチジルセリン合成酵素 1 の活性部位及び調節部位の探索

我々は、哺乳動物細胞におけるホスファチジルセリン（PS）生合成及びその調節過程の分子機構を解明する一環として、PS 合成酵素（PSS）1 の活性およびその調節に関わるアミノ酸残基の特定を試みた。PSS 1 は、PSS 1 と同様に塩基交換反応により PS を合成し、その活性が外来性 PS により阻害されるもう１つの PS 合成酵素である PSS2 とアミノ酸配列において類似性（約 30%の同一性）を示す。そこで、これら２つの酵素に共通する 66 の極性アミノ酸残基に着目し、それらアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異型 PSS１をコードする 66 種のプラスミドを構築した。得られた各プラスミドを CHO 細胞に導入し、それぞれの変異型 PSS 1 を発現させた結果、アラニン置換することにより PS 合成調節に異常を生ずるもの、PS 合成活性或いは酵素発現量を著しく低下させるものをそれぞれ 6 残基、13 残基見出した。本知見は、今後の PSS 1 の膜配向性の解析、更には二次元・三次元的構造解析とともに、PSS 1 の活性発現機構と活性調節機構の解明に極めて重要な知見と考えられる。[大沢智子、久下　理、西島正弘]

1-2.　高等動物細胞におけるスフィンゴ脂質の代謝と機能に関する研究

（１）セリンパルミトイル転移酵素(SPT)LCB1 サブユニットの細胞内局在とトポロジー

スフィンゴ脂質合成の初発ステップを担う SPT は、二つのサブユニット（LCB1 および LCB2）から成る複合体膜酵素である。当研究室では、LCB1 の発現が欠損した CHO 細胞変異株・LY-B 株を分離している。N 末もしくは C 末に HA エピトープタグを付加した LCB1 を LY-B 細胞に発現させると SPT 活性が回復した。エピトープを指標にして LCB1 の細胞内局在および膜トポロジーを解析したところ、LCB1 は小胞体に局在し、その N 末は小胞体内腔側に、C 末は細胞質側に配向していることが明からとなった。LCB1 の膜貫通領域は N 末に近い領域に一カ所だけと予測されるので、LCB1 はその大部分を細胞質側に向けた小胞体膜タンパク質と結論した。[安田智、西島正弘、花田賢太郎]

（２）LCB1 の機能

LCB1 発現が欠損した LY-B 株では、LCB2 発現レベルも低下していることをウエスタンブロット解析によって見出した。LCB1 cDNA を LY-B 細胞に導入すると、LCB2 発現が野生型レベルに回復した。また、LCB2 の過剰発現には LCB1 の共過剰発現が必要であり、過剰生産された LCB2 のほぼ全ての分子は、LCB1 と複合体を形成していた。一方、LCB1 は、LCB2 の共過剰発現がなくとも、単独での過剰発現が可能であった。これらの結果から、LCB2 の安定維持には LCB1 との会合が必要であることが明らかとなった。[花田賢太郎、安田　智、西島正弘]

（３）先天性感覚神経障害１型(HSN1)の原因変異が SPT 活性におよぼす影響

常染色体優性遺伝病である HSN1 は LCB1 遺伝子の特異的なミスセンス変異を伴うことが報告されたので、こ

の変異が SPT 活性に及ぼす影響を解析した。HSN1 患者由来の細胞では、健常者対照に比べて有意に SPT 活性が低く、スフィンゴ脂質生合成も低下していた。ただし、LCB1,LCB2 タンパク質発現レベルには変化がなかった。また、CHO 細胞に HSN1 型 LCB1 cDNA 発現させるとSPT 活性はむしろ抑制された。HSN1 型 LCB1 は、LCB2 と複合体を形成するものの SPT 活性は示さなかった。これらの結果から、HSN1 型変異 LCB1 は，LCB2 と不活性型の複合体を形成し、SPT 活性を優性抑制することが明らかとなった。[花田賢太郎、安田　智、西島正弘：内田良一、Walter Holleran (カリフォルニア大)、Khemissa Bejaoui, Mengfatt Ho, Robert Brown Jr. （デイ神経筋肉研究所)]

（４）細胞内セラミド輸送欠損変異株の機能的相補遺伝子クローニング

LY-A 株は，セラミドの ATP 依存性小胞体-ゴルジ体間輸送が欠損しているためスフィンゴミエリン (SM)生合成が低下している CHO 細胞変異株である。HeLa cDNA ライブラリーをレトロウイルスベクターを用いて LY-A 株に導入後，SM 生合成が回復した形質転換株を分離し、回復株からゲノミック PCR によって cDNA を回収した。回収した cDNA を LY-A 細胞に再導入すると SM 生合成は回復した。このようにして、LY-A 株の SM 生合成を回復させる因子(CERT と命名)をコードする遺伝子 cDNA のクローニングに成功した。[花田賢太郎]

（５）LY-A 変異株の原因変異の同定

ヒト由来 CERT cDNA を LY-A 細胞に導入しても、SM 合成酵素活性や ATP 非依存生セラミド輸送の高進は起こらず、ATP 依存性小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送が特異的に回復した。さらに、野生型 CHO 細胞と LY-A 細胞からそれぞれ CERT cDNA をクローニングして比較したところ、LY-A 細胞由来 CERT は、６７番目のグリシンがグルタミン酸に置換(G67E)していることを見出した。LY-A 細胞は、野生型 CERT の導入で機能回復したが、G67E 変異型 CERT では回復しなかった。これらの結果から、当該 CERT 変異が、LY-A 変異細胞におけるセラミド輸送欠損の原因変異であることが明からとなった。[花田賢太郎、安田　智、西島正弘]

（６）CERT のスプライシング異性体

CERTは、５９８アミノ酸からなる親水性タンパク質であり、アミノ末端約１２０アミノ酸領域にプレクストリンホモロジー(PH)ドメインを、カルボキシル末端約２３０アミノ酸領域にステロイドジェック急性制御タンパク質関連脂質転移 (steroidgenic acute regulatory protein-related lipid transfer; START)ドメインを、それらの中間領域(middle region, MR)のドメインと大きく３つのドメインを持っている。また、MRドメインとSTARTドメインの間に２６アミノ酸が挿入されたスプライシング異性体($CERT_L$)が存在する。LY-A細胞に$CERT_L$ cDNAを導入すると、CERT cDNAの場合と同様に、機能回復した。この結果は、$CERT_L$は、CERTと同じようにセラミド輸送に関わる機能を持っていることを示している。[花田賢太郎]

（７）CERT が触媒するセラミドの脂質膜からの遊離

放射性セラミドを含有するリン脂質多重膜小胞を遠心すると、セラミドはほぼ完全にリン脂質小胞とともに沈殿した。しかし、精製した組換え体 CERT が共存する場合には、リン脂質多重膜小胞は完全に沈殿しながらも、セラミドは膜から遊離して CERT とともに上清み画分に分配するようになった。他の様々な脂質に対する遊離活性を調べたが、セラミド以外の遊離活性は CERT にはなかった。これらの結果から、CERT は特異的にセラミドを膜から遊離させる活性を持つことが明らかになった。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

（８）セラミド遊離活性を持つドメインの特定

CERT の持つ三つのドメイン、すなわち、PH, MR, START の各ドメインの欠失組替え体を用いた解析によって、セラミド遊離活性を持つドメインを特定した。セラミド遊離活性は、START ドメインを欠くと完全に消失し、一方、START ドメインのみから成る組替え体でもセラミド遊離活性を示した。よって、CERT のセラミド遊離活性は、START ドメインが持つ活性であることが明らかとなった。[熊谷圭悟、三浦有紀子、花田賢太郎]

（９）CERT が有する PH ドメインの役割

PH ドメインはホスファチジルイノシトール(PI)リン酸化体への結合能を有する。CERT の PH ドメインの結合脂質選択性を調べたところ、PI-4-一リン酸(PI4P)を特異的に認識することが明らかとなった。LY-A 細胞由来の G67E 変異 CERT では、この PI4P 結合能が失われていた。PI4P 特異的 PH ドメインはゴルジ体にターゲティングすると考えられている。よって、CERT の PH ドメインはゴルジ体ターゲティングに関わり、G67E 変異で本ターゲティング機能が損なわれると示唆される。[熊谷圭悟、三浦有紀子、花田賢太郎]

（１０）セラミド輸送の選択的阻害剤

化学合成によって得られた新規化合物・(1R,3R)HPA-12 がセラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を阻害することを昨年度までに示している。本年度は，(1R,3R)HPA-12 の様々な誘導体を合成し、構造活性相関を解析した。その結果、アミドアシル基の長さは C13 が至適であること、二つある水酸基の両方が活性に必須であることなどを明らかにした。[熊谷圭悟、安田智、花田賢太郎：小林修（東大薬学大学院)]

（１１）哺乳動物スフィンゴミエリナーゼ(SMase)が有するスフィンゴシルホスホコリン分解活性

中性pH領域に至適pHのある中性SMase (nSMase)として、哺乳動物ではnSMase1 およびnSMase2 という２種類のタンパク質が遺伝子クローニングされている。界面活性剤非存在下でのアッセイでは、nSMase-1 はリソホスファチジルコリン(LPC)やリソ血小板活性化因子(LPAF)も加水分解することが知られている。しかし、これらnSMaseが、リソ型SMであるスフィンゴシルホスホコリン(SPC)を基質にするか否かは不明であった。ヒト由来nSMase-1 もしくはnSMase-1 cDNAを導入したHEK293 細胞から調製した膜画分を酵素源として、また、[コリン-メチル-^{14}C]SMを脱アシル化して調製した[コリン-メチル-^{14}C]SPCを基質としてアッセイしたところ、両SMaseともにSPCに対するホスホリーパーゼC活性を示した。本活性は、界面活性剤やnSMase阻害剤であるスキホスタチンで阻害された。

［三浦有紀子、後藤恵理子、西島正弘、花田賢太郎］

1-3. **エキソソームに関する研究**

本研究では、エキソソームの脂質分析およびプロテオーム解析を行い、それらの結果を基盤にエキソソームの形成機構を解明し、エキソソームの抗がんワクチン製造への応用を目指している。昨年度は、B細胞からのエキソソーム分離法を確立し、その脂質分析を行った。本年度はエキソソームのプロテオーム解析を行った。EBウィルスでトランスフォームしたヒトB細胞株COHS-4 の培養液を集め、100,000 x g, 60 min 遠心して沈殿を回収し、その後、sucrose density gradientを行ってエキソソームを分離した。なお、培養に用いる血清は、100,000g, 60 minで遠心処理してその沈殿物を除去したものを用いた。sucrose density gradient後の各フラクションにおけるＭＨＣクラスIIの存在をanti-human HLA-DRで調べたところ、密度 1.2 付近に検出された。^{14}C-acetateで標識した細胞の培養液から分離したエキソソームもほぼ同様の位置に回収された。また、エキソソームの蛋白質組成は、細胞全体の膜画分の蛋白質組成とは大きく異なっていた。これらの結果から、純度の高いエキソソームが得られたものと考えられる。エキソソーム蛋白質を一次元電気泳動で分離し、CBBで染色されるやく３０のバンドについて、MALDI/TOFS質量分析器で解析を行った。PMF法により、現在までに５個の蛋白質を同定した。現在、他の蛋白質の同定をさらに進めているところである。

［西島正弘、佐藤慈子、三浦雅美］

2. **膜応答機能の解析**

2-1. **エンドトキシンによるマクロファージ活性化機構に関する研究**

（１）Orn 含有脂質によるマクロファージの活性化機構に関する研究

アミノ含有脂質であるOrn 含有脂質にはマウスマクロファージを活性化して特に IL-1 の産生を誘導する活性がある。本研究では Orn 含有脂質による IL-1 産生の機構について検討した。その結果、ミセル状に会合した Orn 含有脂質でマクロファージを刺激すると IL-1 は産生されるが、単分子状態の Orn 脂質で刺激すると IL-1 が殆ど産生されないことが解った。さらに、TLR-4 と CD14 の変異マクロファージでは IL-1 が産生されない事からマクロファージにおける Orn 含有脂質の認識経路は LPS（リポ多糖）の認識経路と同じである事が判った。以上の結果はマクロファージの TLR-4 を介した脂質の認識は単なるリガンドとレセプターの結合では説明できない機構が存在することを示唆している。[桶本和男、川崎清史、西島正弘]

（２）リポ多糖の毒性に関する研究

Lipid A はリポ多糖（LPS）の活性部位であるが、その構造により生物活性にも違いが認められる。例えば、LPS の部分分解産物 monophosphoryl lipid A (MPL)は LPS と異なり細胞毒性を示さないことが知られている。しかしながら、なぜ lipid A の構造によって生物活性に差違が生じるのかは明らかになっていない。ところで caspase-1 のノックアウトマウスは LPS の毒性に対して耐性である。本研究では caspase-1 活性を lipid A および MPL で刺激したマウス腹腔マクロファージ（mpMphs）で比較検討した。その結果、lipid A と異なり MPL は mpMphs の caspase-1 を活性化しなかった。MPL は NF B を活性化する事から、LPS は未知のシグナル伝達経路を介し caspase-1 を活性化して毒性を示すと考えられ現在解析中である。［桶本和男、川崎清史、西島正弘］

II. 生体高分子の生化学的・物理化学的研究

1. **Ｃ型肝炎ウイルス（HCV）に関する研究**

（1）Ｃ型肝炎ウイルスコアタンパク質が脂肪滴タンパク質組成および脂肪滴機能に及ぼす影響の解析

Ｃ型肝炎ウイルス（HCV）による肝炎では、脂肪蓄積（脂肪肝）が生じる。このとき細胞内には脂肪滴が認められるが、HCV コアタンパク質は小胞体に加えて脂肪滴にも局在することが知られており、コアタンパク質が脂肪滴上で何らかの機能を果たしていることが予想される。そこで培養肝細胞にコアタンパク質を発現させ、脂肪滴タンパク質群の発現プロファイルを質量分析により解析し、新規に得られた以下の知見に着目した。〔1〕脂肪滴上には、小胞輸送における役割が未だ明確にされていない数種の Rab タンパク質が存在する。〔2〕コアタンパク

質発現により、核酸代謝酵素と思われる数種の機能未知タンパク質が脂肪滴上に増加する。これらの現象が脂肪滴の生成と機能に及ぼす影響を解析するため、RNAi 法による Rab タンパク質等の発現抑制実験を開始し、検討を進めている。[深澤征義、佐藤慈子、永井有紀、山河芳夫、西島正弘（細胞化学部）鈴木哲朗、宮村達男（ウイルス２部)]

（2）C 型肝炎ウィルスのコア蛋白発現による肝細胞のプロスタグランジン合成系への影響について

プロスタグランジン(PG)合成阻害剤である非ステロイド性抗炎症剤が大腸癌等の治療に有効であることが近年明らかになってきた。一方、肝臓癌の大きなリスクファクターとして C 型肝炎ウィルス(HCV)の感染が注目されている。また、HCV のコア蛋白を発現させたトランスジェニックマウスを用いた研究によりこの蛋白の発現が肝癌の発生に関わっていることが示唆されている。しかしその詳細な機序については未だ解明されていない。本研究では HCV 感染による肝癌の発生に PG が関与している可能性について、コア蛋白を発現する培養肝細胞を用いて解析を進めた。その結果、コア蛋白発現細胞では発癌プロモーターの刺激により通常は誘導されていない誘導型プロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素（PGHS）-2 が誘導されること、非誘導型の PGHS-1 の抗原量がコア蛋白非発現細胞とは異なることが示唆された。以上から HCV の感染におけるコア蛋白の発現は肝細胞の PG 代謝に影響を及ぼすと考えている。HCV の研究に於いてこのウィルスの感染がホストの PG 代謝に及ぼす影響を解明することは、今後肝癌の予防と治療の方法を確立する上で新たな方向性を開く重要なテーマではないかと思われる。更に検討を進めている。[田中康仁、小甲真央、佐藤慈子、永井有紀、西島正弘；鈴木哲朗、宮村達男（ウィルス二部)]

2. . プリオン病に関する研究

（１）プリオン病治療薬としてのβ-Sheet Breaker ペプチドの再検討

異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）は、正常型プリオン蛋白質（PrP^{C}）の高次構造が何らかの機構によって変換して生じる。プリオン蛋白質の Ala^{115}-Val^{122} に相当する断片（β-Sheet Breaker ペプチド）は PrP^{C} から PrP^{Sc} への変換を抑制すると報告されている [C. Soto et al., Lancet, 355, 192 (2000)]が、この抑制効果の真偽については十分な検討が為されていない。今回、PrP^{Sc} を産生する培養神経細胞（ScN2a）を用いてβ-Sheet Breaker ペプチドによる PrP^{Sc} への変換抑制効果を追試したところ、抑制効果は認められなかった。そこで、プリオン蛋白質に対するβ-Sheet Breaker ペプチドの親和性を高めるために norbornene 基を介してβ-Sheet Breaker ペプチドを重合させたβ-Sheet Breaker ペプチド・デンドリマーを化学合成した。デンドリマーはモノマー・ペプチドよりも PrP^{C} との解離定数が１０倍向上していることが表面プラズモン分析により示されたにもかかわらず、デンドリマーにおいても PrP^{Sc} 変換に対する抑制効果は得られなかった。[萩原健一、有本博一*、大石剛久*、山河芳夫、西島正弘（*名古屋大学大学院・理学研究科)]

（２）異常型プリオン蛋白質の生成過程についての研究

蛋白質の生合成では、高次構造が正しく折りたたまれる（フォールディング）ことが重要である。近年、小胞体に局在する幾つかの蛋白質が、蛋白質・生合成の初期ステップにおいてフォールディングの校正・制御を行う品質管理の役割を果たしていることが明らかになってきた。正常型プリオン蛋白質（PrP^{C}）から異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）への変換は細胞膜上で起こると予想されているが、詳細は解明されていない。小胞体での品質管理が不正確なために、正しくフォールディングされていないプリオン蛋白質が細胞膜に輸送され、細胞膜上にて容易に PrP^{Sc} に変換するのではないかという可能性を検討するために、PrP^{C} を産生する培養神経細胞（N2a）および PrP^{Sc} を産生する ScN2a 細胞について、小胞体でのフォールディングの校正・制御に関わる CHOP、GRP78 の発現・誘導量をツニカマイシンやジチオスレイトール処理による小胞体ストレス負荷時ないし非負荷時において比較した。その結果、２つの細胞種において有意差は認められず、両者の小胞体での品質管理に機能的差異は無いと考えられた。このことから、おそらく PrP^{Sc} の産生は、その生合成の初期ステップ以降に起因していると予想される。[萩原健一、山河芳夫、西島正弘]

（３）ウシ海綿状脳症病原体（PrP^{BSE}）の生体内分布

ウシ海綿状脳症（BSE）に罹患していることが確認された 2 頭のウシ（ホルスタイン種、雌、平成８年生）について病原体であるプロテアーゼ抵抗性プリオンタンパク（PrP^{BSE}）の組織分布と相対的な含量についてウエスタンブロット法で検討した。その結果、特定危険部位である脳、脊髄など中枢神経系及び回腸遠位部及び、脊髄に接する背根神経節のうち頚神経節、胸（6-7 神経節）腰神経節及び前殿神経節にPrP^{SC}の蓄積を認めたが、肩甲上神経節、腟神経節及び尾神叢ではPrP^{BSE}は検出限界以下であった。なお、回腸遠位部におけるPrP^{BSE}の蓄積はアウエルバッハ神経叢であり、筋肉層にはPrP^{BSE}は蓄積していないことが免疫組織染色によりあきらかとなった。一方、各所のリンパ節、脾臓、扁桃その他の実質臓器にはPrP^{SC}の蓄積を認めることは出来なかった。これらの結果からBSEでは異常型プリオンは神経組織に特異的に蓄積し、中枢神経系に加えてリンパ系組織にも異常型プリオンが蓄積するヒツジの海綿状脳症であるスクレーピーと異なる分布を示すことが明らかとなった。[山河

芳夫、萩原健一、納富香子、西島正弘]

（4）防御型プリオンタンパク質を用いたプリオン病の治療開発に関する研究（I）

ヒトのプリオン遺伝子のコドン219のグルタミン酸がリジンに置換された遺伝子多形（219K）を有する個体はプリオン病に抵抗性を有することが知られている。これは、219Kが正常型プリオンタンパク質(PrP^{C})から異常型（PrP^{Sc}）への複製反応を触媒すると考えられているシャペロン様物質（プロテインX）と強く結合してその活性を阻害する為であると考えられており、219Kが持つこのような作用はプリオン病の治療薬として有望な因子である。今回、ヒトの219K多形に相当するマウスのリコンビナントタンパク(moPrP218K)がプリオン持続感染株であるScN2a細胞のPrP^{Sc}の産生を抑制するか否かを検討した。その結果、培地に添加したmoPrP218Kが濃度依存的に（1 μg/ml以上）PrP^{Sc}の産生を抑制し、内在蓄積したPrP^{Sc}も除去され減少することが確認され、moPrP218Kがプリオン病の治療に応用する事が出来る可能性が強く示唆された。[岸田日帯*、山河芳夫、萩原健一、金子清俊*、西島正弘（*国立精神・神経センター）]

（5）プリオン蛋白質由来のペプチド断片による異常型プリオン蛋白質の蓄積阻害に関する研究

プリオン病に特異的に認められる異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）は正常型プリオン蛋白質（PrP^{C}）の構造変化により生じると考えられており、PrP^{Sc}の蓄積機構を明らかにし，その蓄積を防ぐことがプリオン病の発症予防、治療につながることが期待される。本年度の研究では、PrP^{Sc}のコア部分（90-231）のアミノ酸配列を模したペプチド断片10種を合成し、それらのペプチドのプリオン持続感染神経芽細胞細胞（ScN2a））のPrP^{Sc}の蓄積に及ぼす影響を検討した。その結果，PrP^{C} の第一ヘリックスと第二ヘリックスを結ぶ非構造部分のアミノ酸配列を持つペプチド（Ｐ９）がScN2aの細胞内PrP^{Sc}蓄積量を著しく減少させることが判った。本ペプチドのPrP^{Sc}蓄積阻害の機構の詳細について、現在検討中である。[中村優子、萩原健一、山河芳夫、西島正弘]

III. 細胞膜の構造・機能と細胞病態変化の解析

１. 糖輸送タンパク質の発現と細胞膜分布

ヒト子宮がん由来HeLa細胞の腫瘍性は未知の癌抑制遺伝子により制御されている。正常ヒト細胞との融合によりin vivo腫瘍性の抑制されたHeLa融合細胞は糖輸送タンパク質GLUT1を発現しているのに対し、腫瘍性融合細胞はGLUT3を共発現していた。腫瘍細胞の増殖、転移における糖輸送タンパク質の役割を検討するため、細胞膜における局在性を検討した結果、これら糖輸送タンパク質は異なる細胞膜ドメインに存在し、GLUT1は界面活性剤に難溶性のラフトなどの脂質膜ドメインに存在することが示唆された。そこで、タグ付きベクターに組み込まれた遺伝子をCHO細胞に強制発現した結果、これらの糖輸送タンパク質はそれぞれ特異的な細胞膜ドメインに分布した。糖輸送タンパク質の細胞膜分布を制御する機能ドメインについてさらに検討中である。[佐京智子、北川隆之]

2. 糖輸送タンパク質ファミリーの細胞膜分布と制御因子

促進拡散型糖輸送タンパク質ファミリーの発現は臓器、細胞に特異的で、上皮細胞では極性分布を示し、局在性と機能制御の密接な関連が推定される。そこで、糖輸送タンパク質の細胞膜分布を制御する機能タンパク質を探索する目的で、ヒト上皮系細胞株A431を用いて検討した。その結果、細胞接着性因子のE-カドヘリンがβ-カテニンと複合体を形成し、GLUT1とともに界面活性剤難溶性の脂質膜ドメインに分布することが示唆された。これらの分子間相互作用をさらに検討中である。[佐京 智子、北川 隆之]

IV. 行政検査実績

項目：ウシ海綿状脳症のウエスタンブロット法による確認検査

平成14年度（自平成14年４月至平成15年3月）における検査受付及び結果は以下のとおりである。

検体受付　40　（陰性37、陽性2、判定不能1）

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

01) K. Hanada, N. M. Q. Palacpac, P. A. Magistrado, G. Rai, D. Sakata, T. Hara, D. Chakraabarti, T. Horii, M. Nishijima, and T. Mitamura: Plasmodium falciparum Phospholipase C Hydrolyzing Sphingomyelin and Lysocholinephospholipids: A Possible Target for Malaria Chemottherapy. ***J. Exp. Med***., 195, 23-34, 2002

02) K. Gomi, K. Kawasaki, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum*. ***J. Immunol***., 168, 2939-2943, 2002

03) K. Nishikawa, K. Matsuoka, E. Kita, N. Okabe, M. Mizuguchi, K. Hino, S. Miyazawa, C. Yamasaki, J.

Aoki, S. Takashima, Y. Yamakawa, M. Nishijima, D. Terunuma, H. Kuzuhara, and Y. Natori: A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, 99, 7669-7674, 2002

04) F. Lafont, G. T. van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F. Gisou van der Goot: Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol-sphingolipids raft-mediated CD44-IpaB interaction. ***EMBO J***. 21, 4449-4457, 2002

05) B. Wispriyono, E.M. Schmelz, H. Pelayo, K. Hanada, and D. Separovic: A role of the de novo sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. ***Exp. Cell Res***. 279, 153-165, 2002

06) K. Bejaoui, Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R.H. Brown Jr., W.M. Holleran, and K. Hanada: Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant-negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. ***J. Clin. Invest***. 110, 1301-1308, 2002

07) Y. Kawai, M. Watanabe, M. Matsuura, M. Nishijima, and K. Kawahara: The partially degraded ipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* and ornithine containinglipids derived from some gram-negative bacteria are useful complex lipid adjuvants. ***FEMS Immunol. Med. Microbiol.***, 34, 173-179, 2002

08) T. Sakyo, and T. Kitagawa: Differential localization of glucose transporter isoforms in non-polarized mammalian cells: distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. ***Biochim. Biophys. Acta***, 1567, 165-175, 2002

09) S. Yasuda, M. Nishijima, and K. Hanada: Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. ***J. Biol. Chem.,*** 278, 4176-4183, 2003

10) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, and M. Nishijima: Synthesis of lipid A type carboxymethyl derivatives with ether chains instead of ester chains and their LPS-antagonistic activities. ***Carbohydr. Res***. 338, 47-54, 2003

11) K. Kawasaki, H. Nogawa, and M. Nishijima: Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. ***J. Immunol***. 170, 413-420, 2003

12) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, and M. Nishijima: Synthesis of lipid A type carboxylmethyl derivatives with ether chains instead of ester chains and their LPS-antagonistic activities. ***Carbohydr. Res***. 338, 47-54, 2003

13) O. Kuge, and M. Nishijima: Biosynthetic regulation and intracellular transport of phosphatidylserine in mammalian cells. ***J. Biochem.*** (review) in press.

14) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular basis for lipopolysaccharide mimetic action of taxol and flavolipin. ***J. Endotoxin Res***. in press

15) K. Kawasaki and M. Nishijima: Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from cultured mammalian cells. Membrane protein protocols: Expression, purification, and Characterization. Editted by B.S. Selinsky, ***Methods in Molecular Biology (Vol 228), Membrane Protein Protocols*** Human Press, in press

16) K. Hanada and M. Nishijima: Purification of mammalian serine palmitoyltransferase, a hetero-subunit enzyme for sphingolipid biosynthesis by affinity-peptide chromatography Methods in Molecular Biology: Membrane Protein Protocols, Edited by S. Selinsky, ***Methods in Molecular Biology (Vol 228), Membrane Protein Protocols*** Human Press, in press

２．　和文発表

01）**川崎清史**，**西島正弘**: Toll-like receptor 4 **の新しいリガンド：**Flavolipin，**エンドトキシン研究** 5，45-49，2002

02）**川崎清史**，**西島正弘**: LPS **及び** LPS **アゴニストの認識・識別に関わる分子**，**別冊・医学のあゆみ「動物界における免疫系の進化」**，**医歯薬出版**，52-56，2002

03）**川崎清史**: **エンドトキシン受容体としての** Toll-like receptor **研究**，**臨床と微生物** 30，255-259，2003

04）**西島正弘**: **ホスファチジルセリンデカルボキシラーゼ**，**タンパク質化学第４巻酵素**，**廣川書店**，67-71，2002

05）**西島正弘**: **新興・再興感染症**，**病原微生物学**，**東京化学同人**，65-70，2002

06）**萩原健一**: **酵素的分析法（第４章** 10 **節** 2 **節）**，**分析試料前処理ハンドブック 中村洋編**，**丸善**，2003

II.　**学会発表**

1.　**国際学会**

01) M. Nishijima: Biochemical study of intracellular transport of phosphatidylserine in CHO cells. Annual Meeting of American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Symposium on Lipid Traffic and Enzymology in Membrane Assembly. 2002.4.23, New Orleans, USA
02) M. Nishijima: Genefic and Biochemical Studies on the Biosynthesis and Functions of Membrane. Phospholipids in Mammalian Cells. 15th International Symposium on Plant Lipids. 2002.5.14, Okazaki
03) K. kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular Basis for Lipopolysaccharide Mimetic Action of Taxol and Flavolipin. The 7th conference of the international endotoxin society. 2002.7., Washington, D.C., U.S.A.
04) K.Bejaoui, Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R. H. Jr. Brown, W. M. Holleran, and K. Hanada: Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant-negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. 6th Membrane Research Forum, 2002.11.5, Nagoya
05) K. Gomi, K. Kawasaki, and M. Nishijima: Toll-like receptor 4-MD2 complex mediates a signal induced by serine-glycine containing lipid(flavolipin) of Falvobacterium meningosepticum. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2003.8.24-27, Awaji Island

2. **国内学会**

01) **川崎清史**: **カルジオリピン合成系酵素温度感受性変異株における酸化ストレスによる細胞死の解析**, **第** 44 **回 日本脂質生化学会** 2002.6.14（**東京**）
02) **花田賢太郎**: **スフィンゴ脂質代謝異常と疾患**, **平成** 14 **年度日本油化学会 生物科学・工学部会セミナー** 2002.6.21
03) **花田賢太郎**: **スフィンゴ脂質合成の鍵酵素・セリンパルミトイル転移酵素： 構造と機能および遺伝病**, **第** 112 **回 東京脂質談話会** 2002.7（**東京**）
04) **佐京智子**, **北川隆之**: **糖輸送タンパク質ファミリー** GLUT1**の細胞膜分布と細胞骨格の関与**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.15（**京都**）
05) **佐藤慈子**, **深澤征義**, **山河芳夫**, **鈴木哲朗**, **宮村達男**, **西島正弘**: **脂肪滴のプロテオーム解析**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.15（**京都**）
06) **西島正弘**, **相良康子**, **小嶋英二朗**, **川崎清史**, **白木洋**, **前田義章**: HTLV-1 **感染受容体における** Phosphatidylglycerol **の役割**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.15（**京都**）
07) **久下 理**, **大澤智子**, **西島正弘**: **動物細胞におけるホスファチジルセリン生合成の制御機構**, **第** 75 **回 日本生化学会大会**, **シンポジウム：脂質代謝と膜輸送の接点** 2002.10.16（**京都**）
08) **中村優子**, **萩原健一**, **山河芳夫**, **西島正弘**, **佐伯圭一**, **小野寺節**: **ウィルス感染時におけるプリオン蛋白質の機能関与**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.16（**京都**）
09) **大内史子**, **西島正弘**, **金子清俊**, **山河芳夫**: **プリオン病のプロテオーム解析**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.16（**京都**）
10) **岸田日帯**, **逆瀬川裕二**, **青戸久美子**, **鎌田礼子**, **山河芳夫**, **西島正弘**, **黒岩義之**, **八谷如美**, **金子清俊**: **防御型プリオンタンパク質を用いたプリオン病の治療法開発の培養細胞における検討**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.16（**京都**）
11) **田中康仁**, **滝澤万紀子**, **五十君靜信**, **天野富美夫**: RAW 264.7 **マクロファージ細胞における非ステロイド系抗炎症剤による** PGHS-2 **誘導の促進とプロスタグランジン合成阻害への影響について**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.16（**京都**）
12) **花田賢太郎**, **安田智**, **西島正弘**: Bejaoui Khemissa: **遺伝性知覚神経障害** I **型の原因変異がスフィンゴ脂質合成初発酵素・セリンパルミトイル転移酵素に及ぼす優性欠損効果**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.17（**京都**）
13) **西島正弘**, **中島龍**, **今井浩孝**, **北島理沙**, **川崎清史**, **中川靖一**: **カルジオリピン合成系酵素による酸化ストレスによる細胞死の抑制機構の解析**, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.17（**京都**）
14）**相良康子**, **井上由紀子**, **小嶋英二朗**, **川崎清史**, **西島正弘**, **白木洋**, **前田義章**: HTLV-1 **感染受容体における** Phosphatidylglycerol **の役割： 第２報** Role of Phosphatidylglycerol in Receptor Complex for Cell-to-cell Transmission of HTLV-1, **第** 75 **回 日本生化学会大会** 2002.10.17（**京都**）
15）**花田賢太郎**, **西島正弘**: **スフィンゴ脂質合成の鍵酵素・セリンパルミトイル転移酵素の遺伝生化学**, **公開シンポジウム「ポストゲノム時代をリードするリピドバイオロジー」** 2003.1.23（**東京**）
16）**佐京智子**, **北川隆之**: Hela **融合細胞 における糖輸送タンパク質ファミリーの発現と細胞膜分布**, **第** 123 **年会 日本薬学会** 2003.3.27（**長崎**）

１１．昆虫医科学部

部　長　　小林　睦生

概　　要

平成１４年度、当該部の運営および研究・調査等に関する業務実績の概要は以下の通りである．

人事に関する事項では，８月１日より津田良夫が第１室長として長崎大学から転任し，澤邉京子が第２室長として採用された．新たに，安居院宣昭，倉橋　弘が厚生労働研究事業の継続のために客員研究員として加わり，和田義人，栗原　毅，二瓶直子は客員研究員として，デ・マ・テーラー，李時雨，主藤千枝子は協力研究員として本年度も継続された．本年度に実施された研究課題およびその内容は以下の通りである．

I.　衛生昆虫類の媒介生態・分類に関する研究

デング熱媒介蚊であるネッタイシマカの生態遺伝学的調査をインドネシア，タイ由来の系統を用いて行い，白色系統と黒色系統との吸血後の寿命，産卵数に有意な差が認められた．東北地方におけるヒトスジシマカの分布調査では，新たな分布域の北進は認められなかったが，2000 年に初めて分布が確認された山形市の調査では，全市的に同蚊の分布が広がっており，刺咬被害が発生していることがアンケート調査で明らかとなった．ヒトスジシマカの寄生原虫(*Ascogregarina*)に関して，原虫オーシストを感染させた１齢幼虫から大量にスポロゾイトを集める方法を確立することに成功し，遺伝子導入への準備が進んでいる．北海道東部の能取湖畔で夏季に大量に発生するセスジヤブカの調査を行い,実験室内で採卵し，年２回発生することを確認した．インドネシア・ロンボク島におけるマラリアの媒介蚊の調査では，山間部では *Anopheles balabacensis* が主要な媒介蚊であることが明らかとなった．北海道におけるマラリア媒介蚊の分布調査を行い，道東においては、*An. engarensis* が多く見られ，*An.　lesteri* も一部の地域で確認された．ソロモン諸島におけるマラリアリスクマップ作成に GIS およびリモートセンシングを用いた．GIS の手法を大阪府におけるセアカゴケグモの分布解析に応用し，今後のゴケグモ対策の一助とした．ハエ類が多包条虫の卵を播種する可能性を考え，北海道において，キタキツネの糞に集まるハエ類の調査を行った．大分県におけるメマトイ類の *Thelazia* 幼虫感染状況を明らかにするために調査を行い 3 種のメマトイから 1-3 期幼虫を検出し，遺伝子配列より，東洋眼虫と同定した．センチニクバエの休眠性と地理的分布との関係も継続して調査している．

山形県大江町より温泉施設に大量に飛来するイヨシロオビアブの調査を依頼された．１晩で 2,000 匹ほどのアブがドライアイストラップで捕集されたが，発生源が森林の土壌であることから，薬剤による防除が困難で，トラップによる誘引捕殺を対策として奨励した．

衛生動物同定依頼

平成 14 年度は 34 件 473 個体の昆虫，マダニ，クモ等の同定依頼を受けた．また，厚生労働科学研究費関連で，成田空港検疫所，関西空港検疫所，大阪検疫所，横浜検疫所等よりの依頼検体の同定も行った．

II.　衛生昆虫類の生理・生化学・遺伝学的研究

北海道のハマダラカの分子系統分類を試み，rDNAITS2 の解析で，４種類を同定することが可能となった．ネッタイシマカの斑紋変異系統のエネルギー代謝の特徴を調べ，飛翔距離に系統間で差があることが明らかとなった．ウエストナイルウイルスの検出キット(VecTest)を用い，従来の PCR 法と検出感度を検討した．簡便さ等を考慮すると，大量捕集蚊のスクリーニングには有用と判断された．オオクロヤブカの cDNA ライブラリーを作製し，液性防御機構の初期反応の解明に利用する．冬期に世代交代を行うクロバエ類の脂質代謝において，融点が低いパルミトオレイン酸の組織含有率が高く，このことが低温環境への適応に貢献していることが示唆された．路上生活者に寄生するコロモジラミからの塹壕熱の病原体検出を継続して行っている．アタマジラミは現在も散発的に流行しているが，現在使用されているピレスロイド剤に対する抵抗性のコロニーを初めて検出し，その抵抗性の分子機構の解析から，作用点であるナトリウムチャンネルのアミノ酸置換が全ての抵抗性アタマジラミから検出された．また、コロモジラミにおいて有機りん剤に対する抵抗性に関わる，第２のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の塩基配列を決定した．また，コガタアカイエカの第２の AChE 遺伝子を解析し，第２染色体上の位置を特定した．ネッタイイエカのピレスロイド剤抵抗性に関わる分子の解析により，２つのアミノ酸置換によって非常に高度な抵抗性を示す事が示された．シラミ類の保存方法が PCR 増幅に与える影響を検討し，餓死後常温で 8 週間保存したシラミから目的遺伝子の核 DNA 断片が増幅できることが示された．また，コロモジラミの人工膜吸血法を検討し，約 30%が１齢幼虫から成虫まで発育した．この方法は，シラミ媒介性病原体の感染実験に応用可能である．

研　究　業　績

Ⅰ．衛生昆虫類の媒介生態・分類に関する研究

（１）都市化がもたらすデング熱媒介蚊の生態遺伝的変化

インドネシア・スラバヤで採集され，人為選抜されたネッタイシマカの白色系統と黒色系統を用いて，個体群形質の違いを室内実験によって調べた．吸血させずに砂糖水だけを与えて飼育したときの成虫寿命は 35-36 日で系統間に差はなかった．しかし吸血させた場合の平均寿命は黒色系統が 51 日，白色系統は 39 日で，黒色系統の方が長命であった．純繁殖率は黒色系統が 176，白色系統は 121 と，黒色系統の繁殖能力の方が高かった．タイ・チェンマイのネッタイシマカ集団に対しても体色による人為選抜を行った．

［津田良夫，澤邉京子；江下優樹（大分医大）；高木正洋（長崎大)］

（２）東南アジアにおける蚊媒介性疾患の流行を左右する環境の定量的評価

インドネシア・ロンボク島でマラリア媒介蚊の現地調査を実施した．幼虫・成虫の定期調査によって，この地域の主要媒介蚊がほぼ明らかになり，山地部では *An. balabacensis* が主要媒介蚊であることがわかった．本種の生態的性質を明らかにするために，室内飼育系統の確立を試みたが失敗した．

［津田良夫, 澤邉京子；高木正洋, 川田　均, 谷村　晋, 中澤秀介，長谷部太，安高雄治，都野展子(長崎大)；中谷知樹（立命館大)；杉山　章（名古屋女大)；吉村光則（総合地球環境学研)］

（３）リモートセンシングによるインドシナ半島におけるマラリア浸淫状況の解析

インドシナ半島のマラリア危険地図を作成するために，行政区別の各種のマラリア罹患分布図と，NOAA のデータから得られた 1997 年の月別植生指数 NDVI 図を， Imagine や ArcGIS 等のパソコンソフトで解析した．月別 NDVI 値が 0.35 あるいは 0.4 の月数が，熱帯熱マラリアの危険率を説明していることを明らかにした．

［二瓶直子，小林睦生；橋田良彦（日大)；石井　明（自治医大)］

（４）ソロモン諸島国におけるマラリアリスクマップ作成

民族紛争や自然環境の問題から現地調査の困難な島嶼マラリアの感染状況を，簡便に推測する方法をガダルカナル島で検討した．GIS やリモートセンシングを活用して，海岸平野，後背湿地，三角州や内陸の段丘など地形，景観の異なる地域の小学校でマラリア罹患率を調査した結果と，森林，土壌，土地利用などの要因を比較して，マラリアリスクマップを作成した．

［二瓶直子，小林睦生；橋田良彦（日大)；川端眞人（神戸大)；Bacotee, B., Leafasia, J.（Solomon Islands MTRI）；石井　明（自治医大)］

（５）GIS による地理的分布パターンから推測されるセアカゴケグモの拡散様式について

セアカゴケグモの移動・拡散様式を明らかにする目的で，1995 年 11 月から 2002 年 12 月までの生息確認地を年度別および番地別に図化した．新しい確認地点から前年度までの確認地点までの最短距離を結び，年度ごとに重ね合わせて，移動の年代と移動距離・移動方向を解析した．その結果，移動・拡散は自力歩行による移動と車等の輸送手段を利用した移動によって起こり，仔グモが糸を使って空中飛行する分散方式ではないことが示された．

［二瓶直子，小林睦生；吉田政弘（大阪府公衛研)；金田弘幸，嶋村竜太（パスコ GIS 総合研)］

（６）モバイルシステムによるハマダラカ類の採集地点の図化と地理情報収集の試み

北海道の戦前・戦後におけるマラリアの流行が見られる地域におけるハマダラカ類の調査を, ArcPad(ESRI 社）を搭載したポケット PC を用いてモバイル GIS を実施した．緊急監視体制の地図作成や流行予測に寄与すると考えられる．

［二瓶直子，小林睦生；斎藤康秀（麻布大)］

（７）東北地方におけるヒトスジシマカの分布調査：山形市の事例

東北地方におけるヒトスジシマカの分布調査を継続して行っているが，2001 年に横手，水沢，気仙沼，新庄で新たに分布を確認したが，2002 年の調査では新たな分布域の拡大は確認されなかった．山形市では，2000 年に初めてヒトスジシマカが確認されたが，その後徐々に分布が広がり，2002 年に実施されたアンケート調査では，広範に刺傷被害が発生している事が確認された．

[小林睦生，二瓶直子，栗原　毅]

（８）北海道北東部の能取湖畔で採集されたセスジヤブカの産卵

フラビウイルスの媒介蚊として知られるセスジヤブカに関して，北海道北東部で発生源調査を行い，牛舎から吸血雌を多数採集した．実験室内で産卵させることを試みたところ，園芸用土壌の中に数個ずつ産卵することが明らかとなった．これら次世代の幼虫を飼育し，成虫に

まで発育したことから，北海道でセスジヤブカは年２回発生することが確認された.
[小林睦生，二瓶直子，栗原　毅]

（９）無弁翅ハエ類の分類・生態学的研究
マダラフンコバエ *Poecilosomella punctipennis* は東洋区・オーストラリア区・大洋州地区における普通種で，ヒト親和性の種として知られている．このハエを再検討した結果，従来１種として扱われてきた本種に２種が含まれていることが判明し，1 種を *Poecilosomella affinis* として新種記載した．両種は分布もほとんど重なり，形態的にも交尾器の構造を調べなくては確実な同定は難しい．生態的には前者は主に家畜の糞に集まるのに対し，新種のほうは人糞に好んで集まり，ヒト病原体の機械的媒介者としては新種のほうが重要と思われた.
［林　利彦］

（10）ハエ類が多包条虫感染に関与する可能性に関する研究
北海道における多包条虫症のヒトへの感染は飲料水汚染，野菜や果物に付着した虫卵の摂食等諸説あるが，詳細は不明である． 我々はクロバエ科のハエの１種がある種の条虫卵を媒介していることを実証した仕事（Lawson, 1989）に着目し，多包条虫もハエが媒介に関与している可能性を探るため，北海道においてキタキツネの糞に集まるハエ類を採集し，腸管と体表から卵の検出を試みた．採集されたハエ類は 8 科 13 種 46 個体であったが, これらから虫卵を見いだすことはできなかった.
［林　利彦, 二瓶直子, 小林睦生；堀尾政博（産業医大）］

（11）イヨシロオビアブの大発生とその防除に関する調査研究
イヨシロオビアブ *Hirosia iyoensis* は森林の土壌より発生し，各地で大量発生が知られる．今回，山形県大江町の露天風呂へこのアブが大量に飛来し，客に被害を与えるという報告を受け，現地調査を行った．発生地は温泉の山側の森であることが判明し, トラップ調査の結果, 一晩で 2,000 個体近く捕集された．この種は無吸血産卵をすることと発生源が森林の土壌であることから薬剤駆除が難しく，温泉客が咬傷被害にあわないようにドライアイストラップを設置し，誘引捕殺する方法で対策指導を行った.
［林　利彦, 森林敦子, 倉橋　弘, 冨田隆史, 葛西真治, 小林睦生；渡辺　護(富山衛研)］

（12）大分県におけるメマトイ類の *Thelazia* 幼虫感染に関する研究
大分県下 11 カ所においてメマトイ類を採集し，*Thelazia* 幼虫の検出を行った．877 個体を解剖し，カッパメマトイ *Amiota kappa,* オオマダラメマトイ *A. magna*, マダラメマトイ *A. okadai* の３種から *Thelazia* の第 1，2，3 期幼虫を検出し，感染率は 3.8%，3.2%， 2.3%であった．大分県下のヒト症例からの東洋眼虫 *Thelazia callipaeda* 成虫と今回検出された幼虫の遺伝子配列とを照合し，一致したことより，これら幼虫は東洋眼虫と同定された.
［林　利彦；青木千春, 大塚　靖, 高岡宏行（大分医大）］

（13）センチニクバエの蛹休眠に見られる多様性と進化
センチニクバエは東南アジアを中心に南北半球に広く分布している．北半球の温帯地域では蛹休眠で越冬し，赤道周辺と南半球では非休眠または休眠率が低い．今回チェンマイ市郊外 MaeThang で最寒期に採集したコロニーについて調べ，休眠率０％を得た．これは前にチェンマイ市内で９月に得られたコロニーの高い休眠率(99%)と異なる結果である．亜熱帯では比較的狭い地域でも，サンプルした場所や季節によって休眠性は大きく異なる可能性が示唆された.
［倉橋　弘，森林敦子，主藤千枝子，津田良夫；K.& K. Sukontason(チェンマイ大)］

（14）衛生動物同定検査報告
平成 14 年４月から平成 15 年３月までの間，34 件 473 個体の昆虫・マダニ・クモ等の同定依頼を受けた．昨年度・一昨年度に引き続き，厚生労働科学研究「疾病媒介昆虫の侵入・移動分散の監視・防御に関する研究」の一環として，成田空港・関西空港・大阪・横浜等の検疫所より，港湾地区や海外からの到着便航空機内で採集された昆虫類の同定を依頼された．航空機によって日本に侵入する昆虫種の多くが夜間灯火に飛来する習性のある種であることが判明した．なお同定依頼に関して，エクアドルのジャングルにて感染したヒトヒフバエの輸入症例が含まれている.
［林　利彦，津田良夫，倉橋　弘，栗原　毅］

Ⅱ．衛生昆虫類の生理・生化学・遺伝学的研究

（１）日本産ハマダラカ属 hyrcanus 種群の分子系統分類の試み
2002 年７月北海道で採集されたハマダラカ *Anopheles* 属 hyrcanus 種群の蚊は，採集個体および次世代の成虫の形態的特徴から *An. sinensis*，*An. engarensis*，*An. lesteri* の３種類に分類された．しかし，形態的特徴にのみよる鑑別は非常に難しいことから，rDNA ITS2 領域の塩基配列の比較による分子系統分類を試みた．その結果，前出の北海道採集群は *An. lesteri*，*An. sineroides*，*An. sinensis*，*An. engarensis* に分かれ，それぞれが明らかに独立したクラスターに位置することが分かった. 今回の結果から，これまで主に形態的特徴により種の分類が困難であった *sinensis* と *engarensis* の鑑別に対しても有用であること

が明らかとなった.
［澤邉京子；高井憲治（聖マリアンナ医大）；二瓶直子，小林睦生，栗原　毅］

（２）VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出
蚊からのウエストナイル（WN）ウイルスの検出には，従来 RT-PCR 法を用いたウイルス遺伝子を検出する方法が用いられてきたが，近年，米国においてウイルス抗原検出用の VecTest が簡便なキットとして開発された．そこで両検出法の有用性について検討した．本邦産２種の雌成虫（ヒトスジシマカ，アカイエカ）を各ウイルス量に希釈した WN ウイルス液を加えて磨砕し検出感度を検討した．その結果 RT-PCR 法は VecTest に比べはるかに検出感度に優れていた．次いで，WN ウイルスを胸部に注射し作成された感染蚊を用いて検出したところ，50 匹中 1 匹でも感染蚊が存在すれば，どちらの方法においても検出可能であった．迅速さと簡便さにおいては VecTest が優るものの，検出感度については RT-PCR 法が優れている結果を得た.
［佐々木年則，澤邉京子；伊藤美佳子，高崎智彦，倉根一郎（ウイルス第一部）；江下優樹（大分医大）；小林睦生］

（３）ネッタイシマカ成虫腹部における斑紋変異とグリコーゲン・中性脂肪量との関係
ネッタイシマカ成虫の腹部には斑紋変異が知られており，この斑紋変異と蚊のデング熱ウイルスに対する感受性や殺虫剤抵抗性との関連性も指摘されている．今回はまず斑紋変異の生理的意味をエネルギー代謝の観点から考察するために，ベトナム国内で採集し維持しているネッタイシマカのコロニーから白色個体および黒色個体をそれぞれ人為選抜しグリコーゲンと脂肪量を測定した．さらにそれらの個体を飛翔量測定装置によって飛翔させた．黒色個体は白色個体に比べ，速度は遅いもののより長い時間と距離を飛翔できることが分かった．この結果は黒色系統がグリコーゲンよりも脂肪を効率よく利用できるのに対し，白色系統では逆にグリコーゲンをより多く利用するという，エネルギー利用の特徴から生じるものであると推察された.
［澤邉京子，津田良夫；T. V. Phong，V. S. Nam（ベトナム衛生疫学研究所）；上宮健吉（久留米大）；高木正洋（長崎大)］

（４）路上生活者より採取されたコロモジラミから塹壕熱病原体 *Bartonella quintana*（*B. quintana*）の検出（3）
東京都内のホームレスの衣服から採取したコロモジラミにおいて，塹壕熱の病原体 *B. quintana* の存在を昨年に引続き PCR 法で調べた．13 人由来のコロモジラミを調べた結果，*B. quintana* のクエン酸合成酵素 A 遺伝子断片や 16S-23S rRNA 遺伝子 intergenic spacer region 1 (ITS1)は検出されなかった．1999 年以降コロモジラミからの *B. quintana* の検出率は，7.5 %（3/40）となった.
［佐々木年則，澤邉京子；佐々木次雄（細菌第二部）；小林睦生］

（５）オオクロヤブカ（*Armigeres subalbatus*）由来 cDNA ライブラリーの作製
マラリア原虫に対する蚊の殺滅機構として，プロフェノール活性化系が知られている．プロフェノール活性化系に関わると考えられるシアル酸特異的レクチンの cDNA クローニングを行うため，異物に対して強力なメラニン化反応が観察されるオオクロヤブカ(*Armigeres subalbatus*)を用いて cDNA ライブラリーの作製を行った.
［佐々木年則，澤邉京子，小林睦生］

（６）長距離移動性昆虫の国内への飛来経路と発生源推定
長距離移動性衛生昆虫類のわが国への飛来経路とその発生源の推定を行うための基礎研究として，2 種類のトンボについて分子系統分類学的検討を行った．1999 年から 2002 年にかけて韓国および日本各地で採集したウスバキトンボ *Pantala flavescens* とアカトンボ属（*Sympetrum* spp.）のミトコンドリア DNA 16S rRNA 領域の塩基配列を解析した結果，ウスバキトンボについては種間の差以上の差異を表すことはできなかったが，アカトンボ属においては，これまで日本特産種とされてきたアキアカネ *S. frequens* が韓国産タイリクアキアカネ *S. depressiusculum* と同一種であることが明らかになった．この結果は両者のこれまでの分類学的な位置関係を見直す必要性を示唆した.
［澤邉京子；上田哲之（石川県農業短大）；東　和啓（佐賀市）；李　承模（ソウル市・韓国)］

（７）オオクロバエの脂質について
オオクロバエは, 冬期の短日低温下で世代交代を行い，夏期の長日下では，成虫休眠に入る．低温下での成虫の生理学的な特徴を脂質分析から試みた．脂質の構成脂肪酸は，主にシス型のパルミトオレイン酸で，40 %から 50 %を占めた．この脂肪酸の融点は，± 0.5C と低い．このように融点の低い脂肪酸を高率に含有する脂質は，低温下の冬期において生体内において利用されやすいと考えられる．この脂肪酸は，同様に冬期に世代交代を行うケブカクロバエにおいても卵巣や脂肪体に 40 %の高率で含有されていた．冬期において世代交代を行うクロバエ２種から同様の結果が得られたことから，シス型のパルミトオレイン酸の増加は，低温下での環境に適応するために有利に働いているものと思われる.
［森林敦子，林　利彦，主藤千枝子，倉橋　弘］

（８）ヒトスジシマカ寄生原虫への遺伝子導入のためのスポロゾイトの分離法

ヤブカ類には，非病原性で，宿主特異性の高い寄生原虫 *Ascogregarina* spp.が認められており，この原虫を外来遺伝子のベクターとして利用できる可能性が考えられる．そこで，遺伝子導入ステージとして最適と考えられるスポロゾイトを分離する方法を検討した．ヤブカ１齢幼虫に大量にオーシストを感染させ，１時間後に中腸を解剖してスポロゾイトを回収する方法が最も効率がよかった．なお，これら回収されたスポロゾイトは緩衝液中で最低 12 時間感染性を保持していた．

［Sudipta Roychoudhry，小林睦生］

（９）アタマジラミのピレスロイド剤感受性調査と作用点の構造変異

2001 年より首都圏でアタマジラミのフェノトリン感受性試験を継続して行っており，今年度新たに調べた５コロニーはすべて感受性を示し，累積すると抵抗性コロニーの割合は 3/15 となった．ピレスロイド作用点のナトリウムチャンネルの構造変異について，抵抗性の２コロニーと感受性の１コロニーを解析した．これまでに解析を終えた３つの抵抗性コロニーは共通して４つのアミノ酸置換変異をホモ接合で有した．これらの置換の内，DII S5 領域の T952I 変異に関して TaqMan プローブを用いたジェノタイピング法を確立した．

［冨田隆史，葛西真治；矢口　昇（池袋保健所）；安居院宣昭］

（10）コガタアカイエカの２つ目のアセチルコリンエステラーゼ遺伝子と有機りん剤抵抗性に関連する点突然変異

有機りん剤抵抗性 Toyama 系統のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)はフェニトロオクソンに対して 870 倍の感受性低下を示す．本種で２番目となる 701 アミノ酸残基をコードする AChE cDNA 配列（*Ace2*）を決定し，成熟タンパク質配列に Toyama 系統特異的な唯一のアミノ酸置換を同定した．抵抗性系統と感受性系統の間の戻し交配個体を使いサザンブロット解析と酵素阻害実験を行い，*Ace2* 構造遺伝子と AChE 殺虫剤非感受性因子は第２染色体上の 1 cM 以内のごく近傍に存在した．

［冨田隆史；鍋島　武（筑波大）；森　章夫（Univ. of Notre Dame）；古崎利紀, 葛西真治；河野義明（筑波大）］

（11）コロモジラミの第２アセチルコリンエステラーゼの構造解析

アセチルコリンエステラーゼ（AChE）は，国外でヒトジラミの駆除剤として広く用いられている有機りん系殺虫剤の作用点である．ヒトジラミの殺虫剤抵抗性を分子診断する目的で，既知の昆虫種第２族 AChE　の保存配列に基づき，コロモジラミで２番目となる AChE cDNA 配列をプライマーウォーキングにより決定した．翻訳開始点を確定することはできなかったが，少なくとも 708 アミノ酸残基から成る第２族 AChE 前駆体タンパク質をコードしていた．

［李時雨，葛西真治，冨田隆史］

（12）核酸増幅のためのヒトジラミ保存条件の検討

コロモジラミを用いて PCR 増幅が可能なシラミ保存法を検討した．生きた虫体をエタノールの中に常温で浸漬保存しても，餓死後常温でシラミを保存しても，８週後に抽出した DNA を用いて 0.8 kb のナトリウムチャンネル遺伝子の核 DNA 断片が増幅された．エタノール中に浸漬保存した場合であっても，１日後に抽出した RNA を用いた場合 RT-PCR 産物が得られたものの，４日目以降に抽出した RNA では RT-PCR 産物を得ることは困難であった．

［李時雨，葛西真治，冨田隆史］

（13）コロモジラミの人工膜吸血法確立に関する研究

飼育法が確立されていないコロモジラミの人工膜吸血法確立に取り組んだ．パラフィルム，脱脂綿および保存液を添加した人血を用いて血液パッドを作製し，コロモジラミ１齢幼虫に 21 日間連続で吸血させ，毎日の死亡個体数，脱皮数，産卵数を調べた．その結果，シラミ媒介性病原体の感染実験に応用可能なレベルまで効率よく吸血させることが出来たが，成虫脱皮率は 33 %程度にとどまったことから，継代飼育に用いるためにはさらに改良を加える必要があると考察された．

［葛西真治；三原　實（日本環境衛生センター）；高橋正和，安居院宣昭，冨田隆史］

（14）ピレスロイド剤抵抗性ネッタイイエカの作用点変異に関する研究

ピレスロイド剤抵抗性ネッタイイエカについて，ナトリウムチャネルの構造変化と抵抗性レベルについて調べた．これまでに抵抗性系統から見つかった２種類のハプロタイプについて，それぞれの遺伝子をホモにもつ個体群の分離を試み，純化が進んだ２つのコロニーについて permethrin 感受性を調べた．その結果，両コロニーは共に高い抵抗性を示したことから，２つのアミノ酸置換によって同レベルの薬剤感受性低下がもたらされることが確認された．今後，野外集団における抵抗性の分子診断に応用可能である．

［葛西真治，李時雨，冨田隆史］

（15）キイロショウジョウバエのチトクロム P450 発現に関する研究

cDNA アレイ法を用いて，キイロショウジョウバエのチトクロム P450 の遺伝子発現解析を行った．その結果，

脱皮ホルモンの合成に関与している P450 を２分子種と，雄体内で雌の 80 倍以上発現している P450 (*Cyp312a1*)を特定することに成功した．*Cyp312a1* の遺伝子発現は成虫期にピークがあることと，その発現の大部分が腹部に集中していることから，*Cyp312a1* が生殖に関わる生理活性物質の代謝に関与していることが示唆された．これらの P450 は今後，新しい昆虫制御剤の作用点として発展する可能性がある．

［葛西真治，冨田隆史］

発表業績一覧

Ⅰ．誌 上 発 表

１．欧文発表

原　　著

１）Shinonaga, S. and Kurahashi, H.: Two new species of the tribe Hydrotaeini from Indonesia（Diptera: Muscidae）. Med. Entomol. Zool. , 53: 43-47, 2002.

２） Hayashi, T.: Description of a new species, *Poecilosomella affinis*（Diptera, Sphaeroceridae）from the Oriental and Australasian regions. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 121-127, 2002.

３）Kurahashi, H. and Afzal, M.: The blow flies recorded from Pakistan, with the description of one new species（Diptera: Calliphoridae）. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 213-230, 2002.

４）Wells, J. D., Golf, M. L., Tomberlin, J. K. and Kurahashi, H.: Molecular systematics of the endemic Hawaiian blowfly genus *Dyscritomyia* Grimshaw（Diptera: Calliphoridae）. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 231-238, 2002.

５）Moribayashi, A., Hiraoka, T., Kurahashi, H. and Agui, N.: Pupal diapause induction in larvae destined for non-diapause of the flesh fly, *Boettcherisca peregrina*（Diptera: Sarcophagidae）. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 279-288, 2002.

６）Moribayashi, A. and Agui, N.: Responses of ligated larvae of the flesh fly, *Boettcherisca peregrina*（Diptera: Sarcophagidae）, to injected ecdysteroids: a possible usage for a simple *in vivo* assay for ecdysteroid measurement. Appl. Entomol. Zool., 37: 497-501, 2002.

７）Prajakwong, S., Suwonkerd, W., Chawprom, S., Banchong-Aksorn, T., Tsuda Y. and Takagi, M.: A field evaluation study on the effects of residual spray of Bifenthrin and Deltamethrin on *Anopheles minimus* population in Mae Hong Son Province, northern Thailand. Jpn. J. Trop. Med. Hyg., 30: 289-293, 2002.

８）Tsuda, Y., Yotopranoto, S., Bendryman, S. S., Rosmanida, Dachlan, Y. P. and Takagi, M.: Seasonal changes in variation of dorsal scale pattern of *Aedes aegypti*（L.）（Diptera: Culicidae）in Surabaya, Indonesia. Med. Entomol. Zool., 54: 73-80, 2003.

９）Dieng, H., Boots, M., Tsuda, Y. and Takagi, M.: A laboratory oviposition study in *Aedes albopictus*（Diptera: Culicidae）with reference to habitat size, leaf litter and their interactions. Med. Entomol. Zool., 54: 43-50, 2003.

10）Sasaki, T., Kobayashi, M. and Agui, N.: Detection of *Bartonella quintana* from bodylice, *Pediculus humanus*（Anoplura: Pediculidae）infesting homeless people in Tokyo by molecular technique. J. Med. Entomol., 39: 427-429, 2002.

11）Kobayashi, M., Sasaki, T. and Agui, N.: Possible food contamination with the excreta of housefly with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Med. Entomol. Zool., 53: 83-87, 2002.

12）Nihei, N., Hashida, Y., Kobayashi, M. and Ishii, A.: Analysis of malaria endemic areas on the Indochina Peninsula using remote sensing. Jpn. J. Infect. Dis., 55: 160-165, 2002.

13）Kasai, S. and Tomita, T.: Male specific expression of a cytochrome P450（*Cyp312a1*）in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 300: 894-900, 2003.

14）Kasai, S., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Tomita, T.: Rapid evaluation of human lice susceptibility to phenothrin. Med. Entomol. Zool., 54: 31-36, 2003.

15）Ni, X-Y., Tomita, T., Kasai, S. and Kono, Y.: cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella*（L.）（Lepidoptera: Plutellidae）. Appl. Entomol. Zool., 38: 49-56, 2003.

16）Anazawa, Y., Tomita, T., Aiki, Y., Kozaki, T., and Kono, Y.: Sequence of a cDNA encoding acetyl-cholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Insect Biochem. Mol. Biol., 33: 509-514, 2003.

２．和文発表

原　　著

１）栗原　毅：日本列島のマラリア媒介蚊（南西諸島を除く）. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 1-28, 2002.

２）三原　實，倉橋　弘：自然環境中に建てられた大規模近代建築へのウヅキイエバエモドキの大量飛来と越冬. Med. Entomol. Zool., 53, Suppl. 2: 239-258, 2002.

３）森林敦子，倉橋　弘，杉江　元，片桐千仭，土田耕三：ケブカクロバエ *Aldrichina grahami*（Aldrich）

(Diptera: Calliphoridae)成虫の卵巣発育におけるエクジステロイドホルモン及び脂質の変動について．Med. Entomol. Zool., 54:65-71, 2003.
４）栗原　毅：ヒトスジシマカの生態と分布拡大．生活と環境，47(7): 16-20, 2002.
５）小林睦生：シラミに関する諸問題．生活と環境，47(7): 26-30, 2002.
６）津田良夫，小林睦生：ウエストナイルウイルス媒介蚊の生態．病原微生物検出情報，23(12):10-11, 2002.
７）小林睦生：感染症見直しに向けて．生活と環境，48(1): 70-75, 2003.
８）冨田隆史，葛西真治，小林睦生：シラミの駆除剤抵抗性と病原体媒介能の実態．生活と環境，48(2): 45-51, 2003.
９）林　利彦，葛西真治，森林敦子，冨田隆史，倉橋弘，小林睦生，渡辺　護：山形県大江町の露天風呂におけるコシジロ対策．アブ研究，26:1-9, 2002.
10）小林睦生：衛生害虫．昆虫学大事典（総編集　三橋淳，1200 pp.), pp.920-933, 2003.

Ⅱ．学 会 発 表

１．国際学会

１）Kobayashi, M.: Present status of pediculosis in Japan. 2nd International Congress of Phthiraptera, July 8-12, 2002, Brisbane.
２）Kasai, S., Yaguchi, N., Agui, N., Mihara, M. and Tomita, T.: Efficacy of pyrethroid insecticide to head lice in Japan（Ⅰ): Emergence of phenothrin-resistant colonies. 2nd International Congress of Phthiraptera, July 8-12, 2002, Brisbane.
３）Tomita, T., Yaguchi, N., Agui, N., Mihara, M. and Kasai, S.: Efficacy of pyrethroid insecticide to head lice in Japan（Ⅱ). Point mutations of sodium channel gene in pyrethroid-resistant lice. 2nd International Congress of Phthiraptera, July 8-12, 2002, Brisbane.
４）Kurahashi, H., Hayashi, T. and Wells, J. D.: Phylogeny of Chrysomyine blow flies. 5th International Congress of Dipterology, September 28-October 6, 2002, Brisbane.
５）Moribayashi, A., Hiraoka, T., Kurahashi, H. and Agui, N.: Pupal diapause induction in larvae destined for nondiapause of the flesh fly, *Boettcherisca peregrina*（Diptera: Sarcophagidae). 5th International Congress of Dipterology, September 28-October 6, 2002, Brisbane.
６）Tsuda, Y. and Takagi, M.: Variation in dorsal scale pattern of *Aedes aegypti*. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious Diseases, November 28-30, 2002, Hanoi.
７）Nam, V., Tsuda, Y., Yen, N. and Takagi, M.: Variation in dorsal pattern of *Aedes aegypti* in Vietnam. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious Diseases, November, 28-30, 2002.
８）Nam, V., Yen, N., Anh, N., Hasegawa, M., Tsuda, Y. and Takagi, M.: Japanese encephalitis vectors in north and central Vietnam, 2001-2002. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious Diseases, November 28-30, 2002, Hanoi.
９）Sawabe, K., Phong, Y., Nam, V., Tsuda, Y. and Takagi, M.: Glycogen and neutral lipid contents in selected bright & dark strains of *Aedes aegypti* from Hanoi, Vietnam. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious Diseases, November 28-30, 2002, Hanoi.
10）Tsuda, Y.: Recent studies on morphological variation of *Aedes aegypt*i in Southeast Asian countries. Seminar on Medical Entomology, Post Graduate Program, Airlangga University, January 23, 2003, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.
11）Tsuda, Y.: Entomological survey of vector mosquitoes on Sumbawa Island. The 5th regular meeting of the malaria control project in Lombok and Sumbawa Island, February 7-8, 2003, Mataram, Lombok, Indonesia.

