1. ウイルス第一部

部 長　　倉 根 一 郎

概　　要

ウイルス第一部において、本年度、以下の人事異動があった。平成 15 年 4 月 1 日付で田島（白鳥）茂が第二室研究員として採用され理化学研究所より就任した。平成 15 年8月1日付で井上直樹が主任研究官として採用され米国 CDC より就任した。同日、水谷哲也が主任研究官として北海道大学より転任した。また、平成 15 年 9 月 1 日付で福士秀悦が第一室研究員として採用され、BML より就任した。平成 16 年 3 月 31 日付で第四室長柳壹夫、主任研究官新井陽子、主任研究官志賀定祠が定年退官した。

研究業務としては、出血熱ウイルス、ポックスウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、狂犬病ウイルス、エプスタイン・バールウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス８、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、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で発表された。

第一室においては、BSL4 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、本年度はクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対する Real Time PCR 法を開発した。一方、痘そうワクチンの品質管理に関しては、リバータントウイルスの検出と性状解析に関する研究を行った。また痘そうワクチンの有効性をサル痘をモデルとして示した。さらに、SARS の血清診断法の確立、SARS コロナウイルスの感染機序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に比較解析を行った。また、ウエストナイル熱の病原体・血清診断法を確立し、さらにそれを用いてのサーベイランス体制の確立を行った。デングウイルスに対する新たな病原体検査法を確立し、熱帯・亜熱帯地域からの輸入患者の病原体検査を一層充実させた。また、デングウイルス感染の病態解明にむけて研究を進展させた。

第三室においてはタイ国の狂犬病ウイルス株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行った。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。この 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。さらに、狂犬病ウイルスに対するマクロファージの応答に関する研究を行った。

第四室においては、EBV の潜伏感染に関する研究及び疫学的研究を進展させた。EBNA-2 及び EBNA-1 に対する抗体価を健常人において調査し、EBV 再活性化に関する知見を得た。EBNA-LP、EBNA-2 に関して、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。また、ヒトヘルペスウイルス８に対する新たな抗体測定法を作製し、抗体価と疾患との関連に関する研究を進展させた。

第五室においては、クラミジア感染症の血清・病原体検査法を確立した。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い、さらに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熱の新しい血清・病原体検査法として Real Time PCR 法を確立し、従来の方法との比較において有用性を確認した。また、シムカニアに関しての研究を開始した。

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。痘そうワクチン、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.　ウイルス性出血熱に関する研究

(1)クリミア･コンゴ出血熱ウイルス感染症の real-time TaqMan-PCR による診断法の開発

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の診断のための real-time TaqMan-PCR 法を開発し、クリミア・コンゴ出血熱患者血清、感染ダニから得られた cDNA を用いて評価した。PCR のためのプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブをクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの S-遺伝子に設計した。Nested PCR 法でクリミア・コンゴ出血熱と診断された 10 人の患者から得られた血清のうち、8 人の血清からクリミア･コンゴ出血熱遺伝子が今回開発された real-time TaqMan-PCR で検出された。また、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子が nested RT-PCR 法で増幅されたダニから得られた cDNA からも、本法でクリミア・コンゴ出血熱遺伝子が増幅された。一方、nested RT-PCR 法で陰性を呈したサンプルは、real-time TaqMan-PCR でも陰性を呈した。この遺伝子増幅法では定量的に遺伝子量を決定することが可能であった。今回開発された real-time TaqMan-PCR 法は、診断のみではなく、病勢の判定にも有用であると考えられる。[西條政幸、唐青（中国ウイルス性疾患疾病予防センター)、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、倉根一郎]

(2) クリミア・コンゴ出血熱に罹患した母親から感染したと考えられる 4 歳女児例のウイルス学的検討

中国西部新疆ウイグル自治区には、クリミア・コンゴ出血熱の流行地があり、同地域でクリミア・コンゴ出血熱に罹患した母親の発症から 5 日目に発熱を呈した 4 歳女児例を経験した。母親およびこの女児の血清から nested RT-PCR 法でウイルスゲノム（S-遺伝子の部分遺伝子）か検出され、その遺伝子産物の塩基配列を決定したところ、完全に一致した。クリミア・コンゴ出血熱の潜伏期間（4-7 日）およびこの成績から、女児はクリミア・コンゴ出血熱に罹患した母親からクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに感染したものと考えられた。家族内感染がウイルス学的に証明されたはじめてのケースである。クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのヒトからヒトへの感染予防の重要性が示唆された。[西條政幸、唐青（中国ウイルス性疾患疾病予防センター)、森川茂、前田秋彦（現、北海道大学獣医学部)、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、倉根一郎]

2.　ポックスウイルスに関する研究

(1) 天然痘ウイルスの迅速診断のための real time PCR 法の開発と評価

近年、天然痘（痘そう，variola）ウイルスが用いられたバイオテロリズムの危険性が指摘され、また、アフリカ大陸にのみ発生が認められていたサル痘が、2003 年に米国で流行した。そのため天然痘やサル痘（monkeypox）の迅速診断の必要性が高まっている。Variola ウイルス、monkeypox ウイルス、オルソポックス属ウイルス、および、ワクシニア（vaccinia）ウイルスにそれぞれ特異的プライマー（それぞれ Var1/2、Gabon-1/-2、ATI-up-1/low-1、Vac1/2）を用いた polymerase chain reaction（PCR）法および variola ウイルスゲノムを特異的に検出するためのリアルタイム PCR 法を整えた。これらのウイルスゲノム検出法の精度や感度を、variola ウイルスを含むオルソポックス属ウイルスゲノムを用いて評価した。リアルタイム PCR 法は PCR 法に比べて 10ー10,000 倍の感度を示した。Variola ウイルスおよび monkeypox ウイルス特異的プライマーを用いた PCR 法により、それぞれ特異的に variola ウイルスと monkeypox ウイルスのゲノムが増幅された。オルソポックス属ウイルス共通プライマーおよび vaccinia ウイルス特異的プライマーを用いた PCR では、variola、monkeypox、牛痘（cowpox)、キャメルポックス（camelpox)、vaccinia、ectromeria ウイルスすべてのゲノムが増幅された。リアルタイム PCR 法や PCR 法による天然痘とサル痘の診断は、迅速であり、かつ、特異的である。さらにリアルタイム PCR 法は、PCR 法に比較してより高感度である。[西條政幸、森川茂、前田秋彦（現、北海道大学獣医学部)、緒方もも子、倉根一郎、長谷川秀樹（感染病理部）、Inger Damon（Pox Division, CDC, Atlanta,GA)]

(2)LC16m8 株天然痘ワクチンの霊長類におけるサル痘発症予防効果の検討

1960 年代に我が国で橘爪壮博士（千葉血清研究所）により開発された天然痘ワクチン LC16m8 株は、天然痘ワクチンで問題となる中枢神経系合併症（種痘後脳炎、脳症）の発生頻度が極めて低いとされ、実際 50,000 人前後の小児を対象とした臨床治験では、重篤な合併症は報告されていない。しかし、このワクチンは、免疫ターゲット蛋

白として重要なもののひとつである B5R 遺伝子に 1 塩基欠損があり、完全な B5R を発現しない。また、LC16m8 株の天然痘予防効果は、本ワクチンが臨床応用された当時すでに天然痘がほぼ根絶されていたため、確認されていない。そこで、霊長類（カニクイザル）を用いて、LC16m8 株のサル痘発症予防効果をLister株天然痘ワクチンの効果と比較して検討した。未ワクチン接種群では、サル痘特異的な症状が出現したが､LC16m8 株およびLister 株ワクチン接種群では全く症状が出現しなかった。また、血中サイトカインレベル、生化学的検査所見、末梢血液検査、ウイルス血症レベルの解析でも、LC16m8 株のサル痘発症予防効果は、Lister 株と同等であることが確認された。LC16m8 株は、サル痘の発症予防に有効であり、天然痘の予防にも有効であることが推察された。[西條政幸、森川茂、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、倉根一郎、網康至・須崎百合子（動物管理室)、長谷川秀樹・永田典代・岩田奈織子（感染病理病理部)]

(3)LC16m0 型リバータントウイルスの遺伝子解析と生物学的性状

乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれるLC16m0型のリバータントウイルスの含有率は、ウイルスの継代数に相関して上昇する。そこで、LC16m0 型のリバータントウイルスを RK13 細胞､VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイからクローニングして、その B5R 遺伝子の配列を比較した。また､それぞれの生物学的性状を､RK13 細胞と VeroE6 細胞でのプラークサイズ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズに関して解析した。その結果、RK13 細胞でスモールプラークを形成するウイルスは、LC16m8 株と同様に B5R 遺伝子に frameshift mutation があり、リバータントウイルスは､B5R 遺伝子の変異により frameshift mutation を回避していたが、その変異部位により 7 グループに分類された。LC16m0 に復帰する変異は見られなかった。また、いずれのリバータントウイルスも、RK13 細胞、VeroE6 細胞でラージプラークを形成し、鶏卵漿尿膜でラージポックを形成した。[森川 茂、緒方もも子、灰谷あずさ、西條政幸、倉根 一郎、木所 稔（ウイルス第三部)]

(4) LC16m0 型リバータントウイルスの検出法

乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれるLC16m0型のリバータントウイルスの検出を PRK 細胞､RK13 細胞､VeroE6 細胞を用いたプラークアッセイ、鶏卵漿尿膜でのポックサイズでそれぞれ行い、各試験法のリバータントウイルス検出法を比較した。その結果、リバータントウイルス含率 = 「VeroE6 細胞でのラージプラーク力価／RK13 細胞でのプラーク力価」による LC16m0 型のリバータントウイルス検出法が最も高感度であった。[森川 茂、緒方もも子、西條政幸、倉根 一郎]

(5) LC16m0 型リバータントウイルスの含まれる LC16m8 株のウサギ皮膚増殖試験

乾燥細胞培養痘そうワクチンに含まれるLC16m0型のリバータントウイルスの混入・出現は、乾燥培養痘そうワクチン承認時には想定されていなかったため、どの程度リバータントウイルスが混入するとワクチンの性状、安全性に影響するかは不明である。本研究では、種々の割合で LC16m0 型のリバータントウイルスが含まれる LC16m8 株を用いてウサギ皮膚増殖性試験を行い、リバータントウイルス含有率と皮膚増殖性との関係を明らかにした。その結果、リバータントウイルス含有率 4%程度まではウサギ皮膚増殖試験において有意差がでないものの、それ以上になると有意差がでると想定された。[西條 政幸、緒方 もも子、倉根 一郎、森川 茂、木所 稔（ウイルス第三部)、永田 典代・長谷川 秀樹（感染病理部）須崎 百合子・網 康至（同実験動物管理室)]

3. SARS コロナウイルス（SARS-CoV）に関する研究

(1) SARS-CoV の組換え核蛋白を抗原とした IgG ELISA 法の開発と評価

SARS-CoV は、重症急性呼吸窮迫症候群（severe acute respiratory syndrome）の患者から分離された新種のコロナウイルスで、我が国ではクラス 3 病原体に指定されている。また、SARS-CoV の実験室内感染も報告されており、SARS-CoV の組換え蛋白が抗原とする抗体検出法は、抗原を作製する stage で感染性ウイルスを用いる必要がなく、大変有用である。SARS-CoV の組換え核蛋白を抗原とした IgG-ELISA は、中和抗体検出法、SARS-CoV を抗原とした ELISA に比較して、高い感度と精度を有することが確かめられた。本法は、SARS の血清学的診断に有用である。[西條政幸、森川茂、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、倉根一郎、田口文広・荻野利夫・松山州徳（ウイルス第三部)、Hoang Thuy Long (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam)]

(2) ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染機構の解析

アンギオテンシン変換酵素 2(ACE2)は SARS コロナウイルス(SARS CoV)のレセプター分子として報告されている。

ヒトとマウスではACE2のアミノ酸配列の相同性が約80%である。マウスを用いたSARS-CoVの感染実験ではウイルスの複製は１−２日をピークに約１週間で消失してしまうことからマウスの体内では必ずしも効率的にウイルスが増殖しているとは言えない。SARS-CoVがマウス由来の培養細胞で増殖可能かどうか、またマウス由来ACE2がレセプターとして機能するかどうか*in vitro*で調べるために、ヒトおよびマウス由来ACE2 cDNAをHeLa,およびL細胞にトランスフェクトし、薬剤による選別を行い stable にACE2を発現する細胞株を作製した。今後、これらの細胞を用いてSARS-CoVの増殖効率を解析する予定である。[福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、緒方もも子、森川茂]

(3) SARS-CoV感染細胞におけるp38 MAPKの活性化

SARS-CoV の病原性を解明する目的で、Vero E6 細胞に感染後のシグナル伝達系の変化について検討した。SARS-CoV はこの細胞に感染すると約 24 時間で細胞障害を起こすので、DNAを抽出して電気泳動をおこなったところ、DNA fragmentationが観察されapoptosisを起こしていることがわかった。Western blotによる解析では、ストレス応答系のシグナル伝達であるp38 MAPKが活性化していることが明らかとなった。さらに、p38 MAPKの下流に位置するMAPKAPK-2、HSP-27、eIF4E、CREBなどもリン酸化していた。これらの蛋白質はp38 MAPKの特異的な阻害剤(SB203580)でそのリン酸化が抑制された。また、この阻害剤を用いると細胞傷害も遅れることから、p38 MAPKの活性化がウイルスによる細胞死に関与していることが明らかになった。[水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、緒方もも子、森川茂]

(4) あらかじめウイルス種を想定することなくRNAウイルスを検出する方法の開発とSARS-CoVへの適用

サブトラクション法である Representational difference analysis (RDA)法を用いて、感染細胞特異的な DNA 断片としてウイルスゲノムがクローニング可能であることは知られているが、この方法を RNA ウイルスの検出に適用する場合、細胞内に大量に存在するリボゾーム RNA によって反応が阻害されるため、実用的な感度が得られない。宿主細胞のリボゾーム RNA 配列をプライミングする可能性の低いオリゴマー群(制限プライマーミックス)を用いることにより、検出する対象のウイルス種を限定することなく RNA ウイルスを検出可能な RDA 法の変法を開発し、SARS-CoV への適用を試みた。リボゾーム RNA に結合しない６塩基配列はヒトおよびラットのリボゾーム RNA 塩基配列に基づき、塩基配列出現頻度解析プログラムを用いて設計した。頻度解析に基づいて合成されたリボゾームRNAでの出現頻度が極めて低い96種のヘキサマーをcDNA合成に用いたところ、RDA法によるモデル分子の検出感度は30倍以上増加することが示唆された。SARS-CoV感染細胞からもウイルスのcDNA断片がRDA法によって特異的に増幅された。これらの結果は、SARS-CoVに限らずRDA法を利用することにより、ウイルス種を想定することなくRNAウイルスのゲノム断片を分取・同定できる可能性が示している。[水谷哲也、森川 茂、遠藤 大二(酪農学園大学)、牧 与志之(シグマアルドリッチジャパン)、斎藤 秀俊・桐沢 力雄・林　正信(酪農学園大学)]

(5) SARS-CoVの経代培養によるゲノム変異

SARS-CoVの欠損干渉ウイルス(DI)を得る目的で、Vero E6細胞を用いて高い感染価による連続経代をおこなった。20 回経代しても DI ウイルスは認められなかったが、Envelope蛋白質に欠損のあるウイルスが優位に増殖し、ほぼすべてのウイルスがE蛋白質欠損ウイルスになった。この結果は、E蛋白質の欠損はウイルスの複製や粒子形成に影響を及ぼさないことを示している。[水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎、緒方もも子、森川茂、山田靖子 (動物管理室)、高橋一朗 (遺伝子資源室)]

4.　West Nile virusに関する研究

(1) West Nile virusの媒介蚊（ヒトスジシマカ）のエンドサイトーシスにおけるJNKの重要性

東北以南に生息するヒトスジシマカはWest Nile Virusを媒介する有力な候補である。我々はヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞が細菌をファゴサイトーシスすることや種々の抗菌物質を分泌することを明らかにした。さらに、ショウジョウバエ以外の昆虫では初めてストレス応答シグナル伝達系のMAPKのひとつ、JNKのクローニングに成功した。蚊の JNK は細菌の表面物質である LPS や高温により活性化し、幼虫（ぼうふら）に JNK の RNAi 法を適用することにより、おそらく脱皮を阻害し、成虫になる割合を激減することに成功した。また、低レベルで常時活性化されている JNK を抑制することによりファゴサイトーシスやエンドサイトーシスを阻害したという結果を得た。C6/36細胞ではJNKの阻害剤を用いることによりWest Nile Virusの感染を抑制できたことから、このウイルスの感染におけるJNKの重要性が明らかとなった。[水谷哲也、倉根一郎、高崎智彦、江下優樹 (大分大学)、高島郁夫 (北海道大学)]

5. その他の研究

(1) Norovirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発現と酵素活性について

Norovirus(NV)は3'末端にpoly(A)配列をもつ約７.5kbのプラス鎖１本鎖の RNA をゲノムとして有している。ORF 1 の 3D 領域には他の RNA ウイルスに見られるような RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の特徴的なアミノ酸配列(GDD モチーフ)が存在する。この RdRp 蛋白質の性状について解析することを目的としてバキュロウイルスを用いた RdRp 蛋白質の発現および精製を行い、その酵素活性について検討した。精製した NV RdRp 蛋白質に RdRp 活性が認められた。一方、GDD モチーフに変異を導入した蛋白質には活性がみられなかった。２価陽イオンの至適条件は 2mM MnCl2 であった。HCV の RdRp で報告されているような terminal nucleotidyl transferase(TNT)活性は検出されなかった。また、RdRp 反応により得られた product は二本鎖を形成していた。鋳型 RNA の 3'末端から poly (A) を削った場合、あるいは鋳型 RNA に primer RNA を加えた場合でも活性に影響は認められず、poly(A)および primer 非依存的な RdRp 活性であった。これらの結果から、NV RdRp は鋳型ゲノム RNA に対し相補的な RNA を de novo で合成する活性を有すると考えられた。[福士秀悦、岡智一郎・武田直和・片山和彦（ウイルス第二部)]

Ⅱ 第二室

1. 日本脳炎ウイルスに関する研究

(1) 日本脳炎ウイルスのサーベイランス

2002 年、ブタ血清から分離された日本脳炎ウイルスを、血清学的、遺伝学的並びに進化学的に解析するだけでなく、その病原性をマウスにおける中枢神経毒性及び中枢神経侵入性の面から調査し、ワクチン株との比較を行った。分離された８株の日本脳炎ウイルスEタンパク領域の遺伝子配列は、いずれも3型の現ワクチン株とは異なり、遺伝子型 1 型であった。何れの分離ウイルスもワクチン株同様の高い感染価（PFU/ml）を示し、ワクチン株 Beijing-1 の高度免疫抗血清に対する中和抗体価は、Beijijng-1 、 Nakayama-NIH 株 に 比 べ て 、JEV/sw/Hiroshima/25 /2002 以外の分離株は 1log程度低い値を示し、抗原性の変異が示唆された。哺乳マウス脳における中枢神経毒性試験の結果は、ワクチン株の Beijing-1 で LD_{50} は 7 日目で 5pfu であったが、JEV/sw/Chiba/88/2002 のそれはBeijing-1 株の 1/25 であり、sw/Hiroshima/25/ 2002 は濃い希釈で１匹の麻痺発症が見られただけであった。他方、5 株の新分離ウイルス 3'NTR領域の塩基配列を決定したところ、共通して 68-80 番目に塩基の欠失が見られることが確認された。[根路銘令子、高崎智彦、田島 茂、伊藤美佳子、野村秀和、小滝徹、山田竜臣、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）吉田隆史（国立感染症研究所ウイルス第一部、三菱化学BCL)、小川知子（千葉県衛研)、尾西一（石川県保環センター)、神田政弘（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)、沖浩臣（和歌山県衛公研センター)、山西重機（香川県衛研)、甲木和子・田端康二（熊本県保環科研)、糸数清正（沖縄県衛環研）]

(2) 病因未確定無菌性髄膜炎患者における日本脳炎ウイルスの遺伝子検出

平成１１年から 14 年に広島県で無菌性髄膜炎により、検査依頼があり、エンテロウイルス等が陰性であった小児（０歳から 15 歳）の患者５７症例の髄液に関して、日本脳炎ウイルス遺伝子を PCR 法によりスクリーニングしたところ、４症例において産物が認められ、遺伝子解析の結果、日本脳炎ウイルス遺伝子と判定された。[高崎智彦、伊藤美佳子、小滝 徹、倉根一郎、桑山 勝（広島県保健環境センター）]

2. ウエストナイルウイルスに関する研究

(1) 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ウエストナイル脳炎の原因ウイルスであるウエストナイルウイルスは、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 法を確立し、成田空港検疫所において、検査希望者に対する検査を行った。また全国各地の医療機関からの検査依頼に関して、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。また、米国における大流行を受けて、地方衛生研究所地域ブロック 7 施設に対し、病原体診断法、血清診断法に関する研修会を実施した（8

月 6 日)。[高崎智彦、伊藤美佳子、小滝　徹、倉根一郎、松本泰治・横田勉・河合誠義（成田空港検疫所)]

(2) 臓器移植・骨髄移植に対するウエストナイルウイルス検出法の確立とサーベイランス体制の構築

2003 年から検査依頼事例が生じている骨髄移植、臓器移植に関するウエストナイルウイルス感染の有無の検査を検査会社 2 社が実施するうえで、厚生労働本省の依頼により感染研との 3 施設間で検査の感度・特異性を統一するために、TaqMan RT-PCR用の増幅領域であるE領域と3’NC領域の合成RNAを作製した。クローン化したウエストナイルウイルスのプラスミド（クローン２）をテンプレートにして、CDCが作製したプライマーを用いてそれぞれのシークセンスをし、プラスミドのインサートにEタンパクが存在することが確認した。このウエストナイルウイルスのプラスミドを用いてT7 RiboMax Express Large Scale RNA Production SystemsによりRNAを合成した。E領域の合成RNAは $7.7x10^{11}$copies/μlであり、3’NCの合成RNAは $7.8x10^{10}$copies/ulの濃度のRNAが合成された。どちらも 10 copies/μlが検出限界であった。[高崎智彦、伊藤美佳子、田島　茂、根路銘令子、小滝　徹、倉根一郎、奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所）]

(3) ウエストナイルウイルス DNA ワクチンの作製とマウスに対する防御効果の検討

ウエストナイルウイルス(NY99-6922 株)のprM/E遺伝子をベクタープラスミドpcDNA3 に組込んだDNAワクチン(PcWNM1 向)を作製し、マウスにおける評価を行った。従来のDNAワクチンの作製法に基づいて、prMの上流 20 アミノ酸からなるシグナルペプチドが含まれるようプライマーを設計し、NY99-6922 株のcDNAからprM/E領域の遺伝子を増幅した。EcoRI及びXbaIによりpcDNA3 に組込み、pcWNMEを作製した。prM/E遺伝子領域についてシークエンス解析を行ったところ、得られた 8 クローンのうち、7 クローンにGenBankに登録されている塩基配列と少なくとも 1 塩基の相違が認められたが、他の 1 クローンは全く同じ配列であった。このクローンを以下のマウス実験に使用した。100μgまたは 10μgのpcWNMEを雌ddYマウス(1 群 6 匹)に、5 週令及び 8 週令時に針無注射器を用いて免疫した。2 回免疫後、100μg接種群では 1:2560 の中和抗体価が、10 mg接種群では 1:80 の中和抗体価が認められた。13 週令時に $500LD_{50}$のWNVで腹腔内チャレンジを行い生死を観察すると共に、ウイルス血症に対する防御も評価する目的で、血清中のWNV遺伝子の存在をTaqManRT-PCR法を用いて調べた。いずれのワクチン接種群についてもウイルス遺伝子は検出されず 100%生残したのに対し、対照のcDNA3 投与群及び非免疫群ではWW遺伝子が検出され、6 匹中 4 匹(pcDNA3 投与群)または 6 匹(非免疫群)が死亡した。これらの結果は、pcWNMEの中和抗体誘導能を示すと共に防御効力を示唆する。[高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎、奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所)、石川知弘・小西英二（神戸大学医学部)]

3.　黄熱ウイルスに関する研究

(1) 黄熱ワクチンへの ALV 混入に関する研究

現行の黄熱ワクチンはニワトリ胚細胞を用いて製造されている。近年、ニワトリ胚細胞を用いて生産されている麻疹およびおたふく風邪ワクチンに、ニワトリ胚線維芽細胞に由来する内在性ニワトリレトロウイルス（EAV）および内在性ニワトリレトロウイルス（ALV-E）の粒子が混入していることが報告された。同様に、最近黄熱ワクチンにもこれらの粒子の混入が認められたという報告がなされた。そこで黄熱ワクチンにこれらのウイルス RNA および DNA が混入しているかを調べた。YF-VAX (Connaught Laboratories, live 17D virus) ４ロット６バイアルを蒸留水で溶解後 RNA を抽出し､ALV-E に特異的なプライマーを用いて RT-PCR および PCR を行った。調べたすべてのワクチンにおいて RT-PCR および PCR 産物が得られた。次に RNA 溶液を DNaseI で処理後 RT-PCR および PCR をおこなったところ、RT-PCR 産物に比べ PCR 産物の量が顕著に低下した。このことから、YF-VAX には E-ALV の RNA だけでなく DNA も混入していることが明らかとなった。一方、外因性 ALV（exoALV）の混入についても調べたが、RNA、DNA ともに検出されなかった。[田島　茂、高崎智彦、伊藤美佳子、根路銘令子、倉根一郎、加藤　篤（ウイルス第三部）]

4.　デングウイルスに関する研究

(1) 2003 年度輸入デングウイルス感染症、ウエストナイルウイルス感染症の検査・診断

デングウイルス感染症は東南アジアを中心として世界的規模で熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、再興感染症の一つとして、極めて重要な感染症になっている。わが国では過去約 60 年間国内流行のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例がみられる。輸入デングウイルス感染症では、PCR によるウイルス遺伝子検出とウイルス分離および IgM-捕捉 ELISA による IgM 抗体の

両検出法により、流行地域からの帰国者で初感染のデング熱の確定診断が可能であった。本年はまた、インドからカナダに帰国する旅行者が、機中で熱発し成田空港検疫所にて診察・検査した結果、デング熱であることが判明した症例があった。[高崎智彦、伊藤美佳子、小滝　徹、田島　茂、根路銘令子、倉根一郎、三輪俊樹・高橋　正樹・松本泰治・横田　勉・河合 誠義（成田空港検疫所）]

(2)2003 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、小滝　徹、高崎智彦、倉根一郎、三輪俊樹・高橋正樹・横田勉・河合 誠義 ((成田空港検疫所)]

（3）デングウイルス感染症の実験室内診断：TaqMan RT-PCR 法による血清型別検出法の確立

デングウイルス感染症は東南アジア・南米を中心として拡がっており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国でも輸入感染症として診断される症例が増加している。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。今回、簡便で迅速にデングウイルス遺伝子を検出する Real Time PCR（TaqMan RT-PCR 法）を用いた検出法を検討した。プライマーおよびプローブは、世界の分離株を比較・検討し、各血清型間において相同性が低く、なおかつ各血清型内において保存された部位に対して作製した。作製した Real Time PCR と RT-PCR との感度の比較を、HI 試験、IgM-ELISA、RT-PCR などにより初感染のデング熱感染と診断された検体について行った。血清型特異的プライマーおよびプローブによりデングウイルスは 100%の感度で的確に各血清型に分類され、他のフラビウイルスを検出しなかった。また、通常行われている RT-PCR より感受性が高かった。[伊藤美佳子、山田堅一郎、田島茂、根路銘令子、小滝　徹、高崎智彦、倉根一郎]

(4) デングウイルスの中和抗体による防御能および感染増強の解析

デングウイルスには血清型 1-4 の 4 つの型が存在する。ヒトにおいてはデング熱・デング出血熱を起すウイルスであり、初感染とは異なる血清型のウイルスによる感染増強が確認されている。そこで、感染増強のメカニズムを解明するために、サルの抗デングウイルス血清を用いて、デングウイルス交叉性中和抗体および血清型特異中和抗体による感染増強を観察した。

サルにデングウイルスを感染後、免疫血清を経時的に採取し、①ウイルス血症の推移②血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価の推移③交叉性中和抗体および型特異的中和抗体の感染増強を解明するために、デングウイルスと希釈した交叉性中和抗体および型特異的中和抗体の感染増強現象を解析した。その結果、感染後 58 週目の交叉性中和抗体および型特異中和抗体によりデングウイルスの感染が最も増強された。さらに、交叉性中和抗体は１：３倍希釈で、型特異中和抗体は１：３０倍希釈で最も感染の増強が認められたことから、初感染とは異なる血清型のウイルスの方が、同型のウイルスよりも再感染時に感染増強が発生しやすいことが明らかとなった。このことから、ヒトのデングウイルス再感染時の感染増強が最も発生しやすいのは、初期感染時の中和抗体が減少し、再感染時のウイルスの血清型が初感染時とは異なる型のウイルスであることが考えられた。[伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、向井鐐三郎(霊長類センター)]

(5) 日本人デングウイルス感染者における血清型特異的 IgM 抗体検出法の改良

デング熱の血清診断法として開発されたウイルス特異的 IgM 抗体検出のための IgM 捕捉 ELISA 法は、デングウイルス血清型間の交差反応の存在のために、通常血清型の同定は比較的困難である。デングウイルスの血清型診断法としての IgM-ELISA 法の有用性を高める目的で、反応系に蛋白変性試薬を添加することにより、感染ウイルス血清型に特異的 IgM 抗体の検出を検討した結果、薬剤添加後に感染ウイルス血清型に対する IgM 抗体反応は、他の血清型に対する交叉反応よりも増強された。[高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎、名和　優・赤塚俊隆（埼玉医科大学微生物学）]

(6) デングウイルス１型完全長 cDNA クローンの作成お

よびウイルス産生系の確立

完全長cDNAクローンはウイルス蛋白質機能の解析や変異体ウイルスを作成する上で非常に有用なツールとなる。デングウイルスの完全長cDNAクローンは、これまでにいくつかの外国の研究室で作成されているが、我が国では作成の報告はない。我々はデングウイルス１型完全長cDNAクローンの作成を試みた。作成する上での親株は当研究室で分離されたデングウイルス１型 02-２０株を用いた。ウイルスcDNAは３つの領域に分けてPCRで増幅後、それぞれを低コピー数プラスミドベクターpMW119に連結しクローニングした。各断片の塩基配列を確認後、３つの断片を１つのプラスミドベクター上に順次連結し、最終的に完全長のデングウイルス１型をコードするcDNAクローンを構築した。

次に本cDNAクローンに由来するウイルスの産生を試みた。ウイルスcDNAの3’末端に付加した制限酵素SacII部位１ヶ所でプラスミドベクターを切断して直鎖上にした後、5’末端に付加したT3プロモーターからin vitroで転写反応を行い、完全長ウイルスRNAを得た。これをリポソーム試薬(DMRIE-C)を用いてVero細胞に導入し、５日後に培養上清（１次ウイルス液）を回収した。またこの上清を再びVero細胞に接種し、５日後に培養上清（２次ウイルス液）を回収した。それぞれのウイルス力価を測定したところ、２次ウイルス液が高力価(約 $4x10^8$)を示した。このウイルス液からウイルスRNAを回収し、全塩基配列を決定したところ、親株と完全に一致した。またVero細胞に接種したときのプラークの大きさや増殖速度も親株とほぼ一致した。[田島　茂、高崎智彦、倉根一郎]

5.　その他のウイルスに関する研究

(1)Yokoseウイルスの全塩基配列の決定および性状解析

Yokose ウイルスは 1971 年にコウモリ血液より分離されたウイルスである。血清学的解析およびウイルスゲノムの一部(NS5領域の一部)の遺伝子解析などから、Yokoseウイルスはフラビウイルスに属することが示されたが、ゲノム構成、媒介するベクター、病原性などは不明であった。本年度我々はYokoseウイルスの全ゲノムの塩基配列を決定した。Yokoseウイルスは、全長10857ヌクレオチドで、3425アミノ酸からなる蛋白質がコードされる領域（10275ヌクレオチド）と、150ヌクレオチドの5’非翻訳領域および432ヌクレオチドの3’非翻訳領域からなることが明らかとなった。各ウイルス蛋白質のアミノ酸配列を６種類の代表的なフラビウイルス（デング２型、日本脳炎、ウエストナイル、黄熱、ダニ媒介性脳炎、Rio bravo）と比較すると、ほとんどの蛋白質で黄熱ウイルスと最も高い相同性が示された。系統樹解析からも６種類のウイルスのなかでは黄熱ウイルスと最も近縁であることが示された。ヒト血清を用いた細胞染色では、デング熱患者由来血清および黄熱ワクチン接種者由来血清でウイルス抗原を検出することが可能であった。ウエスタンブロット解析では、デング熱患者血清、黄熱ワクチン接種者血清、およびデングウイルス感染マウス血清を用いることにより、E、NS1、およびNS3に相当すると思われるウイルス蛋白質が検出された。プラーク減少法による中和試験では、黄熱ワクチン接種者血清で非常に弱い中和活性が観察された。蚊媒介性フラビウイルスで保存性の高い3’非翻訳領域内の配列CS１をYokoseウイルスも有していたことから、本ウイルスは蚊によって媒介される可能性が示唆された。しかしヒトスジシマカ由来培養細胞であるC6/36への感染実験では明確な増殖は確認できなかった。[田島　茂、高崎智彦、倉根一郎、江下優樹（大分医科大学）]

(2) ウシ白血病ウイルス感染個体内でのウイルス遺伝子発現制御機構の解析

ウシ白血病ウイルス（ＢＬＶ）は地方病性牛白血病（ＥＢＬ）の原因ウイルスである。感染個体内でのＢＬＶの発現は、感染後一過性に上昇した後潜伏化する。一方感染個体の末梢血リンパ球を培養するとウイルス発現は速やかに再活性化する。これらの機構は、ウイルスが個体内で生存し、さらに伝搬する上で非常に重要と考えられる。本年度はＢＬＶの潜伏化・再活性化機構の解明を目標とし、メチル化がウイルス転写制御領域（ＬＴＲ）依存的転写に及ぼす影響、プロウイルスＬＴＲのメチル化状態、および再活性化に係わるシグナル伝達経路について調べた。ＬＴＲを連結したレポータープラスミドをメチラーゼ処理した後、転写活性を測定したところ、メチラーゼ非処理のものに比べ転写量が顕著に低下した。次に、ＢＬＶ感染健康牛、ＢＬＶ感染持続性リンパ球増多症牛、ＥＢＬ牛、およびＢＬＶ感染健康羊の感染細胞中のプロウイルスＬＴＲ上の転写制御コア領域Ｕ３領域およびＲ領域の一部のメチル化状態を調べた。すると発症ステージやＢＬＶの発現量に関係無く、ほとんどメチル化されていないことが明らかとなった。これより本領域のメチル化は、転写を抑制する能力は有するものの、ＢＬＶの潜伏化には関与しないことが示唆された。次にウイルスの再活性化条件を定量的ＲＴ−ＰＣＲ法により検討した。すると採血後の全血あるいは白血球を３７℃で保温するだけで速やかに再活性化が引き起こされた。またこの再活性化はＰＫＣ阻害剤の添加により抑制された。

そこで保温前後でのＰＫＣの活性状態を調べるため、ＰＫＣの局在およびリン酸化状態を調べた。すると保温後、膜に局在するリン酸化ＰＫＣ量が増加したことから、白血球中のＰＫＣが採血後の保温により活性化されることが明らかとなった。以上より採血後ＰＫＣ経路が活性化され、これによりプロウイルス発現が活性化される可能性が示唆された。［田島茂、間陽子（理化学研究所）］

Ⅲ　第三室

1．狂犬病ウイルスに関する研究

（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、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）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た。そのウイルスの性状をin vitro及びin vivoで解析した結果。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。この増殖欠損ウイルス作製系を利用して、より安全で有効な組換えウイルスワクチンの開発や遺伝子発現ベクターとしての応用が可能であると考えられた。［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）］

（3）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示すものから、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、種々の組換え狂犬病ウイルスを作製した。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）］

（4）タイ国バンコク市狂犬病ウイルス流行株の遺伝子解析

狂犬病流行地であるタイ国バンコク市において採取された狂犬病感染イヌの脳より得られた狂犬病ウイルスＧ遺伝子の塩基配列を決定し、バンコク流行株の分子疫学的解析を行った。さらに同一個体から得られた株内での塩基置換部位の解析（quasispecies解析）を行い、流行株の変動のメカニズムを解析した。［森本金次郎、倉根一郎、西園晃（大分医大）、Pakamatz Khawplod (The Thai Red Cross Society)］