２．国内学会

１）栗原　毅：蚊媒介病防除に関する基礎的な問題についての一連の研究．第 54 回日本衛生動物学会学会賞受賞講演，14 年４月１-３日，東京都.
２）倉橋　弘，林　利彦：オビキンバエ種群の系統と *Chrysomya greebergi* の発見．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
３）林　利彦，倉橋　弘，J. D. Wells：東洋区産オビキンバエ属ハエ類の分子系統．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
４）青木千春，高岡宏行，林　利彦：大分県におけるカッパメマトイの季節消長と *Thelazia* 幼虫自然感染．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
５）森林敦子，主藤千枝子，倉橋　弘：晩秋に長距離移動飛翔が見られるオオクロバエのエクジステロイドと脂質．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
６)秦　和壽, 栗原　毅：衛生害虫の伝統的な対応法(10) 国内のマラリア対策．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
７）小林睦生，二瓶直子，佐々木年則，栗原　毅：メッシュ気候図による東北地方のヒトスジシマカの分布解析．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
８)佐々木年則, 小林睦生, 二瓶直子, 飯塚信二, Jetsumon Sattbongkot，坪井敬文：VecTest によるハマダラカ唾液腺中のスポロゾイトの検出．第 54 回日本衛生動物学会，

14 年４月１-３日，東京都.
９）橋田良彦，二瓶直子，小林睦生，高阪宏行，石井明：インドシナ半島のマラリア分布指標としての植生指数 NDVI について．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
10）二瓶直子，吉田政弘，小林睦生，金田弘幸，嶋村竜太，高阪宏行，安居院宣昭：地理情報システムによる大阪府におけるセアカゴケグモの分布解析．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
11）佐々木年則，小林睦生，安居院宣昭，佐々木次雄：コロモジラミからの塹壕熱病原体，*Bartonella quintana* 遺伝子の検出(2)．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
12）冨田隆史，葛西真治，矢口　昇，三原　實，高橋正和，安居院宣昭：アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性（Ⅰ）日本における抵抗性コロニーの出現．第 54 回日本衛生動物学会，14 年４月１-３日，東京都.
13）葛西真治，冨田隆史，矢口　昇，三原　實，高橋正和，安居院宣昭： アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性（Ⅱ）抵抗性コロニーにおけるナトリウムチャネルの構造変異. 第 54 回日本衛生動物学会, 14 年４月１-３日，東京都.
14）小林睦生，佐々木年則，斎藤典子，倉橋　弘，安居院宣昭：人親和性の高いイエバエにおける腸管出血性大腸菌 O157:H7 の播種能について．第６回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム，14 年６月 24-25 日，感染研.
15）小林睦生，Sudipta　Roychoudhury，二瓶直子，佐々木年則：デング熱媒介蚊の防除に応用するための *Ascogregarina* 原虫に関する予備的研究．日米医学協力寄生虫疾患専門部会日米合同会議，14 年８月 20-22 日，長崎市.
16）佐々木年則，小林睦生：蚊由来シアル酸特異的レクチンのチオニン様領域．日本比較免疫学会第 14 回学術集会，14 年８月 26-28 日，名古屋市.
17）小林睦生：我が国の衛生害虫とその防除への課題．第５回昆虫病理研究会シンポジウム・平成 14 年度 BT 研究小集会合同大会，14 年９月 26-28 日，富士吉田市.
18）小林睦生，二瓶直子，栗原　毅：北海道北東部の能取湖畔で採集されたセスジヤブカの産卵について．第 54 回日本衛生動物学会東日本支部大会，14 年９月 28 日，相模原市.
19）二瓶直子，小林睦生，斉藤康秀：モバイルシステムによるハマダラカ類の採集地点の図化と地理情報収集の試み．第 54 回日本衛生動物学会東日本支部大会，14 年９月 28 日，相模原市.
20)秦　和壽, 栗原　毅：衛生害虫の伝統的な対応法(11)国内のマラリア対策．第 54 回日本衛生動物学会東日本支部大会，14 年９月 28 日，相模原市.
21）小林睦生：日本における節足動物媒介性感染症の問題点と今後の対応.「節足動物媒介性疾患と媒介動物の防圧戦略」研究集会，14 年 10 月４-５日，長崎市.
22）澤邉京子：同胞種の問題，どこまで判っているか.「節足動物媒介性疾患と媒介動物の防圧戦略」研究集会，14 年 10 月４-５日，長崎市.
23）二瓶直子：GIS は流行発生予測に使えるか.「節足動物媒介性疾患と媒介動物の防圧戦略」研究集会，14 年 10 月４-５日，長崎市.
24）津田良夫：環境適応からみたネッタイシマカとヒトスジシマカ.「節足動物媒介性疾患と媒介動物の防圧戦略」研究集会，14 年 10 月４-５日，長崎市.
25）冨田隆史：殺虫剤感受性レベルの監視と抵抗性遺伝子の分子診断.「節足動物媒介性疾患と媒介動物の防圧戦略」研究集会，14 年 10 月４-５日，長崎市.
26）上村　清，稲岡　徹，堀尾政博，中村正聡，倉橋弘，Mohammad　Afzal：パキスタンにおける蚊類発生源の調査（総括）．第 57 回日本衛生動物学会西日本支部大会，14 年 10 月 12-13 日，松山市.
27）小林睦生：都市におけるシラミ問題．全国環境衛生大会，14 年 10 月 24 日，東京都.
28）小林睦生：地球温暖化による昆虫生態系の変化と感染症．SRL 感染症フォーラム，2002 年ニュースの中の感染症②，14年12月14日，名古屋市.
29）津田良夫：無人島におけるヒトスジシマカの生態：吸血飛来蚊の垂直分布．第 52 回日本衛生動物学会南日本支部大会，14 年 10 月 26-27 日，長崎市.
30）小林睦生：東北地方におけるヒトスジシマカの分布拡大について：山形市を中心に．日米医学協力研究会寄生虫疾患専門部会国内研究会議，15 年１月 24-25 日，名古屋市.
31）安居院宣昭：衛生動物をめぐる最近の話題（１）．ねずみ衛生害虫駆除技術研修会，15 年２月４日，川崎市.
32）小林睦生：衛生動物をめぐる最近の話題（２）．ねずみ衛生害虫駆除技術研修会，15 年２月４日，川崎市.
33）小林睦生：米国におけるウエストナイル熱の現状と我が国での媒介蚊対策．大阪府立公衆衛生研究所セミナー，15 年２月７日，大阪市.
34）安居院宣昭：疾病媒介昆虫等の侵入・移動分散の監視・防除に関する研究の推進について．ねずみ・衛生害虫駆除研究協議会ペストコントロールフォーラム，15 年２月 20-21 日，新潟市.
35）冨田隆史：シラミ症の実態と流行対策．ねずみ・衛生害虫駆除研究協議会ペストコントロールフォーラム，15 年２月 20-21 日，新潟市.
36)小林睦生：我が国における蚊媒介性感染症のリスク．ねずみ・衛生害虫駆除研究協議会ペストコントロールフォーラム，15 年２月 20-21 日，新潟市.
37）小林睦生：西ナイルウイルス及び蚊媒介性感染症のリスク．埼玉県ペストコントロール協会感染症対策研修会，15 年３月４日，さいたま市.

38）葛西真治：cDNA アレイ法を用いたチトクロム P450 発現の解析：殺虫剤新規作用点の探索と抵抗性機構の解明にむけて．第 28 回日本農薬学会シンポジウム（植物保護とバイオテクノロジー），15 年３月 23 日，名古屋市．
39）葛西真治，冨田隆史：キイロショウジョウバエにおけるチトクロム P450 の性特異的発現．第 47 回日本応用動物昆虫学会，15 年３月 25-27 日，盛岡市．
40）李時雨, 葛西真治, 冨田隆史：Two acetylcholinesterase genes of the body louse, *Pediculus humanus*. 第 47 回日本応用動物昆虫学会，15 年３月 25-27 日，盛岡市．
41）冨田隆史，鍋島　武，古崎利紀，葛西真治，河野義明：コガタアカイエカの２つ目のアセチルコリンエステラーゼ遺伝子と有機りん剤抵抗性に関連する点突然変異．第 47 回日本応用動物昆虫学会，15 年３月 25-27 日，盛岡市．
42）堀尾政博，金澤　保，小林文夫，厳城　隆，奥祐三郎，神谷正男，二瓶直子，林　利彦：ハエ類が多包条虫感染に関与する可能性の検討．15 年３月 28 日，第 72 回日本寄生虫学会大会，久留米市．
43）二瓶直子：GIS in schistosomiasis control．日本住血吸虫発見 100 年記念国際シンポジウム，15年３月30日，久留米市．
44）冨田隆史：米国での西ナイルウイルス汚染実態について．第 55 回日本衛生動物学会大会殺虫剤研究班集会，15年３月 31 日，大分市．
45）林　利彦：山形県大江町の露天風呂におけるコシジロ対策．第 55 回日本衛生動物学会大会アブ研究班集会，15年３月 31 日，大分市．

調　　査

１）津田良夫：東南アジアにおける蚊媒介性感染症の流行を左右する環境の定量的評価（科学研究費補助金，長崎大学）．インドネシア，14 年９月８日-22 日，15 年１月 15 日-２月 10 日．
２）津田良夫，澤邉京子：東南アジアにおける蚊媒介性感染症の流行を左右する環境の定量的評価（科学研究費補助金，長崎大学）ベトナム，14 年 11 月 25 日-12 月２日．
３）津田良夫：都市化がもたらすデング熱媒介蚊の生態遺伝学的変化（科学研究費補助金），チェンマイ，15 年２月 17 日-３月４日．
４）倉橋　弘：北半球における高等ハエ類の多様性および系統関係に関する研究（科学研究費補助金，九州大学大学院比較社会文化研究院），スウェーデン，14 年７月 16 日-30 日．
５）倉橋　弘：疾病媒介昆虫の侵入・移動分散の監視・防御に関する研究．侵入昆虫の調査（厚生労働科学研究費補助金），タイ，15 年２月４日-17 日．

12. 獣 医 科 学 部

部長　　山田　章雄

概　　要

平成 14 年度 4 月 1 日付けで、獣医科学部は組織改変され、これまでの 2 室体制から 4 室体制へと強化された。これは厚生労働省の試験研究機関全体の再編に伴ったものであるばかりか、昨今の動物由来感染症研究に対する社会的要請の変化を受けてのことである。旧国立公衆衛生院が国立保健医療科学院に改組されるにあたって、今岡浩一、木村昌伸が転任により獣医科学部に赴任した。各室の名称は第 1 室から第 4 室までとされた。また新たに設置された第 2 室および第 3 室長は部長が事務取り扱いすることとなったが、10 月 1 日付で、井上智主任研究官が第 2 室長に昇任し、第 3 室長には筑波医学実験用霊長類センター主任研究官棚林清が昇任し着任した。

研究面では厚生労働科学研究費、日本学術振興会科学研究費等の補助を受け、例年通り行われた。特にブルセラ、炭疽、野兎病など国内での発生が稀ではあるがバイオテロに使用される可能性が指摘されている病原体の迅速診断法開発に関する研究などが行われた。狂犬病ウイルスの診断及びウイルス学的研究、モデル動物の開発に関する研究、実験小動物の繁殖・育成に関する研究等も例年通りに進められた。

研　究　業　績

I.　動物由来感染症に関する研究

1．　動物由来感染症の発生状況とサーベイランスの課題

動物由来感染症予防体制の強化のためには、各感染症の実態を把握する必要がある。そこで、国内および世界中における動物由来感染症の発生状況や、関連すると思われる動物の輸入状況についてデータベースを用いて検討し現状の把握を行った。その国々の感染症サーベイランスシステムの熟成度により、すべての国で必ずしも正確なデータが得られるとは限らず、特に家畜以外の動物における発生状況に関しては、そのサーベイランスがほとんど行われていないに等しいことが明らかとなった。現在の動物の輸入状況等を考慮すると、輸入動物・国内の野生動物などにおけるサーベイランス体制の強化や輸入規制等、適切な事前対応をとる必要があると考えられた。[神山恒夫、今岡浩一、木村昌伸]

2．　ブルセラ症の迅速診断法の開発および血清疫学について

感染症法で第 4 類に指定されているブルセラ症（Brucellosis）はブルセラ属菌（genus *Brucella*）による動物由来感染症で、未だに多くの感染者・感染動物の発生を見る世界的に重要な感染症のひとつである。国内での発生は近年まれであるが、輸入動物、食品から、または海外での感染が懸念される。今回、高感度・迅速診断法として、PCR 法、およびライトサイクラーを用いた Real-time PCR 法による *Brucella spp.* 遺伝子検出法の確立を試みた。ブルセラ属菌すべてを検出するプライマーとプローブを用いた方法を検討した結果、*B. abortus*、*B. canis* ともに 1 時間足らずで、反応チューブ中に約 10 個の菌があれば検出可能であることが示された。[今岡浩一、木村昌伸、神山恒夫]

3．　ペスト菌の検出と診断法の確立

ペストは、動物由来感染症の中でも齧歯類由来の非常に重要な感染症であり、海外からの輸入齧歯類についても十分な警戒をしなければならないが、一方、生物テロの材料としても考えられている非常に危険度の高い疾患である。他のエルシニア感染症との鑑別を含め、迅速に対応（診断、対策等）することが求められている。本研究では、*Y. pseudotuberculosis* 特異的遺伝子の inv および *Y. pestis* 特異的遺伝子の 3a をプライマーとしたライトサイクラーによる Real-time PCR 法を検討した。inv は *Y. pseudotuberculosis* および *Y.pestis* を検出し、3a は *Y. pestis* のみを検出することより、両者の鑑別診断が可能であると考えられた。また、本ライトサイクラーの系では、一時間程度で結果が得られ、また、検出感度も通常の PCR よりも約 1000 倍程度の感度であり、試料中に 1～10 コピーあれば検出可能であることが示されたことから、非常に有用な迅速診断法となると考えられた。

[今岡浩一、木村昌伸、神山恒夫]

４． 狂犬病に関する研究

(1) 狂犬病のサーベイランスに関する研究

自治体の協力を得て、犬が不法に上陸している港湾地区（稚内、小樽、根室（花咲）、伏木富山）と東京都で捕獲・引き取りされた犬の抗狂犬病防御抗体保有率を調査した。港湾地区のイヌの防御抗体保有率は平均 30.0%（北海道３港の平均は 19.3%）であり、東京都は平成４年から平成１３年にかけて 11%から 60%の防御抗体保有率であった。イヌの狂犬病ワクチン接種率は全国平均 79.7%と報告されており、今回の低い抗体保有率は未登録犬等のワクチン未摂取が原因と考えられた。本研究により、未登録犬、不法上陸犬、飼い主不定の犬対策が狂犬病侵入高リスク地区の重要な課題であることが明らかとなった。

[井上 智、 野口 章、山田章雄、根本卓弥（北海道食品衛生課）、高橋まり（北海道稚内保健所）、平塚千書(北海道根室保健所)、反町士朗(小樽市保健所)、松崎留美子（富山県厚生部）、竹重都子（東京都動物愛護センター）、佐藤 克（都獣医師会）、沼田一三（兵庫県生活衛生課)]

(2) 狂犬病診断に必要となる臨床画像と簡便な初期診断システム確立に関する研究

タイ赤十字研究所 （Queen Saovabha Memorial Institute、QSMI）と自治体関係機関の協力を得て、１）CD-ROM を利用した動画による狂犬病の臨床診断サポートシステム、２）狂犬病の初期診断を自治体で可能とする安価で簡便な検査手技マニュアル、３）狂犬病が疑われた動物から安全に検査脳材料を摘出する方法の確立を行なった。

[井上 智、野口 章、山田章雄、竹重都子（東京都動物愛護センター）、佐藤 克（都獣医師会）、沼田一三（兵庫県生活衛生課)]

(3) 鶏卵法を利用した安全で簡便な狂犬病ウイルス検出用抗体作製に関する研究

大腸菌を利用して組換え狂犬病ウイルス蛋白（N、P）を発現して免疫抗原を安全かつ簡便に作製した。また、鶏卵法により産卵鶏卵黄中に産生された IgY 抗体を簡便かつ大量に回収した。組換え N、P 蛋白に対する IgY 抗体は狂犬病ウイルスを IFA 法と WB 法により特異的に検出できた。[井上 智、、山田章雄、本井ゆり恵（岐阜連合大学院）、佐藤こずえ（岐阜連合大学院）、井上さやか（京都女子大学）、森本金次郎（感染研・ウ I）、八田 一森（京都女子大学)]

(4) Oita rhabdovirus 296/1972 の病原性とウイルス学的特徴に関する研究

1972 年に大分市内で野生コキクガシラコウモリ（Rinolophus cornutus）の血液から分離されたウイルス（Oita 296）についてマウスの感受性と中枢神経組織における病理を解析した。成熟ウイルス粒子の形状とマウス感染実験により、Oita 296 ウイルスはマウスの神経細胞に親和性のあるラブドウイルス科に属すると考えられた。また、狂犬病ウイルス株との間でウイルス抗原に対する抗体の交差反応性はなく、幼弱マウスのみがウイルスに感受性であることからリッサウイルスではないと考えられた。

[井上 智、神山恒夫、山田章雄、岩崎琢也（長崎熱帯研）、早坂大輔（長崎熱帯研）、佐藤由子（病理）、松尾恵子（病理）、小野哲朗（大分衛生環境センター）、佐多徹太郎（病理）、倉田 毅]

(5) 狂犬病ウイルスを用いた経シナプス的逆行性神経トレーシング

狂犬病ウイルスを神経トレーサーとして用いることにより、多シナプス性神経回路の構造基盤を解明することができる。抗狂犬病ウイルス抗体を用い、逆行性にラベルされた感染細胞の分布を免疫組織化学的に調べた結果、注入後７２時間で、視床を介してラベルされた二次細胞が淡蒼球内節や小脳核にみとめられ、その後、三次細胞（線条体細胞やプルキンエ細胞）、さらに四次細胞が順次ラベルされる様子が観察された。

[宮地重弘(都神経研)、南部篤(都神経研)、小池智(都神経研)、井上智、高田昌彦(都神経研)]

(6) 狂犬病の検査に関する業務

平成１４年４月に京都府で発見された神経症状を示して死亡したタヌキについて狂犬病検査を行ない陰性と結果が出た。平成１５年３月に千葉県でヒトに咬傷を起したイヌが抑留観察中に突然死亡したため狂犬病の検査を行ない陰性と結果がでた。

[井上 智、野口 章、山田章雄]

５． 炭疽菌に関する研究

(1) 炭疽菌の核酸増幅法による迅速検出法に関する研究

本研究では、既存の PCR 法に Pyrosequencing 法を組み合わせて PCR 増幅された炭疽菌（*B.anthracis*）特異的な遺伝子産物の塩基配列を短時間でシーケンスすることにより分離された *B.anthracis* の確定と型別を遺伝子レベルで迅速かつ正確に行う方法を開発した。検出は炭疽菌の *vrrA* 遺伝子について行なった。

B.anthracis 特異的なシーケンスプライマーを使用することによって *B.cereus* の不定な PCR 産物を鑑別しつつ、短時間に標的遺伝子が *B.anthracis* 由来であることを確定することが可能であった。
[井上　智、野口　章、山田章雄]

(2)　札幌市で見つかった炭疽菌を疑う「白い粉」の事例

2002 年３月末に札幌市の公共施設で見つかった炭疽菌を疑う「白い粉」を札幌市衛生研究所で検査した結果、グラム染色陽性の有芽胞大桿菌が認められ、さらに PCR 反応で炭疽菌と同一サイズの防御抗原遺伝子(PA)のみが検出された。本菌より DNA を精製し鋳型として、1)炭疽菌の染色体遺伝子 Ba813 を標的とした PCR-MPH 法（湧永製薬）、2)リアルタイム PCR 法（日本ロッシュ）を行った。その結果両検査法では何れの遺伝子も検出されず、当該菌は炭疽菌ではないと結論づけた。さらに増幅された DNA 断片の塩基配列を調べたところ *Bacillus subtilis* の ATP 依存デオキシリボヌクレアーゼと一致し、本菌の生化学的性状の総合的な結果より、*B. subtilis* と同定した。
[赤石尚一（札幌市衛研)、藤田　修、井上　智、巽　正志、神山恒夫、山田章雄、田村和満＊、渡邊治雄＊（＊細菌部)]

6.　野兎病の迅速診断法の開発に関する研究

ユーゴン血液寒天培地を用いた野兎病菌の分離培養による病原菌の検出法では少なくとも２日以上かかる為、近年様々な遺伝子検出法が検討されている。今回、高感度の迅速遺伝子検出法として Real-time PCR 法を用いて野兎病菌の共通遺伝子(*FopA*)の検出を行った。その結果、*FopA* 遺伝子 10 コピーが検出可能で、反応開始後１時間以内で結果が判定でき、さらに今回検査した日本国内分離５株および LVS 株、Russian Vaccine 株で遺伝子の検出ができたことより、野兎病の迅速診断法としては有用性が高いと判断された。
[藤田　修、巽　正志、棚林　清、山田章雄]

II.　モデル動物の開発に関する研究

１.　GM1-ガングリオシドーシスマウスに関する研究

(1)　GM1 ガングリオシドーシス幼児型モデルマウスの病態解析

幼児型ヒト変異 β-Gal（ガラクトシダーゼ）発現マウス（TG/KO、BK48）のマウスの大脳の β-Gal 活性は、野生型マウスに比較するとその 4.1%であり非常に低いが、β-GalKO マウス（1.9%）に比べると高く、振戦、重度の歩行異常を示し約 15 か月齢で死亡した。本モデルマウスは、ヒト変異酵素による残存酵素活性を示すことにより、発症が遅延するタイプの GM1 ガングリオシドーシスモデルであると考えられた。
［野口　章、山本美江、高野　薫、野口洋子、竹川奈穂、鈴木　治、大島章弘、松田潤一郎、鈴木義之（国際医療福祉大)］

(2)　低分子化合物によるモデルマウスの治療法開発

β-Gal の阻害剤として最近開発されたガラクトース類似低分子化合物が、GM1 ガングリオシドーシスの変異 β-Gal 活性を増大させることが細胞実験により示された。そこで、GM1-ガングリオシドーシス幼児型モデルマウス(BK48)に本薬剤の１mM 水溶液を飲水として１週間投与したところ、大脳を含む全ての臓器の β-Gal 活性が顕著に増大し、中枢をターゲットとした治療薬としての可能性が示された。
［山本美江、野口章、野口洋子、竹川奈穂、鈴木治、大島章弘、松田潤一郎、鈴木義之（国際医療福祉大)］

(3)　GM1 合成酵素高発現マウスの作製

GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスにおいて、ガングリオシド合成能を高めることで蓄積が早期に起こり、発症が早くなるような病態モデルの作成を目的とし、GM1/GA1 合成酵素遺伝子導入マウスを６ライン作出した。このうち調べた３ラインのうち２ラインで遺伝子発現を確認しており、今後 β-GalKO マウスとの交配を行い、早期発症型のモデルマウスを作出する予定である。
［竹川奈穂、野口　章、鈴木　治、山本美江、高野　薫、野口洋子、松田潤一郎］

２.　心筋症モデルマウスに関する研究

(1)　心筋症モデルマウスの組織解剖学解析

昨年度見出した，突然死を呈するシアル酸転移酵素導入マウスの病態を解析するため，解剖学的解析を行なった。ホモ型導入マウスは，半年齢ほどに達すると，急に胸郭の変形を伴う呼吸困難状態となり，羸痩（削痩）して死にいたる。この状態のマウスの解剖したところ，重度の心臓肥大が観察された。心臓肥大が肺を圧迫し呼吸困難を呈するものと思われた。心腔の拡大が顕著であることから拡張型心筋症が示唆された。病理組織学的には，心筋組織の線維化，骨格筋繊維の硝子変性や再生像が観察された。このマウスは心筋症や筋疾患のモデルとしての活用が期待された。
［野口洋子、野口章、山本美江、小浦美奈子、高野　薫、鈴木　治、松田潤一郎］

(2) 心筋症モデルマウスの導入遺伝子のマッピング

昨年度見出した，突然死を呈するシアル酸転移酵素導入マウスの病態を解析するため，昨年考案した二段階 Genome Walking による導入遺伝子のマッピングとヘミ・ヘテロ個体判定用プライマーを設計した。Genome Walking によると導入遺伝子は，第 11 番染色体の δ-サルコグリカン遺伝子の上流約 200kb の位置にあることがわかった。この位置には，既知の遺伝子の報告はなく，導入遺伝子挿入による既存遺伝子破壊の存在は確認できなかった。マッピング情報から近傍配列をもとに近傍プライマーを設定し，導入遺伝子についてホモ・ヘミ･野生の 3 種を確実に判定できるようになった。

［高野　薫、野口洋子、山本美江、小浦美奈子、竹川奈穂、鈴木　治、松田潤一郎］

(3) 心筋症モデルマウスの血清生化学的解析

心筋症モデルマウスにおける，血清生化学値について，正常個体との比較を行なった。正常個体 48 日齢（雄雌各 5 匹）とホモ個体 38 日齢（雄雌各 3 匹）について，血清生化学値 5 項目（LDH，GOT，GPT，ALP，CPK）を測定した。この日齢では，いわゆる臨床症状（胸郭の変形・呼吸困難・羸痩等）は示していないにもかかわらず, ホモ型個体は CPK や LDH が有意に高く（*t*-検定による），筋肉系組織の障害が示唆された。心筋症や筋疾患のモデルとしての有用性を更に高める結果といえる。

［山本美江、小浦美奈子、野口洋子、高野　薫、鈴木　治、松田潤一郎］

(4) 心筋症モデルマウスのプロテオーム解析

臨床症状を示す心筋症モデルマウスホモ個体（5 ヶ月齢）とその同齢の正常個体の心臓のホモジェネートを二次元電気泳動した。クマシー染色像を解析ソフト（PDQuest）によりスポット比較したところ，ホモ個体では，正常個体に比べスポット数が減少していた。さらにウェスタンブロット後にレクチン（小麦胚芽レクチン）染色したところ，レクチン染色されるスポット数が正常個体よりも少なかった。このことは，シアル酸転移酵素を導入されている心筋症モデルマウスでは，蛋白質代謝，特にシアル酸含有蛋白質の代謝に乱れが生じており，それが何らかの機序で心臓機能に障害を与えることを示唆している。

［小浦美奈子、山本美江、野口洋子、高野　薫、鈴木　治、松田潤一郎］

3． ゲノムインプリンティングと疾患との関連に関する研究

(1) 体細胞核移植クローンマウスの正常性の検討

動物には 2001 年 9 月から 2002 年 1 月までに生まれた JF1x129 の F1 動物の未成熟セルトリ細胞、尾の線維芽細胞、卵丘細胞由来クローンマウスを用いた。月齢を合わせた対照動物と共に解剖し病理学的な解析とともに血清生化学値を測定した。元の動物の系統、由来細胞の種類により血清中の特異的な傾向は見られなかった。引き続き、病理学的解析を行い、血清生化学値と比較検討する予定である。

[山本美江、高野薫、野口洋子、井上貴美子*、越後貫成美*、小倉淳郎*(*理研)]

(2) 母性発現インプリント遺伝子 Meg1/Grb10 過剰発現マウスの解析

母性発現遺伝子 Meg1/Grb10 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、２型糖尿病や成長異常（低体重）が観察されている。今回、糖尿病を発症する Tg マウス２ラインと、非発症型の Tg マウス２ラインについて、発症機序解明の一環として血清生化学的検査を行ったところ、発症型 Tg ラインで中性脂肪の上昇が認められた。現在、生化学的、分子生物学的解析を進め、糖代謝異常モデルとしての有用性を検討している。（東京工業大学石野研究室との共同研究）

［山本美江、秦朋子、竹川奈穂、野口洋子、鈴木　治、松田潤一郎］

(3) インプリント遺伝子解析のための *Mus spretus* 雑種胎仔の作製

インプリント遺伝子は Silver-Russell 症候群や Prader-Willi 症候群などの遺伝病、さらに発癌など、多くの疾患と関連することが知られている。そこで、インプリント遺伝子の証明のために、野生マウスである *Mus spretus* とラボラトリーマウスである *Mus musculus* との遺伝子多型を利用するため、両者の F1 及び F2 雑種♀と C57BL/6♂の体外受精により F2 および F3 雑種 9.5 日胎仔を作製した。（東京工業大学石野研究室、理研小倉研究室との共同研究）

［秦朋子、山本美江、竹川奈穂、野口洋子、鈴木　治、松田潤一郎］

4． プリオン病モデルマウスの開発

牛海綿状脳症（BSE）の発症機構、診断系のためのバイオアッセイ系確立などを目的として、ウシプリオン単独発現マウスの作製を開始した。トランスジーンとしてウシ（ホルスタイン）プリオン遺伝子（ORF、264 アミノ酸をコード）と強発現用プロモーター（CAG プロモーター）の融合遺伝子を用い、４ラインのトランスジェニックマウスを作製し、遺伝子発現、ウシプリオン蛋白の発現を確認した。現在、プリオンノックアウトマウスとの交配により、ウシプリオン単独発現マウスを樹立中で

ある。(感染病理部、細胞化学部との共同研究)
［竹川奈穂、高野　薫、野口洋子、山本美江、小浦美奈子、鈴木　治、松田潤一郎］

５．　ICR コロニーから発見された白血病について

近年 ICR コロニー(クローズド)から、異形白血球が増加して各リンパ節が腫脹し死の転帰をとるマウスが数例発見され、白血病が疑われた。そこで近縁の 4 ペアを兄妹交配によって継代し、白血病高発ラインを選抜することを試みた。末梢血の観察では、発症の 1 ヶ月くらい前から僅かな変化が認められ、発症個体は、各リンパ節及び脾臓の腫脹(大きいものは長径が 30mm に及ぶ)を示し、異型白血球が充満していた。胸腺の腫脹が著しいものは心・肺の圧迫による呼吸困難が見られ、そうでないものと比べて死亡時期が早まる傾向があった。今後は繁殖可能で発症率が高いものを選抜し、系統化する予定である。
[小浦美奈子、高野　薫、野口洋子、松田潤一郎]

６．　ICR コロニーに見られた黄色ブドウ球菌の感染について

2002 年春から夏にかけて、ICR コロニーの中に目や耳の周りがただれたり、下腹部や後肢周辺の皮膚が、膿とともに浮き上がって脱落する動物が観察された。ひどい場合は眼球を欠損する事もあった。微生物学的検査を行ったところ、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の感染があった。黄色ブドウ球菌は日和見感染症として知られ、免疫不全などの特殊な動物以外は影響を受ける事はまれで、SPF 動物施設においてもチェック項目には含まれていない。今回は白血病が出ているコロニーでもあり、抗生物質のテトラサイクリンを飲水に添加したり、発症個所に塗布して治療を試みた。発症初期で菌数の少ないものには効果があり、ただれがひどいものは若干軽快するケースも見られたが、完全に治療する事はできなかった。ブドウ球菌によるコロニーへのダメージも、発症したものをその都度取り除く事で、軽減する事ができた。白血病を発症する事とブドウ球菌に罹る事との関連も示唆されたので、今後も経過を観察したい。
［小浦美奈子、高野　薫、中山一栄（動物管理室)]

III.　実験小動物の繁殖･育成に関する研究

１．　初期胚・精子の凍結保存

(1)　マウス胚凍結保存
系統維持の一環として、過排卵処置-自然交配、あるいは体外受精により得たマウス 2 細胞期胚をガラス化法により凍結保存している。本年度は、とくにトランスジェニックマウスについては体外受精を積極的に行い、新規の 14 系統を含む 21 系統（計 45 ライン）について、9,891 個の胚を凍結保存した。胚凍結を開始した 1989 年から 2003 年 3 月末までの総計は、合計 97 系統、胚数 60,252 個に達した。
[高野　薫、小浦美奈子、野口洋子、鈴木　治、山本美江、松原純子、松田潤一郎]

(2)　マウス精子凍結保存
主に遺伝子改変動物の特性を保持するために、精巣上体精子の凍結保存を 1997 年より行っており、今年度は、トランスジェニック、ノックアウトマウスを中心に新規の 12 系統を含む 21 系統（ストロー568 本）の精子凍結を行った。今年度末までの保存精子の総計は、47 系統、雄 299 匹分である。
［小浦美奈子、高野　薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎]

(3)　マストミス精子の凍結保存法の検討
マストミスの系統保存を目的に精子の凍結保存法の検討を行った。凍結保存液は、18%ラフィノース＋25%卵黄＋0.7%OEP 水溶液が高い生存精子率と運動性を示した。凍結-融解条件は、予備凍結時間を 5 分、融解温度を 37℃、融解時間を 10 秒とし、融解後の培養メディウムに AI メディウムを用いる事で最も良い成績（MCC 系統の精子において 25%の生存率）を示した。また、レクチン染色を行なった凍結-融解精子を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、その先体の状態を明らかにすることができた。現在、凍結精子による人工授精などを行っている。
[平田淳也、小浦美奈子、高野　薫、松原純子、松田潤一郎]

(4)　スナネズミ精子の凍結保存法の検討
スナネズミに関してはこれまでに人工授精、胚移植、胚凍結保存などの生殖関連技術の開発を行っているが、今回は精子の凍結保存法の検討を行った。6～8 か月令成熟雄の精巣上体尾部より採取した精子を、凍結保存液中に浮遊させた後、精子用ストローに封入し、液体窒素に投入し保存した。各種の凍結保存液を試みたが、18%ラフィノースと 0.7% OEP を含む 25%及び 20%卵黄液が比較的良好な成績を示した。しかし凍結精子を用いての体外受精や人工授精はまだ実現しておらず、引き続き検討して行く予定である。
[小浦美奈子、平田淳也、高野　薫、松原純子、松田潤一郎]

２． マウス卵巣内卵子の発生能獲得関与遺伝子の検索

マウス卵巣内卵子は卵胞発育に従い胚発生能を獲得する。本研究ではディファレンシャル・ディスプレイ法(DD 法)による差次的発現遺伝子の検索を試みた。17 日齢及び 24 日齢の B6D2F1 マウスから得た体外成熟卵子の cDNA ライブラリを作成し，両ライブラリについて DD-PCR を行った。差次的増幅産物について核酸配列を決定後 NCBI Blast 検索により既知配列との比較を行った。回収した差次的増幅産物の 68 個のうち 11 個が既知であり, GDF-9 や β-catenin, Hepatoma-Derived Growth Factor に発生能の関連が示唆された。
［鈴木　治、小浦美奈子、野口洋子、高野　薫、山本美江、松田潤一郎］

Ⅳ. WHO 特定小動物協力センター

１． 今年度も、WHO 特定小動物協力センター(WHO Collaborating Center for Defined Laboratory Animals)として特定実験動物を維持・分与を行った。維持動物の一覧および分与状況は添付資料の表の通りである。
[高野　薫、小浦美奈子、山本美江、鈴木　治、野口洋子、野口章、竹川奈穂、松原純子、松田潤一郎]

２． 他施設に由来する動物の SPF 化
微生物学的に汚染されている他施設由来の動物を、感染研 SPF 区への動物導入のために胚移植技術を応用しクリーニングした。今年度は、自然交配あるいは体外受精して得た２細胞期胚、および凍結-融解胚を清浄な偽妊娠雌に移植することで、Ngfr、tk、tht、Meg1Tg、Prion KO などマウス９系統を SPF 区へ導入することができた。
[小浦美奈子、山本美江、高野　薫、鈴木 治、野口洋子、野口　章、竹川奈穂、松原純子、松田潤一郎]

Ⅴ. その他の研究

1. HIV に関する研究

(1) 感染性クローン樹立
感染性クローン樹立はウイルスの病原性解析をはじめとする様々な解析の分子基盤であるが、全世界で subtype C に次いで感染者が多い subtype A に関してはその報告はいまだない。1992 年 Uganda で分離され、gag と env 領域から subtype A と判定された HIV-1　2 株から MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた HIV Trapping System で感染性 DNA クローンを４クローン得た。全塩基配列を決定し近隣結合法により系統樹を作成したところ全て Subtype A1 に帰属した。全てのクローンは PBMC で増殖し、CCR5 Tropism を示した。全世界の感染者数が subtype C に次いで多いとされ、様々な組換え流行株の母体となっている HIV-1 subtype A の感染性分子クローンの分離に世界に先駆けて成功した。[異　正志、草川　茂、武部　豊（エイズ研究センター)、松田道行（大阪大学微生物病研究所）]

(2) HIV-1 subtype A に特化したクローニング戦略
先に報告した HIV-1 Trapping System で PBS 領域から 3'LTR PolyA Signal まで９Kbp の Amplicon を増幅する戦略では感染性クローンの樹立は困難であった。そこで幾つかの非感染性全長クローンの塩基配列解析から Vpr 領域に保存される Nco I site を用いて Half & Half Strategy で Uganda で分離された HIV-1 subtype A の４感染性クローンの樹立に成功した。これらの感染性クローンの全塩基配列を決定し遺伝子構造を解析したところ以下の事項が判明した。[異　正志、松田道行（大阪大学微生物病研究所）]

(3) 系統樹解析と Bootscanning Analysis
４クローンの全塩基配列を決定し(92UG031-A1; 9616 bp, 92UG031-A2;9616 bp, 92UG029-A3; 9629 bp, 92UG029-A4; 9635 bp)、９つのウイルス蛋白をコードするオープンリーディングフレームが存在することを確認した。他の代表的な Subtype の reference sequence との Alignment をもとに Kimura-2-parameter 法により genetic distance matrix をつくり、近隣結合法にて系統樹を作成したところ、４クローンは subtype A と 100%の boostrap 値でクラスターを形成した。４クローンの Break Point の位置を比較するために Bootscanning 解析を行った。500bp ごとのブーツトラップ系統樹から得られたブーツストラップ値を 100bp 毎ずらして計算していきグラフにプロットした。グラフが上の方にあるほど、そのサブタイプとの間で形成されるクラスターの信頼性が高いことを示している。 この解析により４クローンとも全長にわたり subtype A に帰属し、Pure な subtype A クローンであることが判明した。[異　正志、草川　茂、武部　豊（エイズ研究センター)、松田道行（大阪大学微生物病研究所）]

(4) 感染実験と Coreceptor Usage
４クローンを 293T 細胞 に FuGene 6 を用いて transfect 2 日後の培養上澄には、感染性クローン pBa-L,および我々が樹立した世界最初の subtype C の感染性クローン pIndie-C1 と同等な RT 活性を検出し

た。この培養上澄をウイルスストックして感染実験に用いたところ、PBMC 培養で増殖を認めた。一方、Coreceptor Usage を確かめるため、NP-2/CD4/CCR5 と NP-2/CD4 /CXCR4 細胞株を用いて検討した。その結果、４クローンは全て CCR5 を Coreceptor として用いる R5 HIV-1 クローンであることが確認された。[異　正志、草川　茂、武部　豊（エイズ研究センター）]

２．　多包虫組織より分離した 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの生化学的性状および機能

多包虫組織からペルオキシレドキシン(Prx)DNA を得た。この得られた Prx 遺伝子のコードするタンパク質の推定分子量は約 21kDa で、アミノ酸配列の 48 および 169 番目にはシステイン残基が認められた。大腸菌で組換えタンパク質(EmPrx)を作成・精製し、その生化学的機能を検討した。Thiol mixed-function oxidation (MFO) assay によりプラスミド DNA に対するハイドロキシラジカルによる損傷を阻止する酵素活性が認められた。次に、EmPrx の過酸化水素に対する還元活性を調べた結果、EmPrx はチオレドキシンを電子供与体としてチオレドキシンペルオキシダーゼ活性が確認された。［藤田　修、河津信一郎（国立国際医療センター）、野崎智義（寄生動物部）］

３．　カニクイザルにおける日本脳炎DNAワクチンの有効性に関する研究

日本脳炎ウイルス(JEV)に対するDNAワクチンの開発に向け、候補プラスミドDNAを接種したサル血清中の抗JEV抗体測定を詳細に行うとともに、病原ウイルス攻撃後の材料について組織学的病変の検索を試みた。個体差が認められるもののDNAワクチン接種により中和抗体が誘導され、免疫期間中特記すべき臨床症状は認められなかった。攻撃実験ではワクチン接種による明確な感染防御効果を判定するには至らなかったが既往性抗体反応が認められるとともに生残動物においては明瞭な脳組織病変はなかった。
〔棚林　清、向井鐐三郎（筑波霊長類センター）、高崎智彦、倉根一郎(ウイルス１部)、山岡正興（兵庫県健康環境研）、小西英二(神戸大)〕

発 表 業 績 一 覧

I.　誌 上 発 表

１．　欧文発表

原　著

1)　Malcotti,V., Yasoshima,A., Imaoka, K., Nakayama, H. and Doi,K. Dorsal skin responses to subchronic ultraviolet B (UVB)-irradation in Wistar-derived hypotrichotic WBN/ILA-Ht rats. Histol.Histopathol, 17:683-690,2002.

2)　Fujita, O., Inoue, S., Tatsumi, M., Kamiyama T., Akaishi, S., Ootani, T., Kawai, T., Hirochi, T., Sakamoto, Y., Tamura, K., Watanabe, H., Yamada, A. Amplification of irrelevant sequence from *Bacillus subtilis* using a primer set designed for detection of the pag gene of Bacillus anthracis. Jpn. J. Infect. Dis., 55, 99-100, 2002.

3)　Tanabayashi, K., Mukai R., Yamada A., Takasaki T., Kurane I., Yamaoka M., Terazawa A., Konishi E. Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. Vaccine 21: 2338–2345, 2003.

4)　Takeuchi K., Takeda M., Miyajima N., Kobune F., Tanabayashi K., Tashiro M. Recombinant wild-type and Edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins: Role of H protein in cell fusion and host cell specificity. J.Virol., 76: 4891-4900., 2002.

5)　Uda A., Tanabayashi K., Mukai R., Terao K., Yamada A. Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis), J. Med. Primatol. 32: 105-110, 2003.

6)　Takeuchi H., Suzuki, Y., Tatsumi M., Hoshino H., Daar E. S., Koyanagi Y. Isolation and characterization of an infectious HIV type 1:Molecular clone from a patient with primary infection。AIDS Res Hu. Retroviruses 18: 1127-1133, 2002.

7)　Kusagawa S., Sato H., Tomita Y., Tatsumi M., Kato K., Motomura K., Yang R. and Takebe Y. Isolation and characterization of replication

-competent molecular DNA clones of HIV type 1 CRF01_AE with different coreceptor usages.. AIDS Res. Hum Retroviruses 18: 115 – 122, 2002.

8) Sugiura, W., Matsuda Z., Yokomaku Y., Hertogs K., Larder B., Oishi, T. Okano A., Shiino T., Tatsumi M., Matsuda M., Abumi H., Takata N, Shirahata S, Yamada K., Yoshikura Y, and Nagai N. Interference between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. Antimicrob. Agents Chemother.. 46: 708-715., 2002.

9) Hachiya A., S. Aizawa, K. Tsuchiya , H.Gatanaga, S. Kimura, M. Tatsumi, S. Oka. "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drig resistance assay for three-drug combination therapies that takes into considerarion in vivo drug concentrations. J.Virol.Meth. 111; 43 – 53, 2003.

10) Suzuki Y, Takeuchi H, Tatsumi M, Daar E.S., Miura Y, Ebina H, Misawa N, Yamamoto N and Koyanagi Y. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 from acute infection and identification of major target cell as monocyte without exogeneous stimulation in vitro. J.Virol. in press.

11) Suzuki O, Mochida K, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takano K, Matsuda J, Ogura A. Comparison of glycoprotein hormone alpha-subunits of laboratory animals. Mol Reprod Dev. 2002;62:335-42.

12) Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, Matsuda J. Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. Mol Reprod Dev. 2003;64:219-25.

13) Ogonuki N, Mochida K, Inoue K, Matsuda J, Yamamoto Y, Takano K, Ogura A. Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following Intracytoplasmic Injection with Spermatids in Mastomys (Praomys coucha). Biol. Reprod., 68: 1821-7, 2003.

２． 和文発表

1) 嶋崎洋子、井上 智、蒲生恒一郎、千田 恵、衛藤真理子、伊藤 治、牧江弘孝：狂犬病中和抗体測定用参照犬血清の作製及び評価。動薬検年報。39:29-32、2002.

2) 赤石尚一、藤田 修、井上 智、巽 正志、神山恒夫、山田章雄、田村和満、渡邊治雄：炭疽菌 PCR において防御抗原遺伝子と思われるバンドが検出された事例。病原体微生物情報、23、175-177、2002.

3) 山田章雄 ： 動物由来感染症のサーベイランス。感染と抗菌薬 Vol.5 No.4, 348-352、Dec.2002.

単行書籍
鈴木治：「胚発生の基礎」、動物発生工学、岩倉洋一郎、佐藤英明、舘 鄰、東條英昭編、東京、学窓社、2002年。

II. 学会発表

１． 国際学会

1) Inoue,S., Yurie,M., Makoto,A., Makino,T., and Akio,Y. The absence of anti-rabies antibody in sera of captured wild raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. The US-Japan Virology Panel Meeting. 18 June, 2002. Matsumoto, Nagano, Japan.

2) Miyachi,S., Nambu,A., Koike,S., Inoue,S., and Takada,M. Multi-synaptic input pathways of monkey primary motor cortex visualized by retrograde transneuronal transport of rabies virus. The 32th Annual Meeting, Society for Neuroscience Meeting. 4 November, 2002. Orlando, FL, USA.

3) Mochida K, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Takano K, Matsuda J, Ogura A: Efficient In vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Using Frozen-thawed Spermatozoa in the Mouse. The 39th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 27-Aug. 1, Colorado.

4) Suzuki Y, Nanba E, Ohno K, Matsuda J, Jinbo M: A New Molecular Therapy for Lysosomal Storage Diseases. 31st Annual Meeting of Child Neurology Society, October 9-12, 2002; Washington, DC.

２． 国内学会

1) 黒澤明日香、今岡浩一、鈴木和彦、AlbarenqueStella Maris、永田貴之、上塚浩司、中山裕

之、土井邦雄：Brown Norway ラットにおける塩化ピクリル（PCL）誘発接触皮膚炎。第 134 回日本獣医学会、2002 年 9 月、岐阜。

2)　宮地重弘、南部篤、小池智、井上　智、高田昌彦：狂犬病ウイルスを用いた経シナプス的逆行性神経トレシング−サル一次運動野への入力経路。第 25 回日本神経科学大会、2002 年 7 月、東京。

3)　高木弘隆、村上裕之、井上　智、丸山務、杉山和良：PCR 産物をプローブとしたバクテリアゲノム dot blot hybridization による *L.monocytogenes* の特異的検出の検討。第 23 回日本食品微生物学会学術総会、2002 年 9 月、東京。

4)　岩崎啄也、井上　智、早坂大輔、佐藤由子、松尾恵子、小野哲朗、佐多徹太郎、神山恒夫、山田章雄、倉田　毅：Oita rhabdovirus 296/1972 の病原性とウイルス学的特徴。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2002 年 10 月、北海道。

5)　井上　智：日本では起きていない人獣共通感染症 - 世界における狂犬病の現状について。平成１４年度（第２２回）市民大学。麻布大学。2002 年 8 月 8 日、神奈川。

6)　井上　智：我が国を取り巻く狂犬病の状況（危機管理の観点から考える狂犬病への対応の重要性）。日本小動物獣医師会２００２年年次学会。2002 年 10 月 6 日、仙台。

7)　井上　智、佐藤　克：タイ国で観察された麻痺型狂犬病の一例に関する臨床所見等（CD-ROM の解説）。平成１４年度狂犬病予防等技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2002 年 11 月 8 日、東京（三田共用会議所講堂）。

8)　宮地重弘、南部篤、小池智、井上　智、高田昌彦：狂犬病ウイルスを用いた逆行性神経シナプス性ラベルによる大脳基底核、小脳、および前頭前野から一次運動野への入力路の同定。研究領域「脳を知る」合同シンポジウム／脳神経科学の最先端 2002、2002 年 11 月 25 日、京都。

9)　井上　智：ズーノーシスのリスクアナリシスモデル、−韓国の狂犬病−。「ズーノーシスのリスクアナリシスを考える」。第２回「人と動物の共通感染症研究会」シンポジウム、2002 年 11 月 9 日、東京。

10)　井上　智：野生動物からの感染症。教育講演：人獣共通感染症−最近の話題。教育講演：人獣共通感染症−最近の話題。第６５回獣医麻酔外科学会／第３１回日本比較臨床医学会合同学術集会、2003 年 1 月 11 日、山口。

11)　井上　智：狂犬病について（世界の発生状況と日本で必要な予防と発生時の対応について）。東京都動物愛護相談センター所内技術講習会。2003 年 2 月 14 日、東京。

12)　井上　智：５．狂犬病の危機管理対応　−　地方自治体における対応および検査の実際。平成１４年、希少感染症診断技術研修会。厚生労働省健康局・結核感染症課、国立感染症研究所。2003 年 2 月 18 日、東京。

13)　井上　智：狂犬病について（世界の発生状況と日本で必要な予防と発生時の対応について）。人獣共通感染症に関する講習会。長野県獣医師会長野支部主催。2003 年 2 月 21 日、長野。

14)　井上　智：動物由来感染症としての狂犬病（世界での発生状況と日本で必要な予防について）。平成１４年度公衆衛生講習会。宮崎県獣医師会主催。2003 年 3 月１日、宮崎。

15)　井上　智、中嶋健介：リスクアナリシスにおける獣医学の役割。２．狂犬病予防におけるリスク管理／海外からの侵入に備えた危機管理マニュアル策定等の経緯。第１３５回、日本獣医学会、公衆衛生分科会シンポジウム。2003 年 3 月 31 日、東京。

16)　藤田　修、河津信一郎、野崎智義：多包虫組織より分離した 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの生化学的性状および機能について、第 72 回日本寄生虫学会、2003 年 3 月、久留米。

17)　棚林　清、宇田晶彦、向井鐐三郎、山田章雄：免疫組織染色によるＢウイルス特異的抗原検出法の検討。第 134 回日本獣医学会、2002 年 9 月、岐阜。

18)　巽　正志、草川　茂、武部　豊、松田道行: HIV-1 subtype A 感染性クローンの樹立について。第 16 回日本エイズ学会　2002 年 11 月、名古屋。

19)　森　治代，小島洋子，川畑拓也，大竹　徹，巽正志：HIV 感染者におけるウイルス phenotype の量的変動。第 50 回日本ウイルス学会　2002 年 10 月、札幌。

20)　鈴木　治、持田慶司、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎、小倉淳郎：第一波卵胞発育における

B6D2F1 マウス卵子の発生能獲得、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

21) 舛甚賢太郎、山本美江、高野薫、小倉淳郎、松田潤一郎、国枝哲夫：被毛異常突然変異遺伝子（*ypc*）の染色体マッピング、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

22) 山本美江、野口章、長瀬裕美、鈴木治、持田慶司、中平美穂、高野薫、野口洋子、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎：GM1 ガングリオシドーシス幼児型、成人型モデルとしてのヒト型 KO/Tg マウスの作製、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

23) 越後貫成美、中平美穂、持田慶司、井上貴美子、野口章、三木洋美、松田潤一郎、古谷恵子、杉山文博、八神健一、小倉淳郎：マウス凍結精子を用いた卵細胞質内精子注入法（ICSI）による産仔の獲得、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

24) 持田慶司、松田潤一郎、高野薫、鈴木治、山本美江、野口洋子、小浦美奈子、中山一栄、越後貫成美、井上貴美子、小倉淳郎：近交系マウス初期胚の最適な凍結保存法の検討（緩慢法とガラス化法の比較）、第 49 回日本実験動物学会総会、2002 年 5 月、名古屋。

25) 徐聖旭、神山恒夫、佐多徹太郎、松田潤一郎、山田章雄、桑原正貴、局博一、遠藤英紀、糸原重美、佐伯圭一、松本芳嗣、小野寺節：白オリックス PrP 遺伝子を有する Tg マウスにおけるプリオン高感受性及び過発現による心異常. 第 6 回日本神経ウイルス学会、2002 年 7 月、三島市。

26) 三木洋美、越後貫成美、井上貴美子、山本美江、野口洋子、高野薫、持田慶司、長嶋比呂志、小倉淳郎：未成熟雄マウス由来 First Wave 精細胞を用いた顕微授精、第 95 回日本繁殖生物学会、2002 年 9 月。

27) 越後貫成美、持田慶司、井上貴美子、高野薫、小倉淳郎：マストミス伸長精子細胞を用いた顕微授精による産仔の作出、第 95 回日本繁殖生物学会、2002 年 9 月。

28) 野口章、鈴木治、小浦美奈子、高野薫、野口洋子、山本美江、松田潤一郎：シアル酸転移酵素遺伝子導入マウスの 1 ラインに見られたホモ個体特異的な削痩を伴う早期死について、第 19 回日本疾患モデル学会総会、2002 年 11 月、伊香保。

29) 小川由美、高村歩美、冨永里香、難波栄二、高浦奈津子、田中あけみ、大野耕策、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：GM1-ガングリオシドーシスに対する新しい治療法の開発：新しい化合物を用いたケミカルシャペロン法、第 45 回日本先天代謝異常学会、2002 年 11 月、神戸。

30) 大島章弘、松田潤一郎、鈴木治、山本美江、野口章、難波栄二、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：GM1 ガングリオシドーシス：疾患モデルマウスへの低分子化合物投与よる治療効果の検討、第 45 回日本先天代謝異常学会、2002 年 11 月、神戸。

31) 高野 薫、小浦美奈子、持田慶司、小倉淳郎、松原純子、山本美江、野口 章、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎：スナネズミの繁殖成績と特性、日本実験動物技術者協会関東支部懇話会 2003 年 2 月 東京。

32) 小浦美奈子、高野 薫、持田慶司、小倉淳郎、松原純子、山本美江、野口 章、野口洋子、鈴木 治、松田潤一郎：マストミスの繁殖成績と特性、日本実験動物技術者協会関東支部懇話会 2003 年 2 月 東京。

33) 岡戸晴生、川野仁、松田潤一郎、寺島俊雄、葛西正孝：サブプレートニューロンと視床皮質投射の発生に関与する 転写抑制蛋白 RP58. 第 80 回日本生理学会大会 2003 年 3 月、福岡市。

34) 山田-山口美鈴、山田-内尾こずえ、後藤康文、森俊治、坂田千夏、長尾雅哉、小倉淳郎、山本美江、宮本元、眞鍋昇：遺伝性腎疾患（ICGN）マウスにおける腎性貧血発症機序の解明、第 135 回日本獣医学会学術集会、2003 年 3 月、東京。

35) 後藤康文、山田-内尾こずえ、山田-山口美鈴、小倉淳郎、山本美江、宮本元、眞鍋昇：腎尿細管間質線維芽細胞培養系を用いた遺伝性腎疾患（ICGN）マウス腎線維症発症の分子メカニズムの解析、第 135 回日本獣医学会学術集会、2003 年 3 月、東京。

３．セミナー・講演など

松田潤一郎：疾患モデル動物研究資源の基盤整備に向けて－各種実験動物の生殖関連技術の重要性－、CARD(熊本大学動物資源開発センター)国際シンポジウム、2002 年 11 月 26 日、熊本。

国立感染症研究所 獣医科学部 第四室（実験動物開発室）維持動物一覧（マウス）

系 統 名	生体維持	胚凍結維持	精子凍結維持	備　　考
129/SvJ	○	○		
129/Sv-*ter*		○		精巣性テラトーマ
B10.A(4R)		○		コンジェニック
B10.A(5R)		○		コンジェニック
B10.SM		○		コンジェニック
B10.Th1		○		コンジェニック
BALB.B		○		
BALB.K		○		
BALB/c		○		
BALB/c *nude*		○		ヌードマウス
BC-H2-BM1		○		
BDF1		○	○	F1
BXSB/MPJ		○		自己免疫疾患
C3H.JK/Sn		○		
C3H.NB/Sn		○		
C3H/HeJ	○	○		
C57BL/6J	○	○	○	
C57BL/6J *bg*	○	○		低 NK 活性
C57L	○	○		
C58	○	○		
CAC			○	白内障
CB17 scid		○		免疫不全
CBA/J	○	○		
CBA/N		○		(免疫不全)
CF#1		○		Outbred
CFW		○		
DBA/1N		○		
DBA/2	○	○	○	
DDY	○	○		
EL	○	○		てんかん
gpc		○		Outbred
GR	○	○		乳癌
HR	○	○		皮膚角化異常
HSFS/N		○		ヒスタミン増感試験用
HTG		○		
ICGN(ヘテロ)	○	○		原発性ネフローゼ
ICGN(ホモ)	○	○		原発性ネフローゼ
koala		○	○	mutant
Tht	○			mutant
tk	○	○		mutant
MPS	○	○		易呼吸器感染性
NFS/N		○		ヒスタミン増感試験用
PC	○	○		貧毛、リンパ節腫大
RIIIS/J		○		
Yok:ddY	○	○	○	Outbred
Yok:ICR	○	○		Outbred
ICR-K	○			白血病高発
5G			○	TG マウス　　4 lines

獣 医 科 学 部

5LG			○	TG マウス	
Acr-GFP		○		TG マウス	
C3G		○		TG マウス	2 lines
4C30	○	○	○	TG マウス	
CD19-Cre		○		TG マウス	
CD40L		○	○	TG マウス	
CG	○	○	○	TG マウス	2 lines
EGFP		○		TG マウス	
G		○	○	TG マウス	5 lines
Gal A	○	○	○	TG マウス	3 lines
Gal B	○	○	○	TG マウス	2 lines
Gal F		○	○	TG マウス	2 lines
GLUT4		○	○	TG マウス	
GM1Sy			○	TG マウス	
lck-Cre		○		TG マウス	
Meg1	○	○	○	TG マウス	4 lines
mit-YFP			○	TG マウス	17 lines
MLC-2v-Cre		○	○	TG マウス	
N-CAM		○	○	TG マウス	
nestin-Cre		○		TG マウス	
Ngfr	○			TG マウス	
Oct-GFP		○	○	TG マウス	
Octx129		○	○	TG マウス	
OryxPrionTg			○	TG マウス	
Prp-TG		○		TG マウス	
PST		○	○	TG マウス	2 lines
Rag1		○	○	TG マウス	
Ras		○	○	TG マウス	3 lines
ST3		○	○	TG マウス	2 lines
ST3P		○		TG マウス	
ST6		○	○	TG マウス	
STX		○	○	TG マウス	2 lines
TMT		○		TG マウス	
Translin			○	TG マウス	
X-GFP		○		TG マウス	
8HS		○		KO マウス	
Atm			○	KO マウス	
CD40KO			○	KO マウス	
RP58KO			○	KO マウス	
BH			○	KO マウス	3 lines
BKO	○	○		KO マウス	
AK	○		○	KO/TG	3 lines
BK	○	○	○	KO/TG	2 lines
CK	○	○	○	KO/TG	
JF1(*Mus musculus* 亜種)	○	○	○	愛玩マウス由来	
Mus spretus			○	野生マウス	

国立感染症研究所 獣医科学部 第四室 (実験動物開発室)
維持動物一覧 (マウス以外)

動物種	系統	由来
ゴールデンハムスター *Mesocricetus auratus*	HAW	医科研
スナネズミ *Meriones unguiculatus*	MOG (野生色)	実中研
	MGS/Idr (野生色)**	愛知県心身障害者コロニー
	MGR (野生色)	愛知県心身障害者コロニー
	MG-B (黒色)	日本医大
	MG-W (白色)	日本医大
マストミス *Praomys coucha*	MST (野生色)	遺伝研 (感染研近交化)
	MCC (シャモア色)	医科研
	MWC (野生色)	医科研
	RI-7 (シャモア色)	感染研
	RI-M (野生色)	感染研
モルモット* *Cavia porcellus*	No.2	日本生物科学研究所
	No.13	米国 NIH
	C4D	国立がんセンター
	JY-1	感染研
	JY-2	感染研
	JY-3	感染研
	JY-4	感染研
	JY-7	感染研
	JY-9	感染研
	JY-10	感染研
	JY-G	感染研
	Weiser-Maples	資生堂研究所

*現在モルモットの維持生産は, 所外委託中
**凍結胚のみ

系統動物の所外への分与状況 (平成14年度)

動物種 (系統)	分与先
マウス(129/SvJ)	シネ・サイエンス研究所
マウス (C57BL/6J *bg*)	北里大学医療衛生学部
	浜松医科大学医学部
マウス(C57L)	浜松医科大学医学部
	鶴見大学歯学部
マウス(C58)	浜松医科大学医学部
マウス(CBA/J)	東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
マウス(DDY)	名古屋大学生物分子応答研究センター
マウス(GR)	明治大学農学部
マウス(ICGN)	帝京大学医学部
	京都大学農学部 (2回)
	川崎医科大学腎臓内科
マウス(PC)	早稲田大学教育学部
マウス(BK48)	国際医療福祉大学
マウス(CK35)	鳥取大学遺伝子実験施設

13. 血液･安全性研究部

部 長　小 室 勝 利

概　要

本年度から、新しく血液･安全性研究部が組織された。新組織は、血液製剤関連の旧室名、血液製剤室、輸血病態室と旧安全性研究部の物理化学分析室、一般毒性室の4室より構成され各々第1室～第 4 室と名称を変えて運営されることとなった。
人事の上では、平成 14 年度末で第 1 室の奥山堅司主任研究官が定年退職された。
今までの研究、業務に対する努力と多大な貢献に敬意を表すとともに、今後のご活躍を祈っている。15 年度からは、梅森清子が研究員として採用され、業務の引き継ぎを行っている。
各室の検定、検査業務も着実に行われた。
品質管理に関連する研究も順調に進行し、さらに新組織に要求される方向を考慮した、長期的視野にたった基礎的研究も進展を見せた。これら研究は、厚生労働省科学研究費、文部科学省科学研究費、HS 財団、WHO 等の援助を受けて行われた。
当部において行われた研究、行政関連の協力、国際協力、品質管理に関する業績を以下に紹介する。
部長として、概要を記すのも最後となるが、部員全員の今後の活躍、発展を期待している。
公に尽くすことを任とする皆様方に以下の文を捧げる。(鎌倉、建長寺、食事五観文、解説付)

1. 一つには功の多少を計り、彼の来処を量る。
(この食物が食膳に運ばれるまでには、幾多の人々の労力と神仏の加護によることを思って感謝いたします)
2. 二つには、己が徳行の全欠をはかって供に応ず。
(わたくし共の徳行の足らざるに、この食物を頂くことを過分に思います)
3. 三つには、心を防ぎ、過貪等を離るるを宗とす。
(この食物にむかって貪る心、厭う心を起こしません)
4. 四つには、正に良薬を事とするは形枯を療ぜんが為なり。
(この食物は、転地の生命を宿す良薬と心得て頂きます)
5. 五つには、道業を成せんが為に、将にこの食をうくべし。
(この食物は道業を成せんが為に頂くことを誓います)

研究業績

Ⅰ．生物学的製剤の品質管理に関する研究

1. 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究

昨年度に引き続き、安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究の一環として、今年度は、異常毒性否定試験に関してはコブラ(タイ)、狂犬病･ジフテリア(インドネシア)そしてガス壊疽(ブルガリア)の4抗毒素について、発熱試験はコブラ(タイ)、クサリヘビ(インドネシア)、狂犬病･破傷風、ジフテリア(インドネシア)そしてガス壊疽(ブルガリア)の 6 抗毒素について実施した。その結果、一部の製剤に、我が国の生物学的製剤基準への適合性が疑われる製剤を確認した。
[後藤紀久、内藤誠之郎、加藤博史、前山順一、永田典代(感染病理部)、高橋元秀(細菌第二部)]

2. 核磁気共鳴(NMR)スペクトル法による、市販抗生物質医薬品(セファトリジンプロピレングリコール、硫酸ゲンタマイシン、塩酸バンコマイシン、アムホテリシン B)の確認試験

(1) スペクトルの種類と測定方法
標準品(4種)と検体(全19検体)に、内標準物質(DSS、TMS)を含んだ測定溶媒(重水、重水-重塩酸、DMSO-d6)を加えて溶解し、力価濃度の等しい標準溶液、検体溶液を作成した。さらに標準溶液と検体溶液の等容量を混合し混合溶液とした。これらの溶液を用いて、^{1}H(400MHz)、^{13}C(100MHz)の各1次元スペクトル測定を室

温 (約 26℃) で実施し、それぞれ、標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルとし、各スペクトルの比較から、製剤の同定確認を試みた。

(2) スペクトル測定の結果

(ア)セファトリジンプロピレングリコール［15mg (力価) /DCl-D2O/DSS、カプセル:2 検体 (2社)； 顆粒:5 検体 (4社)］

^{1}H-スペクトル:カプセルは賦形剤等のピークがほとんど検出されず、標準品と同一のスペクトルを与えた。　顆粒は3.2ppm～4.3ppmに賦形剤由来の大きな多重線が存在し、この領域にあるセファトリジンのピークは検出困難であった。等量混合物スペクトルでは、他の領域のピークは完全に一致した。なお、賦形剤のピークは類似しており、5 検体は類似の化合物が使用されていると推定できた。 ^{13}C-スペクトル:標準スペクトルには 23 ピーク (予想 21 ピーク) が観測されたが、グリコールのラセミ混合物のためと推測した。検体スペクトルも、ほぼ同様のピーク数と化学シフト値が検出された。これらのピークにはいくつかの重複未分離ピークの存在が認められた。賦形剤のピーク領域では、完全な分離ピークが得られた。等量混合スペクトルでは 23 ピークは完全に一致した。3 検体で、172ppmにトリアゾール炭素と推測される小ピークが検出されたが、標準品と他の 4 検体では全く検出されなかった。^{1}H-スペクトルの標準、検体、等量混合物の各スペクトルで 8.5ppm付近にトリアゾールプロトンの存在が標準品と全検体で確認できた結果、同定確認に至ることができた。同定確認に、^{1}H-スペクトルと^{13}C-スペクトルの測定が共に必要なケースであった。

(イ)硫酸ゲンタマイシン［20mg (力価) /D2O/DSS、注射液:5 検体 (3 社)］

^{1}H-スペクトル:　多量の軽水が検体溶液に含まれているため、presaturationの測定条件でスペクトルを観測した。4.5ppm～6ppm以外の領域のピークは高分解でスペクトルが得られた。硫酸ゲンタマイシンは、非常に化学構造の類似した4つの類縁体 (C1,C1a,C2,C2a) の混合物から成っており、その組成比は常に一定ではない。このため、多重線の重なりの他、積分比、ピーク形状の変動が予想され、^{1}H-スペクトルによる同定確認は困難であった。5.9ppm付近の多重ピークから4つの類縁体のモル組成比が得られた。5 検体全てに、添加剤のベンジルアルコールのピークが4.6ppm (一重線) と 7.4ppm (多重線) に観測された。特に、1 検体 (10mg力価/ml) で、ゲンタマイシンとの相対含有量が大きかった。^{13}C-スペクトル:　標準品スペクトルから全部で 42 ピーク (重複未分離ピークを含む) が観測され、検体スペクトル、等量混合物スペクトルにも、これらすべてに対応するピークが観測された。等量混合物スペクトルでは、これらのピークは、強度は異なるが、すべて化学シフトが一致し、同定確認された

(ウ)塩酸バンコマイシン［55mg (力価) /DMSO-d6/TMS、注射用:3検体 (3 社)］

^{1}H-スペクトル:標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルに広幅なピークが1ppm～10ppmに均等に分布し、H-Hカップリング等のパターンの酷似したスペクトルが得られたが、この測定条件では分解能を改善することは困難であった。分解能が低いスペクトル間の比較は確実性が乏しく、同定確認には不適であった。2 検体において、標準品に検出された 5.5ppm付近のピークが検出されないという明らかな相違が見られ、標準品と検体の同一性に否定的な結果が得られた。^{13}C-スペクトル:157ppm付近のピーク (ピーク強度から 0.5～1モル相当量;^{1}H－スペクトルでの 5.5ppmのピークと関係すると推測された。) が標準品と標準品を提供している同一製造社の 1 検体に検出された。このピーク以外の 62 ピークは、3 検体とも、すべて標準スペクトルのピークと一致した。標準品の純度 (1000 μg力価/mg以上) から、157ppmのピークが不純物由来と考え難かったが、別の標準品を用いて標準スペクトルを測定した結果、157ppmのピークは全く検出されなかった。このことから、157ppmのピークは不純物由来と結論した。3 検体は標準品と 62 ピーク全てが一致し、同定確認が完了した。検体スペクトルには 63 ピーク以外には不純物らしきピークは検出されなかった。また常用標準品が、必ずしもNMR確認試験の標準品に適さないことが示された。

(エ)アムホテリシン B［エタノール沈殿処理、30mg (力価) /DMSO-d6/TMS、錠:2 検体 (2 社)； シロップ:2 検体 (2 社)］

^{1}H-スペクトル:標準スペクトル、検体スペクトル、等量混合物スペクトルのいずれもピークが非常に広幅なスペクトルが得られ、同定確認に至らなかった。^{13}C-スペクトル:標準スペクトルでは、全部で40ピークが観測された (予想ピーク数 47)。同じ構成単位の繰り返しが多い分子構造上、重複未分離ピークが多数観測された。測定条件上、ピークの定量はできなかったが、125ppm～140ppmの領域にオレフィン炭素が4ピーク分、60ppm～100ppmの領域に2級アルコール炭素が 2 ピーク分、未分離重複ピークとして存在すると推定された。検体スペクトルには数個の重複ピークが認められたが、標準スペクトルと同一の 40 ピークが検出された。等量混合物スペクトルでは、ピークは全て一致したことから、同定確認した。

［矢野茂生］

3. WHO国際標準品作成プログラムへの参加

WHO HBsAg Reference Panel および WHO International Standard for anti-Parvovirus B19 の作成プログラムに参加し、日本国内で用いられている検査キットを用いて両者候補品について測定を行い、その結果をNIBSC に報告した。Anti-Parvo B19 については国際標準品として既に認められ、HBsAg Reference Panel については今秋開催される WHO の国際会議で認められる予定になっている。

［水落利明］

Ⅱ．血液製剤に関する研究

1. プリオンに関する研究

(1) ヒト血液成分における正常プリオンタンパクの分布に関

する研究

BSEが輸血によって感染することを示唆する動物実験が報告されている。病原性プリオンタンパクの伝播に正常プリオンタンパク（PrP^C）を発現している血球がかかわっているかどうかは不明である。本研究ではヒトの血液の各成分におけるPrP^Cの分布をウエウタンブロット法及びフローサイトメトリーで分析し、以下のことを明らかにした。(ロ)$CD3^+$ T cell、$CD19^+$ B cellにおいてPrP^Cは同程度に発現していることを確認した。(ハ)血液中のPrP^Cは主に血小板画分に分布していた。血漿中のPrP^Cは検出できなかった。(ホ) Megakaryocyte的な性質を有する白血病由来細胞株5株のうち4株がPrP^Cを発現していた。

［水沢左衛子、岡田義昭　血液･安全性研究部（厚生労働科学研究費補助金、肝炎等克服緊急対策研究事業）］

(2) 血液を介するプリオン感染機構の解析とプリオン除去の研究

体内に侵入したPrP^{sc}が中枢神経に達する機構として、FDCに注目した。FDCは感染早期にプリオンが検出できることが知られているので 、FDCが産生するケモカインであるBLCに対する遊走性を脾細胞や腹腔内に存在するPEC（peritoneal exudative cells）を用いて解析し、PECに高い遊走性が認められた。同様に、SDFに対しても遊走性が確認出来た。PECを介してFDCや神経系にプリオンタンパクが運ばれる可能性が示唆された。また、ウイルス除去工程として実際の製造で導入されているポリエチレングリコール処理がウイルスだけでなく正常プリオンを濃縮することを確認した。これらを来年度に予定されている感染実験で確認したい。

［岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利］

2. ウイルスに関する研究

(1) 血液からのウエストナイルウイルス検出法の開発

米国においてウエストナイルウイルスが流行し、我国への侵入が心配されている。また、我国で市販されている血漿分画製剤の内、献血以外の製剤の血漿は主に米国において採血されているので輸血を含めた血液製剤の安全性確保のためにウエストナイルウイルスの検出法を検討した。ウエストナイルウイルスは幾つかの genotype が存在し、我国においては日本脳炎ウイルスとの遺伝子上での類似性があることから、日本脳炎ウイルスとクロスしないで、他のウエストナイルウイルスを全て検出する系を目指した。今のところ、米国から分離されるウイルス株を検出しうる系が確立出来た。

［岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利、高崎智彦（ウイルス一部）倉根一郎（ウイルス一部）］

(2) 血漿分画製剤からのパルボウイルス B19-DNA 検出

血液の安全性確保のために、ウイルスの核酸増幅法が日本と欧米で導入されている。これまで HBV、HCV、HIV、の 3 つのウイルスが主な対象だったが、検査体制が整備された（HBV は国によって実施していないが）ことによって次の対象として B19 の規制が検討されている。国内外の製造所では既に自主的に原料血漿におけるスクリーニングを導入しているところもあるが、最終製剤での B19- DNA 陽性率を検討した。市販されている免疫グロブリン製剤やフィブリノーゲン製剤からは検出感度以下であった。スクリーニングを導入する前と考えられる製品からは検出されたことからスクリーニングの導入は安全性確保の上から有用である。

［岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利］

(3) ヒトパルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系の確立

昨年分離した KU812 細胞株のクローンを用いて、パルボウイルス B19 の加熱による不活化効率を評価した。これまで、B19 の適当な感染系がなかったためにモデルウイルスを使ったヴァリデーションが実施されていたが、我々の細胞株で B19 での評価が可能になった。60℃の液状加熱によって 10 の 4 乗以上感染価は減少した。一方、PBS、アルブミンに各々添加した B19 ウイルス液を乾燥後、60℃24 時間加熱したところ、PBS では液状加熱と同等の不活化が認められたが、アルブミン存在下では減少が認められなかった。［岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小

室勝利］

(4) マウスレトロウイルスをモデルとした異性間感染の解析

異性間感染の機序をケモカインの面から解析するために、マウスレトロウイルスをモデルに用いて行った。 昨年度は MIP-1alpha に対して感染細胞のケモタキシスが認められたので、今年度は感染マウスから脾細胞を分離し MIP-1alpha、 MIP-2 に対して遊走する細胞からのウイルス産生を検討した。共に脾細胞の遊走が亢進していたが、MIP-2 に遊走した細胞からはウイルスを産生する細胞は認められなかった。一方、 MIP-1 に遊走した細胞からは高頻度に産生細胞が認められた。正常な性周期に一致して生体から産生される MIP-1 を利用して効率良く他の宿主に感染することが示された。

［岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、種市麻衣子、小室勝利］

III．ワクチン添加剤に関する研究

1. 粘膜ワクチン用アジュバントとしての組換えコレラ毒素 B サブユニット(rCTB)に関する研究

(1) 肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PW)への試み

CDAP を使用した活性化多糖体とスペーサー導入 rCTB を混合し、4℃で作用させて架橋した材料を BALB/c マウスに 4 回経鼻投与し、その後、血液、糞便、鼻腔、肺、小腸、

大腸、膣の各洗浄液及び唾液を採取し、抗体価を調べた。血清中の抗 PW IgM 抗体価は初回免疫で最高値に達し、抗 IgG 及び抗 IgA 抗体価は IgM 抗体より低かった。また、粘膜 IgA 抗体は全ての粘膜部位で検出されなかった。
［後藤紀久、前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大･医)］

(2) インフルエンザ HA ワクチンへの試み
インフルエンザウイルスA/New Caledonia/20/99 とB/Johannesburg/5/99 の 2 株のワクチン抗原にrCTBを添加して、BALB/cマウスに 4 回経鼻投与し、血清中HI抗体価を測定したところ、rCTB存在下で免疫したマウスがA型に対する高いHI抗体価を示した。A･B型共にHA量を 1/5(0.2 μg)に減量して投与したところ、A･B型のHAに対する血清IgG抗体価は、rCTBの有無に関係なく、同程度に高い値を示した。血清IgA抗体価はA型ではrCTBの存在に関係なく、B型ではrCTBの存在下の方が高い抗体価を示した。HI価は、rCTB存在下で免疫したマウスの血清ではB型のHAによる赤血球凝集を有意に阻止し、高いHI価を示した。また、rCTB存在下で鼻腔と肺の粘膜IgAも上昇した。
［後藤紀久、前山順一、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大･医)、諸熊一則、大隈邦夫(化血研)］

(3) 細胞性免疫反応に対する rCTB の作用
BCGを用いて、rCTBの同時経鼻投与による細胞性免疫増強効果を見出したが、精製ツベルクリンに対する皮膚反応(モルモット)によって、更に投与条件等を詳細に検討した。その結果、あらかじめrCTBと共にBCGを 10^5CFU経鼻投与し、その後、2、3、4 週目にrCTBのみを経鼻投与した場合、BCG皮下投与と同程度の強い皮膚反応が得られた。このことから、rCTBは細胞性免疫反応をも増強することがより明確になった。
［前山順一、後藤紀久、山本三郎(細菌第二部)、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫(名古屋市大･医)］

(4) カニクイザルに対する安全性と効果
ジフテリア･破傷風トキソイド及び HBs ワクチン抗原を rCTB と共に経鼻投与したところ、破傷風抗毒素価、抗 HBs 抗体価について、rCTB 添加により増強が認められた。しかしながら、ジフテリアについては、高い血清抗毒素価を示すところの、過去に感染があったと考えられるサルの供給を受けたため、明確な結果が得られなかった。また、体重変化、剖検所見、血液生化学的性状には大きな異常は認められなかった。現在、更に病理組織学的所見、各粘膜局所からの粘膜分泌型 IgA、各リンパ組織細胞からのサイトカイン産生等の解析を進めている。
［前山順一、古畑啓子、後藤紀久、永田典代、原嶋綾子(感染病理部)、網　康至、須崎百合子(動物管理室)、小宮貴子、高橋元秀(細菌第二部)、井坂雅徳(名古屋市大･医)］

2. IFN-βの粘膜アジュバント作用に関する研究
IFN-βによる抗原特異的抗体産生の増強について報告してきたが、安定した抗体産生を得られないという点で課題が残されていた。より鼻粘膜滞留性のよい投与剤形を検討する目的で、1%キトサン溶液を用いることを試みた。その結果、IFN-βとキトサンが相乗的なアジュバント作用を示し、キトサン添加群で、IFN-βの量に依存して、抗原特異的血清 IgG 抗体産生及び局所分泌型 IgA 産生の有意な増強が認められた。
［前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)］

Ⅳ．感染症に対する生体反応に関する研究

1. IgE 抗体産生を惹起しにくいワクチンの創製に関する研究 － 抗原結合リポソームのマクロファージによる認識

これまでの検討の結果、リポソームの脂質組成によってアジュバント効果が顕著に異なることが示されたが、脂質組成の異なるリポソームと蛍光標識 OVA との結合物をマクロファージ培養中に添加してマクロファージによる取り込みおよび OVA の消化を検討したところ、アジュバント効果の高いリポソームと結合した OVA はマクロファージに取り込まれやすく、より消化を受けることがわかった。さらに、OVA 特異的 T 細胞クローンへの抗原提示についてもアジュバント効果の高いリポソームと低いリポソームとの間で顕著な差がみられた。このことから、脂質組成の異なるリポソームの間にみられるアジュバント効果の差は抗原提供細胞による抗原認識の差と関連があることが示唆された。
［内藤誠之郎、加藤博史、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也］

2. IgE 抗体産生を惹起しにくいワクチンの創製に関する研究 － フォスファチジルセリン含有リポソームにおけるアジュバント効果の増強

生体内において食細胞がアポトーシス細胞を貪食、消化する機構のひとつとして、アポトーシス細胞の表面に発現したフォスファチジルセリンを食細胞が認識することによるものが知られている。リポソームを構成する脂質にフォスファチジルセリンを加えることでリポソームのアジュバント効果を増強することが可能であるかについて検討を行った。その結果、フォスファチジルセリンを脂質組成に含むリポソームは含まないものと比べて顕著に高い抗原特異的抗体産生をマウスにおいて誘導した。この結果は試験管内でのマクロファージによる貪食を検討した結果とも一致した。フォスファチジルセリン含有リポソームにおいても、抗原結合リポソームによる IgE 抗体産生の選択的抑制効果はこれまでと変わらず観察された。これらのことから、フォスファチジルセリンの添加によりリポソームのアジュバント効果を増強することが可能であることが示唆された。
［加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也］

3. リポソーム結合抗原のアレルギー治療への応用に関する研究

リポソーム結合抗原をアレルゲン減感作療法に応用する可能性について検討を行った。前年度はスギ花粉抗原として Sugi Basic Protein (SBP)を用いて検討を行ったが、今年度は SBP を構成する Cry J1 を用いて検討を行った。その結果、リポソーム結合 Cry J1 を免疫したマウスでは、Cry J1 特異的 IgG 抗体産生は誘導されたが IgE 抗体産生は誘導されなかった。このことから、リポソーム結合 Cry J1 をアレルゲン減感作療法に応用する可能性が示唆された。
［種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、内田哲也］

4. ウイルスゲノムのターゲティングによる遺伝子治療法の開発

レトロウイルス様ターゲティングベクターの開発中に、パッケージング細胞の内部で高頻度の相同組み換えが起こっていることを見い出した。これは、細胞内のインテグラーゼの作用によるものと推測され、同蛋白質を発現しているレトロウイルス感染細胞内でも同様の事象が生じることが期待された。そこで、ウイルスゲノムの一部を有するDNAを感染細胞に導入したところ、組み込まれていたウイルスゲノムの一部をターゲティングすることが出来、逆転写酵素活性等が非感染細胞レベルに復帰したトランスフェクタントが高頻度に得られた。
［田中（庄司）明子］

5. 液性免疫賦活化方法とその評価方法の開発を目的とした、MHC class II 拘束性抗原提示の分子メカニズムに関する研究。

液性免疫賦活化方法とその細胞レベルでの評価法の開発を目的として、様々な抗原提示細胞におけるMHC class㈼拘束性抗原提示の分子メカニズムに関する研究をおこなった。H2-DMb2鎖の細胞質領域に蛍光タンパク質を結合したキメラ分子をコードするベクターをマウス由来抗原提示細胞へ導入した。キメラ分子はクラス㈼分子、インバリアント鎖およびCD80分子陽性のlysosome様細胞内小胞に存在した。蛍光顕微鏡観察とwestern blot解析により、キメラ分子陽性小胞内における外来性抗原の消化とクラスⅡと抗原ペプチド複合体の形成が確認された。
［笠井道之］

6. 胸腺細胞にアポトーシスを誘導した際の胸腺での脈管新生―マクロファージMMP-9の関与

Matrix metalloproteinases-9(MMP-9)は様々の疾患との関連が報告されているが、血管周囲の基底膜を分解することにより血管管新生を促進することが知られている。抗CD3 抗体をマウス投与に投与すると胸腺細胞にアポトーシスが誘導されるが、死細胞は速やかに胸腺に遊走してきたマクロファージによって貪食処理されることを報告してきた。今回、マウス胸腺細胞のアポトーシスに伴い、胸腺に遊走してきたマクロファージから産生された MMP-9 が IV 型コラーゲンを切断し、脈管新生が誘導されることを観察した。そして、多くのマクロファージは形成された脈管を介して胸腺からの移出して行くことが示唆された。
［小高千加子］

7. ウイルス遺伝子と生体内シグナル伝達機構の解析―転写因子を中心にー

ウイルス遺伝子（またはタンパク質）の一部を用いた生体内での解析が進められ、様々な生体反応への影響が解明されてきている。これら一つ一つの遺伝子コンポーネントの生体反応への影響を詳細に解析することが、最終目的である感染メカニズムの解析、ワクチン、特異的な治療法の開発への礎となるものと考えられる。我々は、正常個体であるアフリカツメガエルの胚をモデルにした遺伝子発現系と生体内シグナル伝達系に関する基礎的研究を進めている。

(1) C 型肝炎ウイルス、コア（core）タンパク質と細胞内シグナル伝達系の解析

レチノイド（Retinoic Acid ; RA）は及びその受容体（RXR）は、生体の発生、分化、増殖、再生、脂質代謝等に関わる重要なシグナル伝達系の一つである。これまでRXR- がCoreタンパク質と特異的に結合すること（ウイルス二部、宮村ら）、及び RA 過剰発現、暴露による様々な種の胎児の発生異常等をきたすことが明らかにされている。我々は様々な培養細胞系にトランスフェクションを行い、RARE(RA-responsive element)-Luciferase のコンストラクションを指標に、CoreとRXRシグナル伝達系との関係を解析したところ、RA の場合に比較してほぼ同様の RARE の活性が認められた。また、正常個体の2細胞期の胚内に Core 遺伝子を過剰発現させると、眼、特に網膜（retina）発生が抑制されていることを明らかにした。現在は、様々な眼、神経系の遺伝子マーカーをプローブにして in situ hybridization 等を行い遺伝子発現とその局在を明らかにしているところである。
［青木陽一郎、益見厚子、矢野茂生、布施晃］

(2) HIV 制御遺伝子（Tat）が胎児に与える影響

現在、HIV のワクチン開発が進められているが、近年その調節遺伝子である Tat が注目されてきた。また、HIV 感染を受けた母親から生まれた HIV 感染を受けていない胎児は、血清学的、免疫学的異常が長期間継続することが報告されている。我々は、胎児に与える影響を短期間に広範囲な現象を解析しうる方法として、アフリカツメガエル胚への Tat, mutant-Tat 等を接種し、各発生段階の胚を様々な遺伝子マーカーを持ちいいて解析したところ、胎児の三胚葉形成の基本となる転写因子 Brachyury (Xbra)の遺伝子発現が抑制され、原腸陥入後の胚葉形成が不全となった。現在は生化学的な解析を含め、特異的な抑制メカニズムを解析中である。
［青木陽一郎、小室勝利］

8. インターフェロン転写制御因子に関する研究

インターフェロン転写制御因子のうち、IRF-2 がヒストンアセチル化酵素によりアセチル化を受けることを見い出したことから、NIH3T3 細胞を用いて細胞増殖制御との関連で検討した。細胞増殖と関係の深い H4 遺伝子が IRF-2 にと

って制御をうけ、その際 IRF-2 はアセチル化を受けて機能を発揮していることが明らかとなった。
［益見厚子］

9. HCV タンパク質 NS5A の研究
NS5A を HeLa 細胞に恒常的に発現させた細胞をもちいて、プロテオーム研究を行った。およそ 1L 培養から細胞をアフィニテイカラムで NS5A を精製し、結合してきた宿主細胞タンパク質を LC/MS–MS で解析した。結合タンパク質は今のところ2種類見い出され、それぞれ、phosphoprotein と phosphatase であった。Phosphoprotein のほうは、2003 年に他の研究者が見い出したタンパク質と同一であった。もうひとつの phophatase について検討している。
［益見厚子］

10. cDNA マイクロアレイによる分析 II:抗ガン剤による細胞死の分析と感受性の事前診断
白血病細胞株 CMK に抗ガン剤 Ara-C を投与し、細胞死に至るまでに変化する遺伝子について我々が独自に作成した DNA マイクロアレイ（ヒトの遺伝子2000をのせたチップ）で解析した。その結果、細胞死にいたる前に、いくつかのアポトーシス関連および転写関連遺伝子の変化が認められた。患者のガン細胞の遺伝子変化の分析により、患者に効果のある抗ガン剤を事前に選択する方法を開発する。
［布施　晃、佐藤武幸（千葉大研究院）、関　直彦（千葉大研究院）］

11. 微小重力の生体防御に及ぼす影響 III :微小重力の潜伏ウイルスの再活性化
マウスヘルペスウイルス持続感染系を開発し、熱処理や紫外線処理でウイルスの活性化する系を作成した。これらの系ではストレス刺激によって、ヒートショック蛋白や種々のサイトカインの遺伝子発現が変化することも見いだした。この持続感染系を微少重力下に持ち込み、宇宙空間で持続感染しているウイルスの再活性化がどのように起こるか、今後検討する予定である。
［布施　晃、喜多正和（京都府立医大）］

1. 平成14年度　検定/検査実績(第1室)

試験検査	件数
国家検定	
乾燥人フィブリノゲン	2
乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子	55
人免疫グロブリン	6
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	4
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	66
pH4処理酸性人免疫グロブリン	5
乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン	5
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	40
乾燥ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙ処理人免疫グロブリン	38
抗破傷風人免疫グロブリン	1
乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	3
ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙ処理抗破傷風人免疫グロブリン	3
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ	41
人ハプトグロビン	7
計	276
抜取検査	
乾燥人血液凝固第IX因子複合体	4
乾燥濃縮人血液凝固第IX因子-原血漿が 50 人分以上の場合	4
ヒスタミン加人免疫グロブリン（乾燥）	2
計	10
一般依頼検査	
遺伝子組換え血液凝固第Ⅷ因子	16
人免疫ｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ	2
計	18
合計	304

2. 平成 14年度 検定/検査/標準品等供与の実績(第2室)

試験検査	件数
国家検定	
抗 HBs 人免疫グロブリン	1
乾燥抗 HBs 人免疫グロブリン	4
乾燥ﾎﾟﾘｴﾁﾚﾝｸﾞﾘｺｰﾙ処理抗 HBs 人免疫ｸﾞﾛﾌﾞﾘﾝ	1
乾燥抗 D(Rho)人免疫グロブリン	4
計	10
国家検査(収去検査)	
抗ヒトグロブリン抗体（多特異性抗体）	9
抗 A 血液型判定用抗体	4
抗 B 血液型判定用抗体	4
抗 D 血液型判定用抗体	6

ゲルカラム遠心凝集法血液型判定用抗体	2
(抗グロブリン抗体を含む製剤)	
ゲルカラム遠心凝集法血液型判定用抗体	1
(混合血液型抗体を含む製剤)	
計	26
依頼検査	
HBs 抗原検出用体外診断キット	6
HCV 抗体検出用体外診断キット	5
計	11
標準品の供与	
参照抗 HBs 人免疫グロブリン	1(1)
HBs 抗原国内標準品	7(14)
計	8(15)
合計	55(15)

3. 平成14年度　検定/検査実績(第3室)

試験検査	件数
生物製剤･血液製剤	
水素イオン濃度試験	11
含湿度試験	127
蛋白窒素定量試験	216
蛋白質定量試験	94
ホルムアルデヒド定量試験	138
チメロサール定量試験	2
ヒスタミン定量試験	1
ヘモグロビン定量試験	8
クエン酸ナトリウム定量試験	3
フェノール定量試験	1
特審･依頼 (抗生物質等)	
吸光度 (紫外吸収)	8
旋光度	5
含湿度　水分定量法 (KF 法)	38
乾燥重量法	33
重金属	6
赤外吸収	21
紫外吸収	2
NMR	18
強熱残分	5
薄層クロマトグラフィー	2
合計	739

4. 平成14年度　検定/検定実績(第4室)

(1) 異常毒性否定試験

(ア) 生物学的製剤

月	試験実施	判　定		再試験	取下げ
	件　数	合　格	不合格		
4	20	20	0	0	0
5	9	9	0	0	0
6	4	4	0	0	0
7	7	7	0	0	0
8	6	6	0	0	0
9	49	49	0	0	0
10	15	15	0	0	0
11	7	7	0	0	0
12	22	22	0	0	0
1	3	3	0	0	0
2	10	10	0	0	0
3	21	21	0	0	0
計	173	173	0	0	0

(イ) 血液製剤

月	試験実施	判　定		再試験	取下げ
	件　数	合　格	不合格		
4	106	106	0	0	0
5	36	36	0	0	0
6	49	48	0	1	0
7	100	97	0	3	0

8	40	39	0	1	0
9	89	84	0	5	0
10	46	46	0	0	0
11	81	79	0	2	0
12	81	80	0	1	0
1	42	42	0	0	0
2	48	48	0	0	0
3	124	123	0	1	0
計	842	828	0	14	0

8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	2	2	0	0	0

〔2〕 生物学的製剤発熱試験

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	29	29	0	0	0
5	32	31	0	1	0
6	30	30	0	0	0
7	29	29	0	0	0
8	31	31	0	0	0
9	32	32	0	0	0
10	18	18	0	0	0
11	26	26	0	0	0
12	19	19	0	0	0
1	27	27	0	0	0
2	28	28	0	0	0
3	29	29	0	0	0
計	330	329	0	1	0

〔3〕 発熱性物質試験 (抗生物質) 一般依頼検査

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	2	2	0	0	0

研究業績一覧

I. 論文発表

1. 欧文発表

1) Collaborative study to calibrate hepatitis C virus genotypes 2-6 against the HCV International Standard, 96/790 (genotype 1). Saldanha J, Heath A; Collaborative Study Group. (Mizusawa, S. as a member of the WHO collaborative Study Group). Vox Sang. 2003 Jan;84(1):20-7.

2) Toda, M., M. Kasai, H. Hosokawa, N. Nakano, Y. Taniguchi, S. Inouye, S. Kaminogawa, T. Takemori, and M. Sakaguchi. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of $CD4^+$ T cell epitope peptide derived from Japanese ceder pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. Eur. J. Immunol. 32:1631-1639 (2002).

3) Utsuyama, M., J. Shiraishi, H. Takahashi, M. Kasai, and K Hirokawa. Glia Maturation factor produced by thymic epithelial cells plays a role in T cell differentiation in the thymic microenvironment. Int. Immunol. 15:557-564 (2003).

4) Odaka, C., Mizuochi, T., Yang, J., and Ding, A. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during phagocytosis of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. J. Immunology 171:1507-1514 (2003).

5) Yoshizawa, I., T. Mizuochi, A. Ogata, M. Murakami, H. Yagaita, Y. Takahashi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota: Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. AIDS Res. and Human Retro. 19:469-479 (2003).

6) Aoki Y, Spokony R.F, Magner-Fink E.K. and Saint-Jeannet J-P. (2002). The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus. Development 129, 421-432.

7) Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E. K, Lee Y-H, Credidio C, and Saint-Jeannet, J-P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in Xenopus. Developmental Biology. 259.19-33.

8) Sunohara M, Morikawa Stakeyuki, Sato T, Sato I, Sato S and Fuse A, Modulatuin of human *C-MPL* gene expression by thrombpoietin through protein kinase C. Cellular Molecular Biology 49 OL393-OL-398 (online), 2003

9) Caillaud A., Prakash A., Smith E., Masumi A., Hovanessian A.G., Levy D.E. and Marie I. Acetylation of Interferon Regulatory Factor-7 by p300/CREB-binding Protein (CBP)-associated factor (PCAF) Impairs its DNA binding. J. Biol. Chem. 277, 49417-49421 (2002)

10) Masumi A, Tamaoki S, Wang IM, Ozato K, and Komuro K. IRF-8/ICSBP and IRF-1 cooperatively stimulate mouse IL-12 promoter activity in macrophages. FEBS Lett. 531, 348-53 (2002)

11) Masumi A., Yamakawa Y., Fukazawa H., Ozato K. and Komuro K. Interferon regulatory factor 2 regulates cell growth through its acetylation. J. Biol. Chem. 278, 25401-25407 (2003)

12) Nishikawa K., Kobayashi M., Masumi A., Susan E. Lyons, Brant M. Weinstein, P. Paul Liu and Yamamoto M.Self-association of Gata1 Enhances Transcriptional Activity In Vivo in Zebrafish Embryos. Mol. Cell. Biol. (2003) In press

13) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Taniguchi, T., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K and Goto, N. : Effects of recombinant cholera toxin B subunit on IL-1β produced by macrophages *in vitro*. Microbiol. Immunol., 46, 593-599, 2002

14) Taneichi, M., Naito, S., Kato, H., Komuro, K., Uchida, T. (2002) T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. J Immunol 169:4246-4252.

15) Tanaka, Y., Ishikawa, F., Osada, H., Ohmi, S, Uchida, T., Kakiuchi, T. (2002) Reveromycin A inhibits antigen receptor-mediated antigen presentation by B lymphoma cells through affecting intracellular trafficking of the antigen. J Antibiotics 55:904-913.

16) Naito, S., Taneichi, M., Kato, H., Ami, Y., Suzaki, Y., Mori, M., Nakano, Y., Yamamura, H., Morokuma, K., Ohkuma, K., Miyake, H., Kiniwa, M., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates. Int Arch Allergy Immunol. 129:314-319.

17) Uchida, T. (2003) Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion. (2003) Current Drug Targets 3:119-135.

18) Arai, C., Ichiji, T., Tanaka, Y., Okada, Y., Umeda, M., Uchida, T., Kiniwa, M., Kakiuchi, T. (2003) Selective enhancement of B cell antigen receptor-mediated antigen presentation by treatment with tumor growth factor-beta. Eur. J. Immunol. 33:1806-1815

2. 和文発表

1) 種市麻衣子、内田哲也：完全フロイントアジュバントの IgE 産生抑制機構. 臨床免疫、科学評論社、東京、2002、第 38 巻 1 号、102-106 頁.

2) 内田哲也：リポソーム表面結合抗原のアレルギー予防･治療への応用に関する研究 ヒューマンサイエンス基礎研究事業 平成 14 年度官民共同プロジェクト研究報告書 2003

3) 後藤紀久、朽久保邦夫、大隈邦夫、櫻井信豪：安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究、平成 13 年度創薬等ヒューマンサイエンス研究、重点研究報告書、第 5 分野、健康保持増進･予防医薬品の開発に関する研究、66-76, 2002.

4) 後藤紀久、朽久保邦夫、大隈邦夫、櫻井信豪：安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究、平成 14 年度創薬等ヒューマンサイエンス研究、重点研究報告書、第 5 分野、健康寿命延伸･予防診断･治療法の開発に関する研究、59-66, 2003.

5) 後藤紀久：抗毒素の安全に関する研究−異常毒性否定試験･発熱試験、厚生労働科学研究費補助金 平成 14 年度医薬安全総合研究事業 総括･分担研究報告書、安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究、19-35, 2003

6) 青木陽一郎、小室勝利：ワクチンの安全性評価。HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究。平成14 年度創薬ヒューマンサイエンス総合研究事業、報告書。

7) 益見厚子：インターフェロン転写制御因子の生物学的機能について、日本学術振興会基盤研究(C)平成 13-14 年度報告書

8) 益見厚子：ウイルスタンパク質の宿主因子におけるプロテオーム研究、平成 14 年度ヒューマンサイエンス振興財団創薬国際グラント事業補助金分担報告書

9) 益見厚子：Keystone Symposia に参加して、臨床薬理の進歩 2003 (臨床薬理研究振興財団海外交流補助金報告書)

㈿. 学会発表

1. 国際学会

1) M. Kasai and T. Ikeda：Study on the molecular mechanism of MHC class II restricted antigen-presenting process in thymic epithelial cell lines. Kyoto T Cell Conference. The 3rd International

Workshop (12th Annual Meeting). 2002.

2) Fuse A: Effect of gravity change on the production of cytokines from spleen cells. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium

3) Fuse A: Effect of gravity change on viral infection. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium

4) Fuse A: Effect of gravity change on thrombopoiesis in mice. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium

5) Fuse A: From Minderbroedersstraat to space with cytokines. REGA International Symposium 2002. October 11-12, 2002, Leuven, Belgium

6) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation International congress of Interferon and Cytokine Research (ISICR) Turin, Italy, Oct, 2002.

7) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation Keystone Symposia, Big Sky, Montana, Jan, 2003.

国内学会

1) 岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：パルボウイルス B19 感染系の確立とその応用。第 50 回日本ウイルス学会学術集会･総会、2002 年 10 月、札幌市。

2) 岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子：マウスエイズウイルス感染細胞におけるケモカインに対する遊走性の解析。第 32 回日本免疫学会総会･学術集会、2002 年 12 月、東京。

3) 笠井道之、池田　通：マウス胸腺上皮細胞株における H2-DM陽性細胞内小胞の解析。第32回日本免疫学会総会･学術集会、2002年　12月

4) 小高千加子，水落利明：アポトーシス死細胞貪食時のマクロファージからの secretory leukocyte protease inhibitor の産生。第 32 回日本免疫学会総会･学術集会、2002 年　12 月

5) 田中（庄司）明子、小室勝利：ウイルスゲノムのターゲティングによるレトロウイルス感染症の遺伝子治療の試み。第25回日本分子生物学会年会、2002年
12月

6) 山本俊郎、喜多正和、今西二郎、布施　晃：サイトカイン産生に対する微小重力の影響。第 66 回日本インターフェロン･サイトカイン学会、平成 14 年 6 月，京都

7) 布施　晃，青木陽一郎、佐藤武幸、春原正隆、武岡元：微小重力によるマウス抹消血中の血小板減少。第16回日本宇宙生物学会　平成 14 年 11 月 9-11 日、富山

8) 布施　晃：ウイルス安全性に関する欧米での最近の話題。第1回ウイルス安全性研究会シンポジウム。平成14年12月20日．北里大学

9) Yoichiro Aoki, Jean-Pierre Saint-Jeannet. Analysis of Sox10 function during development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. 日本分子生物学会第25回年会。平成14年12月。

10) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro
Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 75 回日本生化学会、京都 10 月

11) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro
Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第25回日本分子生物学会、横浜 12 月

12) 前山順一、山本三郎、安田陽子、井坂雅徳、谷口　暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久：BCG の鼻粘膜投与における組換えコレラ毒素 B サブユニットのアジュバント効果について。第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜

13) 井坂雅徳、小宮貴子、安田陽子、谷口　暢、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫：rCTB をアジュバントとした DPT ワクチン経鼻投与での破傷風、ジフテリア抗毒素価の検討。第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜

14) 朽久保邦夫、井坂雅徳、安田陽子、谷口　暢、亦野恵子、後藤紀久、大隈邦夫：コレラ毒素 B サブユニットの粘膜アジュバント活性。第49回毒素シンポジウム、2002年7月、岐阜

15) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫、山本三郎、後藤紀久：組換えコレラ毒素 B サブユニットによるマウスマクロファージの IL-1β産生誘導機構の解析。第 67 回日本インターフェロン･サイトカイン学会総会･学術集会、2002 年 7 月、東京

16) 趙　艶秋、井坂雅徳、安田陽子、谷口　暢、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、朽久保邦夫：コレラ毒素 B サブユニットをアジュバントとしたインフルエンザワクチンの経鼻投与に対する免疫応答。第 39 回日本細菌学会中部支部総会、2002 年 10 月、愛知

17) 井坂雅徳、安田陽子、谷口　暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、高橋元秀、後藤紀久、朽久保邦夫：組換えコレラ毒素 B サブユニットを添加した試作調整 DPT ワクチンの経鼻投与におけるジフテリアと破傷風の毒素中和抗体誘導について。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉

18) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口　暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久：粘膜ワクチン用組換え CTB アジュバントの BCG 経鼻投与に対する効果。第 6 回日本ワクチン学会学術集会、2002 年 11 月、千葉

19) 山本十糸子、前山順一、後藤紀久、伊保澄子、McMurray, D.N.，山本三郎：抗結核免疫における免疫増強性 CpG-DNA の役割。第 32 回日本免疫学会総会･

学術集会、2002 年 12 月、東京

20)種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也：リポソーム結合抗原による抗原特異的、IgE 選択的無反応の誘導メカニズム　第 32 回日本免疫学会総会、2002 年

21)加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也：リポソーム結合抗原経口投与マウスにおける抗体産生　第 32 回日本免疫学会総会、2002 年

22)内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内田哲也：スギ花粉抗原―リポソーム結合物の花粉症治療への応用可能性　第 32 回日本免疫学会総会、2002 年

23)田中ゆり子、笠井道之、内藤誠之郎、種市麻衣子、加藤博史、内田哲也：マクロファージにおけるリポソーム結合抗原の細胞内動態　第 32 回日本免疫学会総会、2002 年

15. 遺伝子解析室

室 長　　神 田 忠 仁

概　　要

遺伝子解析室の業務は、遺伝子治療に用いるウイルスベクターの研究とウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索、解析である。種々のウイルスベクターに関する情報の収集、解析とアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの基礎的研究を中心に業務を進めた。また、子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス（HPV）が表皮基底層細胞に持続感染する分子機構の解明と HPV 感染を予防するワクチンの開発をめざす研究、HIV 逆転写酵素変異体の解析によって多剤耐性の獲得機構を明らかにする研究を継続した。

遺伝子治療は、有効な治療法が殆ど無い先天性遺伝病や癌に対して、革新的な治療法になると期待されている。これまでに欧米及び我が国で行われた臨床試験では、先天性の遺伝子異常による免疫不全症に対して良好な治療効果が見られ、末期癌に対する治療では患者の QOL(quality of life)の改善に貢献することが示されている。治療用遺伝子の細胞内への導入と発現を担うベクターの性能向上が、遺伝子治療の今後の実用化のカギを握るとされ、新たなベクターの開発が進められている。先天性遺伝病に対しては、治療用遺伝子を細胞染色体に組み込み、長期間に渡って安定に発現させる技術が求められ、AAV ベクターを中心とする遺伝子組み込みベクターの改良が進められている。癌の遺伝子治療では、癌細胞の増殖を阻止し、アポトーシスを誘導する遺伝子の一過性の発現を利用する治療戦略が一般的で、遺伝子導入効率の飛躍的向上をめざし、感染力を強化した新たなウイルスベクターが開発されている。一方、米国でのアデノウイルスベクターによる患者の死亡やフランスでのレトロウイルスベクターによる白血病の発症が示すように、いわば人工のウイルスであるベクターのリスク管理の重要性も示されている。このような現状から、我が国での遺伝子治療臨床試験のリスク管理に役立てるため、内外のウイルスベクターの安全性に関する情報収集に努めた。基礎研究としては、遺伝子組み込み治療への応用が期待される AAV ベクターの研究に注力した。AAV ベクターは安全性が高いとされるが、実はベクターの素材となる AAV の生活環に不明な点が多い。AAV は大部分のヒトに潜伏・持続感染しているので、患者体内でベクターとの組み換え（ベクターレスキュー)が起こる可能性があり、また生殖細胞にベクターが感染すると子孫に影響が生じることも予想される。これらを科学的に解析するにはベクターの体内動態を知ることが必要であり、サルをモデルにしてベクターの体内分布と経時的変動の詳細な解析を進めた。同時に AAV ベクターの改良や新たなベクター作製技術の開発にも取り組んだ。

HPV は子宮頚癌、肛門周囲癌、陰茎癌等の原因となる。小型の DNA ウイルスで、性行為等で生じた上皮組織の微小なキズから侵入し、表皮基底層細胞に潜伏・持続感染する。WHO は、世界の女性の癌の 11%（年間 45 万人）は HPV 感染が原因であるとし、HPV 感染への対策を呼びかけている。HPV には 80 以上の異なる遺伝子型があり、その中で HPV16、18 型に代表される 14 の型（高危険度群）が癌を引き起こすので、高危険度群 HPV の感染を予防できるワクチンの開発をめざしている。HPV の潜伏・持続感染を支える分子機構を明らかにし、持続感染細胞からウイルスを排除する方法を探っている。また、HIV のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤に対する耐性株は、逆転写酵素に変異を持つことがわかったので、変異が逆転写酵素の構造と機能をどのように修飾するのかを詳細に解析し、薬剤耐性の分子機構を知るための研究を継続した。これらの持続感染するウイルスの研究は、ウイルスベクターの研究とも関連するものである。

研 究 業 績

I. 遺伝子治療に用いるウイルスベクターに関する研究

1.　アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの開発及び安全性評価のための基礎的研究

(1)　AAV ベクターの体内動態の解析

カニクイサルでの AAV2 型ベクターの体内動態を解析した。今年度は、導入された遺伝子の発現を調べることに重点を置いた。EGFP-tubulin 融合蛋白質発現ベクターを、４頭のサルに大腿静脈より接種した。3 ヶ月後に解剖し、各臓器から DNA を抽出した。半定量的 PCR を利用してベクターDNA の有無とおおよその存在量を調べた。脾臓、リンパ節、肝臓、扁桃に多くのベクターDNA が存在し、筋肉、小脳、肺、卵巣などにも検出された。また、組織中の tubulin 蛋白質を抽出、濃縮し、ウエスタンブロット法により EGFP-tubulin 融合タンパク質の発現を調べた。3 ヶ月後でもリンパ節、扁桃、脾臓において導入遺伝子の発現が確認された。（森清一郎、竹内隆正、榎本　裕、佐多徹太郎[感染病理]、山田章雄[獣医科学]、神田忠仁）。

(2)　カニクイサルからの新規 AAV ゲノムの単離

カニクイサルの臓器 DNA に、未知の AAV ゲノム DNA を検出したので、クローニングした。AAV9 型及び 10 型と名付け、新たな AAV ベクターの素材となる可能性を探った。ヒトから分離され、現在 AAV ベクターの素材として主に使用されている AAV2 型のキャプシド蛋白質のアミノ酸配列と 9、10 型のアミノ酸配列の相同性は、それぞれ 84%と 62%だった。9 型、10 型のキャプシドを用いた AAV ベクターを作成し、マウスの尾静脈から接種した。1 週間後に各臓器に存在するベクターDNA を PCR で増幅し、検出した。AAV2 型、9 型のベクターは肝臓に多く、10 型のベクターは肺に多いことがわかり、標的臓器に違いがあることが示唆された。（森清一郎、神田忠仁）

2.　新たな機能分子の開発に関する研究

(1)　RNAi を利用した癌の遺伝子治療用カセットの作製

U6 snRNA プロモーターを用いた short hairpin RNA（shRNA）発現カセットを作製し遺伝子ノックダウンの実験を行えるようにした。癌の遺伝子治療を目的とするため、その発現が細胞の無限増殖に必須であると予想される遺伝子を標的候補とし、また同一標的遺伝子内でも複数の標的配列を選択して、種々の shRNA の発現カセットを作った。薬剤耐性遺伝子を持つ shRNA 発現プラスミドを HeLa 細胞に導入した後、薬剤選択下でのコロニー形成能の低下を指標にして、これらのカッセットのノックダウン効果を比較し、癌細胞の増殖抑制効果の機能的評価を行った。（竹内隆正、神田忠仁）。

(2)ヒト DNA 中のインスレーター配列の解析

インスレーターには、隣接するエンハンサーの活性を遮断する機能と、染色体に組み込まれた外来遺伝子の転写が組み込み部位に依存する現象（position effect)を阻止する機能がある。昨年度までに AAVS1 領域の約 300bp の SmaI 断片にはエンハンサー遮断活性が存在することを明らかにしたので、position effect の阻害機能を調べた。ルシフェラーゼ発現ユニットの両端に AAVS1-SmaI 断片ないしλDNA 断片を付加したレポーターを 293 細胞に導入し、細胞染色体に組み込ませた。15 週間後、 λDNA 断片付加の場合はルシフェラーゼ発現は著しく低下したが、AAVS1-SmaI 断片の付加では発現低下がみられなかった。AAVS1-SmaI 断片はインスレーターの特徴とされる 2 つの機能の両方を持つことがわかった。 (緒方敏彦、神田忠仁)。

3.　小型 DNA ウイルスベクターの作製技術の開発に関する研究

1)昆虫細胞（sf9)を用いた HPV 偽ウイルスの作製

培養細胞で増殖しないウイルスの感染初期過程やウイルス中和抗体の解析には、感染性偽ウイルスが役立つ。HPV の感染性偽ウイルスを sf9 で作る技術を開発した。マーカー遺伝子の発現プラスミドにバキュウロウイルス DNA の複製開始点を組み、sf9 に導入した。

さらにHPVキャプシド蛋白質(L1及びL2)を発現する組み換えバキュウロウイルスを感染させ、生じたキャプシドを精製した。キャプシド内にマーカー遺伝子発現プラスミドを組み込んだ感染性偽ウイルスを得ることができた。これまでに開発した試験管内合成法に比べると、プラスミド以外のDNA断片も組み込まれる傾向があるものの、キャプシド蛋白質量あたりの感染価は10倍程度上昇した。（石井克幸、神田忠仁）

2)HPVキャプシド形成の分子機構の解析

機能分子を細胞内に運び込む担体として、小型DNAウイルスのキャプシドを利用できる。HPVキャプシドは、72個のキャプソメア(L1の５量体)と12分子のL2から成る。キャプソメア間のジスルフィド結合によって正二十面体構造が作られており、L2 の存在によってキャプシドの安定性が増すが、L2がどのように存在しているのかは知られていない。昆虫細胞でL2と野生型L1、ないしL2とキャプソメアのみ形成できる変異型L1を発現させると、野生型L1では直径55nmのキャプシドが、変異体L1では直径40-50nmの粒子が形成された。即ち、L2 にはジスルフィド結合に非依存的にキャプソメアの会合を仲立ちする機能があることがわかった。（石井克幸、神田忠仁）

II. HPVに関する研究

1.HPVの増殖制御機構の研究

(1)　表皮分化を誘導する転写因子(hSkn-1a)の発現によって変動する遺伝子群の解析

初代ヒト表皮角化細胞で hSkn-1a を発現させると、表皮形成に至る分化が誘導される。HPVの生活環を解析するには、hSkn-1aの発現で生じる細胞生理の連続的な変化をたどることが重要である。培養液にドキシサイクリンを加えるとhSkn-1aが発現するHeLa細胞株を作り、hSkn-1a 発現直後に mRNA 量が大きく変動する遺伝子群を探索した。hSkn-1a発現後、速やかにmRNA量が増加したのはConnexin 43(Cx43)とras homolog gene family、member H(ARHH)で、減少したのはHomo sapiens myxovirus resistance 2 (Mx2)、ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RalGDS)であった。新生児表皮角化細胞を分化させ、これらのmRNA量の変動を調べると、Cx43、ARHH、RalGDSは増加し、Mx2は減少した。(榎本喜久子、神田忠仁)

(2) HPV陽性子宮頸癌由来細胞の分化能の検討

薬剤耐性マーカーと表皮分化を誘導する転写因子、hSkn-1a、を発現するプラスミドを種々の癌由来細胞株に導入し、薬剤耐性細胞コロニーを調べた。また、hSkn-1a発現アデノウイルスベクターを細胞に感染させ、角化細胞の分化マーカー蛋白質の発現とアポトーシスを調べた。角化細胞由来の癌細胞株はすべてhSkn-1aによってコロニーの数とサイズが減少し、一過性にhSkn-1aを発現させたすべての角化細胞由来の癌細胞株で、サイトケラチン 10 の発現誘導と、アポトーシスが検出された。角化細胞由来の癌細胞は hSkn-1aによる分化誘導に応答する能力を保っており、hSkn-1aが分化誘導療法の機能分子となり得ることが示唆された。(榎本　裕、神田忠仁）

(3)　HPV16L1蛋白質の発現抑制機構の解析

HPV16L1 遺伝子を CMV プロモーターに繋いだ発現プラスミドを培養細胞に導入しても、L1蛋白質は発現しない。この発現抑制機構は、HPVの潜伏・持続感染に重要な役割を担っているらしい。L1蛋白質のアミノ酸配列を変えずに、核酸の配列を変えるとL1蛋白質の発現が起こったので、この変異体と野生型L1遺伝子とのキメラを複数作り、発現抑制を担う領域がどこか調べた。これまでの解析で、全長約1500bpのL1遺伝子の5'端から200塩基(nt200)までの領域とnt400からnt900までの2つの領域があると、L1-mRNAの細胞内での分解が著しく促進されることが示された。分解促進が、角化細胞の分化に伴って消失すると思われる。（尾崎さおり、神田忠仁）

2. HPV ワクチン開発に関する研究

HPV16 型 L2 のアミノ酸 108-120 領域には、複数の HPV 型を中和できるエピトープが存在する。この領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを 10 名のボランティアに、経鼻接種した。プラセボ（3 名)には生理食塩水を用いた。4 及び 12 週後に追加接種した。接種前、6 及び 16 週後に血清を採取した。抗原ペプチドの経鼻接種で大きな副作用は認められなかった。500mg の接種を 3 回受けた 5 名のうち、3 名の血清中に HPV16 及び 52 型 L2 と結合する IgG 抗体が認められ、血清は HPV16 及び 52 型偽ウイルスの感染を阻止した。L2-ペプチドは、ヒトに毒性が無く一部のヒトには抗原性を持つことが示されたので、今後、このペプチドを実用的なワクチン抗原とする方法を開発する。（川名　敬、神田忠仁）

III. HIV に関する研究

1. HIV 逆転写酵素の研究

(1) HIV-1 逆転写酵素の大量発現・精製系の確立

HIV-1 薬剤耐性および易変異性発現の構造機能研究に用いる逆転写酵素の高純度精製標品を効率的に得る系を作った。his-tag 付き逆転写酵素を大腸菌で発現させ、親和性クロマトグラフイ‐とゲルろ過で精製した。1 リットルの大腸菌培養液から、純度 90%以上の精製標品を５mg 以上得ることができた。同標品は、活性型ダイマ‐で、高い比活性を示した。得られた酵素標品は、機能解析の目的には充分な純度を示したが、構造解析には、さらに純度を上げる必要があ
る。(守宏美、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 逆転写酵素の基質特異性調節機構の研究

HIV-1 薬剤耐性および易変異性発現の分子機構を知るために、HIV-1 逆転写酵素の基質選択性の調節機構を解析した。精製逆転写酵素を用い、細胞質に存在する種々のヌクレオチドおよびアナログが酵素触媒活性に与える影響を反応速度論的に解析した。ATP、GTP、CTP、UTP 存在下で、AZTTP の IC50 は濃度依存的に増加した。ATP の効果が最も顕著であった。ATP 濃度依存的に逆転写酵素の Km、Kcat は、それぞれ約 1/2、1/5 に減少した。AZTTP 感受性株、多剤耐性株で減少幅に有意差は無かった。AZTTP, d4TTP に対する Ki は ATP 濃度依存的に増加した。多剤耐性株の Ki 増加は感受性株より顕著で ATP 非存在下の約 20 倍に達した。ATP は逆転写酵素の基質結合部位とは異なる部位に結合し、基質特異性を変化させるアロステリック効果を持つ可能性が示唆された。(横山勝、佐藤裕徳)

2. HIV-1 の細胞侵入機構の研究

HIV-1 の細胞膜融合・侵入過程のラフト要求性を解析した。受容体非発現細胞である NP2 細胞に CD4-非依存性 HIV-1 Env 発現ベクターを導入し、cyclodextrin 30 分パルス処理した標的細胞（HeLa 細胞、NP2/CXCR4 陽性細胞）と混合培養し、24 時間後に形成されたシンシチウム数を測定した。LacZ を発現する CD4-非依存性 HIV-1 ベクターを構築し、同様に 標的細胞に感染させ、2 日後に X-Gal 染色により感染価を測定した。 HeLa 細胞では、標的細胞のシンシチウム形成は 90 %阻害された。NP2/CXCR4 細胞の 1 mM cyclodextrin 処理における CD4-非依存性 HIV-1 ベクターの感染価は 50 %低下した。CD4-非依存性 HIV-1 の感染効率と細胞膜融合効率に標的細胞のラフト構造が重要な役割を果たすことが示唆された。(久保嘉直[長崎大学・熱帯医学研究]、田中勇悦[琉球大学]、山本直樹[エイズ研究セ
ンタ]、佐藤裕徳)

3. HIVGp120、逆転写酵素活性型ヘテロダイマ‐、プロテア‐ゼ活性型ホモダイマ‐の立体構造研究カナダ CCG 社の統合計算化学システム MOE のホモロジ‐モデリングプログラムを用いて、HIV/SIV の野生株、変異株蛋白質の立体構造モデルの作製を進めた。鋳型は報

告された結晶構造及び NMR 構造を用いた。得られたモデルを用いて基質結合のシュミレ−ション等を行い、結果を報告済みの基質・蛋白質複合体結晶構造と比較することにより、分子モデルの精度を検証した。これまでに、糖鎖が付加した Gp120、逆転写酵素活性型ヘテロダイマ−、プロテア−ゼ活性型ホモダイマ−について、精度の高い分子モデルが得られた。今後精度検証を行いつつ、逆転写酵素の基質特異性調節機構の研究、薬剤耐性発現機構研究などに適用する。(横山勝、佐藤裕徳)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y.: Neutralizing
antibodies against oncogenic human papillomavirus (HPV) as a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. BBRC, 296:102-105, 2002.

2) Mori, S., Murakami, M., Takeuchi, T., Kozuka, T., and Kanda, T.: Rescue of AAV by antibody-induced Fas-mediated apoptosis from viral DNA integrated in HeLa chromosome. Virology, 301: 90-98, 2002.

3) Ishii, Y., Tanaka, K, and Kanda, T. : Mutational Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein L1: the Cysteines Affecting the Intermolecular Bonding and Structure of L1-Capsids. Virology, 308:128-136、2003.

4) Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Nakagawa, S., Kawana, K., Takeoka, A., Yaegashi, N.,
Iwasaka, T., Kanazawa, K., Taketani, Y., and Kanda, T. :IgG Antibodies to Human Papillomavirus 16, 52, 58 and 6 L1-Capsids: a Case-Control Study of Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan. J. Medical Virology, 69:441-446, 2003.

5) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Kimura S, Oka S. Isolation and
Molecular Characterization of a Nelfinavir (NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication. J. Virol. 77: 318-27, 2003.

2. 和文発表

1) 佐藤裕徳：耐性獲得とウイルスの進化。現代医療社 HIV 感染症−基礎と臨床。第 35 巻、p33-38、2003 年。

2) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳：SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割。日本エイズ学会誌。第 5 巻 2 号、p89-91、2003 年。

3)神田忠仁：パピローマウイルスによる発癌とその予防。医学のあゆみ。医歯薬出版社、2002 年。

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Matsuoka S., Sato H., Hachiya A., Tsuchiya K., Takebe Y., Kimura S, and Oka S. :Nelfinavir (NFV) can Potentiate the Infectivity and Replication of HIV-1 Whose Fitness is Otherwise Compromised upon the Acquisition of Gag p17 in Association with Protease Mutations Conferring NFV Resistance. (2002 年 9 月、米国、サンディエゴ市)

2) Kawana, K, Yasugi, T, Kawana, Y, Yoshikawa, H, Kanda, T, Taketani, Y：Safety and mmunogenicity of a Peptide Containing the Cross-Neutralization Epitope on HPV 16 L2 in Nasal Immunization of Adult Volunteers. 第 20 回 国際パピローマウイルス会議(2002 年 10 月、フランス共和国、パリ市)

2. 国内学会

1)Kanda, T: Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of HPV16 L1 Expression in HeLa.

感染と免疫フォーラム（2002 年 8 月、淡路島）
2)石井克幸、神田忠仁: ヒトパピローマウイルス 16 型キャプシド主構成蛋白質 L1 の変異解析。第 50 回日本ウイルス学会総会（2002 年 10 月、札幌）
3)富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳：SIV Gp120 糖鎖変異が蛋白質の立体構造、細胞内成熟、およびウイルスの増殖活性に及ぼす影響。第 50 回日本ウイルス学会総会（2002 年 10 月、札幌)
4)緒方敏彦、神田忠仁：アデノ随伴ウイルス組み込み領域(AAVS1)のエンハンサー遮断活性。分子生物学会（2002 年 12 月、横浜）
5)富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳：SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割。第 15 回日本エイズ学会シンポジウム（2002 年 11 月、名古屋)
6)海津雅彦、網康至、泉康之、佐藤裕徳、武部 豊、仲宗根正、染谷健二、北村勝彦、杤久保修、本多三男：エンベロープ V3 ループ領域の入れ替えが SHIV に与えた in vitro および in vivo におけるコレセプター使用への影響。第 15 回日本エイズ学会総会（2002 年 11 月、名古屋)
7)松田昌和、千葉智子、岡野愛子、守谷研二、富田康浩、佐藤裕徳、杉浦亙：相同組み換えによる患者由来 CRF01AE の再構築とその解析。第１５回日本エイズ学会総会（2002 年 11 月、名古屋)
8)松岡佐織、蜂谷敦子、土屋亮人、佐藤裕徳、岡慎一：NFV 存在下において感染効率の上昇が認められた薬剤耐性株の解析。第 15 回日本エイズ学会総会（2002 年 11 月、名古屋）

１６. 遺伝子資源室

室 長　　橋 本 雄 之

概　　要

ヒトゲノム解析プロジェクトの進展で、ヒトゲノム全塩基配列が利用可能となり、ヒト完全長 cDNA や EST の配列情報を基にヒト遺伝子２万以上が国際データベースに記載されている。さらに、ゲノム情報に基づく網羅的遺伝子機能解明が転写物、タンパク質レベルで進められているが、まだ、十分な展開を見せるに至っていない。従って、ゲノムの遺伝子部分の確定とその機能解明のために分離した完全長 cDNA クローンとその配列情報を遺伝子機能・発現制御等の研究の材料とすることは依然として必要である。

われわれはヒトに近いモデル動物としてのカニクイサルの完全長cDNAのカタログに基づいたヒトゲノム遺伝子領域解析をめざして、　これまでにカニクイザルの脳（大脳前頭、頭頂、後頭、側頭、小脳、脳幹、延髄)、精巣および肝臓から 90,000 以上の cDNA クローンを分離し、5'末端配列を決定してきた。このうち 5'末端配列が既知の登録配列に相同性を持たない 3,000 クローン強について全長配列を決定した。さらにカニクイザル cDNA の塩基配列とヒトゲノム塩基配列を比較することにより、ヒトゲノム配列中から対応する領域（転写領域相当）を抜き出し、仮想的なヒト cDNA 配列を構築した。ヒトゲノム配列から予測された遺伝子データベース（Ensemble）との比較の結果、全長配列決定クローンのうち約 500 は十分な長さの ORF を持ちながらもそのデータベースには存在しない、新規遺伝子候補であることが示された。さらに、精巣由来 cDNA ライブラリーより単離し、全長配列を決定した 400 クローンについてはｃ DNA マイクロアレイを作製して組織での発現解析を行い、精巣で特に発現の高い 75 遺伝子を見いだした。また、413個のヒト神経疾患関連遺伝子に対応する配列を検索し、54遺伝子について全長塩基配列を決定し、ヒトとの配列比較を行い、進化的に保存・変異しているアミノ酸と疾病成因に関わるアミノ酸との関連を探った。

チンパンジー材料が入手可能となったので、カニクイザルの脳 7 領域、心臓、腎臓、肝臓とチンパンジー大脳、小脳、肝臓、皮膚由来完全長 cDNA ライブラリーから単離したカニクイザル約４万に加えて、チンパンジー約１万クローンから得られた 5'端配列について、各々約４千、約２千種のヒト既知 mRNA に対応する配列を検索・選定した。１遺伝子につき複数のクローンが得られたカニクイザル 734 種、チンパンジー 226 種の遺伝子については、コンセンサス配列を決定し、精度の高い配列データベースを構築した。それらのうちから両種に共通の遺伝子 133 種を選び、5'端配列をヒト mRNA 配列と比較したところ、アミノ酸にしてヒト-カニクイザル 98.8%、ヒト-チンパンジー 99.7%という相同性が見られた。また、全体的に見れば、転写開始点の分布状態についても、類似が見られたが、約１割の遺伝子で分布状態の変化が見られた。これらの結果は今後の全長決定による配列比較により、遺伝子進化からヒトの進化を探ること、遺伝子の差異から疾病に成立要因を探ることの有用性を示した。こうした比較ゲノム手法によりヒトゲノム解析の一環としてのヒト遺伝子の機能推定に寄与するとともに、ヒト疾病関連遺伝子の同定から機能解明、さらにその疾病の成因解明そして診断、治療に結び付く研究の発展に資することが期待される。

(通常経費以外に交付された研究費)

＊厚生省ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「サル及びマウス脳完全長cDNAの分離とその細胞・個体での機能解明のための供給方法等に関する研究」
主任研究者（橋本）
＊厚生省ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「ウイルス性慢性肝疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析」分担　（亀岡）

研 究 業 績

１．遺伝子バンクとしての遺伝子育成・維持、供給業務

ヒト材料からでは分離しにくい cDNA を得ることと、ヒトに近いモデル動物としてのサル cDNA のヒト染色体へのマッピングと新規の機能解析を行い、ヒト相同遺伝子探索のためのカタログ化をめざすとともに、バンクを通じてＤＮＡマイクロアレイで供給するシステムを検討することを目的として、１）カニクイザル脳 各部の７組織（頭頂葉、側頭葉, 前頭葉、後頭葉、脳幹、小脳皮質、 延髄）および精巣について、オリゴキャップ法により作製した完全長 cDNA に富むライブラリー cDNA クローンを各々 5,000-１万クローンを分離し、96 穴プレートのアレイにして凍結保存した。自動 DNA シークエンサーを用いて上記の順に 11419, 8736, 13074, 5598, 3211, 11443, 5313 および 10701 の 計 70,000 個の 5'端部分塩基配列を決定し、ホモロジーサーチの自動プログラムを利用して、既知 DNA 配列との相同性や新規性等を調べ、その結果をデータベース化して、バンクから供給可能とした。 全クローンの５’端配列をもとにクラスタリングを行い、23,000 クラスターとその代表クローンの一覧表を作成した。
２）これらから新規 cDNA クローン約 3,000 を選び、その全長塩基配列を決定して、2,050 配列を公共データベースに登録した。そのうち、一定の ORF を持つ 823 クローンについて、そのコードするタンパク質想定などの解析を行った。それらにはヒトゲノムシークエンス上に配置され、新規のヒト遺伝子の存在を予測できるものがあり、ヒト特定染色体上に新規の遺伝子として登録できるもの約 500 クローンが見出された。また、ヒトゲノム中に見いだされた新規エキソン 455 のうち、43 % はコンピューター予測がされていなかった。
[橋本雄之、楠田 潤、高橋一朗、後藤英介、亀岡洋祐、田沼玲子、平田 誠]

2. カニクイザル脳由来新規完全長 cDNA の分離

これまでにカニクイザル脳（前頭、頭頂、後頭、側頭、小脳、脳幹、延髄)、精巣由来の cDNA ライブラリーから約 70,000 の 5'-端配列を解読し、約 3,000 の新規遺伝子候補の全長配列を決定した。全長配列を決定し、かつ十分な長さの ORF を持ったクローン 823 のうち、約 500 については、ヒトゲノムのアノテーションデータベース上で遺伝子領域として登録されておらず、ヒト新規遺伝子の候補として記載した。また、これらを利用してヒトゲノム配列中から、これまで記載のない新規遺伝子として転写される領域を予測した。さらに、精巣由来 cDNA ライブラリーより単離し、全長配列を決定した 400 クローンについてはｃ DNA マイクロアレイを作製して組織での発現解析を行い、精巣で特に発現の高い 75 クローンを識別した。
[長田直樹(東大院・理)、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹(東大院・新領域)、橋本雄之]

3. 新規遺伝子 casein kinase I alpha 2 の起原と発現解析

casein kinase I(CKI) alpha 1 は細胞増殖因子 beta-catenin をリン酸化することで beta-catenin の ubiqutin 化とプロテオソームによる分解を導き、初期胚の分化を調節し、細胞のガン化を防止すると考えられている。既発表のヒトおよびマウスゲノムの全塩基配列を検索するとヒトゲノムでは CKI alpha 1 遺伝子の他にもう１コピー相同性の高い遺伝子(CKI alpha 2)が存在し、マウスゲノムにはその遺伝子はないことが分かった。われわれは PCR 等の解析により (1)CKI alpha 2 が進化の過程で、新世界ザルから旧世界ザルが分岐した後、retrotransposition により出現したこと、(2)CKI alpha 1 が ubiqitous に発現するのに対し、CKI alpha 2 は精巣特異的に発現することを明らかにした。
[楠田潤、平田誠、田沼玲子、橋本雄之]

4. Three-Hybrid System を用いた Xist RNA に結合するタンパク質の Screening

Three-Hybrid System は酵母内で、RNA と結合するタンパクを Screening する System である。RNA bait として Xist RNA のくり返し配列の１つのユニットを用いた。10^5 の cDNA Library を Screening した結果、３４個の positive コロニーが得られた。これらは、１８種の異なったクローンであった。このうち、タンパクをコードするフレームのずれのない１２種のクローンを用い RNA dependency assay を行ったところ１個のクローンのみ陽性であった。このクローンは DEAD RNA ヘリカーゼであったが、bait RNA 特異的ではなく bait ベクターとも結合した。従って、求める RNA と特異的に結合するクローンは得られなかった。
[高橋 一朗、橋本 雄之]

5. ヘテロクロマチンタンパク(HP1)と Xist RNA との interaction について

HP1 タンパクは 22Kda のクロモドメイン(CD), クロモシャドウドメイン(CSD)とその２つのドメインをつなぐヒンジ領域の３つの部分で構成されている核蛋白質である。HP1 は、ヘテロクロマチン領域に極在し、このヘテロクロマチン化には RNA が関与しているという報

告がある。そこで、RNA がヘテロクロマチン化のひきがねと考えられている Xist RNA と HP1 の interaction について調べた。その結果 HP1 のヒンジ領域が、RNA と結合することが判明した。しかし、Xist RNA 特異的というわけではなかった。
[高橋　一朗、橋本　雄之]

6. MPO 遺伝子エキソン９における遺伝子変異

日本で解析された MPO 欠損症のうち完全欠損例 3 例のうち 2 例は点突然変異、Gly501Ser（mRNA；G1501A）と Arg499Cys（mRNA；C1495T）に起因し、いずれも MPO 遺伝子のエキソン 9 に位置している。日本人におけるエキソン 9 の変異頻度を解析するため 385 検体のゲノム DNA を解析したが、いずれのタイプの変異も検出することができなかった。新たな変異として non-synonymous で T1469C（Ile490Thr）および synonymous で G1434A, C1478A の３つの変異を検出した。これらサンプルはいずれもヘテロ接合体であり、この変異頻度から、これらがホモ接合体として出現する頻度は十万分の 0.25 となり、複数個の変異の存在を考慮すると本欠損症の頻度は数万分の１と考えられた。
[亀岡洋祐、Amanda Persad（生物活性物質部・南フロリダ大）、橋本雄之、鈴木和男（生物活性物質部）]

7.　ウイルス性慢性肝疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析

C 型肝炎ウイルス（HCV）に起因する慢性肝炎に対してはインターフェロン療法が中心となっており、この治療への応答の違いが、治療効果に大きく影響することが知られている。本研究ではインターフェロン誘発性の抗ウイルス作用を担う宿主要因を制御する因子がどのような遺伝子的（genomic）背景を持つかを解析することを目的とする。　本年度は、染色体 1 番および 2 番について、最近利用が可能になった SNP 検出プローブを用いて走査した。染色体 1 番先端から２５ MB 付近に位置する SNP では P 値は 0.0012 を示し、染色体 1 番の中では最も高い偏りを示した。2 番染色体には IL1 β局在部位に LOD 値の極大を検出し IL1 βのプロモーター領域が C 型肝炎発症と強く連鎖していることを確認した。
[亀岡洋祐、鈴木哲郎（ウイルス 2 部）、橋本雄之]

8.　マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング

川崎病罹患児糞便由来のカンジダアルカリ抽出物を用いてマウスに川崎病類似冠状動脈炎を作製した。冠状動脈炎発生率は、マウス系統により差異があり CBA/JN には冠状動脈炎抑制遺伝子が予想され、その染色体マッピングを行った。F1 マウスより N1 を得、病理組織学的に冠状動脈炎の有無を確認し、43 個のマイクロサテライトマーカーにより解析した。冠状動脈炎発生率は、N1：24/103 であり、N1 におけるヘテロ出現数を検討した結果、少なくとも 2 個の染色体上に比較的高い Odds 値を示す領域が確認され、この領域中に、抑制遺伝子がマッピングされる可能性が示唆された。
[亀岡洋祐、大原関利章（東邦大）、倉　文明（細菌部）、高橋　啓（東邦大）、山田仁美（東邦大）、鈴木和男（生物活性物質部）、直江史郎（東邦大）]

9. 化学薬剤による未成熟染色体凝縮法（PCC）の確立とその応用

染色体は放射線や環境変異原物質などにより損傷を受ける。遺伝子の損傷を評価するために染色体の解析は広く行われている方法であるが、損傷の度合いが大きくなると細胞周期の遅延あるいは停止により、分裂中期染色体を得ることが困難あるいは不可能となり、その結果遺伝子の損傷の解析に限界を与えていた。未成熟染色体凝縮法はこの限界を克服しうる技術であり、カリクリンなどの蛋白質脱リン酸化酵素阻害により効率良く PCC を誘発する方法を開発した。この方法により従来困難であった染色体の解析に広く利用されることとなった。
[後藤　英介]

10.　未成熟染色体凝縮法を利用した簡便な大被曝線量での生物学的線量計の開発

放射線による被曝事故における線量の推定には染色体の損傷を指標とする、生物学的線量計が広く使われている。しかしながら従来のコルセミドを用いた分裂中期染色体を得る方法では、被曝線量が高くなると細胞周期の停止から染色体を得ることが不可能であり、１０ Gy を超える被爆線量の算定は不可能であった。1996 年に未成熟染色体凝縮法を利用して４０ Gy まで被曝線量を推定する方法を発表したが、染色体ペインティング方を使うため、限られた施設でしか施行できなかった。より簡便に線量の推定を行うことを可能とするため、ギムザ染色と組み合わせた簡単で迅速なプロトコルの開発を行っている。
[後藤　英介、高倉　かほる（ICU）]

11. 放射線による DNA 損傷とその修復における DNA-PK の役割の解析

DNA-PK（DNA 依存性プロテインキナーゼ）は DNA 二重鎖切断（DSB）、特に放射線による DSB の修復に大きく関わっている酵素であるがその詳細は不明である。DNA-PK の阻害剤を用い放射線照射による染色体損傷とその修復の過程を未成熟染色体凝縮法を応用し染色体レベルでの解析を中心に細胞周期に及ぼす影響、生存率曲線などを行い解析している。
[後藤　英介、高倉かほる（ICU）]

発表業績一覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧 文 発 表

1）Nomiyama,H., Egami, K., Tanase, S., Miura, R., Hirakawa, H., Kuhara, S., Ogasawara, J., Morishita, S., Yoshie, O, Kusuda, J., and Hashimoto, K.: Comparative DNA sequence analysis of mouse and human CC chemokine gene clusters. J. Interferon & Cytokine Res. 23:37-45, 2003.