（5）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知られている。この性質を利用し、神経伝達のプローブとしての狂犬病ウイルスの開発を行っている。狂犬病ウイルスcDNA発現系を用いて、神経伝達のトレーサーとして有用な組換え狂犬病ウイルスを構築し、神経伝達機構の解析を行った。［森本金次郎、倉根一郎、井上謙一、飯島敏夫（東北大・生命科学）］

（6）狂犬病ウイルスに対するマクロファージ応答メカニズム

狂犬病ウイルス(RV)感染に対するマクロファージ系細胞株RAW264の活性化機序を調べた。RVを接種したRAW264におけるサイトカインとケモカイン、炎症性メディエーター等の遺伝子発現プロファイルを解析し、一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)とCXCケモカイン(CXC chemokine ligand 10, CXCL10/IP－10)の発現が飛躍的に増加することを示した。またRVによるiNOSとC

XCL10の発現誘導にはMAPキナーゼファミリーに属するExtracellular－signal regulated kinases (ERK)1／2カスケードを介した細胞内シグナル伝達が関与することを見出し、マクロファージがウイルス粒子をエンドサイトーシスにより取り込む過程でERK1/2が活性化されることを明らかにした。[中道一生、森本金次郎、倉根一郎]

2. 他のリッサウイルスに関する研究

(1) 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

前年度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]

IV 第四室

1. エプスタイン・バールウイルス(EBV)に関する研究

(1) EBVウイルスのEBNA-2 タンパク質に対するIgG抗体が我が国の高年齢群で高い陽性率と高い抗体価を示す[注1)] 高齢化社会の感染症研究[注2)] (注 1：EBNA-2 IgGの抗体価はEBV初感染で発症の場合はその後低下消失する。しかし我が国のEBV感染はほとんどの人が幼少児期不顕性感染である点に特徴がある。注 2：老人性リンパ増殖症との関連も考えられる。)

我が国では欧米と異なり、幼小児期に大多数が EBV に感染して潜伏感染が成立する。EBV が不顕性初感染を起こした後、各 EBNA 特に EBNA-2 IgG 抗体価がどのように動くのかが、これまで不明であった。不顕性初感染を起こした人の血清抗体価の変動を生涯にわたって分析することは実施困難であるが、EBV 初感染が幼小児期に非常に高率に起こる我が国の健康人の血清を年齢群別に分析することによってその近似値が得られる、と考え本研究を行った。1) EBNA-2 IgG 陽性率は、1-2 歳年齢群で上昇、3-4、5-9、10-14、15-29 年齢群でプラトーになり、40 歳以上年齢群でほぼ 100％であった。EBNA-1 陽性率と EBNA/Raji 陽性率は共に、1-2 歳群で上昇、維持され、40 歳以上年齢群で 100％であった。2) EBNA-2 IgG の幾何学的平均値(GMT)は、5-9 歳、10-14 歳、15-29 歳年齢群でプラトーを示し、40 歳以上年齢群でより高い値を示した。EBNA-1 IgG の GMT は、1-2 歳群でプラトーに達しより高い年齢群で変化しなかった。3) EBNA-2 抗体価の抗 EBNA-1 抗体価に対する比が１.０以上を示す血清の割合が、40 歳以上で約 25%,他の年齢層では非常に少なかった。本研究は、我が国の 40 歳以上年齢群で、潜伏感染 EBV の再活性化あるいは EBV 超感染が、広く繰り返し起こっている可能性を示唆する。EBV と我が国の老人性リンパ増殖症 (加齢性 EBV 関連 B 細胞リンパ増殖異常症) との関連も考えられる結果であり、高齢化社会における感染症の研究として意義を有する。 [原田志津子、鎌田良雄、北村　亮、岡部信彦(感染症情報センター)、泉福英信(細菌第一部)、柳　壹夫]

(2) EBV 核蛋白 EBNA-LP と相互作用する細胞性因子の検索と機能解析

EBV 潜伏感染時に発現する核蛋白 EBNA-LP の機能を解析するために、我々はこれまで酵母実験系や免疫沈降法などで EBNA-LP と相互作用する細胞性蛋白の検索をおこない幾つかの遺伝子産物を報告してきた。今年度は未発表の蛋白についての相互作用能や EBNA-LP によるリン酸化等の修飾活性を検討した。[原田志津子、平田顕恵]

(3) EBV 核蛋白 EBNA-LP と EBNA-2 との相互作用

EBV の潜伏感染に重要な役割をもつ核蛋白 EBNA-LP と EBNA-2 は協調的に作用して遺伝子の転写活性化を促進するが、直接的な相互作用はこれまで証明されていたかった。我々は in vitro 実験系で EBNA-LP のＷ２繰り返し領域と EBNA-2 の酸性アミノ酸に富む転写活性化領域とが直接相互作用する事をみいだし PNAS に報告した。EBNA-LP が多量体を形成し、さらに EBNA-2 との相互作用能をもつ事から、こうした性質を保持しながら野生型 EBNA-LP の転写活性化補因子機能を欠く欠損変異体の機能効果を検討したところ、EBNA-LP の機能を抑制するドミナントネガティブとして働くことが明らかになった。[原田志津子、

加藤美緒]

(4) EBV 核蛋白 EBNA-LP のドミナントネガティブ発現細胞の樹立

EBNA-LP の EBV 感染細胞における機能を解析するために、EBV 潜伏感染細胞を用いて EBNA-LP ドミナントネガティブ変異体を誘導発現する細胞株を作った。テトラサイクリン誘導系、および Cre-loxP 系で誘導発現細胞樹立を試み、多数のクローンから薬剤添加後の誘導発現効果の大きい細胞株を複数樹立した。それら細胞株の増殖などの性状を解析した。[原田志津子、加藤美緒、加賀美奈子、平田顕恵]

2. ヒトヘルペスウイルス８ (HHV-8) に関する研究

(1) HHV-8 ORF73 抗原に対する抗体上昇とカポジ肉腫発症との相関

HHV-8 に対する抗体検出のための新たな蛍光抗体法及び酵素抗体法の開発・従来法との比較を今までに行なってきた。今回新しい方法で HIV 患者血清を解析したところ、カポジ肉腫発症群と非発症群の間で潜伏感染抗原 ORF73 に対する抗体価の上昇に差があることを見出し、この抗体の変動が診断マーカーとして利用できるかさらに例数を増やし検討している。[井上直樹、Spira, T., Lam, L., Corchero, J.L., Luo, W. (CDC)]

(2) 抗 HHV-8 IgA 抗体の検出

組換え体 SFV を用いて発現させた HHV-8 の ORF73 及び K8.1 を抗原として、カポジ肉腫からの回復患者の血中及び唾液中の抗 HHV8 IgA 抗体を検出した。IgA 抗体は分泌型であること、口腔内に積極的に分泌されていることを見出した。[Mbopi-Keou, F.-X., Hocini, H., Legoff, J., Picketty, C. Malkin, J.-E., 井上直樹, Teo, C.G. (UK)]

(3) リポーター細胞を用いた中和抗体価測定法

感受性細胞がない HHV8 の力価測定のために、感染によりリポーター遺伝子が活性化される細胞株を樹立し、中和抗体の測定を可能にした。HIV と HHV-8 重感染者について中和抗体の検出頻度と抗体価をカポジ肉腫発症群と非発症群間で比較したが有意な差は見られなかった。このことからカポジ肉腫発症の抑制において中和抗体は一義的役割を果たさないと考察された。[井上直樹、Spira, T., Lam, L. (CDC)]

(4) HHV-8 感染に伴う細胞応答

毛細血管内皮細胞は HHV8 感染に応答して細胞性の抗ウイルス遺伝子の発現を亢進した。インターフェロンαによる感染阻害はウイルス複製阻害剤である PFA よりも効果的であった。また、HHV-8 がコードする v IRF-1 はインターフェロンαによる感染阻害を一過性であるが阻害することを見出した。[Offermann, K., Pozharskaya, V., Krug, L.T. (Emory Univ.), 井上直樹]

3. サイトメガロウイルス (CMV) に関する研究

(1) 乾燥臍帯を用いた先天性 CMV 感染のレトロスペクティブな診断法の確立

胎児期の CMV 感染（先天性 CMV 感染症）は全出生児数百人に１人の高い頻度で起こる感染症で、その約１割が出生時顕性、さらに残りの不顕性感染児の１割が持続するウイルス増殖により数年以内に聴覚障害（感音性難聴）を発症すると考えられている。先天性 CMV と聴覚障害の関係を調べるために、乾燥保存された臍の緒も検査材料として利用できる。[古谷野伸 (旭川医大)、錫谷達夫 (福島医大)、井上直樹]

Ⅴ　第五室

1. リケッチアに関する研究

(1) Q熱の血清診断における IF 法と ELISA 法の診断基準設定の検討

Q熱は、その診断において病原体診断が容易でないことから、血清学的診断は重要である。しかし、Q熱の血清診断の標準化はまだ十分ではない。今回、IFA 法と ELISA 法での急性感染の診断基準設定を Western Blotting(WB)を参考に比較検討した。血清は、海外の研究機関由来Q熱患者血清 16 検体と、日本の市中肺炎患者 150 例の pair 血清、および本邦のQ熱患者の single 血清 4 検体、陰性コントロール血清 4 検体、計 324 検体を使用した。IFA 法は Nine Mile II 相菌を抗原とした。ELISA 法には PanBio 社のキットを使用した。Q熱に対する特異抗体の保有を確認するため全血清で WB を行い、27 kDaQ熱特異蛋白に対する抗体の有無をみた。IFA では IgM32～64 倍まで、および IgG64～128 倍までを保留領域とし、それらを超える場合をそれぞれ陽性、それ未満を陰性とした。ELISA では Index 値(ID)10～16 を保留

領域とし、それらを超える場合をそれぞれ陽性、それ未満を陰性とした。判定は慢性あるいは回復期の血清、急性期から回復初期の血清、陰性血清、保留領域血清に分けて判断した。IF 法で陽性であった例では、慢性および回復期血清は 3 方法すべてで IgG が陽性、IgM が陰性であった。急性期から回復初期の血清は、3 方法すべてで IgM および IgG が陽性であった。また陰性の血清は 3 方法で IgM、IgG ともに陰性であった。従って IF 法は WB との一致率が良好であった。一方、ELISA で陽性であったQ熱例では、3 つの方法すべてで IgG あるいは IgM が陽性となったものの、保留領域の 13 検体では IF 法と WB が陽性となる検体はなかった。非特異反応の可能性も含めて今後さらに検体を増やして検討する必要があるが、ELISA 保留領域の判定には、可能な限り複数の診断法で確認をすることが望ましいと考えられた。[Agus Setiyono、小川基彦、岸本寿男、佐藤　梢、志賀定祠、蔡　燕]

（2）Real Time PCR (TaqMan)による *Coxiella burnetii* 検出法の開発

Q熱の診断および感染源の特定は、起因菌の *Coxiella burnetii* の分離・培養が難しいことから、主に遺伝子検出によって行われている。そこで今回、多量の検体の同時処理が可能で、簡便かつ迅速な新しい検出法の確立を目的に、TaqMan probe を用いた Real Time PCR による検出法の開発および評価を行った。*C.burnetii* の外膜蛋白質 com1 遺伝子ならびにゲノムに繰り返し配列が存在する IS 遺伝子を標的として、他の菌やヒトゲノムへのホモロジーが極めて低く、*C.burnetii* のみに特異性が高い TaqManPCR 用のプローブおよびプライマーを各 1 組ずつ設計した（Qomp および QIS)。粗精製の Nine Mile 株Ⅱ相菌を粒子数を計測後、DNA を抽出し、感度検定に用いた。 また、小児呼吸器感染症例の喀痰 200 検体およびダニ 80 検体から DNA を抽出し検出を試みた。 QIS は、一反応（チューブ）あたり 0.01～0.1 個の菌が検出可能で最も感度が高かった。また、Qomp は 0.1～1 個の菌が検出可能で、同じ遺伝子を標的とした Nested PCR より感度が高かった。これらの結果から、今回設計したプライマーおよびプローブによる Real Time PCR 法は、従来の Nested-PCR より感度が高く、実用的であった。今後、検体数を増やして検討を行う予定である。また、実際の検出感度は、臨床検体からの DNA 抽出の効率に大きく左右されるので、血液検体などを用いたスパイク試験も今後報告する予定である。[小川基彦、佐藤　梢、Agus Setiyono、岸本寿男、山崎　勉（埼玉医科大学小児科）]

（3）四類届出リケッチア症の TaqMan 法による検出法の開発

つつが虫病、紅斑熱群リケッチアおよびチフス群リケッチア症に関しても、上述のQ熱に対する TaqMan 法の開発と同様の検討を行い、感度、特異性、血液でのスパイク試験の検討を行っている。[小川基彦]

（4）LAMP 法による *Coxiella burnetii* 検出の基礎検討

近年、市中肺炎の起因微生物として *Coxiella burnetii* が注目されているが、 臨床的な鑑別が難しく、国内で診断ができる機関が限られている。そこで我々は迅速遺伝子増幅法である LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法を利用した *C. burnetii* 検出系を確立した。LAMP プライマーは、*C. burnetii* の 27-kDa outer membrane protein をコードした遺伝子(com1)を標的として設計した。この設計したプライマについて、*C. burnetii* Nine Mile 株抽出 DNA を鋳型として LAMP 反応を行った。非 *C. burnetii* 32 菌株についての特異性試験を行った。感度対照として nested PCR を行った。*C. burnetii* Nine Mile 株抽出 DNA に対して、本法は対照とした nested PCR と同等の検出感度を示した。非 *C. burnetii* 32 菌株に対して、LAMP 増幅は認められなかった。従って、本法は、*C. burnetii* の迅速検出に有用であると考えられた。[百田隆祥・小島禎・池戸正成（栄研化学株式会社　生物化学研究所)、小川基彦、佐藤梢、Agus Setiyono、岸本寿男]

（5）慢性疲労症候群様患者におけるコクシエラ感染の検討

2002 年より慢性疲労症候群様患者におけるコクシエラ感染の検討を継続して行っている。これまでに、47 名の患者に関し、血清抗体価の測定および血中からの遺伝子検出を行ったが、陽性例は得られていない。今後も、検体の採取時期を症状の強いときに限定するなどの工夫をしてさらに継続して行う予定である。[伴信太郎（名古屋大学・医学部)、袴田康弘（静岡県立病院・総合診療科)、小川基彦]

(6)韓国における乳牛，健常者，肺炎患者の *Coxiella burnetii* の抗体保有率

Q熱 *Coxiella burnetii* 感染症は世界中で発生があり、動物における繁殖障害やヒトでの呼吸器感染症の原因となっている。韓国ではこれまでQ熱の疫学や臨床事例の

研究はほとんどなされていない。今回は韓国の農場における繁殖障害牛の *C.burnetii* 抗体保有率調査を実施した。また同時に韓国農村部の健常者と市中肺炎(CAP)の患者においても同様の調査を実施した。

繁殖障害が認められたウシ血清 414 検体を 2001 年 3 月から 6 月に採取、また健常者血清 205 検体、CAP 患者血清 111 検体を 2001 年に採取した。間接 Micro-immunofluorescence（Micro-IF）法で *C.burnetii* の抗体の測定を行い，1：16 を陽性とした。

ウシ血清の陽性率は全体で 28.5%，地域により 11.1～59.3%の差が認められた。健常者の 2%、CAP 患者の 13%で *C.burnetii* 抗体陽性であった。

韓国において、*C.burnetii* はウシの繁殖障害の重要な原因である可能性があり，ヒトでも CAP の一因である可能性が示唆されたが、抗体保有についての意義付けを含めてさらに詳細な検討を行なう必要がある。[Woo Jin KIM, Seung-Joon LEE（Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kangwon National University）, Tae-Wook HAN（Department of Veterinary Medicine, College of Animal Resources Science, Kangwon National University ）、小川基彦（国立感染症研究所　ウイルス第一部）]

（7）地方衛生研究所におけるつつが虫病診断の現状―アンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較―

1999 年 4 月に施行された新感染症法に基づく感染症発生動向調査により、つつが虫病は全数把握疾患となっている。今回、アンケート調査により、つつが虫病症例の診断における地方衛生研究所（以下地衛研）の現状を知ることを試みた。また、2000 年には 756 例、2001 年は 491 例のつつが虫病の症例報告をうけた感染症発生動向調査の結果と比較することにより感染症発生動向調査システムの評価もあわせて行った。2002 年 7 月に、全国の地衛研計 73 施設のつつが虫病検査担当者に対して 2000 年、2001 年の各施設におけるつつが虫病検査の実施状況を郵送によりアンケート調査した。回答率は、都道府県地衛研 43/47 施設（91%）、その他（政令市など）の地衛研 24/26 施設（92%）であった。また、つつが虫病と診断された症例数について、都道府県別にアンケート調査と感染症発生動向調査の結果を比較した。

つつが虫病特異検査を通常業務として実施しているのは、2001 年においては、都道府県地衛研 38 施設、その他地衛研 4 施設であった。通常実施している検査法は FA 法のみ 26 施設、FA 法＋PCR 法 9 施設、IP 法のみ 2 施設、IP 法＋PCR 法 2 施設、PCR のみ 1 施設、FA 法＋IP 法 1 施設、FA 法＋PCR 法＋IP 法 1 施設であった。血清検査の際、通常使用する抗原は、標準 3 株（Kato,Karp,Gilliam 株）のみ 23 施設、標準 3 株＋Kawasaki,Kuroki 株(以下基本 5 株)15 施設、基本 5 株+その他株 2 施設、Kawasaki 株のみ 1 施設であった。2000 年のつつが虫病疑い症例の検体受け入れ総症例数は 1090 例で、そのうち確定診断されたのは 570 例(52%)、2001 年は、受け入れ総症例数は 823 例、うち確定診断されたのは 330 例（40%）であった。また、2000 年、2001 年ともに、地衛研における確定症例数と感染症発生動向調査の届け出症例数が似通った数値をとった県があった。

地衛研はつつが虫病検査について多数の検体を受け入れており、診断において大きな役割を果たしている現状が明らかになった。また、複数の検査法を同時に行ったり、通常コマーシャルラボでは使わない株を用いるなど、地衛研においては精度の高い検査が実施されていた。個々の症例を比較することができないため、確定することは困難であるが、地衛研における確定症例数と感染症発生動向調査の届け出症例数が似通った数値をとった県においては、臨床医、保健所、地衛研の連携がよく、サーベイランスのシステムが良好に機能していることを示唆すると考察された。[松井珠乃（国立感染症研究所 Field Epidemiology Training Program）小川基彦、岸本寿男、海保郁男（千葉県衛生研究所　ウイルス研究室)、大山卓昭・ジョン コバヤシ・ 岡部信彦（感染症情報センター）]

2. クラミジアに関する研究

（1）オウム病クラミジア感染のペットにおける実態把握に関する研究

我が国のオウム病クラミジア感染のペットにおける実態把握を行い、侵淫現状を把握することを目指した。愛玩鳥のオウム病クラミジア(*C.psittaci*)の保有状況を、2003年4月から約一年間、輸入卸売りおよび小売り業者、動物病院、および展示施設からの検体を材料とし、PCR法にて調査した。生鳥は糞便ないしクロアカの拭い液を検査材料とした。死亡鳥は脾臓ないし肝臓を検査材料とした。これらの検体約0.1gからDNAを抽出し、主要外膜タンパク質遺伝子（MOMP）を標的とするPCRによってクラミジアの検索を行った。健康鳥ないし感染症が疑われた病鳥、491および71検体について検索したところ、それぞれ25検体（5.4%）および5検体（7.6%）からクラミジアが検出された。施設別にみると動物病院7.9%、動物販売業者5.6%、および展示施設3.1%であった。斃死鳥では感染症が疑われた59検体中13検体（28.3%）からク

ラミジアが検出されたが、他の原因が疑われ、剖検を依頼された27検体ではクラミジアは検出されなかった。クラミジアが検出された鳥種は様々であったが、オカメインコ、セキセイインコおよびゴシキセイガイインコからの検出数ならびに検出率が高かった。また、上記と別に10数箇所の鳥類飼育施設とペットショップに依頼して採取した約600検体の糞について検討したところ、1%～18%とばらつきがあるものの、平均5%程度の陽性率であった。今回検索した動物販売業者からの依頼検体の多くは輸入個体であるが、陽性率は5.6%と、従来の比率とほぼ同様であった。

さらに、愛玩鳥の*C.psittaci*治療法について、*C.psittaci*陽性の保菌鳥の治療と経過観察を行い、半年までの陰性化を確認した。このことから、無症状の保菌鳥に対しては約2週間のテトラサイクリンによる治療の有効性は高いと考えられた。今後病鳥に対する治療効果に関し、期間、投与量等の比較を行い、適切な治療法について検討する。[岸本寿男、蔡　燕、志賀定祠、小川基彦、Agus Setiyono、佐藤　梢、福士秀人(岐阜大学農学部獣医学家畜微生物)]

(2) 人のオウム病の疫学的調査

開業医20施設を受診した市中肺炎例168例に関し、ペア血清を用いたmicro-IFによる抗体測定と、咽頭スワブからの分離によるオウム病の検索を行った。結果は急性のオウム病抗体を保有する例はなく、分離例もなかった。現在引き続きさらに100例程度の追加検討を行っている。[岸本寿男、志賀定祠、蔡　燕、小川基彦、Agus Setiyono、佐藤　梢、中浜　力(中浜医院)]

(3) 新たなPCRプライマーによる鳥からの*C. psittaci*遺伝子検出法の開発

従来報告されている*C.psittaci*用のPCRは属特異プライマーで増幅した後、制限酵素での切断を要するか、nested PCR を必要とするため煩雑である。我々は one step PCR のプライマーを開発し、最適な条件、特異性、感度等の検討を行った。*C. psittaci* の主要外膜蛋白質 MOMP 遺伝子を標的として、*C. psittaci* のみに特異性が高いプライマー１組を設計した(Cpsi-1およびCpsi-2)。*C. pneumoniae*、*C. trachomatis*、*C. pecorum* および他の 30 菌種を用い、特異性を検討した。*C. psittaci* 6BC 株精製EBからDNAを抽出し、感度検定に用いた。また、他の報告されているオウム病診断用プライマー2 組と比較した。さらに、動物園やペットショップのトリ糞便 140 検体（オウム病集団発生事例の 7 検体を含む)、オウム病患者喀痰１検体を用いて検出を試みた。Cpsi-1/2 は一反応あたり 6～60 fg（約 0.6～6 ゲノムコピー）を検出可能で、他のプライマーを用いた PCR より感度が高かった。トリ 140 検体から 4 検体、オウム病患者喀痰１検体が陽性であった。これらの結果から、今回設計したプライマーによるPCR法は、*C. psittaci*特異的で高感度であった。また、Cpsi-1/2 は one-step PCR で *C. psittaci* のみ増幅できるため、簡便で実用的と考えられた。今後検体数を増やしてさらに検討する予定である。[蔡　燕、岸本寿男、志賀定祠、小川基彦、Agus Setiyono、佐藤　梢]

(4) ヒトの簡便なオウム病血清診断法の開発

ヒトでの診断法として種特異的で簡便なELISA法が望まれている。*C.psittaci*の基本小体の精製を行い、その外膜複合蛋白を抗原としたELISA法の開発を目指した。測定系は構築し得たが、現在までのところまだ十分な特異性が得られていないため、今後、抗原の選択についてさらに検討の予定である。[蔡　燕、岸本寿男、志賀定祠、小川基彦、Agus Setiyono、佐藤　梢]

(5) ヒトのアウトブレイクの原因となったヘラジカ由来*Chlamydia psittaci*の遺伝学的解析とその感染源に関する調査

2001年5月川崎市夢見ヶ崎動物公園においてヘラジカの出産の介助に携わった職員および獣医師の5名がオウム病に感染するという事例が報告された。その後の解析で、胎盤および死亡ヘラジカ胎仔の肺からPCRによりクラミジアの遺伝子が検出され、胎盤からクラミジアの分離に成功した。今回、分離されたクラミジアの遺伝学的性状を解析した。

ヘラジカ分離株の遺伝学性状の解析は、外膜タンパク質(ompA)の塩基配列を決定し、既報の株と比較し行った。また、精製菌から抽出したゲノムDNAのAlu1制限酵素による切断パターンを、他のクラミジアの株と比較した。次に、この動物公園内で飼育されているヘラジカの血清（当該メスジカの他、オス１、メス１）の分離株に対する抗体価を測定して、ヘラジカ間での流行の可能性を調査した。また、有害駆除された動物公園周辺のカラスおよびドバトの糞便、脾臓、肝臓からPCRによる遺伝子検出および塩基配列の決定を行い、ヘラジカ分離株との比較解析を行った。ヘラジカ分離株のompAの塩基配列は、既報のトリ由来*C.psittaci*に高い相同性を示した。特に、既報の鳩由来株に相同性が高かった。また、PCRにより選択的に増幅された微量の集団を解析している危険性を排除するため、Alu1消化によるゲノムパターンの解析

を行った結果、*C.psittaci*と同じパターンを示したため、分離された株では*C.psittaci*が主要なpopulationであるか、単独の感染であることが明らかになった。次に、ヘラジカの血清抗体価Ig(whole)は当該メス感染時1024倍、感染後9ヶ月で64倍に減少し、他のメスジカは感染後8ヶ月で64倍、オスジカは8倍であり、他のメスが過去に感染していた可能性は残ったが、オスジカが感染していた可能性はきわめて低かった。従って、オスから交尾によって感染した可能性はきわめて低くなった。さらに、周辺のカラス４羽およびドバト12羽の糞便、肝臓、脾臓から、PCRによる検出を行った結果、ドバト２羽の糞便、うち１羽の肝臓および脾臓も陽性となった。陽性検体のompA塩基配列は、ヘラジカ分離株とアミノ酸配列で99.8%、塩基配列で99.9%一致していた。従って、今回のアウトブレイクは動物公園の周囲にいたドバトから、何らかの原因でヘラジカに感染し、胎盤で爆発的に増殖したクラミジアがヒトのアウトブレイクの原因となった可能性がきわめて強くなった。このようなケースは世界的にも珍しく、今後もこういったケースが他にもあるのか、広く調査解析を進めていく必要があると思われた。［小川基彦、岸本寿男、佐藤　梢、志賀定祠、蔡　燕、Agus Setiyono、多田有希（感染症情報センター）、長澤　實（川崎市立夢見ヶ崎動物公園）］

（6） *Chlamydia pneumoniae*のタイピングに関する研究（第１報）

*Chlamydia pneumoniae*は、一般にゲノム型、血清型が１つと考えられタイピングが困難と考えられてきた。また、現在までに４菌株の全塩基配列が公表されているが、非常に近似しているためタイピングの困難さが予想される。しかし、菌株のタイピングが可能になると、疫学調査、病原因子の解析、潜伏感染と再感染の区別など種々の知見に役立つと考えられる。そこで、これまでに全塩基配列の明らかにされた菌株の情報を比較し、遺伝子サイズの異なる領域を検索した。その結果明らかとなった遺伝子サイズの異なる領域数カ所について、PCR で増幅し電気泳動で確認した。世界各国で分離された J138（日本）、CWL-029（米国）、Kajanii6（フィンランド）、TW183（台湾）、AR39（米国）、IOL207（イラン）について比較検討したところ、AR39、IOL207 以外の各国の株は区別できた。しかし、日本で分離された J138（下関）、YK41（広島）、TFC100、105（岡山県市中肺炎）、岡山・倉敷集団発生由来 11 株、熊本県集団発生由来８株を検討したところ、熊本集団発生由来の１株と岡山県市中肺炎由来の１株を除いてすべて同じパターンとなり、区別はできなかった。今回開発したタイピング法では、分離された国別のタイピングは可能であるが、日本で分離された株についてはタイピングが困難であった。今後さらに精度の良いタイピング法の検討が望まれる。[尾内一信・遠藤雅子(川崎医科大学小児科学２講座) 岸本寿男、山崎勉、志賀定祠、小川基彦]

（7）抗 *Simkania negevensis* 抗体検出についての検討

Simkania negevensis（*S. negevensis*）はイスラエルの Kahane らが 1993 年に分離報告し、現在 *Chlamydia* 目 *Simkania* 科に分類されている微生物である。成人では市中肺炎を、小児では細気管支炎を引き起こし、細気管支炎ではその 25%に関与しているとの報告がある。我々は *Chlamydia* の抗体測定法の一つである Microplate immunofluorescence antibody technique(MFA 法)を使って対象に抗 *S. negevensis* 抗体の検出を行った。健常者 588 人を、培養２日目の単層を形成した Vero 細胞に *S. negevensis*（ATCC VR-1471)を接種した。接種後 5 日目に、感染させた Vero 細胞を trypsin で剥離してマイクロプレートに移植し、さらに 2 日間培養した後に固定し、MFA 法の抗原とした。MFA 法は抗原と被検血清を反応させた後、FITC 標識抗ヒト IgG 抗体と反応させたものを蛍光顕微鏡で検鏡し、封入体部分が蛍光染色されている感染細胞が認められるものを陽性と判定した。血清 IgG の抗体価が 8 倍以上のものを陽性者と判定した。その結果、*Chlamydia* と同様に特徴的な封入体の蛍光染色を確認でき、抗体陽性と判定したものは 588 人中、40%の 235 人であった。年齢別抗体保有率は 4 歳以下では 8.0%であったが、5～14 歳で約 30%に上昇し、15 歳以降ほぼ横ばいとなり 47～57%を示した。以上のことから、本邦においても広く *S. negevensis* 感染が存在することが示された。また抗体保有率が小児期に上昇していることから、この時期の何らかの病態に関与していることが示唆された。 [山口徹也（浜松医科大学小児科）、山崎勉・井上美由紀(埼玉医科大学小児科)、小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、尾内一信（川崎医科大学小児科 2 講座)、大関武彦・中川裕一（浜松医科大学小児科）]

（8）*Simkania negevensis* 培養条件の検討

*S.negevensis*の細胞培養については、限られた施設でのみ施行されていて、至適培養条件については明らかでない点が多い。そこで、今回は培養条件の比較検討を行い、*S.negevensis*の増殖に最適な条件を求めた。培養条件の検討は、4×10^4個/mLに菌数を調整した*S.negevensis*をVero細胞に接種し、５％CO_2条件下37℃で 5 日間培養した。培養液は、RPMI1640 培地を

使用した。細胞はメタノールにて固定後、抗*S.negevensis*家兎ポリクローナル抗体と抗家兎FITC標識抗体を用いて封入体を染色した。*S.negevensis*の封入体は、30 視野計測し、各検討項目について３回ずつ施行して平均封入体数を算定した。培養条件の検討項目は、前処理としてポリエチレングリコール (PEG)とDEAE デキストラン、接種時の超音波処理の有無、接種後の遠心吸着の有無、培養液のfetal calf serum濃度、抗生剤およびglucose添加の有無とした。

今回の検討からは、*S.negevensis*の増殖に関して、抑制的あるいは影響を及ぼさなかった項目は、PEGあるいはDEAEデキストランによるVero細胞の前処理、接種時の超音波処理であった。一方、促進的と判断された項目は、接種時の遠心吸着、培養液への 10%FCS の添加であった。[井上美由紀・山崎　勉（埼玉医科大学小児科)、山口徹也（浜松医科大学小児科)、小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、尾内一信（川崎医科大学小児科 2 講座)、大関武彦・中川裕一（浜松医科大学小児科）]

(9) 市中肺炎例の *C.pneumoniae* 肺炎診断における Ig M 測定の意義について

C.pneumoniae 感染症の血清診断では、ペア血清での判定が重要ではあるが、IgG、IgA 抗体価の変動が緩やかなため確定診断が困難なことが多い。そこでシングル血清でも診断的意義が高いとされる特異 IgM 測定の有用性について、成人市中肺炎例を対象に、ELISA 法、micro-IF 法により比較検討した。関東以西の第一線の臨床医 20 施設を受診し、インフォームドコンセントが得られた中等症までの市中肺炎例 168 例について、各種起因菌の検索と肺炎クラミジアについては培養、PCR、とペア血清の *C.pneumoniae* 抗体を測定した。ELISA 法はヒタザイム C.ニューモニエ(日立化成)を用い、micro-IF は *C.pneumoniae* AR39 株を含めたクラミジア 3 種の抗原を用いて、それぞれ IgG,A,M について検討した。IgM の測定は RF を除去処理後に行った。*C.pneumoniae* 急性感染の抗体価判定基準として、ELISA はペア血清での IgG の ID 値 1.35 以上上昇か IgA の 1.00 以上上昇、あるいはペアのどちらかが IgM 1.60 以上のもの、これらのいずれかをみたすこととした。また micro-IF は、ペアでの IgG の 4 倍以上上昇、あるいはペアのどちらかが IgM 32 倍以上のいずれかを満たすこと、とした。*C.pneumoniae* 急性感染確診例は、ELISA で 26/168 例(16%)、micro-IF で 14/168 例(8.3%)であった。このうちペア血清 IgG,IgA の有意な上昇で診断可能であった例は、ELISA で 2 例のみ、micro-IF では 1 例もなく、残りはすべて IgM による判定基準での診断であった。*C.pneumoniae* 肺炎の血清診断において、IgG、IgA のペアでの判定でも急性感染確定診断は困難であったが、その理由として、血清採取の間隔の約２週間が短期間であったことが考えられる。一方、IgM 測定は、ELISA 法、micro-IF 法ともに有用であった。また、ELISA 法は簡便であり、micro-IF より診断率が優れていたことからも、経過観察期間が比較的短い一般開業医の外来診療の現場では今後特に臨床応用の意義が大きいと思われた。 [岸本寿男、志賀定祠、小川基彦、佐藤　梢、Agus Setiyono、蔡　燕、中浜　力(中浜医院)]

Ⅵ. 検定検査業務

1. 乾燥細胞培養痘そうワクチンの国家検定

平成 15 年度は、5 ロットの乾燥細胞培養痘そうワクチンの国家検定を実施し、5 ロット全てを合格と判定した。[緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、倉根一郎]

2. 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 15 年度は､36 ロットの日本脳炎ワクチンの国家検定を実施し､36 ロット全てを合格と判定した。[根路銘令子、高崎智彦、伊藤美佳子、田島茂、倉根一郎]

3. 黄熱ワクチン依頼検査

平成15年度は２ロットの黄熱ワクチン依頼検査の行政検査を実施した。[伊藤美佳子、高崎智彦、根路銘令子、田島茂、倉根一郎]

4. ウイルス行政検査

ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス行政検査が４件依頼され、実施した。 [高崎智彦、伊藤美佳子、根路銘令子、田島茂、倉根一郎]

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ロットについて、生物学的製剤基準に基づいて、力価試験および不活化試験を行ない、合格と判定した。[新井陽子、森本金次郎、中道一生、倉根一郎]

6. 水痘ワクチンの検定

乾燥水痘生ワクチン国家検定４ロット、輸出用ワクチン依頼検査５ロット、水痘抗原国家検定１ロットを実施し、全ロットとも合格であった。[柳　壹夫、原田志津子、井上直樹、倉根一郎]

7.　リケッチア関連の検査

四類全数把握届出感染症のQ熱、つつが虫病、日本紅斑熱、発疹チフスリケッチアおよび類症鑑別に必要な菌株の維持および抗原の作成を行った。また、検査として、患者 34 名計 80 検体の血清診断および遺伝子検出などを行った。その結果、ケニアで感染したと思われる輸入紅斑熱１例、オーストラリアで感染した思われるQ熱１例、ベトナムで感染したと思われる発疹熱 1 例、ネパールで感染したと思われるつつが虫病 1 例が、陽性と診断された。患者数は多くないが、異なったリケッチアに感染した患者が、異なった地域から帰国後報告されたことは、改めて輸入感染症としてのリケッチア症に注意を払う必要性が示唆された結果であった。(なお、リケッチアの型別は、徳島大学・医学部、フランス CNRS, unite des Rickettsie との共同研究により行い継続中である。)[小川基彦、岸本寿男、倉根一郎]

8.　クラミジア関連の検査

クラミジア特異抗体測定のためのmicro-IF用抗原として*C.psittaci* Budgerigar No.1 株を 6ml 6.3×10^8と、*C.trachomatis* D株(C/TW-3/OT)5ml 4.5×10^8の精製を行った。