2）Jin,Y., Suzuki,H., Maegawa,S.,Endo,H., Sugano, S., Hashimoto,K.,Yasuda,K., and Inoue,K.: A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. EMBO Journal 22:905-912, 2003.

3）Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Suto Y, Hirai M, Terao K, Sugano S, Hashimoto K.: Cynomolgus monkey testicular cDNAs for discovery of novel human genes in the human genome sequence. BMC Genomics. 3(1):36.1-36.12, 2002.

4）Osada N, Kusuda J, Hirata M, Tanuma R, Hida M, Sugano S, Hirai M, Hashimoto K.: Search for genes positively selected during primate evolution by 5'-end-sequence screening of cynomolgus monkey cDNAs. Genomics 79(5):657-662, 2002.

5）Cox, L.J., Larman, M.G., Saunders, C.M., Hashimoto, K., Swann, K., & Lai, F.A.: Sperm PLC-zeta from human and cynomolgus monkeys triggers Ca2+ oscillations, activation and development of mouse oocytes. Reproduction 124(5):611-623, 2002.

6）Hu, J., Meng, Q., Roy, S.K., Raha, A., Hu, J., Zhang, J., Hashimoto, K., Kalvakolanu, D.V.: A novel transactivating factor that regulates IFN-gamma J. Biol. Chem. 277(33);30253-30263, 2002.

7）Takahashi,I., Kameoka, Y.,and Hashimoto,K.: MacroH2A1.2 binds the nuclear protein Spop Biophys. Biochem. Acta 1591,63-68, 2002.

8）Arai YT, Kuzmin IV, Kameoka Y, Botvinkin AD. New lyssavirus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat （Myotis blythi）, Kyrghyzstan. Emerg Infect Dis. 9(3):333-337, 2003.

9）Sugiyama H, Morishima Y, Kameoka Y, Kawanaka M. Polymerase chain reaction （PCR）-based molecular discrimination between Paragonimus westermani and P. miyazakii at the metacercarial stage. Mol Cell Probes. 16(3):231-236, 2002.

10）Ito S, Gotoh E, Ozawa S, and Yanagi K.: Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with ‘chromatin prematurely condensed’ during interphase and its newly replicated regions in particular. J Gen. Virol. 83:2377-2388, 2003.

II. 学 会 発 表

1. 国 際 学 会

1）Hida,M., Sakate,R., Hashimoto,K., Suzuki,Y., Hirai,M., Terao,K., Gojyobori,T. and Sugano,S.: Comparative analysis of 5'-regions of human and cynomolgus monkey mRNA using oligo-capped cDNA libraries. Human Genome Meeting, April 14-17, 2002, Shanghai, China

2）Hida,M., Sakate,R., Hashimoto, K., Osada,N., Hirai,M., Suzuki,Y.,and Sugano,S.: Monkey full-length cDNA libraries. Cold Spring Harbor Meeting on Genome Sequencing & Biology May 7-11, 2002, Cold Spring Harbor, NY, USA

3）Iwashita,S., Itoh,T., Oshima,K., Hashimoto,K. and Makalowski,W.: A transposable element contributes directly to the protein diversity: retroposon-mediated gene diversity that directly produces a novel type protein including the endonuclease domain of RTE-1. 12th International Workshopop on beyond the Identification of Transcribed Sequences: Functional,Evolutionary and Expression Analysis. October 25-28, 2002, Viena, Virginia, USA.

2. 国 内 学 会

1）長田直樹、橋本雄之:
カニクイザル完全長 cDNA の分離ーヒトゲノム配列での新規ヒト遺伝子同定および既知ヒト遺伝子との配列比較.
平成 13 年度哺乳動物遺伝学研究会、千歳, 2002 年 6 月
2） 坂手龍一、肥田宗友、菅野純夫、橋本雄之、早坂郁夫、平井百樹：
チンパンジー cDNA の 5 ’端配列の解析.
第 18 回 日本霊長類学会大会, 東京、2002 年 7 月
3）長田直樹、肥田宗友、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹、寺尾恵治、菅野純夫、橋本雄之：
カニクイザル cDNA ライブラリーを利用したヒト新規遺伝子の探索
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
4）亀岡 洋祐、Persad Amanda、小池 和彦、堤 武也、松浦知和、須藤 勉、井出 達也、 田中 一雄、佐田通夫、日野 邦彦、神代 正道、橋本 雄之、宮村 達夫、鈴木 哲朗:
C 型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索.
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
5)楠田潤、長田直樹、田沼玲子、平田誠、坂手龍一、肥田宗友、平井百樹、橋本雄之：
非ヒト霊長類における神経疾患関連遺伝子の解析.
第 25 回日本分子生物学会年会、横浜、2002 年 12 月
6）橋本雄之
カニクイザル完全長 cDNA ライブラリーを利用した新規ヒト遺伝子同定と既知ヒト遺伝子との配列比較.
国立遺伝学研究所研究集会「人類集団における遺伝子レベルとゲノムレベルにおける多様性」
2003 年 1 月 10 日、三島
7）亀岡洋祐、大原関利章、倉 文明、高橋 啓、山田仁美、鈴木和男、直江史郎：
マウス冠状動脈炎モデルにおける血管炎抑制遺伝子の染色体マッピング.
第 75 回日本生化学会大会 京都 平成 14 年 10 月
8）Amanda Persad、亀岡洋祐、鈴木和男：
MPO 完全欠損患者で見つかった ARG499CYS 変異.
第 8 回 MPO 研究会、宮崎、平成 14 年 10 月
９）Amanda S. Persad、亀岡洋祐、鈴木和男：
MPO 完全欠損患者で見つかった ARG499CYS 変異
第 25 回日本分子生物学会大会、横浜、平成 14 年 12 月
10）後藤 英介、加藤 宝光、高倉 かほる:
放射線による染色体損傷の修復における DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)の機能の解析.
理工学研究会、東京、2002 年 7 月
11）後藤 英介, 加藤 宝光、高倉 かほる:
放射線による染色体損傷の修復における DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)の機能の解析.
第 45 回日本放射線影響学会年会、仙台、2002 年９月

17．バイオセーフティ管理室

室　長　　杉　山　　和　良

概　　要

バイオセーフティ管理室は病原体等安全管理規程に基づき、感染研全体にわたる病原体等の安全な取り扱いに関する管理業務を担当している。また、病原体等の安全管理に関わるバイオセーフティについての研究及びバイオセーフティについての教育並びに情報提供を行っている。

病原体等安全管理規程に基づき、病原体等の取り扱いと保有、移動についての手続きの点検と記録管理及び病原体等取り扱い実験室の安全管理についてのプログラム立案と実施等の業務を行った。各部長の指揮監督のもとに各部の管轄するＢＳＬ2実験室における病原体等の取り扱いについての管理運営を行っている。一方、共同利用施設であるＢＳＬ３と４の実験室（指定実験室）の一元的な管理・運営はバイオセーフティ管理室が行っている。新規に病原体等を取扱う者に対してはバイオセーフティ講習会を行った。さらに、ＢＳＬ３実験室利用者へのバイオセーフティ教育及び緊急時対応訓練等を実施した。管理室では病原体等の安全管理の一環として、特別の健康管理としての職員等の保存血清採取と管理を行った。また、ＢＳＬ２実験室の生物学的安全キャビネット（安全キャビネット）の定期点検を実施した。また、特定病原体(HIV)取り扱い者に対する抗体測定を行った。病原体等の安全管理業務（バイオセーフティ講習会、実験室マニュアル等）の充実をはかった。

施設整備に関しては、村山分室６号棟のＢＳＬ３実験室の運用を平成１５年1月２４日より開始した。３号棟ＢＳＬ３実験室は1月１７日をもって運用を終了した。

研究業務としては各種消毒剤による炭疽菌芽胞及びウイルスの不活性化、安全キャビネットの給排気量の自動制御、実験室前室機能及びバイオハザード対策用の防護服の国際基準に関する研究等を行った。

第４５回米国バイオセーフティ学会総会に出席し、高度安全実験室の改修に関わる研究成果を発表するとともにバイオセーフティについての最新情報の収集を行った。また、本学会の期間中に開催された国際バイオセーフティワーキンググループの会議に日本からのメンバーとして参加し、各国共通の問題について討議した。また、病原体輸送についてのセミナー（シンガポール）に出席し最新情報の収集を行った。

感染研が受け入れている国際協力事業団(JICA)からの研修生に対し、バイオセーフティについての講義を行った。

バイオセーフティ管理室のホームページには、バイオセーフティ講習会の年間予定、バイオセーフティ講習会のプログラム案内、病原体等取扱申請方法、病原体等安全管理規程、関連学会日程及び日本バイオセーフティ学会活動などを掲載し情報の提供を行った。

Ⅰ．バイオセーフティ講習会

新規受講者を対象としたバイオセーフティ講習会は年間予定に従い２ヶ月に一度、６回実施した。また、外国人を対象としたバイオセーフティ講習会は随時行い、１３回開催した。ウイルス第二部、宮村達男部長がバイオセーフティ委員長を務め、バイオセーフティの考え方について講演した。

新規受講者講習会に引き続き試験を導入し講習の教育効果を高めるように努めた。また、バイオセーフティの実践として、「安全キャビネットの使い方」、「汎用消毒薬の基本と使い方」についての項目を設けており、安全キャビネットの正しい使用法及び消毒剤の適切な使い方について指導を行った。

外国人研修生対象として、感染研エイズ国際研修、ポリオ国際研修及びハンセン病国際研修時にバイオセーフティについての講義を行った。

1．バイオセーフティ講習会受講者数

1）平成 14 年度 新規講習会

実　施　日	受講者数
平成 14 年 4 月　3 日	75
6 月　4 日	40
8 月　2 日	29
10 月　2 日	28
12 月　3 日	28
平成 15 年 2 月　4 日	15
計	215　(人)

2）平成14年度 外国人対象講習会

実　施　日	受講者数
平成14年4月18日	3
5月14日	6
5月27日	1
6月12日	1
8月 6日	3
10月 8日	2
11月 6日	1
12月 6日	2
12月11日	1
12月18日	1
平成15年1月14日	1
2月 5日	1
3月11日	2
計	25(人)

2．平成14年度 利用者講習会月別受講者数

庁舎名 / 実施月	戸　山		村　山		筑　波	
	回数	人数	回数	人数	回数	人数
4 月	5	9	1	1	0	0
5 月	1	1	1	1	0	0
6 月	1	2	0	0	1	1
7 月	2	2	1	1	0	0
8 月	4	10	3	5	0	0
9 月	3	3	1	5	0	0
10 月	1	3	0	0	2	2
11 月	0	0	1	1	0	0
12 月	1	7	0	0	1	1
1 月	0	0	3	16	0	0
2 月	0	0	1	4	0	0
3 月	0	0	1	6	0	0
計	18	37	13	40	4	4

※　回数（講習会実施回数）

II．指定実験室の管理・運営および利用状況

ＢＳＬ３と４の実験室（指定実験室）の一元的な管理・運営を行った。戸山庁舎においては杉山及び高木弘隆研究官が、村山分室においては篠原克明主任研究官が、筑波支所においてはバイオセーフティ管理室併任の向井鐐三郎室長が担当した。甲原照子氏が非常勤職員として、１１月まで戸山指定実験室の管理・運営にあたった。12月からは６号棟ＢＳＬ３実験室の運用準備及び開始のため、村山指定実験室の管理・運営にあたった。引き続き、各指定実験室の日常の管理・運営、施設管理技術者の作業調整と監督、施設の定期総合点検の計画立案と実施及び指定実験室利用者に対する講習等の教育指導等を行った。

指定実験室の利用登録者と指定実験室利用者講習受講者を表に示した。

1．平成14年度 指定実験室（BSL3）登録者数

庁　　舎　　名	登録者数
戸山庁舎	121
村山分室	40
筑波霊長類センター	40
計	201

III．バイオセーフティ教育と情報提供

バイオセーフティ教育の一環として、大学、国立機関、民間機関その他でバイオセーフティに関わる業務関係者を対象とした講義を行った。国際協力の一環として、JICAのトルコ研修生を受け入れ、バイオセーフティについての教育を行った。結核研究所における外国人研修時にバイオセーフティについての講義も引き続き行った。

外部機関から病原体等安全管理規程についての問い合わせや分与依頼、病原体のバイオセーフティレベル分けや実験施設・設備、ＢＳＬ３の管理運営法及びバイオセーフティ委員会等についての問い合わせが引き続き多数寄せられ、これらの問い合わせについて資料提供並びに情報提供を行った。また、施設見学の受け入れと、これら見学者に対してバイオセーフティについての解説も多数行った。

病原体等の取り扱いにおける安全管理運営、安全装置及び実験施設設計等のバイオセーフティに関する学術研究の推進並びにバイオセーフティの普及を図り、バイオセーフティの向上発展に寄与することを目的とし、平成１４年1月１９日に設立された日本バイオセーフティ学会に参加し、１４年１１月に行われた総会・学術集会の運営にたずさわった。

研　究　業　績

Ⅰ．バイオセーフティに関する研究

1．微生物実験における密閉空間内の相対湿度調整方法の検討

微生物の繁殖および低減には環境因子として温度と共に、周囲の相対湿度が影響する。通常環境条件による影響を実験により評価する場合、温度に関しては恒温槽で容易に可能であるが、相対湿度は恒温恒湿槽の精度やコスト、および試験中でのコンタミネーションの問題より容易ではない。安定した相対湿度を作り出す方法として、各種無機飽和塩溶液を密閉チャンバー内に入れ、相対湿度を調節する方法が考えられる。そこで無機飽和塩の種類の違いによりチャンバー内の相対湿度を測定し、微生物実験への適用を検討した。

その結果、以下の無機飽和塩溶液で、それぞれの相対湿度(20℃)で安定することを確認し、微生物実験への適用できる感触を得た。

KNO_3：95%RH、KCl：90%RH、$BaCl_2$：81%RH、
$Mg(NO_3)_2$：53%RH、$MgCl_2$：33%RH。

［浜崎　浩、篠原克明、狩野文雄］

2．安全キャビネットの給排気量の自動維持機構の検証

クラス II 安全キャビネットによる作業者保護には、流入開口部に正常なエアカーテンを形成することが重要であり、そのためには給排気空気量を適性量に維持することが必要である。そこで、給排気空気量モニター機能とコントロールシステムを搭載したクラス II 安全キャビネットを開発し、その性能を検証した。その結果、当該安全キャビネットは、BSL3 実験室内の圧力変動や並列接続された他の安全キャビネットの発停の影響を受けにくいことが確認された。

［篠原克明、深見　哲、杉山和良］

3．バイオハザード対策施設における前室機能に関する研究

BSL3 実験施設の前室の機能向上をめざして、差圧調整ダンパによる気流制御について研究を行っている。フロート式ダンパは、スライド式の差圧調整ダンパより開口面積を大きく取れるというメリットがある。そこで、フロート式とスライド式差圧調整ダンパの換気効率に与える相違を数値シミュレーションにより検討した。その結果、前室給気-更衣室排気の換気方式においては、壁上方に取り付けたスライド式ダンパに比べてドアに組み込んだフロート式ダンパの方が、部屋の換気効率を良好にできることが判明した。

［篠原克明、杉山和良］

4．バイオハザード対策用の防護服の国際基準に関する検討

バイオハザード対策専用の防護服の基準に関しては、現在 ISO 基準が策定されつつある。現在までのところ、素材の微生物浸透防護性能などについて ISO 基準とすべき数件の試験方法が提案されている。そこで、ISO 基準化を踏まえ、防護服素材に関する要求性能や試験方法などについて、国内外の状況や科学的根拠について調査、検討を行なっている。

［篠原克明、高木弘隆、杉山和良］

5．各種消毒剤による炭疽菌芽胞の迅速的不活性化に関する研究

バイオテロを想定した迅速かつ有効な消毒方法を検討すべく、そのモデルとして環境抵抗性の強い炭疽菌芽胞に対する各種消毒剤の不活性化効果について検討した。炭疽菌芽胞はパスツールⅠ苗株及び 34F2 株より調製した成熟芽胞を使用した。消毒剤は芽胞に対して不活性化効果があるとされ、一般環境下でも使用可能と考えられる過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素(安定化)の 3 種類についてその濃度と経時的不活性化について検討を行った。

その結果両菌株 10^6CFU以上の不活性化は、過酢酸では 0.05%(過酢酸濃度として)以上で 10 分、次亜塩素酸ナトリウムでは 0.1%、20 分、希硫酸で活性化した二酸化塩素では 0.05%、10 分で達成されることが確認された。また 0.07% 過酢酸及び 0.05%活性型二酸化塩素による環境分離 Bacillus sp.2 株の成熟芽胞に対する不活性化効果もみたところ、過酢酸ではその 1 株において 40-60 分作用後も 3log10 の減少にとどまり株間での不活性化に大きな差違が認められたが、活性型二酸化塩素では 30 分以上作用させることで両株とも 10^6CFU以上が不活性化された。

［高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、山田章雄(獣医科学部)］

※なお本研究は厚生労働科学特別研究事業「バイオテロに使用される可能性の高い細菌の迅速的診断法及び消毒法に関する研究」(H14-特別-29)により実施したものである。

6．塩素系消毒剤によるカリシウイルスの抵抗性に関する研究

capsid virusの消毒剤不活性化効果を検討してゆく中で、環境水へのヒト由来Norwalk-like virusの流出が示唆され、排水処理で行われる塩素消毒の適性について、ネコカリシウイルス(FCV)を用いた塩素系消毒剤抵抗性に関する検討を行った。FCVは 弱毒ワクチン株及び臨床分離されたもの計 8 株について 10^6〜10^8PFU/0.1mlに調製し、有効塩素 50ppmの次亜塩素酸ナトリウムに対する 10 分間での不活性化を経時的にトレースした。

その結果5株では3分で速やかに6log10～7log10の不活性化効果が認められたが、ワクチン株を含む3株で5分後に10^2～10^3PFUの残存がみられ、うち1株では10分後でも10^2PFUの残存が確認された。これらについては引き続き、実際的な低塩素濃度での抵抗性を確認すると共に、こうした抵抗性株の出現頻度、分子生物学的解析を試みている。

［高木弘隆、篠原克明、杉山和良］

7．各種消毒剤によるコロナウイルスの不活性化に関する研究

SARSコロナウイルスの世界的なoutbreakにより、その感染及び汚染防止対策が急務となった。そこでこの一環として同属のコロナウイルスを用いた各種消毒剤によるコロナウイルスの不活性化効果について検討を行った。供試ウイルスはブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)を用い、消毒剤はハロゲン系に次亜塩素酸ナトリウム及びポビドンヨード(うがい用)、アルコール系としてエタノール、界面活性剤として、Nonidet P-40、Triton X-100及び両性界面活性剤を使用し、2分間の作用による各々の不活性化効果をみた。なおこれまで界面活性剤は細胞毒性が強くこれを回避するには大量の希釈を行う必要があり、高力価ウイルスの不活性化評価が困難であったが、今回界面活性剤除去用ビーズを用いてウイルス力価を損なうことなく細胞毒性を軽減することができた。

その結果TGEV$10^6$$TCID_{50}$を不活性化するためにはポビドンヨード0.5%、Nonidet P-40及びTriton X-100 0.1%以上、両性界面活性剤0.05%以上で可能であることが認められた。

エタノールは50%以上でTGEV $3\times10^3$$TCID_{50}$が減少し、次亜塩素酸ナトリウムでは500ppmでTGEV $8\times10^4$$TCID_{50}$が減少した。消毒剤不活性化効果試験の手法が確立できたとともに界面活性成分により有効な不活性化が行われることが示唆された。今後マウス肝炎ウイルス(MHV)及びSARSコロナウイルスに対して同様の試験を行ってゆく。

［高木弘隆、篠原克明、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、森川茂(ウイルスⅠ部)］

Ⅱ．その他

1．エイズウイルスに関する研究

V-1 clade Bとclade Eキメラウイルスの作製

SHIV-C2/1 KS661をベースとしてHIV-1 clade Bとclade EのC2-V3領域を組み込んだキメラウイルスを作製した。clade Eの*env*領域については、塩基配列の異なるクローンを数種類作製し、その性状について解析中である。

［高橋栄治、篠原克明（バイオセーフティ管理室)、網康至、須崎百合子（動物管理室)、阪井弘治、仲宗根正、本多三男（エイズ研究センター)］

2．ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)抗体測定ELISAの開発と動物血清中抗体価評価システム構築に関する研究

TBEVがイヌに感染した場合、発症せずウイルス血症を起こすため、感染後には高い抗体価を示す。関東近県でとくに郊外で飼われているイヌを対象とし、TBEVの感染実態を調査すべく、抗体価測定ELISAの開発と抗体価測定に関わる課題について検討した。

TBEV抗原としてはウイルスⅠ部所有のロシア春夏脳炎ウイルス(RSSEV)を使用し、これを改変無血清培地によりVERO9013細胞で培養し10^8PFU/mlのウイルス液を得た。ホルマリンにて不活性化し、透析・限外濾過に濃縮したものを固相化抗原としてELISAプレートに固相化した。北大より供与いただいた中和抗体陽性及び陰性イヌ血清、関東近県の動物病院から供与いただいたイヌ血清・血漿を用いてELISAを実施した。また同時に不活性化日本脳炎ウイルス(JEV)固相化プレートを作成し、同様にELISAを実施した。

その結果抗TBEV陽性及び陰性血清による暫定基準により、関東近県イヌ血清9検体中2検体で推定陽性となったが、これについて中和試験を行ったところ1:20未満であった。またこの2検体のJEV抗原に対する反応性は弱かった。これについてはIgM capture-ELISAによる他のフラビウイルスに対する反応性について引き続き検討している。

［高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、高崎智彦(ウイルスⅠ部)］

3．ゲノムDNAのdot blot hybridizationによる*Listeria monocytogenes*の特異的検出に関する研究

4種類のPCR産物をprobeとした*L.monocytogenes*遺伝子の特異的検出を昨年に引き続き検討した。Biotin標識probeで問題となっていた非特異反応は菌体成分とAvidinが非特異的結合することが判明、DNA抽出方法を改良することによってこの非特異反応を軽減することが可能となったが、DIG標識probeと比較した場合特異性の面ではやや劣っていた。そこで改良DNA抽出法とDIG標識probeによる検出感度及び*L.monocytogenes*以外の*Listeria* spp.(5菌種17株)遺伝子に対する反応性をみたところ、検出感度は約10^5copies/spotとほぼ理論値に近く、特異性についてはLM1/LM2およびmonoA/monoBの各probeで非特異反応がみられたが、prfA1/2及びLM1/HLYP-9の各probeでは*Listeria* spp.に対する反応は全くみられなかった。よって寒天培地上のコロニーの直接鑑別など同時多検体処理には大いに有効であると考える。

［高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、井上智(獣医科学部)、村上裕之、丸山務（麻布大学)］

4．環境河川中からの Norwalk-like virus 検出及び分子疫学的解析

2000 年から同一河川における継続調査を行い、2001 年 12 月で 2 年間をもって調査を終了した。

2001 年 6 月から 12 月にかけては上・中・下流及び河口汽水域すべてで NLV 特異遺伝子は検出されなかった。2001 年夏期は降雨量が少なく河川水量も減少しており、こうした自然条件が少なからず影響しているものと思われる。

また 2001 年 1 月から 5 月にかけて検出された NLV pol 遺伝子の一部について direct sequence を試みたところ、すべて G2 グループではあったが、月ごとにその homology は大きく違った。今後さらに広い領域での sequence を行い、より詳細な分子解析をする予定である。

［高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、牛島廣治(東京大学)］

発表業績一覧

Ⅰ． 誌上発表

1．欧文発表

1) Shinohara,K., Takagi,H., Fujii,H., Asano,T., Kitabayashi, A., Sugiyama,K. : Time course study of inflow velocity in Biological Safety Cabinet in National Institute of Infectious Diseases Japan. Applied Biosafety, 7 (1), 22-23, 2002.

2) Shinohara, K., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kurata, T. Renovation of BSL-4 Laboratory. Applied Biosafety, 7 (4), 217, 2002.

3) Shinohara, K., Yamanaka, Y., Kogure, K., Ohkubo, T., Koba, Y., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kitabayashi, A. The exhaust airflow stabilization System for multiple class Ⅱ type B Biological Safety Cabinets in BSL-3 laboratory. Applied Biosafety, 7 (4), 219, 2002.

2．和文発表

1) 杉山和良：2003 腎症候性出血熱､動物由来感染症その診断と対策. 真興交易 (株) 医書出版部 92-96,2003

2) 篠原克明：バイオハザードとバイオセーフティ．セイフティ・ダイジェスト（Safety & Health Digest）Vol.48. No.7. 24-33. 2002. 7月.社団法人 日本保安用品協会（JSAA）

Ⅱ． 学会発表

1．国際学会

1) Shinohara, K., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kurata, T. Renovation of BSL-4 Laboratory. American Biological Safety Association, 45th Annual Biological Safety Conference, October 20-23, 2002, San Francisco, USA.

2) Shinohara, K., Yamanaka, Y., Kogure, K., Ohkubo, T., Koba, Y., Takagi, H., Sugiyama, K. and Kitabayashi, A. The exhaust airflow stabilization system for multiple class II type B Biological Safety Cabinets in BSL-3 laboratory. American Biological Safety Association, 45th Annual Biological Safety Conference, October 20-23, 2002, San Francisco, USA.

2．国内学会

1）大谷光幸、大野貴志、中村慎二、篠原克明：フロート式差圧ダンパによる室圧制御と室内気流性状の検討。第 20 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会、2002 年 4 月、東京。

2）篠原克明、坂本道子、永江啓夫、杉浦彰彦、清崎俊夫、三好哲夫、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良：安全キャビネット及び実験室内ガス滅菌時のガス濃度推移。日本防菌防黴学会　第 29 回年次大会、2002 年 5 月、東京。

3）榎瀬良美、山本俊郎、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、三浦智行、喜多正和、速水正憲：弱毒 SHIV 感染免疫ザルにおける早期の強毒ウイルス攻撃接種に対する防御効果。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2002 年 10 月、札幌。

4）篠原克明、坂本道子、永江啓夫、杉浦彰彦、清崎俊夫、三好哲夫、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良：ホルムアルデヒドガス滅菌時のガス濃度モニタリング。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。

5）山中祐二、大久保孝雄、小暮一俊、木場裕介、北林厚生、小野恵一、本間圭一、篠原克明、杉山和良：バイオハザード対策用クラス II タイプ B 安全キャビネットの排気安定化システムについて。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。

6）本多三男、仲宗根正、松尾和浩、網康至、泉康之、染谷健二、滝沢万里、浜野隆一、海津雅彦、川原守、原隆志、吉野直人、篠原克明、佐々木裕子、高橋栄治、阪井弘治、堀端重男、兼清優、浜岳牧子、山崎修道、山本直樹：HIV ワクチンの実用化に向けて：サルからヒトへ。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年 11 月、名古屋。

7）喜多正和、榎瀬良美、宇賀神秀樹、横山京子、鈴木元、桑田岳夫、三浦智行、阪井弘治、高橋栄治、篠原克明、山本俊郎、今西二郎、速水正憲：IFN-γ遺伝子組込み弱毒 SHIV ワクチン効果。第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会、2002 年 11 月、名古屋。

8）高木弘隆、村上裕之、井上智、丸山務、杉山和良：PCR 産物を probe としたバクテリアゲノム dot blot hybridization による *L.monocytogenes* の特異的検出の検討。第 23 回 日本食品微生物学会学術総会、2002 年 9 月、東京

9）杉山和良：病原体の輸送。第 2 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2002 年 11 月、東京。

１８．放射能管理室

室　長　　前　川　秀　彰

概　　要

放射性同位元素等の安全取り扱いに常々取り組んでおり、今年度も特に問題はなかった。職員各位の一層の注意を望む。講習会は下表の通り新規（６回）臨時（1回）、外国語（６回）及び継続（４回）に分けてそれぞれ実施された。受講者は新規日本語　１１５名、外国語１０名、継続　３９４名であった。新規受講者に対する試験は全員１回で合格した。継続について、今年度は前川、土田が行い、継続者に対して廃棄物の処理及び科学技術庁の通達等を中心に講習した。

戸山庁舎主任者は前川室長と放射能管理室併任に引続きなった健康栄養研江崎部長がなり、村山分室の主任者は、ウイルス第2部の武田室長にお願いした。村山分室管理室業務補佐として引き続き菅原氏が在籍した。保健医療科学院花田部長が新たに併任となった。農工大の時田氏、江尻氏が企業に進み、天竺桂氏は博士課程に進学した。農工大山内氏、日大の小林氏、溝呂木氏が在籍した。東大の藤本氏は後半感染研特別研究員として在籍した。アリゾナ大のJennifer Gardettoは、BRAVO! Programで短期間滞在した。日大の及川氏、佐藤氏が3月に入所した。昨年に引き続きそれぞれの研究が進められ以下の成果が得られた。

Ⅰ．放射性同位元素使用状況

１．戸山研究庁舎（健康栄養研分も含む）

（単位　kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
^{3}H	1484350	490250	304501
^{14}C	289346	91760	45241
^{32}P	1512910	5248450	4538450
^{33}P	0	0	0
^{35}S	1811500	3515000	4272000
^{51}Cr	259000	666000	851000
^{125}I	501535	70300	299885

保管量合計１群換算42,049.064kBq

２．村山分室

（単位　kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
^{3}H	542390	148000	154760
^{14}C	2016	31450	4810
^{32}P	11240	434750	380315
^{33}P	0	64750	25590
^{35}S	40000	903000	727020
^{51}Cr	27750	0	27750
^{125}I	0	0	0

保管量合計１群換算　3772.436kBq

Ⅱ．従事者登録数

１．戸山庁舎　　396名
(健康栄養研、保健医療科学院分も含む)

２．村山分室　　106名

Ⅲ．講習会受講者数

１．通常講習会

日時	受講者数（内継続）	備考
平成13年 4月 8日	53	新規
5月 8日	152	継続
5月 9日	140	継続
5月13日	69	継続
6月 7日	16(5)	新規
6月14日	16	継続
7月 8日	1	臨時
8月 1日	18(4)	新規
10月 1日	8(7)	新規
12月 2日	12(1)	新規
平成14年 2月 3日	7	新規
合計	509	

(健康栄養研､保健医療科学院を含む)

２．外国語講習会

日時	受講者数	備考
平成13年 5月10日	2	新規
6月11日	2	新規
9月19日	1	新規
10月25日	1	新規
12月18日	2	新規
3月10日	2	新規
合計	10	

研究業績

放射性同位元素等を使用した生物学利用の研究

Ⅰ．新たな導入ベクターに関する研究

１．遺伝子導入系の開発

新たな遺伝子治療ベクターに利用できることを前提にレトロトランスポゾン及びレトロポゾンを使った導入系を開発し解析している。

（１） RNA介在型転位因子様配列の挿入機構の解析。

レトロトランスポゾンＲ２Ｂmをテストケースとしてゲノムへの組み込み機構を解析しているが、ORF1、ORF2両方を持つ非LTR型レトロトランスポゾンR1Bmをすでに開発した系へ導入し解析した。３’端は部位特異的に挿入していることが確かめられた。しかし、R1Bmの場合はそれ以外の部位にも挿入が見られておりその場合は3‘端から欠失が見られた。

[藤本（東大）、蛭川、松浦（ウイルス第２部）、橋戸、土田、高田、小林（東大）、前川]

（２）ＢＭＣ1導入ウイルスの構築

非LTR型レトロトランスポゾンBMC1のORF1、およびORF2を持ったクローンを作成した。R2Bmで構築した解析形に導入しベクターとしての有用性を検証する。

[藤本（東大）、蛭川、松浦（ウイルス２部）、橋戸、土田、高田、小林（東大）、前川]

（３）転移因子マリナー様配列の水平伝播ついての考察

沖縄を含む日本の昆虫(鱗翅目、鞘翅目)、珊瑚などに存在するマリナー様配列は、近年水平伝播したと考えられる結果を得ていたが、データベースのコンセンサス配列と比較することにより鱗翅目においていくつものマリナーのグループが存在することが判った。何が水平伝播にかかわっているか明らかにすることは、無害な導入ベクター開発につながると期待できる。

[中島(琉球大)、藤本（東大）、橋戸、高田、土田、前川]

Ⅱ．染色体の構造と機能に関する研究

１．サブテロメリック領域の構造解析

（１）GCリッチ縦列反復配列の塩基配列の決定と解析

Not Ⅰ で消化して得られた約2kbの縦列重複配列ＴＲＥＳＴ１関連配列を、従来の方法とは異なる、機械的な切断方法によってゲノムDNAを切断し、プラスミドに組み込むという方法で作成した染色体末端を主に含むゲノムライブラリーから単離し、解析した。サブテロメリック領域を構成すると考えられるクローンを得、分類したところ、TRASファミリーやSARTファミリー以外にTREST1あるいはSTERT1に属するものがサブテロメリック領域に存在することが明らかになった。更に物理的切断による断片を平滑末端にし組み込むことで新たなサブテロメリック領域のクローンを単離し解析を進めている。

[橋戸、高田、前川]

（２）鱗翅目以外のサブテロメリック領域の解析

ショウジョウバエではテロメリック領域はカイコで知られているTTAGGの繰返し配列が存在せず。HeT-AやTARTなどのレトロトランスポゾンが存在し末端保護を行っていると考えられている。哺乳類では、良く知られているTTAGGGの配列を持つテロメリック・リピートが存在する。しかし、それ以外の配列についてはあまりよく判っていない。そこでサブテロメリック領域をカイコで行ったと同様の方法で単離し、その構造解析を昨年に引き続き進めている。

[橋戸、高田、前川]

III． 放射線感受性部位の高次構造の解析

１．放射線によるＤＮＡ二本鎖切断検出のためのPCR法の利用

PCR法によるDNA二本鎖切断検出法が明らかにDNAの二本鎖切断を検出していることをプラスミドpBR322をモデルにして証明した。既に報告されているpBR322を使用して放射線照射により閉環状と開環状の変異度合いを電気泳動法の結果とあうことも確認した。シミュレーション法と比較した結果閉環状条件での$p=0.2$のときに直鎖状のDNAに対するPCR法の結果が一致した。今後シミュレーション計算のパラメーターと実験結果のすり合わせを行う予定である。[山内(農工大)、藤本(東大)、 橋戸、斎藤（原研東海）、渡辺（原研東海）、土田、高田、普後(農工大)、前川]

２．放射線照射DNAのPCR法による解析はDNAの高次構造の解析に利用できる

プラスミドpBR322を使用した放射線照射切断の解析は、閉環状DNAに対して行われるとその構造に依存してPCR増幅の程度が変化する。この方法を利用して高次構造解析が可能であることが確証された。閉環状DNAはPCR反応が進みにくい構造であると考えるとシミュレーションのパターンとあうことから、この考えが妥当であると判断している。 [山内(農工大)、藤本(東大)、斎藤（原研東海）、渡辺（原研東海）、橋戸、土田、高田、普後(農工大)、前川]

３．放射線照射ゲノムDNAへのPCR法の応用

電気泳動法が利用できないゲノムDNAに対してこのPCR法を応用することを試みた。ゲノムDNAに対する放射線切断の検出は、直鎖状プラスミドと同様に可能であった。閉環状構造のプラスミドで見られたPCR反応の未照射DNAに対して20～50%の増幅現象は観察されなかった。この理由としては、用いたDNAの長さが約20kbと短いためと考えている。[溝呂木（日大）、山内(農工大)、藤本(東大)、橋戸、土田、高田、福原(日大)、岩野(日大)、前川]

Ⅴ．脂質輸送機構の解析

１．カロチノイド結合たんぱく質（CBP）遺伝子の発現解析

CBP遺伝子のｃDNAクローンをプローブにI遺伝子Y遺伝子関連突然変異系統の絹糸腺から抽出したRNAに対してノーザンブロット解析を行った。この結果CBP遺伝子はY遺伝子とリンクしていることが明らかとなった。CBPが発現していない白い繭を作る系統ではCBPmRNAの発現量が10分の1くらいに落ちていることが観察された。
[小林（日大）、藤井(九大)、前川、橋戸、高田、福原（日大）、岩野（日大）、土田]

２．CBP遺伝子の解析

サザーンブロット法を利用してI遺伝子Y遺伝子関連突然変異系統のゲノムDNAの解析を行った。個体内、系統間においてかなりの多型が認められた。しかし、遺伝子そのものが欠失している系統は無かった。それぞれの突然変異系統の絹糸腺から抽出したRNAにたいしてRT-PCR法によりｃDNAを合成し塩基配列を決定したところ、ORF領域には系統間で差がなかった。
[小林（日大）、藤井(九大)、前川、橋戸、高田、福原（日大）、岩野（日大）、土田]

３．CBPタンパク質の組織内分布についての解析

免疫ブロット法によりY遺伝子関連突然変異体の中腸内の分布を調べた。優性Y遺伝子を持つ系統の中腸上皮細胞の縦耗内に局在することが確認されたので、このY遺伝子がCBP遺伝子に関連していることが強く示唆された。
[J.Gardetto(アリゾナ大)、小林（日大）、杉山（寄生動物）、藤井(九大)、前川、橋戸、高田、土田]

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

1) 欧文

1. H. Tabunoki, H. Sugiyama, Y. Tanaka, H. Fujii, Y. Banno, Z. E. Jouni, M. Kobayashi, R. Sato, H. Maekawa and K. Tsuchida: Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland of *Bombyx mori* larvae. J. Biol. Chem., 277, 32133-32140 (2002)

2. Y. Nakajima, H.Fujimoto, T.Negishi, K.Hashido, T.Shiino, K.Tsuchida, M.Hidaka, N.Takada and H.Maekawa:Possible horizontal transfer of mariner-like sequences into some invertebrates including lepidopteran insects, a grasshopper and a coral. J. Insect Biotech. Sericol., 71, 109-121 (2002)

Ⅱ．学会発表

放射能管理室

1)　国際学会

1. H.Fujimoto, Y.Hirukawa, H.Tani, Y.Matsuura, K.Hashido, K.,Tsuchda, N.Takada, M.Kobayashi and H.,Maekawa: Enhanced TPRT activity byh 3' end modification of retrotransposon, R2Bm. Fourth International symposium on Molecular Insect Science, May Tucson, 2002.

2. Z.E.Jouni, N.Takada, J.Gazard, H. Maekawa, M.A.Wells and K.Tsuchida: Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles:role of the lipid transfer particle. Fourth International symposium on Molecular Insect Science, May Tucson, 2002.

3. K.Tsuchida, C.Katagiri, Y.Tanaka, Z.Jouni, M.Kobayashi and H.Maekawa: Lipids transport in the *Bombyx mori* mutants of impaired carotenoid transport. Fourth International symposium on Molecular Insect Science, May Tucson, 2002.

4．K.Tsuchida, J.Gardetto, Y.Kobayashi, Z.E.Jouni and H.Maekawa: Carotenoid binding protein in the midgut of *Bombyx mori* may be involved in absorption of carotenoid. The 50the annual meeting of the entomological society of America. Nov. 2002, Florida USA.

5. K.Tsuchida, H.Tabunoki, H.Sugiyama, Z.E.Jouni, C.Katagiri, Y.Tanaka, M.Kobayashi and H.Maekawa: Carotenoid binding protein is a new member of the START protein family with unique features of binding carotenoid. 43rd International conference on the bioscience of lipids. Sep. 2002, Graz Austria.

6. H. Maekawa, Y. Ejiri, J.Nobata, K. Mita, H.Fujimoto, E. Yamauchi, M. Mizorogi, K. Hashido, K. Tsuchida, M. Kobayashi and N. Takada: Ribosomal DNA Gene Cluster and Retrotransposon in *Bombyx mori*. The 1st International workshop of lepidoptera genomics. Sep. 2002, Tsukuba Japan.

7. Y.Nakajima, H.Fujimoto, T.Negishi, K.Hashido, T.Shiino, K.Tsuchida, M.Hidaka, N.Takada and H.Maekawa: Possible horizontal transfer of mariner-like sequences into some inbertebrates incuding lepidopteran insects, a grasshopper and a coral inhabiting Japan islands. The 1st International workshop of lepidoptera genomics. Sep. 2002, Tsukuba Japan.

8. H. Maekawa, Y. Ejiri, J.Nobata, K. Mita, H.Fujimoto, E. Yamauchi, M. Mizorogi, K. Hashido, K. Tsuchida, and N. Takada: Ribosomal RNA Cluster in *Bombyx mori*. Joint meetings of Korean and Japanese Societies of Sericultural Science, Nov. 2002, Swon Korea.

9. Y. Nakajima, H.Fujimoto, T.Negishi, K.Hashido, T.Shiino, K.Tsuchida, M.Hidaka, N.Takada, M.Kobayashi and H.Maekawa: One mariner-like sequence classified to cecropia subfamily might be horizontally transferred very recently into invertebrates including lepidopteran insects inhabiting Japan islands. "Transposition and other genome rearrangements" Keystone symposia, Feb. 2003, Santa Fe USA.

10. E.Yamauchi, M.Mizoroki, H.Fujimoto, R.Watanabe, K.Saito, M.Murakami, K.Hashido, K.Tsuchida, N.Takada, H.Fugo and H.Maekawa: Comparative analysis of DNA aberrated by irradiation using PCR and simulation methods. International Symosium on Innovative Technology for Radiation Risk Study 2003. March, 2003, Tokyo Japan.

2) 国内学会

1．山内恵美子、藤本浩文、江尻由希、渡辺立子、斎藤公明、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、普後一、前川秀彰：PCR 法を用いた放射線によるプラスミド及びゲノム DNA 切断頻度の検出と感受性部位の探索。第 45 回放射線影響学会シンポジウム、2002 年 9 月、仙台

2．橋戸和夫、前川秀彰：カイコ染色体と人染色体におけるサブテロメア領域の構造解析と比較。第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜

3．中島裕美子、藤本浩文、中村隆、伴野豊、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：*Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列の比較によるカイコとクワコの分岐についての考察。第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜

4．藤本浩文、山内恵美子、蛭川由紀子、橋戸和夫、高田直子、土田耕三、小林正彦、前川秀彰：ウイルスベクターを用いた転移因子様配列の宿主細胞ゲノムへの挿入機構の解析。第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜

5．山内恵美子、溝呂木舞、藤本浩文、渡辺立子、斎藤公明、村上正弘、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、普後一、前川秀彰：放射線照射プラスミドの切断解析。第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜

6．溝呂木舞、山内恵美子、藤本浩文、渡辺立子、斎藤公明、橋戸和夫、土田耕三、前川秀彰：PCR 法を利用した放射線照射ゲノム DNA の切断解析。　第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜

7．土田耕三、J.Gardetto（アリゾナ大）、小林悠（日大）、天竺桂弘子（農工大）、東政明（鳥取大）、杉山弘（寄生動物）、J．Zeina（アリゾナ大）、前川秀彰、岩野秀俊（日大）、藤井博（九大）、伴野豊（九大）：中腸と絹糸腺におけるカロチノイド結合タンパク質（CBP）の組織内分布。第 73 回日本蚕糸学会、2003 年 3 月、東京

8．山内恵美子、溝呂木舞、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕

三、高田直子、前川秀彰：高線量γ線照射カイコの影響評価。第 73 回日本蚕糸学会、2003 年 3 月、東京

9．中島裕美子、藤本浩文、中村隆、伴野豊、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：*Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列の比較によるカイコとクワコの分岐についての考察。第 73 回日本蚕糸学会、2003 年 3 月、東京

10．溝呂木舞、山内恵美子、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、岩野秀俊、前川秀彰：PCR 法による放射線照射ゲノム DNA の切断頻度の検出。第 73 回日本蚕糸学会、2003 年 3 月、東京

11．山内恵美子、溝呂木舞、藤本浩文、渡辺立子、斎藤公明、村上正弘、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、普後一、前川秀彰：DNA 構造解析への利用を目的とした、リアルタイム PCR による DNA 切断頻度の検出。第 73 回日本蚕糸学会、2003 年 3 月、東京

19. 動　物　管　理　室

室長　　浅野敏彦

概　要

動物実験施設利用者の協力により、戸山庁舎、村山分室ともに滞りなく運営管理が行われた。特に、村山分室においては、四号棟の改修工事により、霊長類を利用する実験ができなくなり、検定や実験が筑波霊長類センターで行わざるを得なくなり、それらに関わる利用者には多大の不便をかけたが、平成１４年 8 月より運用が開始された。改修された四号棟は地下一階地上二階で、地下部分が霊長類の飼育、地上一階が霊長類の実験部分、地上二階が齧歯類等の飼育と実験部分となっており、霊長類を用いた実験に関しては、旧四号棟に比してかなり利用しやすくなっている。一方、齧歯類等においては、四号棟に新たに飼育スペースが出来たことより、運営に余裕を持って対応出来るようになった。皆様の協力に感謝する。さらに、六号棟に BSL3 に対応する動物実験区が新たに設けられることとなり、バイオセーフティ管理室と協力して、導入機器等の選定に係わった。平成１５年度から運用が開始される。

戸山庁舎においても、利用者の協力により平穏に管理運営が行われた。

国際協力に関しては、平成１４年１１月から１２月にかけて、国際協力事業団の要請により浅野敏彦がタイ国 NIH に専門家として派遣された。内容は、実験動物に関する技術指導、特に GLP と感染実験におけるそれである。

動物管理室の研究は、昨年度に引き続き実験動物の感染症に関する研究、サルの病理学的研究、感染症に関するモデル動物の開発研究が進められた。

なお、浅野が責任者として年報を書くのはこれが最後であり、次年度からは新しい室長のもとで、動物管理室が運営されるので、戸山庁舎および村山分室の動物管理区が利用者にさらに利用されやすい施設になるものと期待している。

動物管理区の利用状況

戸山庁舎と村山庁舎の動物管理区において、利用登録されている職員等の人数はそれぞれ、戸山庁舎 404 人、村山庁舎 147 人である。（平成 15 年 3 月 31 日現在）

Ⅰ　実験動物施設利用者講習会

開催月日	開催場所	受講者数（人）
４月３日	戸山	３０
４月１１日	村山	１２
６月４日	戸山	１１
７月３０日	戸山	1
８月２日	戸山	１２
９月３日	村山	6
１０月２日	戸山	6
１０月１６日	戸山	1
１１月１１日	戸山	1
１１月２６日	*戸山*	*1*
１２月３日	戸山	3
１２月４日	村山	１２
２月４日	戸山	5
合計		１０１

イタリック文字は臨時講習会（外国人等）

Ⅱ　微生物モニタリング

戸山庁舎、村山庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し，月一回定期的にモニタリングを行っている。

Ⅱ-1　戸山庁舎

Ⅱ-1-(1)　マウス

緑膿菌，サルモネラ，腸粘膜肥厚症菌，パスツレラ，ネズミコリネ菌，マイコプラズマ（主要臓器培養），MHV，HVJ，マイコプラズマ，Tyzzer 菌，エクトロメリア（血清学的検査，ELISA 法・CF 法），ジアルジア，スピロヌクレウス，ネズミ盲腸蟯虫，ネズミ大腸蟯虫，疥癬ダニ（鏡検）について，延べ 426 匹検査したところ，全て陰性であり，飼育室は清浄に保たれている。(滝本一広，　中山一栄，　星谷　武，　増子芳郎，　浅野敏彦)

Ⅱ-1-(2)　モルモット

緑膿菌，サルモネラ，溶血連鎖球菌，肺炎球菌，気管支敗血症菌（鼻腔拭き取り検査）について延べ 33 匹，HVJ，Tyzzer 菌（血清学的検査，CF 法），コクシジウム（鏡検）について 6 匹検査したところ，全て陰性であり，飼育室は清浄に保たれている。(中山一栄，　滝本一広，　星谷　武，　増子芳郎，　浅野敏彦)

Ⅱ-1-(3)　ウサギ

緑膿菌，ブドウ球菌，サルモネラ，パスツレラ，気管支敗血症菌（鼻腔拭き取り検査）について延べ 22 匹，HVJ，Tyzzer 菌（血清学的検査，CF 法），コクシジウム，疥癬ダニ（鏡検）について 4 匹検査したところ全て陰性であり，飼育室は清浄に保たれている。(中山一栄，　滝本一広，　星谷　武，　増子芳郎，　浅野敏彦)

Ⅱ-2　*Pneumocystis carinii* 汚染検査

Pneumocystis carinii は免疫機能が正常な動物では感染しても発症することがないが、免疫不全動物が感染した場合、重篤な肺炎を発症し死に至る。当研究所に搬入された *P. carinii* 陽性マウスの SPF 化の確認検査をきっかけに、他の利用者が飼育している動物についても検査したところ、免疫不全動物に限らず、免疫機能が正常でも *P. carinii* に感染している動物が認められた。*P. carinii* 不顕性感染マウスが免疫不全動物に対する汚染源であるかは明確ではないが、免疫不全動物の隔離飼育等の対策が必要であるかもしれない。(滝本一広，　中山一栄，　星谷　武，　増子芳郎，　浅野敏彦)

Ⅱ-3　村山庁舎

Ⅱ-3-(1)　マウス

サルモネラ、腸粘膜肥厚症菌、パスツレラ、ネズミコリネ菌、マイコプラズマ（以上培養）、マイコプラズマ、MHV、HVJ、Tyzzer 菌、エクトロメリア（以上血清学的検査―ELISA 法、CF 法、IFA 法）の項目について延べ 176 匹を検査したところ全て陰性であり飼育室は清浄に保たれていた。
（須崎百合子、松野久美子、矢部美機子、山田保利、網　康至、山田靖子）

Ⅱ-3-(2)　モルモット

緑膿菌、溶血連鎖球菌、肺炎球菌、サルモネラ、気管支敗血症菌（以上鼻腔拭き取り培養検査）、HVJ、Tyzzer 菌（以上血清学的検査―CF 法）について延べ 72 匹を検査したところ全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれていた。
（松野久美子、須崎百合子、矢部美機子、吉岡利夫、小川敏雄、網　康至、山田靖子）

Ⅱ-3-(3)　ウサギ

サルモネラ、ウサギパスツレラ、気管支敗血症菌（以上鼻腔拭き取り培養検査）、HVJ、Tyzzer 菌（以上血清学的検査―CF 法）について延べ 72 匹を検査したところ全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれていた。
（須崎百合子、松野久美子、矢部美機子、大池正明、網　康至、山田靖子）

研　究　業　績

Ⅰ　実験動物の感染症に関する研究

Ⅰ-1　ワクシニアウイルスを利用した希少実験動物の抗体検査法の検討

マウスの Ectromelia、ウサギの Rabbit pox, サルの Monkey pox の原因ウイルスは Orthopoxvirus 属に分類されるポックスウイルスで、同じ属のワクシニアウイルスと抗体反応が交差する。当管理室ではワクシニアウイルスを用いて抗原を作製し、マウス、ウサギの抗体検査を行っている。ワクシニアウイルスの宿主域の広さを利用してスナネズミ、ハムスターの感染血清を得、これら希少実験動物の抗体検査法を検討した。2 次抗体としてハムスターでは抗ハムスター及び protein A、スナネズミでは抗マウス IgG の使用で良好な ELISA 反応が確認された。

（山田靖子、矢部美機子）

Ⅱ　モデル動物の開発

Ⅱ-1　感染症モデル動物の開発と病態解析

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、麻疹ウイルスを 5 頭のカニクイザルに経鼻接種後、そのうち 3 頭については、ウイルス血症の極期である、感染 7 日後に、末梢血より単核細胞を分離し、同一個体の視床に接種し、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行った。

感染 3 週後、すなわち感染自己単核細胞脳内接種後 2 週で、対照群、実験群 1 頭づつ解剖し、脳からのウイルス分離を試みたが、陰性であった。残りのサルについては引き続き臨床観察を行っている。

［網　康至、須崎百合子、小船富美夫[1]、小長谷昌功[1]
([1]　ウイルス第 3 部)］

Ⅱ-2　低分子化合物 Gal X の GM1 ガングリオシドーシス治療効果について

Ⅱ-1-(1) Gal X の 1 週間投与による蓄積糖脂質量の変化

Gal X は培養細胞系で酵素復元効果が認められており、β-ガラクトシダーゼノックアウトマウスを用いて GM1 およびアシアロ GM1 の蓄積量に対する効果について調べた。3 ヶ月齢の BK48 マウスに Gal X 1mM あるいは Gal X 0.1mM を飲水に混ぜて 1 週間投与し、大脳の GM1，アシアロ GM1 含有量を非投与群と比較したが、全群で GM1，アシアロ GM1 含有量に差は認められなかった。また、同様に 6 ヶ月齢の BK48 マウスに Gal X 1mM を飲水に混ぜて 1 週間投与し、大脳および肝臓の GM1，アシアロ GM1 含有量を非投与群と比較することにより、その治療効果について検討した。大脳では、全群で GM1，アシアロ GM1 含有量に差は認められなかった。肝臓では全群ともに GM1 は検出されず、アシアロ GM1 は投与群の方が増加する傾向が認められた。

［滝本一広，松田潤一郎[1]，鈴木　治[1]，高野　薫[1]，浅野敏彦（[1] 獣医科学部)］

Ⅱ-1-(2)　Gal X の 5 週間投与による蓄積糖脂質量の変化

5 週齢の BK48 マウスに Gal X 1mM を飲水に混ぜて 5 週間投与し、大脳の GM1，アシアロ GM1 含有量を非投与群と比較することにより、その治療効果について検討したが、GM1，アシアロ GM1 含有量に差は認められなかった。

［滝本一広，松田潤一郎[1]，鈴木　治[1]，高野　薫[1]，浅野敏彦（[1] 獣医科学部)］

III　ワクチン品質管理試験に用いる実験動物に関する研究

破傷風トキソイド力価試験におけるマウス系統間および亜系統との感受性の差を検討したところ、Slc:ddY に比較して、Slc:ICR では、有意に低値を示した。この現象は、１ケージ１０匹飼育条件下で認められ、５匹飼育では認められないこと、C57BL/6 との F1 では認められないことを明らかにした。Slc:ICR が遺伝的要因によりストレスに対し感受性が高く、抗体産生能の低下が引き起こされたことが原因と考えられた。

［網　康至、福田　靖[1]、須崎百合子、高橋元秀[1]
([1] 細菌第 2 部)］

発表業績一覧

Ⅰ　誌上発表

Ⅰ-1　欧文

(1) Naito S, Taneichi M, Kato H, Tanaka Y, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kiniwa M, Komuro K, Uchida T. (2002): Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral pre-treatment with OVA-liposome conjugates. Int Arch Allergy Immunol., 129:314-9.

(2) Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzaki Y, Ami Y, Terao K, Nagai Y. (2002): Primary replication of a recombinant Sendai virus vector in macaques.J Gen Virol., 83:1377-86

(3) Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K, Uchida T. (2002): Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. Int Arch Allergy Immunol., 127:294-8

(4) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T. (2002): Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. J Med Virol., 67:207-16.

Ⅱ　学会発表

Ⅱ-2　国内学会

(1) 狩野宗英、中村浩美、武田明子、加藤　篤、須崎百合子、網　康至、永井美之、俣野哲朗：Gag 発現組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルモデルによる解析。第５０回日本ウイルス学会、平成 14 年 10 月、札幌。

(2) 永田典代、清水博之、網　康至、波多野いく持、原嶋綾子、佐藤由子、須崎百合子、佐多徹太郎、倉田　毅、野本明男、岩崎啄也：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス TgPVR21 の粘膜感染モデル。第５０回日本ウイルス学会、平成 14 年 10 月、札幌。

(3) 宇田晶彦、棚林　清、谷内真由実、山田靖子、向井鐐三郎、寺尾恵治、山田章雄：マルチプレックス PCR-SSP 法によるカニクイザル MHC タイピング。第 134 回日本獣医学会学術集会、平成１４年９月、岐阜。

(4) 小柳 充、加藤 明子、佐藤 俊哉、山田 靖子、佐藤 徳光：ＭＨＶのモニタリング:フィルターダストから RT-nested PCR-SSCP 法による遺伝子型分類。第 25 回日本分子生物学会年会、平成 14 年 12 月、横浜。

20. 感染症情報センター

センター長 岡部信彦

概　要

平成11年4月に施行された感染症法では、サーベイランスシステムの強化が示されている。同法に基づいた基本指針の中には患者発生状況サーベイランスと同様に病原体に関する情報の収集、分析及び提供と公開も必要であるとされている。指針をふまえた局長通知では、感染症発生動向調査事業の実施について述べられている。その中には国立感染症研究所に中央感染症情報センターを、地方感染症情報センターを各都道府県等域内に1カ所設置することが述べられ、それぞれの役割が記されている。

感染症情報センター(IDSC)は、国のサーベイランス事業の中で中央感染症情報センターとして位置づけられ、地方感染症情報センターならびに都道府県等の協力を得て、感染症法に規定された 1-4 類感染症を中心にしたサーベイランスを行っている。病原体情報については WISH Net, IDSC ホームページ(http://idsc.nih.go.jp/index-j.html)、病原微生物検出情報（IASR）を中心として、疾患の発生動向については感染症週報(IDWR: Infectious Disease Weekly Report)などを中心として、収集された情報の迅速な還元と公開を行っているところである。血清疫学調査としては、感染症流行予測調査事業の中でこれを行っている。このデーター等を基礎とし、感染症対策の重要な一角としての予防接種のあり方についてのエビデンスを求めることも IDSC の重要な業務である。

感染症発生への適切な対応の一環として実地疫学の重要性が理解されつつあるが、これにかかわる人材の育成は急務である。感染研では業務の一つとしてこの人材教育（実施疫学調査専門家養成コース(FETP)）が行われているが、研修実施の主体は IDSC が行っている。

最近の約 1 年間に IDSC がサーベイランスに関して積極的に取り組んだことの詳細はそれぞれに記されているが、その概要は以下のとおりである。

1. 感染症発生動向調査事業の実施

厚生（労働省）感染症発生動向調査事業における全国からの患者発生報告を集計処理し、各都道府県へのデータ還元。必要に応じて地方感染症情報センター等への問い合わせを行い、それらの結果を総合してコメントを作成し、表とグラフの作成も行い、ホームページ上での情報還元を行った。重要事項については厚生(労働省)結核感染症課へも情報提供を行った。

2. IDWR, IASR の定期的な発行。内容のさらなる充実とシステムの改善。

3. 感染症発生動向調査事業年報CD-ROM版データ集 (2001/1-2001/12) の発行

感染症法が施行されてからの感染症発生動向の確定データを迅速に還元するためには、時間のかかるコメントの作成を最小限にしてデータ集の形で発行するのが望まれる。このため、利用者がデータ処理をできるようにエクセルの表を中心として収載したCD-ROM版 (2001/1-2001/12) を平成14年12月に発行した。前回のものと比べて疾患の詳細分類、感染地別の分類をするなど、内容の充実を図った。引き続き、2002年度CD-ROM版 (2002/1-12) の作成のために全国からの確定データの収集を行いつつあるが、本年度よりも早期の発行を目指している。

4. 院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）

平成 9 年度より継続されてきた厚生科学研究「薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステム構築に関する研究」、および「薬剤耐性菌症例情報ネットワークに構築に関する研究」における研究結果や試行を踏まえ、平成12年7月より「院内感染対策サーベイランス」事業の運用が開始され、さらにこの結果は感染症情報センターホームページを通じてインターネット公開した。

5. 実地疫学調査専門家養成コース(FETP)

FETP の実施は 4 年目となった。これまでの研修開始は9月であったが、平成14年度からは4月より研修開始とし、5期生4名（島田 靖、逸見佳美、森 伸生、吉田英樹）が参加した。平成14年8月2期生3名（加來浩器、田中 毅、松井珠乃）研修終了した。平成13年度に引き続き Dr.John Kobayashi （Washington State Health Department）に長期コンサルタントを依頼した。

積極的な疫学調査、地域における調査がさらに充実し、公衆衛生領域における認知が進んでいる。

6. 症候群サーベイランスの実施
現行のサーベイランスは主に診断名が確定した疾患サーベイランスであるが、米国における炭疽菌事件等より、危機的状況におけるサーベイランスとして、平成 12 年度より症候群サーベイランスの導入に関する検討を行った。平成14年 FIFA ワールドカップサッカー大会においては、開催都市並びに東京都の協力を得て、症候群サーベイランスを実施した。なおこの実施にあたり、韓国予防衛生研究所と密に協力を行い、韓国でも初の実施を行っている。これは平成 14 年度末より世界的に問題となった SARS サーベイランスの実施にあたり、基礎的な経験となった。

7. 感染症法は制定から 5 年後に見直しをすることが定められている。我が国のサーベイランスは、法実施をきっかけに多くの改善が行われた。しかし、対象疾患や疾患定義の問題、サーベイランスの質の問題、個人情報と公開情報のバランスの問題、入力システムそのものの問題、感染症対策への反映の問題等々、法内容あるいは運用方法の改善や修正など、見直すべき点も多々ある。サーベイランスはデーターの集積のために行うものではなく、感染症の対策に利用されるべきものとして存在する。それぞれの疾患についてサーベイランスを行う目的を明確にし、なおかつ包括的なものを構築していく必要があり、この点の研究は IDSC にとって重要なテーマの一つとして平成 14 年度も継続実施した。

8. 予防接種室においては、これまでの感染症流行予測のほか、平成 13 年度より予防接種の効果、安全性、あるいはその実施にあたっての情報等、情報センターホームページ内に予防接種のサイトを作成し、広い情報提供を開始し、平成 14 年度はさらにこれを充実させた。また国における予防接種に対し、積極的にデーターを提出し、改善に向けての提案などを行うようになった。

9. 病原診断室においては、従来の研究対象であったアデノウイルスの研究に加え、不明病原体の検索について充実を図りつつある。

10. 平成 14 年 4 月より旧国立公衆衛生院より、2 名の室長が配置転換となり、感染症情報センター5 室、6 室が新設され、それぞれの室長となった。旧国立公衆衛生院の業務を引き継ぎ、5 室においては細菌、6 室においてはウイルスについて、自治体における病原体検査の研修等を行い、また病原体検査に関する情報の収集、検査法の開発等を行うようになった。業務は村山庁舎で行っている。

11. 平成 14 年度末には SARS が発生し、WHO は Global Alert をかけた。感染症情報センターは総力を挙げ、国内外より情報の収集、分析を行い、情報センターホームページに緊急情報として SARS の項目を設置、広く最新情報の提供を行った。また対策案の提言、積極的疫学調査の実施、WHO への調査協力、なども行った。

人事関係では、平成 14 年 3 月情報管理専門官村上修司が厚生労働省統計情報部へ異動。平成 14 年 4 月伊藤健一郎が第 5 室室長として、西尾 治が第 6 室室長として旧国立公衆衛生院より異動、平成 14 年 11 月に砂川富正が第 1 室主任研究官として横浜検疫所より異動。平成 14 年 8 月小坂 健研究員が米国ハーバード大学公衆衛生大学院留学より帰国。

なお岡部センター長は以下の委員の委嘱を国より受け、情報センター業務･研究の結果、成績などを背景として国における感染症対策の検討に参画した。

厚生省労働省健康危機管理調整会議委員
厚生労働省厚生科学審議会臨時委員
（感染症分科会員）
厚生労働省薬事･食品衛生審議会臨時委員
（医療機器･体外診断薬診断部会員）
厚生労働省薬事･食品衛生審議会臨時委員
（食中毒部会員）
厚生労働省疾病･障害認定審査会臨時委員
（感染症･予防接種審査分科会員）
厚生労働省厚生科学審議会生活環境水道部会委員
厚生労働省疾病･障害認定審査会委員
（感染症･予防接種審査分科会員）

業務･研究業績

I. 感染症発生動向調査事業の実施

1 感染症法に基づく感染症発生動向調査

厚生（労働省）感染症発生動向調査事業における全国からの患者発生報告を集計処理し、各都道府県へのデータ還元を行った後、全国集計データをダウンロードし、データ変換の後エクセルへの読み込みを行い、時系列解析、地理的解析などを行った。さらには、必要に応じて FETP より地方感染症情報センターへの問い合わせを行い、それらの結果を総合してコメントを作成し、表とグラフの作成も行い、ホームページ上での情報還元を行った。また、重要事項については厚生労働省結核感染症課へも情報提供を行った。［岡部信彦、木村幹男、小坂 健、谷口 清州、FETP 研修生、江頭圭三、大竹由里子、松岡静香］

2 院内感染対策サーベイランス

院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）

平成 12 年 7 月より運用開始となった「院内感染対策サーベイランス」では、月ごとの集計結果が全国の集計結果とともに参加施設に還元される。一方、院内感染対策のエビデンスとして、3 ヶ月ごとの集計が「季報」としてウエブ上で公開されることになった。この公開にあたり、データの有用な提供方法を検討し、サーベイランスの解析結果とともに「院内感染対策委員会」の専門家の承認を経て、検査部門、集中治療室部門、全入院部門のそれぞれについて Web コンテンツを作成し、順次情報を公開した。［谷口清州、松岡静香、岡部信彦、荒川宜親（細菌・血液製剤部）、山根一和（細菌・血液製剤部）、医療情報システム開発センター、厚生労働省医薬安全局安全対策課、平成 14 年度厚生科学研究費補助金「薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究」研究班］

II. 感染症発生動向調査事業に関する応用研究・業務

1. サーベイランスシステムの改善に関する研究

厚生省新興再興感染症研究事業として「効果的な感染症発生動向調査のための国及び県の発生動向調査の方法論に関する研究（主任研究者 岡部信彦）を組織し、感染症サーベイランスの在り方について研究を行った。[岡部信彦、谷口清州、山下 和予、小坂 健、大山卓昭、橋戸 円、中瀬克己、中島一敏]

2. 感染症発生動向調査に基づく流行の警報・注意報に関する業務

平成 12 年 12 月から本格運用となった「警報発生システム」によって得られた感染症の早期流行情報を、麻疹、インフルエンザなどについて「感染症週報」で取り上げて、保健衛生に関わる専門家にむけて注意を喚起した。特にインフルエンザについては、一般市民の高い関心に答えるべく、保健所ごとの早期流行状況を、警報（赤色）、注意報（黄色）に色分けして日本地図上に表示し、ウエブ上で公開した。共同通信社をはじめとした新聞各紙、テレビなどの報道機関で定期的に取り上げられるようになり、感染症情報の迅速な国民への提供に貢献した。［谷口清州、小坂健、松岡静香、永井正規（埼玉医科大学）、橋本修二（東京大学）、村上義孝（大分県立看護科学大学）、渕上博司（埼玉医科大学）］

3. 感染症発生動向調査に基づく注意報・警報システムおよび全国罹患数推計に関する研究

上述の研究班の分担として、これまで3年間の経験を元に注意報警報レベルの妥当性について検討を行い、一部疾患において基準値の変更を行った。また2001年度の全国罹患数推計をおこなった。［谷口清州、小坂健、永井正規（埼玉医科大学）、橋本修二（藤田保健衛生大学）、村上義孝（国立環境研究所）、渕上博司（埼玉医科大学）］

4. 国際保健規則（IHR）改正に係わる業務

世界保健機関（WHO）と加盟国との協力で勧められている IHR の改正について、WHO 本部と連絡調整をおこなっているが、本年、ジュネーブより IHR 改正チームが訪日し、厚生労働省結核感染症課、検疫所業務管理室、および各検疫所と合同で IHR 改正の進捗状況および具体的な改正の内容についての合同会議を行い、今後の予定あるいは協力体制について議論を行った。[重松美加、谷口清州、Sandy Cocksedge (WHO)、Max Hardiman (WHO)、厚生労働省結核感染症課、検疫所業務管理室]

5. バイオテロ対策に係わる業務

世界保健機関、あるいは G7＋メキシコと協力しながら、バイオテロ、特に天然痘に関する対応方針を作成するに当たり、国際

会議において各国の情報を収集議論し、厚生労働省に技術支援を行い、本邦におけるガイドラインの作成、あるいは研修会への協力を行った。[谷口清州]

6. 食品と微生物におけるリスクアセスメント

1)腸炎ビブリオ感染症と魚貝類におけるリスクアセスメントについて WHO、FAO 共同プロジェクトの中で草案グループの専門家として日本のデータ収集、提供及び草案を作成した。〔小坂健、春日文子〕

2) 日本におけるＳＲＳＶのリスク評価の初期段階として、リスクプロファイリングの作成に協力した。〔重松美加〕

7. 感染症発生動向調査の連携に関する研究

厚生科学研究事業「国及び県の発生動向調査の連携及び海外の定点設定に関する研究」のなかで、感染症情報の有効な活用と対策へすみやかにつなげるために、国及び発生動向調査の連携と海外機関との連携について検討した。特に、各分野での既存のネットワークを調査し、ネットワーク同士の交流の可能性を研究した。〔大山卓昭〕

III 感染症発生動向調査の情報の還元及びそのシステムの改善

1. 病原体情報の収集と月報･年報の作成

病原微生物検出情報事務局において、病原体情報センター業務として、オンラインによる報告票の収集、電算機処理、情報ファイル作成、作表、月報および年報の作成、配布に関する一連の作業が継続的に実施された。

1) 情報処理：2002 年 1 月－2002 年 12 月の検出病原体報 告数は、病原菌については、地研･保健所 9,605、検疫所 2,637、都市立感染症指定医療機関 609 であった。ウイルス（リケッチア, マイコプラズマを含む）に関しては 18,447 件の検出報告をうけた。

2) 月報の編集：本年度中に病原微生物検出情報月報が 12 号（第 23 巻）および第 23 巻索引が編集･発行された。また、インターネットを介して毎月、病原微生物検出情報が国内外に提供された。

3) 年報の編集：病原体情報に関する年報は、1998 年年報が「感染症サーベイランス事業年報、平成 10･11 年(1～3 月)、厚生省保健医療局エイズ結核感染症課」の病原体情報部門として編集･発行された。また欧文による報告も 1998 年年報が、Japan J. Med. Sci. Biol., 1998 Vol.52 Supplement として編集･発行された。〔山下和予、齊藤剛仁、赤塚昌江、加藤信子、野地元子、徳永真里子、木村幹男、岡部信彦〕

2. 感染症疫学情報の解析に基づく特集記事の作成

毎月 1 回の編集委員会で、特定の感染症を患者発生情報と病原体情報の両面から分析し、「病原微生物検出情報」の特集記事を作成した。掲載された記事は、2002年4月号：梅毒、5月号：HIV/AIDS、6月号：腸管出血性大腸菌感染症、7月号：B型肝炎･C型肝炎、8月号：エンテロウイルス、9月号：コレラ、 10月号：オウム病、 11月号：A型肝炎･E型肝炎、12月号：インフルエンザ、2003年1月号：細菌性赤痢、2月号：レジオネラ症、3月号：風疹である。〔山下和予、齊藤剛仁、赤塚昌江、加藤信子、徳永真里子、野地元子、木村幹男、岡部信彦、谷口清州、多屋馨子、伊藤健一郎、西尾治、井上栄、田村和満（細菌第一部）、渡邊治雄（細菌第一部）、寺嶋淳（細菌第一部）、荒川英二（細菌第一部）、倉文明（細菌第一部）、前川純子（細菌第一部）、倉根一郎（ウイルス第一部）、岸本寿男（ウイルス第一部）、宮村達男（ウイルス第二部）、田代真人（ウイルス第三部）小田切孝人（ウイルス第三部）、海野幸子（ウイルス第三部）、中島節子（ウイルス第三部）、荒川宜親（細菌第二部）、新谷三春（細菌第二部）、遠藤卓郎（寄生動物部）、小林睦生（昆虫医科学部）、神山恒夫（獣医科学部）、佐多徹太郎（感染病理部）、石井則久（ハンセン病研究センター）、山本茂貴（国立衛研）、小竹久平（企画主幹）、中林圭一（企画主幹）、倉田毅（副所長）、吉倉廣（所長）、佐野正（厚生労働省）、宮川昭二（厚生労働省）、金井要（厚生労働省）〕

3. 感染症週報の発行

平成 11 年 4 月施行の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」の主旨のもとに、同時期より感染症週報の発行を開始しており、当感染症情報センターのホームページ上に PDF 版と HTML 版とで掲載している。感染症週報には「発生動向総覧」以外に、「注目すべき感染症」としてその時々で問題となる感染症を 1～2 取り上げ、詳細な解説を行い、「病原体情報」として、その時々で問題となる感染症の患者からの病原微生物検出状況を掲載している。また、「速報」においては、主に地方衛生研究所から投稿される国内で問題となったアウトブレークに関する最新の記事などを掲載し、成田空港検疫所の協力で「海外感染症情報」のコーナーを設けて、最新

の海外感染症に関する記事を紹介し、「感染症の話」においては、所内外の協力を得て感染症法に規定された疾患、あるいはそれ以外の疾患も取り上げて解説を行い、「読者のコーナー」においては、外部からの問い合わせのあった質問につき、掲載する価値があると判断されたものを多くの読者にも公開している。〔岡部信彦、木村幹男、谷口 清州、小坂 健、重松美加、多屋馨子、齊藤剛仁、石井俊也（成田空港検疫所）、菊池均（成田空港検疫所）、大竹由里子、松岡静香〕

4. 感染症発生動向調査、話題の病原体、海外感染症情報、旅行医学、SARS関連緊急情報、予防接種キャンペーン、Epi Info日本語版のインターネットホームページの作成および更新、維持

上記感染症発生動向調査の解析結果、時系列グラフ、地図グラフおよびHTMLファイルを作成してホームページ上にアップロードし、定期的に更新、維持管理を行った。話題の病原体、海外感染症情報、旅行医学、SARS関連緊急情報、および予防接種キャンペーン等のページについても内容を検討しHTMLファイルを作成し、アップロード、維持管理を行った。また、Epi Info 2002j 日本語版 Ver.1をホームページにて紹介し、ダウンロードできるように環境を整えた。[大竹由里子、松岡 静香、小坂 健、重松美加、進藤奈邦子、加藤信子、山本英二（岡山理科大学）]

5. 感染症発生動向調査事業年報CD-ROM版データ集(2001/1-2001/12) の発行

感染症法が施行されてからの感染症発生動向の確定データを迅速に還元するためには、時間のかかるコメントの作成を最小限にしてデータ集の形で発行するのが望まれる。このため、利用者がデータ処理をできるようにエクセルの表を中心として収載したCD-ROM版 (2001/1-2001/12) を平成14年12月に発行した。前回のものと比べて疾患の詳細分類、感染地毎の分類をするなど、内容の充実を図った。引き続き、2002年度CD-ROM版 (2002/1-12) の作成のために全国からの確定データの収集を行いつつあるが、本年度よりも早期の発行を目指している。〔岡部信彦、木村幹男、谷口清州、多屋馨子、小坂 健、重松美加、FETP研修生、加藤信子、村上修司、江頭圭三〕

6. 海外感染症情報の収集と評価

WER (WHO)、MMWR (米国 CDC)、Eurosurveillance Weekly (EU)、CDR Weekly (英国)、SCIEH Weekly Report (スコットランド)、CDI(豪州)、Lancet、N. Engl. J. Med.、 J. Infect. Dis.、Clin. Infect. Dis.、 J. Travel Med.などや、電子メールでの ProMED、Outbreak Verification List (WHO、参加機関のみ) や TravelMed (国際旅行医学会、会員のみ)、あるいは、その他種々のウエッブページ上での感染症情報を収集・評価し、必要な情報を関係機関に連絡した。[岡部信彦、木村幹男、谷口清州、多屋馨子、新井 智、小坂 健、重松美加、大山卓昭、砂川富正、齊藤剛仁、FETP 研修生]

7. 感染症検査情報収集還元オンラインシステムの改良

平成 12 年 1 月より運用を開始した感染研－地研・検疫所間の感染症検査情報（病原体情報）コンピュータオンラインシステム Version4 について、プログラムの改善を行った。インフルエンザ情報に血球の種類と濃度を追加し、入力支援機能を追加した Version5.0 を平成 14 年 10 月に、さらに不具合修正と機能追加のため Version5.1～5.3 を開発して平成 15 年 1～3 月より運用を開始した。また Version5.0 以降は各衛研が WWW-WISH の個別システムからプログラムをダウンロードできるようシステムが改善された。〔山下和予、齊藤剛仁、加藤信子、赤塚昌江〕

8. インターネット等による病原体情報の提供

1）病原体情報報告機関に対して、速報を還元するために主要病原体の動向を WWW-WISH の電子会議室の病原体情報フォーラムにアップロードした。また WWW-WISH の個別情報システムによる還元情報速報閲覧のために新しいデータのアップロードを毎日行った。

2）IDSC ホームページの「病原微生物検出情報」のページに、オンラインで随時報告されるデータの追加・変更を反映させた速報グラフを更新・掲載した。地方衛生研究所などからの速報記事を随時掲載した。また、累積データに基づく統計表とグラフおよび病原体名、疾病名から検索できる月報特集記事索引を毎月作成し更新・掲載した。

3) インフルエンザシーズン中、ウイルス第三部へのインフルエンザウイルス情報の転送と、WHO の FluNet への日本の週別型別分離数データのアップロードを毎週行った。〔齊藤剛仁、赤塚昌江、徳永真理子、野地元子、加藤信子、山下和予〕

IV 感染症危機管理およびそれに関わる人材養成（実地疫学専門家養成プログラム）に関する業務

1. 感染症危機管理およびそれに関わる人材養成（実地疫学専門家養成プログラム）に関する業務

1)全般実施状況

FETP の実施は4年目となり、平成14 年8月2期生3名（加來浩器、田中毅、松井珠乃）が研修終了した。同年4月、4期生4名（島田靖、逸見佳美、森伸生、吉田英樹）を迎えた。また平成13 年度から Dr.John Kobayashi （Washington State Health Department）に長期コンサルタントを依頼し、感染症疫学研究、地方自治体との積極的疫学調査などが充実した。

2)感染症集団発生事例に対する実地疫学調査協力

平成 14 年度において、実地疫学専門家養成プログラム（FETP）は、以下の感染症集団発生事例に対して、地方自治体からの要請を受けて、調査協力を行った。

- 学校内麻疹集団発生事例（茨城県北茨城市）
- 施設内 B 型肝炎集団発生事例（佐賀県佐賀市）
- 施設内 VRE 集団発生事例（福岡県北九州市）
- 施設内病原性大腸菌 O157 感染症集団発生事例（福岡県福岡市）
- 施設内病原性大腸菌 O26 感染症集団発生事例（長野県長野市）
- 施設内病原性大腸菌 O157 感染症集団発生事例（徳島県海部郡）
- 施設内アメーバ赤痢感染症集団発生事例（熊本県八代市）
- 施設内 B 型肝炎集団発生事例（埼玉県騎西町）
- 循環器手術後の重症消化器合併症集積事例（宮城県仙台市）
- SARS 多国間広域集団発生事例（マニラ、フィリピン）

3)研修活動

FETP のトレーニングの一環として、初期導入研修（Edward Simoe, Jim Mendlein）とともに、英語論文の作成方法（Jim Mendlein）、生物兵器テロリズムに対する事前対応（Julie Wicklund）、院内感染症の予防と対策（Mike Bell）、インフルエンザの国際的な予防対策（Tim Uyeki）、感染症サーベイランス（Paul Kitsutani）に関するセミナーを開催した。

4) 教育研修経験

また、教育経験のための研修として、全国感染症危機管理研修会での講義、地方自治体の感染症危機管理研修会（埼玉県、鹿児島県、新潟県、熊本県、静岡県、青森県、岩手県、福岡県、秋田県、奈良県）での講義をおこなった。

5) 感染症疫学研究

平成 14 年度に研修終了した 2 期生が以下の長期プロジェクト研究発表をおこなった。

- 東アジア（台湾、韓国、日本を中心とした）におけるマラリア予防対策（加來）
- 日本におけるツツガムシ病の疫学（松井）
- 各国（日本、アジア・ヨーロッパ各国、ニュージーランド等）検疫システムの比較（田中）

6) 感染症サーベイランス活動

毎週ごとに収集されるサーベイランス報告対象疾患の情報を監視・解析し、必要に応じて地方自治体とともに公衆衛生的介入を実施した。

- 麻疹症例増加に対する予防接種推奨
- 夏季のエンテロウイルス流行時期での注意喚起、等

7) 感染症情報の還元

感染症サーベイランス、感染症集団発生事例に対する実地疫学調査協力などで得られた情報を病原体検出情報（月報）、感染症週報などを通じて一般住民、公衆衛生従事者などに還元した。また、インフルエンザ流行時期（10 月～3 月）には一般住民からのインフルエンザに関する問い合わせに対応する「インフルエンザホットライン」の中心的役割を果たした。［大山卓昭、砂川富正、谷口清州、多屋馨子、小坂 健、重松美加、FETP］

2. 希少感染症診断技術向上事業に関する業務

平成14年度は対象疾患として、西ナイル脳炎、バルトネラおよびマイコプラズマ、E 型肝炎、狂犬病、赤痢アメーバおよびマラリア、オウム病および Q 熱が取り上げられた。研修会は平成15年2月、当感染研で2日間開催され、56地研が参加した。それぞれの疾患はウイルス1部、細菌2部、ウイルス2部、獣医科学部、寄生動物部、感染症情報センター、細菌1部の協力により行われた。また、本事業の一環として、レファレンスセンター（エンテロウイルス、溶血性連鎖球菌、カンピロバクター）の運営がウイルス2部、細菌部、国立衛生研、東京都立衛生研究所の協力でなされた。また、新規レファレンスセンターが、それぞれ全国の支部センターと共に発足した。（レジオネラ、アデノウイルス、寄生虫、ジフテリアおよび百日咳）。［稲田 敏樹、橋戸 円、渡邊 治雄（細菌部）］

3. 新興再興感染症技術研修

本研修は、保健所あるいは地方衛生研究所において細菌検

査業務に従事するものを対象として、新しい知識及び技術の習得を目的としている。14年度は①ブドウ球菌エンテロトキシンの検出②ビブリオ・バルニフィカス検査③リアルタイム PCR を中心として、5日間、保健医療科学院白金台庁舎で行った。参加者は、保健所2名・衛生研究所10名・中核市保健所4名の合計 16 名であった。[伊藤健一郎・西尾治・荒川英二(細菌1部) ・佐多徹太郎(感染病理部)・神ノ田昌博(結核感染症課)・原田誠(横浜検疫所輸入食品検疫検査センター)・松崎充宏(日本海事検定協会理化学分析センター食品衛生チーム) ・新井めぐみ(雪印乳業食品衛生研究所)・浅尾努・河合高生(大阪府公衆衛生研究所)・島田俊雄(日本食品油脂検査協会)・沖津忠行(神奈川県衛生研究所)]

4. 国立保健医療科学院による特別課程ウイルスコースの実施

国立保健医療科学院による特別課程ウイルスコースとして、平成 14 年 10 月 29 日から 11 月 29 日に当感染研村山分室で研修会を実施した。ウイルス学、免疫学および分子疫学等について体系的な理解と新しい知見・ウイルス診断技術を習得することを目的とし、地方衛生研究所でウイルスに関する業務につく 20 名が参加した。本研修は感染症研究所の全ての部、センターの協力、支援によって遂行された。[西尾治、伊藤 健一郎]

5. 情報センターの業務の一環として 11 月から 3 月までのあいだ週末を除く連日インフルエンザホットラインを担当し、一般、医療機関、行政機関からの問い合わせに対応した。[木村幹男、大山卓昭、砂川富正、重松美加、谷口清州、多屋馨子、小坂健、岡部信彦、鈴木里和、島田靖、逸見佳美、森伸生、吉田英樹]

6. FIFA ワールドカップにおける症候群サーベイランスと危機管理体制の整備

FIFA ワールドカップが日本と韓国の共催で 2002 年 5 月 31 日から 6 月 30 日まで開催され、大会期間中の大規模感染症対策のひとつとして、感染症集団発生の早期探知と対応を目的とした「症候群サーベイランス」を実施し、技術的支援として、毎日のデータ解析、データ管理、緊急時対応体制の整備を行った。[木村幹男、大山卓昭、砂川富正、重松美加、谷口清州、多屋馨子、岡部信彦、鈴木里和、島田靖、逸見佳美、森伸生、吉田英樹]

V.感染症の疫学等の研究

1. インフルエンザによる超過死亡の分析

インフルエンザ流行が我が国の人口動態に与える影響を、インフルエンザによる超過死亡の分析によって評価した。1999/2000 シーズンの超過死亡は 13,846 人と多かったものの、2000/01 シーズン 913 人、2001/02 シーズン 1,078 人と2シーズンは少なかった。しかしながら、2002/03 シーズンは比較的大きな流行を経験し、超過死亡は 11,215 人を記録した。[谷口清州、大日康史(大阪大学社会経済研究所)、井伊雅子(横浜国立大学)]

2. インフルエンザ関連死亡迅速把握に関する研究

13 大都市でのインフルエンザ関連死亡(インフルエンザ及び肺炎死亡)数から超過死亡モデルを作成し、超過死亡を早期に把握できるか検討した。13 大都市における死亡の状況は国全体とよく相関し、インフルエンザにおける超過死亡の早期警戒に有用と考えられた。[谷口清州、大日康史(大阪大学社会経済研究所)、NEC、厚生労働省健康局結核感染症課、13 大都市・特別区衛生主幹部局]

3. 大規模感染症発生時における行政機関、医療機関等の間の広域連携に関する研究

大規模イベントなどバイオテロ発生の蓋然性上昇時に行うための症候群サーベイランスの手法を研究し、具体的なシステムの提案と早期に異常を検知するアルゴリズムの検討を行った。米国 CDC との協力で、Drop-in method が応用可能であることが判明した。[鈴木里和、大日康史(大阪大学)、谷口清州]

4. 国内での発生が稀少のため知見が乏しい感染症対応のための技術的基盤整備に関する研究

世界から根絶された天然痘がバイオテロに使用されるかもしれないという危惧から、天然痘によるアウトブレイク発生時での対応体制について検討した。特にワクチン接種の際のワクチン説明、インフォームドコンセント用のビデオを作成した。[谷口清州、岡部信彦]

5. インフルエンザ脳炎脳症疫学研究

インフルエンザ脳炎脳症はここ数年間特に日本の小児において増加しており注目されている疾患である。その実態を調査す

る厚生科学研究研究班(森島班)の分担研究として、日本の疫学調査を実施し、患者発生、血清疫学調査、ウイルス分離状況に関して報告した。[岡部信彦、山下和予、齊藤剛仁、吉川昌江、大山卓昭、谷口清洲、多屋馨子]

6. わが国におけるエンテロウイルス感染症の疫学研究
重症エンテロウイルス脳炎の疫学的ウイルス学的研究ならびに臨床的対策にする研究（岩崎班）の分担研究3年目として、わが国における疫学的調査をまとめる部分を担当した。全国の小児科医療機関を対象に2000-2002年のEV71感染症流行時における重症患者発生状況を調査することになり、アンケート調査を実施した。[多屋馨子、岡部信彦]

7. 気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究
上記厚生科学研究研究班（飯倉班）の分担研究としてわが国のインフルエンザの疫学調査を報告した。2000/2001シーズンのインフルエンザの流行規模について、累積患者報告数、年齢階級別報告数、患者から分離、検出されたウイルス報告数、その種類、シーズン前の国民のワクチン株に対する抗体保有状況について調査した。これらの疫学調査成績と気管支喘息発症調査成績を相互に検討することによって、ウイルス感染症と気管支喘息発症の関係に関して明らかにすることを目的として研究を実施した。[岡部信彦、多屋馨子、新井 智、山下和予、齊藤剛仁、吉川昌江]

8. ビブリオバルニフィカスの魚貝類における実態調査
近年問題となっているビブリオバルニフィカス感染症の実態を把握するために5つの地研と協力して、毎月魚貝類におけるビブリオバルニフィカス及び腸炎ビブリオの定量的なデータを収集し解析を行った。［小坂 健、岡部信彦、田村和満（細菌部）、荒川英二（細菌部）、春日文子（国衛研）、山本茂貴（国衛研）、斉藤紀行（宮城県保健環境センター）、山井志朗（神奈川県衛生研究所）、杉山寛治（静岡県環境衛生科学研究所）、宮坂次郎（熊本県保健環境科学研究所）、甲斐明美（東京都立衛生研究所）］

9. 動物由来感染症対策としての新しいサーベイランスシステムの開発に関する研究
2000年に日本では初めて動物園の展示動物を原因とした動物由来感染症のヒトの集団発生が確認され、動物展示施設においても十分な感染症対策の必要性が明らかになった。そこで動物展示施設における感染症対策ガイドラインとして「人と動物由の共通感染症ガイドライン」の作成を行った。 [岡部信彦、新井 智、大山卓昭、安藤 正樹(神奈川県東部家畜保健衛生所)、多田 有希(川崎市)、中島 一敏(大分医科大学微生物学講座、FETP)、成島 悦雄(東京都上野動物園)、福本 幸夫(広島市安佐動物公園長)、藤井逸人(京都市、FETP)、山田章雄(獣医科学部)]

10. 動物由来感染症対策のサーベイランスの関連として、動物およびそれ由来の製品輸入時におけるリスク評価を検討する目的で、獣医科学部と協力し、オーストラリア農水林業省 Biosecurity Australia編纂の「輸入リスク分析指針（Guidelines for Import Risk Analysis）」の注釈付き翻訳の作成を行った。［岡部信彦、神山恒夫（獣医科学部）、重松美加］

11. 保育園における感染症実態のコホート研究
子ども過程総合研究事業の中で、保育園における感染症実態のコホート研究を行った。福井県および横浜市の保育園2園よりインターネット上のデータベースを通して園児全員の感染症に関わる健康状態を日々把握した。事前の予防接種実施状況、園内の衛生状況の観察を行い、インフルエンザ等実際の感染症発生時には早期の介入を行なった。[砂川富正]

12. 港湾、空港におけるベクターサーベイランスに関する研究
近年のウエストナイル熱の米国での流行を受けて、ねずみ族、蚊族の各港湾、空港におけるサーベイランスの見直しが始まっている。検疫所研究の一環として調査を行い、発生国から到着する各港湾、空港毎のリスクの評価を行なった。[砂川富正]

13. インフルエンザ迅速検査サーベイランスの実施
全国の小児科医が参加する複数のメーリングリストを通して、2000-01シーズンよりインフルエンザ迅速診断検査結果に関する自主的なサーベイランスを行なっている。インターネット上のデータベースの構築、サーバーの管理等は、滋賀県の西藤成雄医師が行った。2002-03シーズンは約3万件の情報が寄せられた。迅速性において優れたサーベイランスとして定着している。[砂川富正]

VI 予防接種、薬剤等に関連した研究

1. 流行予測調査事業に関する業務

1)感染症流行予測調査報告書の作成

感染症流行予測調査報告書の作成：厚生労働省健康局結核感染症課および感染研関係各部と共同で、平成 13 年度(2001 年度)報告書を作成した。

2)感染症流行予測調査結果速報の発信

平成 14 年度感染症流行予測調査のうち、A) 全国日本脳炎ブタ情報 (感染症流行予測調査-速報)を 7 月 10 日から 11 月 27 日まで毎週（計 17 週）速報として HP 上に公開した。B) 全国インフルエンザ抗体保有状況調査速報を 10 月 30 日から 1 月 30 日まで計 4 回速報として HP 上に公開した。

3)感染症流行予測調査実施要領の作製

厚生労働省健康局結核感染症課と共同で平成 14 年度版を作製した。

4)感染症流行予測調査事業 PR 用パンフレット

（平成 14 年度版）の作製各都道府県に配布すると共に HP 上に公開した。

5)オンライン入力システムの改訂、検証

都道府県からの結果送付用のシステムおよび集計システムを改訂、検証した。

6)感染症流行予測調査結果をデータバンクに保存した。

7) 感染症流行予測調査事業検査術式（改訂版）を国立感染症研究所感染症流行予測調査事業委員会および厚生労働省結核感染症課との合同で作製した。

8)事務局業務

厚生労働省健康局結核感染症課、都道府県、都道府県各衛生研究所、国立感染症研究所各疾患担当部との密接な連携を保つための業務を行った。[多屋馨子、新井 智、早川丘芳、北本理恵、長谷川斐子、岡部信彦]

2. 肺炎球菌の標準的抗体価測定法の確立

昨年度作製した ELISA 法の有効性を判定するため、健常者のワクチン接種前後の抗体価の測定と慢性呼吸器疾患患者の抗体価の測定を行った。その結果、ボランティアに対してはワクチン接種によって抗体価が良好に上昇していることを確認することが可能となった。慢性呼吸器疾患患者についても有効な抗体測定方法であることが明らかになった。[新井 智、高橋透(万有製薬)、斉藤剛(BML)、高野昇一(BML)、大石和徳(長崎大学熱帯医学研究所)、岡部信彦]

3. 血清銀行に関する業務

1)血清の保管

感染症流行予測調査事業のため各都道府県において収集された血清の一部を国内血清銀行に受け入れ、保管した。平成 13 年採血分として平成 14 年度に受け入れた血清は、計 4,007 本であった。また、平成 14 年職員血清として計 496 本の血清を受け入れ保管した。

2)研究目的での血清の払い出し

5 件の研究に対して払い出し依頼があり、年度内に 5 件の研究に対して計 1,558 本の払い出しを行った。

3)血清銀行運営委員会設立準備（事務局担当）

血清銀行運営委員会を正式に委員会として立ち上げるための準備、事務局担当を行った。

4)保管血清の管理を行った。[多屋馨子、新井 智、早川丘芳、岡部信彦]

4. 電話、メールによる問い合わせ業務

予防接種、人獣共通感染症、その他感染症に関する電話、メールによる問い合わせに対応した。年間の問い合わせ件数は電話約 350 件、メール約 50 件である。[多屋馨子、新井 智]

5. 予防接種情報公開に関する業務

感染症情報センターHP 内に日本の予防接種スケジュール 2002 を公開した。[多屋馨子、新井 智、松岡静香、岡部信彦]

6. 日本ワクチン学会ニュースレター

ニュースレター事務局業務を行った。著者への連絡、原稿収集、ワクチン関連トピックスを担当し、その原稿を作成した。[多屋馨子、岡部信彦]

7. 予防接種後副反応・健康状況調査検討会

上記委員として、調査解析に参加した。[多屋馨子、岡部信彦]

8. 熱帯病・寄生虫症治療のための国内未承認薬の確保・供給

平成13年度から開始された創薬等ヒューマンサイエンス総合

研究事業「熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究」班(主任研究者:大友弘士) の主要な活動として、熱帯病や寄生虫症に対する治療薬剤で、国内で認可されていないが必要なものを許可を得て輸入し、全国22ケ所の保管機関に配付し、それらの機関を通じて薬剤入手を可能にする体制を構築し、運営してきた。そして、これらの国内未承認薬へのアクセスを容易にすることを目的に、研究班のホームページを立ち上げた。

また、国内で広く抗マラリア薬を適正に使用できるようにするために、マラリア治療研修会も開催した。さらには、国内で発生したマラリア患者の詳細を把握し、今後の対策に役立てるために、約1,800の医療機関を対象にしたアンケート調査を実施した。

平成 14 年度の最後には、懸案であった「寄生虫症薬物治療の手引き 2003 年改訂第 5 版」を発行し 2,000 部印刷して関係機関・関係者に広く配付した。また、研究班のホームページから PDF 版でダウンロードできるようにもした。〔木村幹男〕

9. トラベラーズワクチンの実態と必要性・有効性に関する研究

国際医療協力研究委託事業 海外旅行者の健康管理及び疾病予防に関する研究班(岡部班)の分担研究 2 年目として、接種の実態の把握、接種後副反応調査、接種後抗体価(A 型肝炎、破傷風)の測定について研究した。[多屋馨子、橋本迪子(東京検疫所)、高崎智彦(ウイルス1部)、宮崎寛(日本航空)、藤井達也(陸上自衛隊幕僚監部)、岡部信彦]

10. 安全なワクチン確保とその接種方法に関する総合的研究

厚生科学研究研究班(竹中班)の分担研究として、日本脳炎については、過去 20 年間のデータを用いて日本脳炎自然感染率を解析し、現在も引き続き日本脳炎ウイルス自然感染が存在していることが明らかになった。また、麻しんワクチン、風しんワクチン、MMR ワクチンの年齢別接種率を算定し今後の麻疹対策、風疹対策に寄与することを目的として解析を実施した。[岡部信彦、多屋馨子、新井智、早川丘芳、北本理恵、高崎智彦(ウイルス第1部)、倉根一郎(ウイルス第1部)、稲松孝思(東京都老人医療センター)]

11. 麻疹輸出のモデル解析

日本では毎年数十万人の麻疹患者の発生が確認され、感染者が発症前に渡航し、海外へ麻疹を輸出する危険性が指摘されてきた。そこで、2002 年のワールドカップにおける人口流動を用いて麻疹輸出危険モデルを作成し、日本国内で麻疹に感染し、海外へ麻疹を輸出する危険性を検討した。[高橋央、田中毅、多屋馨子、新井 智、長谷川斐子、岡部信彦]

12. 地域における麻疹対策への関与

沖縄はしか"0"プロジェクト委員会への参加、沖縄県具志川市における麻疹対策等に外部委員として積極的に関わっている。[砂川富正]

13. 通常時の麻疹ワクチン接種指針および麻疹発生時の対応指針の作成

厚生労働科学研究費補助金「成人麻疹の実態把握と今後の麻疹対策の方向性に関する研究」の中で、特に実地医家向けの麻疹ワクチン接種指針、自治体その他公衆衛生担当者向けの麻疹発生時の対応指針を作成した。麻疹ワクチン接種については特に別刷りとして関係者に配布されることとなっている。[砂川富正]

14. 黄熱ワクチンの副反応に関するコホート研究

感染症および感染症対策の国際的動向に関する研究の一環として、横浜検疫所、東京検疫所、成田空港検疫所において接種された黄熱ワクチン(4ヶ月間、対象者 921 人)の副反応に関するコホート研究を行った。副反応発生に関わるリスク要因として、食物アレルギー、卵アレルギー、薬剤アレルギーの既往が有意に関連していることが示された。[砂川富正]

15. 成人麻疹の実態把握と今後の麻疹対策の方向性に関する研究

厚生科学研究研究班(高山班)の分担研究として国単位の疫学調査である感染症発生動向調査ならびに感染症流行予測調査成績を集計・解析し、最近の麻疹流行の実態と日本における健常者の血清疫学調査を報告すると共に、国内での麻疹対策に資することを目的に研究を実施した。[岡部信彦、多屋馨子、砂川富正、森伸生、中島一敏(大分医科大学微生物学)、安井良則(堺市保健所)、谷口清州、知念正雄((知念小児科医院)、富樫武弘(市立札幌病院)、西本靖男(高知県)、山口亮(網

走保健所))

16. 高齢者における麻疹抗体保有状況

従来終生免役と言われていた小児に好発するウイルス感染症(麻疹)に対する免疫が、高齢化社会に伴い、罹患後 60 年～90 年以上経過した時点でどの程度維持されているかを検討し、現在青壮年期にある人の抗体価と比較検討した。[多屋馨子、稲松孝思(東京都老人医療センター)、岡部信彦]

VII 病原体の病態及び診断に関連した研究

1. アデノウイルスの診断法の開発

(PCR 法によるアデノウイルス血清型の同定)

前年度に報告したヒトアデノウイルスBおよびD亜属それぞれのヘキソン、ファイバー遺伝子にプライマーを設計し、PCR-制限酵素切断法(REA)およびマルチプレックス PCR 法により血清型同定を試みた。広島市および宮崎県で分離された流行性角結膜炎患者の検体を、BおよびD亜属全ての型に共通なプライマーを用い増幅した産物を Hinf I, Rsa I, Bsr I, Dde I で切断した。また、B、D亜属の血清型に特異的なプライマーを設計し、それぞれ一本のチューブに混入し PCR を行った。この結果広島市から、中和反応で8型と同定されたが、ヘキソン領域が9型に近い分離株、宮崎県からは、11型であるがヘキソンが35型に近い株が同定できた。これらは組換えによって生じたと考えられるが、単純で迅速な血清型同定法は様々な臨床現場や疫学調査で、重要なアデノウイルスの型決定に有用であることが示された。[アディカリ アルンクマー、向山 淳司、松野 重夫、稲田 敏樹、岡部 信彦]

2. 腸管付着性大腸菌

付着性大腸菌の病原性はまだ明快ではない。また、食品の本菌による汚染状況の調査もほとんどされていない。そこで、本菌群の病原性検査法の確立と汚染状況を把握することを目的とした。

1)局在性及び凝集性付着大腸菌の検査法

局在性、凝集性及び拡散性付着性大腸菌の病原関連遺伝子13 種類を検査できるようにした。従来法より簡便で迅速な生物活性測定法を検討した。結果は(1)血清型及び *eae* 遺伝子型により付着性関連遺伝子に変異又は脱落があること、(2)コンタクトヘモリシス法を用いた生物活性は増菌培地による影響を受けていた。*eae* 遺伝子型の α及び βは生物活性が測れたが、O157 を含む γはまだ測定できない。この型の生物活性の発現に必要な因子を検討する必要がある。[伊藤健一郎・岡本その子(栃木県保健環境センター)]

2)食品の細菌汚染状況の調査

食品の汚染状況を調べた。対象は漬物及び生鮮野菜である。漬物では、白菜・キュウリ等を主原料とする食品 43 件を調べた。検査法は一般性菌数・大腸菌群に加え、付着性大腸菌等も調べた。大腸菌は糞便性大腸菌の公定法に加えて食中毒検査に使用する検査法も行った。漬物では、付着性大腸菌及びサルモネラは全て陰性であった。大腸菌は公定法による 44.5℃培養検査では4件(9.3%)、食中毒検査法では8件(18.6%)から検出された。一般細菌数は、10^3～10^8/gの範囲で検出された。また、セレウス菌グループは 23 件(53.5%)から検出され、下痢性毒素も検出された。生鮮野菜としては、市販のねぎ・きゅうり・ほうれん草の計 31 検体を調べた。検査法は出血性大腸菌の検査法を主として行った。生鮮野菜からは病原菌は検出されなかった。[伊藤健一郎・森屋一雄(佐賀県衛生薬業センター)・松崎充宏(日本海事検定協会理化学分析センター食品衛生チーム)]

3. リアルタイム PCR(SmartCycler)による迅速診断法の開発

1)チフス菌・パラチフス菌

対象とした遺伝子は、チフス菌では Vi 抗原の合成に関与する *vipR* とパラチフス菌は O 抗原構成単糖の合成に関与する *tyv* である。検出法は異なる蛍光標識したタックマンプローブを用い、マルチプレックスで行える。[伊藤健一郎・広瀬健二(細菌 1 部)]

2)チフス菌・パラチフス菌の薬剤耐性の検査

対象とした遺伝子は *gyrA* で、変異部分にプライマーを設計し、共通のプローブを使用する方法と、共通のプライマーを使用して変異部分にプローブを用いる方法を試した。タックマンプローブ法を用い、後者では LUX プライマーを使用した Tm 値の測定法やモルキュラービーコン法も試した。どの方法でもワイルドと変異体を鑑別することはできた。変異位置の特定が難しく、クロスが見られるなど改良点が残っている。[伊藤健一郎・広瀬健二(細菌 1 部)]

3)黄色ブドウ球菌

対象とした遺伝子はエンテロトキシン A 型から E 型である。検出法はタックマンプローブ法を用いた。クロスが見られるなど改良点が残っている。 [伊藤健一郎・森屋一雄(佐賀県衛生薬業セ

ンター)]

4. ヒトバベシア原虫を含む不明熱疾患の解析
ヒトバベシア原虫は、ヒトの不明熱疾患の原因病原体として明らかになっている。そこで、ダニ媒介性疾患の発生が多く報告のある千葉県や島根県のヒト血清についてヒトバベシア原虫やその他の病原体について間接蛍光抗体法や PCR によって感染の有無を調査した。[新井 智、辻 正義(酪農大)、海保郁男(千葉衛研)、 板垣朝夫(島根環境研)、田原研司(島根環境研)、石原智明(酪農大)、岡部信彦]

5. ヘルペス科ウイルス検出(HHV-6,HHV-7)に関する研究
不明熱、不明発疹を呈した患者から得られた臨床検体を基に、ヘルペス科ウイルス(HHV-6,HHV-7)の検出(ウイルス分離、DNA 検出)、HHV-6,HHV-7 IgG 抗体価および IgM 抗体価の測定を実施した。[多屋馨子、山本あつ子(三井記念病院)、飯谷秀美(いいたに小児科医院)]

6. ウイルス性下痢症診断マニュアル(第三版)作成
酵素抗体法による A 群ロタウイルスの G 血清型別、ノロウイルスの RT-PCR 法、アデノウイルスを担当した。[西尾治]

7. 学校等で流行するウイルス感染症の早期診断法の確立と防止法の樹立
文部科学省科学研究研究班として、学校保健で問題となるアデノウイルスによるプール熱等の呼吸器感染症、エンテロウイルス 71 型による中枢神経感染症を併発した手足口病の迅速診断法の開発およびノロウイルスによる予防策に取り組んだ。[西尾治、藤本嗣人(兵庫県立健康環境科学研究センター)]

8. 乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究
創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業研究班として、4 種類の下痢症ウイルスを同時に検出できるキットの開発を目的とし、昨年度構築した A 群ロタウイルスとアストロウイルスを同時検出するキットの評価を調査し、新たにアストロウイルスの検出について検討した。[西尾治、大瀬戸光明(愛媛県立衛生環境研究所)、天辻康夫(国際試薬)、一口毅(国際試薬)]

9. 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究
厚生労働科学研究食品・化学物質安全総合研究事業研究班として、食品の安全性評価のために、国産市販カキ、輸入魚介類におけるウイルス汚染状況を明らかに、食品の安全性の確保に努めた。[西尾治]

10. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員(乳肉水産食品部会)の委嘱を国より受けた。[西尾治]

Ⅷ. 検査実施状況

	行 政	研 究	合 計
ウイルス分離同定	1	6	7
核酸・抗原検出	2	189	191
血 清 反 応	0	432	432
合 計	3	627	630

平成 14 年度研究員･研究生

氏　名	身　分	期　間	出　身
中村明子	客員研究員	H9.4.1-	東京大学
金澤保	客員研究員	H10.7.1-	産業医科大学
樋口薫	協力研究員	H11.6.1-	自宅開業
小松崎眞 (元 FETP)	協力研究員	H11.9.1-	東京慈恵会医科大学
砂川富正 (元 FETP)	協力研究員	H11.9.1- H14.8.31	横浜検疫所
中瀬克己 (元 FETP)	協力研究員	H11.9.1-	岡山市保健所
中島一敏 (元 FETP)	協力研究員	H11.9.1-	国立大分医科大学
藤井逸人 (元 FETP)	協力研究員	H11.9.1-	京都市役所
加來浩器 (FETP)	協力研究員	H12.9.1-	陸上自衛隊衛生学校
松井珠乃 (FETP)	協力研究員	H12.9.1-	健康保険天草中央病院
田中毅 (FETP)	協力研究員	H12.9.1-	福岡検疫所
鈴木里和 (FETP)	協力研究員	H13.9.1-	医師
大日康史	客員研究員	H11.9.1- H14.8.31	大阪大学
井伊雅子	客員研究員	H11.9.1- H14.8.31	横浜国立大学
根路銘国昭	客員研究員	H13.2.1- H15.1.31	バイオメディカルサイエンス研究会
浦島充佳	協力研究員	H12.12.1- H14.11.30	東京慈恵会医科大学
奥村順子	協力研究員	H12.12.1-	東京大学
松永泰子	協力研究員	H13.5.1-	元職員
Arun Kumar Adhikary	協力研究員	H13.5.1-H15.4.30	日本学術振興会
藤井達也	協力研究員	H13.7.1-	陸上自衛隊
川上桂子	協力研究員	H14.2.1-	国立公衆衛生院
安井良則	協力研究員	H14.3.1-	大阪府堺市保健所
John M. Kobayashi	客員研究員	H13.7.1- H15.2.28	ワシントン州保健局
長谷川斐子	客員研究員	H14.4.1-	元職員
逸見佳美	協力研究員	H14.4.1-	陸上自衛隊
島田靖	協力研究員	H14.4.1-	日本医科大学
吉田英樹	協力研究員	H14.4.1-	医師
森伸生	協力研究員	H14.4.1-	医師
Tsai Kuang chau	協力研究員	H14.4.1-H15.3.31	国立台湾大学
重松美加	流動研究員	H14.4.1-H15.3.31	(財) HS 財団
Richard Scott Bermudez	協力研究員	H14.7.2-H14.8.22	ﾊｰﾊﾞｰﾄﾞ大学
寺村知子	協力研究員	H14.7.1-	京都市衛生公害研究所
斎藤章暢	協力研究員	H14.7.1-	埼玉県衛生研究所
Urmila Banik	協力研究員	H14.10.1-	ﾁﾀｺﾞﾝｸﾞ大学
日谷明裕	協力研究員	H15.1.1-	医療法人社団愛友会流山総合病院
佐藤弘	協力研究員	H15.2.1-	酪農学園大学
山口卓	協力研究員	H15.2.1-	(財) 日本冷凍食品検査協会

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

原著

1) Arai, Y.T., Kimura, M., Sakaue, Y., Hamada, A., Yamada, K., Nakayama, M., Takasaki, T., Kurane, I.: Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. Vaccine 20:2448-2453, 2002

2) Doan, L-T-P., Okitsu, S., Nishio, O., Pham, D-T., Nguyen, D-H., Ushijima, H. Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Ming City, Vietnam. J Med.Virol. 69:588-94, 2003

3) Fujimoto, T., Chikahira, M., Yoshida, S., Ebira, H., Hasegawa, A., Totsuka, A., and Nishio, O. Outbreak of Central Nervous System Disease Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease in Japan during the Summer of 2000 : Detection and Molecular Epidemiology of Enterovirus 71. Microbiol.Immunol. 46:621-627,2002

4) Arun Kumar Adhikary, Jiro Numaga, Toshikatsu Kaburaki, Hidetoshi Kawashima, Makoto Araie, Yoshifumi Ikeda, Takeo Ogino, Hideaki Shimizu, Eiko Suzuki, and Hiroshi Ushijima. Genetic Characterization of AdenovirusType 8 (Ad8) isolated in Hiroshima City over a 15-year period. Journal of Clinical Pathology. 2003; 56:120-125.

5) K. Adhikary, Jiro Numaga, Eiko Suzuki, and Hiroshi Ushijima, Atsushi Mukoyama, Toshiki Inada, Nobuhiko Okabe. Identification of hexon and fiber gene of a novel strain adenovirus isolated from the cases of EKC. Journal of Clinical Pathology. 2003 (In press).

6) Kimura, M., Suzaki, A., Matsumoto, Y., Nakajima, K., Wataya, Y., Ohtomo, H.: Epidemiological and clinical aspects of malaria in Japan. J. Travel Med., 10:122-127, 2003

7) Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Nucleotide, Protein Identification bof human herpesvirus 6 latency-associated transcripts.J Virol. 76(8):4145-51. 2002

8) M.Sakaguchi, T.Nakayama, H.Kaku, K Taniguchi, S.Saito, A.Kimura, S.Inouye. Analysis of HLA in children with gelatin allergy. Tissue Antigens 59:412-416, 2002.

9) Matsuzawa, A., Shimizu, M., Takeda, Y., Nagase, H., Sayama, K., Kimura, M.: Significant role of Fas ligand-binding but defective Fas receptor (CD95) in lymph node hyperplasia composed of abnormal double-negative T cells. Immunology 106:470-475, 2002

10) Ono J, Imai K, Tanaka-Taya K, Kurahashi H, Okada S. Decreased frequency of seizures in infantile spasms associated with lissencephaly by human herpes virus 7 infection. Pediatr Int. 44(2):168-170. 2002

11) Osaka K, Takahashi H, Ohyama T.Testing a symptom-based surveillance system at high-profile gatherings as a preparatory measure for bioterrorism. Epidemiol. Infect. 129: 429-434, 2002

12) Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplantation recipients. Blood. 15;100(6):2005-11, 2002

13) Shigematsu, M., Davison, K.L, Crowcroft, N.S.: National Enhanced Surveillance of Meningococcal Disease in England, Wales and Northern Ireland, January 1999 to June 2001. Epidemiology & Infection 129:459-470, 2002

14) Sugimoto T, Tanaka-Taya K, Ono J, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Human herpesvirus-6 infection in neonates: Not protected by only humoral immunity. Pediatr Int. Jun;44(3):281-285. 2002

15) Tamano Matui, et al.Evaluation of National Tsutsugamushi Disease Surveillance - Japan 2000. Japanese Journal of Infectious Disease 2002;55:197-203

16) Tanaka H, Nishimura T, Hakui M, Sugimoto H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Human herpesvirus 6-associated hemophagocytic syndrome in a healthy adult. Emerging Infectious Diseases. 8(1):87-8. 2002

17) Thawaranantha D, Chimabutra K, Balachandra K, Warachit P, Pantuwatana S, Tanaka-Taya K, Inagi R, Kurata T, Yamanishi K. Genetic variations of human herpesvirus 7 by analysis of glycoproteins B and H and R2-repeat regions. Journal of Medical Virology. 66(3):370-7.2002

18) Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amou K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. Apr;29(7):595-8. 2002

19) Yamamoto, Y., Takasaki, T., Yamada K., Kimura, M., Washizaki, K., Yoshikawa, K., Hitani, A, Nakamura, T., Iwamoto, A.: Acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. J. Infect. Chemother., 8:175-177, 2002

その他

1) FAO/WHO（Ken OSAKA et al） Guidelines on Exposure Assessment of Microbiological Hazards in Food and Water. Draft .2001

2) FAO/WHO（Ken OSAKA et al） Joint FAO / WHO Expert consultations on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods. –preliminary document MRA 01/03

3) Editorial Committee of Findings of Infectious Agents in Japan: Annual Report on Findings of Infectious Agents in Japan, 1998. Jpn. J. Infect. Dis., 52, Supplement, 1999.

4)

2. 和文発表

原著･総説･解説

1) 木村幹男：英国のマラリア予防ガイドラインの特徴と変遷. 熱帯 35:31-38, 2002

2) 木村幹男：抗マラリア薬. 塩酸メフロキン. 臨床と薬物治療 21:411-413, 2002

3) 木村幹男：マラリアにおける診断と治療の現況. 感染症学雑誌 76:585-593, 2002

4) 木村幹男：コレラワクチンの現況. 病原微生物検出情報 23:227, 2002

5) 木村幹男：旅行医学における理論と実践の特徴. 日本検疫医学会誌 4:8-16, 2002

6) 古田隆久, 菊地たかね, 木村幹男, 渡辺直熙：[特集. IgE-マスト細胞の役割を問い直すために] マラリア感染防御と IgE. アレルギー科 14:114-119, 2002

7) 木村幹男, 重松美加, 川上桂子：第 4 回アジア太平洋旅行医学会議に参加して. 日本醫事新報 No. 4109:27-30, 2003

8) 田中毅ら. ドイツのウイルス性出血熱輸入例対策. 日本公衆衛雑誌 2002;49(6):564-72

9) 松井珠乃ら. 熊本県におけるツツガムシ病の診断･報告の現状. 日本皮膚科学会雑誌 2002;112(9):1253-55

10) 高橋央ら. サッカーワールドカップに伴う症候群サーベイランス評価. 感染症学雑誌 2002;76(2):102-8

11) 松井珠乃ら. G8 福岡･宮崎サミット 2000 に伴う症候群サーベイランス評価. 感染症学雑誌 2002;76(3):161-6

12) 砂川富正、安井良則. 麻疹－最近の国内外の状況と今後の対策－、保健婦雑誌 58(4): 348-353, 2002.

13) 砂川富正. 麻疹ワクチンの乳児の早期接種、治療増刊号 84: 650-652, 2002.

14) 砂川富正. ペスト、天然痘 小児科診療 65(12): 2046-2050, 2002.

15) 砂川富正. 感染性胃腸炎とは 小児看護 26(2): 174-181, 2003.

16) 谷口清州、岡部信彦. 国際的に問題となるウイルス性脳炎. 臨床とウイルス 30（4）、249-254、2002.

17) 谷口清州. 感染症のアウトブレイクに対する新しい取り組み. 公衆衛生情報 32（12）、15-17、2002.

18) 谷口清州. エボラ出血熱、クリミアコンゴ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱. 小児科診療 12（27）、2039-2045、2002.

19) 谷口清州. 予防接種：全般、ジフテリア・百日咳・破傷風. 小児科 43(9) 1179-1184、2002.
20) 谷口清州. グローバル時代の感染症・世界の驚異. 日本臨床 61 増刊2 16-23、2003.
21) 谷口清州. 感染症情報の予防接種への生かし方. 医報フジ 121 11-17、2003.
22) 谷口清州. 無菌性髄膜炎. 総合臨床 52 増刊 970-975、2003.
23) 谷口清州. 無菌性髄膜炎. 臨床検査 47(3) 313-317、2003.
24) 高橋 央、多屋馨子、新井 智、長谷川斐子、岡部信彦. サッカーワールドカップ2002に伴う麻疹輸出の危険率モデル解析. 感染症学雑誌. 2002. 76: 269-274
25) 多屋馨子: 診療科別にみたウイルス感染症 4) 小児科ウイルス学から見た医療の安全性 編集：栗村敬 メディカルレビュー社 104-110, 2002
26) 多屋馨子：外来患者の素朴な疑問に応える-家庭でのケアとその指導 Q&A-Part 2 予防接種 ポリオ、麻疹. 小児科 43(9)1185-1191, 2002
27) 監修 岡部信彦、多屋馨子：予防接種に関する Q&A 集. 社団法人細菌製剤協会 1-81, 2002
28) 多屋馨子：インフルエンザウイルスのワクチンをめぐって最近の接種率の動向と供給体制. 内科 90(5):883-888, 2002
29) 多屋馨子: 麻疹 小児内科. 34(増刊号), 954-961, 2002
30) 岡部信彦、砂川富正、谷口清洲、多屋馨子、中島一敏、森伸生、安井良則：麻疹の現状と今後の麻疹対策について. 1-61, 2001
31) 監修 岡部信彦 R-Book 2000 日本版-小児感染症の手引き- (Section1.能動免疫と受動免疫 能動免疫 翻訳担当：多屋馨子)1-41, 2002
32) 多屋馨子：特集 冬から春の感染症マネージメント インフルエンザ：流行予測. 小児科臨床. 55(12), 2189-2199, 2002
33) 多屋馨子: 院内のウイルス感染症予防対策 ～予防接種とサーベイランスを有効に用いるにはどうしたらいいか？～―愛以外に地球を救う それはワクチンー. 18(1), 49-58、2002
34) 岡部信彦、森伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、中嶋一敏、安井良則：麻疹の征圧は可能かー今、現実に可能なこと、早急に取り組むべきことー. 日本小児科医会会報. 24:37-43, 2002
35) 成松浩志、小林貴廣、世古庄太、後藤祐司、木元正一、尾形長彦、渕 祐一、伊藤健一郎：と畜場に搬入された豚の糞便中におけるベロ毒素産生性大腸菌（VTEC）の分布と病原性関連因子保有状況調査 食品微生物学雑誌 19(1)：21-26、2002.
36) 小林一寛、伊藤健一郎他：下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査の一考察. 感染症学雑誌 76(11)：911-920、2002.
37) 伊藤健一郎、松崎充宏：腸管出血性大腸菌 O157 の迅速検査法とその成績の取り扱い 日本臨床 60(6)：1114-1120、2002
38) 古田敏彦、竹内寛行、東谷市郎、西尾治：大アサリの喫食を原因とするノーウオーク様ウイルスとA型肝炎ウイルスによる食中毒事例 ―浜松市 病原微生物検出情報 23:119-120,2002
39) 藤本継人、近平雅嗣、宗村徹也、西尾治、吉田弘、武田和子、吉田真策：脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出された A 群コクサッキーウイルス ―兵庫県 病原微生物検出情報 23:174-174,2002
40) 西尾治、秋山美穂、長谷川斐子、古屋由美子、大瀬戸光明、杉枝正明：輸入生鮮魚介類からの A 型肝炎ウイルス検出状況 病原微生物検出情報 23:274-275,2002
41) 近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄、西尾治、秋山美穂：愛媛県において 10 月から流行したノーウォークウイルス様ウイルス胃腸炎 病原微生物検出情報 24:9-10,2003
42) 西尾治、加藤由美子：PCR 産物のマイクロプレートハイブリダイゼーションによるノーウォークウイルスの確認および遺伝子型別について 日本臨床 60(6):1175-1180,2002
43) 岡藤輝夫、岡藤隆夫、岡藤みはる、藤本嗣人、近平雅嗣、西尾治：スイミングプールを介したと推定されるアデノウイルス4型による咽頭結膜熱の流行 臨床とウイルス 30(4)：270-274,2002
44) 西尾治、新川奈緒美：ノーウオーク様ウイルスによる集団発生 日本医事新報 4105:5-9,2002
45) 古田敏彦、秋山美穂、加藤由美子、西尾治：ノロウイルス（ノーウォークウイルス）A 型肝炎ウイルスに汚染されたウチムラサキ貝による食中毒事例 感染症学雑誌 77:89-94,2003
46) 福田美和、川田一伸、矢野拓也、杉山明、中山治、西尾

治、関根大正、櫻井悠朗：養殖カキのウイルス浄化試験 感染症学雑誌 77:95-102,2003

47) 田中俊光、西尾治：輸入二枚貝等からの SRSV 遺伝子検出状況 獣医公衆衛生研究 5:15-17,2003

48) 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、川本尋義、西尾治、久保英幸、村上司、蓑城昇次、瀧野薫、小倉壽：河川水からの Norwalk virus の検出 生活衛生 46:137-143,2002

49) 入谷展弘、勢戸祥介、春木孝裕、西尾治、久保英幸、村上司、蓑城昇次、瀧野薫、綾田稔、小倉壽：リアルタイム PCR 法を用いた Norwalk virus 検出法の評価 大阪市立環境科学研究所報告 64:6-10,2002

50) 新川奈緒美、永田告治、有馬忠行、本田俊郎、吉國謙一郎、上野伸広、湯又義勝、西尾治：鹿児島県における海域のウイルス汚染実態調査及びウイルス性胃腸炎集団発生事例 鹿児島県環境保健センター所報 3:102-105,2003

51) 岡部信彦、加來浩器 テロ勃発時における感染症情報センターの役割 治療 84(4):1311-1316, 2002.

52) 岡部信彦. 天然痘（痘瘡）Medical Practice 19(5):892-894, 2002.

53) 岡部信彦. 海外における感染症の情報 臨床と研究 79(4):611-614, 2002.

54) 岡部信彦. 手足口病と脳炎 特集：母子保健と感染症 母子保健情報 45:40-45, 2002

55) 岡部信彦. ポリオ 小児科臨床 Vol.55（増） 1251-1260, 2002.

56) 岡部信彦. 学校伝染病の予防とその対策 治療 84(8):2195-2199, 2002.

57) 岡部信彦. 予防接種-BCG-小児科 43(9):1192-1194, 2002.

58) 岡部信彦. 特集：第一種伝染病とその対応 学校伝染病の概要と危機管理 臨床と微生物 29(5):463-466, 2002.

59) 岡部信彦. 生物テロの危機管理と医療従事者特集「医療従事者の危機管理」総合臨床 51(10):2728-2732, 2002.

60) 岡部信彦. ジフテリア・百日咳・破傷風特集「医療従事者の危機管理」総合臨床 51(10):2794-2797, 2002.

61) 岡部信彦. 感染症サーベイランスによる感染症動向の把握特集「小児の感染症の現況」小児内科 34(10):1449-1452, 2002.

62) 岡部信彦. インフルエンザ 特集：内科 100 年のあゆみ（感染症）日本内科学雑誌 91(10):2845-2849, 2002

63) 岡部信彦. 新興・再興感染症とその対策 特集：感染対策の理論と実際 現代医療 34(11):2624-2629, 2002.

64) 岡部信彦. 輸入感染報と感染症法におけるサーベイランス 特集「輸入感染症」小児科診療 65(12):2025-2031, 2002.

65) 岡部信彦. インフルエンザ脳炎・脳症 病原微生物検出情報 23(12):310-311, 2002.

66) 岡部信彦、森 伸生、砂川富正、多屋薫子、谷口清州、中島一敏、安井良則 麻疹の制圧は可能か-今、現実に可能なこと、早急に取り組むべきこと-日本小児科医会会報 24:37-43, 2002.

67) 岡部信彦. 動物由来感染症は今なぜ重要か 感染と抗菌薬 5(4):343-347, 2002.

68) 岡部信彦. 特集：小児疾患診療のための病態生理 熱帯病 小児内科 34（増刊号）:1067-1070, 2002.

69) 岡部信彦. 特集：小児疾患診療のための病態生理 コレラ 小児内科 34（増刊号）:1080-1083, 2002.

70) 岡部信彦. 感染症とからだのしくみ 学校保健フォーラム 58(6):18-22, 2002.

71) 岡部信彦. 特集：最新のインフルエンザ診療 今冬の流行予測 内科 90(11):900-903, 2002

72) 岡部信彦. 日本の感染症サーベイランス 日本皮膚科学会雑誌 112(13):1683-1685, 2002.

73) 岡部信彦. コレラ 小児内科 34（増）;1080-1083, 2002.

74) 岡部信彦. 熱帯病（出血熱・マラリア・デング熱など） 小児内科 34（増）;1067-1080, 2002.

75) 岡部信彦. 新世紀の感染症学 グローバル時代の感染症-本邦の現状-日本臨床 61 巻増刊号 2 9-15, 2003.

76) 岡部信彦. ライフスタイルの変化と感染症 臨床と薬物治療 22(1):7-10, 2003.

77) 岡部信彦. 感染症週報（IDWR）からみる日本の感染症の動向 現代医療 35(1):42-52, 2003.