国内研究施設への分与は細胞 2 箇所、クラミジア株 2 箇所、micro-IF 抗原 5 箇所に行った。

依頼検査として国内から市中肺炎例のクラミジア 3 種の抗体価、PCR、分離を約 200 例 500 検体にて施行した。[志賀定祠、岸本寿男、倉根一郎]

Ⅶ　国際協力

1.　JICA ガーナ感染症対策プロジェクトへの短期専門家派遣

西條政幸主任研究官が、昨年度に引き続き国際協力事業団（現、国際協力機構、JICA)が行っているガーナ感染症対策プロジェクトを通じたガーナ大学野口研究所スタッフへの技術協力を行うために、JICA の短期専門家としてガーナ大学に 2003 年 8 月 24 日から 3 週間にわたり派遣された。派遣先では、エボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスおよびラッサウイルス感染症の診断法の技術供与を行うとともに、それらのウイルス感染症の血清疫学的研究の技術援助を行った。

2.　JICA ガーナ性感染症プロジェクトの最終評価

ガーナにおける性感染症の原因病原体の解析と技術移転を目的に、JICA および野口研究所(NMIMR)との共同研究を行ってきた。プロジェクトの終了に際し評価を行った。中間評価で指摘されたクラミジアの検査の精度に問題があることや、日本で分離等の技術研修を受けた担当者が実際の検査に携わっていないことなどの問題点がその後も改善されていなかったため、最終的に extra counterpart 研修として、感染研で受け入れた。また検体をガーナから持ち込んで確認を行った。感染研での PCR と rRNA detection test(APTIMA)による確認試験の結果から、NMIMR のクラミジア検査の信頼性は低いと考えざるを得なかった。ただし幸い、感度、特異性に最も優れた rRNA detection test での *C. trachomatis* クラミジア陽性率は 3%という結果が得られたこと、PCR で陽性であった 8 株は sequence analyse による genotyping で E、G の 2 株であることが明らかになったことは疫学的に意義のあることと考えられた。クラミジアのほかにも HB 抗原の陽性率が高かったことや、*N. gonorhoeae* の検出率が低いことなど、その理由については考察が必要であるが興味深い結果が得られた。

Ⅷ　協力研究員、研究員、実習生等

第一室	協力研究員	畠山修司、樗木俊聡、小安重夫
	実習生	灰谷あずさ
第二室	客員研究員	鈴木隆二、名和　優
	協力研究員	吉田靖子、正木秀幸、吉田隆史、山本　晃、原田　誠、飯塚信二、矢部貞雄、中山幹男、山田堅一郎
	研究生	藤井克樹、Beti Ernawati Dewi、
第三室	協力研究員	Pakamatz Khawplod
	研究生	庄司洋子
	実習生	滝川　彩
第四室	協力研究員	関沢　剛、大川雅子、小澤　茂、青塚新一、伊藤さゆり
	研究生	北村　亮

第五室　協力研究員　平野由紀、山崎　勉、井筒　浩、
萩原敏且、麻生宣子、宮野昭弘、
山野宏晃、大口純人、山口徹也、
佐藤　梢
流動研究員　蔡　燕、Agus Setiyono

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Eshita, Y., Takasaki, T., Yamada, K., and Kurane, I.: Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes. Anthrology in Biosafety. 6: 63-71. 2003

2) 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

3) Mori, K., Tamura, M., Yashino, T., Asada, H., Kawamoto, M., Shikida, T., Kurane, I., and Kubo, T.: Modulation of T-cell functions by the laser surgery in patients with allergic rhinitis. Acta Oto-Laryngologica. 123: 704-708, 2003

4) 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

5) 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

6) Pandy, B.D., Yamamoto, A., Morita, K., Kurosawa, Y., Rai, S.K., Kandel, R., Adhikari, S.K., and Kurane, I.: Sero-diagnosis of Japanese encephalitis in Nepal by the particle aggulutination assay. Epidemiology and Infection. 131: 881-885, 2003

7) Konishi, E., Ajiro, N., Nukuzuma, C., Mason, P. W., and Kurane, I.: Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. Vaccine. 21: 3675-3683, 2003

8) Sa-ngasang, A., Wibulwattanakij, S., Chanama, S., O-rapinpatipat, A., A-nuegoonpipat, A., Anantapreecha, S., Sawanpanyalert, P., and Kurane, I.: Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. Japanese Journal of Infectious Diseases. Japanese Journal of infectious Diseases 56: 205-209, 2003

9) Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Kurane, I., and Akatsuka, T.: Development of IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue, using beta-propiolactone-inactivated dengue viral antigens. Dengue Bulletin. 27: 95-99, 2003

10）Tang Q, Saijo, M., Zhang Y, Asiguma, M., Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S.: A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleoprotein-based antibody detection systems. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10:489-491, 2003

11）Suzutani, T., Ishioka, K., De Clercq E, Ishibashi, K., Kaneko, H., Kira, T., Hashimoto, K., Ogasawara, M., Ohtani, K., Wakamiya, N., Saijo, M.: Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47:1707-1713, 2003

12）Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Ako, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara, M. and Takashima, I.: Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. Insect Molecular Biology 12: 61-66, 2003

13) Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Ako, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura, T., Takashima, I.: Involvement of the JNK-like protein of the Aedes albopictus mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. 2003. Insect Molecular Biology 12: 491-499, 2003

14) Niikura, M., Ikegami, T., Saijo, M., Kurata, T., Kurane, I., Morikawa, S.: Analysis of linear B-cell epitopes of the nucleoprotein of ebola virus that distinguish ebola virus subtypes. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunolgy 10(1):83-7. 2003

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

16) Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, M.E.G., Calaor, A.B., Hernandez, M., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S.: Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. Epidemiology and Infection. 130:533-9. 2003

17) Sunohara, M., Morikawa, S., Sato, T., Sato, I., Sato, T., and Fuse, A.: Modulation of human c-mpl gene expression by thrombopoietin through protein kinase C. Cellular and Molecular Biology, 49: Online Pub:OL393-8 2003

18) Maeda, A., Lee , B-H., Yoshimatsu, K., Saijo, M., Kurane, I., Arikawa, J. and Morikawa, S.: The Intracellular Association of the Nucleocapsid Protein (NP) of HantaanVirus (HTNV) with Small Ubiquitin-Like Modifier-1 (SUMO-1) Conjugating Enzyme 9 (Ubc9). Virology, 305: 288-297. 2003

19) Ikegami, T., Niikura. M., Saijo, M., Miranda, M.E., Calaor, A.B., Hernandez, M., Acosata, L.P., Manalo, D.L., Kurane, I., Yoshikawa, Y. and Morikawa, S.: Antigen-capture Enzyme-linked Immunosorbent Assay that specifically detects Reston Ebola Virus Nucleoprotein. Clinical and Diagnostic Labortory immunology, 10: 552-557, 2003

20) Lee BH, Yoshimatsu K, Maeda A, Ochiai K, Morimatsu M, Araki K, Ogino M, Morikawa S, Arikawa J.: Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules. Virus Research 98(1):83-91. 2003

21) Sakamoto, T., Ushijima, H., Okitsu, S., Suzuki a, E., Sakai, K., Morikawa, S. and W. E.G. Muller : Establishment of an HIV cell ≀ cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. Journal of Virological Methods 114: 159-166, 2003

22) Takasaki, T., Yabe, S., Nerome, R., Ito, M., Yamada, K., Kurane, I.: Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. Vaccine 21(31) 4514-4518, 2003

23) Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Yabe, S., Kurane, I.: Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10(4) 725-728, 2003.

24) Tajima S., Tsukamoto M., Aida Y.: Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. Journal of Virology 77, 4423-4430, 2003

25) Konnai S., Takeshima S., Tajima S., Okada K., Onuma M., Aida Y.: The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. Microbiology and Immunology, 47, 223-232, 2003

26) Usui T., Konnai M., Tajima S., Watarai S., Aida Y., Ohashi K., Onuma M.: Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. Journal of Veterinary Medical Science, 65, 1201-1205, 2003

27) Takahashi M., Tajima S., Takeshima SN., Konnai S., Yin SA., Okada K., Davis WC., Aida, Y.: Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5- B cells that express BLV. Microbes and Infection, 6, 584-595, 2004

28) 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

29) Arai, Y.T., Kuzmin, I.V., Kameoka, Y., Botvinkin, A.D.: New Lyssavirus Genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (Myotis blythi), Kyrghyzstan. Emerging Infectious Diseases 9: 333-337, 2003

30) Kuzmin IV, Orciari LA, Arai YT, Smith JS, Hanlon CA, Kameoka Y, Rupprecht CE.Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. Virus Research 2003, 97: 65-79.

31) Ito, M., Itou, T., Shoji, Y., Sakai, T., Ito, F.H., Arai, Y.T., 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

32) Shoji, Y., Inoue, S., Nakamichi, K., Kurane, I., Sakai, T., Morimoto, K.: Generation and characterization of P gene-deficient rabies virus. Virology 318: 295-305, 2004

33) Harada, S., Kamata, Y., Ishii,Y., Eda, H., Kitamura, R., Ban, F., Kuranari, J., Nakajima, H., Kuze, T., 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 Diagnostics and Laboratory Immunology 11: 123-130, 2004.

34) Inoue, N., Winter, J., Lal, R., Offermann, M.K. and Koyano, S.:Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line.

Journal of Virolpgy 77: 8147-8152, 2003.
35) Koyano, S., Mar, E.-C., Stamey, F.R. and Inoue, N.: Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion. Journal of General Virology 84:1485-1491, 2003.
36) Koyano, S., Hirano, Y., Araki, A., Murono, K., Fujieda, K., Suzutani, Yagyu, T. and K.Inoue, N. : Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. Pediatric Infectious Disease Journal 23:481-482, 2004.
37) Mbopi-Keou, F.-X., Hocini, H., Legoff, J., Picketty, C. Malkin, J.-E., Inoue, N. Scully, C.M., Porter, S.R., Teo, C.G. and Belec, L.: Salivary production of IgA and IgG to human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in individuals with resolved Kaposi's sarcoma. AIDS 18:338-340, 2004.
38) Nabeshima,T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D.W., Kono, Y. and Tomita, T.: An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorynchus*. B.B.R.C. 313, 794-801, 2004.
39) Nikolaou, K., Varinou, L., Inoue, N. and Arsenakis M. : Identification and characterization of gene products of ORF U90/89 of human herpesvirus 6. Acta Virologica 47:17-26, 2003.
40) Peng, C-W., Xue,Y., Zhao, B., Johanssen, E., Kieff, E. and Harada, S.: Direct interactions between Epstein-Barr virus leader protein (EBNALP) and the EBNA2 acidic domain underlie cooperative transcriptional regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:1033-1038, 2004.
41) Yamazaki, T., Inoue, M., Ogawa, M., Shiga, S., Kishimoto, T., Hagiwara, T., Matsumoto, T., Hayashi, T.: Inactivation of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* by ozone. Lett Appl Microbiol. 38(5):406-9. 2004
42) Yamazaki, T., Inoue, M., Sasaki, N., Hagiwara, T., Kishimoto, T., Shiga, S., Ogawa, M., Hara, Y., Matsumoto, T.: In vitro inhibitory effects of tea polyphenols on the proliferation of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. Jpn J Infect Dis. 56(4):143-5. 2003.
43) Yamaguchi, T., Yamazaki, T., Inoue, M., Ogawa, M., Shiga, S., Nakagawa, Y., Kishimoto, T., Ouchi, K. and Ohzeki, T.: Factors Improving the Propagation of *Simkania negevensis* Strain Z in Cell Culture Jpn. J. Infect. Dis., 57, 103-106, 2003

2. 和文発表

1）伊藤美佳子、倉根一郎：デング熱・デング出血熱．総合臨床 52(増刊)：1109-1115，2003
2）倉根一郎：ウエストナイル熱．ウイルス 53：1-6，2003.
3）倉根一郎：ウエストナイルウイルス：北アメリカにおける脅威．Molecular Medicine：890-894，2003.
4）倉根一郎：ウエストナイル熱と日本の対策．ファルマシア 39:545-548，2003
5）倉根一郎：デング熱・デング出血熱、黄熱．臨床と微生物 30:356-360，2003
6）倉根一郎：ウエストナイルウイルスの侵入を水際で防ぐ．化学 58(No.12):18-20，2003
7）倉根一郎：ウエストナイルウイルス感染症のその後．感染症と化学療法．7：28-31，2003
8）倉根一郎：新しいウイルス性疾患：ウエストナイル熱、SARS など．Medical Practice．20：2087-2091,2003
9）倉根一郎：デング熱・デング出血熱．感染症 33(6):243-253，2003
10）高崎智彦、倉根一郎：ウエストナイルウイルス感染症と移植．今日の移植．17(1)：144-149，2004
11）倉根一郎：デング熱・デング出血熱．臨床ウイルス．32：23-29，2004
12）前田秋彦、倉根一郎：ニパウイルス感染症．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 101-105,2003
13）倉根一郎：日本脳炎．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 106-109,2003
14）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―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
15）小田切孝人、二宮 愛、板村繁之、西藤岳彦、宮島直子、森川 茂、西條政幸、田代眞人：SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果．インフルエンザ（メディカルレビュー社）5:35-42，2004
16）西條政幸：サル痘ウイルス感染症．臨床と微生物 31:21-24，2004
17）西條政幸：ウイルス性出血熱．化学療法の領域 20:224-228，2004
18）森川 茂：ウイルス性出血熱、動物由来感染症：その診断と対策、真公交易（ISBN4-88003-694-3），pp71-76，April 2003
19）森川 茂：リンパ球性脈絡髄膜炎、動物由来感染症：その診断と対策、真公交易（ISBN4-88003-694-3），pp 119-122，April 2003

20）森川　茂：マールブルグ病、総合臨床（増刊：感染症診断・投薬ガイド）Vol 52, 601-604, 2003
21）森川　茂：ウイルス性出血熱のその検査、モダンメディア、 第49巻第4号、103-109
22）森川　茂（2003）：ラッサウイルス　日本臨床 61巻増刊号3（通巻821号）539-543, 2003
23）森川　茂（2003）：フィロウイルス　日本臨床 61巻増刊号3（通巻821号）544-549, 2003
24）高崎智彦：ウエストナイル熱（West Nile Fever）. CURRENT CONCEPTS IN INFECTIOUS DISEASES 22(3) 18-19, 2003
25）高崎智彦：ウエストナイルウイルス感染症.　畜産技術. 581(10) 28-31, 2003
26）高崎智彦：ウエストナイル熱.　臨床医.　29(10) 1779-1782. 2003
27）高崎智彦、伊藤美佳子：ウイルス性脳炎～ウエストナイル脳炎～. 化学療法の領域　19(5) 797-801, 2003.
28）高崎智彦：フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割.　鶏病研究会報.39(増刊号) 1-6. 2003
29）田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美、村田以和夫、諸角　聖、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎：デングウイルス初感染例における中和抗体測定による血清型判定が可能な病日期間の検討.　臨床とウイルス.　32(1).30-35, 2004
30）新井　智、多屋馨子、岡部信彦、高崎智彦、倉根一郎：わが国における日本脳炎の疫学と今後の対策について. 臨床とウイルス.　32(1).13-22, 2004
31）高崎智彦：再興感染症と注目される感染症「黄熱」. からだの科学［増刊］166-170.
2004
32）高崎智彦：先生の知りたい最新医学がここにある「ウエストナイル熱」.　健　32号(9)　42-44, 2003
33）高崎智彦：西ナイル熱.　きょうの健康.　187(10) 123-125, 2003
34）高崎智彦：最近注目すべき感染症「ウエストナイル熱/脳炎」 MBC Forum ’03 11-24, 2003
35）高崎智彦：図説「感染症シリーズ　ウエストナイル熱／脳炎」.　医療 58(2)114-118, 2004
36）根路銘令子、倉根一郎：日本脳炎ワクチン。臨床検査、48 (4)：399-415、2004.
37）伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎：「輸血のすべて」Ⅲ輸血関連感染症検査　ウイルス検査　5.ウエストナイル　月刊　Medical　Technology 31(13) 1411-1415 (2003年)
38）伊藤美佳子、高崎　智彦：特集：輸血と感染症2003 2.新興輸血感染症　2）「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」
血液フロンティア 13(5)613-617. 2003
39）田島茂、倉根一郎：デング熱・デング出血熱　成人病と生活習慣病 33：1111-1115, 2003
40）田島茂、倉根一郎：ウエストナイル熱　からだの科学増刊「新興再興感染症」、156-160, 2004
41）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－ワクチン開発への応用－　獣医畜産新報　第56巻　第7号　603-604　2003
42）新井陽子：1940年代に分離された日本の狂犬病ウイルス(高免株と小松川株)の系統樹解析、感染症学雑誌 2004　第78巻第9号
43）小川基彦、Agus Setiyono、岸本寿男：Q熱の抗体価測定の意義と問題点. 化学療法領域 20：39-43,2004.
44）岸本寿男：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.23:1008-1019,2003
45）岸本寿男、大口純人:炎症抑制による動脈硬化進展防止.The Lipid 14(5)：491-497.2003
46）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：理解して実践する感染症診療・投薬ガイド第Ⅱ部疾患各論Ⅳ.4 類感染症(全数把握)5.オウム病 総合臨床 52:1012-1016,2003
47）岸本寿男、小川基彦、志賀定祠：理解して実践する感染症診療・投薬ガイド第Ⅱ部疾患各論Ⅳ.4 類感染症(定点把握)22.クラミジア肺炎(オウム病を除く) 総合臨床 52:942-948,2003
48）岸本寿男、小川基彦、蔡　燕、志賀定祠:特集:ペットを介する病気　オウム病　小児科　44:781-788,2003
49）岸本寿男、小川基彦、蔡　燕、志賀定祠:話題の感染症　オウム病(*C.psittaci* 感染症)　最近の動向　臨床医 29:1806-1818,2003
50）岸本寿男、山口恵三、渡辺　彰、斉藤　厚:新しい診断と治療の ABC 17 呼吸器 4 肺炎　座談会　市中肺炎と院内肺炎の新しい展開　最新医学社 230-247,2003
51）岸本寿男、小川基彦、蔡　燕:呼吸器感染症－最新の話題　クラミジア　呼吸と循環　52:149-154,2004
52）岸本寿男、小川基彦、蔡　燕:特集　外来で診る呼吸器感染症　細菌感染症の診断と治療 鑑別が重要な肺炎クラミジア肺炎　総合臨床 52,2753-2759,2003
53）岸本寿男、小川基彦:抗生物質・抗菌薬療法の実際　A.感染症からみた抗生物質・抗菌薬の選択と使用の実際 オウム病,クラミジアニューモニエ肺炎　Medical Practice 臨時増刊号 241-245,2003
54）岸本寿男、小川基彦:クラミジアニューモニエ肺炎 呼吸器疾患最新の治療 2004-2006　南江堂 214-216,2003
55）岸本寿男: 臨床検査項辞典 クラミジア・ニューモニア抗体 Medical Technology(別冊)950,2003

56）岸本寿男: 臨床検査項辞典 クラミジア培養・同定 Medical Technology(別冊)51,2003
57）岸本寿男:特集クラミジア感染症の最近の動向　クラミジア感染症の内科領域における最近の動向　化学療法の領域 20:413-417,2004
58）松井珠乃、小川基彦、岸本寿男、海保郁男、大山卓昭、ジョン コバヤシ、岡部信彦：地方衛生研究所におけるツツガムシ病診断の現状-アンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較-．感染症学雑誌 78：248-252,2004
59）亀崎佐織, 末廣　豊, 福永真之介, 竹川剛史, 古村速, 川崎浩三, 尾内一信, 志賀定祠, 小川基彦, 山崎　勉, 岸本寿男: 小児気管支喘息におけるアジスロマイシン投与の効果,日本小児アレルギー学会誌　18:168-175,2004
60）岸本寿男:動物由来感染症その診断と対策　オウム病(Psittacosis)　神山恒夫、山田章雄編 p.133-139,真興交易(株)医書出版部 2003 年
61）小川基彦:動物由来感染症その診断と対策　ツツガムシ病(Tsutsugamushi disease,Scrub typhus)神山恒夫、山田章雄編 p.140-145,真興交易(株)医書出版部 2003 年
62）小川基彦:動物由来感染症その診断と対策　日本紅斑熱(Japanese spotted fever)神山恒夫、山田章雄編 p.146-150,真興交易(株)医書出版部 2003 年
63）小川基彦:動物由来感染症その診断と対策　Q熱(Q fever)神山恒夫、山田章雄編 p.151-155,真興交易(株)医書出版部 2003 年
64）岸本寿男、小川基彦:ダイナミックメディシン　クラミジア感染症　1 クラミジア・トラコマチス p.98-100,西村書店　2003 年
65）岸本寿男、小川基彦:ダイナミックメディシン　クラミジア感染症　2 肺炎クラミジア　p.101-102,西村書店 2003 年
66）山崎　勉, 岸本寿男: 疾患別・症状別　今日の治療と看護　改訂第 2 版,クラミジア感染症, p.976-978.南江堂 2004 年
67）山崎　勉, 岸本寿男: 疾患別・症状別　今日の治療と看護　改訂第 2 版,マイコプラズマ感染症 p.978-979,南江堂 2004 年
68）岸本寿男:医学大辞典　伊藤正男他編　医学書院 2003 年

その他

1）高崎智彦、倉根一郎：世界におけるデング熱・デング出血熱．病原微生物検出情報　25(2)33-34, 2004
2）岡田幸助、尹善愛、池田学、今内覚、田島茂、竹嶋伸之輔、高橋雅彦、平田統一、沼宮内茂、御領政信、小沼操、間陽子：御明神牧場におけるウシ白血病ウイルス接種実験概要　平成１４年度岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター年報 1：69−78, 2003
3）松江フォーゲルパークオウム病調査委員会：松江フォーゲルパークで発生したオウム病調査報告書．　2003年12月
4）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ワーキンググループ 2003．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2003（平成15年 厚生科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業「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」）

Ⅱ．学会発表

1．国際学会

1) Kurane, I.: Research and development of vaccines against Japanese encephalitis. Global Vaccine Research Forum. Seoul, Korea, June 30 – July 2, 2003.
2) Kurane, I.: Japanese encephalitis avccines. International Workshop “vaccination at the beginning of 21st century”. Tokyo, July 11-13, 2003.
3) Kurane, I.: Progress in the analysis of the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 6th Asia Pacific Congress on Medical virology. Kuala Lumpur, Malaysia, December 7-10, 2003.
4) Saijo,M., Qing Tang, Maeda, A., Kurane, I., Morikawa, S.: Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 37th Annual Meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program, July 2003, Houston, Texas
5) Saijo, M.:　Diagnosis of viral hemorrhagic fevers including variola prepared in the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.　International symposium on bioterrorism sponsored by Korean National Institute of Health, November, 2003, Seoul, Korea
6） Tajima S., Aida Y.: Analysis of “silencing” and “reactivation” mechanisms of the expression of bovine leukemia virus. 11th international conference on human retrovirology:HTLV, June 9-12, 2003.
7) Takahashi M., Tajima S., Takeshima S., Okada K., Aida Y.: Regulation of apoptosis by bovine leukemia virus encoding Tax with elevated transactivation activity.　11th International conference on human retrovirology:HTLV, June 9-12, 2003.
8) Aida Y., Konnai S., Takeshima S., Tajima S., Yin S., Onuma M., Okada K.: Influence of polymorphism of MHC class II

alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. 11th International conference on human retrovirology:HTLV, June 9-12, 2003.

9) Morimoto, K.: Generation of propagation of P gene-deficient rabies virus. 37th US-Japan Joint Working Conference on Viral Diseases, Houston, Texas, July 17-19, 2003

10) Inoue, S., Shoji, Y., Morimoto K.: The pathogenicity and antigenicity of P-gene deficient rabies HEP-Flury strain. The 2003 Rabies in the Americas Conference, Philadelphia, Pennsylvania, October 20-24, 2003

11) Morimoto, K.: Generation of P-gene deficient rabies virus. The 2003 Rabies in the Americas Conference, Philadelphia, Pennsylvania, October 20-24, 2003

12) Ito, S. and Yanagi, K.: Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 colocalizes with cellular replication foci in the absence of EBV plasmids. The 28th International Herpesvirus Workshop, Madison, Wisconsin, U.S.A., July 31-August 6, 2003.

13) Inoue, N., Krug, L. T., Offermann, M. K. and Winter, J.: Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line. The 28th International Herpesvirus Workshop. Madison, Wisconsin, U.S.A., July 31-August 6, 2003.

14) Mbopi-Keou, F.-X., Hocini, H., Legoff, J., Picketty, C. Malkin, J.-E., Inoue, N. Scully, C.M., Porter, S.R., Teo, C.G. and Belec, L.: Salivary production of IgA and IgG to human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in individuals with resolved Kaposi's sarcoma. AIDS Vaccine 2003 Conference, New York, September 18-21, 2003.

15) Peng, C-W., Harada, S., Xue, Y., Zhao, B. and Kieff, E.: EBNA-LP cooperates with EBNA-2 through two novel domains. The 28th International Herpesvirus Workshop. Madison, Wisconsin, U.S.A., July 31-August 6, 2003.

2. 国内学会

1）倉根一郎：ウエストナイル熱とその現状．新潟県ウエストナイル熱講習会．新潟市、平成 15 年 4 月 18 日

2）倉根一郎：フラビウイルス感染症の現状とその対策．中国・四国ウイルス研究会、観音寺市、平成 15 年 5 月 24 日

3）倉根一郎：輸血とウエストナイルウイルス．第 51 回日本輸血学会総会、p222、平成 15 年 5 月 29-31 日

4）倉根一郎：ウエストナイルウイルスとウエストナイル熱．平成 15 年度東京都健康局・病院経営本部専門性向上研修　環境衛生実務研修、東京都、平成 15 年 6 月 10 日

5）倉根一郎：デング熱・デング出血熱．第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島市、平成 15 年 6 月 26-27 日

6）倉根一郎：ウエストナイル熱の現状と対策．第 18 回尿路ウイルス研究会、東京都、平成 15 年 9 月 22 日

7）倉根一郎：ウエストナイルウイルス．第 4 回感染病態シンポジウム、仙台市、平成 15 年 11 月 15 日

8）倉根一郎：節足動物媒介性ウイルス感染症と地球温暖化．環境省地球環境研究総合推進費一般公開シンポジウム、東京都、平成 15 年 11 月 25 日

9）西條政幸，森川茂，倉根一郎：組換え核蛋白を用いたクリミア・コンゴ出血熱の血清学的診断．第 77 回日本感染症学会総会．2003 年 4 月，福岡

10）西條政幸，森川茂，前田秋彦，倉根一郎：急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答．日本ウイルス学会　第 51 回学術集会・総会，2003 年 10 月，京都

11）西條政幸：流行地で学ぶクリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症．トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会．2003 年 10 月，京都

12）板村繁之、森川茂、田代真人：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの感染性とゲノムの不活化．第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月，京都．

13）森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸，小田切孝人、倉根一郎、田代真人：重症急性呼吸器症候群(SARS)の血清診断法．　第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月，京都．

14）板村繁之、二宮愛、西藤岳彦、森川茂、西條政幸，小田切孝人、倉根一郎、田代真人：RT－PCR 法による重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスの検出感度の検定．　第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月，京都．

15）西條政幸，森川茂、前田秋彦、倉根一郎：急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答．　第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月，京都．

16）鈴木映子、岩坂正和、上野照剛、林京子、巽正志、森川 茂、沖津祥子、牛島廣治：HIV-1 の cell to cell fusion における gp41-mediated fusion．　第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月，京都．

17）高崎智彦：ウエストナイル熱－診断法と防疫対策－第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003 年 5 月 15-16 日

18）佐々木年則、澤邉京子、伊澤晴彦、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生：イムノクロマトグラフィーによる蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

19）佐藤利明、斎藤隆行、古屋由美子、今井光信、宮澤真紀、高崎智彦、倉根一郎：ウエストナイルウイルスの遺伝子検査－感染研マニュアルの死亡カラスへの応用事例－　第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

20）伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、野村秀和、Beti Ernwati Dewi,倉根一郎：Real Time PCRによるDengue virusの血清型分類. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

21）名和　優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎：デングウイルス血清型特異的IgM検出のためのタンパク変性試薬（チオシアン酸ナトリウム）を用いたELISA. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

22）新井　智、高崎智彦、森　伸生、多屋馨子、早川丘芳、倉根一郎、岡部信彦：感染症流行予測事業担当者. 1982年から2002年までの日本脳炎患者発生状況. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

23）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：日本脳炎ウイルスのサーベイランス. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会　小樽　2003年5月15-16日

24）高崎智彦:「ウエストナイルウイルス感染症」　新興疾病・人獣共通感染症に関する国際ワークショップ　東京　2003年6月19日

25）高崎智彦:「ウエストナイルウイルス感染症について」第2回関西感染症フォーラム　大阪　2003年6月21日

26）高崎智彦：最近注目すべき感染症－ウエストナイル熱／脳炎－. MBC FORUM‘03　　東京　2003年7月19日

27）高崎智彦：NHKきょうの健康「西ナイル熱」　ＮＨＫ　2003年7月31日

28）田島茂、高崎智彦、倉根一郎：黄熱ワクチンへのＡＬＶ混入に関する研究. 第10回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会　京都　2003年10月26日

29）名和　優、赤塚俊隆、高崎智彦、倉根一郎：C6/36細胞表面に吸着した日本脳炎ウイルスの弱酸性条件における膜融合と、ウイルス遺伝子の直接侵入による感染. 第10回トガ･フラビ･ペスチウイルス研究会　京都　2003年10月26日

30）田島茂、高崎智彦、松野重夫、中山幹男、倉根一郎：Yokoseウイルスの全塩基配列の決定および他のフラビウイルスとの相同性の比較. 第51回日本ウイルス学会　京都　2003年10月27-29日

31）Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎：PBL induce increase in the permeability on dengue virus infected-endothelial cells associated with down regulation of VE-cadherin. 第51回日本ウイルス学会　京都　2003年10月27-29日

32）新井　智、多屋馨子、高崎智彦、辻正義、石原智明、倉根一郎、岡部信彦：日本脳炎ウイルス非構造タンパク質NS1の発現. 第51回日本ウイルス学会　京都　2003年10月27-29日

33）名和　優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎：デングウイルス血清型特異的IgM検出のためのタンパク変性試薬（チオシアン酸ナトリウム）を用いたELISA.　第51回日本ウイルス学会　京都　2003年10月27-29日

34）根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎：日本脳炎ウイルスのサーベイランス：ブタ血清からのウイルス分離とその解析.　第51回日本ウイルス学会　京都　2003年10月27-29日

35）伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、田島　茂、野村秀和、Ernawati Dewi Beti, 倉根一郎：Real time PCRによるDengue virusの血清型分類.　第51回日本ウイルス学会京都　2003年10月27-29日

36）高橋雅彦、田島茂、間陽子：変異体 Tax を有する牛白血病ウイルス(BLV)によるアポトーシス制御。第 51 回日本ウイルス学会・総会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

37）市村香苗、高木道浩、田島茂、大橋和彦、小沼操、間陽子：ウシ白血病ウイルス感染ヒツジ由来末梢血単核球におけるNKレセプターとアポトーシス関連因子の発現。第51回日本ウイルス学会･総会､京都､2003年10月27-29日

38）新井　智、多屋馨子、高崎智彦、早坂丘芳、倉根一郎、岡部信彦：近年の日本脳炎患者発生状況および感染リスク.　第３回人と動物の共通感染症研究会学術集会　東京　2003年11月1日

39）高崎智彦：フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割.　平成15年秋季全国鶏病技術研修会　広島　2003年11月6日

40）高崎智彦、倉根一郎：第３回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム.　東京　2003年12月19日

41）高崎智彦：話題の感染症－ウエストナイル熱を中心に－.　第19回日本環境感染学会　横浜　2004年2月20日

42）高崎智彦:「医療機関における海外渡航者へのアドバイスのために－海外旅行者に必要なワクチン－. 感染症

シリーズ 平成15年度　第3回　大阪　2004年2月26日

43）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坑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

44）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

45）新井陽子、亀岡洋祐：日本の狂犬病ウイルスの起源に関する解析　第51回日本ウイルス学会総会　京都　2003年10月27-29日

46）庄司洋子、井上智、中道一生、倉根一郎、酒井健夫、森本金次郎：Ｐ遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出と性状解析　第51回日本ウイルス学会総会　京都　2003年10月27-29日

47）伊藤さゆり、柳　壹夫: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、局在する一潜伏感染の新しいメカニズム.日本ウイルス学会第51回学術集会､京都、2003年10月27-29日

48）伊藤さゆり、柳　壹夫:Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 that is an origin-binding protein and the only EBV protein essential for replication and maintenance of EBV plasmid DNAs colocalizes with cellular DNA replication foci in the absence of EBV plasmids.　第２６回日本分子生物学会年会　神戸　2003年12月10-13日

49）原田志津子、伴　文彦、北村　亮、岡部信彦（感染症情報センター)、中村良子（昭和大学)、柳　壹夫:健常人成人層におけるEBVウイルス核蛋白質EBNA-2に対する抗体価の分析.日本ウイルス学会第51回学術集会､京都、2003年10月27-29日

50）原田志津子、Elliott Kieff: The Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA) 2 acidic domain binds to EBNA-LP. 第26回日本分子生物学会年会，神戸、2003年12月10-13日

51)島影美鈴､原田志津子､笹川寿之: ＥＢウイルスBamHI Y1Y2領域をプローブとしたmRNA in situ hybridization.日本ウイルス学会第51回学術集会、京都、2003年10月27-29日

52）佐藤　梢、小川基彦、Agus Setiyono、山崎　勉、岸本寿男：Real Time PCR(TaqMan)による*Coxiella burnetii*検出法の開発．第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

53）Agus Setiyono、小川基彦、佐藤　梢、蔡　燕、志賀定祠、岸本寿男：Ｑ熱診断におけるIFAとELISAの診断基準の設定．第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

54）百田隆祥、小島禎、池戸正成、小川基彦、佐藤梢、Agus Setiyono、岸本寿男：LAMP法による*Coxiella burnetii*の検出の基礎.第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会.東京.2003年11月1日-２日

55）Kim, W.J., Lee, S.J., Han, T.W., Ogawa, M.: Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle, healthy people and pneumonia patients in Korea. 第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

56）松井珠乃、小川基彦、岸本寿男、海保郁男、大山卓昭、ジョンコバヤシ、岡部信彦：地方衛生研究所におけるツツガムシ病診断の現状-アンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較.第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

57）小川基彦、岸本寿男、佐藤　梢、志賀定祠、蔡　燕、Agus Setiyono、多田有希、長澤　實：ヒトのアウトブレイクの原因となったヘラジカ由来*Chlamydia psittaci*の遺伝学的解析とその感染源に関する調査．第52回東日本感染症学会．横浜．2003年10月30日-31日

58）佐藤　梢、小川基彦、Agus Setiyono、山崎　勉、岸本寿男：Real Time PCR(TaqMan)による*Coxiella burnetii*検出法の開発．第52回東日本感染症学会．横浜．2003年10月30日-31日

59）百田隆祥、小島禎、池戸正成、小川基彦、佐藤梢、Agus Setiyono、岸本寿男：LAMP法を用いた*Coxiella burnetii*の検出．第１５回日本臨床微生物学会総会．筑波．2004年１月24日

60）尾内一信、遠藤雅子、小川基彦、志賀定嗣、山崎 勉、岸本寿男：*Chlamydophila pneumoniae*のタイピングに関する研究（第１報）第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

61）岸本寿男、志賀定詞、小川基彦、佐藤　梢、Agus Setiyono、蔡　燕：市中肺炎例の*C.pneumoniae*肺炎診断におけるIgM測定の意義について 第21回日本クラミジア研究会・第10回リケッチア研究会．東京．2003年11月1日-２日

62)岸本寿男､志賀定祠､小川基彦､蔡　燕､Agus setiyono、倉根一郎、山崎　勉：Micro-IF法による*C.pneumoniae*血清抗体測定の国際的基準化(Phase3)並びにELISA法との比較 第77回 日本感染症学会総会.福岡.　2003年4月17日-18日

63）岸本寿男：パネルディスカッションⅦ　リケッチア

及びクラミジア感染症の現状と展望　第52回日本医学検査学会　埼玉　2003年5月16日-17日

64）山口徹也、山崎　勉、小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、尾内一信 ： Micro-immunofluorescence 法による抗 *Simkania negevensis* 抗体検出法についての検討 第 77 回 日本感染症学会総会.福岡.　2003年4月17日-18日

65)岸本寿男､志賀定祠､小川基彦､蔡　燕､Agus Setiyono､佐藤　梢、山崎　勉、山口徹也、中浜　力: 成人市中肺炎例における肺炎クラミジア特異 IgM 抗体測定の有用性 第 52 回 日本感染症学会総会東日本地方会.神奈川.　2003年10月30日-31日

66）山口徹也、山崎　勉、小川基彦、志賀定祠、岸本寿男、尾内一信: 抗 *Simkania negevensis* 抗体検出法についての検討 第 52 回 日本感染症学会総会東日本地方会.神奈川.　2003年10月30日-31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、当部が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。本年は小分製品1件の検定をおこなった。また不活化ワクチン導入への基礎実験をふくめ、ポリオワクチンの免疫学的研究をおこなった。

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進展した。遺伝子型の解析、レセプターの検索、ウイルス様粒子の形成、ウイルス複製に関する地道な研究も進んだ。また全国地研との連携が確立し、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。本年度は日本固有の E 型肝炎ウイルス株がみつかり、更に人畜共通伝染病としてのE型肝炎についての研究が進んだ。ウイルス中空粒子を用いた、感度の良い診断系の確立が大きく貢献した。ワクチン開発という応用研究が進む一方で、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。また計画達成前後の国内及び世界レベルのワクチン戦略について提言を行っている。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（HPV）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。本年度は特にウイルスの構成蛋白であるコア蛋白の多岐にわたる機能について、その修飾、局在、安定性、産生量、サイトカイン誘導の面から詳細に調べ、発癌や持続感染への役割をしらべた。

第5室の最重要課題は不活化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、検査である。本年はＡ型肝炎ワクチン1件、B型肝炎ワクチン7件の検定を行った。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が着々と進んだ。

各室で以下のような国際的技術協力をおこなった。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。

⑴ 陳　立（中国、中国疾病予防センター）＜JICA フェロー＞
平成 14 年 12 月 16 日ー平成 15 年 11 月 14 日、ポリオウイルスの分子学診断技術研修

⑵ 祝　双利（中国、中国疾病予防センター）＜JICA フェロー＞
平成 15 年 11 月 10 日ー平成 16 年 5 月 1 日、ポリオウイルスの分子学診断技術研修

⑶ 柯　昌文（中国、広東省疾病予防センター）＜日中医学笹川フェロー＞　平成 15 年 4 月 1 日ー平成 16 年 3 月 31 日、E 型肝炎ウイルスの分子生物学的研究

⑷ Ratigorn Guntapong（タイ国立衛生研究所）＜JICA フェロー＞
平成 15 年 9 月 1 日ー平成 15 年 11 月 30 日、ノロウイルスの分子生物学的研究

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、文科省科学研究費、 医薬品機構等の援助を受けた。

人事面では、田中幸江研究員が感染症情報センターへ配置換えとなった（平成 15 年 10 月 1 日）。新型 HPV を次々に発見し、子宮頚癌のウイルス学的診断法の確立に心血を注いだ松倉俊彦主任研究官が定年退職した（平成 16 年 3 月 31 日）。白土東子がウイルス第1室研究員（平成 13 年 10 月 1 日）、西村順裕がウイルス第2室研究員（平成 15 年 10 月 1 日）、村上恭子がウイルス第3室研究員（平成 16 年4月 1 日）として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に（平成 14 年 5 月より）、染谷雄一主任研究間がノロウイルスの下痢発症メカニズムの分子生物学的研究の為，カリフォルニア大学サンフランシスコ医学校に（平成 15 年 5 月より）それぞれ長期出張している。

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(NoV)に関する研究

(1) NoV と血液型物質との結合の解析

NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株が血液型物質である H、Leb 型物質を認識することが報告された。しかし、NoV に属するすべてのウイルス株が同じ血液型物質を認識するわけではなく、NoV 全体の総括的な結合パターンは理解されているとは言い難い。そこで、NoV 14 株の中空粒子(VLP)を用い、Saliva-VLP binding assay により唾液中の血液型物質との結合を検討した。さらに、唾液に含まれる H、A、B、Lea、Leb 型物質の定量を行い、各ウイルス株が認識する血液型物質を解析した。その結果、同じクラスターに属するウイルス株は同じ結合パターンを示した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、Genogroup Ⅰ(GI)では共通してB型唾液への結合が低く、GⅡではB型唾液への結合が高かった。

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

(2) ノロウイルス(NoV)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

NoV 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とが知られており、これまで吸着しない細胞の同定はなされていなかった。そこで、NoV の吸着しない細胞の同定を Binding assay により行い、ヒトリンパ球細胞系の細胞株にはほとんど結合しないことを明らかにした。つぎに、136 種類の抗 CD 抗体を用いて、NoV が吸着しない細胞株と吸着する細胞株の表面分子の発現を Flow cytometry により比較検討し、吸着する細胞株で発現の高い分子を 36 種類選択した。これらの中には NoV の結合に関与する分子が含まれる可能性がある。現在、抗体によるVLP結合阻害実験を行い、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検討している。

[白土東子、名取克郎、小川智子、武田直和、宮村達男]

(3) NoV 粒子形成機構の解析

NoV ゲノムに存在する3つの ORF のうち、構造蛋白質(VP1)をコードする ORF2 をバキュロウイルスで発現させるとウイルス様粒子 VLP を作出できる。ORF3 は、粒子の安定性に関与する構造蛋白質(VP2)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可能性がある。本研究では ORF1, ORF2, ORF3 をそれぞれ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、各種蛋白質が VLP 形成にどのように関与しているのかを調べている。

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

(4) 昆虫細胞を用いた NoV 粒子作成の試み

NoV の ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現して作製した VLP は中空である。この発現系に、NoV ゲノム全長を供給すると、VLP へのゲノムパッケージが起きる可能性がある。NoV ゲノムの 5'末端と 3'末端にリボザイムを組み入れた組換えバキュロウイルスを作製し、細胞内に完全長の NoV ゲノムを供給できるようにした。NoV ゲノム供給用バキュロウイルスと、ORF2 組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、作製した VLP を浮上密度勾配遠心法、沈降密度勾配遠心法で分析したところ、中空の VLP よりも比重の重い分画にシフトした粒子が存在することが確認できた。現在、比重の異なる粒子の解析を進めている。

[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、田中恵子(感染病理部)]

(5) NoV VLP 産生機構の解析

NoV 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。これらクローン間には 5つのアミノ酸残基の違いがあったが、VLP 産生クローンと非産生クローンのキメラを比較検討した結果、P 領域の1アミノ酸残基の変異が VLP の産生能を決定していることを見いだした。現在、この変異が細胞内の VLP 局在に与える影響を免疫電子顕微鏡観察で調べている。

[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、田中恵子(感染病理部)]

(6) NoV の病原性に関する研究

NoV は非細菌性食中毒の主要な原因であると考えられているが、その病原性発現機構については調べられていない。NoV 蛋白質が真核生物の細胞に与える影響を調べるため ORF1, ORF2, ORF3 を、それぞれ発現する3種類の組換えバキュロウイルスを作製し、これらの感染が昆虫細胞に与える影響を調べた。感染細胞における細胞の成長速度、アポトーシスには違いが認められなかったが、ORF1 発現細胞のネクローシス誘導は他に比べ有意に高かった。ORF1 に細胞毒性のある因子が存在することが示唆された。

[林 薫、松原尚子、白土東子、片山和彦、宮村達男、武田直和]

(7) NoV の分子系統解析

NoV のゲノム全塩基配列の分子遺伝学的解析により、構造蛋白質領域の約 250 塩基の遺伝子配列を用いた NoV のタイピング法を構築した。NoV には、2003 年現在、GI に 14 種類、GII に 17 種類の Genotype(遺伝

子型)が存在する。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、分子系統解析のガイドムービー、データファイルを公開し配布するとともに、NoV データベースの構築を進めている。
[片山和彦、名取克郎、影山 努(BML)、宮村達男、武田直和]

(8)NoV 複製機構の研究

NoV 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。NoV 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、NoV ゲノム全長を組み込んだプラスミドクローンを作製しヒト培養細胞内に導入した。同時に組換えワクチニアウイルスの共感染によりT7 RNA ポリメラーゼを細胞内で発現させ、5'末端がキャッピングされたNoV ゲノム RNA を大量に細胞内に供給した。ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が転写翻訳され、(+)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。しかし、この系では 3A-VPg 蛋白質の切断が不完全で、合成されたサブゲノム RNA から翻訳されると推定されている構造蛋白質が翻訳されず、NoV の粒子形成ができないことが明らかになった。
[片山和彦、岡智一郎、小嶋慈之(BML)、宮村達男、武田直和]

(9)NoV VLP の発現と血清学的解析

昨年度に VLP が発現できたアルファトロン株の分類上の位置付けは、遺伝学的にも血清学的にも GII に分類されることが妥当と考えられた。本年度は新たに GI に属す1株、GII の2株で VLP 発現に成功し、現在所有する VLP 発現ができた株の総計は GI で 6株、GII で 22 株となった。これらの株の遺伝学的および血清学的分類結果は完全に一致し、GI は14のうちの6遺伝子型で、GII では17のうちの13遺伝子型で NoV VLP 抗原および抗血清が作製できたことになる。また抗原、抗血清の分与体制も整い、国内の NoV の血清診断や血清疫学研究に使われている。
[名取克郎、片山和彦、小林慎一(愛知衛研)、Grant Hansman(東大大学院)、永田典代、田中恵子(感染病理部)、宮村達男、武田直和]

2. サポウイルス(SaV)に関する研究

(1)SaV ORF1 のプロセッシング産物の同定と切断地図の作製

SaV Mc10 株のORF1 のプロセッシング産物を同定するため、in vitro で^{35}S標識ORF1 タンパク質を発現させ、部位特異抗体を用いた免疫沈降法で各切断産物を同定した。その結果、SaV Mc10 ORF1 の切断地図が NH_2-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOHであることを明らかにした。また、プロテアーゼのGDCG モチーフに変異を導入した結果、ORF1 のプロセッシングは全く観察されず、SaV ORF1 のプロセッシングが自己のプロテアーゼによって行なわれることも明らかになった。
[岡智一郎、小川智子、Grant Hansman(東大大学院)、影山 努(BML)、片山和彦、武田直和、宮村達男]

(2)SaV 遺伝子の解析

SaV の全塩基配列はデータベース上にわずか3株しか報告されておらず、現状では SaV 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 10 株の SaV 全塩基配列を決定し、解析を行った。データベース上の配列を含め SaV は GI, GII, GIII, GIV, GV の5つのグループに分別できることが明らかになった。さらに、各グループはそれぞれ幾つかの遺伝子型に分別可能であることが明らかになった。GII-c に分別された SakaiC12 株にはゲノムの組換えが認められた。組換えの基点は SaV ゲノムで最も高度に保存された 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。SaV でも NoV と同様ゲノムの組換えが起きていることが明らかになった。
[片山和彦、Grant Hansman(東大大学院)、岡智一郎、田中智之(堺市衛研)、宮村達男、武田直和]

(3)SaV VLP の作出

SaV の遺伝子解析の進展に伴い、SaV でも NoV 同様複数の Genogroup (遺伝子群)とそれらに内包された遺伝子型の存在が示された。SaV の遺伝子群 GI に属する Mc114 株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、幾つかの欠失変異体を作製して、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。さらに GII に属する SakaiC12 株、GV に属する NK24 株を用いて VLP を作出することに成功した。Mc114 株の VLP は、クライオ電子顕微鏡観察を用いて粒子構造を詳細に解析する予定である。
[Grant Hansman(東大大学院)、片山和彦、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)]

(4)SaV VLP を用いた抗原 ELISA システムの構築

作出に成功した3種類の遺伝子群の VLP のうち、GI の Mc114 株、GV の NK24 株の VLP は、ウサギ及びモルモットの免疫に十分な発現量が得られた。まず GI の VLP を抗原としてウサギおよびモルモットに免疫し、抗体を作出した。GI 抗体は GI VLP のみを特異的に認識し、GV VLP には反応しなかった。SaV は、遺伝子群が異なると互いに異なる抗原性を有することが示唆された。GI の抗体を用いてサンドイッチ ELISA による SaV 抗原検出システムを構築し、下痢症患者糞便検体を用いた検討を行った。本検出系は NoV、ロタウイルス、エンテロウイルスなどには全く反応せず、RT-PCR で GI の SaV 陽性を呈した検体のみを検出可能であった。今後、GV の抗体をテストするとともに、GII, GIII, GIV の VLP 作出と抗体の作製を試みる予定である。
[Grant Hansman(東大大学院)、名取克郎、片山和彦、永田典代、田中恵

子(感染病理部)、宮村達男、武田直和]

(5)SaV と血液型物質との結合の解析

SaV のレセプター分子は明らかにされておらず、血液型物質との結合についても報告がない。そこで、SaV GI の VLP を用い、Saliva-VLP binding assay により血液型物質との結合パターンを検討した。その結果、SaV は全く唾液に結合しないことが明らかになった。カリシウイルス科 Lagovirus 属のウサギ出血病ウイルスは H 型物質に結合することが知られている。また、NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株も H 型物質を認識する。しかし、SaV は血液型物質に結合しない可能性があり、カリシウイルス科に共通の特徴ではないことが示唆された。血液型物質がカリシウイルスの単なる結合因子として働いているのか、侵入にも関与するレセプターであるのかさらなる検討が必要である。

[白土東子、名取克郎、Grant Hansman(東大大学院)、武田直和、宮村達男]

3. その他の研究

(1)排水処理施設の小型球形ウイルス UV 不活化の条件検討

排水処理施設の消毒は従来下水中の細菌類の不活化が中心であり、小型球形ウイルスを含めたウイルス対策は技術的な検討がなされてきていない。そこで、培養可能なアストロウイルスを用いて紫外線照射量および照射実験条件を検討した。時計皿に 10^6PFU/mlのアストロウイルス 2 型を入れ、上部より紫外線ランプを照射し不活化する。紫外線の照度は事前に照度計により測定し、照射量はシャッターの開閉により照射時間を変えた。予備実験で、従来報告されている腸管系ウイルスより高い紫外線照射量(60mJ/cm2)で不活化された。

[宇田川悦子]

(2) 電子顕微鏡によるウイルス診断の世界レベルでの品質評価研究
(External Quality Assessment of EM Virus Diagnostics: EQA-EMV13)

昨年に引き続き、本研究所を含む世界各国【26カ国93施設(独;39、EU内;32、極東 EU;4 とその他 18)】に対し不活化標準ウイルスが頒布された。我々はその検体について電子顕微鏡観察でウイルスの確定診断を行い研究班へ報告した。結果として、分与された 6 検体中 5 検体の結果が一致したが、残る 1 検体は検体送付中の影響によると考えられるウイルス粒子の破壊が著しく、観察不能であった。総ての結果は他の研究所の結果と良く一致した。

[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管し、要望に応じて地研等に配布した。2003 年は、エンテロウイルス標準株 10 株、ポリオウイルス標準株 2 セット、エンテロウイルス抗血清 77 種類、プール抗血清 EP95 を 26 セット、コクサッキーA 群同定用 CF 腹水 2 セット、ポリオウイルス標準抗血清 2 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検査を行政検査として行った。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(JICA)の開催

第 13 回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。研修期間は 2004 年 2 月 16 日ー3 月 5 日、研修参加者は、アルジェリア、バングラディシュ、ケニア、ミャンマー、タイ、ザンビアから各 1 名、タンザニアおよびエチオピアからそれぞれ2名の計 10 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 (GSL)としての活動

i) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。AFP 由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

ii) WHO GSL として、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム・韓国、香港等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。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。

iii) 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(cVDPV)であることを明らかにし、病原性等詳細なウイルス学的性状について、他の地域で分離された cVDPV との比較を行った。

iv) 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。特に遺伝子解析による非ポリオエンテロウイルスの実験室診断法についての研究を行った。

v) 2003 年 9 月 3−9 月 10 日に行われた WHO ワクチン由来株に関する専門家会議および Global Polio LabNet 会議に参加した。[清水博之]

vi) 2003 年 11 月 17−11 月 18 日に行われた WHO による中国国家ラボレビューに参加した。[清水博之]

vii) 2003 年 11 月 30−12 月 6 日に行われた WHO 細胞培養ワークショップに講師として参加した[清水博之]

viii) 2003 年 12 月 18−19 日に実施したモンゴル国家ラボレビューに

参加した。[吉田 弘]

ix) 2004年4月22−23日に実施したポリオ実験室GSL代表者会議に参加した。[清水博之]

x) 2004年7月に実施したCCDC/JICA/WHO共催中国ポリオラボ新人研修会に参加した。[有田峰太郎、吉田 弘]

2. 西太平洋地域の2003年のウイルス分離

2003年にラオス、カンボジアから送付されたAFP症例234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。6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59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あるいは塩基配列解析を行なった。
[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、和田純子、宮村達男]

3. JICA中国EPIプロジェクトへの協力

(1)2003年8−9月に実施した省級ラボレビュー(甘粛、黒龍江、青海、湖北、江蘇、新疆、広西、江西)に参加した。
[宮村達男、吉倉 廣、吉田 弘、有田峰太郎、清水博之]

(2)2003年8−9月に実施したWHO/JICA/CCDC中国ポリオ実験室トレーニングコースに講師として参加した。
[吉田 弘、有田峰太郎、清水博之]

(3)2004年3月に開催された中国ポリオラボネットワーク会議に出席するとともに省級ラボレビュー(上海、重慶、雲南)に参加した。
[吉田 弘]

4. 根絶計画にかかるポリオウイルスの研究

(1)2002−2003年富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測

富山県では過去3回河川水のウイルス汚染調査を行ってきた。第4回目は02-03年に実施した。河川定点から採水後濃縮処理し、ウイルス分離を行った。調査期間中E4,7,11,13,CB2,3,4型、ポリオウイルス2型、Reo1,2型が分離された。ポリオ2型は11月に採取した河川水から1定点で分離され、ITDの結果ワクチン由来のウイルスだった。E11、13型は、全国的に2002年夏に無菌性髄膜炎等の患者からよく検出されており、富山県においても河川水調査の結果と相関している。過去の結果と第4回目の調査結果を比較すると、検出されるウイルスの種類や頻度は少なくなっている。ポリオウイルスに関しては、第1-2回の調査ではポリオ生ワクチン投与時期に必ず分離されていたが、最近の調査では検出数が少なくなっている。これは、第1回調査時1979年頃の富山県における下水道普及率は約30%で生活排水のほとんどが河川に流入している状態であったが、その後下水道普及率が上昇(2002年63.1%)したことによると考えられる。
[岩井雅恵、松浦久美子(富山県衛生研究所)、吉田 弘]

(2)カンボジアにおけるAFP症例から分離されたC群エンテロウイルスの解析

昨年度、カンボジアにおけるAFP症例から新たなポリオウイルス組換え体が分離された。今年度は、カンボジアにおけるAFP症例から分離されたC群エンテロウイルスの解析を行い、ポリオウイルス組換え体のゲノム中の未知の配列を与えた親株のウイルスの同定を試みた。その結果、2ABC領域はカンボジアのCAV17株に近縁であり、3D領域はカンボジアのCAV18株に近縁であることが明らかとなった。これらの配列は、プロトタイプのCAV17もしくはCAV18とは異なっていた。これらのことから、分離されたポリオウイルス組換え体ゲノムの未知の配列は、カンボジアで蔓延しているC群エンテロウイルスに由来するものであることが強く示唆された。
[有田峰太郎、祝双利、吉田 弘、清水博之、米山徹夫、宮村達男]

(3)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。環境中サーベイランスからはOPVが継続して分離されたが、他のサーベイランス由来のOPVは、IPV導入後比較的速やかに検出されなくなった。分離ポリオウイルスの遺伝子解析により、OPV使用国からの輸入ウイルスであることが示唆された。OPV接種停止後は、出来るだけ複数のサーベイランスによりポリオ伝播の停止を確認する必要があることが示された。
[Sue Huang (IESR, New Zealand)、清水博之、宮村達男、Mark Pallansch (CDC)]

(4)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2年以上伝播していた可能性が高い。cVDPVは、親株であるSabin 1株と比較すると、病原性復帰に関わると考えられる多くの塩基およびアミノ酸置換が認められた。その結果、AFP由来のcVDPV 3株は、温度感受性および神経毒力の復帰が認められた。一方、接触者由来株は他の株と共通した塩基置換が認められるのにもかかわらず、ポリオウイルス強毒株の性状を示さなかった。

［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)、Mark Pallansch、Olen Kew (CDC) ］

(5)1型ワクチン由来ポリオウイルスの病原性および伝播能の解析

フィリピンおよびヒスパニオーラで分離された1型cVDPVの多くは、ポリオレセプター発現トランスジェニックマウス(TgPVR)に脳内接種した場合、野生株と同等の神経毒力を示し、Sabin 1株からの顕著な毒性復帰が認められる。Sabin 1とcVDPVのin vivoにおける病原性および伝播能の違いをより詳細に検討するために、経鼻接種による神経病原性の発現および便中に排泄されるウイルス量の比較解析を行った。経鼻接種による生死および麻痺の発現による比較では、cVDPV は概ね強毒株であるMahoney株と同等の病原性を有していた。便中へのウイルス排泄もSabin 1 と比較すると顕著に増加しており、伝播能においても野生型と同等の性状を有することが示された。

［清水博之、Andi Utama、西村順裕、宮村達男、永田典代(感染病理部)、岩崎琢也(長崎大学)］

(6)ポリオウイルスと近縁なコクサッキーA群ウイルス(CAV)の同定

ワクチン由来ポリオウイルスの伝播過程で、自然界に伝播しているエンテロウイルスと組換えを起こし、病原性・伝播力を再獲得することによりポリオ流行を起こす可能性が指摘されている。ポリオと分子系統学的に近縁なウイルスを同定するため、CAV標準株の塩基配列を解析し、CA-11, 15, 17, 20 はポリオウイルスと相同性が高い領域を非構造蛋白質領域全域に、CA-13,18 等は、P3領域に有することを確認した。

［Andi Utama、清水博之、宮村達男］

(7)ヨーロッパで分離されたVDPVの病原性の解析

ヨーロッパで分離された疫学的背景が不明な VDPV について遺伝子解析および神経病原性の解析を行った。2002 年にエストニアで下水から分離された3型ポリオウイルス Est02/252 は、VP1 領域の塩基配列において、親株であるSabin 3と比較して、13%の変異が認められ孤発例由来 VDPV と同定された。TgPVR 脳内接種による神経病原性の比較解析によると強毒型Leon株と同等以上の強い病原性復帰が認められた。スロバキアの環境サーベイランスから分離された一連の2型VDPVは、塩基配列解析から持続感染者由来であることが強く示唆された。そのうちの 2株について神経毒力の解析を行ったところ、Sabin 2 株と比較すると病原性復帰が認められたものの、2型野生株(MEF-1株)との比較では低い病原性を示した。野生株ポリオ根絶および OPV 接種停止を念頭においた精度の高いサーベイランスにより、多様な性状を有する VDPV が分離されることが明らかとなった。

［清水博之、Andi Utama、宮村達男、Merja Roivainen、Tapani Hovi (KTL, Finland)］

(8)中国江蘇省の1型ポリオ分離株の解析

1996-1998年に中国江蘇省においてAFP患者から分離された1型ポリオウイルスは、VP1領域の塩基配列がSabin 1株と大きく異なることから、cVDPVである可能性が認められた。より詳細なゲノム塩基配列の解析の結果、非構造蛋白質領域においてもSabin 1株との相同性が低いことが明らかとなった。しかし、VP1 領域の塩基配列が 1 型野生型標準株であるBrunhilde株と高い相同性を示したため、他のゲノム領域についての塩基配列の比較を行った。その結果、江蘇省の 1 型ポリオウイルスはBrunhilde 標準株に由来することが確認された。どのような経緯で標準株が分離同定されたかは、今のところ不明であるが、野生株標準株の実験室封じ込めには、今後特に留意する必要がある。

［Chen Li、Hou Xiaohui、Xu Wenbo (中国疾病予防センター)、清水博之、宮村達男］

5. ポリオウイルスに関する基礎研究

(1)ポリオウイルスの神経毒性発現の解析

ポリオウイルスのワクチン株は、神経細胞特異的にウイルスタンパク合成が低下しているために、弱い神経毒力を示すと考えられてきた。本研究では、ポリオウイルスのタンパク合成を低下させた一連の変異株を作製し、Tg21PVR マウスを用いて神経毒力を測定した。その結果、親株のタンパク合成の28%のタンパク合成を持つ変異株は強い神経毒力を維持しており、17%のタンパク合成能を持つ変異株でもわずかに神経毒力の低下が認められるのみであった。この変異株は、脳から脊髄への感染経路では低下したタンパク合成のためにウイルスの複製が不安定であったが、脊髄内では安定に増殖できることが見出された。このことは、ポリオウイルスワクチン株の弱毒化においてはウイルスタンパク合成の低下は主要な機構ではないこと、また脊髄組織には、タンパク合成もしくは他の段階で、ウイルスの複製を促進する機構があることを強く示唆する。

［有田峰太郎、清水博之、宮村達男］

(2)ポリオウイルスタンパク質2C、2BCと相互作用する宿主因子の探索

ポリオウイルスの複製は感染細胞に特異的に形成される滑面小胞上で行われる。これまでに、この滑面小胞の形成にはポリオウイルスタンパク質2Cもしくはその前駆体である2BCが関与することが報告されている。この滑面小胞の生成機序に関して手がかりを得るため、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーを対象に、酵母ツーハイブリッド法(split-ubiqutin system)を用いて、ポリオウイルスタンパク質 2C、2BC と相互作用する宿主因子の探索を試みた。

［岡智一郎、片山和彦、武田直和、宮村達男］

6. ポリオワクチンに関する研究

(1)Sabin-IPV の抗原性に関する研究

日本ポリオ研究所が開発した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)は、現在実用化へ向けての研究が進められている。ホルマリン不活化工程でエピトープ構造の変化について、抗原認識部位特異的モノクローナル抗体(MAb)を用いた ELISA 法および中和試験により調べた。Sabin 1 および Sabin 2 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が、全体的には大きな抗原性変化は認められなかった。Sabin 3 では site-1 および site-3 の抗原認識部位がホルマリン不活化によって変化した。ホルマリン処理過程での部分的抗原性の変化は認められたものの、Sabin-IPV の全体的な中和抗原性には大きな影響はないことが示唆された。

[田野良夫(日本ポリオ研)、清水博之、宮村達男、Javier Martin(NIBSC)]

(2)ポリオワクチン接種状況

全国 1347 カ所の市区町村に調査依頼し、2003 年秋のワクチン接種状況をアンケート調査した。平成 15 年度に満3歳に達した小児におけるポリオ生ワクチン1回目の累積摂種率は 92.5%、2回目のそれは 88.8%という高い値であった。

[宮村達男、高山直秀(都立駒込病院)、加藤達夫(聖マリアンナ医大)]

7. ポリオワクチンの品質管理に関する研究

(1) 国内標準抗血清の整備

これまでに国立感染症研究所で作製されてきた型特異的標準サル血清を整理し、冷凍保管した。1、2、3 型凍結乾燥品のそれぞれの本数は 222 本、499 本、631 本である。1ml に溶解したときの抗体価はそれぞれ 900、4500、3000 単位であった。経口生ワクチン、不活化ワクチン両方の検定検査に有用な資源である。

[小西恭子、武田直和、宮村達男]

8. 非ポリオエンテロウイルスに関する研究

(1)1999-2003 年に分離されたエコーウイルス 30 型の分子系統解析

日本において 1982-98 年に分離された E30 は大まかに 2 つのゲノタイプが存在していた。98 年以降分離された株を解析することにより、次の流行株のゲノタイプおよび抗原変異を予測することを目的とした。99-03 年に岡山、新潟、広島で主に無菌性髄膜炎患者より分離、同定された 35 株の E30 について VP1 の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。また抗血清を用いて分離株に対する中和反応性を調べた。その結果 99-03 年期の分離株は従来から存在していたゲノタイプ以外のクラスターを形成するタイプも見出された。このグループは過去の分離株と塩基レベルで約19%(アミノ酸で約5%)異なっていた。標準抗血清とはやや難中和であるが、過去の分離株で作成した抗血清とは易中和性を示しており大きな抗原変異は起こっていないと考えられた。E30 の流行が約 7-8 年おきであることを考えると、前回97-98 年期の流行から7年経過しており、04-05 年は E30 の流行に対し監視を強めておく必要がある。

[吉田 弘, 椋 清美, 濱野雅子(岡山県環境保健センター), 渡辺香奈子(新潟県保環研), 高尾信一(広島県保健環境センター), 清水博之, 宮村達男]

(2)培養細胞に馴化したエンテロウイルス 71(EV71)の解析

培養細胞における EV71 分離株の増殖は、同じエンテロウイルス属のポリオウイルスと比べ、著しく遅くかつウイルスの力価も低い。そこで、培養細胞における増殖速度もしくはウイルス力価を決定している因子を同定することを目的に、EV71 の標準株である BrCr 株を Hep-2c 細胞に馴化することを試みた。その結果、Hep-2c 細胞に馴化した EV71 変異株を分離し、ウイルスゲノム上にいくつかの変異を見いだすことに成功した。今後、これらの変異株を用いて、マウス細胞に馴化した変異株を分離する予定である。

[有田峰太郎、清水博之、宮村達男]

(3)EV71 特異的レセプターの探索

当室にて EV71 粒子に特異的なモノクローナル抗体が作製された。そのモノクローナル抗体を用いて, EV71 結合レセプターの同定を試みている。その手順は以下の4ステップである。1)エンテロウイルス非感受性細胞に、感受性細胞由来ライブラリーを発現。2)抗EV71 抗体を介して、EV71 粒子をシャーレに固定。3)1)のライブラリー発現細胞を2)のプレートでパンニング。4)プレートに残った細胞から cDNA を単離・同定。現在, 各種細胞の EV71 感受性について解析している。

[西村順裕、有田峰太郎、清水博之、宮村達男]

(4)EV71 の神経毒性の発現機序の研究

EV71 は、中枢神経合併症を引き起こす頻度が高い非ポリオエンテロウイルスとして知られている。近年、東アジアで死亡例を含む手足口病重症例が多発し、EV71 の中枢神経感染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我々が確立したカニクイザル感染モデルを用いて EV71 の神経病原性を解析した。EV71 標準株とポリオウイルス1型強毒株(PV1)感染カニクイザルは、いずれも、中枢神経症状の発現が認められた。PV1 感染は弛緩性麻痺が中心で、EV71 感染サルは、より多様な神経症状を呈し、ヒト EV71 感染における臨床症状との類似が認められた。中枢神経における病変およびウイルス増殖部位の比較解析により、EV71 感染サルでは、PV1 感染サルと比較して運動神経への局在化が弱い傾向が認められた。

[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)]

(5)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。この地域では近年genogroup BおよびCのEV71が同時に伝播しており、マレーシア、台湾、日本を含めた多くの地域で、2種類の genogroup が混在している。それぞれの genogroup をより詳細に分類した subgenogroup の分布によると、1990年代後半以降、genogroup B3 および B4、また、genogroup C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されている。1997年のマレーシア、および1998年の台湾におけるEV71脳炎をともなう手足口病流行においては、それぞれ、genogroup B3 および genogroup C2 が主要な流行株であった。日本では、1970年代から2000年代にかけて、genogroup C3を除く、ほぼすべてのgenogroupのEV71が分離されているが、最近多く分離される遺伝子型は、genogroup B4 および genogroup C2 である。東アジア地域では、多様な遺伝子型を有し、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。他のエンテロウイルスと同様、EV71においても地域固有のウイルス伝播は例外で、広範囲な多くの地域間で頻繁にウイルス伝播が起きていることが示唆される。

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

(6)HEV-A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同定不能な非ポリオエンテロウイルスの遺伝子解析を行ったところ、カプシド領域の分子系統解析により、4 株のエンテロウイルスが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。これらのエンテロウイルスは、species Human enterovirus A (HEV-A)に分類されるが、既知のヒト由来の HEV-A との相同性は比較的低く、むしろ HEV-A に属する一部のサルエンテロウイルスとの関連性が認められた。このうち 1株の全塩基配列解析を行ったところ、非構造蛋白質領域においても既知のHEV-Aと独立したクラスターに属するユニークな新規エンテロウイルスであることが明らかとなった。

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

(7)オランダで同定されたEV90とカンボジアで分離された新規エンテロウイルスとの分子疫学的相同性の解析

前項で示したカンボジアの AFP 由来の新規エンテロウイルスは、オランダのHIV-1陽性者糞便検体から、培養細胞によるウイルス分離を経ずに直接RT-PCRにより検出同定された新規エンテロウイルスとVP1領域の塩基配列において高い相同性を示した。カンボジアおよびオランダの新規エンテロウイルスは、分子系統解析により同一の genotype に属することが明らかとなり、暫定的にエンテロウイルス90 (EV90) と命名された。代表的な 2 株は、5'UTR、カプシド、非構造蛋白質等すべてのゲノム領域において高い相同性を示し、HEV-A に属する新たなヒトエンテロウイルスであることが確認された。EV90の5'UTRは、既知のHEV-A株と異なる系統関係を示し、HEV-C および HEV-D と高い相同性を有していた。

[陳 立、清水博之、Andi Utama、宮村達男、Peter van den Broek (Primagen Holding)]

Ⅲ. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A型肝炎ウイルスに関する研究

(1)抗イディオタイプ抗体をプローブとしたHAV表面構造の解析

抗 HAV 単クローン抗体(Ab1)KF94 を免疫して抗イディオタイプ抗体(Ab2)94-2と94-7を作製した。いずれのAb2もKF94とHAVの結合を阻害した。94-7はGL37細胞へのHAVの感染を阻害したことなどからHAV のレセプター結合部位を模倣した構造を持つと推察された。一方の94-2は感染阻害には関与しないことからHAVの抗体結合部位を模倣していると考えられた。Ab2:94-2と94-7の交差反応から抗体結合部位とレセプター結合部位が独立した構造で、ウイルス表面に並ぶような形で近接していることがわかった。

[清原知子、戸塚敦子]

(2)合成siRNAによるA型肝炎ウイルスの増殖抑制

HAV、KRM003 株のゲノム全体の塩基配列から小分子干渉RNA(siRNA)の候補部位を10箇所余り選び、siRNA を合成した。Lipofectamine2000 とともにアフリカミドルザルの株化腎細胞 GL37 にトランスフェクションし、HAVの感染価を比べてsiRNAの効果を検討した。、5'と3'の非翻訳領域の塩基配列から作成したものは増殖効果が殆どなかったが、VP3 領域から選んだ siRNA は非常に効果的にウイルスの増殖を抑制した。siRNAの効果がHAVの配列特異的であることは、遺伝子型の違う株やミスマッチをいれた siRNA などの実験から明らかであった。

[米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子]

(3)A型肝炎ウイルス培養細胞馴化株の遺伝子解析

同一の野生株からAGMK細胞およびHEL細胞で独立に分離継代した遺伝子ⅢB型HAV株6種類の全遺伝子を解析して、野生株からの置換部位を同定し、ⅠA、ⅠB 遺伝子型の培養細胞馴化株で報告されている遺伝子置換と比較検討した。もっとも馴化に関係しているとされており、ウイルスRNA複製に関与している非構造蛋白2B、2C、3Aに、ⅢB型馴化株では4から8個のアミノ酸置換が認められた。株固有のアミノ酸置換が半数以上を占めたが、2Bの216と226、3Aの5と65、3Cの142など

多くの馴化株で共通したアミノ酸置換部位も存在した。
［戸塚敦子、吉井孝男(ウイルス第三部)、米山徹夫］

(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用細胞GL37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、細胞を無血清で培養する手法の確立を目指している。これまでの研究よりGL37、更にGL37内でHAVは無血清培地VP-SFMで増殖可能であることを明らかとした。しかし、その増殖はこれまで用いてきた10% FBS入りMEM培地の場合に比べ悪い。本年度はコラーゲン処理プレートを用いることでVP-SFM培地でGL37細胞の増殖をこれまで用いたプレートの場合より約13%良くすることが出来た。今後、VP-SFM培地に欠ける細胞増殖に必要な因子を探索することや、3次元培養法を用いることを検討したい。
［下池貴志］