78) 岡部信彦. バイオテロ対策-基本的な知識と対応 -Infection Control 12(3)"244-250, 2003.

79) 岡部信彦. 世界の感染症と日本の現況 綜合臨床 52（増）:651-657, 2003.

80) 岡部信彦. 予防接種・ワクチン 綜合臨床 52（増）:676-681、2003.

81) 国立感染症研究所、厚生労働省結核感染症課：病原微生物検出情報、月報 23 巻 4 号-24 巻 3 号。2002-2003

82) 予防医学事業中央会：ヒト由来病原体の検出数（統計のページ）、予防医学ジャーナル、386-397、2002-2003

書籍

1) 岡部信彦. 日本の感染症サーベイランス 小児科学 第2版 P.689-693 医学書院 2002.6.
2) 岡部信彦. わが国における感染症サーベイランスシステム-感染症情報の収集と還元-感染症研究の新戦略-阿蘇シンポジウム 2001-南山堂 2002.7.
3) 中村安秀、岡部信彦 監修 親と子の海外生活ガイド 母子衛生研究会 2002.3.
4) 岡部信彦. 海外旅行者へのワクチン接種アドバイス 新版･感染症マニュアル P.308-325 2002.10. スパイラル出版
5) 岡部信彦. 監修･訳 R-Book 2000 -小児感染症の手引き- 日本小児医事出版社 2002.11.
6) 岡部信彦･多屋馨子 監修 予防接種に関するQ&A集 細菌製剤協会 2002.8.
7) 岡部信彦. ウイルス感染症 わかりやすい疾患と試薬の解説 2003.p.224-227監修･佐藤哲男 アークメイデイア 2002.12.
8) 岡部信彦. アデノウイルス7型感染症 小児の治療指針 第13版 P.842-843 編集･大関武彦、古川 漸、横田俊一郎 医学書院 2003.3.
9) 岡部信彦. 海外渡航者に同行する小児の予防接種 小児の治療指針 第13版 P.513-515 編集･大関武彦、古川 漸、横田俊一郎 医学書院 2003.3.
10) 谷口清州. 世界からみた日本の感染症の特殊性. 小児科学第2版 医学書院 685-689 2002.

単行本

1) 岡部信彦 ペット感染症が危ない-あなたと動物を守る正しい知識-PHP 研究所 2002.10.
2) 岡部信彦 一般病院･診療所における危機的感染症への対応 ユニオンエース(東京) 2002.4.

Ⅱ. 学会発表

国際学会

1. Suzuki S. et al. Web-based Japanese Syndromic Surveillance for FIFA World Cup 2002. The National Syndromic Surveillance Conference, USA, 2002
2. Tanaka T. et al. A Nosocomial outbreak of Serratia marcescens sp. Induced by contaminated hepalinized-saline. EIS Conference, USA, 2002
3. Tanaka T. et al. A risk analysis by a measles exportation mode concerning FIFA World Cup 2002 TEPHINET Conference, Spain, 2002
4. K.Taniguchi. Influenza surveillance in Japan. WHO/CDC joint workshop on Epidemiology and Surveillance of Influenza, November 2002,Atlanta, USA.
5. K.Taniguchi. Global infectious disease surveillance and WHO strategy. The 2002 Taiwan International Public Health Workshop, October 2002, Taiwan.
6. K.Taniguchi. Surveillance and control on Tsutsugamushi disease in Japan. The symposium on Strategies for Tsutsugamushi disease prevention, September, 2002, Korea.
7. K.Taniguchi. Surveillance and control of infectious disease in Japan. International Conference on Surveillance for Infectious Diseases, December 2002, Korea.
8. K.Taniguchi. Syndromic Surveillance sysytem in Japan. International Conference on Surveillance for Infectious Diseases, December 2002, Korea.
9. Kinoshita, J., Yamada, H., Minematsu, T., Kimura, M., Ohtomo, H., Kotaki, H.: Evaluation of antimalarial drug cardiotoxicity by using guinea-pig isolated perfused hearts. 3rd European Conference on Travel Medicine. Florence, Italy, 2002
10. Kimura, M.: Country Report. A Japanese tropical and parasitic disease network useful for foreign visitors from endemic areas. 4th Asia Pacific Travel Health Conference. Shanghai, 2002.
11. Kimura, M., Yamamoto, Y., Takasaki, T., Yamada, K., Washizaki, K., Yoshikawa, K., Hitani, A., Nakamura, T., Iwamoto, A.: Acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever and a favorable response to high-dose corticosteroid therapy: report of a case. 4th Asia Pacific Travel Health Conference. Shanghai, 2002.

12. Kawakami, K., Kimura, M., Hashimoto, M., Aoki, K., Hamada, M., Tanihata, T.: Knowledge and preparation regarding the risk of malaria among the Japanese international travelers. 4th Asia Pacific Travel Health Conference. Shanghai, 2002.
13. Shigematsu, M., Kaufmann, M.E., Charlett, A., Pitt, T.L., Ohnishi, M., Mori, K., Kimura, M., Okabe, N.: Epidemiology of *Plesiomonas shigelloides* among Japanese travelers with diarrhoea. 4th Asia Pacific Travel Health Conference. Shanghai, 2002.
14. Kim, H.-S., Wataya, Y., Kimura, M.: DNA diagnosis of malaria using microtiter-plate hybridization method. 4th Asia Pacific Travel Health Conference. Shanghai, 2002.
15. Kimura, M.: Infectious disease surveillance in Japan. China-Japan Medical Conference 2002. Beijing, 2002.
16. Yamamoto, J. Iwahori, M.Shigematsu, K. Osaka, H. Toyofuku, F. Kasuga, M. Nishibuchi: Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in southern Thailand. The 37th Joint Conference of US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel
17. Ken OSAKA Risk assessment of *V. parahaemolyticus* and finfish. Joint FAO/WHO Expert consultations on risk characterization of Campylobacter spp. In broiler chickens and Vibrio spp. In seafood. 30th August 2002.
18. Kishimoto, T., Ogawa, M., Shiga, S., Kurane, I., Tada, Y., Yoshikawa T., Fujii, I., Nakashima, K., Arai, S., Oyama, T., Okabe, N. and Fukushi, H. An outbreak of *Chlamydia psittaci* infection in zoo staff members involved in delivery assistance to a Siberian elk. Chlamydia Infections Proceedings of the tenth international symposium on human chlamydial infections. Antalya, Turkey. June 16-22, 2002.
19. Keiko Tanaka-Taya, Nobuhiko Okabe: Laboratory issues for measles control in Japan. Meeting of technical experts on measles (Seoul city, Korea) 2002.4.30-5.2.
20. Arun Kumar Adhikary, Jiro Numaga, Toshikatsu Kaburaki, Hidetoshi Kawashima, Makoto Araie, Eiko Suzuki, Hiroshi Ushijima, Atsushi Mukoyama, Shigeo Matsuno, Toshiki Inada, and Nobuhiko Okabe. Genotyping of Adenoviruses by PCR-REA and Multiplex PCR. Conference of the Japanese Society for Virology. 16-18 October, 2002. Sapporo, Japan.
21. A. K. Adhikary, Jiro. Numaga, Toshikatsu Kaburaki, Hidetoshi Kawashima, Makoto Araie, Atsushi Mukoyama, Eiko Suzuki, and Hiroshi Ushijima, Shigeo Matsuno, Toshiki Inada, Nobuhiko Okabe. Identification of hexon and fiber gene of a novel genome type of adenovirus type 8 (Ad8) isolated from the cases of EKC. Adenovirus workshop, 16 October, 2002. Sapporo, Japan.
22. Genetic Characterization of a Novel Strain of Adenovirus Involved in Epidemic Keratoconjunctivitis (EKC) A. K. Adhikary, Toshiki Inada, Jiro Numaga, Atsushi Mukoyama, Eiko Suzuki, and Hiroshi Ushijima, Shigeo Matsuno, Nobuhiko Okabe. Adenovirus workshop, 6 July, 2003. Osaka, Japan.
23. Ushijima,H., Zhou,Y., Okitsu, S., Zhu,L., Ishihara,K., Nishio,O.：Molecular epidemiological study of diarrheal viruses in Japan from 1996-2000 and gene analysis of rotavirus serotype G9. 4th China-Japan International Congress of Virology. Jun.2002, Kun Ming, China
24. Ushijima,H., Li,L., Lan,DTP, Okitsu,S., Nishio,O., Seo,J-K., Sim,J-G. ：Molecular epidemiology of adenovirus among children with diarrhea in Japan, Vietnam, and Korea. 36th Joint Meeting Conference on Viral Disease. Aug.2002, Matsumoto
25. Doan,T-P-L., Okitsu,S., Nishio,O., Pham,T-D., Nguyen,H-D., Ushijima,H.: Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease. Nov.2002, Pattaya, Thailand
26. Ushijima,H., Kono,H., Zhou,Y-M., Lan, D-T-P., Peerakome,S., Maneekarn,N., Okitsu,S., Nishio,O.: Recent trend of rotavirus infection in Japan, Thailand and Vietnam. VII International Congress of Virology. July.2002, Paris
27. Kawamoto,A., Matsumoto,N., Hosoi,T., Nishio,O. Epidemiology investigation of Norwalk virus detected in humans, environment and oysters. VII International Congress of Virology. July.2002, Paris

28. Ushijima,H., Zhou,Y., Okitsu,S., Zhu,L., Nishio,O.: Molecular epidemiology of rotaviruses, especially G9, in Japan(1999-2000). 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Disease. Nov.2002, Pattaya, Thailand

2. 国内学会

1) 森伸生ら. 茨城県取手氏における小中学校の麻疹ワクチン接種状況. 日本ワクチン学会、2002 年

2) 森伸生ら. 茨城県での T 中学校麻疹集団発生事例調査. 小児感染症学会、2002 年

3) 加來浩器ら. 大韓民国におけるマラリア. 日本検疫学会、2002 年

4) 田中毅ら. 諸外国の人獣共通感染症にかかわる動物及びベクターサーベイランス. 日本検疫学会、2002 年

5) 砂川富正ら.「発熱・水泡を有する患者が複数発生し入港したパナマ船の事例」(口演) 日本検疫医学会学術大会、2002 年、大阪府

6) 砂川富正.「未経験の感染症の侵入、発生に対する備えおよび対策」(口演) 関西感染症懇話会、2002 年、大阪府

7) 砂川富正.「世界および日本における麻疹を巡る状況」(口演) 大阪小児科学会、2002 年、大阪府

8) 砂川富正.「健康危機管理に関わる問題とウエストナイルウイルス」(口演) 公衆衛生情報研究協議会、2003 年、神奈川県

9) 砂川富正.「疫学的対応に基づいた健康危機管理」(口演) 北海道衛生公衆衛生セミナー、2003 年、北海道

10) 谷口清州、進藤奈邦子、木村幹男、他. インフルエンザ 2001/2002 シーズンの流行状況と公衆衛生学的インパクト. 第 6 回日本ワクチン学会. 2002 年 11 月、千葉市.

11) 谷口清州、進藤奈邦子、橋本修二、村上義孝、永井正規、渕上博司. 感染症発生動向調査に基づく研究 第 2 報 警報・注意報の発生状況. 第 61 回日本公衆衛生学会. 2002 年 10 月、さいたま市.

12) 谷口清州. 世界の感染症の状況と WHO の戦略. 中部日本小児科学会. 2002 年 9 月、津市

13) 谷口清州. 近年の麻疹流行の日本国民へのインパクト. 第 25 回日本造血細胞移植学会. 2002 年 10 月. 大阪市

14) 谷口清州. ワールドカップ症例別サーベイランスについて. 第 7 回地域保健のためのインターネット研究会. 2002 年 11 月 東京

15) 谷口清州. 症候群別サーベイランスの結果報告. 第 16 回公衆衛生情報研究協議会. 2002 年 1 月、横浜市

16) 谷口清州. 国際的に問題となるウイルス性脳炎. 第 43 回日本臨床ウイルス学会. 2002 年 6 月、秋田市.

17) 三浦聡之, 木村幹男, 日谷明裕, 鯉渕智彦, 中村仁美, 遠藤宗臣, 高橋 孝, 小田原隆, 中村哲也, 岩本愛吉: 東京大学医科学研究所附属病院におけるマラリアの統計 ―過去 10 年間の検討― 第 76 回日本感染症学会総会 2002

18) 木村幹男, 名和行文, 大友弘士: 熱帯病・寄生虫症治療のための稀用薬の保管・供給体制. 日本感染症学会第 51 回東日本地方会総会 2002.

19) 木村幹男, 名和行文, 大友弘士, 「熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究」班: ワークショップ「旅行医学」. 熱帯病・寄生虫症稀用薬の保管・供給体制の現況. 第 43 回日本熱帯医学会大会 2002.

20) 川上桂子, 木村幹男, 橋本迪子, 青木和子, 浜田 勝, 谷畑健生: ワークショップ「旅行医学」. 日本人海外渡航予定者のマラリアに関する意識. 第 43 回日本熱帯医学会大会 2002.

21) 古田隆久, 菊地たかね, 木村幹男, 渡辺直熙: ワークショップ「原虫感染防御」. IgE によるマラリア原虫感染防御について. 第 43 回日本熱帯医学会大会 2002.

22) 岩堀淳一郎,山本昭夫, Vuddhakul, V., Kalnawakul, S., Chowdhury, A., 重松美加, 小坂健, 豊福肇, 春日文子, 山本茂貴, 西渕光昭: タイ南部における赤貝の摂食に伴う腸炎ビブリオ感染の定量的リスクアセスメント ― 微生物学的リスクアセスメントにおける国際協力. 日本リスク研究学会第 15 回研究発表会

23) 齊藤剛仁 山下和予 岡部信彦：病原体サーベイランスにおけるムンプスウイルスの検出状況 第 34 回日本小児感染症学会総会 2002 年 11 月、札幌
24) 新井 智、高崎智彦、多屋馨子、高崎智彦、松永泰子、倉根一郎、岡部信彦、流行予測調査グループ. 2000 年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 2002 年 第 6 回ワクチン学会. 2002 年 11 月.
25) 多屋馨子、新井 智、田代眞人、岡部信彦、流行予測調査グループ. 本邦健常人における麻疹抗体保有状況及び予防接種率と麻疹流行状況～2001 年度調査～. 2002 年 第 34 回日本小児感染症学会. 2002 年 11 月.
26) 新井 智、高崎智彦、多屋馨子、高崎智彦、松永泰子、倉根一郎、岡部信彦、流行予測調査グループ. 2000 年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 2002 年 第 34 回日本症に感染症学会. 2002 年 11 月.
27) 吉川徹、多田有希、中島一敏、新井智、大山卓昭、岡部信彦. 動物園における人獣共通感染症の危機管理とリスクマネージメントの一事例. 第 75 回日本産業衛生学会, 神戸市. 2002 年 4 月
28) 多屋馨子：院内のウイルス感染症予防対策 ～予防接種とサーベイランスを有効に用いるにはどうしたらいいか？～愛以外に地球を救う それはワクチン –第 85 回臨床研究セミナー（大阪）、2002.1.18.
29) 多屋馨子：院内感染対策：何が問題か？防げるウイルス感染症とその対策.第 13 回日本臨床微生物学会（東京）、2002.1.25-27
30) 多屋馨子、長谷川裴子、岡部信彦、井上栄：IAHA 法による Mumps 抗体価測定の検討. 第 2 回抗体測定研究会（東京）、2002.2.15
31) 多屋馨子、新井智、岡部信彦：我が国の麻疹抗体保有率とワクチン接種率～2000 年度感染症流行予測調査より～. 第 105 回日本小児科学会学術集会（名古屋）、2002.4.19-21.
32) 多屋馨子：HHV-6 DNA の遺伝的伝播.第 9 回日本ヘルペス感染症フォーラム（小樽）、2002.8.23-24.
33) 多屋馨子：社会にとってのワクチン、個人にとってのワクチン：集団と個人.大阪小児科学会ワクチンシンポジウム（大阪）、2002.9.29
34) 多屋馨子、橋本迪子、岡部信彦：渡航前接種を実施した破傷風および A 型肝炎ワクチンの免疫獲得に関する検討.第 6 回日本ワクチン学会（千葉）、2002.11.30-12.1
35) 隈元星子、森屋一雄、諸石早苗、伊藤健一郎：散発下痢症患者及び健常乳幼児由来大腸菌における局在性及び凝集性付着大腸菌関連遺伝子の保有状況について（第 2 報）. 第 76 回日本感染症学会総会. 2002
36) 西尾治、秋山美穂、加藤由美子：リアルタイム PCR 法による A 型肝炎ウイルスの検出について. 第 76 回日本感染症学会、2002 年 4 月、東京
37) 西尾治：ウイルス性食中毒の病因. 第 42 回日本臨床ウイルス学会、2002 年 6 月、秋田
38) 藤本嗣人、近平雅嗣、岡藤輝夫、西尾治、吉田弘：兵庫県において 1993 年 10 月～1994 年 10 月に無菌性髄膜炎と発疹症の流行を引き起こしたエコーウイルス 9 型の分子疫学. 第 42 回日本臨床ウイルス学会、2002 年 6 月、秋田
39) 西尾治：ウイルス性食中毒. 第 134 回日本獣医学会学術集会、2002 年 9 月、岐阜
40) 田中俊光、西尾治：千葉市内の市場で流通する輸入二枚貝等からの SRSV 遺伝子検出状況について. 獣医公衆衛生研究平成 14 年度調査研究発表会、2002 年 9 月、東京
41) 大瀬戸光明、近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、杉枝正明、古屋由美子、藤本嗣人、長谷川斐子、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：輸入魚介類のウイルス汚染実態調査. 第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌
42) 古屋由美子、原みゆき、片山丘、今井光信、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：イカ塩辛が原因の Norwalk virus による食中毒事例. 第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌
43) 西田知子、三上稔之、沖村容子、篠原美千代、西香南子、川本歩、木村博一、杉枝正明、大瀬戸光明、春木考祐、鈴木宏、西尾治：国内産および韓国産カキのノーウォークウイルスおよび A 型肝炎ウイルスの汚染状況. 第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌
44) 藤本嗣人、近平雅嗣、宗村徹也、西尾治、吉田弘：脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出されたコクサッキーA 群ウイルス. 第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌
45) 杉枝正明、大瀬戸光明、福田伸治、川本歩、木村博一、三上稔之、西田知子、新川奈緒美、西香南子、古屋由

美子、西尾治：全国各地で発生したノーウォークウイルス(NV)による食中毒事例について．第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌

46) 新川奈緒美、中山浩一郎、伊東祐治、西尾治：Norwalk virus による胃腸炎集団発生患者から排泄されるウイルス量と遺伝子型について．第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌

47) 西香南子、松野重夫、西尾治：カキ及び養殖海域の Norwalk virus 調査と環境因子との関連性．第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌

48) 山下育孝、大瀬戸光明、吉田紀美、近藤玲子、天辻康夫、一口毅、西尾治：ロタウイルスとアデノウイルスを同時に鑑別して検出する迅速診断キットの評価．第 50 回日本ウイルス学会、2002 年 10 月、札幌

49) 藤本嗣人、近平雅嗣、増田邦義、西尾治、吉田茂：日本において一般的に軽症と考えられている 手足口病起因ウイルスが，兵庫県内において死亡例と後遺症例を含む，重症中枢神経患者を多発させたケースに関する調査研究．平成 14 年度兵庫県公衆衛生協会総会兼中央研究会、2002 年、神戸

50) 新川奈緒美、伊東祐治、西尾治　他：ノーウォークウイルスによる食中毒事例と排泄されるウイルス量について．第 44 回鹿児島県公衆衛生学会、2002 年、鹿児島

51) 新川奈緒美、中山浩一郎、湯又義勝、西尾治：Norwalk virus による集団発生事例の疫学と患者から排泄されるウイルス量．第 28 回九州衛生環境技術協議会、2002 年、宮崎

52) 入谷展弘、勢戸祥介、久保英幸、村上司、綾田稔 、小倉壽、春木孝祐、西尾治：市販生カキからのノーウォークウイルスおよびA型肝炎ウイルスの検出．39 回近畿地区ウイルス疾患協議会、2003 年 2 月、神戸

21. エイズ研究センター

センター長　山 本 直 樹

概　要

UNAIDSの報告によると2002年末には世界の累積HIV感染者数は4200万人となった。そして2010年までの今後7年間でさらに4500万人以上増えると予想されている。このうちの大多数は言うまでもなく、経済的理由により、多剤併用療法の恩恵に浴し得ない発展途上国の人々である。この厳しい現実を目の当たりにして、先進諸国の一員としてのわが国の役割は益々増大している。

アジアでは、これまでの東南・南アジア地域の大流行に加え、中国を中心とする東アジア地域での流行の拡大が現実のものとなってきた。またわが国は先進国の中では例外的に感染者数の増加傾向に歯止めがかからないという大きな問題に直面している。中でも若年感染者の増加は看過できない問題となっている。また、近年、献血者にHIV陽性者が増加している。わが国においても、新規HIV患者の拡大の抑制と患者・感染者の予後とQOLの向上をはかることが切実に求められている。

新しい抗HIV剤が次々に開発、認可され、特に、いくつかの逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の多剤併用によるHAARTの効果には著しいものがある。しかし、多剤併用をもっても、体内からウイルスを完全に駆逐することは今のところ不可能であり、ヨーロッパでは未治療患者の中ですでに10％をこえる耐性ウイルスが検出されたとの観察もなされている。当センターでは血中ウイルスRNA量の定量や薬剤耐性ウイルス株の検出など治療効果判定に必須の研究を医療現場との協力で活発に行っている。

エイズ研究センターは1988年発足以来15年が経過した。この間、多数の臨床サンプルの解析を行い、感染者の病態診断、治療効果の判定や抗エイズ薬の臨床試行に寄与してきた。さらに、ウイルスの解析、疫学的情報の収集と解析、病態の解明、診断法の開発、新しい予防治療法の開発、エイズの病態と発症機構の解析や動物モデルの開発等の研究を行っている。特にHIVライフサイクルにかかわる宿主側因子の同定の試みが活発になされている。一方、組換えウイルスベクターやDNAワクチンなどの分子生物学的手法を応用した新規細胞性免疫誘導型エイズワクチンの開発研究およびHIV感染防御免疫機構の解析をマカクサルエイズモデルにより検討中である。特に、リコンビナントBCG-HIVワクチン及び安全性に優れたリコンビナントワクシニアDIsワクチン、センダイウイルスベクターとDNAワクチンの併用免疫法という2種のコンビネーションレジメンは、マカクサル実験において良好な細胞性免疫の誘導と感染防御効果を示している。前者に関しては、タイ国との共同研究が進行中である。また、独特の糖鎖変異ウイルスを用いた弱毒生ワクチンの開発研究も行われている。これらのサル感染モデル系を用いることにより新しいコンセプトでのワクチン開発研究をはじめ、病態の解析、種々の抗ウイルス薬の評価が可能となった。また、タイに続いて、近年流行の急速な拡大が憂慮されているミャンマー、カンボジア、ベトナム、中国などアジア各国におけるHIV流行株に関する解析も進められ、貴重な成果を挙げている。

当センターはまた、業務活動の一環として、HIV体外診断薬の検定、依頼検査を行うと共に世界各国のエイズ関連技術者や医療従事者・保健行政の職員を対象としたエイズ対策の国際研修や国内の地方衛生研究所関係者の診断技術講習会を継続して開催している。国際協力事業団(JICA)のエイズプロジェクト等にも積極的に協力し、平成10年発足の「タイNIH機能向上プロジェクト」と「ザンビア国エイズ及び結核対策プロジェクト」を推進している。このように、当センターの活動は一層国際的な展開をみせている(表1)。一方、厚生労働省、文部科学省、HS財団等の研究費による班研究等にも多数参加した(表2)。

人事では、ウィスコンシン大学、駒野淳博士が研究員として第3室に採用(平成14年4月1日付)、扇本真治主任研究官が神戸大学に出向(4月1日付)、俣野哲朗助教授（東京大学）が併任(4月1日付)、竹田誠研究員（第2研究グループ）が辞職(7月1日付)、エイズ予防財団レジデント、草川茂博士が主任研究官へ就任(7月1日付)、巽正志主任研究官（獣医科学部）が併任(9月1日付)、また、有吉紅也主任研究官がタイ王国国立衛生研究所に派遣された（9月27日付）。さらに、明里宏文主任研究官（筑波医学実験用霊長類センター）の併任が認められた(11月1日付)。

当センターの運営に当たっては倉田毅副所長、佐多徹太郎感染病理部長、岡部信彦感染症情報センター長、竹森利忠免疫部長、小室勝利血液・安全性研究部長、寺尾恵治筑波医学実験用霊長類センター長等多くの方の協力を得た。

研究の場に関しては改善はみられたものの、研究スペースの確保と統合は依然として最重要課題のひとつとなっている。

エイズ研究センター

表１．国際協力への参加状況

所属	氏名	期間	要請先	要件・目的
センター長	山本		JICA	ザンビア国エイズ及び結核対策プロジェクト （国内委員会委員長）
			JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト（国内委員会委員）
第一研究グループ	本多	H14.4-H15.3	JST	研修生受け入れ：タイ国
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.2.5-6	JST	タイエイズプロジェクトの最終シンポジウム出席
		H15.3.5-7	日米医学協力研究会	第 15 回日米エイズ会議出席
	仲宗根	H14.4-H15.3	JST	研修生受け入れ：タイ国
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.2.5-6	JST	タイエイズプロジェクトの最終シンポジウム出席
		H15.3.5-7	日米医学協力研究会	第 15 回日米エイズ会議出席
第二研究グループ	杉浦	H15.1.13-18	JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト短期専門家
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.1.14-3.19	JICA	第 15 回臨床感染症学研修講師
		H15.2.17-4.12	JICA	研修生受入
	阪井	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
	有吉	H14.9-H16.2	JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト長期専門家
	横幕	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
第一室	武部	H14.6.26-29	文部科学省	基盤研究(A-2) 海外学術研究に基づく共同研究 第４回日中ウイルス学会に出席（中国昆明）
		H14.8.6-13	文部科学省	基盤研究(A-2) アジア型 HIV-1 ヴァリアントのウイルス学的解析に関する共同研究のため（米国）
		H14.9.8-18	文部科学省	基盤研究(A-2) 2002 年ヒトウイルス学研究所国際会議出席及び米国における共同研究者との研究打合せのため（米国）
		H14.10.31-11.4	文部科学省	基盤研究(A-2) The Sino-US Conference on Research and Training in AIDS-Related Areas (NIH-中国 CDC 共催)への出席および研究発表（中国）
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.2.9-17	厚生労働省	エイズ対策研究事業 第 10 回国際レトロウイルス･日和見感染症会議出席と米国における共同研究者との研究打合せのため（米国）
		H15.3.5-7	日米医学協力研究会	第 15 回日米エイズ会議出席（沖縄）
		H15.3.16-21	エイズ予防財団	海外委託研究事業に基づく共同研究 タイ・ミャンマーにおけるエイズ流行とその背景にある宿主要因に関する分子疫学的調査研究のため（タイ・ミャンマー）
	椎野	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
	草川	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
第二室	吉原	H14.4.15-23	WHO	オーストラリア精度管理会議出席
		H14.7.5-6	JICA	ワクチン予防対策集団研修コース講師
		H14.7.24	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修講師
		H14.8.12-13	JICA	HIV/ATL 集団研修コース講師
		H14.8.22-23	JICA	HIV/ATL 集団研修コース講師 実習
		H14.10.8-18	JICA	エジプト感染症対策技術研修コース短期専門家
		H14.11.11	JICA	感染症対策技術研修コース講師
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.1.9-2.4	JICA	カンボディア国結核対策プロジェクト短期専門家
		H15.2.14	JICA	臨床感染症集団研修コース講師
		H15.2.17-18	JICA	ナイジェリアエイズ対策集団研修コース講師
	鈴木	H14.8.22-23	JICA	HIV/ATL 集団研修コース講師 実習
		H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師

エイズ研究センター

所　属	氏　名	期　間	要　請　先	要　件　・　目　的
第三室	松　田	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H15.3.17-21	JICA	タイ NIH 機能向上プログラム短期専門家 HIV/AIDS 研究（レトロウイルス学研究）HIV の分子生物学講師
	森	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
	石　川	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師
		H14.7.25	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修講師
		H14.10.28	エイズ予防財団	アジア地域エイズ専門家研修講師
		H15.2.12	JICA,国際医療ｾﾝﾀｰ	第 15 回臨床感染症学研修分子疫学入門講師
	駒　野	H15.1.14-2.21	JICA	第 10 回エイズのウイルス感染診断検査技術コース講師

表２．厚生労働科学研究等への参加状況

所　属	氏　名	要 請 機 関	課　　題
センター長	山　本	厚生労働省	エイズ対策研究事業「エイズ対策研究事業の企画と評価に関する研究」主任研究者
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「細胞性免疫誘導型プライムブーストエイズワクチンの臨床評価系の確立」主任研究者
		文部科学省	特定領域研究(C)「感染の成立と宿主応答の分子基盤」（研究代表者：永井美之　富山県衛生研究所）
第一研究グループ	本　多	JST	アジア、太平洋地域型国際共同研究事業「日-タイ共同クレイド E 型エイズワクチン研究プロジェクト」代表研究者
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究」主任研究者
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「エイズ治療薬開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用」（主任研究者：永井美之　富山県衛生研究所）
		JST	研究情報データベース化支援事業「HIV 感染症統合データベースの構築」アドバイザリー委員（代表研究者：仲宗根正）
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・創薬等ヒューマンサイエンス研究：第５分野健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究「レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用」（主任研究者：若宮伸隆　旭川医科大）
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「リコンビナントタイプ HIV ワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクションの可能性の検討」(主任研究者：仲宗根正)
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「小動物モデルを用いた抗エイズ薬評価スクリーニング系の開発」（主任研究者：辻本元　東京大学）
	仲宗根	JST	研究情報データベース化支援事業「HIV 感染症統合データベースの構築」代表研究者
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「リコンビナントタイプ HIV ワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクションの可能性の検討」主任研究者
		JST	アジア、太平洋地域型国際共同研究事業「日-タイ共同クレイド E 型エイズワクチン研究プロジェクト」（代表研究者：本多三男）
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「日本の HIV-1 の遺伝子・分子生物学的解析（集団的解析）」（主任研究者：佐藤裕徳）
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV 構造遺伝子と HIV 制御遺伝子のコンビネーションワクチンの開発に関する研究」（主任研究者：本多三男）
第二研究グループ	杉　浦	医薬品機構	「テーラーメイド治療を目指した HIV 治療法の開発」（主任研究者：岡慎一　国立国際医療センター）
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「薬剤耐性のモニタリングに関する技術開発研究」主任研究者
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV-1 の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬剤開発のための研究」主任研究者
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV の検査法と検査体制を確立するための研究」（主任研究者：今井光信　神奈川県衛生研究所）

エイズ研究センター

所　属	氏　名	要請機関	課　　題
	阪　井	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV感染予防に関する研究」（主任研究者：竹森利忠　免疫部）
	有　吉	厚生労働省	エイズ対策研究事業「東アジア及び太平洋沿岸地域におけるHIV感染症の疫学に関する研究」（主任研究者：武部豊）
		HS財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「HIV特異的免疫療法開発に関する基礎的研究」（主任研究者：岩本愛吉 東京大学医科学研究所先端医療研究センター）
	横　幕	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」(主任研究者：佐藤裕徳　遺伝子解析室)
		HS財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「HIV特異的免疫療法開発に関する基礎的研究」（主任研究者：岩本愛吉　東京大学医科学研究所先端医療研究センター）
第一室	武　部	厚生労働省	エイズ対策研究事業「東アジア及び太平洋沿岸地域におけるHIV感染症の疫学に関する研究」主任研究者
		文部科学省	基盤研究(A)(2)「アジアにおけるエイズ流行とその背景にある宿主要因に関する分子疫学的調査研究」研究代表者
		HS財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「HIV亜種解析によるHIVワクチンの開発」（研究代表者：石川晃一）
第二室	吉　原	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIVの検査法と検査体制を確立するための研究」（主任研究者：今井光信　神奈川県衛生研究所）
		厚生労働省	医薬安全研究事業「医療用具関係の国際ハーモナイゼイションに関する研究」（主任研究者：土屋利江　国立医薬品食品衛生研究所）
		厚生労働省	国際医療協力研究委託事業「特殊感染症等の疫病情報の収集システムの構築及び活用に関する調査研究」（主任研究者：蟻田功　国際保健医療交流センター）
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV感染症に関する臨床研究」（主任研究者：石川信克　財団法人結核予防会結核研究所）
第三室	松　田	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIVおよびその関連ウイルスの増殖機構および増殖制御に関する研究」（主任研究者：佐藤裕徳　遺伝子解析室）
		JST	重点研究支援事業「プロテオーム解析（プロテオミクス）による感染症の研究」（総括責任者：西島正弘　細胞化学部）
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「HIV-1の遺伝子発現とウイルス増殖を制御する新たな治療薬剤開発のための研究」（主任研究者：杉浦亙）
	森	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV感染予防に関する研究」（主任研究者：竹森忠利　免疫部）
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「エイズ治療開発のためのサル評価スクリーニング系の開発とその応用」（主任研究者：永井美之　富山衛生研究所）
		ＨＳ財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「ヘルパーＴ細胞活性化を誘導するエイズワクチンの開発」主任研究者
		ＨＳ財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「HIV抵抗性を決定する新規宿主遺伝子の同定によるワクチン戦略の開発」（主任研究者：宮澤正顯　近畿大学医学部）
	石　川	HS財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業・エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント「HIV亜種解析によるHIVワクチンの開発」主任研究者
	駒　野	厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」（主任研究者：佐藤裕徳　遺伝子解析室）

研 究 業 績

I. エイズワクチンの開発

１．プロトタイプワクチンの開発

Whole Gag を標的にした HIV 候補ワクチンは SIV のホモローグで病原性ウイルスの感染を防御し、400 日以上にわたって検出限界以下にコントロールされていることからウイルス血症の再発を長期にわたって抑えることが可能なレジメンであることが示唆された。本年度の研究では rBCG プライミング rDls ブースターによるレジメンが HIV-1 clade E gag の免疫によるヒトへの投与可能量とルートで免疫誘導が充分に起こりうることがマウス及びサルを用いた実験で明らかにされた。さらに、サル41匹を用いた安全性、免疫原性、環境汚染に関してもその有用性が明らかにされた。現在、タイのワクチン開発グループを中心にしたタイ国 FDA へのシードロットアプローバルの申請書類を作成中である。

rDls/SIVgag 皮内接種による細胞性免疫誘導とウイルス感染防御効果の解析

弱毒化ワクシニア Dls 株をベクターとして、Simian immunodeficiency virus (SIV)の構造遺伝子 gag を発現する組み替えワクチン (rDls/SIVgag) を構築し、その有用性を解析した。

rDls/SIVgagを 10^6及び 10^7 PFU/monkeyでカニクイザルに 2 回皮内接種し、Gag特異的免疫誘導の評価として、リンパ球増殖試験、IFN-gamma ELISPOTアッセイ、Flow cytometry を利用した細胞内IFN-gamma染色による解析を行った。結果、rDls/SIVgagワクチンは、2 回接種により有意な免疫誘導が認められた。キメラウイルスSHIV C2/1 の経直腸感染に対する防御効果を解析したところ、免疫群ではCD4 陽性Tリンパ球減少及び血漿中ウイルスRNAコピー数増加を抑制することが認められ、同時に高い細胞性免疫の誘導が認められた。

[泉泰之、網康至（動物管理室）、仲宗根正、松尾和浩、染谷健二、山本直樹、本多三男]

BCG をベクターに用いたエイズワクチンの開発

SIV *gag* 全遺伝子を組み込んだ組み換え型 BCG (rBCG-SIV Gag) の免疫誘導能の解析

rBCG-SIV Gag の免疫誘導能についてモルモットを用いて解析した。0.1 mg 皮内接種 1 回または 80 mg 経口投与 2 回のいずれかで免疫したところ、両免疫群で PPD および Gag p27 に対する DTH 反応が観察された。Gag に対する DTH 反応は免疫 50 週後でも安定して誘導された。免疫後 20 週目に細胞増殖試験を行なったところ、両群由来の PBMC で PPD、Gag 特異的な反応が検出された。免疫後 50 週目に抗原特異的なIFNγの発現亢進をreal-time RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、両群から分離した PBMC および脾臓細胞で PPD、Gag 特異的な IFNγの発現亢進が検出された。しかしながら、両群の iIEL, LPL においては、それらの反応は認められなかった。また、両群共に PPD、Gag 特異的な血清 IgG 抗体価が高く維持されていた。これらの結果は、rBCG-SIV Gag はウイルス抗原特異的な細胞性および液性免疫反応を長期にわたり誘導・維持できることを示す。この候補ワクチンの粘膜免疫誘導能は、今後更に検討が必要である。

[川原守、本多三男]

HIV-1 subtypeB 由来 Gag 蛋白質を発現する組み換えワクシニアウイルス Dls 株(rDls-gagB)によるサルでの免疫誘導能の解析

rDls-gagBの免疫誘導能をカニクイザルを用いて詳細に解析した。10^6 pfuを 2 回i.v.投与した後、Gag特異的細胞性免疫誘導を調べた所、リンパ球増殖反応、Crリリースによる CTL 反応、IFN-γ ELISPOT 反応のいずれも陽性で、ELISPOT陽性細胞数は、防御免疫に必要なレベルまで達していた。今後、AIDS治療ワクチンへの応用を視野に入れ、env, pol遺伝子の導入を検討する。

[松尾和浩、泉泰之、浜野隆一、網康至（動物管理室）、本多三男]

サブタイプ E 型 HIVgag を発現するリコンビナント Dls の細胞性免疫誘導及び安全性の評価

BCG 及び弱毒化ワクシニア Dls 株をベクターとして、クレイド E 型 HIVgag を発現する組み替えワクチン (rBCG/SIVgag 及び rDls/SIVgag) を構築し、その有用性及び安全性についてカニクイザルを用いて解析した。

rBCG/HIVgagE（oral 80mgまたはi.d. 0.1mg～10mg）でprimingし、rDls/HIVgagE（10^7PFU）でboostした。IFN-γ ELISPOTにより解析した結果、コントロール群と比較して、有意なGag特異的細胞性免疫誘導が認められた。詳細な解析は引き続き解析中である。

また、この組み換えワクチンを過剰量（rBCG/HIVgagE; oral-800mg, i.d.-50mg, rDls/HIVgagE; i.d.-10^8PFU）接種したが、顕著な血液学的、病理学的変化は認められず、安全性の見通しが立った。

[泉泰之、本多三男]

HIV-1 由来 gp120、gp41 を発現する組み換えワクシニアウイルス Dls 株の構築

HIV-1 由来の envelope をターゲットとした候補ワクチンの一つとして、gp120、gp41 を各々発現する組み換えワクシニアウイルス Dls（rDls）株の構築を検討した。PCR で増

幅した gp120、gp41 遺伝子を Dls 組み換え用ベクターにクローニングし、rDls-LacZ 感染 chick embryo fibroblast（CEF）初代培養細胞にトランスフェクション後、X-gal 含有寒天培地上で組み換えウイルスを選択した。クローニングしたウイルスについて CEF での発現を現在確認中であり、発現株が得られ次第マウスでの免疫応答を解析する予定である。
[堀端重男、松尾和浩、本多三男]

二種類の HIV 抗原を同時に発現する組み換えワクシニアウイルス Dls 株の構築

様々な HLA ハプロタイプで抗原提示可能な CTL エピトープをワクシニアウイルス Dls 株に組み込むためには単一のプラスミドに複数の抗原発現ユニットを導入することが必要となる。今回、SIVmac 由来の Gag 抗原と HIV-1 由来の gp120、gp41 抗原を Gag-gp120、Gag-gp41、gp120-gp41 という組み合わせでその両方の遺伝子を単一の Dls 組み換え用ベクターにクローニングし、Dls 株での発現を検討した。Gag 抗原については感染細胞上において発現が確認できたが、二種類の抗原を組み込んだ場合の抗原の発現強度、抗原の発現に関して現在検討中である。
[堀端重男、松尾和浩、本多三男]

リコンビナントワクシニアウイルスワクチン（rDls-SIVgag-pol）によるマウスでの経鼻免疫による免疫能の検討

天然痘ワクチンは従来皮内接種で行われてきており、rDls-SIVgag-pol も皮内接種により全身性免疫が誘導できることが既に確認されている。しかし、HIV 感染の 8 割以上が性交感染であり、この感染経路の最大の防御となる粘膜面に対し rDls-SIVgag-pol が有効であるかどうかは検討されていない。そこで、rDls-SIVgag-pol によるマウスでの経鼻免疫による免疫能の検討を行った。rDls-SIVgag-pol を鼻腔に免疫したマウスでは、全身性の免疫のみならず腸管、膣等に抗体産生が見られた。また、腸管上皮細胞間リンパ球で顕著な細胞障害性リンパ球が確認された。さらに、従来の皮内免疫方法と比較して有意に SIVgag 特異的免疫が誘導されていた。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

リコンビナントワクシニアウイルスワクチン（rDls-SIVgag-pol）によるマウスでの経口免疫による免疫能の検討

rDls-SIVgag-pol をマウスで経鼻免疫したところ、顕著な SIVgag 特異的免疫が誘導されていたため、この免疫方法と比較するため rDls-SIVgag-pol によるマウスでの経口免疫による免疫能の検討を行った。rDls-SIVgag-pol を鼻腔に免疫したマウスでは、全身性の免疫のみならず腸管、膣等に抗体産生が見られ、SIVgag 特異的ヘルパー機能も確認できたが、いずれも同用量での経鼻免疫を行った場合と比較して特異的免疫誘導能は低かった。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

リコンビナントワクシニアウイルスワクチン（rDls-SIVgag-pol）によるマウスでの経鼻免疫でのコレラトキシンアジュバントの有効性の検討

rDls-SIVgag-pol をマウスで経鼻免疫したところ、顕著な SIVgag 特異的免疫が誘導されていた。この免疫能をさらに高めることを目的として、代表的な粘膜アジュバントであるコレラトキシンを用い rDls-SIVgag-pol によるマウスでの経鼻免疫でのコレラトキシンアジュバントの有効性の検討を行った。rDls-SIVgag-pol とコレラトキシンを併用した群では、rDls-SIVgag-pol 単独接種群と比較して特異的抗体産生能は差がなかった。また、SIVgag 特異的ヘルパー機能は逆に rDls-SIVgag-pol 単独接種群よりもコレラトキシンを併用した群で低かった。これは、コレラトキシンにより抗 rDls 免疫が誘導されウイルスベクター自体が排除されたためであると推測する。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、萩原由加利（北里研究所）、駒瀬勝啓（北里研究所）、山本直樹、本多三男]

リコンビナントワクシニアウイルスワクチン（rDls-SIVgag-pol）によるマウスでの経口免疫での BCG のアジュバント効果の検討

rDls-SIVgag-pol をマウスで経口免疫したところ、SIVgag 特異的免疫が誘導されていた。この免疫能をさらに高めることを目的として、BCG の経口アジュバント効果の検討を行った。rDls-SIVgag-pol と BCG を併用した群では、rDls-SIVgag-pol 単独接種群と比較して血清中の特異的抗体産生能は差がなかったが、糞抽出液中の特異的抗体産生能は逆に rDls-SIVgag-pol 単独接種群よりも BCG を併用した群で低かった。これは、BCG により抗 rDls 免疫が誘導されウイルスベクター自体が排除されたためであると推測する。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

リコンビナントワクシニアウイルスワクチン（rDls-SIVgag-pol）によるマウスでの経皮免疫による免疫能の検討

経皮免疫は近年、粘膜免疫を誘導する免疫方法として注目されている。しかし、これらの検討は蛋白質を抗原とした研究に限定されている。そこで、ライブウイルスベクターである rDls-SIVgag-pol によるマウスでの経皮免疫による免疫能の検討を行った。rDls-SIVgag-pol を経皮免疫したマウスでは、腸管、膣等に抗体産生が見られ、これらの抗体価は経鼻免疫を行ったときのマウスと同等であ

った。本研究は、アジュバントを使用せずライブウイルスベクターで顕著に特異的粘膜免疫を誘導できた世界初の成功例である。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

２．第２世代ワクチンの開発

液性免疫志向型ワクチンの開発を V3 領域の連続免疫法により cross reactive な高力価の抗体が誘導されることを明らかにし、現在、中和能の解析中である。さらに細胞性免疫志向型ワクチンの改良を試み rBCG ワクチンがコドンの至適化によって外来性抗原の発現が増強し、免疫誘導が増強されることを明らかにした。今後の BCG をベースにしたリコンビナントワクチンの開発が急速に進むものと期待される。

組換え BCG-HIV ワクチンのコドン至適化による Low-dose 免疫法の確立

従来行われてきた組換え BCG-HIV ワクチン開発では、HIV 特異的免疫応答を誘導するのに、通常の抗結核ワクチンの 10- 100 倍の投与量が必要とされてきた。そこで組換え BCG の外来抗原発現を増強させることで Low-dose 免疫による特異的免疫応答の誘導が可能か検討した。コドン改変 HIV 遺伝子を導入した組換え BCG では約 40 倍の発現増強がみられ、またマウスに免疫したところ抗結核ワクチンの場合と同等の Low-dose 免疫によって HIV 抗原特異的なリンパ球増殖応答、IFN-g 産生細胞誘導、および抗体誘導が可能であることを確認した。このコドン至適化組換え BCG ワクチンの開発は、今まで不可能とされてきた Low-dose 免疫法を確立するとともに、HIV ワクチンとしての有用性を飛躍的に高めるものであると考えられる。
[兼清優、松尾和浩、濱武牧子、山本直樹、本多三男]

HIV-1 Gag 及び V3 epitope を発現する組み換え BCG の中和抗体誘導能

CTL と中和抗体の両方を誘導できるワクチン開発を目指して、HIV subtypeE の whole Gag 抗原と V3 エピト- プ (E12: 12mer)-α抗原融合蛋白質の両方を発現する単一の組み換え BCG 株 0.1mg をマウスに接種し、抗原発現、中和抗体産生能を、E12 単独発現 BCG 株と比較した。抗原発現レベル、菌の生育速度、血清 IgG の 92TH022 株中和活性とも、ほぼ同等であり、この手法で複数の抗原に対する免疫応答が得られることが示唆された。
[松尾和浩、浜野隆一、Duanthanorm Thawaranantha（NIH・Thai）、Kruavon Balachandra（NIH・Thai）、 Nathanun Phoosri（NIH・Thai）、Napasawan Boonsathorn（NIH・Thai）、本多三男]

HIV-1 subtypeE の感染性分子クローンの確立

HIV-1 subtypeE のコンセンサスに極めて近い配列を持つ 92TH022 をベースに、gag p17 領域を種々の臨床株由来の配列と置換することにより、MAGIC5 細胞に感染性を持つ分子クローンを得た。ただ、PBMC での感染性は低く、改良を検討中である。
[松尾和浩、浜野隆一、阪井弘治、本多三男]

SIV gag pol 遺伝子を組み込んだ複製欠損型ワクチニアウイルス Dls 株のウイルス学的、免疫学特性の解析

HIV 候補ワクチンとして開発が進められている複製欠損型ワクチニアウイルス Dls 株をベースとした組み換えワクチニアウイルスのウイルス学的特性の解析を行った。SIV の gag-pol 遺伝子を組み込んだワクチニアウイルス Dls 株(rDls-SIVgagpol)の哺乳類細胞に対する感受性と挿入遺伝子産物の発現を確認するために BHK-21 及び RK-13 細胞を用いて経時的な感染価測定と蛍光抗体法ならびに ELISA による遺伝子産物の発現を調べた。その結果、rDls-SIVgagpol はこれら細胞株で増殖できないが、外来遺伝子産物は発現させることが確認できた。組み換えによるウイルス粒子形成の影響を確認するため、培養に用いる鶏胚細胞に rDls-SIVgagpol を感染させて電子顕微鏡による観察をおこなったところ、ワクチニアウイルス特有の形態と大きさのウイルス粒子が確認できた。さらに、マウスを用いた免疫原性の確認をおこなったところ、挿入遺伝子産物である SIV 抗原に特異的な細胞性免疫応答が誘導されていることが確認できた。
[染谷健二、泉泰之、松尾和浩、本多三男]

DNA プライム／rDls ブーストワクチネーションで誘導された免疫能の評価

SIV gagpol遺伝子をコードするDNAワクチンとSIVgagpol遺伝子を挿入した組み換えワクチニアウイルスDls株(rDls-SIVgagpol)を用いたプライム／ブーストワクチネーションによりカニクイサルに誘導された免疫能の解析を行った。DNAワクチンまたはrDls-SIVgagpolを単独接種した場合に比べ、プライム／ブーストワクチネーションで誘導される免疫応答は有意に強いことが確認できた。さらに病原性SHIVチャレンジによる防御反応もそれぞれのワクチン単独接種に比べて有意に強いことが$CD4^+$T細胞数及び血漿中のウイルス量の解析から明らかとなった。
[染谷健二、網康至（動物管理室）、泉泰之、忻克勤（横浜市立大学）、奥田研爾（横浜市立大学）、山本博（富山医科薬科大学）、上坂浩実（富山医科薬科大学）、仲宗根正、本多三男]

非ヒト霊長類モデルにおける C4/V3 ペプタイドの連続免疫法による免疫誘導

近年、HIV 感染における主要な感染防御免疫として液性免疫の重要性が明らかになり、ウイルス中和抗体を誘導するワクチン開発の妥当性も明らかとなった。しかし従来の液性免疫指向型ワクチンではウイルスを広範に中和する抗体を誘導することは困難であり、新たな液性免

疫指向型ワクチンの開発が期待されている。本研究では交差反応性のウイルス中和抗体を誘導することを目的として、非ヒト霊長類モデルにおいて、ヘテロ C4/V3 ペプタイドの連続免疫による免疫誘導の検討を行った。結果、免疫 4 週目以降いずれのサルにおいても血清中抗 V3 lgG 抗体が上昇し、複数の V3 に対して強い交差結合性を示した。また免疫 36 週目においても交差性抗 V3 抗体価は高いレベルで維持された。このことから C4/V3 液性免疫指向型ワクチンの有用性が明らかとなり、感染防御実験の結果が期待される。
[兼清優、吉野直人、網康至（動物管理室）、矢野明（科学院）、西澤俊樹（科学院）、山本直樹、本多三男]

C4/V3 リポペプタイドワクチンの作製および免疫誘導能の評価

C4/V3 ペプタイドの連続免疫することによって顕著な交差性抗 V3 結合抗体が誘導されることから、この免疫ストラテジーを応用したアジュバントフリーのワクチン開発を検討した。ペプタイド自身の抗原性を増強させ、さらなるアジュバントの添加を必要としないことを目的として、ペプタイド末端にパルミチン酸を付加した C4/V3 リポペプタイドを作製した。作製したリポペプタイドをマウスに免疫したところ、腹腔、皮下投与のいずれの群においてもリポペプタイド単独での特異的抗体誘導は低く、アジュバントを併用した群においてもパルミチン酸非付加ペプタイドの場合と比較して同等であった。これは付加した脂肪酸が単一のパルミチン酸であったため十分なアジュバント効果が得られなかったものと推測される。
[兼清優、吉野直人、矢野明（科学院）、西澤俊樹（科学院）、西島正弘（細胞化学部）、山本直樹、本多三男]

II. 抗エイズ候補物質の開発

中和抗体を能動免疫によって *in vivo* で機能するレベルまで上昇させることは現在のところ不可能であるので受動免疫による中和抗体療法を検討した。これまで中和抗体としての抗 V3 抗体は型特的であり、HIV のような変異性に富むウイルスの制御に関しては臨床応用が不可能であった。これらの課題に関して多くの研究室で cross reactive な抗体の産生の試みがなされている。しかし、現在のところその抗体を産生することができるのは化血研で開発された Sequential Immunization による方法のみである。この方法によって免疫された動物より得られるモノクローナル抗体遺伝子をヒト型化して臨床応用を目的とした受動免疫用の中和抗体が化血研で開発された。その防御免疫能を *in vitro* 及び *in vivo* で解析し、以下に示すように広範な primary isolate の中和能を有することが明らかとなった。さらにサルによる評価で病原性ウイルスの感染を完全に防御した。これらの結果から現在米国で Phase IB Trial を行う準備が完了しつつある。

１．HIV-1 の接着、侵入機構の解析

目的：現在まで、GPGR に対する m-Ab、KD-247 が T-tropic のみならず、中和されにくいとされる M-tropic の primary isolate も中和可能であることが分かった。この Ab を用いた場合、virus の接着をどの程度阻止できるか、またどの程度の時間で virus は細胞に接着するかを検討した。方法：virus を Ab の存在下、または非存在下で細胞に 10〜60 分間感染させ、その後 virus を洗浄除去してから、一方は細胞を 3%トリプシンで破壊し P24 を測定し、もう一方はさらに 1 週間培養を続け上清中の P24 を ELISA で測定した。結果：細胞上の P24 値は、Ab の有無とは無関係であった。侵入に関しては、培養 1 週間後の P24 値は Ab 存在下の方が非存在下の場合よりも 20~60 分の感染時間では 95%以上、10 分では 90%低下した。これらの結果より、Ab は free の virus と結合し、その複合体は細胞に接着はするが侵入はしないか、または virus が細胞に非特異的に過結合するため、Ab が free の virus を阻害することを目隠ししている可能性が示された。
[滝澤万里、村上利夫（化学及び血清療法研究所）、前田敏宏（化学及び血清療法研究所）、本多三男]

２．*In vitro* における mAb-KD-247 の抑制機序

KD-247 は HIV の env 内 V3 領域内の GPGR エピトープを認識するモノクロナール抗体である。昨年度に続き、この KD-247 の virus 抑制効果を検討した。Virus が細胞に接着後、侵入する前に KD247 を加えた場合の抑制効果を、TCLA、Primary isolate virus(PI)、また tropism の違いにより比較した。細胞が virus との接着のみで侵入が起こらないように、反応は 4℃で行った。用いた virus は、JRCSF(R5,PI)、92Th014(R5,PI)、MNP(X4,PI)、MN(X4,TCLA)および PAS(R5,TCLA)の 5 種類であった。結果は、virus が細胞に接着する前に KD-247 を加えた場合に比べ、接着後に加えた方が、やや低いもののすべての virus で中和効果が認められた。TCLA、Primary isolate virus(PI)、および tropism による違いは見られなかった。これらの結果から、KD-247 は free の virus に結合するだけではなく、細胞表面に接着した virus にも結合し、感染を阻害することが示唆された。
[滝澤万里、村上利夫（化学及び血清療法研究所）、前田敏宏（化学及び血清療法研究所）、本多三男]

３．Subtype B HIV-1 感染に対して中和能をもつ KD-247 モノクローナル抗体に対するエスケープウイルス出現；*in vitro* 解析系の構築

KD-247 モノクローナル抗体は、Subtype B HIV-1 に対して優れた感染中和能を有し、エンベロープ V3 配列中のクラウン領域を認識する事がこれまで明かされている。こ

の一方で、SHIV 感染サルに対してこの中和抗体を静脈投与すると、数日内にエピトープ中のアミノ酸配列が変化したエスケープミュータントウイルスが出現して大勢になる事を我々は見い出した。この様なエスケープミュータントの出現様式に対する単純な *in vitro* 解析系の構築を目指した。エピトープにマッチしたアミノ酸配列を持ち初期感染ウイルスの特徴を兼ね備える JR-CSF 株を、中和抗体存在下で毎週植え継ぎ10週間に渡り培養した。ウイルス投与量が少ない程、また存在抗体量が多い程、ウイルス産生は抑えられた。今後は、各時点のストックウイルスの配列及びコレセプター使用形質を解析し、中和抗体に対するエスケープの様式を解析したい。
[海津雅彦、網康至（動物管理室）、滝澤万里、阪井弘治、村上利夫（化学及び血清療法研究所）、江田康幸（化学及び血清療法研究所）、前田敏宏（化学及び血清療法研究所）、原敬志、仲宗根正、泉泰之、本多三男]

４．BCG 投与の NK 機能に与える影響

我々は、現在までにモルモットの細胞表面抗原の解析を行ってきた。昨年度は、抗体を用いてlymphocyte、monocyte、 granulocyte、 eosinophil、および kurloff cellを含む集団について、各々の集団 5 種類に分画できることを報告した。今年度は、これらの細胞集団をsortingし、その機能を解析した。Kurloff cellを含む集団はNK機能を有し、$CD4^+$、$CD8^+$、B-lymphocyteでは機能は見られなかった。また、BCG投与の影響を調べたところ、5mg IVまたは 0.1mg IDの投与条件で、NK活性は対照と比較し 2 倍に上昇した。これら 2 つの条件の間には有意な差は見られなかった。以上より、通常結核ワクチンに使用されているBCGの投与条件（0.1mg ID）では、十分な免疫効果が得られているものと考えられた。
[滝澤万里、松尾和浩、服部真一朗、本多三男]

５．MBP（Mannose Binding Protein）の HIV-1 に対する抑制効果―1

目的：HIV の外被や PBMC の表面には多数の mannose 分子が存在する。そこで我々は、MBP を用いて mannose を block することで HIV-1 を抑制できるか検討した。方法：HIV-1（M-tropic,Primary isolate/92Th016,JRCSF）と target cell（PBMC ならびに GOHST）を予め MBP と反応させてから両者を混合し、洗浄後 MBP を添加し、1 週間の培養後、PBMC に関しては上清中の P24 を ELISA で、また GOHST は GFP の陽性細胞率を FACS により測定した。結果：PBMC を用いた場合、MBP は濃度依存的に 92Th016 ならびに JRCSF を抑制したが、GOHST の場合は全く効果が認められなかった。target cell による抑制効果の違いについては、今後の検討課題である。
[滝澤万里、岸雄一郎（扶桑薬品工業）、本多三男]

６．MBP（Mannose Binding Protein）の HIV-1 に対する抑制効果―2

目的：mannose が virus ならびに PBMC(target cell)の両者に存在することにより、両者とも予め MBP と結合させることで、MBP に HIV-1 を抑制する効果があることが分かった。さらに、MBP の作用機構を明らかにするために、virus の PBMC 感染前後における MBP の作用を調べた。方法：①virus あるいは PBMC のどちらか一方を MBP でもう一方を medium で pre-incubation した後、両者を混合する。②virus を PBMC に感染させた後に MBP を添加し、virus を洗浄除去後、再び MBP を添加し MBP 存在下で 1 週間培養を行い、上清中の P24 を測定した。結果：virus ならびに target cell の両方に MBP を加えた場合と、virus のみに加えた場合とでは MBP の効果を差が見られず、target cell のみに加えた場合に効果は低下した。また、virus 感染後に加えた場合は抑制効果が見られなかった。以上の結果から、virus の mannose を block した方が target cell の mannose を block するより効果的で、感染後では MBP に効果がないことが示唆された。
[滝澤万里、岸雄一郎（扶桑薬品工業）、本多三男]

III. HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

１．HIV/AIDS ワクチン開発：候補ワクチン rBCG/rDls のプライム/ブースト法によるサルエイズモデルでの効果

我々が開発した候補ワクチンrBCG-gagとrDls-gagの生体での防御免疫能を明らかにするため、SHIV/サル経粘膜感染エイズ発症モデルを用いて評価した。rBCG-SIVgag（10mg, 皮下接種）とrDls-SIVgag（10^6pfu, 静脈接種）を用い、それぞれ単独群（カニクイサル各２頭、計４頭）、rDlsプライム/rBCGブースト群（３頭）、rBCGプライム/rDlsブースト群（３頭）に接種した。後２群ではプライム後 47 週目にブーストした。ブースト後７週目にSHIV-C2/1 KS661C（2000$TCID_{50}$、経直腸）を攻撃接種した。その後、経時的に末梢血CD4 細胞数と血漿ウイルス量を測定し、Naive& Vector Control群（３頭）と比較検討した。

コントロール群では感染後２週目にウイルス量がピークに達し、４週目以後高い Set-point viremia を持続した。末梢血 CD4 細胞数も２週目以後ほぼ０まで消失し、以後回復しなかった。感染半年後３頭中１頭が、感染８ヶ月後さらに１頭が AIDS を発症した。rBCG 単独 & rDls 単独群でもコントロール群と同等の Viremia と CD4 細胞数消失が観察された。rDls 単独のうち１頭は感染半年後に AIDS を発症した。rDls プライム/rBCG ブースト群では、２頭にコントロール群と同等の Viremia と CD4 細胞数消失が観察されたが、残り１頭では同等の Viremia を呈するにも関らず、感染 10 週目以後 CD4 細胞の中等度回復（300～800/μl）が見られた。この１頭は観察期間中 AIDS を発症しなかった。

一方で先の２頭は、感染後８ヶ月と 10 ヶ月で相次いで AIDS を発症した。rBCG プライム/rDls ブースト群では、コントロール群に比較して若干低い Peak viremia を呈した後、２頭は血漿中からウイルスが消失（検出感度以下）した。この２頭は感染後の CD4 消失が一過性で、感染 10 週目以後 300～900/μl を維持し、感染１年９ヶ月後の現在まで AIDS を発症していない。残り１頭は、コントロール群と同等の Set-point viremia と CD4 細胞消失が観察されたが、感染後１年５ヶ月まで AIDS を発症しなかった。rBCG プライム/rDls ブースト群と他群（失血死症例を除外）について、生存曲線で比べると明らかに rBCG プライム/rDls ブースト群に延命効果が確認された。

以上より、完全防御は得られなかったが、rBCG プライム/rDls ブースト群において血漿中ウイルスの消失、末梢血 CD4 細胞の維持および生存率の改善が確認された事から、同群には明らかに感染抑制効果が認められた。

[仲宗根正、泉泰之、松尾和浩、染谷健二、兼清優、浜野隆一、堀端重男、吉野直人、原敬志、滝澤万理、川原守、海津雅彦、浜武牧子、阪井弘治、山本直樹、本多三男、科学技術振興事業団、網康至（動物管理室）、篠原克明（バイオセーフティ管理室）]

２．サル AIDS モデルにおける感染進行と血中 IL-18 レベルとの相関解析

AIDS ワクチン開発のためには、AIDS ウイルスの感染初期に起こる現象を多角的に知る必要がある。その一環として、種々の Simian/human immunodeficiency virus (SHIV)を感染させたサル AIDS モデル（合計 9 頭）において感染初期の血中レベルが大きく変動する様なサイトカイン等をスクリーニングした。この結果、IL-18 がプライマリーバイレミアと同期して一過性にレベル上昇する事を見い出した。この一過性上昇は、感染の病原性が高い程ピーク値が高い傾向にあった。この結果は、サンプリング難のため知見に乏しいヒトの HIV 初期感染に新視点を提供する。IL-18 の病態への影響（あるいは単なる副産物か）が当面の検討課題であるが、将来的には IL-18 を標的にした AIDS ワクチン開発も検討対象になるかもしれない。

[海津雅彦、網康至（動物管理室）、仲宗根正、佐々木裕子（細菌第二部）、泉泰之、佐藤裕徳（遺伝子解析室）、高橋栄治（バイオセーフティ管理室）、阪井弘治、篠原克明（バイオセーフティ管理室）、中西憲司（兵庫医科大学）、本多三男]

Ⅳ. 日本および他の諸国における臨床ウイルス株の分離とその病態解析

HIV ワクチン開発の方向性のモニタリングに update な野生株の遺伝子学及び生物学的な解析は必須事項となっている。本研究室では日本における HIV 感染の解析を過去 16 年にわたって行っており、さらにタイ国との共同研究により野生株の解析 10 年間にわたって行ってきた。これらの臨床検体についてはすべて現地サイドにおける倫理委員会の承認を得て研究を行っている。

１．わが国における HIV 抗体陽性者からのウイルス分離とその特性解析

1988 年より HIV 抗体陽性者からのウイルス分離を行っており、今年度の検体数は 148 検体（hemophilia：121 検体・その他の感染：27 検体、陽性検体：26）で 2003 年 6 月時点で 3854 検体（hemophilia：2717 検体・その他の感染：1137 検体、陽性検体：824）に達した。これらのサンプルは血漿成分、細胞成分、それら DNA/RNA および分離臨床株として、レトロスペクテイブな解析のためにセットで保管されており、国内の研究者の要望に応じて分与されている。その結果は抗エイズワクチンの開発および感染者の治療指針の確立のための資料として役立てられている。

[仲宗根正、滝澤万里、染谷健二、海津雅彦、川原守、原敬志、吉野直人、泉泰之、本多三男]

２．日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析

日本に蔓延している HIV に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本の HIV について集団としての進化の動向を明らかにする。今年度は日本伝播 HIV の蛋白構造系統樹解析を試み、蛋白構造学的集団変異の傾向を検討した。

具体的には、まず統合計算化学システム MOE で動作する蛋白構造系統樹解析ソフトを開発した。次に変異原性の高さから進化研究に適しているとされる V3 部に着目し、同ソフトを用いて各種蛋白構造系統樹解析を行い次の結果を得た。

① 蛋白構造系統樹解析ソフトを開発した。
② 日本の HIV-1 Subtype B 集団は 10 年ほどの時間を経ても、その構造学的多様性は決まった傾向を持たずに推移していることが示唆された。
③ 蛋白構造系統樹解析法がウイルス進化を構造学的に追究できる新たな手法となり得る可能性が示唆された。
④ しかしながら、本手法の信頼性について今後の十分な検証が必要である。

[仲宗根正、原敬志、本多三男]

３．HIV-1 subtype C virus molecular clone の full genome sequence の解析

我が研究グループは clade E ワクチンの構築の礎を生かし、アフリカにおいて最も dominant な clade C をターゲットとしたワクチンを構築するため、Zambia の HIV 感染者より分離された virus の infectious な molecular clone を作成し、後の

動物を用いたワクチンの評価系に応用したいと考えている。またこの clone の full genome sequence を primer walking 法により解析することにより、HIV の genome のどの部位が感染性に関与しているのかを検討している。現在までに HIV 感染者 4 人から分離された 5 つの infectious clone の全塩基配列を明らかにしており、今後更なる人数の HIV 感染者における HIV genome を解析することにより、clade C ワクチン開発に大きく貢献できると考える。
[原敬志、巽正志（獣医科学部）、本多三男]