(5)HAV粒子構造の解析
HAV粒子は結晶化出来ないため、その構造は未だに明らかにされてない。そこで我々はアフリカミドリザル腎臓由来細胞GL37を用いてHAVを大量に増殖させ、この細胞内のHAVをショ糖密度勾配遠心分離法などを用いて高度に精製し、低温電子顕微鏡法を用いて、精製HAV粒子の立体構造を世界にさきがけ決定した。更に、中和抗体と結合したHAV粒子構造を決定し、この抗体との結合部位を同定した。これらの結果より、HAVは同じピコルナウイルス科のウイルスとは構造的にも違いが大きいことが明らかとなった。現在HAV粒子構造を更に詳しく解析中である。
［戸塚敦子、清原知子、米山徹夫、下池貴志、宮村達男、Li Xing、Holland Cheng(Karolinska Institute)］

2. B型肝炎ウイルスに関する研究

(1)国際参照沈降B型肝炎ワクチン(International Reference Reagent for adsorbed Hepatitis B Vaccine)を用いたB型肝炎ワクチンの力価試験法の検討
国際参照沈降B型肝炎ワクチンの*in vivo*試験、*in vitro*試験を行った。また、総タンパク量を測定し、推定抗原回収率(*in vitro*抗原量／総タンパク量X100)を算出した。国際参照沈降B型肝炎ワクチンの推定抗原回収率は104.1%、国内参照沈降B型肝炎ワクチンの推定抗原回収率は36.4%であった。推定抗原回収率は製造法に寄って異なるが、同一製造法のワクチンの抗原回収率は一定していた。また、*in vitro*力価と*in vivo*力価の再現性もそれぞれ確認された。現在は国内で流通しているワクチンを使った抗原回収率の比較、*in vitro*試験の検討を行っている。
［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)ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB) 三次元培養肝細胞を利用したHCV感染モデルにおけるvirus quasispeciesのダイナミクス
6種類のC型肝炎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。2回の独立した実験から、感染後、第3ー33日間に3回のピークを示す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5'-UTRおよびHVRについて決定した結果、感染時に10数種類認められたウイルスクローンが、感染後3日目以降、2種類の株に選択されることがわかった。
［井上 寧、村上恭子、Su Su Hmwe、小俣和彦、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男］

(2)RFB／HCV感染系による抗ウイルス薬の評価
RFBを用いたヒト肝細胞三次元培養系はHCVの感染からウイルス複製までの観察が可能である。この系を用いた抗HCV薬の評価法を確立するため、抗HCV効果が広く知られているinterferon(IFN)を用いて検討した。患者血清感染直後から、100 IU/mlのIFN-aを1ヶ月間添加した場合、無添加と比較して明らかに培養上清中のHCV-RNA量は減少していた。この時、明らかな肝機能への影響は認められなかった。今後、リバビリン等を用いてさらなる検討を行う予定である。
［村上恭子、井上 寧、小俣和彦、Su Su Hmwe、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男］

(3)RFBによるHCVレプリコン細胞三次元培養系でのHCV粒子作製
HCV全蛋白を発現し、HCV-RNA複製が確認されているHCVレプリコン細胞(RCYM1)をRFBにて培養し、上清中のHCV遺伝子産物を解析した。濃縮した培養上清をショ糖密度勾配遠心で分画したところ、コア蛋白及びHCV-RNAは1.18 g/ml画分をピークとして1.15-1.2 g/mlに検出された。また、NP40処理によりHCV-RNAのピークは1.23 g/mlにシフトした。1.18 g/mlの画分中には電子顕微鏡により30-60 nmのHCV様粒子が観察された。
［村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男］

(4)新規三次元培養システムによるHCV粒子作製
RFBを用いた三次元培養により、RCYM1細胞培養上清からHCV様粒子が検出された。より簡便な三次元培養システムであるMebiolGel(後述)を用いて、同様に培養上清からHCV様粒子が観察されるかを検討した。培養上清を濃縮し、ショ糖密度勾配遠心で分画したところコア蛋白およびHCV-RNAは1.18 g/mlをピークとして検出され、電子顕微鏡により30-60nmの粒子様構造物が観察された。免疫電顕により、この構造物は抗エンベロープ抗体に反応することが確認された。

［村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、*田中恵子、相崎英樹、*佐多徹太郎、勝二郁夫、宮村達男、鈴木哲朗、(*感染病理部)］

(5)HCV レプリコン細胞からの複製複合体の調製:detergent 処理条件の検討

HCV 非構造蛋白と宿主因子からなる HCV ゲノム複製複合体は、lipid rafts や caveolae など detergent resistant membrane に内包されていると考えられている。複製複合体の調製法を改良するため detergent 処理の条件および効果を調べた。その結果、4% Triton X- 100 処理より 0.5% Brij 96 処理の方が、蛋白の選択性は高いものの、ウイルス複製に関わる特に親水性の因子が除かれている可能性が考えられ、また detergent 処理しない場合に比べ精製度の再現性に欠ける傾向が認められた。

［井上 寧、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗］

(6)プロテオーム解析による HCV 複製関連因子の検索

HCV ゲノム複製機構を明らかにするため、RC-YM1 細胞から lipid rafts/caveolae 分画を粗精製し性状解析を行った。また、HCV ゲノム複製と細胞増殖との相関を調べ、細胞が対数増殖期にあるとき複製活性が高いことを見出した。これらの知見を基に、HCV ゲノム複製を調節する宿主因子を同定するため、対数増殖期及び定常期の RC-YM1 細胞からそれぞれ複製複合体を分離し二次元電気泳動により各蛋白の量的比較を行い、約 10 種類の蛋白スポットに有意差を認めた。

［井上 寧、村上恭子、松田麻未、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗］

(7)Huh7 細胞サブクローン間の HCV RNA 複製効率の検討

サブクローン化しておいた各 Huh7 細胞株に RNA レプリコンを導入し 2 週間後に細胞内 HCV-RNA を定量したところ、サブクローン間で RNA 量が最大 50 倍程度異なることを見出した。サブクローン間での複製効率の違いをさらに詳しく解析するため、各レプリコン導入細胞を G418 選択しコロニー形成能を比較したが、Huh7 サブクローン間で、コロニー形成能に有意な差は認められなかった。各群から約 20 コロニー選択し HCV-RNA 量を測定したところ、同一の親株から得られたコロニーにおいても最大 103 コピー程度のばらつきがコロニー間で存在することが判明した。

［井上 寧、村上恭子、宮村達男、鈴木哲朗］

(8)HCV 複製に関連する宿主因子の解析:Toll-like receptor (TLR) 3 mRNA 定量法の開発

自然免疫の担い手である TLR family のうち、TLR3 は二本鎖 RNA を認識し、IRF3 を介して IFN を誘導することにより、ウイルス排除に関わっている。細胞間での HCV 複製効率の違いが TLR3 発現と関連する可能性を考え、TLR3 mRNA の定量法を開発した。HCV RNA 複製活性が認められる Huh7 細胞は、複製活性の低い HepG2 系細胞に比べ TLR3 発現は低かった。Huh7 細胞サブクローン間では、poly I:C および IFN で刺激しても TLR3 発現に有意な差は認められなかった。

［井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗］

(9)HCV genotype 2b 型レプリコン維持細胞の解析

現在報告されている HCV レプリコンの大部分は genotype 1b 由来であり、他には genotype 1a、2a について報告されている。そこで、IFN 感受性の異なる genotype 2b 由来のレプリコンを作製し、Huh7 細胞に導入して維持細胞株を樹立した。HCV 遺伝子の adapted mutation の存在を検討するため、非構造蛋白領域の塩基配列を部分的に検討したところ、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異が数カ所観察された。これらには、genotype 1b レプリコンについて報告されている変異は含まれていなかった。

［江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男］

(10)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 HCV 5' 非翻訳領域(5' UTR)内の stem-loop IIId 領域に HCV コア蛋白質が相互作用し 5' UTR 依存的翻訳を抑制することを見出した。更に stem-loop IIId の loop 領域の構造がこの翻訳抑制に重要であることを示唆する結果を得ている。昨年に引き続き、翻訳抑制に重要なコア蛋白質領域を調べた結果、コア蛋白質の N 末端 24-58 番目の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 35 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、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、(†阪大微研)］

(11)HCV IRES IIId 領域に結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白は、HCV IRES 依存的翻訳を抑制することが報告されている。この翻訳抑制の機序として、HCV 翻訳を調節する宿主因子とコア蛋白との拮抗作用による翻訳抑制の可能性が考えられる。そこで、IRES IIId 領域特異的に結合する宿主因子を検索したところ、RNA プロセシングに関わる p54-nrb、hnRNP-H、PSF 等が同定された。このうち、p54-nrb はコア蛋白存在下で IIId 領域への結合が促進されることを確認した。また、免疫沈降法により、コア蛋白と p54-nrb の結合が示唆された。

［村上恭子、下池貴志、松田麻未、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男］

(12)HCV 様粒子の作成

種々の HCV 遺伝子の構造蛋白質領域(C-E1-E2-p7)を哺乳動物細胞で発現させ、その培養上清からショ糖密度勾配遠心法により HCV 様粒子(HCV-LP)の精製を行なった。密度が約 1.18-1.2 g/ml のフラクションにコア蛋白質のピークが存在した。この密度に収束したサンプルについて、電子顕微鏡による観察を行っている。

［鈴木亮介、*田中恵子、鈴木哲朗、宮村達男(*感染病理部)］

(13)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 コア蛋白質からなるヌクレオキャプシドの形成機構は明らかにされていない。コア蛋白遺伝子(genotype 1b)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コア蛋白質のピークが検出された1.2 g/ml分画をネガティブ染色し電子顕微鏡観察したところ、直径約30ム40 nmの粒子構造が観察された。また、この粒子構造は免疫電子顕微鏡観察からコア粒子であることが明らかとなった。現在コア蛋白質とRNAとの結合がウイルスの粒子形成に及ぼす影響について検討している。
[坂本真一郎、白木和子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(14)HCVコア蛋白質の細胞内局在化機構の解析

HCV コア蛋白発現細胞の細胞分画/ウエスタンブロット法及び免疫電子顕微鏡観察により、コア蛋白質が、小胞体、ミトコンドリア及び核に存在することを確認した。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、小胞体およびミトコンドリアへの局在にはaa 112-152 領域が、核への局在にはN末端側の2つの塩基性アミノ酸クラスターが重要であることを明らかにした。
[鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、下池貴志、*田中恵子、**岩崎琢也、鈴木哲朗、宮村達男(*感染病理部、**長崎大)]

(15)HCVコア蛋白質の核における機能の解明

HCV は細胞質で複製するが、コア蛋白質の一部は核内に存在する。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って等電点が変化する蛋白質としてTGF-beta receptor interacting protein 1 (TRIP1)とEnhancer of Rudimentary Homologue (ERH)を同定した。前者はTGF応答に関わり、後者は転写調節に働く可能性がある。
[鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男]

(16)HCVコア蛋白に結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白の新たな機能を同定する目的で、アフィニティタグ精製法、およびGST-pull down法を用いてコア蛋白に特異的に結合する宿主因子のスクリーニングをおこなった。特異的な結合蛋白をSDS-PAGEゲルより回収し、質量分析法で解析し、同定したところ、複数個の新規結合因子を得ることができた。これらの新規結合因子がウイルス増殖や病原性に与える影響について解析を進めている。
[勝二郁夫、白倉雅之、松田麻未、下地 徹、泉水早智子、宮村達男、市村 徹(東京都立大学)、山河芳夫、西島正弘(細胞化学部)、水本清久(北里大薬学部)]

(17)HCVコア蛋白の分解を制御するユビキチンリガーゼの解析

HCVコア蛋白質のC末端側がプロセスされるとユビキチン依存性にプロテアソームにより分解される。ユビキチン化の分子機構を明らかにするためにHCV コアと結合する因子を探索したところ、ユビキチンリガーゼを結合蛋白として同定した。このユビキチンリガーゼをコア蛋白と共発現することにより、コア蛋白質の分解が促進した。これより、HCV コアユビキチン化を担うユビキチンリガーゼであると考えられた。現在、ユビキチン化機構、結合領域、病態生理学的意義の解析を進めている。
[白倉雅之、勝二郁夫、下地 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、市村徹(東京都立大学)]

(18)HCVコア蛋白の分解メカニズム

C末端側をプロセシングされたHCVコア蛋白質はユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。そこでリジン/アルギニン変異体を使ってコア蛋白質中のユビキチン化部位の同定を行ったところ、7カ所のリジン残基のうち特定の1カ所がユビキチン化されるのではないこと、N末端側の4カ所のリジン残基が修飾を受けやすいことが明らかとなった。一方、ユビキチン化を受けないリジンーレスのコア蛋白質変異体も、PA28γの過剰発現により分解が促進されることから、ユビキチン非依存性の分解経路が存在する可能性が示唆された。
[鈴木亮介、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(19)HCV コア蛋白発現トランスジェニック(TG)マウスにおけるアルコール摂取の影響

C 型肝炎患者はアルコール摂取によって肝炎の増悪、発癌率の上昇を引き起こすことが臨床的に知られているが、その分子機序は解明されていない。エタノール含有食を与えたHCVコア蛋白TGマウスを用いて、肝臓内のシグナル伝達系に対するコア蛋白とエタノールの協調的影響を解析した。その結果、正常食の場合に比べ、肝臓中の p38 MAPK, ERK が活性化され、その下流の転写因子であるATF-2, Elk-1 が結合するCRE, SREの活性化も認められた。
[堤 武也、鈴木哲朗、宮村達男、*小池和彦(*東京大)]

(20)HCVコア蛋白質によるIL-8の発現調節機構の解析

HCV コア蛋白質によってIL-8 のプロモーター活性が増強され、実際に内因性IL-8の発現が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 プロモーターおよびコア蛋白質の変異体(置換、欠損)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、コア蛋白質によるIL8 の転写活性化には、コア蛋白質の細胞質局在が重要であること、NF-κB 及び ER ストレス応答によって活性化される転写因子ATF6 がpositive regulatorとして関与していることが示唆される成績を得た。
[友部 賢、堤 武也、鈴木哲朗、宮村達男]

(21)HCVコア蛋白質による転写因子ATF6の活性化

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、特にATF6 の活性化に関与する可能性が示唆された。ATF6 は、

前駆体蛋白が小胞体で切断され活性化型となって、核へ移行し転写因子として働く。ウエスタンブロッティングから、コア蛋白質の発現により、ATF6 前駆体のプロセシングが促進されることを見出した。更に、ATF6 により発現調節される転写因子 XBP-1 の発現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、宮村達男、鈴木哲朗(*京都大)］

(22)IL-8 発現と遺伝子多型との相関

IL-8 の発現レベルが異なることが知られている6種類のヒト肝癌細胞株について IL-8 遺伝子の多型解析を行った。エクソン領域には遺伝子多型は認められなかったが、非翻訳領域-40 位に G または A 型の一塩基多型(SNP)が存在することがわかった。しかしながら、IL-8 の発現量とこの SNP とは必ずしも相関せず、TNFa、IL1b による発現誘導を含む IL-8 の発現調節機構には、翻訳後修飾など、転写調節以外の未同定のメカニズムが関与しているのかもしれない。

［友部 賢、堤 武也、*神代正道、宮村達男、鈴木哲朗(*久留米大)］

(23)HCV E1 タンパク質の膜トポロジー

HCV のエンベロープ蛋白質 E1 については、従来、I 型膜蛋白質であるとされてきたが、我々は、E1 の中央部と C 末端の疎水性領域が膜を貫通し、その間に存在する親水性領域が細胞質ループを形成する新しいモデル(polytopic topology)を提唱してきた。今回、genotype 1a, 1b の E1 について N-糖鎖結合部位の点変異体を使った詳細な解析から、E1 蛋白質はこれら2種類のトポロジー(type I および polytopic)が混合した形で存在している可能性が示された。

［染谷友美、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*松浦善治(*大阪大)］

(24)HCV NS5A 蛋白のウイルス RNA 複製における役割

リン酸化非構造蛋白質である HCV NS5A は、他の非構造蛋白質とともに、HCV RNA 複製複合体に含まれている可能性が高いが、HCV 複製に果たす役割は不明である。NS5A を部分欠損またはリン酸化部位を点変異させた HCV RNA レプリコンを作製し、細胞のコロニー形成能とルシフェラーゼアッセイを行った結果、ウイルス複製に影響する NS5A 領域が明らかにされた。現在、これらの NS5A 変異が他の HCV 蛋白との相互作用や、複製複合体の活性測定を行っている。

［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］

(25)ミトコンドリア蛋白のプロテオーム:HCV 全蛋白発現細胞の解析

HCV コア蛋白質は reactive oxygen species の蓄積などミトコンドリアの機能に影響を与えている。HCV 全蛋白を発現する HepG2 細胞株(Hep394)及び対照細胞株(Hepswx)からそれぞれミトコンドリア画分を調製しペプチドマスフィンガープリント法を行った。その結果、short/branched chain acyl-coA dehydrogenase (SBCAD) の有意な発現低下が明らかとなった。SBCAD は脂質代謝に関与する酵素として知られており、HCV 感染による肝臓での脂質代謝異常の一因となる可能性が考えられる。

［松田麻未、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗］

(26)ミトコンドリア蛋白のプロテオーム:HCV コア蛋白質と prohibitin との相互作用

コア蛋白発現細胞を使ったミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析を行った。その結果、細胞増殖への関与やシャペロンとして働く prohibitin、antioxidant に関わる MnSOD、電子伝達系を担う complex Ⅲ、ATP synthase などの発現変化が認められた。コア蛋白が細胞増殖やアポトーシスを調節すること、TG マウスにおいて oxidative stress を惹起することを支持する成績である。prohibitin について更に解析し、コア蛋白質は prohibitin の N 末端領域と直接結合し、翻訳後プロセスに作用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］

(27)B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析

HCV 抗原が B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア遺伝子を導入した B 細胞株(Bjab Core)の表面分子変化を検索し、CD48 抗原の発現の低下を認めた。この発現変化は、一過性にコア蛋白を発現させた EBV B cell line(EB-BCL Core)表面においても観察された。さらに、コア蛋白の発現によって、CD48 のプロモーター活性及び mRNA レベルが低下することも見出した。CD48 プロモーターの変異体を作製して、コア蛋白による CD48 の転写調節機構を解析している。

［町田早苗、鈴木亮介、小俣和彦、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男］

(28)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 の肝外病変に関する研究として腎炎との関わりを調べている。HCV 陽性糸球体腎炎患者について、腎生検標本を作製し、抗 HCV コア蛋白抗体で免疫染色を行った。一部の症例でメサンギウム増殖変化した領域に陽性所見が認められ、また尿細管や血管壁などが染色される症例も観察された。さらに、免疫電子顕微鏡解析から、HCV 蛋白がメサンギウム領域、糸球体上皮細胞、基底膜に存在することが示された。

［岩堀 徹、*中尾俊之、鈴木哲朗、宮村達男(*東京医大)］

(29)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 の腎臓に対する病原性、障害発症の分子機構を調べるため、HMC に対する HCV コア蛋白質の影響を検討している。HMC では、TGF-β 添加による細胞外マトリックスの発現誘導が、コア蛋白質によって増強されることを観察した。また、腎炎形成にはメサンギウム細胞の migration が関わっていることが知られている。そこで、Migration assay を行った結果、コア蛋白の発現によって HMC の migration 能が上昇する

こと、またこの作用はTGF-b処理と相乗的に上がることが示された。
［岩堀 徹、宮村達男、鈴木哲朗］

(30)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
HCV蛋白を発現する組換えDIsは、ウイルス蛋白に対する細胞性免疫を強く誘導する安全な組換えワクチンとして期待される。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後、マウスに皮下投与したところ、コア、E1、E2蛋白に対する抗体の誘導が認められた。免疫したマウスの脾臓からT細胞を分離し、overlapping peptidesで刺激してInterferon-γ分泌細胞数を測定したところ、E2のC端部分が最も強く細胞性免疫を誘導することが明らかになった。
［町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、*赤塚俊隆、宮村達男(*埼玉医大)］

(31)高度弱毒化ワクチニアウイルスDIsを用いたHCV非構造蛋白の発現と細胞性免疫誘導能の検討
HCVの非構造蛋白領域(NS3、NS5A)をDIsに組み込み、培養細胞でのHCV蛋白の発現を確認した後マウスに皮下投与したところ、いずれの蛋白に対しても特異抗体の誘導が認められた。また、免疫したマウスの脾臓からT細胞を分離し、抗原で刺激してInterferon-γ分泌細胞数を測定したところ、NS3のC端部分が最も強く細胞性免疫を誘導することが明らかになった。
［石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、*赤塚俊隆、鈴木哲朗、宮村達男(*埼玉医大)］

(32)高ペプチド化型HCVコア蛋白発現系によるCTL誘導の試み
一般に、HCVコア蛋白質に対してのCTLは誘導されにくいとされている。一方我々は、コア蛋白質のC末端側疎水性領域がプロセス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見出している。この性質を利用して、高分解型のコア蛋白を発現させることにより、効率よくコア蛋白のエピトープに対するCTLを誘導しうるかどうかを調べている。種々のコア蛋白発現プラスミドを作製し、マウスにDNA免疫し、CTL活性を解析している。
［鈴木亮介、石井孝司、吉崎佐矢香、町田早苗、鈴木哲朗、宮村達男］

(33)RNA干渉技術を用いたHCV複製阻害剤の検討
HCV配列を元に5' UTR内及びNS3、NS5B領域をターゲットとしたsiRNA発現ベクターを作製し、HCVレプリコン細胞に導入し、ウイルスRNA複製に及ぼす影響を検討した。作製した4種のsiRNAベクターのうち、5' UTR内及びNS3をターゲットとしたものについては、HCV-RNA量が約1/2まで減少した。RNA干渉効果は一塩基の違いによりその効果が大きく変わる可能性がある。今後、高い効果を示したこれらの領域を中心に、より効果的なターゲット配列を検討する予定である。
［江川隆太郎、村上恭子、宮村達男、鈴木哲朗］

(34)C型肝炎治療薬に対する耐性ウイルスの解析
現在、C型肝炎に対する治療法として最も効果が期待できるのは、IFNとリバビリンの併用療法である。IFNについては、耐性を示すHCVクローンが同定されその耐性機序解析が進んでいるが、リバビリンに対する耐性ウイルスの出現については不明な点が多い。そこで、HCVレプリコン細胞に10-100 mMのリバビリンを数ヶ月間処理することにより、薬剤耐性HCVクローンが出現するかどうかを検討している。
［Su Su Hmwe、*小池和彦、宮村達男、鈴木哲朗(*東京大)］

(35)C型肝炎の発症進展に関与する宿主遺伝子の解析
ウイルス肝炎の個別診断、治療法への応用を最終的な目標として、C型肝炎の発症、進展に関連する遺伝子多型の解析を行っている。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X、Yを除く全染色体にわたって走査を行った。昨年、1番および2番染色体で有意に偏りを示す部位を計10領域検出したが、今回新たに、7、10、17、18番染色体にC型肝炎発症と強く連鎖するSNPを同定した。LOD値が極大を示す領域について、更に詳細なSNP解析を行う予定である。
［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］

(36)歯科用器具器材のHCV汚染除去に関する研究
歯科用器具について、洗浄方法を検討し以下の成績を得た。1)技工用カーバイトバー、3-wayシリンジ、技工用シリコンポイントはHCV汚染直後にエタノール綿で拭き取ることにより十分除去可能だが、10分間放置すると、除染は難しい。2)注射筒およびCR充填器では風乾後においてもエタノール綿での拭き取りが有効である。3)デンタルミラー、バキュームチップ、印象用トレイは薬液処理後の水洗が有効である。4)塩化ビニルグローブ、ラテックスグローブは流水洗浄によって汚染除去が可能である。
［小俣和彦、鈴木哲朗、*佐藤田鶴子、*古屋英毅(*日本歯科大)］

(37)C型肝炎症例の口腔内滲出液中からのHCVの検出
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。血清中のHCV-RNAが陽性であった21例においては、19例(90%)で歯肉溝滲出液中にHCV-RNAが検出された。また、唾液中では8例(38%)であった。また、血中HCVレベルが中程度あるいはそれ以上(10^5ー10^6 copies/ml)の症例群では、唾液中に10^2ー10^3,歯肉溝滲出液中に10^4ー10^5 copies/ml程度のHCVを観察した
［小俣和彦、鈴木哲朗、*佐藤田鶴子、*古屋英毅(*日本歯科大)］

(38)HCV NS5A 蛋白質と amphiphysin Ⅱの相互作用

HCV の NS5A 蛋白質は様々な宿主細胞蛋白質と相互作用することにより、インターフェロンに対する感受性や情報伝達系に影響を及ぼすことが報告されている。我々は、NS5A 蛋白質と相互作用する宿主細胞蛋白質として amphiphysin Ⅱを見出した。さらに、NS5A 蛋白質の SH3 ドメイン結合モチーフを含む領域と、amphiphysin Ⅱの N 末端および C 末端が相互作用することを明らかにした。NS5A 蛋白質の SH3 ドメイン結合モチーフの詳細な解析を行い、amphiphysin Ⅱとの相互作用に重要な役割を演じている NS5A 蛋白質のアミノ酸残基を同定した。また、ヒト肝癌由来細胞株に、NS5A 蛋白質と相互作用しない amphiphysin Ⅱの splicing variants が存在することを確認した。HCVNS5A 蛋白質と amphiphysin Ⅱ splicing variants との相互作用の生物学的意義について現在研究を進めている。

[西村恂裕, 岡本 徹(阪大微研)、森石恆司(阪大微研)、松浦善治(阪大微研)]

4. E 型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1)遺伝子型4(G4)HEV の遺伝子解析

E 型肝炎が人畜共通感染症であるかどうかが注目されている。そこでイノシシから G4 に属する HEV を分離し、ヒトやブタから分離したものと比較した。イノシシの糞便から HEV RNA を抽出し、全長領域を網羅する遺伝子をクローニングし、全塩基配列を確定した。現在、この株とヒトやブタ由来株の比較を詳しく検討している。

[李 天成、栄 賢治、伊藤 雅(愛知衛研)、宮村達男、武田直和]

(2)遺伝子型3型(G3)および G4 HEV の構造蛋白の発現及びウイルス様中空粒子(VLP)に対する抗体の作製

現在、HEV には少なくとも4つの遺伝子型が存在する。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 G3 と G4 HEV 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。組換えバキュロウイルスを感染した昆虫細胞 Tn5 の培養上清から大量のウイルス様中空粒子(VLP)得た。VLP をそれぞれウサギ、モルモットに免疫し、高力価の抗体を作製した。ウイルス様中空粒子を用いた抗体検出ELISA 及び高力価の抗体を用いた抗原検出 ELISA を構築した。

[李 天成、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子(感染病理部)]

(3)遺伝子型1(G1)、G3 及び G4 HEV VLP 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、G1、G3 及び G4 HEV の ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を昆虫細胞で発現させ、VLP の作製に成功した。G1 と G3 の VLP 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それぞれの単クローン抗体を用い、G1、G3 型及び G4 VLP との反応の違いから抗原性を評価した。その結果、遺伝子型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、武田直和、宮村達男]

(4)大きなサイズをもつ VLP の作製

これまで G1、G3 及び G4 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を昆虫細胞で発現させ、VLP の作製に成功した。しかし、これらの VLP の直径は 23-24nm であって、ネイティブなウイルス粒子よりはるかに小さい。また、分子量や比重などもネイティブなウイルス粒子と異なっている。そこで組換えバキュウロウイルスを用いて G3 HEV の ORF2 全長を発現したところ、感染 Tn5 細胞から直径約 35-38nm の粒子を得た。この粒子は形状ではネイティブなウイルス粒子と非常に類似の粒子であった。現在、クリオ電顕で三次構造の解析をおこなっている。

[李 天成、恒光 裕(動衛研)、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 の転写産物としては、共通の 5'-、3' 末端を有する3種類の spliced RNA(3.0-、1.2-、1.0-kb)が同定されているが、その転写調節機構はほとんど明らかにされていない。我々はこれまでに、TTV 非翻訳遺伝子内にコアプロモーター、エンハンサーおよびリプレッサー領域が存在することを示してきた。今回、ゲルシフト法、共発現実験などから、TATA box 配列を含む 113 塩基のコアプロモーターの活性調節には、転写因子 USF が最も大きく関わっていることが明らかとなった。

[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 の臨床的意義

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行っている。HBV、HCV、HEV ともに陰性の肝炎症例について、輸血によって 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 抗体価との関連を調べた。

[鈴木亮介、鈴木哲朗、李 天成、宮村達男]

6. GB ウイルス(GBV)に関する研究

(1)GBV-B 蛋白を発現する組み換え DIs の作成と免疫誘導能の検討

GBV-B はタマリンに慢性肝炎を発症させるウイルスで、その構造の類似性から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。GBV-B の構造蛋白の一部を組み込んだ組換え DIs を作成し、哺乳類細胞に感染させたところ目的の GBV 蛋白の発現が確認できた。この DIs をマウスに皮下投与したところ、GBV-B のコア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。

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

(2)GBV-B 感染動物モデルの確立

NIH、Dr. Bukh より供与された GBV-B の全長 cDNA を保持するプラスミドから GBV-B RNA を合成し、タマリンの肝臓に投与したところ急性肝炎症状を呈し、血中にウイルス RNA が高力価で存在することを確認した。またこの血清を他の健常タマリンに投与したところ、同様に急性肝炎症状とウイルス血症を発症することが確認され、GBV-B 感染動物モデルが確立できた。本モデルはC型肝炎のサロゲートモデルとして有用であると考えられる。

［石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、宮村達男、鈴木哲朗、*岩田奈織子、*佐多徹太郎、**明里宏文、***八木慎太郎(*感染病理部、**霊長類センター、***先端生命科学研)］

(3)TaqMan RT-PCR 法を用いた GBV-B RNA 定量法の確立

GBV-B infectious RNA を接種したタマリンの生体内でのウイルス量を測定するため、TaqMan RT-PCR 法を用いて GBV-B RNA 量を定量する系の検討を行った。GBV-B のコア領域に TaqMan プローブとプライマーを設定し、感度の測定には標的領域をサブクローニングしたプラスミド DNA から in vitro transcription により作成した RNA を使用した。その結果、1000 copies/ml 以上で定量可能であった。

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

(4)GBV-B 感染動物の体内ウイルス分布の解析

GBV-B が感染したタマリンの各臓器を摘出し、GBV-B RNA 量を測定した。その結果、GBV-B は肝臓で最も多く、次いで脾臓・リンパ系、生殖器・泌尿器系の順に多かった。HCV の生体でのウイルス分布を解析することは非常に困難であり、本実験は HCV の体内動態の解析に有用な情報を提供するものと思われる。

［石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、宮村達男、鈴木哲朗、*岩田奈織子、*佐多徹太郎、**明里宏文、***八木慎太郎(*感染病理部、**霊長類センター、***先端生命科学研)］

Ⅳ. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. ヒト乳頭腫ウイルス (HPV)に関する研究

(1)HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規基質蛋白の検索

HPV16E6 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 は単独でもユビキチンリガーゼ活性を有する。E6AP の新規基質蛋白を同定するために、Ettan-DIGE 法、MALDI/TOFMS 法を用いて解析し、新たに2種類の E6AP 基質候補蛋白を同定した。新規基質蛋白の可能性が考えられ、現在、検討中である。

［椙山裕一、松田麻未、下地 徹、勝二郁夫、宮村達男、瀬戸裕之(東京理科大学)］

(2)HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の調節蛋白の検索

E6AP の細胞内局在、活性化などの調節機構は依然として不明である。E6AP の調節因子を検索する目的で GST-pull down 法、MALDI-TOF/MS 法により E6AP に特異的に結合する細胞内因子を検索した。質量分析の結果、annexin A1 が E6AP 結合蛋白として同定された。in vitro において結合が確認され、現在、この結合の生理学的意義について解析中である。

［椙山裕一、松田麻未、下地 徹、勝二郁夫、宮村達男、瀬戸裕之(東京理科大学)］

(3)HPV と婦人科領域の腫瘍性病変の研究

子宮膣部および頚部の腫瘍性病変に存在する HPV を blot hybridization 法と PCR 法により比較した。blot hybridization 法では 79% (231/294 例)の扁平上皮癌に性器 HPV が検出された。多くの症例で5コピー以上の HPV ゲノムが検出された。PCR-direct sequence 法では 96% (240/250 例)で性器HPV 遺伝子が検出された。12% (29/250 例)に複数の HPV 型が検出され、コピー数は 0.05 以下だった。この二つの解析方法間には顕著な差があることが明らかとなった。

［松倉俊彦、菅生元康(長野赤十字病院)］

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(BKV)VP1 のみで構成された T=1 の中空粒子の三次構造の解析

BKV はヒトポリオーマウイルスの一つである。BKV VP1 は主要な BKV 構造蛋白をコードする。BKV VP1 を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染し、大きさが異なる二種類の BKV 様粒子(直径 20nm と 45nm)を得た。クリオ電子顕微鏡解析法による解析の結果、直径 45nm である粒子は T=7 であり、直径 20nm である粒子は T=1 であった。Ca++濃度が粒子形成には重要な役割を果たしていた。

［李 天成、武田直和、宮村達男、Josefina Nilsson、Holland Cheng

(Kalorinska Institute)]

(2)BKV VP1 VLP の形成条件の検討

組換えバキュウロウイルス発現システムを用いてBKV の主要構造蛋白 VP1 を発現すると、VLP が形成される。VP1 にある陽電荷アミノ酸 281-297 (R281, R285, K288, R290, R292, R294 and 297)はウイルス粒子の形成および DNA との結合に重要な役割を果たしていると推定されている。これらのアミノ酸をアラニン(A)に置換して、各変異株を組換えバキュウロウイルス発現システムで発現し、粒子の形成および DNA との結合を比較した。その結果、281と285 番目のアルギニンはウイルス粒子の形成に重要であり、288 番目のリジン, 290, 292 及び 294 番目のアルギニンは DNA との結合に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

[柯 昌文(中国広東省 CDC)、李 天成、武田直和、宮村達男]

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 の全配列決定

DIs は日本の種痘ワクチン株であった大連株の高度弱毒株である。近年ウイルスベクターとしての応用が研究されているため、全塩基配列の情報を得ておくことは重要であると考えられる。ショットガン法を用いて全長遺伝子を分割してサブクローニングし、全塩基配列を決定したところ、ゲノム左端にある大きな欠損以外はほぼ親株の大連株と同一であることが確認された。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

V. SARS コロナウイルス(SARS-CoV)に関する研究

(1)SARS-CoV 構造蛋白質のワクチニアウイルスでの発現

重症急性呼吸器症候群(SARS)は SARS-CoV 感染によって起こる疾患で、症状の重篤さと致死率の高さから人類に対する深刻な新たな脅威となっている。本疾患の高感度診断系およびワクチン開発を目的として、SARS-CoV の構造蛋白 4 種の cDNA を DIs 株に組み込み、組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させたところ、目的の各蛋白が感染細胞で発現していることが確認できた。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*森川 茂、*水谷哲也、**田口文広、**小田切孝人、**田代真人(*ウイルス第一部、**ウイルス第三部)]

(2)SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスの免疫誘導能の検討

SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換えウイルスをマウスに皮下及び経鼻投与したところ、いずれのマウスでも SARS-CoV に対する液性及び細胞性免疫が誘導された。Spike protein である S を発現する組換え DIs を投与された群では、誘導された抗体には SARS-CoV の細胞への吸着を阻止する能力もあった。S を発現する組換え DIs を経鼻投与された群では、鼻腔で SARS-CoV に対する粘膜免疫も誘導されており、本組換え DIs が SARS に対するワクチンとして使用できる可能性が示唆された。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*横田恭子、*大西和夫、*高須賀直美、**長谷川秀樹、***森川 茂、****田口文広、****田代真人(*免疫部、**感染病理部、***ウイルス第一部、****ウイルス第三部)]

VI.その他の研究

(1)RFB 三次元培養系を用いたヒト薬物代謝解析モデルの開発

チトクローム P450(CYP)3A4 は、肝臓薬物代謝の第一相反応に関与し、現使用薬物の約30%の代謝を担っている。また、ヒト肝臓における CYP3A4 の発現誘導にはリファンピシン等の薬剤をリガンドとする PXR/RXR のヘテロダイマー形成が関与することが知られている。本研究では、リアルタイム RT-PCR、ゲルシフト法などによる解析から、FLC5 細胞の RFB 三次元培養系においては、単層培養系に比べ、CYP3A4 の顕著な発現上昇と薬剤刺激による発現誘導を示すこと、これには PXR/RXR および HNF-4a の活性化が関与していることが明らかとなった。

[岩堀 徹、相崎英樹、*松浦知和、鈴木哲朗(*慈恵医大)]

(2)新規三次元マトリックス Mebiol Gel を用いた三次元培養肝細胞の組織化学的解析

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。スフェロイド状に培養した Huh7 細胞について、細胞極性形成に関与する蛋白質の発現、細胞内局在を調べた。Desmoglein、Connexin32 は細胞-細胞接着面全体に分布し、細胞間の接着に働くことが示唆された。一方、よりタイトな結合を担う Occuludin、E-cadherin については、毛細胆管様構造の形成に関わることを示唆する局在が観察された。

[鈴木哲朗、吉崎佐矢香、*後藤康文、*眞鍋 昇、石井孝司、宮村達男(*京都大)]

(3)三次元培養肝細胞のプロテオーム解析

スフェロイド状に三次元培養され極性が形成されたヒト肝癌細胞において、発現レベルの変化する蛋白質群の同定を行っている。MebiolGel 培養および単層培養した HepG2、Huh7 細胞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。再現性よく発現の変化を認めたスポットを質量分析に供したところ、細胞骨格に関連する蛋白群を同定することができた。

[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(4)足場付加型 MebiolGel による高分化型肝癌細胞の培養

ヒト肝癌細胞株のうち、HepG2、Huh7 細胞は MebiolGel 中で増殖しスフ

ェロイドが形成されたが、より高分化型細胞であるFLC4ではほとんど増殖が認められなかった。多くの正常細胞では、細胞外マトリックスの存在がその増殖、分化の制御に重要であることが知られている。そこで、MebiolGel に細胞接着関連因子を混合した種々の「足場付加型ゲル」を用いて FLC4 細胞の培養を試みた。これまでのところ、コラーゲンペプチドを 8%程度含有させたゲル中で細胞増殖とスフェロイド形成が観察された。

［吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗］

(5) ネコ免疫不全ウイルス感染ネコ末梢血リンパ球における CD3ε 発現低下

CD3εはT細胞レセプター/CD3複合体の一部であり、ヒト・マウスなどではT細胞のマーカーとして頻用されている。しかし、ネコCD3ε(fCD3ε)の細胞外領域を認識し、ネコ生細胞のフローサイトメトリーに応用できる抗 fCD3ε 抗体は無く、ネコの T 細胞マーカーには fCD5 を使用しているのが現状であった。我々は fCD3ε の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体(NZM1)の作製に成功した。ネコ免疫不全ウイルス(FIV)感染ネコの末梢血リンパ球を解析したところ，fCD8α+β−細胞特異的に fCD3ε 発現量の低下が見いだされた。fCD3ε の発現量により，FIV 感染ネコの免疫ステータスをモニターできる可能性を示した。

［西村順裕，下島昌幸(東大)、佐藤英次(フロリダ大)、泉屋吉宏(カリフォルニア大)，遠矢幸伸(東大)、見上彪(食品安全委員会)、宮沢孝幸(帯広畜産大学)］

(6) ナノバイオ構造用高速高精度解析用電子顕微鏡(TEM)の開発研究

最近の BSE や炭疽菌テロに代表されるように，各種感染症の増大が顕在化している。感染症原因であるウイルスやプリオン蛋白質の機能を解明するためにナノオーダーの微細構造解析が極めて重要で、数百 nm サイズの微小かつ微量なウイルスやプリオン蛋白質の微細構造を直接観察するには高分解能電子顕微鏡(TEM)が唯一のツールである。高コントラスト像検出系技術，ウイルス・蛋白質サーチ画像処理技術，試料前処理用マイクロマシン技術を開発し，それらを搭載したナノバイオ構造高速高精度解析用電子顕微鏡を開発することを目的としている。

［宇田川悦子］

＜別＞ 検査業務

第1室:

行政検査

ノロウイルス確認検査 7件、75検体

E型肝炎確認検査 11件、13検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1件

第2室:

行政検査

平成15年度は6名の被験者から6株のポリオウイルスが分離同定され、中和による同定試験、PCR-RFLP 法あるいは ELISA 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

B型肝炎ウイルス遺伝子解析 1件、16検体

研究検査

TTV 遺伝子解析 2件、43検体

HGV 遺伝子解析 1件、28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 1件

組換沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 3件

沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14 細胞由来) 4件

行政検査

A型肝炎ウイルスの遺伝子検出 1件3検体

発表業績一覧

誌上発表

1. 欧文発表

原著

1) Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. Hepatol Res 27: 169-173, 2003.

2) Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. J Med Virol 69: 207-214, 2003.

3) Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, 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.

4) 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.

5) Pelletier I, Ouzilou L, Arita M, Nomoto A, Colbere-Garapin F. Characterization of the Poliovirus 147S Particle: New Insights into Poliovirus Uncoating. Virology 305: 55-65, 2003.

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

7) Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato M, Nagai A, Kozawa K. Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. Pediatr Infect Dis J 22: 758-759, 2003.

8) Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Mutrata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzulki T, Miyamura T, Matsuura Y: PA28g-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. J Virol 77: 10237-10249, 2003.

9) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T: Production and release of infectious virions from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length- HCV RNA. Virology 314: 16-25, 2003.

10) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T: Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. Hepatology 38: 820-828, 2003.

11) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. Arch Virol 148: 1659-1670, 2003.

12) Chiba Y, Kobayashi M, Chosa T, Yamamoto T, Endo K, Shimizu H, Li L, Wen-Bo X, Li-Bi Z: Molecular epidemiology of type 2 vaccine-associated paralaytic poliomyelitiss in China. Jpn J Infec Dis 56: 181-183, 2003.

13) Brunetti CR, Amano H, Ueda Y, Qin J, Miyamura T, Suzuki T, Li X, Barrett JW, McFadden G: Complete genomic sequence and comparative analysis of the tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. J Virol 77: 13335-13347, 2003.

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

15) Ruggieri A, Murdolo M, Harada T, Miyamura T, Rapicetta M: Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing Hepatitis C virus core protein. Arch Virol 149: 61-74, 2003.

16) Shimizu H, Yoshida H, Utama A, Nakayama T, Saito T, Watanabe K, Iizuka S, Noda S, Yoneyama T, Miyamura T: Surveillance of poliovirus-isolates in Japan, 2002. Jpn J Inf Dis 56: 218-219, 2003.

17) Suzuki T, Aizaki H, Tsutsumi T, Suzuki R, Miyamura T: Possible pathogenic roles of hepatitis C virus proteins. In: Animal Frontier Sciences. 253-259, 2003.

18) Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. Gene Ther 11: 628-635, 2004.

19) Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. Vaccine 22: 370-377, 2004.

20) Kobayashi S, Natori, K Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. Microbiol Immunol 48: 201-204, 2004.

21) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. J Clin Microbiol 42: 2988-2995, 2004.

22) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and identification of a Novel human parechovirus. J Gen Virol 85: 391-398, 2004.

23) Hansman GS, Doan LTP, Kguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. J Clin Microbiol 42: 1305-1307, 2004.

24) Fukushi S, Kojima S, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, Katayama K, Kageyama T: Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. J Virol 78: 3889-3896, 2004.

25) Nishimura Y, Shimojima M, Sato E, Izumiya Y, Tohya Y, Mikami T, and Miyazawa T: Down-modulation of CD3 ε expression in CD8 α+

β-T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. J Gen Virol 85: 2585-2589, 2004.

26) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. J Gen Virol 85: 2981-2989, 2004.

27) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfateproteoglycan associated with the cellular membrane. J Virol 78: 3817-3826, 2004.

28) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. Pediatr Int 46: 231-235, 2004.

29) Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA: Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. Bull WHO 82: 16-22, 2004.

30) Gao L, Aizaki H, He J-W, and Lai M: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. J Virol 7: 3480-3488, 2004.

31) Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of in vitro and in vivo phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. J Gen Virol 85: 1933-1944, 2004.

32) Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, Matsuura Y: Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. J Virol 78: 6370-6380, 2004.

33) Matsukura T, Sugase S: Human papillomavirus genomes in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Virology 324: 439-449, 2004.

34) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita A, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. J Virol 78: 13512-13521, 2004.

35) Hansman GS, Doan LTP, Kguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H: Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Arch Virol, (in press).

36) Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li T-C, Matsuura Y, Mishiro M, MiyamuraT: Identification of basal promoter and enhancer elements in anuntranslated region of the TT virus genome. J Virol, (in press).

37) Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific antibody to hepatitis E virus stays constant during the past 20 years in Japan. J Viral Hepatitis, (in press).

38) Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Shimoike T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. J Virol, (in press).

39) Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li TC, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. Vaccine, (in press).

40) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Kishimoto T, Tanno S, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, Miyamura T: An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. J Gastroenterol Hepatol, (in press).

II. 和文発表

1) 武田直和, 白土東子, 岡 智一郎, 片山和彦, 宇田川悦子, 名取克郎, 宮村達男: カリシウイルスの命名変更について. 病原微生物検出情報 24: 311-312, 2003.

2) 武田直和, 白土東子, 岡 智一郎, 片山和彦, 宇田川悦子, 名取克郎, 宮村達男: カリシウイルスの命名変更について. 感染症発生動向調査週報(IDWR) 5: 9-10, 2003.

3) 李 天成, 宮村達男, 武田直和: E型肝炎ウイルス感染と増殖のメカニズム. Mebio 20: 63-68, 2003.

4) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎ウイルス. 血液フロンティア 13:605-612, 2003.

5) 武田直和: E型肝炎. アニムス 29: 37-41, 2003.

6) 武田直和: E型肝炎の基礎知識. 保健婦雑誌 59: 372-376, 2003.

7) 武田直和: ウイルス; 動物性食品のHACCP研究班 (編): HACCP: 衛生管理計画の作成と実践 HACCP実践データ集. 東京, 中央法規出版株式会社 pp250-256, 2003.

8) 宇田川悦子: 病原因子・発症機序と検査法: 小型球形ウイルス食中毒. 臨床検査 47: 483-494, 2003.

9) 宇田川悦子: 小型球形ウイルスと最新電子顕微鏡検査法. WORLD FOCUS 48: 1-2, 2003.

10) 吉田 弘: ヒトエンテロウイルス. 日本臨床, 61: 463-467, 2003.

11) 清水博之: 手足口病. 総合臨床 増刊号 52: 192-197, 2003.

12) 岩崎琢也, 清水博之, 永田典代: エンテロウイルス 71. 病理と臨床 21: 110-114, 2003.

13) 千葉靖男, 小林 誠, 帖佐 徹, 山本悌司, 遠藤一博, 清水博之, 李 黎, 許 分波, 張 礼壁: 中国の2型ポリオワクチン関連麻痺の分子疫学的検討. 臨床とウイルス 31: 292-296, 2003.

14) 遠田耕平, 清水博之, 宮村達男: インドのポリオ根絶の現状. 日本医事新報 41: 60-61, 2003.
15) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎ウイルスと抗体検出系. 科学療法の領域 19: 57-63, 2003.
16) 白土(堀越) 東子, 片山和彦: ノーウォークウイルス. 日本臨牀増刊号, 新世紀の感染症学(下)ーゲノム・グローバル時代の感染症アップデートー, 61: 468-474, 2003.
17) 宮村達男: 急性灰白髄炎(ポリオ). 分子予防環境医学, 分子予防環境医学研究会編, 本の泉社 pp199-207, 2003.
18) 村上恭子, 鈴木哲朗: ウイルス研究における人工肝の役割. 細胞 35: 468-471, 2003.
19) 武田直和: 感染症の話「E 型肝炎」. 感染症週報(IDWR) 6: 8-11, 2004.
20) 田中智之, 岩上泰雄, 内野清子, 三好龍也, 吉田永祥, 北元憲利, 武田直和: ノロウイルス抗原検出 ELISA キットの評価. 医学と薬学 50: 709-714, 2004.
21) 武田直和: ノロウイルスの食中毒を知ろう.(食品衛生教育シリーズ) 第2版 日本食品衛生協会 2004.
22) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: 日本における E 型肝炎. Medical Practice, 文光堂 21: 441-444, 2004.
23) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎. からだの科学増刊「新興再興感染症 SARS の教訓」, 日本評論社 pp 61-66, 2004.
24) 勝二郁夫: C型肝炎. からだの科学増刊「新興再興感染症 SARS の教訓」, 日本評論社 pp58-60, 2004.
25) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: 不活化ポリオワクチン. 総合臨牀, 永井書店 53: 1860-1865, 2004.
26) 鈴木哲朗, 松浦善治: HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004, 日本メディカルセンター pp117-120, 2004.
27) 宮村達男: C 型肝炎ウイルス発見まで. 日本臨牀 増刊号, 日本臨牀社 7: 7-9, 2004.
28) 相崎英樹, 鈴木哲朗: HCV-RNA 複製および増殖のメカニズム. 日本臨牀 増刊号, 日本臨牀社 7: 81-84, 2004.
29) 村上恭子, 鈴木哲朗: HCV の新たな感染系および HCV-RNA 複製系の開発動向. 日本臨牀 増刊号, 日本臨牀社 7:111-115, 2004.
30) 下池貴志: HAV 粒子の構造. ウイルス性肝炎(下) 日本臨牀 増刊 8 号, 日本臨牀社 62: 423-427, 2004.
31) 下池貴志: HAV ゲノム(RNA)の構造と機能. ウイルス性肝炎(下) 日本臨牀 増刊 8 号, 日本臨牀社 62: 428-432, 2004.
32) 高尾信一, 下薗広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田弘, 島津幸枝, 福田伸治: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的. 疫学的解析. 感染症学雑誌 78: 129-137, 2004.
33) 勝二郁夫: HBV 粒子の構造と特徴. ウイルス性肝炎(下)ー基礎・臨床研究の進歩ー, 日本臨床 増刊号, 日本臨牀社 8, 2004.
34) 米山徹夫, 清原知子, 下池貴志, 森伸生, 岡部信彦: A 型肝炎ー我国の最近の発生動向を中心にー. 臨床とウイルス 32: 149-155, 2004.
35) 鈴木哲朗: HBV をヘルパーウイルスとする HDV の複製増殖機構の特殊性. ウイルス性肝炎(下) 日本臨床 増刊号 62: 393-397, 2004.
36) 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスと肝発癌. 臨床とウイルス 32: 156-162, 2004.
37) 鈴木亮介, 鈴木哲朗: Non-A-E: TTV のウイルス学, 今までにわかったこと, 病因的意義. 臨床とウイルス 32: 179-183, 2004.

学会発表

I. 国際学会

1) Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, Jan 11-13m, 2003.
2) 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.
3) Tanaka T, Miyoshi T, Kitamoto N, Iwagami Y, Uchino K, Natori K, Kamata K, Jiang X, Estes MK, Takeda N: Immunoreactive proteins in human feces may cause nonspecific reactions in a Norwalk virus antigen detection ELISA; 37th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, USA, August 18-20, 2003.
4) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Oka T, Miyamura T, Takeda N: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. ibid.
5) Li T-C: Expression and characterization of hepatitis E virus-like particles. Structural Forum 2003, Virus-Cell Interaction: Structure to Function, Stockholm, August 8-11, 2003.
6) Shimiz, H: Another neurotropic enterovirus－characterization and pathogenicity of enterovirus 71ー. Ibid.
7) Shimizu H: Circulation of type 1 Vaccine-Derived Polioviruses in the Philippines. WHO Informal Consultation on identification and management of vaccine-derived polioviruses, Geneve, September, 2003.
8) Takeda N, Katayama K, Hansman G, Shirato H, Oka T, Ogawa S, Utagawa E, Natori K, aMiyamura T: Genetic and antigenic diversity of Noroviruses. Workshop on Emerging Enteric Viral Diseases, Seoul, November 20, 2003.

9) Suzuki R, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T: Potential mechanism of cap-independent translation conferred by E1 region of the HCV genome. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, December 2-6, 2003.

10) Sakamoto S, Shiroki K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T: In vitro particle assembly of HCV core protein. ibid.

11) Murakami K, Inoue Y, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Suzuki T, Miyamura T: Dynamics of HCV replication in the three-dimensional radial flow bioreactor system. ibid.

12) Utama A, Shimizu H, Miyamura T: Construction and characterization of chimeric viruses between polio and coxsackie A viruses. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, December 7-10, 2003.

13) Huang QS, Greening G, Baker M, Grimwood K, Webber L, Fitzsimons A, Gerret N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Pallansch M: Investigating the circulation and evolution of oral polio vaccine strains in New Zealand. ibid.

14) Sanekata T, Chan X, Utagawa ET.: Characterization of human Rotaviruses isolated in Indonesia. ibid.

15) Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Arntzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. Plant-Derived Vaccines And Antibodies: Potential And Limitations. Veyrier du Lac, France, March 21-24, 2004.

16) Yokota Y, Yamazaki K, Sakon N, Yoshida T, Ohuchi Y, Hayashi K, Tatsumi H, Yoshida H, Yamada A: Characterizing echovirus type 4 in an outbreak in Shiga. JAPA, 5th Japan-China International Congress of Virology, Osaka, June, 2004

II. 国内学会

1) 北村 清, 宇賀神義宣, 宇田川悦子. 下水処理におけるSRSV対策. 平成15年度日本水産工学会学術講演会, 藤沢市, 2003年5月.

2) 武田直和: E型肝炎にまつわる最近の話題. 第15回ウイルス性下痢症研究会, 京都, 2003年10月.

3) 武田直和: E型肝炎ウイルス中空粒子の作製と応用. 第2回動物衛生研究所人獣共通感染症談話会, つくば, 2003年9月25日

4) 4) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 青木孝祐, 西尾 治, 武田直和, 村上 司, 蓑城昇次, 改田厚, 綾田 稔, 小倉 壽. 平成14年度に大阪市で検出されたNorwalk virusのプローブ型別および遺伝子型別. 平成15年度地研近畿支部ウイルス部会研究会, 和歌山, 2003年9月12日.

5) 勢戸祥介, 綾田 稔, 小倉 壽, 入谷展弘, 久保英幸, 青木孝祐, 名取克郎, 武田直和: Alphtron type NOVについて 衛生微生物技術協議会第24回研究会, 福岡, 2003年7月10-11日.

6) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: E型肝炎ウイルスについて: 輸入感染症としてのE型肝炎. 同上.

7) 阿部賢治, 平野 真, 丁 欣, Tran TT Huy, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄, 角坂照貴, 後藤郁夫, 増沢俊幸, 中村正治, 平良勝也, 黒木俊郎, 谷川 力: E型肝炎ウイルスの動物宿主を探る (1) 日本に生息する野ネズミ類における疫学調査と感染流行の実態. 第39回日本肝臓学会総会,福岡, 2003年5月.

8) 平野 真, 丁 欣, Tran TT Huy, 岩城陽子, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 中村 伸, 阿部賢治: E型肝炎ウイルスの動物宿主を探る (2) 各種霊長類における疫学調査とニホンザルにおける感染流行. 同上.

9) 丁 欣, 平野 真, Tran TT Huy, 伊藤玲子, 早川依里子, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 山口真理, 薄井 貢, 正木尚彦, 林 茂樹, 阿部賢治: 東京地域におけるHEV感染の実態と予防対策の必要性. 同上.

10) 玉田陽子, 弘 八, 福田実可, 矢野公士, 学 大, 石橋大海, 矢野右人, 小松達司, 天成 李, 宮村達男, 武田直和, Ahmad N, Khan M: わが国のE型肝炎感染に関する免疫学的および分子系統学的解析. 同上.

11) 岩井雅恵, 松浦久美子, 吉田 弘: 富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測. 第62回日本公衆衛生学会, 京都, 2003年10月.

12) 田中智之, 三好龍也, 岩上康雄, 内野清子, 北元憲利, 鎌田公仁夫, 名取克郎, 武田直和: ノロウイルス抗原検出ELISA法における非特異的反応の解析. 日本ウイルス学会, 第51回学術集会, 京都, 2003年10月.

13) 石古博昭, 三浦里香, 島田康司, 山崎修道, 武田直和, 田川義継, 青木功喜, 大野重昭: 2002年, アジアで急性出血性結膜炎の大流行を引き起こしたエンテロウイルスの分子診断と分子疫学.同上.

14) 片山和彦, Hansman Grant, 岡智一郎, 牛島廣治, 宮村達男, 武田直和: 新たに全塩基配列を決定し得たSapovirus (SV) 4株を用いたゲノム塩基配列の解析. 同上.

15) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和: Genotic classification and expression of a novel sapovirus genotype. 同上.

16) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和: Molecular characterization of a novel recombinant norovirus. 同上.

17) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 牛島廣治, 福士秀悦, 影山努, 高井玲子, 白土(堀越)東子, 片山和彦, 武田直和, 宮村達男: 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. 同上.

18) 影山 努, 小嶋滋之, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 篠原美千代, 内田和江, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦: Norovirusの多様性およびその疫学的な意義について. 同上.

19) 高井玲子, 福士秀悦, 影山 努, 小嶋滋之, 星野文則, 名取克郎,

武田直和, 片山和彦: Norovirus 濃縮法の検討. 同上.
20) 白土(堀越) 東子, 名取克郎, 鎌田公仁夫, 影山 努, 岡智一郎, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: Norovirus と血液型物質との結合. 同上.
21) 福士秀悦, 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 星野文則, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦: Norovirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発現と酵素活性について. 同上.
22) 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 武田直和, 片山和彦: Norovirus VLP の遺伝子デリバリーベクター化への試み. 同上.
23) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子, 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 福士秀悦, 宮村達男, 武田直和: Norovirus (NV) Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 同上.
24) 李 天成, 落合 晋, 石古博昭, 武田直和, 宮村達男: 輸入感染症としてのE型肝炎. 同上.
25) 李 天成, 落合 晋, 永田典代, 石古博昭, 武田直和, 宮村達男: HEV Genotype Ⅳ の構造蛋白の発現及び抗原性の解析. 同上.
26) 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減少におけるウイルスタンパク質合成の役割. 同上.
27) Andi Utama, 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: ポリオウイルスとコックサッキーA ウイルスの組換えウイルスの作製. 同上.
28) 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: 新たに分離されたポリオウイルス組換え体とコクサッキーウイルス野生株の解析. 同上.
29) 永田典代, 清水博之, 吉河智城, 波多野いく持, 原嶋綾子, 佐藤由子, 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) の粘膜免疫モデル. 同上.
30) 椙山裕一, 勝二郁夫, 松田麻未, 瀬戸裕之, 宮村達男: HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規標的蛋白の解析. 同上.
31) 森石恒司, 岡本貴世子, 中村理加, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 小池和彦, 宮村達男, 松浦善治: C型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟・分解の分子機構. 同上.
32) 坂本真一郎, 根岸英雄, 鈴木亮介, 瀬戸裕之, 鈴木哲朗, 宮村達男: C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白のリン酸化が HCV 複製に及ぼす影響. 同上.
33) 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 宮村達男, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス Core 蛋白による B 細胞表面分子の発現変化. 同上.
34) 鈴木亮介, 村上恭子, 鈴木哲朗, 宮村達男: C型肝炎ウイルスの新たな翻訳抑制機構. 同上.
35) 石井孝司, 町田早苗, 鈴木亮介, 吉崎佐矢香, 鈴木哲朗, 赤塚俊隆, 宮村達男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs のウイルスベクターとしての応用. 同上.
36) 村上恭子, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 井上 寧, 小俣和彦, Su Su Hmwe, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男: 三次元培養肝細胞を用いた感染 HCV クローンの経時的変化の解析. 同上.
37) 清原知子, 戸塚敦子, 米山徹夫, 宮村達男, 伊藤壽啓: A型肝炎ウイルスの抗イディオタイプ抗体の作出とその機能解析. 同上.
38) 下池貴志, 戸塚敦子, 米山徹夫, 宮村達男: 無血性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. 同上.
39) 宮村達男: 世界ポリオ根絶計画の最終ステージ: 野生株ウイルスの封じ込め. 第3回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会, 東京, 2003 年 11 月 14, 15 日.
40) 宮村達男: C型肝炎ウイルスと肝発癌. 第 14 回臨床肝臓カンファレンス, 東京, 2003 年 11 月 15 日.
41) 松倉俊彦: ヒト乳頭腫ウイルス感染症の臨床, 病理, 基礎研究. 日本性感染症学会第 16 回学術大会,長野, 2003 年 12 月 6 日.
42) 勝二郁夫, 松田麻未, 椙山裕一, 宮村達男: 蛍光標識二次元ディファレンシャル電気泳動法を用いた E6AP の新規標的蛋白の同定. 第 26 回日本分子生物学学会, 神戸, 2003 年 12 月 10-13 日.
43) 武田直和: わが国における E 型肝炎とリスクファクター. 平成 15 年度食肉衛生技術研修会, 東京, 2004 年 1 月.
44) 武田直和: わが国の E型肝炎. 平成15年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2004 年 2 月.
45) 小俣和彦, 鈴木哲朗, 佐藤田鶴子, 前田宗宏, 荒井千明, 松野智宣, 宮坂孝弘, 北原和樹, 宮井崇宏: C 型肝炎症例の口腔内からの HCV 検出について. 第 58 回日本口腔科学会, 横浜, 2004 年 5 月 7-8 日.
46) 吉田 弘, 楾 清美, 濱野雅子, 渡辺香奈子, 高尾信一, 清水博之, 宮村達男: 1999-2003 年に分離されたエコーウイルス 30 型の分子系統解析. 第 45 回日本臨床ウイルス学会, 2004 年 6 月.
47) 片山和彦, グラント・ハンスマン, 岡智一郎, 牛島廣治, 三好達也, 田中智之, 宮村達男, 武田直和: Sapovirus ゲノムの解析. 衛生微生物技術協議会第 25 回研究会, さいたま市, 2004 年 7 月 8-9 日.
48) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: HEV 感染の現状と検査法. 同上.
49) 清水博之, アンディ・ウタマ, 有田峰太郎, 宮村達男: エンテロウイルスの分子進化とゲノム遺伝子組換え. 同上.
50) 有田峰太郎, 祝 双利, 清水博之, 宮村達男: C 群エンテロウイルスの分子疫学. 同上.
51) 宇田川悦子: 下痢症ウイルスほか. 教育講演: 最近話題のウイルス感染症, 長野市, 2003 年 11 月.

3. ウイルス第三部

部長　田代眞人

概　要

当部は村山支所に配置され、第1室（インフルエンザウイルス）、第2室（風疹ウイルス）、第3室（麻疹ウイルス）、第4室（ムンプスウイルス）、第5室（ウイルス性呼吸器感染症とサイトカイン）で構成される。研究業務は、各ワクチン製剤とサイトカイン製剤の品質管理、当該疾患の病原・病因・予防・診断・治療法に関する研究、レファランス業務および国際協力を行った。

人事異動では、7月1日に田口文広が第5室主任研究官に、9月1日に小渕正次がウイルス第1室の主任研究官に、10月1日に大槻紀之が第2室研究員に、菅井敏行が第3室研究員に、松山州徳が第5室研究員に各々採用された。一方、5月31日にウイルス第3室の荻野倫子研究員が退職し、平成16年3月31日に小長谷昌功第5室長が定年退職した。

業務では、インフルエンザ、風疹、麻しん、おたふくかぜの各ワクチンおよびγ-グロブリン製剤に関する国家検定、検査、特別審査、研究業務を担当した。インターフェロン製剤の収去検査と各感染症の体外診断薬依頼検査も行った又、各種標準品・参照品を製造して配布した。科学の進歩に応じて、生物学的製剤基準の改定を行ない、またGMPやWHO新基準に準拠した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った。

研究業務では、インフルエンザ流行動向調査事業、感染症流行予測事業、ウイルス株系統保存事業を進め、全国地衛研と協力して流行ウイルスの解析と流行予測を行い、国内のワクチン株を選定した。新型インフルエンザ対策として、ワクチン緊急開発体制、抗ウイルス剤備蓄、健康危機管理のあり方等を検討して提言した。WHO 麻疹拡大予防接種計画に応じて、麻疹の免疫抑制機構、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、国及びWHOワクチン政策見直し提言、IgM 抗体簡易診断法の実用化、麻疹ウイルス分離用細胞の開発、麻疹ウイルスの分子疫学等の研究を進めた。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および血清診断法の標準化、風疹ウイルス病原性機序、ワクチン政策の再検討の研究を行った。ムンプスウイルスでは、分子疫学、分子病態・病原性機構の研究、ワクチン全般については細胞や牛血清由来に由来するウイルスの検出方法の改良、動物由来の材料等を使用しない新ワクチンの開発を行った。また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。またリバース・ジェネティクスを駆使したセンダイウイルスの研究によりウイルス病原性の分子機構の解析を進めた。

国際協力では、WHOインフルエンザ協力センターとして各国から送付されたウイルスを解析し、WHOインフルエンザワクチン推奨株を決定した。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、大流行対応計画の策定および、WHO総会での採択を図った。また、中国や東南アジアでのインフルエンザ計画を支援した。麻疹、風疹に関しては、WHO拡大予防接種計画の策定・実施に協力し、標準検査法の開発・普及を行った。

SARSの流行に際しては、WHO-SARS研究ネットワークおよび西太平洋地域検査機関に指定され、SARSコロナウイルスの同定と検査方法の確立を進めた。更に、国内外からの臨床検体の検査と海外への技術支援、WHOによる様々な対策指針の立案・策定に参画した。厚労省・文科省の緊急特別研究では、全所的な協力体制を構築し、ウイルス性状の解析、迅速診断法、治療法、ワクチン、動物モデルの各開発を進めた。迅速簡易診断キットを実用化し、各検疫所等へ配備した。

年度後半の高病原性鳥インフルエンザの流行に際しては、WHO協力センターとして、国内外におけるヒトへの感染診断、分子疫学の解明、新型インフルエンザワクチン緊急開発を行った。また、WHOの要請に応じて東南アジア諸国に対して緊急技術支援を行った。文科・農水・厚労の合同研究を分担し、迅速簡易診断キットを開発した。また、国内およびWHOの新型インフルエンザ対策へ様々な提言・助言を行ない、我が国における新型インフルエンザ準備計画の策定を進めた。

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

インフルエンザの流行状況を把握し、次シーズンのワクチン株を選定するために全国 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および性状解析を実施した。2003/2004 シーズンは前シーズンと同じく A/H3N2 型（総分離数の 95%）とB型ウイルス（総分離数の 5%）の混合流行で、A/H1 型ウイルスの流行はなかった。流行規模は前シーズンの約 64%と小さかった。A/H3 型では、前シーズン後半から増えてきた変異株 A/福建/411/2002 類似株が分離株の大半を占めていたが、これらの多くはワクチン株 A/Panama/2007/99 に対する抗体ともよく交叉反応した。一方、B型ウイルスは、ここ2シーズン続いたB/ビクトリア系統の流行から、抗原的にも遺伝的にも別系統に分類されるB/山形系統に入る株が分離株の大半を占めていた。これらは3シーズン前のワクチン株からは抗原的に大きく変化しており、また、遺伝子解析においても区別が可能であった。同様の流行状況は欧米諸国においても報告さていることから、これらの情勢を総合的に判断して、2004/2005 シーズンのわが国のワクチン株は A/NewCaledonia/20/99(H1N1)、A/Wyoming/3/2003(H3N2)(A/福建類似株)、B/上海/361/2002(山形系統株)が選定された。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。また解析結果は衛生微生物技術協議会、ウイルス学会等の研究集会などを通じて研究機関へも還元され、さらに感染研 HP で一般にも還元された。［西藤岳彦、小渕正次、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子、小田切孝人、田代眞人］

2．高病原性鳥インフルエンザの流行における実験室診断と国際協力

2003 年から 2004 年の始めにかけて日本を含む東アジア諸国の家禽の間で高病原性 A/H5N1 型鳥インフルエンザの大流行が起こった。ベトナム、タイではヒトへも感染し 23 名の死者を出すまでに至り、これに起因した新型インフルエンザウイルスの出現とそれによる世界的な汎流行が危惧されている。当室では WHO インフルエンザ協力センターとして、東南アジア諸国の H5N1 型ウイルス感染が疑われる患者の検体を受け入れ、ウイルス遺伝子検出、ウイルス分離による病原体診断、血清中の中和抗体検出による血清診断を行い、実験室診断における国際協力を行った。一方、山口県の養鶏場での流行においては、従業員や家族から採取した検体について感染診断を行い全例陰性であることを確認し、その結果を山口県及び、厚生労働省にそれぞれ速やかに報告し、その後の対策に反映された。さらに、動物衛生研究所から H5N1 型国内分離株の入手、WHO-H5 ネットワークから海外分離株の入手を行い、それらの抗原解析、遺伝子解析、ワクチン開発を行った。これら国内外の情報交換は WHO ネットワークを通して頻繁に行われ、これによって随時最新の H5N1 型ウイルスの流行状況を把握し、新型インフルエンザ対策に対応した。一方、科学技術振興調整費による「高病原性鳥インフルエンザ対策に関する緊急調査研究」における当室の研究としては、病原体診断系の改良や新規に高感度遺伝子検出系を開発し、短期間で効果的な研究成果を上げた。［小田切孝人、二宮愛、今井正樹、小渕正次、板村繁之、西藤岳彦、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、金子睦子、田代眞人］

3．高病原性鳥型インフルエンザのヒト感染事例に関する技術協力（ベトナム）

2003 年暮れから 2004 年初頭にかけてアジア各地で高病原性トリ型インフルエンザ（H5 亜型）の集団発生が家禽で認められた。これに伴い、タイ、ベトナムではヒトへの散発的な感染事例が発生した。ベトナム・ホーチミン市のパスツール研究所および熱帯病病院におけるヒト H5 感染の診断技術確立のため、世界保健機構(WHO)の要請を受けて各2週間、計約4週間の期間にわたる技術協力を行った。現地では RT-PCR による臨床検体を用いた H5 診断法を確立すると共に、熱帯病病院の BSL-3 実験施設の評価を行った。［板村繁之、西藤岳彦］

4．動物インフルエンザウイルスのサーベイランス

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 HA 亜型のウイルスの収集・系統的分類及びそれらに対する抗血清の作製を完了させた。また新たに野鳥から9株が分離され、それらの抗原解析の結果、H2N3、1 株、 H7N7、1 株、 H8N4、1 株、 H10N1、3株、 H10N7、3株が分離され、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。新型ウイルスが中間宿主のブタの世界に侵入しているのか否かを監視するために、全国 22 地区の地衛研に依頼して、ブタでの H5、H7、H9 ウイルスに対する抗体調査を行った。血清中の抗体価は、A/Hong Kong/213/2003(H5N1)、A/mallard/Netherlands/12/00（H7N3）、A/Hong Kong/1073/99（H9N2)各不活化ウイルスを抗原に用い HI 試

験にて測定した。その結果、H7 ウイルスに対しては全て陰性であった。一方、H5 ウイルスと H9 ウイルスに対してそれぞれ1頭と2頭のブタで陽性反応が検出され、その結果は感染研でも追証された。しかし、これらの血清はブタの間で常在している H1 ウイルスあるいはヒトの H1 ウイルスにも反応したことから、交叉反応なのか、特異反応なのか区別することができなかった。そこで、中和試験で区別できるか否か検討したが、HI 試験と同様の成績が得られ、現時点で可能な解析系では判定が困難であった。今後、ウイルスの流行状況を直接的に把握できるウイルス分離法を用いた監視体制を確立する予定である。[今井正樹、二宮愛、西藤岳彦、板村繁之、斉藤利憲、小渕正次、小田切孝人、田代眞人]

5. WHO 西太平洋地域(WPR)諸国におけるインフルエンザサーベイランへの支援

中国は新型インフルエンザの出現にとって重要な地域であるとともに世界のワクチン標準株が多く分離される国であることから、中国におけるインフルエンザサーベイランス情報および分離株は世界のインフルエンザ対策にとって重要な役割を占めている。しかし、中国国内におけるサーベイランス網の整備や海外諸国との連携はかなり立ち遅れていることから、WHO、感染研、米国 CDC が協力して 2000 年から5カ年計画で中国のサーベイランスの強化を目的とした技術支援を行ってきた。4年目になる本年度は、感染研から田代が中国のサーベイランス拠点を視察し、問題点や改善点を提言した。

一方、中国各地で分離され亜型同定が行われた分離株については、中国 CDC から定期的に感染研へ送られ(本年度は計 191 株が送付された)、詳細な抗原解析、遺伝子解析が行われた。これら解析結果は中国へ適宜還元されるとともに WHO ワクチン株選定会議でワクチン推奨株の選定のための資料として活用された。[田代眞人、小田切孝人、西藤岳彦、小渕正次、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子]