４．タイ北部地域における HIV 陽性患者検体の解析

タイ国 HIV 垂直感染における防御因子としての IL-16

タイ国北部地域の HIV 陽性患者コホートにおいて、母子感染検体を検索し、母親・臍帯血の IL-16 level は垂直感染成立グループよりも非成立グループの方が有意に低い結果となった。このことから、IL-16 が HIV の垂直感染の防御因子と成りうる可能性が示唆された。*in vitro* で IL-16 がウイルス増殖にどのように関与しているのかを検討した。IL-16 を前処理した PHS-blast に CBMC より分離した母親由来の HIV を感作し、37℃で 2 週間培養し、培養上清中の p24 抗原量を測定したところ IL-16 は濃度依存的に HIV の増殖を抑制する結果となった。このことから、IL-16 は垂直感染 HIV 防御の因子の１つである可能性が示唆された。
[原敬志、仲宗根正、浜野隆一、早川智（日大・医学部）、Tawee Chotpitayasunondh（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Paijit Warachit（NIH･Thai）、本多三男]

タイ北部地域における HIV 陽性患者検体の解析

タイ北部地域における HIV 陽性、陰性麻薬常習者(Drug User; DU)および性感染患者(Heterosexual; HS)の解析を継続して行った。今年度(4 月～11 月)の HIV-1 陽性検体数は 105 検体（follow up 含む）であった。それぞれの検体に対して臨床学および遺伝学的（CD4&8 counts, viral load, p24 antigen ELIZA, western blotting, virus isolation, env-V3, tat and gag p17 region sequence）解析を行った。env-V3, gag p17 region の解析から同地域の subtype は DU で 88%、HS で 97%が CRF01_AE であり、その他として subtype B'および B が確認され、CRF01_AE が predominant である事が示唆された。また同地域における新規感染は HS で１人のみであった。新規感染率が更に低下して来ており HIV/AIDS ワクチン治験の cohort 地設定に関しては周辺国を含めて考慮する必要性がある。
[浜野隆一、Pathom Sawanpanyalert（NIH･Thai）、Paijit Warachit（NIH･Thai）、野内英樹（結核研究所）、松尾和浩、原敬志、Sompong Sapsutthipas（JST）、本多三男]

５．母子感染解析

HIV 陽性の、母親 40 人、さい帯血 40 人および乳幼児 61 人（follow up 含む）における臨床学的および細胞表面マーカーの解析を行った。anti-retrovirus drug（AZT およびネビラピン）使用により母子感染率は前年度の約 7%より更に低下し乳幼児の mortality も同様に低下した。また、幼児の細胞表面抗原解析において、CD8+CD28-, CD38+, CD95+ cell で mean 3 months の HIV-1 陽性児と陰性児との間に有意差が見られた。
[浜野隆一、Tawee Chotpitayasunondh（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Naris Waranawat（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Paijit Warachit（NIH･Thai）、Warunee Punpanich（Rajavithi Hospital）、Wirnol Siriwasin（Rajavithi Hospital）、松尾和浩、仲宗根正、原敬志、Sompong Sapsutthipas（JST）、Jurairat Promjai（JST）、本多三男]

６．細胞性免疫の解析

上記 DU を対象とした vaccine strain gag overlapping peptides に対する細胞性免疫の解析を ELISPOT assay を用いて行った。HIV-1 seropositive DU は、20 人中 3 人(15%)が反応を示さなかったが 85%は良好な反応性を示した。HLA 解析は現在解析中で CTL epitope の同定には現段階では至っていない。また、15 HIV-1 seronegative DUs についても 10 DUs（67%）で同様に反応を示す症例があり HIV-1 抵抗性を持つ DU の存在が示唆された。同様に HIV-1 陽性母親から産まれた生後平均 16 ヶ月の 30 HIV-1 seronegative infants についても 19 infants（63%）において gag peptides に対して反応を示した。これらの反応を示す DU および infants は過去に HIV-1 に expose したことが示唆される。
[浜野隆一、Tawee Chotpitayasunondh（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Naris Waranawat（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Pathom Sawanpanyalert(（NIH･Thai）、Paijit Warachit（NIH･Thai）、野内英樹（結核研究所）、松尾和浩、原敬志、Sompong Sapsutthipas（JST）、Jurairat Promjai（JST）、本多三男]

V. HIV 感染症統合データベースの開発

エイズワクチン開発に重要な情報をデータベース(DB)化して公開（一部制限）し、HIV 関連研究者に活用してもらうことを目的として HIV 感染症統合データベース（略名：HIV-DB、URL：https://aids.nih.go.jp）を構築した。

本 DB では、国立感染症研究所・エイズ研究センターにおいて 1989 年から解析中の日本およびタイ国 HIV 感染者からのウイルス分離結果、遺伝子配列、蛋白構造情報などのウイルス遺伝子生物学的情報に加えて、臨床データを時系列に管理・検索可能となる統合 DB を構築し WEB 上で提供する。

DB 内容は、平成 15 年 3 月末現在、DDBJ の HIV 遺伝子 DB（82,447 件）に加えて、提供 HIV 感染者 572、ウイルス分離解析数 3217、C2V3 遺伝子解析数 361、V3 部蛋白構造解

析数 269(PDB 形式)、対応臨床データ（生年、性別、CD4 細胞数、ウイルス量、薬剤履歴、その他）からなる。主機能は、DDBJ の HIV 遺伝子データに対する遺伝子相同性検索、遺伝子系統樹解析、genosubtyping、独自の division 作成機能、V3 部蛋白３次元構造の閲覧機能、臨床データ検索機能である。

本 DB は、 研究情報データベース化事業の１つとして国立感染症研究所と科学技術振興事業団と共同で開発され、平成 14 年 10 月に WEB 公開された。

[仲宗根正、原敬志、染谷健二、本多三男、科学技術振興事業団]

VI. 薬剤耐性 HIV の遺伝子解析

今日、抗 HIV-1 治療薬剤はヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）が 6 種類、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）3 種類、プロテアーゼ阻害剤（PI）6 種類の合計 15 種類の薬剤がある。AIDS による死亡率は Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART)の導入により顕著に低下した。一方で、治療薬剤の持続的な使用により薬剤に反応しなくなる薬剤耐性ウイルスの出現が NRTI、NNRTI、PI いずれにも報告され、治療を進めるうえでの大きな障害として浮上して来ている。薬剤耐性変異ウイルスを検出することは適切な治療を進めるうえで重要かつ緊急な研究課題であり、我々は平成 8 年度より研究を開始し 6 年を経過している。当初10施設の協力で開始した追跡調査も平成 14 年度は 63 施設になり、解析を行った検体は 2002 年 12 月の時点で累積 4850 検体、995 症例である。1996 年以来薬剤耐性症例は増加の傾向が続いており、更なる追跡調査が必要と思われる。

[杉浦 亙、松田昌和、千葉智子、岡野愛子、山田兼雄（聖マリアンナ医）]

VII. 血中および細胞内における抗 HIV 薬剤濃度のモニタリング研究

治療薬剤が適切に服用されているか判断するために抗 HIV 薬剤の血中濃度測定の重要性が言われている。この研究では生体内における治療薬剤の動態をより詳しく理解するために、薬剤が作用する起点となる感染細胞内における薬剤の濃度測定とその動態についての解析を試みた。平成14年度は細胞内濃度測定技術の確立と基本的な情報を得るためにプロテアーゼ阻害剤の濃度を HPB-M(a)、MT-2、CEM 細胞株を用いた in vitro 実験を行った。細胞数、薬剤濃度、培養温度などの各種パラメーターを変えて測定を行いその影響を探った。その結果プロテアーゼ阻害剤の細胞内薬剤濃度はあるレベルまでは添加薬剤量濃度依存的に増加し、その後プラトーに達することが明らかになった。プラトー到達までの時間は短く、2-5 分以内であった。また細胞内においてプロテアーゼ阻害剤濃度は添加した薬剤濃度よりも数十-数百倍高い濃度で維持されており、何らかの濃縮機転が働いていることが示唆された。細胞内薬剤濃度の臨床的意義および濃縮メカニズムおよび薬剤排泄メカニズムについて解析を行っている。

[岡野愛子、杉浦 亙、加藤真吾（慶応大学）、田中理恵（慶応大学）]

VIII. ウイルスの増殖活性が低下したプロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 の病態解析

平成13年度に我々は、プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得し、ウイルス増殖能力が低下したウイルスにおいて、プロテアーゼの基質である gag に集積されてくる切断部位変異（cleavage site mutation CSM）と CSM 以外の部位に集積してくる変異（non-CSM）が共同してウイルスの増殖能力の回復に作用することを明らかにした。平成14年度はウイルスの増殖能力の低下が宿主細胞内での粒子形成にどのような影響を及ぼしているかを形態学的、組織学的に解析した。その結果、増殖能力の低下したウイルスでは細胞内における gag タンパクの輸送が障害されていることが明らかになった。

[Lay Myint、松田昌和、千葉智子、松田善衛、駒野 淳、杉浦 亙]

IX. 相同組み換えによる患者由来ウイルス再構築のためのベクターの作成

患者生体内のウイルスの性質や薬剤感受性などを把握するためにはウイルスを回収することが不可欠である。採血後数日経ってしまったような条件の良くない血液検体からもウイルスを効率よく回収してくるために、相同組み換えを利用したウイルス再構築技術の開発を行った。わが国ではサブタイプＢと CRF01_AE が多いことから、それぞれについてベクターを作成した。サブタイプＢ用のベクターは HXB2 を基本骨格に、pol 遺伝子を欠損させたもの（HRV3）と pol 遺伝子に加えて、gag の p6 から p24 までも併せて欠損させたもの（HRV5）を作成した。CRF01_AE 用のベクターはＮＨ１株を元にサブタイプＢ同様に HRV3E と HRV5E を作成した。HRV3、HRV5、HRV3E そして HRV5E それぞれについて遺伝子導入後逆転写酵素活性ピーク達成までの日数の比較を行った。ベクターの元となった親株同士を比較すると HXB2 の 9.1 日に対し NH1 は 16.5 日と NH1 において 7.4 日の遅延が認められた（$p<0.0001$）。相同組み換えになると HXB2 ベクターの場合 HRV3 で 18.4 日、HRV5 で 16.4 日目にピークが観察され、親株 HXB2 より約１週間の遅延が認められた。NH1 ベクターの場合も HRV3E で 23.9 日 HRV5E では 24.3 日と親株 NH1 より約１週間の遅延が認められた。相同組み換えでの遅延は相同組み替え効率に依存するものと考えら得る。NH1 ベクターの

場合、親株自体の増殖が遅いこともありウイルス回収まで４週間近く必要とするものもあり、今後より迅速に回収するための改良が必要と考えられた。またウイルス回収率の点においてもサブタイプ B 感染症例からの HXB2 ベクターによる回収率に比してサブタイプ E 感染症例からの NH1 ベクターによる回収率は低くこの点においても更なる改良が必要と考えられた。
[松田昌和、千葉智子、杉浦 亙]

X. HIV-1 感染力価を迅速に測定する T 細胞系のレポーター細胞株の樹立と実用化

感染性のウイルスを用いて薬剤感受性検査を行うには、感度の高い感染宿主細胞が必須である。我々は平成13年度までにヒト T 細胞由来の細胞株 HPB-M(a)細胞に LTR 制御のレポーター遺伝子（EGFP、RFP、firefly luciferase）を組み込み、HIV-1 の発現量を定量する新たな細胞株の樹立に成功した。光を発する細胞数はウイルスの感染力価との相関を示し、また firefly luciferase を組み込んだ細胞で産生された luciferase 活性は p24 抗原量で評価したウイルス量と相関した。平成14年度は測定精度を高めるために細胞数の補正ができるように LTR で制御されていないレポーター遺伝子（renila luciferase）を組み込んだ。その結果より再現性の高いデーターを得ることができるようになった。
[千葉智子、滝沢真理、松田昌和、松田善衛、本多三男、杉浦 亙]

XI. AZT 耐性 CRF01_AE（サブタイプ E）HIV-1 ウイルスの簡便検出法の開発

AZT は、母子感染予防などの目的で、近年発展途上国においても広く用いられるようになり、将来 AZT 耐性株の流行が憂慮される。平成 13 年度までに変異分離型 PCR（MS-PCR）の原理を応用、東南アジアに流行する CRF01_AE の AZT 耐性変異である M41L および K70R 変異を特異的かつ簡便・敏速に検出する PCR 法を開発したが、平成 14 年度は同じ手法を用いて新たに 3ＴＣ耐性変異 M184V を検出する方法を確立した。この方法では患者血漿中耐性変異株の割合が 10%程度であっても検出可能であり、また従来のシーケンス法と高い一致率を示した。今後耐性株の流行モニタリングに寄与することが期待される。
[レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、千葉智子、杉浦亙、シリパン・センアローン（タイ国立衛生研究所）、パニータ・パチバニッチ（タイ、ランパン県病院）]

XII. AZT 耐性 CRF01_AE（サブタイプ E）HIV-1 ウイルスの薬剤耐性変異の解析

HIV 感染者の 90%以上が生活する発展途上国ではサブタイプＢは必ずしも主流な流行株ではなく、むしろそれ以外のサブタイプが流行の大半を占めている。発展途上国では抗 HIV 薬剤は経済的な理由からほとんど使用されていなかった。しかしながら近年 generic medicine の使用が認められ、薬剤治療が行われるようになると、発展途上国においても薬剤耐性ウイルスの問題が浮上してきた。今まで薬剤耐性研究はサブタイプ B を中心に行われてきが、サブタイプ B の研究を中心に得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B にも当てはめることができるのか明確ではない。この研究では non-B における薬剤耐性の理解を深めるために、わが国で non-B として最も多いサブタイプ E の薬剤耐性変異パターンをサブタイプ B のパターンと比較解析した。その結果サブタイプＥでは nelfinavir に対する耐性変異が異なっていることが明らかになった。サブタイプＢでは D30N 変異を獲得することが多いのに対してＥでは D30N を取る確率は低く、代わりに N88S が獲得されることが明らかになった。
[有吉紅也、松田昌和、千葉智子、三浦秀佳、建石幸子、杉浦 亙]

XIII. 薬剤耐性 HIV-1 の分子進化解析

薬剤耐性変異が生体内でどのように選択進化していくか解明することは薬剤耐性の病態を理解するうえで重要である。共同研究者の田中 博らは同一個体から採取したウイルスの連続サンプルから、HIV などの病原性ウイルスの宿主内での進化プロセスを推測できる新しい計算方法「Sequential-linking アルゴリズム」を開発した。この方法では中立進化的な分子系統樹解析法と異なり、宿主との相互作用による正の淘汰進化の効果（多様化及び加速進化）を評価でき、ウイルス進化によく認められる準種の絶滅や復帰変異も扱えることが可能である。この方法をプロテアーゼ耐性変異の進化解析に適応した結果、HIV-1 配列の間の系統関係を示しただけではなく、薬剤耐性の宿主内進化、薬剤治療との相関、治療により正の淘汰進化が働いた箇所の同定が可能であった。
[杉浦 亙、松田昌和、千葉智子、柿澤淳子、田中 博（東京医科歯科情報）、任 鳳蓉（東京医科歯科情報）]

XIV. 新たな HIV-1 感染症治療薬剤の開発

薬剤耐性を獲得したために治療困難に陥った症例を救済するためには新たな治療薬剤、あるいは今までとはまったく異なる作用機序をもつ薬剤を開発する必要がある。この研究では既存のプロテアーゼ阻害剤に対して耐性を獲得したウイルスを標的にして感受性のある阻害物質、あるいは増殖能力の低下したウイルスを選択できるような阻害物質の開発と、新たに遺伝子組み込み酵素を標的にしたウイルス阻害物質の開発を目指し、合成化合物ライブラリーのスクリーニングを行なった。平成14年度は

12000 個の化合物ライブラリーについてプロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、ケモカインレセプター阻害剤の探索が終了した。その結果プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、そして侵入阻害剤それぞれ 13、24、10 個の合計 47 個の候補物質を見出した。
[厳 華、杉浦 亙、松田善衛、横幕能行、田中晴雄（北里大学）、千葉治美（北里大学）、野村伸彦（富山化学工業株式会社総合研究所）]

XV. 抗 HIV-1 薬剤の動態に関与する宿主因子多型の解析

薬剤の吸収代謝には種々の代謝酵素、膜タンパク分子が関与している。近年ヒトゲノム解析の進展に伴い、これらのたんぱく質をコードする遺伝子の特定部位に点変異が存在し（single nucleotide polymorphism: SNP）、特定の点変異と特定の薬剤の薬効が密接に関連していることが明らかになりつつある。この研究ではプロテアーゼ阻害剤の吸収に関与するとされている MDR-1（p-glycoprotein）の SNP と薬剤濃度、そして治療効果との関連を明らかにすることを目的とする。平成絵 14 年度は健常人 25 名および同意の取れた感染者 32 名について MDR-1 イントロン内の 3 箇所の SNP 解析を終了した。
[柿澤淳子、守谷研二、杉浦 亙、北村義浩（東大医科学研究所）]

XVI. マカクザルに異なった病態を惹起する病原性 SHIV の比較解析

SHIV-89.6P clone64（Clone64）ウイルスは、接種ザルに強度のウイルス血症を起こすにも拘わらず、強毒性 SHIV-C2/1 とは異なり、感染初期の CD4 陽性細胞の減少は一過性に止まり、3 年以上の経過観察でもエイズ様症状は引き起こさない。本研究では、昨年度に引き続き、Clone64 が惹起する特異的病態の原因となるウイルス側の遺伝的要因を明らかにするために、SHIV-C2/1 との組換えウイルスを作製し、培養細胞における性状解析を行った。その結果、単位ウイルス抗原量当りの感染価を数十倍増強させる変異が env 領域に存在することが特定された。これとは独立に、ウイルス産生量をやや増強させる変異がゲノム 5'半分に存在することが示唆された。
[阪井弘治、篠原克明（バイオセーフティ管理室）、高橋栄治（バイオセーフティ管理室）、louri L. Kozyrev（京都大学ウイルス研究所）、三浦智行（京都大学ウイルス研究所）]

XVII. Nevirapin および 3TC 耐性 CRF01_AEHIV-1 ウイルスの簡便検出法の開発

タイ政府が生産を開始したジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/Nevirapin 合剤)の普及に伴い、Nevirapine, 3TC に対する耐性 HIV-1 株の流行が憂慮される。そこで、変異分離型 PCR（MS-PCR）の原理を応用、Nevirapine 耐性変異 K103V および 3TC 耐性変異 M184V を特異的かつ簡便・敏速に検出する PCR 法の開発を試みている。この方法は、従来のシーケンス法と比べ安価で、高度な機材を要しないことから、今後発展途上国における耐性株の流行モニターリングに寄与することが期待される。
[レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、杉浦 亙、シリパン・センアローン（タイ国立衛生研究所）、ワタナ・オウワニット（タイ国立衛生研究所）]

XVIII. 北タイにおける HIV コホート研究の開発

平成 12 年 7 月より、国際協力事業団の協力を得、タイ政府保健省との共同で、タイ北部ランパン県病院に、HIV 感染者並び配偶者対象にコホート研究を立ち上げた。平成 14 年 10 月時点で、計 862 名が参加、92%以上の追跡率を維持され、また、患者検体が分離・保存されている。同研究は、HIV 伝播・エイズ進行に影響する遺伝子・免疫因子探求などの基礎研究や日和見感染研究に役立っており、同時にタイ国内研究者育成につながっている。
[有吉紅也、パトム・サワンパンヤラート（タイ国立衛生研究所）、パニータ・パチバニッチ（タイ、ランパン県病院）]

XIX. サルモデルによる HIV-1 Nef 蛋白の機能解析研究

HIV-1 のアクセサリー蛋白の一つである Nef は、MHC クラス Ⅰ 分子および CD4 分子の細胞表面かの発現抑制（downregulation）や、T リンパ球の活性化などの作用があり、HIV-1 の病原性に深く関わるとされている。Nef の病原性に与える影響を検討することを目的として、Nef と変異 Nef を発現する組換え SeV を作製し、マカクサルに接種し、病原性に影響を与える因子、特に MHC クラス Ⅰ 分子の downregulation に対する作用の解析および抗原特異的細胞性免疫反応の解析を行っている。
[狩野宗英、中村浩美、武田明子、俣野哲朗]

XX. タイ流行株臨床検体由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み

本研究では新規に gag-pol 発現 HIV-1 vector 系を構築し、タイ人感染者由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞作成を行った。北タイランパン県病院 HIV 感染者コホート中の感染者 45 名の末梢血由来 DNA より gag-pol を含む領域を PCR 法で増幅し 135 クローンの HIV-1 発現ベクターを得た。このうち、異なる患者由来の 6 クローンで B-LCL での標的細胞作成に成功した。新規方法により臨床検体由来 gag-pol 発現ベクター作成が飛躍的に容易となった。今後、タイ臨床株由来 gag-pol 遺伝子発現 CTL 標的細胞パネルを作成し、タ

イ流行株のCTLエピト-プ抗原発現効率の詳細な検討を行う予定である。
[横幕能行、松田善衛、有吉紅也]

XXI. HIV-1遺伝子組換えの特異点：*in vivo* 組換え点の微細マッピング

遺伝子組換えは HIV-1 が高度のゲノム多様性を生み出す重要な要因である。しかし遺伝子組換えが、現実のフィールド株のゲノム上のどのような領域で、どのような特異性によって起こっているかは、ほとんど明らかにされていない。そこで、我々は、分布する HIV-1 株の10-30%が組換えウイルスであるミャンマーをフィールドとして選び、フィールド株のゲノム上の組換え点の分布のマッピングによって、組換え点周辺の遺伝子配列上の特徴、組換えのホットスポットの探索を行った。その結果、組換えウイルス 10 株の *gag*-RT (2.6-kb) 領域に 2-5 個の組換え点が同定された。Overall の組換え構造はウイルス株毎に異なるが、組換え点の詳細なマッピングの結果、組換え点のあるものは相互に共有されていることが明らかになった。組換え点の一部は、さらに中国で見い出される組換え型流行株（CRF）と同一であり、過去の共通の組換え現象によって生み出された可能性が示唆された。また組換え点の近傍では、Homopolymeric tract (HPT)が他の領域に比べ、1.5 倍高い頻度で検出された。HPT は逆転写反応の減速（pausing）・鋳型乗り換えを引き起こすことが知られているが、このような遺伝子配列が、実際のフィールド株においても組換えを誘導するホットスポットとなっている可能性が示唆される。また *gag* p17-p24 間や protease-RT 間のようなタンパク質の機能的ドメインの境界部に組換え点が見い出されることも多いことから、遺伝子組換えによるウイルスの fitness の低下を回避するような選択圧がかかっていることが推測された。
[横田侑子、上原理恵子、今村裕子、草川　茂、武部豊]

XXII. HIV-1 サブタイプ B'の起源に関する進化学的解析

HIV-1 サブタイプ B' は、タイで最初に見い出されたアジア地域に特異的なサブタイプ B ヴァリアントである。B'は主に注射薬物乱用者ネットワークを介して急速に伝播し、また中国に分布する２種の組換え型流行株の構成要素ともなっている重要なウイルス株である。その由来はほとんど明らかにされていない。そこでわれわれは、タイ、ミャンマー、中国で分離した B' 7 株の全塩基配列を決定し、そのゲノム上および進化学的特徴について解析を行い、その起源について考察した。サブタイプ B'は、欧米型サブタイプ B 株とは異なるクラスターを形成され、ゲノムの多くの領域は欧米型のサブタイプ B と明確に区別される。系統樹上の分枝長および SRDT (single rate-dated tip) 法により、B'の起源は1980年代後半 [1988年 (86-89)] と推定された。プロトタイプのB'のV3ループは、欧米型サブタイプBでは見られないGPGQモチーフをもっており、group M の祖先型の特徴を備えていると考えられた。また中国の FPD 間のアウトブレークが B'の強いファウンダー効果によって形成されていることを明らかにした。
[武部　豊、今村　裕子、本村和嗣、楊　栄閣、草川茂]

XXIII. 組換えウイルス出現の前駆期としての HIV-1 共感染

組換えウイルスの生成に先立って、異なる系統のウイルスが個体に共感染している時期の存在が予測される。そこでわれわれは、組換えウイルスが絶えず新生しているミャンマー中部からの HIV-1 感染者の血漿中のウイルス種を HIV-1 ゲノムの様々な領域を増幅することによって解析し、その結果、５％程度の頻度で、複数の系統の異なるウイルス配列が検出される例が見い出されることを明らかにした。すなわち、この地域の感染者には異なる系統の複数のウイルスに同時に感染しているケースが相当数あり、新しい組換えウイルスの出現に関して nascent な状態にあることを示した。共感染が頻繁に検出できることは、宿主免疫応答が、HIV-1 の重複感染を抑制できないことを暗示するもので、ワクチン開発の困難さを示唆するものと考えられる。
[草川茂、Kay Thi Aye、今村　裕子、本村和嗣、Min Thwe（ミャンマー保健省エイズ対策プログラム）、Hla Htut Lwin（ミャンマー保健省エイズ対策プログラム）、Myint Zaw（ミャンマー保健省エイズ対策プログラム）、武部豊]

XXIV. HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

CRF08_BC は中国における急速な HIV 流行拡大の原因になっている重要なウイルス株の一つであるが、これまで、そのウイルス学的および免疫学的解析はほとんどなされていない。そこで、我々は雲南省東部において分離されたウイルスから PCR 法を用いて CRF08_BC の感染性分子クローンを樹立し、その性状について解析を行なった。分離された CRF08_BC の感染性分子クローン 00CN-HH040.NX22 は PHA 刺激 PBMC で増殖能を示し、コレセプターとして CCR5 を利用する。env 蛋白に対する血清学的交差性について検討したところ、CRF08_BC とサブタイプＣとの間では交差性が認められたものの、サブタイプＢとの間では検出感度が悪く、交差性が低いことが示唆された。00CN-HH040.NX22 は、今後 HIV-1 流行の拡大が危惧される中国におけるサブタイプ特異的な検査試薬や将来のワクチン開発にとって有用なクローンであると考えられる。
[草川　茂、楊　栄閣、武部　豊]

XXV. SH3モチーフを介するタンパク質間相互作用に対する新規阻害剤（USC15A）の抗HIV-1 効果に関する解析

USC15A は、抗腫瘍効果をもつ低分子化合物として見い出された新規物質で、その作用機序が、SH3（sarc 相同）モチーフおよびポリプロリン・モチーフを介するタンパク質間相互作用の阻害によることが明らかにされている。一方、エイズ発症に重要な役割をもつと考えられる HIV-1 Nef タンパク質は、SH3 モチーフ（PxxP）をもち、細胞内シグナル伝達系との相互作用を介して、ウイルス増殖に有利な細胞内環境を作り出している可能性が推測されている。そこでわれわれは、UCS15A の HIV-1 増殖に対する影響を調べ、その抗ウイルス剤としての可能性を検討した。その結果、USC15A は高濃度では細胞毒性を示すが、5-10μM の濃度で MT2 および C8166 細胞での HIV-1 増殖を80%以上阻害した。細胞毒性を示す濃度では、MT2 細胞特有の clumping（細胞凝集）の性質が失われ、細胞が大型化する傾向が見い出された。NL432nef(+) 株と NL432nef(-) 株の MT2 細胞での増殖に対する阻害効果には差異は認められなかった。細胞の形態変化や細胞の凝集性に影響を与えることから、細胞骨格系への影響が疑われる。USC15A は細胞毒性を示す薬剤濃度と生物学的効果が認められる濃度の幅が狭いが、ウイルス複製機構を解析する有用な研究試薬として用いることができる可能性が示された。これをリード化合物として HIV-1 により選択性が高く、より低濃度で活性を示す薬剤の開発が期待される。USC15A の HIV-1 増殖阻害機構の詳細を現在検討中である。

[草川茂、Sreenath V. Sharma、中野洋文（協和発酵東京研究所）、上原至雅（生物活性物質部）武部豊]

XXVI. HIVRNA 定量のコントロールサーベイと評価

HIV ウイルス量測定法のアンプリコア HIV-1 モニターの測定精度を明らかにし、施設間での測定値を是正する目的でコントロールサーベイを 1999 年から１年に１回実施している。今年度の参加施設は標準法が 28 施設、高感度法が 28 施設、そのうち 2 法採用が 19 施設であった。当キット使用のほぼ全施設が参加したことになる。標準法および高感度法について各々9 サンプルを配布した。全サンプルが目標値範囲内であった施設は標準法で 9 施設、高感度法で 4 施設であり、2 法とも正確な回答は 2 施設しかなかった。標準法や高感度法の測定範囲を理解していない施設が多数見られた。１施設が陰性検体にコンタミをした。アンケート調査から、作業エリアの区分けや作業前後の消毒は実行されているが、機器のメンテナンスの不徹底がわかった。4 分の３の施設が測定時に何らかのトラブルを経験しており、主なトラブルは QS 吸光度の不良や機器の作動不良であった。

[吉原なみ子、福嶋浩一、坂本優子、井土美由紀（ロシュ・ダイアグノスティック株式会社）、林邦彦（ロシュ・ダイアグノスティック株式会社）]

XXVII. アフリカ地域における感染症サーベイランスの実態および研究協力の推進とその評価

アフリカのセンチネルサイトであるセイシェルとマダガスカルを訪問し、現地の実態調査を行った。感染症に関するセミナーを開催すると共にそれぞれの国で輸血感染症の講義および実技指導した。保健省、病院、研究所、学校を視察し、研究協力の可能性について討議した。マダガスカルには 2000 年に血液伝播ウイルスの 5 種類(HIV, HTLV-I, HBV, HCV, Syphilis)、500 検体分の検査キット(セロディア）を供与した。初回供血者を対象にした検査が実施されており、同一検体を日本の検査結果と比較し、検査の精度および感度を検討した。今年度も同様な方法で供血者の感染症マーカーに関する実施計画するためにマダガスカルには 5 種のキットを各 500 検体分、セイシェルには HTLV-I の感染率が高いとの報告があるので HTLV-I のキットのみを 500 検体分供与し、共同研究を実施することになった。

[吉原なみ子、坂本優子、蟻田功（国際保健医療交流センター）]

XXVIII. カンボディア国の結核患者における HIV 感染率調査

カンボディア国の 2002 年１月に新規登録された全結核患者を対象に HIV 検査を実施した。対象は男性 1196 名、女性 1057 名、不明 14 名の計 2267 名であった。年齢分布は 20 歳代が 13%、30 歳代、40 歳代、50 歳代が各々約 20%、50 歳代が 15%であった。カンボディア国の全国規模調査はまだ実施されたことがなく、予防対策に貴重な資料である。現地で凝集法およびイムノクロマトの手動法での HIV 陽性率は約 10.2%であった。これらの検体を日本に持ち帰り、高感度法により、HIV 抗体、HBｓ抗原, HCV 抗体、HTLV-1 と梅毒の検査および HIV 陽性者のサブタイプを解析中である。

[吉原なみ子、坂本優子]

XXIX. 生分解性ポリマーを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討

生分解性ポリマーとヒト皮膚繊維芽細胞からヒト皮膚モデルを作成し、バイオ皮膚モデル製品の HIV 汚染時における細胞動態および HIV-1 検出法について検討した。5 種類のヒト皮膚モデルはポアサイズの大きいポリマーを用いた方が増殖能が良かった。OM10.1 又は MT-4 による感染細胞接種実験では、3 日目より増殖能が次第に低下し、６日目には感染細胞未接種群よりも増殖能が低下した。

HIV-1p24 抗原量は徐々に増加し、3 日目まで OM10.1 の増殖と相関した。以上より生分解性ポリマーによるヒト皮膚モデルは、HIV-1 の検出に応用できるが、ポリマーの種類及び構造の違いにより増殖能に影響を与えるのでその点を考慮すべきであると思われた。
[鈴木寿子、土屋利江（国立医薬品食品衛生研究所）、吉原なみ子]

XXX. WHO Reference Panel による精度管理

National Serology Reference Laboratory（NRL）の Quality Assessment Program による精度管理に参加した。NRL より 10 検体のパネル血清が配布され、当室ではこれを通常行われている方法で検査した。スクリーニング検査は Genscreen HIV-1/2（ELISA）、Genedia HIV-1/2 MIXT PA（PA）、DAINASCREEN HIV-1/2（ICA）を用い、確認には LAV BLOT I(Western Blot)を用いて検査した結果、HIV-1 陽性が６検体、陰性は４検体であった。この結果は NRL の結果とも一致していた。
[福嶋浩一、吉原なみ子]

XXXI. タンザニアにおける輸血関連ウイルス検査の精度調査

2002 年にタンザニアの血液センターに集められた初回献血者 271 例の血漿において輸血関連ウイルスの感染状況の調査を行ったところ、HBsAg：28 例(10.3%)、TP：37 例(13.7%)、HCV：2 例 (0.7%)、HIV-1/2：26 例(9.6%)、HTLV-Ⅰ：2 例(0.7%)となった。

同検体は事前に現地でも検査が行われていたが、現地の検査は偽陽性および偽陰性が非常に多く、安全な血液の供給のためには感度・精度の高い検査法の導入、技術指導、精度管理の必要性が強く示唆された。
[坂本優子、吉原なみ子]

XXXII. 依頼検査

１．診断薬（キット）実施状況 ４キット
２．HIV 感染確認　　１検体

XXXIII. HIV-1 トランスメンブレンタンパク質の構造･機能関連

HIV-1 エンベロープタンパク質のサブユニットである gp41 は膜融合に必須である。膜融合の過程は完全には明らかにされていないが、融合に際しては細胞外部分の構造変化（コイルドコイル形成）が重要でありその機構に基づいた阻害剤の開発も行われている。一方膜融合への細胞質内部分の寄与も示唆されているが膜貫通部分の寄与についてはインフルエンザウイルス等の他のウイルスについては研究が進められているが、HIV-1 については不明な点が多い。HIV-1gp41 の膜貫通部分には各クレード間でよく保存されたヘリックスーヘリックス間相互作用モチーフと推定される GXXXG 配列が存在する。VSV-G タンパク質ではその膜融合能を低下させるグリシンに対する変異を導入しても HIV においては膜融合能の低下はみられず、gp41 膜貫通部分の変異に対する可塑性が示唆された。しかし膜貫通部分を GpA などの異種膜貫通部分と置換すると膜融合能の著明な低下がみられ、可塑性が無限ではないことが示唆された。現在異種膜貫通部分置換体において膜融合過程のどの部分が阻害されているか解析を進めている。これらの解析により HIV-1 における膜融合の分子過程が明らかにされ新たな阻害剤の開発につながる可能性がある。
[宮内浩典，駒野淳、横幕能行、杉浦亙、松田善衛]

XXXIV. VLP-ELISA 法を用いた新規 HIV-1 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニング

HIV に対する化学療法は一定の成果を収めているものの、その有効性を減弱させる薬剤耐性変異株の出現が感染者の予後を悪化させている。従って新規薬剤の開発が重要である。われわれはわれわれの研究室で開発された迅速プロテアーゼ表現型解析法（VLP-ELISA 法）を用いて新たな抗 HIV 活性を持つ候補薬剤の探索を行っている。現在までに約一万種の候補化合物の一次スクリーニングを終え、二次スクリーニングを行っている。
[横幕能行、杉浦　亙、松田善衛]

XXXV. プロテオーム解析（プロテオミクス）による HIV-1 感染および AIDS 発症に関与する宿主因子の解析

近年２次元電気泳動法と質量分析法を組み合わせたプロテオミクスの手法が進歩した。われわれはプロテオミクスの手法を適用して HIV 感染および AIDS 発症に関与する宿主タンパク質の同定を試みている。いくつかの HIV-1 ウイルスタンパク質（Vif, Vpr）と相互作用する宿主因子の検索、同定を目指して、免疫沈降用のタグを付加したそれぞれのタンパク質を恒常的に発現する T 細胞株を数種類確立した。今後それぞれのタンパク質と相互作用をする宿主因子を免疫共沈降後の質量分析によって同定することを計画している。これらの宿主因子の同定はそれぞれの遺伝子の働きをさらに深く理解することに寄与するだけでなく、新たなウイルス増殖阻害手段の開発に役立つと考えられる。
[宮内浩典、駒野淳、清水佐紀、山本直樹、松田善衛]

XXXVI. ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）複製初期過程の分子機序の解明

細胞内に侵入する病原微生物の一部は、Arp2/3 複合体を活性化することにより、感染を拡大させることが知られている。Arp2/3 複合体は細胞膜直下に存在する密なアクチン網の一部を構成しており、細胞の運動や endocytosis など、形態変化に伴うアクチン細胞骨格の再構成を制御している。我々は、Arp2/3 複合体の活性を阻害することにより、HIV-1 感染の効率が低下することを見い出した。これは、HIV-1 が効率良く細胞に感染を成立させるためには、アクチン新生鎖合成を伴う細胞骨格の再構成が重要であることを示唆するものである。
[駒野淳、宮内浩典、松田善衛]

XXXVII. 感染における Nef 遺伝子の役割

SIVmac239 は感染によりアカゲザルに感染後３年以内に AIDS を発症させる。ところが Nef 遺伝子欠失変異 SIV は感染後５年においても AIDS 症状は観察されなかった。Nef 遺伝子の役割を知るために、主要な感染組織であるリンパ節での感染様式の解析を行った。初期感染ピーク時のリンパ節における感染細胞の同定と分布を病理学的手法により解析した。野生株ウイルス感染は Nef 遺伝子欠失変異 SIV 感染と比べウイルス感染量は数十倍高いが、リンパ節においても感染細胞数は同様に異なった。この違いは感染細胞の分布の違いによることであることが分かった。野生株ウイルス感染では感染細胞の約 80%は T 細胞領域である傍皮質領域に見られたが、Nef 遺伝子欠失変異ウイルス感染では T 細胞領域の CD4 T 細胞での感染が顕著に少なかった。T 細胞領域の CD4 陽性細胞は免疫活性化に必要なことから、エイズウイルス感染が免疫機能障害を起こす理由も Nef 遺伝子 のよる T 細胞領域 CD4 T 細胞感染によると推測された。Nef 遺伝子の in vivo 感染での役割はエイズウイルスが T 細胞領域 CD4+ T 細胞感染増殖を可能とすることであると推測された。
[杉本智恵、森　一泰]

XXXVIII. Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果

エイズウイルスの膜表面のスパイクタンパク(Env)は多数の糖鎖に覆われている。この構造は感染宿主がウイルスに対する有効な免疫誘導の障害の原因となっていると考えられている。Env はワクチン抗原として重要なことから、糖鎖を減少させることにより有効なワクチン抗原となりうるのではないかと考え、病原性が低下した 5 個の糖鎖を欠失した変異ウイルスΔ5G の Env の防御免疫誘導能をアカゲザルを用いて調べた。比較のために野生型の Env 免疫と vector control 免疫を用いた。免疫法は DNA-prime/vaccinia-boost 法により行った。免疫による細胞性免疫、中和抗体誘導を調べた。Env 特異的 T 細胞の誘導では野生型 Env は変異 Env と比べて約 2 倍高かった。中和抗体についてはチャレンジウイルス SIVmac239、Δ5G に対する中和抗体は検出されなかったが、中和されやすいマクロファージ指向性 SIV の中和抗体価において野生型 Env は約６倍高かった。SIVmac239 感染に対する効果は野生型 Env 免疫群ではすべてのサルにおいて初期感染後の感染制御が見られたのに対しΔ5G Env 免疫群では vector control 免疫群と同様の持続感染が見られた。チャレンジウイルスが SIVmac239 であったのでΔ5G に対する効果を現在調べている。現時点では糖鎖の減少は免疫の認識に対してむしろ negative に働く可能性が示唆された。
[杉本智恵、森　一泰]

XXXIX. 糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質

我々が作製したEnv糖鎖欠失SIV、Δ5Gはアカゲザルに接種するとその感染が制御される。Env糖鎖欠失はこれまでのSIV/HIV研究では中和抗体誘導の性質を与えることが示されている。しかしながら、Δ5G感染ザルで明らかに中和抗体が誘導されたのは 5 頭中 2 頭のみで、残りの 3 頭については細胞性免疫が優位であった。すなわちΔ5G感染では糖鎖欠失に対して特定の免疫誘導が起きるのではないことが示された。しかしながらSIVmac239 チャレンジ感染を行ったすべてのΔ5G感染ザルはその感染を防御し、それに付随して急激なCTLの誘導が見られた。これらの結果からΔ5Gは新しいカテゴリーに属するattenuated virusとして機能しているのではないかと考えられた。そこでΔ5G感染のattenuated virusとしての性質を最も詳細な研究が行われているattenuated virusであるΔnef感染と比較した。peak viremia はΔ5G感染がΔnef感染より 10 倍高かった。慢性感染期のplasma viral loadはΔnefが 10^4レベルまでの感染を繰り返していた反面Δ5Gは検出限界以下であり、PBMC中のviral DNA検出でも同様の結果が示された。さらに慢性感染期の免疫誘導の解析ではΔnefでΔ5Gより高いウイルス特異的T細胞誘導が認められた。慢性感染期に持続している高い細胞性免疫活性はΔnef感染における免疫系の傷害と関連している可能性が示唆された。実際、Δnef感染ではnaive CD4+ T細胞の減少が見られている。このようにΔ5Gにおける糖鎖欠失はlive attenuated vaccine strainの条件になるかもしれない。
[杉本智恵、森　一泰]

XL. マイクロサテライト多型によるアカゲザル MHC ハプロタイプ解析

MHC 遺伝子型が統一されたアカゲザルを使うことはウイルス感染防御に有効な CTL エピトープや HTL エピトープを解析する上で極めて有用である。しかし、アカゲザル MHC と感染病態との関連についてはまだわかっていないことが多く、エイズモデルとして有用な MHC-typed サルを生産するためには MHC 遺伝子型の解析と宿主免疫応答の解析の両面から行わなければならない。アカゲザル

MHC 遺伝子型の詳細な解析は共同研究として近畿大・医ならびに東京医歯大・難治研のグループで行われているが、サル動物実験を行う上で MHC ハプロタイプを簡便に判定することも必要である。そこで PCR と自動シークエンサーによるフラグメント解析を利用したアカゲザルのマイクロサテライト多型検出法を確立した。ヒトでは多数のマイクロサテライト多型が明らかにされており、それらを検出するための PCR プライマー情報もデータベース化されている。その中から MHC 領域に存在するマイクロサテライトマーカーに注目し、アカゲザルでも PCR で反応するマーカーを 5 つ選び出した。その 5 つのマーカーについてアカゲザルにおける多型を調べた結果、3 つのマーカー（class Ⅱ領域の D6S291、D6S1560、class Ⅰ領域の C1_2_A）がアリル特異性を示すことが明らかになった。この 3 つのマイクロサテライト多型の組み合わせにより子が親のどちらの MHC アリルを受け継いでいるかを判別することが可能になった。
[杉本智恵、森　一泰]

XLI. 共通 MHC ハプロタイプを持つ SIV 感染アカゲザルに誘導されたウイルス特異的 T 細胞エピトープと感染病態との関係

同じ種オスを父または祖父に持つアカゲザルがこれまでに行った様々な SIV 感染実験に使用されている。この中である 1 頭の種オスザル（R90-120）の子は SIV 感染を制御する傾向が見られた。そこでこれまでに感染実験に用いた R90-120 の子 9 頭に注目し、MHC ハプロタイプ解析と誘導された SIV 特異的 CTL および HTL エピトープの解析を行った。まず、DGGE による Mamu-DRB ハプロタイプ解析の結果、R90-120 は DRB*w2002/DRB*w2501 を持つハプロタイプ（便宜上 A ハプロタイプとする）と DRB1*1007 をもつハプロタイプ（便宜上 B ハプロタイプとする）を保有していることが明らかになった。そして子のうちの 7 頭は A ハプロタイプ、2 頭は B ハプロタイプを受け継いでいることが明らかになった。SIVmac239 感染を自然に制御した 2 頭のサルと delta nef 感染ザルの 1 頭は A ハプロタイプを持ち、非常に似通った HTL エピトープパターンを示した。また同じく A ハプロタイプを持つ感染後早期治療ザル 2 頭は同じ CTL エピトープを認識した。これら A ハプロタイプを持つ感染制御ザルによって認識されたエピトープの共通性から、A ハプロタイプは感染防御に関連する MHC を持つことが示唆された。A ハプロタイプを持つサルが今後繁殖を検討している MHC-typed サルの候補として挙げられた。
[杉本智恵、森　一泰]

XLII. アフリカにおける HIVｓの分子疫学および血液由来感染症の研究

アフリカの HIV-1 蔓延株とくにガーナにおける HIV-1 亜種の検討を続けており、これまでの結果、中央部および東部の検体に関してはサブタイプ A が主要株であり、また、サブタイプ D や G も検出されることを明らかにした。また HIV 感染者における性感染症（STDｓ）罹患率や免疫能に関しても報告してきた。さらに西アフリカを中心に存在する HIV-2 に関しても高感度検出法を報告するとともに血清診断と遺伝子診断の関係を報告してきた。今年度は北部ガーナの検体の解析および詳細な検討を行いガーナにおける HIV-1 サブタイプはその殆どが A/G 組み換体であることが判明した。これら研究の過程で、アフリカにおける肝炎ウイルスの存在も明らかになり、G 型肝炎および TTV の遺伝子解析を行い報告するとともに健常者での高 C 型肝炎罹患率も判明してきた。そこで本年度はＢ型肝炎に注目して、そのサブタイプ解析を進行中であるが、現時点で数種類のサブタイプが検出されている。
[石川晃一（エイズセンター、ガーナ野口記念医学研究所）、ガーナ野口研究所、アントワープ熱帯医学研究所、リスボン熱帯衛生医学研究所、佐多徹太郎（感染病理部）、阿部賢治（感染病理部）]

XLIII. HIV 母子感染介入プロジェクト

サブサハラアフリカにおける HIV の爆発的増加は男女間での性交渉によるものがメインである。近年 HIV 感染妊婦からの HIV 感染児の増加が大きな問題となっており、UNAIDS を始めとする多くの援助機関がこの母子感染介入プログラムを支援しだしているところである。しかしながらガーナにおいては未だ計画すらなく対策の遅れが危惧されていた。そこで、これまで我々が行なった妊婦の血清疫学のデータ等を元にして、ネビラピン（抗 HIV 薬）を用いた HIV 母子感染介入プロジェクトを作成しパイロットスタディーを行ないつつある。（UNAIDS および EU からのファンド）
[石川晃一、野口記念医学研究所]

XLIV. HIV サブタイプ A 型および他のサブタイプの分離、HIV 亜種解析による HIV ワクチンの開発

これまでの解析によりガーナでの主たる HIV サブタイプは HIV-1 サブタイプ A であることが我々の解析で明らかになっている。しかしながらその感染性クローンは未だ得られておらず、他のサブタイプとの比較等が出来ていない。そこでガーナ由来のサブタイプ A の感染性分子クローンを作成することを目的として 10 検体の PBMC より定法に従い分離を試みた。その結果予想に反し A/G リコンピナントのクローンが分離され、これに関しては現在詳細な解析を行なっている。また引き続きサブタイプ A のクローンも分離も試みている。また昨年度に続き各種サブタイプのアクセサリー遺伝子機能の解析を目的とし

て各 HIV-1 サブタイプの vif 発現ベクターを構築してサブタイプ間での差異を検討している。これまでに10数種類の vif 発現ベクターの構築を行っているが、サブタイプ間での顕著な違いは検出されていない。
[石川晃一、徳永研三（感染病理）野口記念医学研究所、巽正志（獣医科学部）、武部豊]

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, Miyamura T: Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: Application as a new replication-deficient viral vector. Virology 302: 433-44, 2002.
2) Senpuku H, Asano T, Matin K, Salam MA, Tsuha Y, Horibata S, Shimazu Y, Soeno Y, Aoba T, Sata T, Hanada N, Honda M: Effects of human interleukin-18 and interleukin-12 treatment on human lymphocyte engraftment in NOD-scid mouse. Immunology 107: 232-42, 2002.
3) Yamamoto S, Yamamoto T, Nojima Y, Uemori K, Phalen S, McMurray DN, Kuramoto E, Iho S, Takauji R, Sato Y, Yamada T, Ohara N, Matsumoto S, Goto Y, Matsuo K, Tokunaga T: Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. Jpn J Infect Dis 55:37-44, 2002.
4) Balachandra K, Matsuo K, Sutthent R, Hoisanka N, Boonsarthorn N, Sawanpanyalert P, Warachit P, Yamazaki S, Honda M: Characteristic of HIV-1 in V3 loop region based on seroreactivity and amino acid sequence in Thailand. Asian Pacific J Aller Immunol 20:93-98, 2002.
5) Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, Honda M: Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bacillus calmette-guérin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. Vaccine 21: 158-66, 2002.
6) Kawahara M, Nakasone T, Honda M: Dynamics of Gamma Interferon, Interleukin-12 (IL-12), IL-10, and transforming growth factor beta mRNA wxpression in primary Mycobacterium bovis BCG infection in guinea pigs measured by a real-time fluorogenic reverse transcription-PCR Assay. Infect Immun 70: 6614-20, 2002.
7) Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M: Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG) expressing HIV-1 antigen as a freeze-dried vaccine induces a long-term HIV-specific mucosal and systemic immunity. Clin Immunol 105: 326-331, 2002.
8) Naganawa S, Sato S, Nossik D, Takahashi K, Hara T, Tochikubo O, Kitamura K, Honda M, Nakasone T: First report of CRF03__AB recombinant HIV type 1 in injecting drug users in Ukraine. AIDS Res Hum Retrov 18: 1145-9, 2002.
9) Nakasone T, Sakai K, Ami Y, Izumi Y, Takahashi E, Sasaki Y, Takizawa M, Suzaki Y, Shinohara K, Honda M: Genetic and biological characterization of a highly pathogenic molecular clone, SHIV-C2/1 KS661. J Med Primatol 31: 252, 2002.
10) Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, Honda M, Kunisawa J, Kiyono H: HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. J Immunol 170: 495-502, 2003.
11) Tsunetsugu-Yokota Y, Tamura H, Tachibana M, Ogata K, Honda M, Takemori T: Selective expanshin of perforin-positive CD8+ T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria. J Leuk Biol 72: 115-124, 2002.
12) Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A, Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H: Assessment of oral transmission using cell-free human immunodeficiency virus-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocyte. Immunology 109: 271-282, 2003.
13) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Izumi Y, Nakasone T, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M: Infection of macaques with an R5-tropuc SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Arch Virol 148: 973-988, 2003.
14) Sugiura W, Matsuda Z, Yokomaku Y, Hertogs K, Larder B, Oishi T, Okano A, Shiino T, Tatsumi M, Matsuda M, Abumi H, Takata N, Shirahata S, Yamada K, Yoshikura H, Nagai Y： Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor resistant human immunodeficiency virus type-1. Antimicrob Agents Chemother 46: 708-715, 2002.
15) Yagyu F, Ikeda Y, Ariyoshi K, Sugiura W, Wongkhomthong SA, Matsuda M, Ushijima H: Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reation using novel env gene primers. J Virol Methods 101: 11-20, 2002.
16) Okano A, Matsuda M, Chiba T, Moriya K, Yamada K, Sugiura W: Discordant movement of CD4-positive T-cell count in HIV-1 infected patients with HARRT failure. Jpn J Infect Dis 55: 62-65, 2002.
17) Myint L, Ariyoshi K, Yan H, Frater AJ, Auwanit W, Pathipvanith P, Yamada K, Matsuda M, Chiba T, Fujita K, McClure M, Weber JN, Sugiura W: Mutagenically separated PCR assay for rapid detection of M41L and K70R zidovudine resistance mutations in CRF01_AE (subtype E) human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother 46: 3861-3868, 2002.
18) Kobayashi N, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Nakamura T,

Nakamura K, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y: Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients. Jpn J Infect Dis 55: 131-133, 2002.

19) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Sugiura W: HIV-1 Gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process. Antiviral Ther 7: S63, 2002.
20) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Yamada K, Hellmann NS, and Sugiura W: Unique drug resistant mutation patterns found in HIV-1 CRF01_AE (subtype E) with antiretoroviral treatment failure. Antiviral Ther 7: S150, 2002.
21) Saijo M, Qing T, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Sakai K, Prehaud C, Kurane I, Morikawa S: Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein for detection of immunoglobulin G antibodies to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J Clin Microbiol 40: 372-375, 2002.
22) Fujita M, Sakurai A, Yoshida A, Miyaura M, Koyama AH, Sakai K, Adachi A: Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. J Virol 77: 1626-1632, 2003.
23) Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Wongchoosie S, Yingseree P, Yoshiike K, Warachit P, Sawanpanyalert P: Survival benefit from non-highly active antiretroviral therapy in a resource-constrained setting. J Acquir Immune Defic Syndr 32: 157-160, 2003.
24) Berry N, Jaffar S, Van Der Loeff MS, Ariyoshi K, Harding E, N'Gom PT, Dias F, Wilkins A, Ricard D, Aaby P, Tedder R, Whittle H: Low level viremia and high CD4% predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. AIDS Res Hum Retrov 18: 1167-1173, 2002.
25) Schim van der Loeff MF, Jaffar S, Aveika AA, Sabally S, Corrah T, Harding E, Alabi A, Bayang A, Ariyoshi K, Whittle HC: Mortality of HIV-1, HIV-2 and HIV-1/HIV-2 dually infected patients in a clinic-based cohort in The Gambia. AIDS 16: 1775-1783, 2002.
26) Ariyoshi K, Promadej N, Ruxrungtham K, Sutthent R. Toward improved evaluation of cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-inducing HIV vaccines in Thailand. AIDS Res Hum Retrov 18: 737-739, 2002
27) Holmgren B, Andersson S, Harding E, van der Loeff MS, Vastrup P, Aaby P, Ariyoshi K, Whittle H: Increased prevalence of HTLV-1 among HIV-2-infected women but not HIV-2-infected men in rural Guinea-Bissau. J Acquir Immune Defic Syndr 30: 342-350, 2002.
28) Frater AJ, Dunn DT, Beardall AJ, Ariyoshi K, Clarke JR, McClure MO, Weber JN: Comparative response of African HIV-1-infected individuals to highly active antiretroviral therapy. AIDS 16: 1139-1146, 2002.
29) Kano M, Matano T, Kato A, Shioda T, Nagai Y: Induction of HIV-1-specific neutralizing antibodies in mice vaccinated with a recombinant Sendai virus vector. Jpn J Infect Dis 55: 59-60, 2002.
30) Matano T, Kano M, Takeda A, Nakamura H, Nomura N, Furuta Y, Shioda T, Nagai Y: No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model. AIDS 17: 1392-1394,
31) Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y: SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. J Virol 76: 6743-6749, 2002.
32) Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Kobune F, Tanabayashi K, Tashiro M: Recombinant wild-type and edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. J Virol 76: 4891-4900, 2002.
33) Kusagawa S, Sato H, Tomita Y, Tatsumi M, Kato K, Motomura K, Yang R, Nohtomi K, Takebe Y: Isolation and characterization of replication-competent molecular DNA clone of CRF01_AE with different coreceptor usages. AIDS Res Hum Retrov 18: 115-122, 2002.
34) Zhang C, Yang R, Xia X, Tan S, Dai J, Zhang Z, Peng Z, Wei T, Liu H, Pu D, Luo J, Takebe Y, Ben K: High prevalence of HIV-1 and HCV coinfection among injecting drug users in the southeast region of Yunnan, China. J Acquir Immune Defic Syndr 29: 191-196, 2002.
35) Fukuda K, Tomiyama H, Wasi C, Matsuda T, Kuasagawa S, Sato H, Oka S, Takebe Y, Takiguchi M: Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese patients. AIDS 16: 701-711, 2002.
36) Murakami Y, Fukasawa H, Kobatake T, Yamagoe S, Takebe Y, Tobiume M, Matsuda M, Uehara Y: A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. Antiviral Res 55: 161-168, 2002.
37) Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y: On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Yunnan province of China. AIDS 16: 1401-1407, 2002.
38) Yoshihara N: Genotyppe, serotype, and phylogenetic characterization of the complete genome sequence of hepatitis B virus isolates from Malawian chronic carriers of the virus. J Med Virol 69: 33-40, 2003.
39) Iga M, Matsuda Z, Okayama A, Sugiura W, Hashida S, Morishita K, Nagai Y, Tsubouchi H: Rapid phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation. J Virol Methods 106: 25-37, 2002.
40) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of simian immunodeficiency virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. J Virol 77: 4169-4180, 2003.
41) Villinger F, Mayne AF, Bostik P, Mori K, Jensen PE, Ahmed R,

Ansari A: Evidence for antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. J Virol 77: 10-24, 2003.

42) Barnor JS, M-Kurosaki N, Yamaguchi K, Kobayasi H, Ishikawa K, Osei-Kwasi M, Ampofo WK, Ofori-Adjei D, Inagaki Y, Yamamoto N, Takaku H: Down regulation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) expression by Vif antisense RNA expression vectors in transfected cells. Nucleic Acids Res Supl (Oxford Univ Press) No.2: 123-124, 2002.
43) Ampofo W, Nii-Trebi N, Ansah J, Abe K, Naito H, Aidoo S, Nuvor V, Brandful J, Yamamoto N, Ofori-Adjei D, Ishikawa K: Prevalence of blood-borne infectious diseases in blood donors in Ghana. J Clin Microbiol 40: 3523-3525, 2002.
44) Begum N. Horiuchi S, Tanaka Y, Yamamoto N, Ichiyama K, Yamamoto N: New approach for generation of neutralizing antibody against human T-cell leukaemia virus type-I (HTLV-I) using phage clones. Vaccine 20: 1281-1289, 2002.
45) Chinanonwait N, Miura H, Yamamoto N, Yamaoka S: A recessive mutant cell line with a constitutive IkappaB kinase activity. FEBS Lett 531: 553-560, 2002.
46) Ikenoya M, Hidaka H, Hosoya T, Suzuki M, Yamamoto N, Sasaki Y: Inhibition of rho-kinase-induced myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) phosphorylation in human neuronal cells by H-1152, a novel and specific Rho-kinase inhibitor. J Neurochem 81: 9-16, 2002.
47) Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Hayashi T, Yamada Y, Kamihira S, Ikeda S, Yamasaki Y, Morikawa S, Tomonaga M, Geleziunas R, Yamamoto N: Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene: potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness. Blood 99: 1341-1349, 2002.
48) Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M: Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Blood 100: 1828-1834, 2002.
49) Mori N, Fujii M, Hinz M, Nakayama K, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Kashanchi F, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N: Activation of cyclin D1 and D2 promoters by human T-cell leukemia virus type I tax protein is associated with IL-2-independent growth of T cells. Int J Cancer 99: 378-385, 2002.
50) Nishiyama Y, Murakami T, Shikama S, Kurita K, Yamamoto N: Anti-HIV-1 peptides derived from partial amino acid sequences of CC-Chemokine RANTES. Bioorg Med Chem 10: 4113-4117, 2002.
51) Nitta T, Igarashi K, Yamamoto N: Polyamine depletion induces apoptosis through mitochondria-mediated pathway. Exp Cell Res 276: 120-128, 2002.
52) Owen SM, Rudolph D, Schols D, Fujii N, Yamamoto N, Lal RB: Susceptibility of diverse primary HIV isolates with varying co-receptor specificity's to CXCR4 antagonistic compounds. J Med Virol 68: 147-155, 2002.
53) Saitoh T, Nakano H, Yamamoto N, Yamaoka S: Lymphotoxin-beta receptor mediates NEMO-independent NF-kappaB activation. FEBS Lett 532: 45-51, 2002.
54) Tamamura H, Hiramatsu K, Miyamoto K, Omagari A, Oishi S, Nakashima H, Yamamoto N, Kuroda Y, Nakagawa T, Otaka A, Fujii N: Synthesis and evaluation of pseudopeptide analogues of a specific CXCR4 inhibitor, T140: The insertion of an (E)-alkene dipeptide isostere into the beta II'-turn moiety. Bioorg Med Chem Lett 12: 923-928, 2002.
55) Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Oishi S, Habashita H, Kanamoto T, Gotoh K, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N: Certification of the critical importance of L-3-(2-naphthyl)alanine at position 3 of a specific CXCR4 inhibitor, T140, leads to an exploratory performance of its downsizing study. Bioorg Med Chem 10: 1417-1426, 2002.

2．和文発表

1) 長縄聰，泉泰之，高橋清実，佐藤成大，藤崎茂巳，藤崎恭大，三谷満昭，網康至，中村正彦，本多三男，仲宗根正，栃久保修，北村勝彦：メタロエンドペプチダーゼ-F の HIV に及ぼす影響． 日本エイズ学会誌. 5: 1-7, 2003.
2) 富田康浩，横山勝，仲宗根正，永井美之，佐藤裕徳：SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割. 日本エイズ学会誌． 5: 89-91, 2003.
3) 本多三男: エイズワクチン． 化学と薬学の教室. 14: 33-40, 2003.
4) 杉浦　亙：HIV のゲノムと薬剤耐性. 現代医療．34(5): 153-159, 2002.
5) 杉浦　亙：HIV 診断技術と薬物治療の発展. ウイルス. 52: 83-87, 2002.
6) 武部　豊：HIV 感染症の分子疫学：原理とその応用. 特集「HIV/AIDS 研究の進歩」，東京，日本臨床社，60(4): 652-661, 2002.
7) 武部　豊：ゲノム情報に基づく HIV の分子疫学.「微生物ゲノム情報と医学- 基礎と臨床」．東京，現代医療社，基礎．現代医療．34 (5): 1047-1059, 2002.
8) 武部　豊：HIV 感染症への分子疫学的アプローチ.「HIV 感染症の基礎と臨床」．東京，医薬ジャーナル社，化学療法の領域．18 (4): 503-511,2002.
9) 武部　豊：感染症の話「エイズ（ヒト後天性免疫不全症候群）」（改訂版）．Japan IDWR (Infectious Diseases Weekly Report) 感染症週報 [厚生省ホームページ（http://www.mhw.go.jp）] 2002.
10) 武部　豊：HIV のサブタイプ「HIV Q & A」（岡慎一編）東京，医薬ジャーナル社， pp. 17-19, 2002.

11) 吉原なみ子：IDD NEES. HIV 検査の展望と課題.ディドベーリング（株）, NO.4 , 2002.
12) 吉原なみ子：総合臨床. HIV:HIV-１核酸増幅定量法. 永井書店, 52 (1): 125-129, 2003.
13) 吉原なみ子：Vita.HIV 感染症の初期診断からステージ診断まで. ビー・エム・エル, 2003.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Kitamura K, Naganawa S, Sato S, Nossik D, Takahashi K, Hara T, Tochikubo O, Honda M, Nakasone T: Novel gag A/env B recombinant HIV-1 in injecting drug users in Krimskii Peninsula, Ukraine. The 14th International AIDS Conference, July 7-12, 2002, Barcelona, Spain.
2) Matsuo K, Nakasone T, Izumi Y, Ami Y, Ohsu T, Hamano T, Yamamoto N, Yamazaki S, Honda M: SIV Gag-expressing recombinant BCG-prime and recombinant vaccinia virus DIs strain-boost regimen evokes protective immune response in monkey. The 14th International AIDS Conference, July 7-12, 2002 Barcelona, Spain.
3) Nakasone T, Ami Y, Matsuo K, Izumi Y, Someya K, Nagai Y, Yamamoto N, Honda M: Priming with rBCG/SIV-gag and boosting with rDIs/SIV-gag partially protected monkeys from mucosal SHIV infection. The 12th International Viruses Congress, July 28-31, 2002, Paris, France.
4) Honda M, Yamazaki S, Warachit P, Chotpitayasunondh T, Yamamoto N, Thai-Japan AIDS Vaccine Project: Challenges to developing an HIV vaccine, new born baby as a final target. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Nov. 10-13, 2002, Thailand.
5) Kaizu M: Infection of Macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
6) Kanekiyo M: Optimization of codon usage confers vigorous expression in recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
7) Izumi Y: Protective efficacy of attenuated vaccinia virus DIs-vector vaccine against SHIV/AIDS model. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
8) Takizawa M: Neutralization effect against HIV-1 subtype E. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
9) Takizawa M: Identification and characterization of novel $SSC^{large}MIL4^{negative}$ T lymphocyte in guinea pig. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
10) Honda M: Preclinic studies to determine the immunogenicity, efficacy and safety of HIV vaccine candidate. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
11) Nakasone T: Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus- Based HIV Vaccine", Feb. 5-6, 2003, Tokyo, Japan.
12) Honda M, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N: Vaccine efficacy and safety of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) and replication-deficient vaccinia virus DIs- based HIV vaccine. 15th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP, Mar. 5-7, 2003, Okinawa, Japan.
13) Nakasone T: Priming with rBCG/SIV-gag and boosting with rDIs/SIV-gag partially protected monkeys from mucosal SHIV infection. 15th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP, Mar. 5-7, 2003, Okinawa, Japan.
14) Murakami T, Maeda T, Mizokami H, Honda M, Matsushita S: Development of a Pseudo-Phenotyping Method for the Humanized Anti-HIV-1 Monoclonal Antibody KD-247. 15th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP, Mar. 5-7, 2003, Okinawa, Japan.
15) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Yamada K, Sugiura W: HIV-1 gag cleavage site mutations and non-cleavage site mutations are closely related in viral fitness recovery process. XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5, 2002, Seville-Spain.
16) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Yamada K, Hellmann NS, Sugiura W: Unique Drug Resistant Mutation Patterns Found in HIV-1 CRF01_AE(subtype E) with Anti- Retroviral Treatment Failure. XI International HIV Drug Resistance Workshop. Jul.2-5, 2002, Seville-Spain.
17) Sugiura W, Ren F, Matsuda M, Chiba T, Kakizawa M, Tanaka H: Sequential linking analyses of within-host drug resistance evolution by reconstructing the seriral phylogenetic tree of HIV-1 protease under HAART. Third HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance. Dec.8-11, 2002, Virginia, USA.
18) Alabi SA, Blanchard T, Ariyoshi K, Berry N, and Whittle H. Potential use of an in-house viral load assay for therapeutic

vaccine efficacy in resource poor settings. Keystone 2003 Symposium on HIV Pathogenesis and Vaccine, Mar. 28 – Apr. 04, 2003, Banff, Canada.