6. ノイラミニダーゼ阻害剤耐性株サーベイランス

抗インフルエンザ薬として燐酸オセルタミビル(タミフル)やザナミビル(リレンザ)が開発され、先進諸国ではインフルエンザの治療薬として臨床現場で使用されている。しかし、これら薬剤に対する耐性株の出現頻度や耐性株の性状など関する情報は少ない。そこで WHO ではこれら耐性株に関する世界規模でのサーベイランスを行い、抗ウイルス薬の使用や新型インフルエンザ対策における国家備蓄の検討などに映させるために、ノイラミニダーゼ阻害剤耐性株ネットワーク(NISN)を設立した。WHO インフルエンザ協力センターであるウイルス第3部第1室もこのプロジェクトに参加し、地衛研から収集した国内分離株を NISN に送付し、耐性株のスクリーニングを行った。わが国は世界で使用されている抗インフルエンザ薬の 2/3 が消費されているといわれていることから、わが国における耐性株のスクリーニングは特に重要であり、今後も継続される。[西藤岳彦、小渕正次、斉藤利憲、伊東玲子、中矢陽子、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子、小田切孝人、田代眞人]

7. WHO 新型インフルエンザ準備・対応計画ガイドラインの作成 (WHO世界インフルエンザ計画会議およびWHO国内インフルエンザセンター長会議の企画・主催)

WHO インフルエンザ協力センターおよび WHO 国内インフルエンザセンターとして、2002 年から開始された WHO 世界インフルエンザ計画の策定および実施に参画し、毎年流行するインフルエンザ対策および新型インフルエンザ大流行に備えた準備と対応計画立案のためのガイドライン策定を行なった。その結果、2003 年 5 月の WHO 総会において、インフルエンザ対策は WHO 政策の中で優先度の高い政策課題として採択された。これに応じて、各国のインフルエンザサーベイランス体制、健康被害の把握、ワクチン製造・供給・接種体制、新型インフルエンザ対策を 4 本柱として規定し、これに対する WHO の行動計画策定を行った。また、通常期および大流行期におけるワクチン政策および抗インフルエンザ薬の使用計画についてのガイドライン・勧告をまとめた。

2003 年 2 月に香港でヒトの感染死亡が起こった H5N1 型高病原性鳥インフルエンザ、同じくオランダにおける H7N7 型高病原性鳥インフルエンザ、さらに 2004 年に東アジアで広く流行して多数の感染者と死亡者を出した H5N1 型鳥インフルエンザに対しては、緊急の検査方法およびワクチン候補ウイルスの開発を行った。これらの新型インフルエンザ出現の懸念に対応して、WHO 新型インフルエンザ緊急対応策の策定を行い、また APEC および G7+1 における新型インフルエンザ対策の専門家会議において、対応策の検討を進めた。さらに、9 月には沖縄で WHO 世界インフルエンザ計画会議および WHO 国内インフルエンザセンター長会議を主催し、これらの内容の具体的実施計画を検討・策定するとともに、各国において速やかにこの計画を実施できるように、政治的・経済的な方策を検討して各国に要請した。

[小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、小渕正次、今井正樹、二宮愛、斎藤利憲、田代眞人]

8. WHO 新型インフルエンザワクチン開発に関するガイドラインの作成

H5N1 型などの高病原性鳥インフルエンザに由来する人の新型インフルエンザウイルスが出現した際には、強毒型のウイルスをそのままワクチン製造に用いることは出来ない。そこで、リバースジェネティクス遺伝子操作技術を応用したウイルスの弱毒化操作が必要であり、このような技術を用いたワクチン製剤の開発方法、製造方法、承認許認可体制、知的所有権問題、安全性の確保方法、WHO および各国の役割と国際協力、ワクチンメーカー等との協議と協力等について、数回にわたる国際会議に参加し、わが国の立場および WHO 協力センターの立場から意見を述べ、WHO 新型インフルエンザワクチン開発に関するガイドラインを作成した[小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、小渕正次、今井正樹、二宮愛、斎藤利憲、田代眞人]

9. 新型インフルエンザ大流行への準備・対策案の検討

新型インフルエンザ大流行が起これば、未曾有の健康被害と社会機能の麻痺が起こることが危惧されている。そこで、WHO の勧告に応じて、わが国においても、新型インフルエンザに対する事前準備と緊急対応計画を予め確立しておく必要があり、このための検討を、厚生労働科学研究費補助金「新興・再興感染症」の研究班を組織して進めた。様々なシナリオに基づいた健康被害と社会的影響について検討を行い、それに対する事前準備のあり方、緊急対応計画についての提言を行った。今年度は、特に、高病原性鳥インフルエンザに由来する病原性の特に強い新型ウイルスによる検討と被害の推定、ワクチンの緊急開発方法と問題点およびその解決案、抗インフルエンザ薬の備蓄に関する問題点と選択肢に関する検討を進めた[小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、小渕正次、二宮愛、今井正樹、斎藤利憲、田代眞人]

10. 新型インフルエンザワクチン(H5 型および H7 型)の力価測定系の確立

新型インフルエンザが流行した場合に備えて、鳥由来の亜型のウイルスでワクチン製造株の種ウイルスを作製すると同時に、その力価を一元放射免疫拡散(SRD)法で測定できるシステムを確立することが重要である。2003 年度には香港で H5N1 型ウイルス、オランダで H7N7 型ウイルスがヒトから分離されている。そこで、これらの亜型のウイルスについて SRD 用の抗血清試薬を作製し、力価測定が可能になった。[今井正樹、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、小渕正次、斉藤利憲、金子睦子、小田切孝人、田代眞人]

11. 新型インフルエンザワクチンの開発

1)ワクチン株の作製:高病原性トリインフルエンザウイルスの流行に備えるために、リバースジェネティクス法を用いてワクチンを作製し、その安全性と有効性を検証した。2003 年に香港でヒトから分離された高病原性トリインフルエンザウイルス A/Hong Kong/213/03 (H5N1)の NA 遺伝子と弱毒型に改変した HA 遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子を含む弱毒化組換え H5N1 ウイルスを、発育鶏卵で高増殖する A/PR/8/34(H1N1)株遺伝子をバックボーンとするリバースジェネティクス系を用いて作製した。2)ワクチン株の病原性試験:組み換えウイルスの病原性を調べるために、ニワトリ及びマウスへの接種試験を行った。その結果、このウイルスはニワトリとマウスに対して病原性を示さないことがわかった。さらに、培養細胞を用いて H5 ウイルスの弱毒化の指標であるトリプシン依存性試験を行ったところ、このウイルスはトリプシン非存在下では、その増殖が著しく抑制されることがわかった。従って、この組み換えウイルスは、ニワトリおよびマウスに対して十分に弱毒化されていることが確認された。[二宮愛、今井正樹、喜田宏*:*北海道大学大学院、小田切孝人、田代眞人]

12. B 型インフルエンザウイルスの発育鶏卵分離による抗原性の変化に関する研究

A 型及び B 型インフルエンザウイルスを発育鶏卵で分離すると、細胞分離株との間で抗原性が異なることが知られている。インフルエンザワクチンは現在発育鶏卵で分離、増殖されているためこの抗原性の変化がワクチンの効果や、サーベイランスの結果に大きな影響を与える可能性がある。数株の B 型ウイルスの発育鶏卵分離株と細胞分離株のペアーについて、抗原性、免疫原性、レセプター特異性について検討した。発育鶏卵分離株と細胞分離株の間で、HA タンパクの糖鎖結合部位の数が異なることが明らかになり、それに伴い抗原性、免疫原性が変化することが示された。ハムスターモデルを用いたワクチンの効果試験では2者の間で有意な差は認められなかった。また2者の間でレセプター特異性は変化しないがレセプターへの親和性が異なることが明らかとなった。[西藤岳彦、中矢陽子、鈴木隆*、伊東玲子、斎藤利憲、齋藤博之**、高尾信一***、佐原啓二****、小田切孝人、村田剛臣*****、碓井太一*****、鈴木康夫*、田代眞人:*静岡県立大学、**秋田衛生科学研究所、***広島県保健環境センター、****静岡県環境衛生科学研究所、******静岡大学]

13. 新型インフルエンザワクチンに用いるアジュバントワクチンの有効性の検討

H5N1 型ワクチン株および鳥由来の弱毒型H7 型ウイルスを用いてホルマリン不活化全粒子ワクチンを作製した。これらをアルミニウムアジュバントと共にマウスに皮下接種し、血清中の HI および中和抗体を測定してワクチンの効果を検討した。その結果、微量の抗原でもアジュバントの使用により、効果的に血中抗体を誘導できる可能性が示された。[二宮愛、今井正樹、
小田切孝人、田代眞人]

14. B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白の機能に関する研究

B 型インフルエンザウイルス第 7 分節 RNA は2種類の膜蛋白質、M1 および 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、ウイルス増殖過程における 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(RG)法を用いて BM2 欠損および部分欠失変異株を作製し、その性状解析を行った。B/山形/1/73 株を骨組みとした RG 系を用いて、BM2 欠損変異株と BM2 部分欠失変異株の作製を試みた。その結果、これらの変異株は全く回収されなかった。そこで BM2 をトランスに補充してやるとこれらの変異株は回収され、野生株と同様のレベルまで増殖能が回復した。以上の結果は、BM2 は B 型インフルエンザウイルスの増殖には必須な蛋白質であることを示している。[今井正樹、二宮愛、小渕正次、小田切孝人]

15. 新型インフルエンザ(A/H5N1)に対する全粒子ワクチンの臨床試験

ワクチンの準備は新型インフルエンザ対策の要として最も重要である。現行ワクチンの製造方法で新型インフルエンザに対する安全で有効なワクチンを製造できるのか確認することを目的として、以前にリバースジェネティクスの手法によって作製したウイルス株をワクチン製造株として新型インフルエンザ (A/H5N1)に対する不活化ワクチンの試験製造を行い臨床試験を実施した。その結果、顕著な副反応は認められなかったが、しかしながら血清中の抗体価の上昇も認められず、ワクチンの免疫原性を高める必要性があることが明らかになった。そこで、本年度は現在は製造されていないが製造法としては認可されている不活化全粒子ワクチンを試験製造して臨床試験を実施した。全粒子ワクチンについても、顕著な副反応は認められなかった。一方、免疫原性についても一部に有意な血清抗体価の上昇が見られたが、その抗体価は低い値であった。より有効性の高い新型インフルエンザに対するワクチン開発の必要性が示 唆された。[板村繁之・小田切孝人・田代眞人]

Ⅱ. 風疹ウイルスに関する研究

1. 風疹抗体検出キットの国内標準品の作製と評価

風疹抗体価の表示の統一をはかるために、抗風疹 IgG 及び IgM 抗体測定用の国内標準品候補を作製した。EIA 、HI、中和抗体価を測定し、WHO の国際標準品に対する相対抗体価を算出すると、IgG 抗体測定用国内標準品候補の相対抗体価はいずれの方法でも誤差の範囲で良く一致していた。それらの加重平均からその相対抗体価は 90.9 IU/ml と推定された。このことから、EIA、HI、中和のどの方法でも国際標準品に対する相対比較による測定を行うことにより、共通の抗体価が得られることが示された。[海野幸子、堀内善信*:*細菌第 2 部、加藤宏幸、
大槻紀之、門澤和恵]

2. Vero 細胞を用いた風疹ワクチンウイルスの無血清増殖系の確立と増殖
(1)ウイルスの生物学的性状の解析(続)

無血清培地 DM-201 単独、或いはそれに大豆由来ペプトンを添加した培地に馴化させた Vero 細胞でそれぞれ 3 代継代した風疹ワクチンウイルスの E1 遺伝子は、元のワクチンウイルス及び従来の牛血清を含む培地で培養された Vero 細胞で継代されたウイルスと同じ配列であった。また、これら継代を経たウイルスの RK13 細胞での増殖は元のワクチンウイルスと同様に高温で抑制された。DM-201 培地に馴化した Vero 細胞で無血清培地を用いて少なくとも 3 代継代を繰り返しても、ウイルスの性質は安定していると考えられた。[海野幸子、加藤宏幸、大槻紀之、門澤和恵、大良勇治]

3. 青年層の抗風疹抗体の保有状況

2002 年と 2003 年の某医学部大学生それぞれ 66 人及び 80 人について抗風疹抗体保有状況を調べた。年毎の風疹ウイルス HI 抗体陽性率は、80.3%と 88.8%であった。その内、女性の陽性率は 84.6%と

100%で、男性の 77.5%と 80.4%に比べ両年とも高かった。2003 年の平均年齢は女性 22.0 歳、男性 23.5 歳で、経過措置による定期接種対象者に該当する。しかし、男性の抗体陰性者の平均年齢は 25.3 歳で、これまでワクチンの接種対象ではなかった年齢層である。今回得られた青年層の抗体保有の傾向は、2002 年の流行予測調査の結果と一致していた。[海野幸子、門澤和恵、中島節子]

4. マイクロアレイを用いた風疹ウイルスワクチン株の弱毒性の検討

風疹ウイルス(M-33 株)感染細胞では、dsRNA またはインターフェロンによって活性化される遺伝子群の顕著な上昇が認められ、この中にはその後機能が明らかになった RIG-1 等の新規 mRNA も含まれた。これら遺伝子発現の変化とウイルスの弱毒性との関連を調べるために風疹ウイルスワクチン株(TO-336Vac)とその親株(TO-336WT)による感染細胞の遺伝子発現変化を比較した。各 ウイルスを同一MOI (約8)で HEL(ヒト胚肺繊維芽細胞)に感染させ、35℃で培養した。8、56、96 時間後に細胞の RNA を回収し、それらの遺伝子発現を調べた。その結果、ワクチン株とその親株の感染細胞において上記遺伝子群が変化していたが、互いに明瞭な差異は認められなかった。[加藤宏幸、海野幸子]

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。麻疹の分離効率は 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。昨年度から、H1 型が頻繁に分離されるようになり、本年度も H1 型だけが分離された。[齋藤義弘、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を確立した。CPE法、プラック減少法のいずれにおいても測定が可能であり、従来の中和試験とよく相関していた。またワクチン株(遺伝子型A)で免疫した血清を用いて麻疹野外株(遺伝子型D3、D5、H1)に対する中和価を本法で比較したが、最近の野外株に対するワクチンの防御効果の減弱は認められなかった。さらに本年度はVero/SLAM細胞のシードを作製し、当研究室から各研究機関に分与する体制を整えた。Vero/SLAM細胞におけるSLAMの発現は、抗SLAM抗体を用いたフローサイトメトリーでモニターしているが、G418 を加えた培地で培養するかぎり、少なくとも 100 代までは安定していた。[齋藤義弘、宮嶋直子、田代眞人、柳雄介*:*九大大学院]

3. 国内抗麻疹標準血清の作製

WHO を中心として、血清抗体価を抗体測定法にかかわらず統一して表示する動きがある。英国 NIBSC より入手した麻疹国際標準血清(5 IU/ml)を参照品として、ヒトの血清で国内標準品の作製を試みた。今回の候補血清の国際標準品に対する相対力価は HI 法と EIA 法において誤差の範囲内で一致し、その力価は 5.453 IU/ml と算出された。一方、中和試験法での相対力価は、3.022 IU/ml と HI 法とEIA 法のそれと比較して乖離が認められた。[齋藤義弘、堀内善信*:*細菌第2部、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。本年度はワクチンの原材料となる細胞以外は動物由来成分を全く使用しないで麻疹ワクチンの製造が可能かどうか検討を行った。その結果、現行の製造法と同等量のワクチンウイルスを得るためには、無血清培地に細胞増殖因子を添加するなどの工夫が必要であることが示唆された。
[齋藤義弘、大槻紀之、関谷成則、田代眞人]

5. 重症心身障害児(者)に対する麻疹生ワクチンの安全性と有効性の検証

麻疹ウイルスが、感染すると宿主に免疫抑制を起こす事が知られている。麻疹生ワクチンは微弱ながらこの性質を持っている。特に免疫機能の低下している患者では、野外麻疹ウイルス感染は時に致命的となり、ワクチンでの予防が強く望まれる。このような背景の中で、重度心身障害者の麻疹ワクチン接種は、野外ウイルスに罹患すると重症化する傾向があることから、是非にも接種したいワクチンの

筆頭となっている。今回、神奈川県立総合リハビリテーションセンターの医師とともに重障児(者)に対する麻疹ワクチン接種の安全性と有効性の検証を行った。[岡田晴恵、秋元未来、菅井敏行、田代眞人]

6. 骨髄移植児(者)に対する麻疹生ワクチンの安全性有効性の検証

現在、我が国では年間約 3000 例の骨髄移植が行われている。移植後の患者が、野外麻疹ウイルスに感染すると重症化することから麻疹ワクチンによる予防は、重要である。今回、骨髄移植児(者)の麻疹生ワクチンの接種の安全性と有効性の検討を行った。これは、移植患者に対する安全性有効性の確認とともに適切な接種時期の決定を目的とした。[岡田晴恵、秋元未来、田代眞人]

7. 麻疹ウイルスV蛋白質によるI型 IFN 情報伝達経路の阻害機構の解析

麻疹ウイルスのP遺伝子は、他の多くのパラミクソウイルスと同じように、P蛋白質の他にVおよびC蛋白質を重複してコードしている。VおよびC蛋白質が、IFNによって誘導される宿主細胞の抗ウイルス効果を阻害する機能を有しているかを調べるために、麻疹ウイルスのV蛋白質発現HeLa細胞、および、C蛋白質発現HeLa細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、麻疹ウイルスV蛋白質がI型IFNによる抗ウイルス活性を阻害する事を確認した。また、麻疹ウイルスV蛋白質が、JAK-STAT経路におけるシグナル伝達分子であるSTAT2 及びSTAT1 のリン酸化を阻害、もしくは抑制する事が明らかになった。[宮嶋直子、竹内薫*:*筑波大・基礎医学]

8. CD46、SLAM(CD150)を経由しない麻疹ウイルスの感染機構

麻疹ウイルスは、主にリンパ系細胞に感染するが、上皮系、内皮系、神経系の細胞にも感染する事が知られている。麻疹ウイルスレセプターとしては、実験室継代株は、CD46、SLAM両方を認識するが、麻疹ウイルス野外株は、SLAMのみを認識する事が報告されている。しかし、SLAMは特定の活性化リンパ系細胞に限って発現するとされており、上皮系、内皮系、神経系細胞におけるSLAM発現の報告はない。我々は、初代ヒト細気管支上皮細胞(SAEC、Clonetics社より購入)に、GFPを発現する麻疹ウイルス野外株が感染し、巨大な細胞融合を形成する事を見出し、麻疹ウイルス野外株が、SLAMを発現していない細胞に感染し得る事が示された。この感染が、抗CD46 抗体でもブロックできなかった事から、CD46 でも、SLAMでもない、新たな麻疹ウイルスレセプターの存在する可能性が示された。[宮嶋直子、竹内薫*:*筑波大・基礎医学]

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

日本国内における近年のムンプスウイルス流行株の経年変化を調べるために、各県の衛生研究所の協力を仰いで臨床分離株を収集し、本年度までに 113 株の SH 遺伝子型別を決定した。ムンプスウイルスはその SH 遺伝子の基配列を基に AーK までの遺伝子型に分類されおり、現在使われているワクチン株は 1980 年以前から本邦で流行していたB 型に分類される。1999 年以前に分離された株はワクチン株と同じ B 遺伝子型株が大部分を占めていたが、2000 年以降に分離される株は、A、B、G、H、K 型の株が並行して流行する傾向が見られ、B 型株はごくわずかしか認められなかった。本年度に分離された株もその傾向の中にあり、全国的に流行株の入れ替えが起こっているものと推定される。[加藤 篤、久保田 耐、田代眞人]

2. ムンプスワクチンウイルスの牛由来成分を使用しない培養方法に関する研究

現行のおたふくかぜ生ワクチンは牛血清等の動物由来物質を含む培地で増殖維持されたニワトリ胚繊維芽細胞(CEF)を用いて製造される。ワクチン製造における動物由来因子の使用はそれらに由来する感染性因子が製剤中に迷入する危険性を伴う。市販の無血清合成培地による CEF 細胞の培養は、従来の牛血清入り培地と同等以上に細胞活性が高く、ムンプスウイルスの増殖性も高いことが分

かっている。そこで、従来の牛血清入り培地と、無血清培地とでそれぞれ培養したCEF細胞に、市販ワクチン等を接種し、増殖してくるウイルスの性状に違いが認められるかどうかを、プラークサイズの変化と、SH 遺伝子の塩基配列を比較することによって検討した。その結果、試験に用いた培養条件下では、いずれのワクチン株においてもプラークサイズ、塩基配列のいずれにおいても有意な変化を認めなかった。以上の結果から、無血清培地がムンプスワクチン製造に利用できる可能性が示された。[加藤 篤、久保田 耐、木所 稔、田代眞人]

3. ムンプスウイルスのIFN作用抑制機構の研究

ムンプスウイルス(MuV)感染細胞ではIFNによる抗ウイルス効果が抑制されており、その原因はウイルス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蛋白質が分解されるためだとされている。一方、麻疹ウイルスでもウイルスV蛋白質によりIFNによる抗ウイルス効果が抑制される事が見いだされたが、この場合はSTAT1蛋白質の分解はない。MuVのV蛋白質は宿主細胞のRACK1蛋白質と結合し、その結合が抗IFN効果と関連すると予想されている。麻疹ウイルスV蛋白質もRACK1と結合することが明らかになり、RACK1とV蛋白質の結合がSTAT1蛋白質の分解と抗IFN効果の発動にどのように関わっているのかに興味がもたれた。
[久保田耐、横沢紀子*、横田伸一*、藤井暢弘*:*札幌医大]

4. ムンプスウイルスの温熱耐性誘導抑制機構の研究

ムンプスウイルス(MuV)持続感染細胞では化学ストレスによる熱ショック蛋白質HSP27の発現誘導が抑制され、細胞の温熱耐性能が減少している。MuV感染細胞の熱ショック蛋白質発現誘導能はSTAT1蛋白質発現プラスミドの導入により回復することから、化学ストレスにより誘導されるHSP27の発現にはSTAT1蛋白質が関わること、またMuV感染細胞の温熱耐性能減少の原因がウイルスV蛋白質によるSTAT1蛋白質の分解によることが明らかになった。[久保田耐、横沢紀子*、横田伸一*、藤井暢弘*:*札幌医大]

Ⅴ. インターフェロン･サイトカイン・重症急性呼吸器症候群（SARS）に関する研究

1. センダイウイルス(SeV)C蛋白発現L細胞でのアポプトーシス抑制

センダイウイルス(SeV)C蛋白発現L細胞ではIFN感受性が全くみられないばかりかPoly(I):Poly(C)およびウイルスにより誘導されるIFN産生能も80%程度抑制される。このC蛋白発現細胞でのIRF3のリン酸化によるホモダイマー形成、核内移行は正常細胞と差がなかった。一方、このC蛋白発現細胞ではPoly(I):Poly(C)ーリポソーム、2重鎖RNAレオウイルスによるアポーシスも抑制された。またTNFによるアポーシスも顕著に抑制され、相互の相乗的、相加的効果も抑制された。SeV C発現細胞では生体内での細胞死からこれらのメカニズムによって免れることが持続感染の必要条件と思われる。
[小長谷昌功、宮嶋直子、荻野利夫、斉藤早久良]

2. 新規国際標準品αLyと国内標準品の力価の整合性に関する研究

天然型インターフェロンIFNαLyの国際標準品が更新され、共同研究に参加した。しかし、その最終力価が国内標準品(J501)と30%程度のズレがあることが、国内企業から指摘され、力価試験を実施したところ、指摘通りであることが確認された。その件についてWHO 標準品委員会に申し入れ、我が国の企業だけの生産品であるので、国際標準品の力価変更を要望した。WHO専門家委員会への議題提出を求めたが他国における生産計画がないことを確認したうえで、正式議題とする方針となった。[小長谷昌功、宮嶋直子、荻野利夫、斉藤早久良]

3. 天然型IFN-βの国際、国内標準品更新に関する研究

国際標準品の更新の共同研究に参加し、CHO細胞由来糖付加型IFNーβ(00/572)が次期の国際標準品として認定された。その際、東レが供給した天然型IFN-βでNIBSCが作成した凍結乾燥アンプル(00/576)が不要になったので、それを譲り受け、次期国内標準品とすることとなり、検定検査協議会で承認を受けることとなった。総本数2000本の内、感染研が300本程度保管し国内標準品として配布することになっている。
[小長谷昌功、宮嶋直子、荻野利夫、斉藤早久良]

4. 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。昨年に

引き続き IFN に対する抵抗性のメカニズムについて検討した。SeV-C 蛋白発現 HeLa 細胞では IFNγ 処理後リン酸化された STAT1 が巨大分子を形成して蓄積していくことが明かにされた。この原因として、正常な脱リン酸化反応が起きない機構が働いている可能性が考えられ、現在さらに検討を加えている。[斉藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、加藤篤、小長谷昌功]

5. 二本鎖 RNA 依存性蛋白リン酸化酵素(PKR)について

昨年に引き続き、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とアミノ酸の置換体を大腸菌に発現させ、精製法を改善して、凝集体らしい分子を除き、基質として用意し、我々のところで部分生成した PKR を用いてリン酸化反応を行ったところ、天然型の aIF2α 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明確になった。また、古細菌中にも aIF2αをリン酸化する活性が検出された。[斎藤早久良、田原舞乃*、木村誠*、加藤篤、
小長谷昌功、:*九州大学]

6. 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、ニューカッスル病ウイルス、ニパウイルス、麻疹ウイルスの 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おり、また STAT1 と V 蛋白質の結合と抗 IFN の発揮との間の相関が無いことが判明した。[加藤 篤、小長谷昌功、
田代眞人、永井美之*:*富山衛研]

7. SARS ワクチンの緊急開発に関する研究

2002 年の 11 月に中国南部の広東省で起こった非定形肺炎の集団発生に端を発した重症急性呼吸器症候群(SARS)は、2003 年 7 月 5 日に WHO から終息宣言が出されるまでの間に、東アジア諸国を中心として世界 32 ヶ国に広がり、8422 人の感染者と 916 人の死者を出した。わが国では SARS 対策のひとつとして科学技術振興調整費による感染研吉倉所長を班長とする「SARS の診断及び検査手法に関する緊急調査研究」班が組織され、ウイルス第3部では所内の関連部署の協力を得て「SARS 診断系の開発」(分担研究者、田代)、「SARS ワクチンの開発」(分担研究者、小田切)に関する共同研究を行った。

「SARS ワクチンの開発」研究グループにおいては、弱毒型ワクシニアウイルスベクターを用いた SARS 成分ワクチンおよび遺伝子組み換え人工ウイルスワクチンの作製が行われ、ベクターに E+M 遺伝子、E+M+S 遺伝所を組み替えたウイルスの作製に成功した。また、不活化全粒子ワクチンを開発するために、アルムアジュバントおよび経鼻免疫用のアジュバントを用いた試作ワクチンをマウスに接種して種々の免疫効果について検討した。さらに、ワクチンの有効性を評価するための動物実験モデル系の検索を行い、マウス、ラットが有用であることを見つけ、SARS ワクチンの開発に関する基礎研究を行った。
[小田切孝人、板村繁之、西藤岳彦、田代眞人;森川茂*、西條政幸*、石井孝司**、鈴木哲朗**、宮村達男**、高須賀直美***、藤井英樹***、横田恭子***、竹森利忠***、長谷川秀樹****、永田典代****、岩田奈織子****、佐藤由子****、原嶋綾子****、佐多徹太郎****、網康至***** :*ウイルス第1部、**ウイルス第2部、***免疫部、****感染病理部、*****動物管理室]

8. WHO-SARS 研究ネットワークへの参加と病原体同定、
診断方法・ワクチン開発における国際協力

昨年度後半から中国南部を基点に東南アジアから全世界へ広がった SARS については、病原体の特定と診断方法の確立を目的とした 9 カ国 11 研究機関(後に中国の 2 研究機関が参加)で構成される WHO-SARS 研究ネットワークが組織された。ウイルス第 3 部に設置されている WHO インフルエンザ協力センターがこれに指定され、ウイルス第 1 部、感染病理部との協力の下に、病原の検索、同定に協力した。さらに診断方法として、RT-PCR のプライマーの評価など至適条件の決定、ELISA や中和試験など抗体価測定方法を確立した。またウイルスの熱安定性、不活化条件、消毒剤の効果など、実験操作上の安全確保と公衆衛生対策に必要な条件を解明した。これらの情報や検査試薬などを国内外の検査研究機関へ提供し、技術支援を行った。さらに、WHO 西太平洋地域 SARS レファランス検査機関のも指定され、国内外から送付された多数の臨床検体について、ウイルス分離、同定、遺伝子診断、抗体検査を行った。一方、WHO-SARS 専門家会議など多くの WHO 会議に参画し、自然宿主と感染伝播経路、感染発症機構、ウイルスおよびその取り扱いに関

する安全性評価、感染防御免疫機構、感染・発症予防および治療方法などの研究領域の優先度、ワクチン開発および抗ウイルス剤開発の方向性等について、提言を行った。[小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、二宮愛、今井正樹、斎藤利憲、田口文広、松山州徳、田代眞人]

9. SARS に関する緊急研究業務

SARS に対する緊急対応の一環として、感染研内に、ウイルス第 1 部、ウイルス第 2 部、ウイルス第 3 部、感染病理部、獣医科学部、免疫部、遺伝子解析室、実験動物管理室、バイオセフティー管理室より構成される共同研究グループを構成した。緊密な協力体制を構築し、遺伝子塩基配列の系統的解明、各ウイルス遺伝子クローニングと発現、感染細胞・ウイルス抗原の大量作製、各種抗体・モノクローナル抗体作製、抗原エピトープの同定、動物モデル開発などの SARS 研究に必要な材料・情報を作成し共有した。次に、これらを駆使して、自然宿主の検索、感染発症・病理機構の解析、組換えウイルス蛋白を利用した安全な抗体検査系の開発、不活化ワクチン・ウイルス様粒子ワクチンの開発、抗ウイルス剤のスクリーニングと動物モデルでの効果検証、有効な消毒方法の確立、実験室レベルの安全確保などに関する研究を、効率よく推進した。[小田切孝人、板村繁之、西藤岳彦、田代眞人;森川茂*、西條政幸*、石井孝司**、鈴木哲朗**、宮村達男**、高須賀直美***、藤井英樹***、横田恭子***、竹森利忠***、長谷川秀樹****、永田典代****、岩田奈織子****、佐藤由子****、原嶋綾子****、佐多徹太郎****、網康至***** :*ウイルス第1部、**ウイルス第2部、***免疫部、****感染病理部、*****動物管理室]

10. SARS-CoV のランプ法による迅速遺伝子診断法の確立

重症急性呼吸器症候群 SARS の診断法として、SARS-CoV 遺伝子の検出、感染性ウイルスの分離の他に中和試験や蛍光抗体法等の血清学的診断法がある。この中で SARS 発症初期の診断法としては、迅速性、感度などの点から遺伝子検出法が最も優れている。これまで WHO の提唱したプライマーを用いた逆転写遺伝子増幅法(RT-PCR)による診断が一般的であったが、栄研化学が開発した loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法の有用性について栄研化学の協力のもとに検討した。WHOからのSARSサンプルの blind test では、10コピー以上を検出することが可能であり、世界の SARS レファレンスラボが同時に行った結果と比べて、陽性率、SARS 遺伝子濃度で100%の正解率を示し、極めて特異性及び感度の高い検査法であることが証明された。また、ベトナムからの SARS 患者検体(血清)を用いて検討した結果、ランプ法は従来の RT-PCR 法と比べ感度が高く、高率に検体中の遺伝子検出が可能であった。また、通常の RT-PCR 法では反応時間が2-3時間必要とするが、ランプ法では約 30 分であり、迅速診断法としては、非常に優れていることが証明された。SARS では発症直後の患者からのウイルス遺伝子の検出率が低いことが問題となっているが、患者検体量を増やしウイルス遺伝子を濃縮することにより、更に感度を上げる方法を開発することが今後も課題である。[納富継宣*、田口文広、板村繁之、松山州徳、水谷哲也**、源原博子***、田代眞人:*栄研化学(協力研究員)、**ウイルス第1部、***血液・安全性研究部]

11. SARS-CoV の細胞内侵入に関する研究

SARS-CoV は標的細胞に侵入する際、粒子表面のS蛋白と細胞表面のレセプターとの相互作用により膜融合が惹起されると考えられる。最近、200kD のS蛋白がトリプシンにより解裂して 100kD になると膜融合が誘導されること、またS蛋白の解裂活性化はエンドソーム内で起こっている可能性があることが示された。この新しいメカニズムを解析するために、SARS のS蛋白のトリプシンおよび他のプロテアーゼに対する感受性を調べた。その結果、trypsin、 thermolysin、等で処理した感染細胞では、1 時間以内に強い細胞融合が認められ、200kD の S 蛋白は 100kD に解裂しており、これは抗体の認識部位から膜貫通S2サブユニットと推定された。Chymotrypsin 等の 処理では細胞融合は弱く、S 蛋白の 200kD 及び 100kD の両バンドは消失した。collagenase では細胞融合は全く起こらずS蛋白の解裂も見られなかった。プロテアーゼ処理後に残存する 100kD の S2 の存在と膜融合活性の発現が並行することから、S 蛋白の活性化には、S蛋白の解裂と、S2 が分解されずに残ることが必要であると推測できる。また 100kD の S2 はこれらのプロテアーゼに耐性であることから、S2 の構造変化産物として知られている6-helix bundle である可能性がある。今後、プロテアーゼがS蛋白にどのような構造変化を起こさせ、その変化が脂質二重膜にどう作用するのか、またエンドゾームの酸性条件下でも同様の変化が起るのか等を明らかにしたい。[松山州徳、川瀬まゆみ、石井孝司*、森川茂**、田代眞人、田口文広:*ウイルス第1部 、 **ウイルス第 2 部]

12. SARS-CoV S タンパクの解裂に関する研究

SARS-CoV の細胞内侵入(膜融合)には S 蛋白の解裂が重要であることが示唆されている。SARS-CoV による膜融合に S 蛋白の解裂

がどのように関与しているのかを知る目的でSARS-CoV S蛋白の宿主プロテアーゼよる解裂予想部位(マウス肝炎ウイルス(MHV)の解裂部位からの類推)に解裂シグナルを導入した変異S蛋白を作製し、その細胞融合能について検討した。SARS-CoV S蛋白中程には2か所の塩基性アミノ酸クラスター[アミノ酸758-761(1)、793-797(2)]が存在する。各々の部位をMHVS蛋白の宿主プロテアーゼ依存性の解裂シグナルと類似のアミノ酸配列に置換した変異SARS-S遺伝子を作製し(各々CL1、CL2と命名)、Vero E6細胞で発現させた。解裂シグナルを持たない親株S、CL1蛋白は細胞融合活性を示さなかったが、CL2発現細胞では細胞融合が認められた。これらの結果から、SARS-CoV S蛋白はCL2部位における特異的な解裂により細胞融合活性を獲得することが推測された。今後、CL1,CL2蛋白の解裂性を検討すると共に、CL2S蛋白を持つpseudotypeレトロウイルスを用いて、SARS-CoVの細胞内侵入にエンドゾームの酸性環境が必須か否かについて検討したい。

[前島雅美、福士秀悦*、松山州徳、川瀬まゆみ、中垣慶子、
森川茂*、田代眞人、田口文広:*ウイルス第1部]

Ⅵ. その他の研究

1. ワクチンの品質管理に関する検討

牛血清には高率に牛ポリオーマウイルス(BPyV)遺伝子が混入していることが報告されている。我が国においても50%以上の牛血清にBPyV遺伝子の混入が確認されている。現在の所BPyV遺伝子の検出が感染性ウイルスの存在を意味するかどうか、またヒトへの危険性について不明ではあるが、麻しん、風しん等多くの生ウイルスワクチンはその製造に牛血清を使用しているため、BPyV遺伝子がワクチン中に混入する可能性がある。そこで、麻しん、風しん、おたふくかぜ生ワクチンからBPyV遺伝子の検出を行ったところいずれのワクチンからもBPyV由来遺伝子は確認されなかった。[大槻紀之、伊藤治*、海野幸子、
加藤宏幸、田代眞人:*農林水産省動物医薬品検査所]