19) Hansmann A, Schim van der Loeff MS, Kaye S, Aveika A, Sarge-Njue R, O'Donovan D, Ariyoshi K, Alabi A, Milligan P, Whittle HC. Plasma viral load and CD4% also predict mortality in HIV-2 infection. Cohort study with 8 years follow-up in West-Africa. XIV International AIDS Conference, Jul.7-12, 2002, Barcelona, Spain.
20) Matsuoka S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Kimura S, Oka S: Nelfinavir (NFV) can potentiate the infectivity and replication of HIV-1 whose fitness is otherwise compromised upon the acquisition of Gag p17 in association with protease mutations conferring NFV resistance. ICAAC, June 2002, San Diego, USA.
21) Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y: Ongoing generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in China's Yunnan province. 4th Japan-China Virology Meeting, June 27-28, 2002, Kunming, China.
22) Takebe Y, Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K: Molecular epidemiology of HIV in Yunnan province of China. 2002 International Meeting of the Institute of Human Virology, Sept. 9-13, 2002, Baltimore, USA.
23) Takebe Y. Yunnan province: "Melting Pot" that generate multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants. Sino-US Conference on Research and Training in AIDS-Related Area (Cosponsored by Chinese CDC and US NIH.) Nov 1-3, 2002, Beijing, China.
24) Takebe Y: Intertwined epidemic in the Asia and Pacific - From the molecular epidemiological viewpoints. 第16回日本エイズ学会国際シンポジウム"AIDS in Asia - Its epidemiological and social dimensions" 2002年11月28日，名古屋，日本.
25) Takebe Y, Yang R, Kusagawa S: A new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. XVth Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Mar. 5-7, 2003, Okinawa, Japan.
26) Sugimoto C, Ohgimoto S, Kusakawa S, Takebe Y, Shioda T, Nagai Y, Mori K: DNA prime-vaccinia boost immunization of deglycosylated Env protein induced less protective immunity against SIVmac239 than wt Env in rhesus macaques. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept. 2002, Monterey, USA.
27) Sugimoto C, Yasutomi Y, Ohgimoto S, Shioda T, Yamanoto N, Nagai Y, Mori K: Implication of deglycosylation of Env in pathogenicity of SIVmac239. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept. 2002, Monterey, USA.
28) Ansari A, Mayne AF, Bostik P, Mori K, Ahmed R, Jensen P E, Villinger F: CD4+ T cell mediated and antibody mediated enhancement of SIVgag antigen processing and cross presentation in SIV infected rhesus macaques. 20th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Sept. 2002, Monterey, USA.
29) Nii-Trebi N, Ampofo W, Aido S, Yankey F, Nuvor S, Obeng E, Atakorah M, Nerquaye-Tetteh J, Ishikawa K Ofori-Adjei D: Voluntary counseling and testing services in Ghana. XIV International AIDS Conference, July 7 -12, 2002, Barcelona, Spain.
30) Ugly-Kwame E, Kumi W, Brandful J, Ishikawa K: Prevalence of HIV-related opportunistic diseases among Ghanaian HIV/AIDS patients. XIV International AIDS Conference, July 7 -12, 2002,Barcelona, Spain.
31) Yamamoto N, Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Yamazaki S, Honda M: Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 10-14, 2003, Boston, USA.

2．国内学会

1) 滝澤万里，芳賀伸治，千葉丈，浅野敏彦，本多三男: フローサイトメーターによるモルモットの新しいMIL4-CT7+白血球分画の同定． 第 12 回日本サイトメトリー学会， 2002年8月2-3日，愛知医科大学.
2) 富田康浩，横山勝，仲宗根正，永井美之，佐藤裕徳: SIV Gp120コアの機能領域に付加する糖鎖の役割．第50回日本ウイルス学会総会，2002年10月16-18日，札幌.
3) 仲宗根正，染谷健二，原敬志，本多三男: HIV 感染症統合データベースの開発． 第 39 回情報科学技術研究集会， 2002年11月14-15日，東京.
4) 本多三男，仲宗根正，松尾和浩，網康至，泉康之，染谷健二，滝澤万里，浜野隆一，海津雅彦，川原守，原敬志，吉野直人，篠原克明，佐々木裕子，高橋栄治，阪井弘治，堀端重男，兼清優，浜武牧子，山崎修道，山本直樹：HIV ワクチンの実用化に向けて：サルからヒトへ．第16回日本エイズ学会総会，シンポジウム，2002年11月28-30日，名古屋.
5) 仲宗根正，染谷健二，原敬志，本多三男：HIV 感染症統合データベースの開発．第16回日本エイズ学会総会，2002年11月28-30日，名古屋.
6) 滝澤万里，村上利夫，江田康幸，前田敏宏，原敬志，本多三男：Primary isolateに対するヒトモノクローナル抗体のKD247の中和効果．第16回日本エイズ学会総会，2002年11月28-30日，名古屋.
7) 海津雅彦，網康至，泉康之，佐藤裕徳，武部豊，染谷健二，仲宗根正，本多三男：エンベロープ V3 ループ領域の入れ替えがSHIVに与えたin vitroおよびin vivoにおけるコレセプター使用への影響．第16回日本エイズ学会総会，2002年11月28-30日，名古屋.
8) 泉泰之，網康至，仲宗根正，松尾和浩，染谷健二，山本直樹，本多三男：弱毒化ワクシニア DIs ベクタ

ーのエイズワクチンへの応用、Dls/SIVgag の皮内接種による細胞性免疫誘導．第16回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
9) 田中陽子，染谷健二，泉泰之，堀端重男，本多三男，山本直樹，木村和子：ワクシニア Dls 株をベースにした組換え型 HIV ワクチンの免疫誘導能の特性　１．小動物における非活性化 HIV-1 gag 特異的 CTL の誘導．第16回日本エイズ学会総会，2002年11月28-30日，名古屋.
10) 染谷健二，忻克勤，網康至，泉泰之，仲宗根正，山本直樹，奥田研爾，本多三男：Non human primate を用いた DNA prime/recombinant vaccinia virus boost vaccine regimen の評価．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
11) 兼清優，松尾和浩，濱武牧子，長谷川篤彦，山本直樹，本多三男：組換え BCG における外来遺伝子の使用コドン最適化の有用性の評価．第16回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
12) 長縄聰，泉泰之，高橋清実，佐藤成大，藤崎茂巳，藤崎恭大，三谷満昭，網康至，中村正彦，本多三男，仲宗根正，栃久保修，北村勝彦：メタロエンドペプチダーゼム F の HIV に及ぼす影響．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
13) 村上利夫，網康至，吉野直人，滝澤万里，仲宗根正，江田康幸，本多三男，前田敏宏：ヒト化抗 HIV-1 V3-tip モノクローナル抗体（KD-247）投与による SHIV-C2/1 接種サルリンパ組織における CD4 陽性細胞の維持．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
14) 富田康浩，横山勝，仲宗根正，永井美之，佐藤裕徳：SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割．第16回日本エイズ学会総会，2002年11月28-30日，名古屋.
15) 兼清優，濱武牧子，本多三男：Sequential Immunization を応用した HIV-1 Env C4-V3 ペプチドによる交差反応性抗体の誘導．第 32 回日本免疫学会総会，2002 年 12 月 4-6 日，東京.
16) 原敬志，仲宗根正，浜野隆一，Tawee Chotpitayasunondh，Paijit Warachit，本多三男：HIV 垂直感染における防御因子としてのIL-16．第32回日本免疫学会総会，2002年 12 月 4-6 日，東京.
17) 仲宗根正，染谷健二，原敬志，池尾一穂，五條堀孝，本多三男：HIV 感染症統合データベースの開発．2003 年情報学シンポジウム，2003 年 1 月 16-17 日，東京.
18) 杉浦 亙：薬剤耐性 HIV-1 における gag の関与と薬剤耐性検査におけるその意義．第 5 回 白馬シンポジウム-最新エイズ研究 2002-，2002 年 7 月 25-27 日，白馬.
19) 杉浦 亙，松田昌和，千葉智子，岡野愛子，守谷研二，山田兼雄，山本直樹：多剤併用療法の導入による抗 HIV-1 薬剤耐性変異の動向．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
20) 杉浦 亙：プロテアーゼ阻害剤耐性 HIV-1 で見られるプロテアーゼ領域外変異とその働き．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
21) 松田昌和，千葉智子，岡野愛子，守谷研二，富田康浩，佐藤裕徳，杉浦 亙：相同組換えによる患者由来 CRF01_AE の再構築とその解析．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
22) 千葉智子，滝澤万里，松田昌和，松田善衛，横幕能行，岡野愛子，守谷研二，山田兼雄，本多三男，杉浦 亙：ヒト T 細胞株を用いた新たな HIV-1 薬剤感受性検査法の確立の試み．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
23) 田中理恵，松田昌和，杉浦 亙，花房秀次，根岸昌功，加藤真吾：ジェノタイプ法とフェノタイプ法による抗レトロウイルス薬に対する HIV-1 の薬剤感受性検査結果の比較．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
24) 岡野愛子，松田昌和，千葉智子，守谷研二，山田兼雄，杉浦 亙：多剤併用療法導入後の本邦における抗 HIV-1 薬剤耐性変異の動向．第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
25) 須藤弘二，西澤雅子，嶋 貴子，近藤真規子，向出雅一，蜂谷敦子，岡 慎一，加藤真吾，伊藤 章，宇宿秀三，野口有三，相楽裕子，杉浦 亙，今井光信：同一患者検体を用いた薬剤体制感受性検査結果の比較．第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
26) 林 公一，戸谷良三，喜多恒和，稲葉憲之，井村総一，大場 悟，葛西建郎，北村勝彦，杉浦 亙，高野政志，谷口晴記，外川正生，早川 智，塚原優己，箕浦茂樹，保田仁介，和田裕一，大久保秀夫，長縄聡，吉野直人：HIV 母子感染予防の臨床的研究（１）この3年間における妊婦HIV抗体検査率の動向について．第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
27) 和田裕一，戸谷良三，喜多恒和，稲葉憲之，井村総一，大場 悟，葛西建郎，北村勝彦，杉浦 亙，高野政志，谷口晴記，塚原優己，外川正生，早川 智，林 公一，箕浦茂樹，保田仁介，大久保秀夫，長縄聡，吉野直人：HIV 母子感染予防の臨床的研究（2）産婦人科領域からの全国調査成績．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
28) 外川正生，戸谷良三，喜多恒和，稲葉憲之，井村総一，大場 悟，葛西建郎，北村勝彦，杉浦 亙，高野政志，谷口晴記，塚原優己，林 公一，箕浦茂樹，保田仁介，和田裕一，大久保秀夫，長縄 聡，吉野直人，早川 智：HIV 母子感染予防の臨床的研究（3）

小児科領域からの全国調査．第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
29) 塚原優己，戸谷良三，喜多恒和，稲葉憲之，井村総一，大場 悟，葛西建郎，北村勝彦，杉浦 亙，高野政志，谷口晴記，外川正生，早川 智，林 公一，箕浦茂樹，保田仁介，大久保秀夫，長繩 聡，吉野直人：HIV 母子感染予防の臨床的研究（4）HIV 母子感染予防対策の普及を目的としたマニュアルの改訂．第 16 回日本エイズ学会学術集会， 2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
30) 谷口晴記，戸谷良三，喜多恒和，稲葉憲之，井村総一，大場 悟，葛西建郎，北村勝彦，杉浦 亙，高野政志，塚原優己，外川正生，早川 智，林 公一，箕浦茂樹，保田仁介，和田裕一，大久保秀夫，長繩聡，吉野直人：HIV 母子感染予防の臨床的研究（5）公開講座参加者へのアンケート結果の解析．第16回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
31) 千葉智子，杉浦 亙：Phenotype Analysis の現状と将来．第 16 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム 3，2002 年 11 月 28-30 日, 名古屋
32) 任 鳳容，杉浦 亙，萩島創一，田中 博：同一宿主からの連続サンプルより HIV-1 の継続的な進化解析．第 25 回日本分子生物学会，2002 年 12 月 11-14 日，横浜.
33) 榎瀬良美，山本俊郎，宇賀神秀樹，横山京子，鈴木元，桑田岳夫，阪井弘治，高橋栄治，篠原克明，三浦智行，喜多正和，速水正憲：弱毒 SHIV 感染免疫ザルにおける早期の強毒ウイルス攻撃接種に対する防御効果．第50回日本ウイルス学会学術集会・総会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
34) 喜多正和，榎瀬良美，宇賀神秀樹，横山京子，鈴木元，桑田岳夫，三浦智行，阪井弘治，高橋栄治，篠原克明，山本俊郎，今西二郎，速水正憲：IFN-γ遺伝子組込み弱毒SHIV のワクチン効果．第16回日本エイズ学会学術集会・総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
35) Pathipvanich Panita, 有吉紅也：Collaborative Activities on HIV/AIDS between Day Care Center, Lampang Hospital and the JICA-NIH Project．第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
36) Rojanawiwat A, Ariyoshi K, Pathipvanich P, Yoshiike K, Sawanpanyalert P： Lack of association between the concordance of HIV-1 infection and HIV-1 RNA viral load in HIV-1 affected couples in Thailand. 第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
37) 横幕能行，三浦秀佳，有吉紅也，松田善衛：Non-Clade B HIV-1 の臨床検体由来 gag-pol 発現標的細胞作成系の確立. 第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
38) Ruchusatsawat N, Nakayama E, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Yoshiike K, Ariyoshi K, Shioda T, Sawanpanyalert P: Study of Genetic Mechanisms of AIDS Pathogenesis in Thailand. 第 16 回日本エイズ学会学術集会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
39) 横幕能行，三浦秀佳，冨山宏子，川名愛，滝口雅文，岩本愛吉，松田善衛，有吉紅也：HIV-1 の CTL epitope 及び周辺領域のアミノ酸変異が特異的 CTL の認識および抗原提示機構に与える影響の解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
40) 狩野宗英，中村浩美，武田明子，加藤篤，須崎百合子，網康至，永井美之，俣野哲朗：Gag 発現組換えセンダイウイルスベクターワクチンのマカクサルエイズモデルによる解析. 第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
41) 倫文輝，狩野宗英，中村浩美，武田明子，森一泰，佐多徹太郎，永井美之，俣野哲朗：Loss of AIDS vaccine-based viremia-control without loss of virus-specific CD8+ T cells in macaque preclinical trials. 第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌
42) 横幕能行，三浦秀佳，松田善衛，有吉紅也：HIV-1 はどのようにして特異的CTLから逃避するのか？ 第 5 回日本レトロウイルス研究会夏期セミナー，2002 年 9 月，豊橋.
43) 草川 茂，武部 豊：ポリプロリンモチーフ（PXXP）を介する蛋白質間相互作用に対する新規阻害剤 UCS15A の抗 HIV-1 効果．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
44) 草川 茂，今村裕子，安岡 彰，岡 慎一，武部豊：国内で初めて分離された HIV-2 臨床分離株の解析．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
45) 武部 豊，楊 栄閣，草川 茂：組換型流行株（CRF）間の遺伝子組換えによる新しいクラスの HIV-1 組換株（Inter-CRF Recombinants）の分離とその解析．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.
46) Takebe, Y. (2002). Intertwined epidemic in the Asia and Pacific: from the molecular epidemiological view points. 第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
47) 松岡佐織，蜂谷敦子，土屋亮人，佐藤裕徳，武部豊，岡 慎一：NFV 存在下において感染効率の上昇が認められた薬剤耐性株の解析．第16回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
48) 楊 栄閣，草川 茂，Kunlong Ben, 武部 豊：HIV-1 組換え型流行株（CRF）間の新規組換えウイルスの分離とその解析．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.
49) 巽 正志，草川 茂，武部 豊，松田道行：HIV-1 subtype A 感染性クローンの樹立．第 16 回日本エイズ

学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

50) 加藤佳代子，大川　淳，武部　豊：CXCR4 利用能をもつ HIV-1 サブタイプ C 株の解析．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

51) 武部　豊：アジアにおけるエイズ・クライシス．第 10 回静岡エイズ・シンンポジウム，2003 年 2 月 8 日，静岡.

52) 武部　豊：アジアにおけるエイズ感染爆発の危機．微生物学研究所　感染症フォーラム 21「プリオン病と新興再興感染症」，2003 年 2 月 18 日，大阪.

53) 吉原なみ子，福嶋浩一，今井光信，伊沢明子，吉田繁，有山巌，杉本和敏，野尻治，池谷宏造，葦原義久，和山行正，林邦彦：第三回アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 コントロールサーベイ．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

54) 鈴木寿子，土屋利江，吉原なみ子： 細胞組織医療機器製品での HIV-1 の検出法の検討（その２）：多孔質体を足場としたヒト皮膚モデルでの HIV-1 感染細胞の動態．第２4 回日本バイオマテリアル学会大会，2002 年 11 月，東京.

55) 鈴木寿子，土屋利江，吉原なみ子：生分解性ポリマーを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

56) 坂本優子，永井慎也，高浜洋一，浜口行雄，小野崎郁史，吉原なみ子：カンボディアの結核患者における HIV-1 分子疫学．第 16 回日本エイズ学会総会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

57) 駒野　淳: Inhibiting functions of EBNA-1 induces apoptosis in EBV-positive normal and Burkitt's lymphoma cells．東京医科歯科大学特別セミナー，2002 年 4 月 23 日，東京.

58) 駒野　淳：Possible involvement of cytoskeleton in the HIV-1's life cycle?　第５回日本レトロウイルス研究会「夏期セミナー」，2002 年 9 月 6-8 日，豊橋.

59) 駒野　淳：Toward the understanding of the post-entry process of HIV-1: an active actin cytoskeletal reorganization supports viral entry．学友会シンポジウム「HIV 複製素過程研究の先端」，2002 年 11 月 26 日，東京.

60) 宮内浩典，横幕能行，駒野淳，杉浦亙，松田善衛：HIV-1 gp41 膜貫通領域の GXXXG モチーフに関する研究．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.

61) 杉本智恵，保富康宏，扇本真治，永井美之，森　一泰：Nef 遺伝子欠損変異 SIV はリンパ節において B 細胞領域であるリンパ濾胞の CD4+ T 細胞に感染していた．第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.

62) 森　一泰，杉本智恵，保富康宏，草川茂，武部豊，中山英美，塩田達雄，永井美之：Env エイズワクチンへの糖鎖変異の効果．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

63) 杉本智恵，保富康宏，塩田達雄，永井美之，森　一泰：糖鎖欠損変異 SIV 感染ザルに誘導された抗 Env 抗体エピトープの解析．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

64) 高村史記，森　一泰，武部豊，草川茂，永井美之，保富康宏：サル免疫不全ウイルス糖鎖欠損エンベロープ蛋白の免疫誘導能の解析．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

65) Xin Hui Qui，森　一泰，森豊隆志，多田隈圭，早川仁，出雲周二：エイズ脳症における大脳白質病変と皮質病変の比較＝サルエイズモデルを用いた神経病理学解析．第 16 回日本エイズ学会，2002 年 11 月 28-30 日，名古屋.

66) Barnor Jacob S, M-Kurosaki Naoko, Yamaguchi Kazuya, Kobayasi Hiroki, Ishikawa Koichi, Osei-Kwasi Mubarak, Ampofo William K, Ofori-Adjei David, Inagaki Yoshio, Yamamoto Naoki, Takaku Hiroshi: Down regulation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) expression by Vif antisense RNA expression vectors in transfected cells. 第 29 回核酸化学シンポジウム．2002 年 11 月 20-22 日，京都.

67) 山岡昇司，山本直樹：Genetic Screens for Cellular Factors Required for the HIV-1 Replication. 第２回あわじしま感染症・免疫フォーラム，　2002 年 8 月 24-27 日，兵庫.

68) 山岡昇司，新田剛，山本直樹：LMP1 膜貫通ドメインの NF-kappa B 依存性細胞死誘導における重要性．第 50 回日本ウイルス学会, 2002 年 10 月 16-18 日, 札幌.

69) 三浦英靖、前田道之、山本直樹、山岡昇司：HTLV-I 感染細胞における I κ B kinase 活性化機構　第 50 回日本ウイルス学会，2002 年 10 月 16-18 日，札幌.

70) Nurjahan Begum, 斉藤達哉, 山岡昇司, 山本直樹：Functional Analyses of a Variant Cell Line Resistant to HIV-1 Infection.　第 16 回日本エイズ学会, 2002 年 11 月 28-30 日, 名古屋.

71) Chinanonwait Netnaphis, 三浦英靖, 山本直樹, 山岡昇司：A recessive mutant cell line with a constitutive I kappa B kinase activity.　第 25 回日本分子生物学会, 2002 年 12 月 11-14 日，横浜.

72) 千葉章子，斉藤達哉，山本直樹，山岡昇司：NEMO は繊維芽細胞における PKC を介した NF-B の活性化に必要である．第 25 回日本分子生物学会，2002 年 12 月 11-14 日，横浜.

73) 斉藤直人，山本直樹，山岡昇司：LMP1 CTAR1 による NEMO 非依存的 NF-kappaB 活性化第 25 回日本分子生物学会，2002 年 12 月 11-14 日，横浜.

74) 斉藤達哉，中野裕康，山本直樹，山岡昇司：Lymphotoxin-beta Receptor による NEMO 非依存的な NF-kappaB 活性化機構の解析. 第 25 回日本分子生物学会，2002 年 12 月 11-14 日，横浜.

２３．筑波医学実験用霊長類センター

センター長　　寺　尾　恵　治

概　　要

本年度から文部科学省のナショナル・バイオリソースプロジェクトがスタートしたことを契機として、我が国における霊長類リソースの開発、保存、利用のありかたが検討され始めている。大型で知能の発達している実験用サル類は生物系研究資源の中でも特殊な動物であり、その飼育管理には特殊な施設、設備、管理技術に加えて、動物福祉の立場から心理的幸福や環境エンリッチメントへの配慮が要求される。近年、欧米を中心にして動物実験における動物福祉、動物の権利に関する社会的関心が高まり、実験動物の飼育環境の適正化への対応が必要になってきた。米国および EU においては、飼育環境を改善する具体的方法の一つとして飼育スペース（ケージサイズ）の拡大が検討され、それぞれの動物種や実験内容に応じたケージサイズが動物実験指針に盛り込まれた。現在ではこれらの基準が国際標準となりつつある。昭和５３年に開設した霊長類センターでは、日常的な健康管理と飼育管理業務に配慮した機能的な飼育ラックおよび飼育ケージを設置したが、カニクイザルの飼育ケージとしては国際標準を下回っていた。数年前から、国際標準に適合するケージの更新を求めて予算要求を繰り返してきたが、今年度の補正予算で繁殖・育成施設および P3 実験施設の飼育ケージの大型化が認められた。現在、新棟建設を含めケージサイズの大型化を目的とした設計が始まっており、平成１７年度からは国際標準サイズのケージによる繁殖育成および実験飼育が開始される予定である。ケージの設計に当たっては、カニクイザルの社会性に配慮して集団飼育を可能とする機能を付加した。加えて、補正予算により共同利用施設への functional MRI の設置要求も認められ、平成１６年から非侵襲的方法による高次脳機能解析が開始される。

今年度は１：１交配、隔日交配により２２７頭のカニクイザル新生児を得た。ワクチン検定を含め感染研へ１５２頭、共同利用施設に４９頭の計２０１頭のカニクイザルを供給した。なお、昨年度から手続きを開始していた韓国・国立霊長類センターへのミドリザルの譲渡契約が最終的に締結され、３月に繁殖育成された３０頭の繁殖用ミドリザルが韓国に移送され、韓国・国立霊長類センターでミドリザルの繁殖コロニーが再編成されることとなった。

これまで継続して行ってきた実験用サルの品質管理（各種モニタリング）およびモデル開発に関する研究は、前者は主として基盤的研究費により、後者は厚生労働科学研究費、文部科学省科学研究費、HS 財団などからの競争的研究費の支援を受けて順調に進展した。品質管理においては霊長類センターのコロニーから分離されたサルタイプ D レトロウイルス（SRV/D）の全塩基配列が決定され、既知の SRV/D とは異なるウイルスであることが判明し、筑波 SRV/D の高感度検出法の確立が期待されている。モデル開発では AIDS を中心とする感染症モデル、肥満・糖尿病などの代謝疾患モデル、老化モデルに加え、共同利用施設利用研究グループと共同で新しい支援技術が確立された。個体レベルから遺伝子レベルまで、階層の異なるサル由来リソースの整備と基盤技術開発を両輪とした総合的な霊長類リソース整備の体制が整いつつある。

人事面では、７月１日付で徳島大学から明里宏文が主任研究官として着任した。１０月１日付けで棚林　清主任研究官が獣医科学部・第三室長に転出した。

研　究　業　績

Ⅰ．実験用サル類の病原学的研究

１．サルＢウイルスに関する研究

（１）免疫組織染色によるＢウイルス（BV）特異的抗原検出法の検討

BV に対するモノクローナル抗体(#19B6 および #3E8)を用い、間接蛍光抗体法および免疫組織化学染色でヒト単純ヘルペスウイ ルス（HSV）と区別して検出できるか BV ｇ B 蛋白発現細胞及び HSV 感染細胞をモデルに して免疫染色を試みた。両抗体ともいずれの方法でも BVgB 発現細胞で明瞭に抗原を検出できたが、HSV 感染細胞ではほとんどシグナルは観察されず、病変組織における BV 特異的抗原検出に利用できる可能性が示唆された。

［棚林　清*、宇田晶彦、向井鐐三郎、山田章雄*（*獣医科学部）］

２．レトロウイルスに関する研究

（１）サルレトロウイルス(SRV/D)感染の検出法に関する研究

筑波霊長類センターで飼育されているサルより SRV/D つくば株を分離し、その全遺伝子配列を決定し、既知の SRV/D とは異なる新しい SRV/D （SRV/D-7 と仮称)であることを明らかにし、特異的検出 PCR 系を開発した。当センター における SRV/D -7 の感染経路、陽性率を明らかにするため、SRV/D-7 に特異的プライマーを設計し、SRV/D 臨床分離株（n=11）の遺伝子解析を行った。その結果、11 分離株全てが SRV/D-7 であったことから、本ウイルスは TPC 内で水平感染により広がっていることが示唆された。

［原　正幸、高野淳一朗*、成田豊子*、菊池俊彦、石川智美、藤本浩二*、寺尾恵治、向井鐐三郎（*(社)予防衛生協会)］

（２）サルエイズ脳炎発症モデルの確立に関する研究

エイズ脳炎で死亡したサル２頭の脳組織の培養により、SIV を産生するモノサイト系ＳＩＶ産生細胞株（BM1, BM5）を樹立し、２株の産生するＳＩＶ bm1 とＳＩＶ bm5 の遺伝子と Host range の解析を行った。その結果、SIV bm5 にはMφ指向性ＳＩＶに特徴的な点突然変異の一部があるが、SIV bm1 にはこの変異が全く無かった。クローン化 SIV bm1 および bm5 は肺胞Mφ、アストロサイトに感染増殖したが、SIVmac239 は感染できなかった。現在、Mφ・神経細胞指向性を担う遺伝子領域を特定しつつある。

［向井鐐三郎、佐多徹太郎*、菊池俊彦、石川智美、原　正幸、小野文子**、中山満（*感染病理部, **(社)予防衛生協会)］

（３）HIV-1 coreceptor, CXCR4・CCR5, -based vaccine の開発

抗 CCR5-CXCR4 キメラ環状ﾄﾞﾃﾞｶﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ単クローン抗体によるエイズウイルスの感染防止作用を MAGIC-5 細胞を用いて調べた結果、本抗体は HIV, SIV, SHIV の細胞への感染をほぼ完全に抑制した。本キメラ環状ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞでサルに免疫および Booster を行った結果、３頭中抗体の上昇が顕著でなかった１頭を含めて全頭の血清が SIV, SHIV の感染をほぼ完全に抑制した。また、１クール３回の免疫で約６ヶ月間は抗ウイルス活性が保持されることが明らかとなった。

［向井鐐三郎、原　正幸、菊池俊彦、石川智美、庄司省三*（* 熊本大薬)］

（４）エイズウイルス Vif タンパク質機能に関する研究

Vif タンパク質は、エイズウイルス複製効率を左右する重要な調節タンパク質である。最近の研究で我々は、Vif が viral genomic RNA 依存性に nucleoprotein complex としてウイルス粒子にパッケージされること、さらにウイルスプロテアーゼによりその一部が特異的領域で切断されることを示した。これらのことから Vif はウイルス粒子内で、ウイルス感染性に関わる何らかの機能を有することが推察された。そこで Vif のウイルス粒子内における役割を検討した。その結果、Vif はウイルスプロテアーゼによる Gag 前駆体の第一切断部位を特異的に阻害し、それによって capsid-p2-nucleocapsid からなる Gag 中間体が生成されること、さらにこの中間体は、Vif と共に nucleoprotein complex に局在することが明らかとなった。本研究成果は、Vif によるウイルス感染性制御機構の解明に重要な知見となるとともに、ウイルス成熟過程を阻害する新規抗 HIV 薬の開発に資すると考えられた。

[明里宏文]

（５）感染における Nef 遺伝子の役割

(内容はエイズ研究センターを参照)

［杉本智恵、森　一泰］

（６）Env エイズワクチンへの糖鎖欠失変異の効果

(内容はエイズ研究センターを参照)

［杉本智恵、森　一泰］

（７）糖鎖欠失 SIV の新規 attenuated virus としての性質

(内容はエイズ研究センターを参照)

［杉本智恵、森　一泰］

（８）マイクロサテライト多型によるアカゲザル MHC ハプロタイプ解析

(内容はエイズ研究センターを参照)

［杉本智恵、森　一泰］

（９）共通 MHC ハプロタイプを持つ SIV 感染アカゲザルに誘導されたウイルス特異的 T 細胞 エピトープと感染病態との関係

(内容はエイズ研究センターを参照)

［杉本智恵、森　一泰］

３．輸入カニクイサルからの赤痢アメーバ（Entamoeba histolytica ）の分離

中国から輸入したカニクイザル 1 頭から赤痢アメーバを分離した。昨年度までの糞便塗抹検査で中国、フィリピン、ベトナムから輸入されたカニクイザル 1,968 頭中 283 頭において E. histolytica/ E. dispar のシストを確認した。本年度は塗抹検査でシストが確認された 33 頭について培養と PCR 検査を組み合わせて E. histolytica と E. dispar の判別を行い、1 頭に E. histolytica、 30 頭に E. dispar を確認した。サル類の糞便内シストを介した飼育管理者の赤痢アメーバ感染に注意が必要である。

[高野淳一朗*、成田豊子*、藤本浩二*、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会）]

４．サルタイプ D レトロウイルス（SRV/D）の精製とウエスタンブロット（WB）用抗原の調整

筑波霊長類センター内のカニクイザルから分離した SRV/D ウイルスを精製して、ELISA　および WB 用抗原を調整し検査系を作成した。SRV/D は Raji 細胞で分離後、A549 細胞に感染させ限界希釈法によりクローン化した。感染 A549 細胞の培養上清から超遠心法によりウイルス粒子を精製し、これを ELISA および WB 抗原として調整した。

[高野淳一朗*、成田豊子*、藤本浩二*、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会）]

５．抗ブタ膵臓細胞抗体と B ウイルス抗原との交差反応性について

ブタ膵臓細胞を移植したカニクイザルにおいて、移植細胞抗原に対する抗体産生に伴い B ウイルス抗原に対する抗体反応が認められた。この反応は共通抗原性を有する SA8、HSV-1 およびホスト細胞の vero　細胞に対しては認められなかった。WB 検査で当該血清は 50kD ～ 60kD にのみ強いバンドを示し、B ウイルス抗体による反応ではないと判断した。ブタ細胞抗原と B ウイルス抗原の交差性については、二次元 WB によりさらに解析を進める。

[成田豊子*、高野淳一朗*、小野文子*、藤本浩二*、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会）]

II. 実験用サル類の臨床病理学的研究

１．２００２年度のカニクイザルのへい死例について

今年度の自然へい死例の剖検総数は４４頭であった。その死因と頭数は次のとおりである。死産８、肺炎３、敗血症（心臓、腎臓に膿瘍）５、咬傷７（母サルによる１、肺炎を併発１）、肺膿瘍２、哺育不良による餓死衰弱２、事故（ケージにはさまる）による餓死１、糖尿病２、膣壁穿孔による腹膜炎２、子宮内膜症に起因する腹膜炎１、開腹手術後の腹膜炎１、鼓腸症（腸捻転）１、リンパ腫１、黄疸１、出生直後死（生活力薄弱）１、骨軟化症１、不明（腐敗を含む）５。

［榊原一兵、浜野政章*、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会)］

III. 実験用サル類の臨床学的研究

１．サル類を用いた末梢血動員幹細胞移植

カニクイザルとアカゲザルを用いて、サイトカイン処理により末梢に動員した造血幹細胞を、1100cGy の放射線全身照射後に自家移植した。移植後、細胞の定着は確認されたが、その後二ヶ月過ぎに 6 頭中 5 頭のサルの容態が急激に悪化し、死亡した。細菌、寄生虫感染は確認されず、SVV、SRV、B-virus の抗体は陰性、抗ウイルス剤などの投薬も著効を示さなかった。現在その原因を解明すべく病理組織学的検索等を検討している。

[揚山直英*、羽成光二*, 鴻野あや子*, 小川浩美*, 小野文子*, 寺尾恵治（*(社)予防衛生協会）]

２．カニクイザルを用いた SeV/FGF2 ベクター接種実験

FGF2 遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクター（SeV/FGF2）を筋肉内投与したカニクイザルで急性変化を検討した。観察期間を通じて、死亡例は認められず、一般健康状態にも著しい異常は認められなかった。体重、体温、血圧、脈拍、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検の結果、SeV/FGF2 接種に起因すると考えられる重篤な急性毒性を発現しなかったことから、SeV/FGF2 の筋肉内投与における毒性は低いものと判断した。

[小野文子*、羽成光二*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*、米満吉和**、吉川泰弘***、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会、**九大、***東大）]

３．カニクイザルにおける糖尿病治療研究

糖尿病カニクイザルにブタ膵内分泌細胞を内包した人工膵島を腹腔内に移植し、血糖値、インシュリン値を指標として有効性を評価した。一方、ブタ膵内分泌細胞に対する抗体を測定したところ移植した人工膵島の破損が確認された８例中７例で抗体が検出されたが、PERV 感染は認められなかった。抗体が陰性で維持された 1 例において約半年間血糖値の低下とインシュリン値の上昇が認められ人工膵島が有効に機能したことが確認された。

［小野文子*、羽成光二*、成田勇人*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*,大河原久子**、吉川泰弘***、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会、**東京女子医大、***東大）]

４．カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作成

カニクイザルを用いて、ドパミンニューロンに対し選択的毒性を示す MPTP の静脈内連続投与によるパーキンソン病モデルの開発を行った。神経症状発現は個体差が著しく、投与閾値を越えた場合には起立不能を呈し死亡する例が見られた。死亡例では肝機能障害が疑われたため、血清中の GOT、GPT 値をモニターし、MPTP の投与量、投与間隔を微調整した。この方法により、安定したパーキンソン症状が持続するモデルの作出が可能となった。

［小野文子*、羽成光二*、成田勇人*、鴻野あや子*、大藤圭子*、小川浩美*、揚山直英*, 吉川泰弘**、寺尾恵治（*(社)予防衛生協会、**東大）]

IV. 実験用サル類の免疫学的特性に関する研究

１．マルチプレックス PCR-SSP 法によるカニクイザル MHC タイピング

カニクイザルのクラス I 主要組織適合抗原、MHC の

タイピング法の確立を目的とし、塩基配列を決定した。その解析結果をもとに、allele 特異的 primer set を設計した。これら primer set を混合することにより同時に数種類の allele を特異的に検出するマルチプレックス PCR-SSP 系を確立できたので、カニクイザルの MHC タイピングに有効な手段であると考えられる。
［宇田晶彦、棚林　清*、向井鐐三郎、山田章雄*、寺尾恵治（*獣医科学部）］

２．カニクイザル CD34 陽性細胞の長期培養と体外増幅
サル骨髄造血幹・前駆細胞の Ex vivo での増幅を目的として 長期培養法の検討をおこなった。カニクイザル骨髄から単離した CD34 陽性細胞をマイトマイシン処理を施したカニクイザル骨髄由来ストローマ細胞をフィーダーとして、hIL3、hFlt-3 存在下で培養した結果、培養 70 日目に CD34 陽性細胞数は約 250 倍に、コロニー形成細胞（造血前駆細胞）は約 230 倍に増加した。この結果より、サル CD34 陽性細胞の体外増幅が可能と判断した。
[柴田宏昭、河野陽子、寺尾恵治]

３．カニクイザル CD34 陽性細胞からリンパ系細胞への分化誘導
カニクイザル造血幹細胞からリンパ系細胞への分化誘導系を検討した。骨髄細胞由来の CD34 陽性細胞を、マイトマイシン処理のカニクイザル骨髄由来ストローマ細胞をフィーダーにし、hIL3、hFlt-3 存在下で培養した結果、培養 7 日目より CD20dull 細胞が発現した。その後、培養 40 日目前後より、CD20dull ／ IgD 陽性細胞が増加し、成熟 B 細胞と考えられる細胞への分化が示唆された。CD3 陽性細胞（T 細胞）、CD16 陽性細胞(NK 細胞)は検出されなかった。
[柴田宏昭、河野陽子、寺尾恵治]

４．カニクイザルの末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞レベルに及ぼす遺伝的影響
カニクイザルの DP T 細胞レベルには個体差が存在することから遺伝的要因の関与が考えられた。両親の DP レベルを高レベル群と低レベル群に分けて家系調査を行った結果、両親が高×高、高×低、低×低の組み合わせからそれぞれ 69.2%、33.3%、0%の高レベルの子供が生まれた。また DP T レベルの両親と子供との相関（遺伝率）は 0.54 ± 0.19 であり、カニクイザルでは末梢 DP T 細胞レベルに遺伝的要因が関与する可能性が示唆された。
[李　元雨、柴田宏昭、*吉川泰弘、寺尾恵治（*東大）]

５．カニクイザル末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞レベル増加時の解析（縦断的調査）
6 歳齢のカニクイザルを DP T 細胞レベルで高中低の 3 群に分け、5 年間縦断的調査を実施した。DP T 細胞が急増した個体では 6 歳齢の時点で休止期成熟記憶 T 細胞の割合が高いことから、免疫系の成熟度が DP T 細胞レベルに影響することが示唆された。胸腺起源細胞マーカーである TREC のレベルを調べた結果、DP T 細胞が増加したサルで TREC のレベルが低く、胸腺退縮が加齢に伴う DP T 細胞増加要因の一つと考えられた。
[李　元雨、柴田宏昭、*吉川泰弘、寺尾恵治（*東大）]

Ⅴ. 実験用サル類の内分泌学的研究

１．カニクイザルの消化管組織中のテストステロン様物質の同定
雄カニクイザルの消化管組織中には少なくとも４種類のテストステロン様物質が存在することを明らかにしてきた。これらのステロイドを同定すべく、盲腸組織をホモジェナイズし、有機溶媒による抽出、ゲル濾過および高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）による分離・精製をおこなった。それらを試料とし、標準標品と比較検討したところ、それらはテストステロン、５α－ディヒドロテストステロン、アンドロステネダイオンと同定された。最後の一つは未だ同定されていない。
[宮本幸子、山海　直、吉田高志]

２． カニクイザルの消化管組織中のテストステロン変換酵素
雄カニクイザルの組織をホモジェナイズして、マイクロゾーム分画を得た。この分画とテストステロンとをインキュベートし､培養液を高速液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）によって分析したところ、テストステロン以外に、少量のアンドロステネダイオンと大量の５α－ディヒドロテストステロンとが検出された。このことは消化管もステロイドホルモンの生合成をおこなう場であることを意味している。消化管の未知の機能が考えられる。
[宮本幸子、山海　直、吉田高志]

３．カニクイザルでの肥満指数としてのレプチン/アディポネクチン比の有用性
カニクイザルの健康状態を把握する目的で各種血清生化学値の測定を行っているものの、肥満を的確に把握できる指標は乏しい。また、二波長Ｘ線密度測定装置（ＤＸＡ）によって全身の脂肪量の測定はできるものの煩雑である。そこで、肥満指数としてのレプチン/アディポネクチン比（Ｌ/Ａ比）の有用性について検討を加えた。ＤＸＡによって全身の軟部組織量に占める脂肪の割合(%Fat)を測定しＬ/Ａ比と比較したところ、%Fat が 40％を超える明らかに肥満の個体で L/A 比の顕著な増加を認めた。
[陳　楊、吉川泰弘*、吉田高志（*東大）]

４．長期人工環境飼育下のカニクイザルでの閉経後の骨量減少
霊長類共同利用施設のエイジングファームの動物を閉経後骨粗鬆症の実験モデルとするために腰椎骨ならびに

全身骨の測定を行なった。2000 年 5 月より約半年の間隔で反復測定を行なった。23 歳齢以上の個体で全身骨量の減少傾向が認められた。しかし腰椎骨では未だそのような傾向は得られていない。今後も観察を継続し自然発症性の閉経後骨粗鬆症の実験モデルとしたい。
[陳　楊、小川浩美*、吉川泰弘**、吉田高志（*(社)予防衛生協会、**東大）]

VI. 実験用サル類の生殖生理および発生工学的研究

１．生殖細胞との共培養を目的としたカニクイザル各種体細胞の株化とその有用性

体細胞は雌雄の成熟カニクイザルおよび胎児より採取し、複数代継代後一部の株において不死化を行った。これまでに卵管、精巣、子宮、卵巣、脳、腎、心、肝、肺、腸管および胎児由来の細胞を分離し株化することに成功した。卵管上皮細胞をフィーダーとしてマウス卵を培養したところ卵の発生に良好な影響を及ぼしていることが確認された。またセルトリ細胞をフィーダーとしてカニクイザルの円形精子細胞を培養したところ、長期の培養が可能となり一部の円形精子細胞で形態変化を示すものを認めた。
[広瀬良宏、岡田浩典、山海　直]

２．不死化カニクイザル卵管上皮細胞株の樹立およびその特性の解析

卵の発育培養において卵管上皮細胞との共培養が良好な影響を与えることが知られている。しかしながらカニクイザルの場合採取できる細胞の量に限界がある。そこでカニクイザル卵管上皮細胞の不死化を試みた。不死化した卵管上皮細胞株について卵に影響を及ぼすことが知られている数種のグロースファクター遺伝子の発現を検索した。またマウス卵を用いて実際に卵の共培養をおこない、その有効性について検索した。その結果、複数のグロースファクターの発現が認められ、実際に卵を培養した場合にも有効な作用が認められた。
[岡田浩典、広瀬良宏、山海　直]

３．Buffalo Rat Liver（BRL）細胞培養上清中に認められるタンパクの LC-MS/MS 分析

BRL　細胞の培養上清中にカニクイザルおよびマウス卵の生存性を改善する因子が 35-50kDa の範囲に含まれていることを明らかにした。そこで LC-MS/MS 分析を試み７種のタンパクを同定した。そのうち follistatin-related protein と pigment epithelium-dirived factor について、卵発生に対して作用することが知られている。この２種を含む７種のタンパクのいずれかが卵発生に影響を及ぼしているものと考えられた。
[岡田浩典、広瀬良宏、吉田高志、山海　直]

４．カニクイザルの体細胞核の異種動物卵の除核卵細胞質内への注入

我々はカニクイザルの胚盤胞を少しでも多く得るための方法を模索している。今回、除核した異種動物の卵細胞質にカニクイザルの体細胞核を注入しその発生について観察した。その結果、低率ではあるが胚盤胞を得ることができた。今後、ミトコンドリア DNA の動態などを検索する予定。また、得られた胚盤胞から ES 細胞の樹立を試み、ES 様細胞をえることに成功したがその株は分化してしまった。
[山海　直、広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎*（*理研）]

５．ウサギ胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立および分化能の検討

サル類の ES 細胞樹立技術の確立を目指し、まずはウサギ卵を用いて技術確立を試みた。自然交配により得られたウサギ卵から ES 様細胞を分離した。ES 様細胞を分離するにあたり、透明体を除去した卵をフィーダー細胞上で培養し ES 様細胞の分離を試みた。得られたコロニーの形態は扁平であり、アルカリフォスファターゼ活性は陽性であった。また分化用培地で培養したところ細胞塊の形態が球状に変化するものが観察された。この球状の細胞塊は複数の層からなり三胚葉に分化している可能性が示唆された。さらに培養を続けることで嚢胞状に変化して胚様体を形成した。
[広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎*、山海　直（*理研）]

６．ウサギ体細胞核由来胚性幹細胞の樹立

サル類への応用を将来的な目的とし、ウサギ体細胞核由来胚性幹細胞の樹立を試みた。ウサギ卵丘細胞の体細胞核移植により得られた卵を用いて ES 様細胞を分離することができた。これらの株は形態上では自然交配により得られたウサギ ES 様細胞と差異はなかった。また９代継代後も 71%の細胞でウサギの正常染色体数である 2n=44 を維持していた。さらに ES 細胞の未分化性を示すマーカーである SSEA 染色においては SSEA-1 と 3 において陽性であることが確認された。今後、これらの細胞株を用いてウサギの体細胞核由来の ES 様細胞の特性について明らかにしたい。
[広瀬良宏、岡田浩典、越後貫成美*、井上貴美子*、三木洋美*、小倉淳郎*、山海　直（*理研）]

７．強磁場環境が精子の運動性および先体反応に及ぼす影響

サル類を含む哺乳動物の生殖細胞に及ぼす強磁場の影響について継続して検討して
いる。Lysophosphatidyl-choline （LC）を培養液に添加して先体反応時間を短縮することで昨年度実施した実験条件の改善を試みた。また、精子は急激な温度変化により運動能が著しく障害され不動化精子が多く観察されるこ

とが知られている。そのことを応用して低温障害処理した精子に強磁場を暴露した場合に致死的な効果が増大されるか否かについても検討を加えた。実験にはモルモット精子を用いた。その結果、10Tesla の磁場環境への 15 分間の暴露では顕著な影響は認められなかった。
[山海　直、岡田浩典、広瀬良宏、岡田詔子*（*東邦大）]

８．多数の卵を収集するための Zona-float 法の開発
近年、数百個の卵をサンプルとして分子生物学的解析を行うことが増えきた。しかしながら手作業による卵の単離・収集では、数千単位の卵を収集することは困難である。また、作業にかかる時間が長くなることにより卵細胞自体に多大なダメージを与えてしまうという問題が生じる。そこで、卵特有の物理的な性質について検索し、透明帯の比重が他の細胞成分に比べて非常に小さいことを明らかにした。この性質を利用し、Percoll を用いて卵を他の細胞からの単離・収集を試み、同時に多数の卵の収集することに成功した。今回はマウス卵を用いて検討したが、今後サル類の卵でも応用できる技術であると考えている。
[岡田浩典、広瀬良宏、山海　直]

Ⅶ. 実験用サル類の飼育・繁殖・育成技術の開発と改良

１．カイニクイザルの繁殖成績
（１）３日間１対１同居交配による繁殖成績
繁殖用雄２３頭と雌２９９頭を用いて延べ７２８回の３日間１対１同居交配を実施した。妊娠診断は前年度に交配を行ったものも含め、延べ７２１頭についておこない、１２８頭の妊娠例（１７．７％）を得た。出生仔の内訳はＦ２が４４頭、Ｆ３が６６頭、Ｆ４が２頭、Ｆ５が２頭、Ｆ６が１頭の合計１１５頭であった。そのうち死産は４例、流産は７例であった。
［前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志（*(社)予防衛生協会)］

（２）隔日１対１交配方式による繁殖成績
繁殖用雄６１頭と雌２８９頭で延べ３７４回の交配を実施した。妊娠診断は前年度から引き続き交配を行っていたものも含め、延べ３８８頭についておこない１２８頭の妊娠例（３２．９％）を得た。出生仔の内訳はＦ２が２０頭、Ｆ３が９６頭、Ｆ４が５頭、Ｆ５が１頭の合計１２２頭であった。そのうち死産は１３例、流産は７例であった。
［前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志（*(社)予防衛生協会)］

（３）長期同居交配方式による繁殖成績
繁殖候補雄１頭雌１頭で長期間同居により妊娠１例を得たが死産であった。
［前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志（*(社)予防衛生協会)］

（４）カニクイザルの人工哺育
本年度中に正常出産した２２７頭のうち７２頭(３１．７％）は母ザルが哺育不良のため人工哺育を実施した。人工哺育した７２頭のうち１０頭が死亡した。死因別頭数は、肺炎３頭、衰弱３頭、肺血症１頭、肺膿症１頭、肺疾患１頭、咬傷１頭であった。
［前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、小川浩美*、高野一郎、吉田高志（*(社)予防衛生協会)］

Ⅷ. 実験用サル類の自然発症疾患

１．カニクイザルにおける心機能疾患の調査
カニクイザル繁殖コロニーの個体の心機能疾患に関する調査を実施した。約７００頭のカニクイザルの中で、雑音の聴取された２６頭を超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査により確定診断を試みた。その結果、９頭の個体で心室中隔欠損、三尖弁閉鎖不全などの心機能異常が認められた。いずれの個体も血算値、心房性ナトリウム利尿ペプチドなどの生化学値などに異常は認められなかった。今後、遺伝的調査、縦断的調査を継続して行いカニクイザル繁殖コロニーにおける心機能疾患の現状を明らかにしたい。
[揚山直英*, 鯉江　洋**, 小野文子*, 山海　直（*(社)予防衛生協会、**日大）]

２．アフリカミドリザルにおける心機能疾患の調査
アフリカミドリザルにおいて超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査を実施して心機能疾患の調査を行った。現在まで２２頭の調査を行い、レントゲン所見、超音波診断で心室の拡大が認められた拡張型心筋症の疑い症例が４例、肥大型心筋症が一例確認された。また、心電図検査により不整脈個体が２例認められた。不整脈個体については、ホルター心電計による鑑別診断を行うことを現在検討している。また、その他の疾患に関しては家系調査、遺伝的解析や心臓カテーテル造影などによる精査を実施していきたい。
[揚山直英*, 鯉江　洋**, 小野文子*, 山海　直（*(社)予防衛生協会、**日大）]

発表業績一覧

Ⅰ. 誌上発表

１．欧文発表
1）Mumi S, Endo M, Mukai R, Tachibana K, Umeda M, Honda T, Takamune N, Shoji S, : A novel cyclic peptide vaccine for defense against HIV/AIDS progression.　J. Biol.

Chem. In press.
2）Khan MA, Akari H, Kao S, Aberham C, Davis D, Buckler-White A, Strebel K : Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1Vif protein by the viral protease and its possible correlation with Vif function. J Virol. 76, 9112-9123, 2002.
3）Kao S, Akari H, Khan MA, Dettenhofer M, Yu X-F, Strebel K : Human immunodeficiency virus type 1 Vif is efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection. J Virol. 77. 1131-1140, 2003.
4）Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K. nef gene is required for robust productive infection by simian immunodeficiency virus ofT-cell-rich paracortex in lymph nodes. J Virol. 774169-80, 2003.
5）Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirata M, Hirai M, Terao K, Suzuki Y, Sugano S and Hashimoto K. : Prediction of unidentified human genes on the basis of sequence similarity to novel cDNAs from cynomolgus monkey brain. Genome Biology, 2002;3(1): RESEARCH 0006.1-0006.5.
6）Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, Ono F., Shen Y, Wang L, Mizukami H, Kume A., Matsumura M., Nagatsu I, Urano F, Ichinose H, Nagatsu T, Terao K, Nakano I and Ozawa K. : Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Human Gene Therapy, 13: 345-354.
7）Shimada MK, Terao K and Shotake T. : Mitochondrial sequence diversity within a subspecies of savanna monkeys (*Cercopithecus aethiops*) is similar to that between subspecies. Journal of Heredity, 93: 9-18.
8）Lee WW, Nam KH, Terao K, and Yoshikawa Y. : Age related telomere length dynamics in healthy cynomolgus monkey's PBMC measured by Flow FISH. Immunology, 105: 458-465.
9）Kano M, Matano T, Kato A, Nakamura H, Takeda A, Suzuki Y, Ami T, Terao K, and Nagai Y. : Primary replication of a recombinant Sendai viral vector in macaques. Journal of General Viology, 83: 1377-1386.
10）Hanazono Y, Nagashima T, Asano T, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Dunbar CE, Kume A, Terao K, Hasegawa M. and Ozawa K. : In vitro selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. Gene Therapy, 9:1055-1064.
11）Hanazono Y, Terao K, Shibata H, Nagashima T, Ageyama N, Asano T, Ueda Y, Kato I, Kume A, Hasegawa M. and Ozawa K. : Introduction of the GFP gene into hematopoietic stem cells in primte results in prolonged discrepancy of in vivo transduction levels between bone marrow progenitors and peripheral blood cells. Journal of Gene Medicine, 4: 470-477.
12）Terao K, Suzuki J and Ohkura S. : Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys. Implication of plasma cortisol levels. Primates, 43(4): 329-338.
13）Asada Y, Kawamoto Y,Shotake S and Terao K. : Molecular evolution of IgG subclass is different from that of IgG in non-human primates, implication of antigenic determinant among apes-. Primates, 43(4): 343-349.14）Inoue-Murayama M, Adachi S, Mishima N, Mitani H, Takenaka O, Terao K, Hayasaka I and Murayama Y. : Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression. Neuroscience Letter, 334(3):206-210.
15）Osada N, Hida M, Kusuda J, Tanuma R, Hirai M, Terao K, Sugano S and Hashimoto K. : Cynomolgus monkey testicular cDNA library for discovery of novel human cDNAs in the human genome sequence. BMC Genomics, 2002 3: 36-47.
16）Suzuki J, Ohkura K and Terao K. Baseline and stress levels of cortisol in conscious and unrestrained Japanese macaques (*Macacca fuscata*). J Med Primatol., 2002 31: 340-344.
17）Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ohto K, Ono F, Nagashima T, Ueda Y, Donahue R.E, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y and Terao K. : Safe and Efficient Methods of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Biomedical Research in Cynomolgus Monkeys. Comp Med. 2002 Oct;52(5):445-51.
18）Ageyama N, Kimikawa M, Eguchi K, Ono F, Shibata H, Yoshikawa Y and Terao K. : Modification of the Leukapheresis Procedure for Use in Rhesus Monkeys (Macaca mulata) J. Clin. Apheresis, 18(1):26-31, 2003.
19）Chen, Y., Ogawa, H. Narita, H., Ohtoh, K., Yoshida, T. and Yoshikawa, Y.: Ratio of leptin to adiponectin as an obesity index of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Exp. Anim. (in press)
20）Kawasaki K, Mitsui Y, Ono T, Ogawa H,Takano I, Sankai T, Terao K. : Simple method for assaying serum oxytocin and changes of serum oxytocin level during parturition in cynomolgus monkeys. Exp. Anim. 51, 181-185, 2002
21）Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, Sankai T. : Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) Human Reproduction (in press)
22）Okada H, Hirose Y, Ito M, Sankai T. : Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts Comparative Topics in Laboratory Animal Science (in press)

23）Tsuchida J, Kawasaki K, Sankai T, Kubo N, Terao K, Koyama T, Makino J, Yoshikawa Y. : Newtype of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis* Int. J. Primatol.（in press）

２．和文発表

なし

Ⅱ．学会発表

１．国際学会

1）Akari H, Bour S, Kao S, Strebel K: The HIV-1 Vpu induces apoptosis by suppressing the NF-kB-dependent expression of anti-apoptotic factors. Keystone Symposia, Colorado, USA. April 5-11, 2002.

2）Khan MA, Kao S, Akari H, Davis D, Buckler-White A, Strebel K: Intravirion processing of the HIV-1 Vif protein by the viral protease. Keystone Symposia. Colorado, USA. April 5-11, 2002.

3）Akari H, Kao S, Khan MA, Strebel K: Regulation of viral infectivity by HIV-1 Vif: more is not always better. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

4）Kao S, Akari H, Khan MA, Strebel K: HIV-1 Vif is efficiently packaged into virions during acute but not chronic infection of H9 cells. ColdSpring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

5）Khan MA, Akari H, Kao S, Davis D, Strebel K: Intravirion processing of thehuman immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease: implications for viral infectivity. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

6）Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Komatsu N, Terao K, Ozawa K. and Hasegawa.M : . In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells with a novel selective amplifier gene consisting of the erythropoietin receptor and MPL genes The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston,USA June 5-9, 2002,

7）Yonemitsu Y, Terao K, Ono F, Kuwahara T, Iida A, Hara H, Iwasaki H, Hasegawa M and Sueishi K. : Preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant sendai virus vector using non-human primate: Toward a clinical study for 'integrated' therapeuticangiogenesis to treat subjects with critical limb ischemia. The 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston,USA June 5-9, 2002,

8）Fujimoto K, Takano J , Narita T and Mukai R. : Detecition of B virus infecition in macaque monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. The 19th Congress of the International Primatological Society, August, 2002, Beijing, China.

9）Ozawa K, Hanazono Y, Kume A, Nagashima T, Ueda Y, Terao K and Hasegawa M. : SAGs（Selective Amplifier Genes）for in vivo expansion of transduced cells in hematopoietic stem cellgene therapy. 3rd Stem cell gene therapy conference, Rockville MD, USA, March 21-23, 2002

10）Hida M. Sakate R, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirai M, Terao K, Gojyobori T and Sugano S. : Comparative analysis of 5'-regions of human and cynomolgus monkeymRNA using oligo-capped cDNA libraries. HGM 2002:HUGO Seventh International Human Genome Meeting, Shanghai, China,.April 14-17, 2002

２．国内学会

1）原　正幸、菊池俊彦、高野淳一朗、成田豊子、藤本浩二、棚林　清、馬場　忠、向井鐐三郎　カニクイザルコロニー SRV / D の同定とその検出系の確立　第 49 回日本実験動物学会（名古屋）2002 年 5 月

2）棚林　清、宇田晶彦、向井鐐三郎、山田章雄　免疫組織染色によるＢウイルス特異的抗原検出法の検討　第 134 回日本獣医学会（岐阜）2002 年 9 月

3）宇田晶彦、棚林　清、向井鐐三郎、南　基煥、山田章雄　カニクイザルにおける CD3 分子のポリモルフィズムの解析　第 131 回日本獣医学会（岐阜）2002 年 9 月

4）明里宏文、足立昭夫　HIV-1 Vif 蛋白はウイルス粒子内においてプロテアーゼによる Gag 前駆体の p2-NC プロセシングを特異的に阻害する　第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会（札幌）2002 年 10 月

5）明里宏文、足立昭夫、Klaus Strebel: HIV-1 Vif 蛋白質に関する機能解析. 第 16 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム５「HIV 形態形成に関する基礎研究の進歩」（名古屋）2002 年 11 月

6）中山大介、向井鐐三郎、石川智美、橘 圀臣、梅田衛、本田徹朗、高宗暢暁、三隅将吾、庄司省三：Chemokine receptor CCR5-CXCR4 chimera 抗原に基づいた conformation specific 単クローン抗体の免疫学的諸性質の検討　第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会（名古屋）2002 年 11 月

7）遠藤昌史、三隅将吾、向井鐐三郎、石川智美、橘 圀臣、梅田 衛、本田徹朗、高宗暢暁、庄司省三 CXCR4 の特異的構造を基礎にした HIV-1 X4 ウイルスの感染防御法の検討　第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会(名古屋）2002 年 11 月

8）飯干高明、三隅将吾、高宗暢暁、向井鐐三郎、石川智美、橘 圀臣、梅田 衛、本田徹朗、庄司省三 HIV-1 coreceptor 由来環状 dodecapeptide(cDDR5)のウイルス感染防止免疫抗原としての検討　第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会（名古屋）2002 年 11 月

9）菊池俊彦、石川智美、宮崎　均、佐多徹太郎、向井

鐐三郎：Cloning and Analysis of Neurotropic SIV。 第 25 回日本分子生物学会（横浜）2002 年
10）小澤敬也、村松慎一、王立軍、池口邦彦、藤本健一、岡田尚巳、水上浩明、寺尾恵治、中野今治 AAV ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療、シンポジウム「中枢神経系再生のストラテジー」第 45 回日本神経化学会大会、7 月 17 日?19 日、2002、札幌学（内 208）
11）Nagashima,T., Ueda,Y., Hanazono,Y., Shibata,H., Ageyama,N., Komatsu,N., Terao,K., Ozawa,K and Hasegawa,M.： Second generation selective amplifire genes for efficient in vivo expansion of gene modified hematopoietic cells. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.
12）Takatoku,M., Hanazono,Y., Nagashima,T., Shibata,H., Ageyama,N., Ueda,Y., Kume,A., Dunbar,CE., Terao,K., Hasegawa,M. and Ozawa,K.： Clonal Insertation analysis of gene-modified hematopoietic cells after hematopoietic reconstitution with retrovirally-transduced CD34+ cells in nonhuman primates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.
13）Yonemitsu,Y., Terao,K., Ono,F., Kawahara,T., Iida,A., Hara,H., Iwasaki,H., Hasegawa,M. and Sueishi,K. : A preclinical safety study for intramuscular administration of F-defective, non-transmissible recombinant Sendai virus vector using non-human praimates. The 8th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, July 18 - 20, 2002, Tokyo.
14）柴田宏昭、棚林 清、揚山直英、吉川泰弘、寺尾恵治 カニクイザル骨髄中の造血幹・前駆細胞の同定 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
15）川崎勝義、小山高正、山海 直、寺尾恵治、吉川泰弘 老齢ザルの非修正法による迷路学習 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
16）李 元雨、寺尾恵治、吉川泰弘 カニクイザルの末梢 CD4/CD8 共陽性（DP）T 細胞と腸管上皮 DPT 細胞との性状比較 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
17）寺尾恵治、李 元雨、柴田宏昭、南 基煥 老齢カニクイザル NK 細胞の表現型と機能 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
18）成田純子、鳥居隆三、寺尾恵治、櫻川宣男 カニクイザル羊膜細胞の核移植による胚の発生 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
19）成田勇人、小野文子、鴻野あや子、羽成光二、揚山直英、大藤圭子、村松慎一、池口邦彦、藤本健一、中野今治、寺尾恵治 カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作出 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
20）揚山直英、花園 豊、小野文子、柴田宏昭、長島建之、上田泰次、長谷川護、小澤敬也、吉川泰弘、寺尾恵治 カニクイザル造血幹細胞の自家移植法の確立 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
21）揚山直英, 花園 豊, 上田享司, 柴田宏昭, 上田泰次, 長谷川護, 小野文子, 小澤敬也, 寺尾恵治；カニクイザルにおいてヒトタンパク質に対する抗体産生を抑制する方法。2003/5/29-31 第 50 回日本実験動物学会総会（埼玉）
22）川崎勝義、中島宙美、関田清司、小山高正、寺尾恵治、山海 直、吉川泰弘 コカイン自己投与カニクイザルの線条体ドーパミン・マイクロダイアリシス 日本神経精神薬理学会（前橋）2002 年 10 月 17 日-18 日
23）陳 楊、小野文子、吉田高志、吉川泰弘 カニクイザルにおける血中レプチン濃度と年齢、体重および性別の関係 第４９回日本実験動物学会総会 （名古屋）2002 年 5 月
24）陳 楊、成田勇人、小野文子、吉田高志、吉川泰弘 カニクイザルでの脂肪細胞由来サイトカインと肥満との関係 第１８回日本霊長類学会大会（東京）2002 年７月
25）宮本幸子、山海 直、町田武生、吉田高志 雌雄ニクイザルの糞便中テストステロン様物質の検出 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
26）吉田高志 糞便中の性ステロイドホルモンの簡易測定法とその応用 第１８回日本霊長類学会大会シンポジウム（霊長類の生殖生物学：ラボからフィールドまで）（東京）200 ２年７月 19-21 日
27）吉田高志 サル類の骨代謝と生理 第６回サル類の疾病ワークショップ（骨疾患を中心として（筑波）2003 年 2 月
28）山海 直 サル類の発生工学?基盤技術の開発を目指して シンポジウム「霊長類の生殖生物学：ラボからフィールドまで」 第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
29)広瀬良宏、岡田浩典、井上貴美子、越後貫成美、三木洋美、小倉淳郎、山海 直 ウサギの受精卵および体細胞の核移植由来胚からの ES 細胞樹立の試み フォーラム「医療に貢献する実験用ウサギの新しい展開」（佐賀）2003 年３月
30）山海 直、広瀬良宏、岡田浩典、土屋英明、越後貫成美、岡田詔子 サル類精子の特性と凍結保存 第５回 SSRE（The Society for the Study of Reproduction Engineering）シンポジウム （東京）2003 年 3 月
31）岡田浩典、広瀬良宏、喜多 清、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直 Buffalo Rat Liver 細胞との共培養がマウス卵の発育に及ぼす影響 第 49 回日本実験動物学会（名古屋）2002 年 5 月
32）広瀬良宏、岡田浩典、喜多 清、伊藤雅夫、山海 直 カニクイザル円形精子細胞の体外成熟培養におけるアポトーシスインヒビターの影響 第 49 回日本実験動物学会（名古屋）2002 年 5 月
33）岡田浩典、広瀬良宏、吉田高志、伊藤雅夫、山海 直 Buffalo Rat Liver 細胞の培養上清がマウス卵の発育に及ぼす影響 第 43 回日本哺乳動物卵子学会（和歌山）

2002 年 5 月
34）広瀬良宏、李　元雨、吉川泰弘、岡田浩典、山海　直　カニクイザル精細胞のアポトーシスの検索および体外成熟培養における　アポトーシスインヒビター添加の影響　　第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
35）岡田浩典、広瀬良宏、Manonmani Periyasamy、吉田高志、伊藤雅夫、山海　直　受精卵の発育培養における各種フィーダー細胞の影響　第 18 回日本霊長類学会(東京）2002 年 7 月 19-21 日
36）土屋英明、松田佳子、喜多　清、岡田浩典、広瀬良宏、桑名　貴、山海　直　サル類始原生殖細胞に関する体外操作基盤技術　第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
37）松田佳子、土屋英明、山海　直、桑名　貴　カニクイザル始原生殖細胞の検出と培養の試み　第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
38）越後貫成美、小倉淳郎、広瀬良宏、岡田浩典、山海　直　カニクイザル円形精子細胞が有する卵子活性化能の個体差の解析　第 18 回日本霊長類学会（東京）2002 年 7 月 19-21 日
39）鯉江　洋、揚山直英、酒井健夫、金山喜一、山海　直　カニクイザルにおける筋性部心室中隔欠損症が疑われた１例　第 135 回日本獣医学会（東京）2003 年 3 月