2. 痘瘡ワクチンの品質管理に関する検討

LC16m8(m8)株は千葉県血清研究所で開発された弱毒痘瘡ワクチン株である。しかし、m8株には復帰変異が起こり、病原性の昂進したリバータントウイルス(RV)が出現することが分かっている。RVの混入は痘瘡ワクチンの安全性に直接関わる問題であることから、痘瘡ワクチンの安全性を評価するための動物モデルを検討した。ウサギ皮膚反応試験ではRV含有率の異なるウイルス液(0.03%, 0.8%, 4.0%, 40.0%)をウサギの皮内に接種し、発赤の程度(ErD50値)を比較した。その結果、RV含有率が5%を越えるとErD50値に有意差が出ることが示唆された。SCIDマウス感染実験では、RVとm8株との病原性の差が約1000倍有ることが示され、この系によって痘瘡ワクチンの安全性を高感度に評価できる事が示された。[木所 稔、森川茂*:*ウイルス第1部]

検定、検査、審査

検 定

インフルエンザワクチン	小分製品	60件
乾燥弱毒生風しんワクチン	中間段階	2件
	小分製品	18件
弱毒生麻疹ワクチン	中間段階	1件
	小分製品	20件
γグロブリン製剤の麻疹抗体力価測定		194件
乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン	中間段階	0件
	小分製品	8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	22件
風疹ウイルスの遺伝子検出	3件
麻疹ウイルスの分離、同定	5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	1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)
シェリング	IFN-α2b	3
武田薬品	IFN-α2a	1
ロッシュ	IFN-α2a	3

インターフェロンの特別審査

(製造所)	(IFN型)

山之内製薬　　IFN-rα（コンセンサス）
中外製薬　　IFN-rα　（ペグ化製剤）

発表業績一覧

Ⅰ　誌上発表

1．　欧文発表

1)　McKimm-Breschkin, J., Trivedi, T., Hampson, A., Hay, A., Klimov, A., Tasihro, M., Hayden, F., Zambon, M. : Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir. Antimicrobial agents and Chemotherapy 47, 2264-2272 (2003)

2)　Haazmans, B. L., Kuiken, T., Martina, B. E., ouchier, R .A. M. F., Remmelzwaan,G. F., Amerongen, G. V., Rhiel, D. V., Rhiel,T., Itamura, S., Chan, K-H., Tashiro, M., Osterhaus,A.D. M.E. :Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in maacaques. Nature Med. 10, 1-4 (2004)

3)　Poon ,L.L.M.W., Leunga,C.S., Tashiro.M., Chan, K.H., Wong, B.W.Y., Yuen, K.Y., Guan, Y., Peiris, J.S.M, :Rapid Detection of SARS Coronavirus by Loop-mediated Isothermal Amplification. Clin. Chem. 50, 1050-1052 (2004)

4)　Nakajima, N., Asahi-Ozaki,Y., Nagata, N., Sato, Y., Dizon, F., Paladin, F.J., Olveda,R.M., Odagiri,T., Tashiro,M and Sata, T.: SARS coronavirus-infected cells in lung detected by new in situ hybridization technique. Jpn. J. Infect.Dis., 56, 139-141 (2003)

5)　Kawakami, C., Saito, T., Nakaya, Y., Nakajima, S., Munemura, T., Saikusa, M., Noguchi,Y., Fujii, K., Takaoka, M., Ito, R., Saito, T., Odagiri, T. and Tashiro, M.: Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan. Jpn J Infect Diseases 56:110-113 (2003)

6)　Imai, M., Watanabe, S., Odagiri, T. : Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. Archives of Virology148: 1873-1884 (2003)

7)　Watanabe, S., Imai, M., Ohara, Y., Odagiri, T. : The influenza B virus BM2 protein is transported through the *trans* Golgi network as an integral membraneprotein. J Virol. 77: 10630-10637 (2003)

8)　Obuchi, M., Fernandes, M. and Barber, G. N. : Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. J Virol. 77:8843-8856 (2003)

9)　Park,C.H., Matsuda, K., Sunden, Y., Ninomiya, A., Takada, A., Ito, H., Kimura, T., Ochiai, K., Kida, H., Umemura, T. :Persistence of viral RNA segments in the central nervous system of mice after recovery from acute influenza A virus infection. Vet. Microbiol. 97:259-268 (2003)

10)　Tanaka, H., Park, C. H., Ninomiya, A., Ozaki, H., Takada, A., Umemura, T.,Kida, H. :Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. Vet. Microbiol. 95:1-13 (2003)

11)　Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A., Kawaoka, Y., Kida, H. :Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. Vaccine 21:3212-3218 (2003)

12)　Koyama, H. A., Irie, H., Kato, A., Nagai, Y., Adachi, A. : Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. Microbes Infect. 5:373-378 (2003)

13)　Yokota, S., Yokosawa, N., Kubota, T., Okabayashi, T., Arata, S., Fujii, N. : Suppression of thermotolerance in mumps virus-infected cells is caused by lack of HSP27 induction contributed by signal transducer and activator of transcription-1. J Bio. Chem. 278:41654-41660 (2003)

14)　Yokota, S., Saito, H., Kubota, T., Yokosawa,N., Amano,K., Fujii, N. : Measles virus suppresses interferon-α signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-α receptor complex. Virology 306:135-146 (2003)

15)　Tahara, M., Ohsawa, A., Saito, S., Kimura, M. :*In vitro* phosphorylation of initiation factor 2 α (aIF2 α) from

hyperthermophilic *Archaeon Pyrococcus horikoshii* OT3. J.Biochemistry 135:479-485 (2004)

16) Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M., Tashiro, M. : Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by SLAM(CD150)-independent mechanism. Virus Research 94 : 11-16 (2003)

17) Takeuchi, K., Kadota, S., Takeda, M., Miyajima, N., Nagata, K. : Measles virus V protein blocks interferon(IFN)-α/β but not IFN-γ signaling by inhibiting STAT1and STAT2 phosphorylation. FEBS letter 545 : 177-182 (2003)

18) Miura, S. H., Nakagaki, K. and Taguchi, F. : N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein. J. Virol. 78, 216-223 (2004)

1. 和文発表

1) 二宮愛、小田切孝人: SARS の診断 臨床医 29:1922-1929 (2003)

2) 小田切孝人: 近年のインフルエンザの流行状況。Pharma Medica 21: 23-28 (2003)

3) 西藤岳彦: インフルエンザの種間伝播 インフルエンザ 4: 150-154 (2003)

4) 西藤岳彦: インフルエンザ・SARS 化学療法の領域 20: 209-215 (2003)

5) 小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代眞人: SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果。インフルエンザ 5:35-24 (2004)

6) 小田切孝人: 東アジア諸国で大流行している高病原性トリインフルエンザウイルス。小児科 45:434-439 (2004)

7) 小田切孝人: SARS の検出 からだの科学[増刊]9-14 (2004)

8) 板村繁之: インフルエンザワクチン. Mebio 20 (11) : 79-83 (2003)

9) 板村繁之: 動物インフルエンザウイルスならびに香港 H5N1 ウイルスの近況 Pharma Medica 21 (11) : 55-60 (2003)

10) 板村繁之: 重症急性呼吸器症候群(SARS)とインフルエンザ-病原体 臨床と微生物 31:65-71(2004)

11) 齋藤義弘、坂田宏子、佐藤威、田代眞人:Vero/hSLAM 細胞での麻疹ウイルスの分離 病原微生物検出情報 25 (3): 14-15(2004)

12) 岡田晴恵:麻疹. INFECTIOUS DISEASES REPORT, 7, 2003

13) 浜端宏英、知念正雄、安次嶺馨、小濱守安、高良聡子、岡田晴恵、佐藤 威、田代眞人:乳児に対する麻疹ワクチン接種の評価 外来小児科 6(3):220-228(2003)

14) 岡田晴恵、田代眞人:重症急性呼吸器症候群(SARS)の流行と対応. 科学 73(7): 723-730(2003)

15) 岡田晴恵、山田明:感染症対策(2) 科学 73(8): 842-846 (2003)

16) 岡田晴恵:増えつつある医療従事者の感染症 労働と健康 29(5): 16-17(2003)

17) 岡田晴恵、田代眞人:新型インフルエンザ大流行の脅威と問題点 科学 73(10): 1089-1097 (2003)

18) 岡田晴恵:SARS 流行の被害を追う 綜合臨床 52(10): 2720-2721 (2003)

19) 岡田晴恵、田代眞人:インフルエンザワクチン(1) 科学 73(11):1192-1199(2003)

20) 岡田晴恵、田代眞人:インフルエンザワクチン(2)科学

73(12): 1280-1287(2003)

21) 岡田晴恵、坂東昌子、その他共著:生命のフィロソフィ世界思想社: (2003)11 月

22) 岡田晴恵、田代眞人:感染症とたたかう 岩波新書:(2003)12 月

23) 田代眞人、岡田晴恵:新型インフルエンザ大流行の脅威と対策 最新医学社 59(2): 7-14(2004)

24) 岡田晴恵:成人麻疹の増加とその背景 Medical Tribune37(7): 48-49 (2004)

25) 岡田晴恵:IgG avidity 検査 臨床と微生物 31(2):(2004)

26) 岡田晴恵:麻疹IgG抗体のavidity測定の臨床的意義 病原微生物検出情報 25(3): 15-16(2004)

27) 飯田章博、加藤 篤.:センダイウイルスベクター ウイルス 53:171-175 (2003)

28) 加藤 篤 :センダイウイルスベクター 実験医学別冊「遺伝子導入と発現解析プロトコール」羊土社 98-106 (2003) 9 月

29) 永田恭助、加藤 篤 : RNA ウイルス複製機構解明がもたらすもの 蛋白質核酸酵素 48:1333-1338 (2003)

30) 加藤 篤 :センダイウイルスアクセサリーC 蛋白質の機能 蛋白質核酸酵素 48:1364-1370 (2003)

31) 杉本正信、大石和恵、木所 稔、橋爪 壮 : 国産天然痘ワクチンの新たな役割 蛋白質核酸酵素 48:1693-1701 (2003)

32) 竹田誠、宮嶋直子、竹内薫:麻疹ウイルス研究のあらたな展開 医学のあゆみ205 : 285-290 (2003)

33) 田口文広:コロナウイルス 臨床医 29(11):1947-1950((2003)

34) 田口文広:SARS ウイルスの起源とコロナウイルス 化学療法の領域 20(1): 24-32 (2004)

35) 田口文広:SARS コロナウイルスの基礎ウイルス学 インフルエンザ5(1):21-27(2004)

36) 田口文広:SARS コロナウイルス ウイルス 53(12):201-209(2003)

37) 松山州徳、多田有希、岡部信彦、田代眞人、田口文広:重症急性呼吸器症候群(SARS)材料取り扱いのための WHO バイオセーフテイガイドライン 臨床検査 48 :43-50 (2004)

Ⅱ 学会発表

1. 国際学会

1） 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, Japan, January 8-10, 2003.

2） Watanabe, S., Imai, M. and Odagiri, T.: The influenza B virus BM2 protein is transported in cytoplasm through the trans-golgi network as an integral membrane protein. 12th International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June 14-19,2003

3） Imai, M., Watanabe, S., Ninomiya, Ai. and Odagiri, T.: Integral membrane protein BM2 of influenza B virus is a necessary component for generation of infectious virus. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan, October 7-11, 2003.

4） Imai, M., Mizuno, T. and Kawasaki, K. : Numbers of influenza hemagglutinin trimers necessary for membrane fusion: a kinetics examination with single particle analysis of reconstituted vesicles of hemagglutinin. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan, October 7-11, 2003.

5) Thant, K-Z., Katow, S., Nakajima, S., Kato, H., Umino, Y., Myint, T-T, Moe, K., Thein, S.,: Molecular epidemiology of Myanmar rubella virus strain at the beginning of the 21. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia, December7-10, 2003

6) Okada, H., Sato, T., Kashiwagi, R., Naoi, T., Hamano, K.,

Yamada, A., Tashiro,M. : Distinctions between primary infection of measles and secondary vaccine failure in adolescents and young adults in Japan. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Malaysia, December 7-10, 2003

7） Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., Tashiro, M., Kato, A., Fujii, N. : Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT1 from the alpha interferon receptor complex. XII International Conference of Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June 14-19, 2003

8） Kato, A., Grogan, C.C., Sugahara, F., Sakaguchi, T., Moyer, S.A., Tashiro, M., Nagai, Y. :Identification of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically required for its interferon antagonism. XII International Conference of Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, June 14-19, 2003

9) Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Tashiro, M., Yanagi,Y. and Nagata,K. : Involvement of P/C/V and M genes in regulating cell specificity of measles virus infection, 12th international conference on negative strand viruses, Pisa, Italy, June 14-19,2003

10) Taguchi, F., Matsuyama, S. and Miura-Suzuki, H. :Fusogenic activation and conformational changes of murine corona virus spike protein by soluble receptor. IXth International Symposium on Nidoviruses, Egnond ann Zee, The Netherlands, May 24-29, 2003

11) Miura-Suzuki, H. and Taguchi, F. :N terminal domain of murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation of spike protein. Ixth International Symposium on Nidoviruses, Egnond ann Zee, The Netherlands, May 24-29, 2003

12) Taguchi, F. :Entry mechanism of murine coronavirus. Minophagen symposium on ″The present and future of the SARS research″. Tokyo, Japan, Dec. 8, 2003

13) Taguchi, F., Matsuyama, S. :Cell entry mechanism of murine coronavirus: Fusogenic activation and conformational changes of the spike protein by soluble receptor. Second Japan-China symposium on infectious diseases,Hong Kong, China, February 18, 2004

2. 国内学会

1) 小田切孝人、西藤岳彦、斉藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、山下和予、岡部信彦、田代眞人: 2002/2003 シーズンのインフルエンザウイルス流行株について、 第24回衛生微生物技術協議会研究会 福岡、2003年7月

2) 小田切孝人:SARSの実験室診断, 第24回衛生微生物技術協議会 福岡、2003年7月

3) 小田切孝人: SARSのウイルス学的診断とワクチン開発の展望 第7回日本ワクチン学会 名古屋、2003年10月

4) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小田切孝人: リバースジェネティクス法によるB型インフルエンザウイルス BM2変異株の作製とBM2蛋白質の機能解析、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

5) 森川茂、板村繁之、西藤岳彦、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代眞人: 重症急性呼吸器症候群 (SARS)の血清診断、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

6) 板村繁之、二宮愛、西藤岳彦、森川茂、西條政幸、小田切孝人、倉根一郎、田代眞人:RT-PCR 法による重症急性呼吸器症候群 (SARS)コロナウイルスの検出感度の検定、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

7) 小田切孝人、西藤岳彦、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代眞人: 2002/2003 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 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、2003年10月

8) 中島典子、尾崎康子、永田典代、佐藤由子、樋口好美、小田切孝人、田代眞人、佐多徹太郎: ホルマリン固定パラフィン法米剖検肺組織標本におけるSARSコロナウイルス感染細胞の同定、第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、

2003 年 10 月

9) 今井正樹、水野敬文、川崎一則:インフルエンザウイルス膜融合の最小ユニット:必要なヘマグルチニン分子数について Ⅲ、第 41 回日本生物物理学会年会、新潟、2003 年 9 月

10) 今井正樹:B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白の性状と機能、RNA ウイルス研究の新展開 Ⅲ、鈴鹿、2004 年 3 月

11) 海野幸子、加藤宏幸、田代眞人、中島節子:風疹ワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子配列及び抗原性の比較、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2003 年 10 月

12) 大槻紀之、田口邦史、千田恵、伊藤治:組織培養用牛由来血清からのウシポリオーマウイルス遺伝子断片の検出、第136回日本獣医学会学術集会、青森、2003 年 10 月

13) 能田健、大槻紀之、永井英貴、PKR クマール、関谷聡、西川諭:リアルタイム PCR による RNA アプタマー定量法の検討、第 136 回日本獣医学会学術集会、青森、2003 年 10 月

14) Hussam Alhaji Ali、沢田拓士、畠山仁、片山芳也、大槻紀之、伊藤治:Invasion of chicken embryo fibroblast cell monolayer by Pasteurella multocida、第 136 回日本獣医学会学術集会、青森、2003 年 10 月

15) 海野幸子、堀内善孝、加藤宏幸、大槻紀之:風疹抗体測定法のための国内標準品の作製、第3回抗体測定法研究会 東京、2004 年 2 月

16) 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 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月

17) 齋藤義弘、坂田宏子、田代眞人:過去 20 年間における筋注用γグロブリン製剤中の麻疹ウイルス抗体価の推移、第44回日本臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月、

18) 齋藤義弘、堀内善信、田代眞人:HI 法、EIA 法、NT 法に対する抗麻疹標準血清作製の試み、第4回抗体測定法研究会、東京、2004 年 2 月

19) 岡田晴恵、秋元未来、佐藤威、田代眞人、高山直秀、武内可尚:成人麻疹の病態解析(初感染患者とSVF 例の血清学的鑑別および免疫病態・臨床症状の比較)、第 44 回日本臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月

20) 秋元未来、岡田晴恵、齋藤義弘、田代眞人:若年成人(大学生)における麻疹のキャンパス内流行の調査について、第44回日本臨床ウイルス学会、鹿児島、2003 年 6 月

21) 加藤 篤:ウイルス感染とインターフェロン・サイトカインシステムからの回避、第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、東京、2003 年 7 月

22) 飯田章博、井上 誠、喜納宏昭、徳炭由美子、北里海雄、朱亜峰、加藤 篤、永井美之、長谷川護:細胞質遺伝子治療の確立へ:リバースジェネティクスを活用した遺伝子治療用センダイウイルスベクターの開発、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

23) 井上 誠、金谷 匠、徳炭由美子、秋葉栄治、加藤 篤、坂口剛正、永井美之、飯田章博、長谷川護:センダイウイルスM蛋白質の微小管経由による細胞質内輸送:F、HN、C 蛋白質との複合体形成と RNP とは別ルートでの輸送、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

24) 加藤 篤、久保田 耐、小長谷昌功、田代眞人、永井美之:センダイウイルス C 蛋白質の抗インターフェロン効果と RNA 合成抑制能、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

25) 斎藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、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−その 2−、第 51 回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10 月

26) 木所 稔、田代眞人、堀内 清、志田壽利:痘瘡ワクチン株 LC16m8 由来リバータントウイルスの生物学的性状の解析、

第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

27) 栗原由紀子、砺波一夫、尾関英徳、福原茂朋、油谷浩幸、加藤 篤、栗原裕基:頭部/心臓神経堤細胞の発生分化におけるEndothelin-1の役割、第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

28) 加藤 篤、小長谷昌功、久保田 耐、田代眞人、永井美之:宿主自然免疫に対抗するセンダイウイルスC蛋白質、第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

29) 砺波一夫、栗原由紀子、油谷浩幸、加藤 篤、栗原裕基:鰓弓形成に関与するEndothelin-1の下流遺伝子の同定:DNAマイクロアレイを用いた検討、第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月

30) 横沢紀子、横田伸一、岡林環樹、久保田耐、藤井暢弘:ムンプスウイルスVタンパク質によるSTAT1およびSTAT3のユビキチン化機構の解析、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

31) 小長谷昌功、斎藤早久良、荻野利夫、宮嶋直子、加藤篤:SeV C発現細胞における2本鎖RNA 誘導性細胞死の抑制と影響因子、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

32) 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蛋白質による抗IFN活性の分子機構の解析、第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会、東京、2003年7月

33) 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蛋白質によるI型IFN情報伝達経路の阻害機構の解析、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

34) 竹内薫、宮嶋直子、竹田誠、田代眞人、永田典代、柳雄介,永田恭介:CD46,SLAM(CD150)を経由しない麻疹ウイルスの感染機構、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003 年 10月

35) 竹内薫、門田伸一、宮嶋直子、竹田誠、永田恭介:麻疹ウイルスの細胞指向性を規定するウイルス側因子と細胞側因子、科学研究費(C)企画シンポジウム「RNAウイルス研究の新展開Ⅲ.」鈴鹿、2004年3月

36) 中垣慶子、中垣和英、田口文広:マウス肝炎ウイルス神経病原性の大脳培養細胞を用いた解析:第一標的細胞と受容体発現細胞、第7回日本神経ウイルス研究会、帯広、2003 年 9月

37) 中垣慶子、中垣和英、田口文広:マウス肝炎ウイルス神経病原性の大脳由来の培養細胞を用いた解析:第一標的細胞と受容体発現細胞、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

38) 三浦秀佳、中垣慶子、田口文広:マウスコロナウイルス受容体の活性中心に関する研究、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

39) 田口文広:マウスコロナウイルスと受容体の相互認識機構、第15回獣医免疫研究会、東京、2003年8月

40) 田口文広:SARS(重症急性呼吸器症候群)の対策—動物感染症の研究の経験から、第136回日本獣医学会、青森、2003年10月

41) 田口文広: コロナウイルス、第41回日本細菌学会中部支部総会、新潟、2003年10月

42) 田口文広: ウイルス学的に見た SARS ウイルス、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

43) 田口文広:SARSウイルスの正体—診断法はどこまで進化したか、第8回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、東京、2004年3月

4. 細 菌 第 一 部

部 長　渡 辺 治 雄

日本全国の地方衛生研究所の協力の下に、集団感染症事例を科学的に迅速に把握するためのシステムとして、分子疫学的手法(現在のところはPFGEを用いている）を用いたネットワークPulse-net Japanの構築を進めてきている。その成果としていくつかのdiffuse outbreakを迅速に検出してきており、厚生科学事業の成功例の一つとして取り上げられている。このシステムを特に国境を越えた細菌感染症の迅速検知に利用するため、アジア地域をネットワーク化（Pulse-net Asia）する試みが行われてきている。アジア諸国（中国、インド等の１２カ国）および米国CDCの参加の元に、第２回会合が2004年３月に香港で開催され、PFGE手法の標準化に向けて動き出した。現在のところこのネットワーク化の維持のための大きな問題点はfundingである。種々の感染症がアジアを基点として発生し伝播してきている事実からすれば、アジア地域の病原体解析ネットワーク化は、感染症制御の観点からも重要な課題である。またこのようなネットワーク化は、人的なコミュニケーションの確保のためにも重要である。研究者間の人的つながり程、迅速な情報交換の場として効果的なものはない。この推進を図っている予定である。

今年度の新しい研究成果としては、感染した生体内で病原菌が発現している物質を検索する試みを行い、新しい病原性因子あるいは感染防御因子を発見してきている。ひとつはレプトスピラのLigA,Bタンパク質（感染防御因子として機能し、ワクチン候補因子である)、もうひとつはレジオネラのLaiAタンパク質（レジオネラの肺胞上皮細胞接着因子として機能している）である。また、病原性遺伝子の発現に関する研究においても新しい知見が得られている。赤痢菌の侵入性因子の発現調節に関与する２成分制御系CpxA-Rの役割分担に関する知見、および腸管出血性大腸菌の病原因子の発現に関与する調節因子としてのPchABCの存在とその意義に関する研究等がある。これらの研究成果が、実際の感染症の制御に寄与するように発展することが期待される。その他、サルモネラのニューキノロン剤に対する新規耐性菌の発見、髄膜炎菌の髄液内での増殖に関与する*ggt*の研究、ボレリアの遺伝子解析系の開発、ブドウ球菌の細胞壁合成に関する研究、レンサ球菌の劇症型菌の変遷に関する研究等に関して多くの成果が出ている。

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、人畜共通感染症，薬剤耐性機序、バイオテロ対策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、平成15年4月1日付けで，常　彬が第三室研究員に、志牟田健が第五室研究員に、中尾龍馬が第六室研究員に採用された。また、平成16年3月31日付けで北村勝が退官した。森田昌知、三浦雅史、小林静史、谷屋貴之、江嵜英剛，菅原大輔、茂木瑞穂、浜田具之、M.A.Salam，津覇雄三、田村昇平、富永燦、奥田健次郎、大部宏子、竹下精香、Somjai Phaisomboon，村井美代、井上伸子、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、大澤朗，久代明，橋本れい子，財津法子、浅原純代、松永聡子、野尻直未、斉藤康憲、鈴木玲子、佐藤裕美、高井信子、森佳津美らが協力研究員，研究生、臨職等で研究に参加した。

研　究　業　績

Ⅰ. 病原性大腸菌に関する研究

1.　細菌学的、疫学的研究

（１）平成 15 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 15 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 1,758 株で、その内で O157:H7 および O157:H- は 1,353 株、それ以外の大腸菌血清型別の依頼株は 405 株であった。O157 以外の血清型は 34 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-で、その傾向は例年とほぼ同様であった。（田村和満、寺島淳、伊豫田淳）

（２）腸管出血性大腸菌 O157 のファージ型別による解析

2003 年に送付された腸管出血性大腸菌 O157 のうち、132 株についてファージ型別を実施した。主なファージ型（PT）は、PT14 が 25%、PT4 が 10%、PT33 が 9%、PT２が 7%であった。昨年 22%を占め、最も多く検出された PT33 は 3 位に後退した。（泉谷秀昌、渡辺治雄）

（３）腸管出血性大腸菌の PFGE による DNA 型別

2003 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 のうち 1472 株および O26, O111 等を含むその他の血清型 369 株、また 2002 年以前に分離された腸管出血性大腸菌 206 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。2001, 2002 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が、その頻度は約 5%であった。一方、疫学的な関連については不明であるが、複数の地域からの分離株が同一の PFGE パターンを示すという事例が少なくとも 7 種類の異なる PFGE パターンについて観察された。一部の PFGE パターンを示す株については複数の散発事例とともに集団事例においても分離されている場合があった。（寺嶋　淳、斉藤康憲、鈴木玲子、浅原純代、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄）

（４）PFGE の標準化とその解析結果利用のネットワーク化に関する研究

PFGE による解析方法の標準化を行うために、米国疾病管理センター（CDC）の方法に準拠した PFGE 方法の提示を行った。新プロトコールでは、標準マーカーとして、CDC から分与をされた *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet standard 株を使用した。また、薄型プラグを用いることで泳動像がより鮮明になったため、腸管出血性大腸菌（EHEC）等の分離株では、PFGE 解析ソフトによる解析及びデータベース化がより正確に行えるようになった。泳動条件の変更及び新しいマーカーの採用により従来のデータベースとの互換性が失われたため、過去の代表株のデータを新規に加えた上で新しいデータベースの構築を開始した。PFGE の解析結果の一部は、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中である。（寺嶋　淳、斉藤康憲、鈴木玲子、浅原純代、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄）

２. 志賀毒素産生性大腸菌［ STEC: 腸管出血性大腸菌（EHEC）]の遺伝子発現に関する研究

（１） 転写制御遺伝子 *pchABC* による LEE 遺伝子群の発現制御機構

腸管病原性大腸菌（EPEC）における LEE の転写制御遺伝子 *perC* と相同性の高い遺伝子が EHEC には 5 コピー存在する。このうち 104 アミノ酸をコードする 3 つの遺伝子（*pchA*, *pchB*, *pchC* と改名）をそれぞれ運ぶプラスミドは、EHEC において LEE の発現を顕著に上昇させることがこれまでの研究で判明している。そこで、これらの遺伝子の欠失変異体を構築し、LEE にコードされる Type III 分泌蛋白質の発現への影響を解析したところ、3 つの *pch* 遺伝子のうち、*pchA* の欠失による影響が最も大きいことが判明した。*pchA* を含む二重欠失変異体（*pchA pchB*、および *pchA pchC*）は、それぞれ *pchA* 単独の欠失変異よりさらに LEE の発現を低下させることから、*pchA*, *pchB*, *pchC* すべての遺伝子が LEE の発現に重要であることが明らかとなった。これらの欠失変異体の培養細胞（HEp-2）への接着能を野生株と比較したところ、*pchA* を含むいずれかの二重欠失変異によって HEp-2 への接着能が完全に失われることが明らかとなった。［伊豫田淳、渡辺治雄］

（２）*pchABC* の発現制御機構

1)で明らかとなった *pchABC* に依存した正の発現制御機構は、LEE にコードされるいくつかの TypeIII 分泌蛋白質に共通して見られる現象であった。そこで、LEE のセントラルレギュレーターである *ler* の発現への影響を解析したところ、*pchABC* に依存して *ler* の転写活性が正の制御を受けることが判明した。一方、*pchABC* それぞれの発現機構を解析したところ、EHEC の LEE 遺伝子群が活性化するいくつかの環境条件下で同様な活性化を受けることが明らかとなった。以上の結果から、*pchABC* は LEE の発現を制御するマスターレギュレーターとして機能することが示唆された。[伊豫田淳、渡辺治雄]

３．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 LEE 非保有型 STEC（LEE-negative STEC: LN-STEC）について、培養細胞（HEp-2）への接着能を解析したところ、いくつかの LN-STEC 株が、HEp-2 に効率よく接着することが明らかとなった。このうち、菌が鎖状に連鎖して繋がり、HEp-2 へ強く接着する（chain-like adhesion: CLA）パターンを示すものがこれまでのところ少なくとも 4 株存在し、これらはすべて血清群 O91 に属することが判明した。CLA パターンは他の下痢原性大腸菌のカテゴリーのうち、腸管凝集性大腸菌（EAEC）が示す接着パターンと一部類似しているものの、上記の 4 つの株にはこれまで EAEC において同定されているいずれの接着遺伝子も存在しないことが判明した。[伊豫田淳、佐藤裕美、陸彦（協力研究員）、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．細菌学的、疫学的研究

（１）平成 15 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 15 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 63 株で、それらは 12 種類の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 であつた。稀な血清型は *S.* Urbana, *S.* Vinohrady, *S.* Singapore であった。（田村和満、泉谷秀昌）

（２）*Salmonella* Enteritidis のファージ型別による解析

2003 年に当研究所に送付された *Salmonella* Enteritidis 1302 株（うち、2003 年分離株は 873

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 2003 年の集団事例 77 件のファージ型（PT）の内訳としては、PT4 が 19 件（25%）、PT47 が 18 件（23%）、PT1 が 16 件（21%）、PT14b が 7 件（9.1%）、その他 17 件であった。依然として PT47 の増加傾向が著しく、以前から多かった PT4 および PT1 と並ぶに至っている。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

（３）*Salmonella* Typhimurium のファージ型別による解析

2003 年に当研究所に送付された多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium の菌株 176 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 およびその関連株はこのうち 51 株であった。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

（４）*Salmonella* Enteritidis 薬剤感受性試験

上記ファージ型別に供した 2003 年に発生した 77 件の集団事例に関する株について薬剤感受性試験を行った。試験した薬剤全てに感受性のものが 48 件、SM 単剤耐性のものが 22 件と大勢を占めた。これ以外に NA 耐性、ABPC+SM 耐性および ABPC+SM+TMP+サルファ剤耐性株がそれぞれ 2 件、SM+TC+KM 耐性株が 1 件検出された。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

（５）フルオロキノロン高度耐性 *Salmonella* Typhimurium 株の解析

2003 年に送付されたフルオロキノロン高度耐性 *Salmonella* Typhimurium 株（n=11）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（n=10）、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（n=1）の 2 種類が存在した。ファージ型別に関しては、すべて DT193 と同定された。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、1 株を除き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）。1 株は、GyrA の 83 番目および ParC の 80 番目のアミノ酸置換については同様であったが、GyrA の 87 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換され、また ParE の 458 番目のプロリンがセリンに置換されており、フルオロキノロンに対する MIC も他の株に比べて高い値を示した。（泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄）

（６） 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

2003 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チフス菌 50 株、パラチフス A 菌 38 株で、例年と比較してパラチフス A 菌がやや増加した。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,A,B1 であった。パラチフス A 菌では、1,4,6 型であった。

（廣瀬健二、田村和満、高井信子、渡辺治雄）

（７）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

2003 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 30%と昨年と同程度であったが、パラチフスＡ菌では昨年と同程度の約 60%であった。(廣瀬健二、田村和満、高井信子、渡辺治雄)

（８）ニューキノロン低感受性菌の迅速スクリーニング法の開発に関する研究

ニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌を迅速にスクリーニングするために PCR-RFLP 法を用いた方法を開発した。この方法では、キノロン耐性決定領域の塩基配列を決定することなく、突然変異の入った場所がわかるため、耐性か低感受性菌かの区別もできる。(廣瀬健二、渡辺治雄)

２．サルモネラの病原性因子の研究

（１）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 INTESTINE407 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。
(廣瀬健二、高橋英行、泉谷秀昌、荒川英二、寺嶋淳、渡辺治雄)

（２）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、解析を続行している。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、*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。１)、２）の解析については昨年度報告した。本年度は、３）についての解析結果を以下ア）～ウ)に報告する。
（中山周一、久代明＊、田中隆一郎＊、渡辺治雄）
（＊＝ヤクルト中研）

ア）*hilA* 発現に対する glycerol dehydrogenase の効果について

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た。この可能性の検討のため、*gldA* 変異株、*gdh*、*gldA* の２重変異株を作製し、*hilA* 発現をモニターしたところ、２重変異株においてのみ、発現が 60%まで低下した。従って、*hilA* 発現の full activation には有限の glycerol dehydrogenase 活性が必要である。

イ） glycerol dehydrogenase の基質、1, 2-propanediol が *hilA* 発現に及ぼす影響について

glycerol dehydrogenase が *hilA* 発現に影響するメカニズムとして、直接には、本酵素の基質となり得る化合物が効果を持つと考えられる。この観点でいくつかの化合物をスクリーニングし、1,

2-propanediol が *hilA* 発現抑制効果を有することをつきとめた。効果は、培地中 150mM で 55%までの抑制、300mM で 20%までの抑制であった。R-(-)、S-(+)による enantiomeric 効果は認められなかった。前述の glycerol dehydrogenase２重変異株でも 1, 2-propanediol 添加による、更なる *hilA* 発現抑制が観察され、1, 2-propanediol は net の negative regulation を行うこと、glycerol dehydrogenase は 1, 2-propanediol を脱水素 conversion することで、その negative regulation を部分的に阻害することが結論付けられた。

ウ）1, 2-propanediol による *hilA* 発現抑制メカニズムの解析

サルモネラにおける 1, 2-propanediol の代謝経路や、それに関わる遺伝子群の発現制御等を参考にして、メカニズム解析を行った結果、前述の 1, 2-propanediol、150mM における抑制効果は、1, 2-propanediol からの代謝産物、propionate によるものであること、これに対して、300mM における抑制効果は、propionate の産生によらないものであることが判明した。このように、この抑制効果は濃度による Di-phasic なものであることが示され、それぞれの詳細な抑制機構の解明と同時に、この Di-phasic な抑制の、生物学的意義の解明が今後の課題となった。

III. 赤痢菌に関する研究

１．細菌学的、疫学的研究

（１）日本国内で分離された *Shigella sonnei* の各種抗菌薬に対する感受性試験

2001-2002 年に日本で分離された *Shigella sonnei* 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国内由来、外国由来ともに26%であった。チフス菌、パラチフスＡ菌と比較するとニューキノロン低感受性菌は、はるかに少なかった。また、ニューキノロンに耐性を示す菌は見られなかった。(廣瀬健二、寺嶋淳、泉谷秀昌、田村和満、高井信子、渡辺治雄)

２．赤痢菌の病原性に関する研究

（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。*cpxA* 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、翻訳レベルで蛋白発現が低下していることが示された。また翻訳レベルでの調節機構の解析に流動研究員の寺岡秀興が加わり、*cpxA* 変異の表現型を相補する因子のクローニングを開始した。(三戸部治郎、寺岡秀興（協力研究員)、渡辺治雄)

（２）赤痢菌の細胞内侵入後の細胞骨格の維持機構に関する研究

赤痢菌は細胞内に侵入するが、侵入部位にアクチンをはじめとする細胞骨格に関する分子が集積し、ファゴサイトーシス様機構で細胞質内に入り込む。侵入後は、菌は細胞質内を動きながら増殖し、隣接細胞に伝播を繰り返す。我々は、菌が侵入した細胞の形態が維持されるには、菌が分泌する分子が必要とされていることを明らかにした。赤痢菌の病原性プラスミド上の遺伝子 *ospE2* が変

異を起こすと、菌が侵入した細胞骨格の異常、つまりアクチン線維の分断が起こり、細胞の形態が rounding-up した。*ospE2* が正常な菌においては、細胞がプレートとコンタクトする部位に vinculin 等の細胞骨格因子が集積しているのに対し、*ospE2* 変異株においてはそれらの分子の集積が見られなくなり形態の変化、rounding-up,が起こっていた。菌が細胞内に入り込むと、細胞骨格に異常を起こそうとするが、OspE2 がそれを正常に戻そうとしていると考えられた。(三浦雅史（協力研究員)、寺嶋淳、三戸部治郎、泉谷秀昌、渡辺治雄)

IV. ビブリオに関する研究

1.平成 15 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 15 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 449 株で *Vibrio cholerae*、*V. mimicus*、*V. fluvialis*、*V. vulnificus* および *Aeromonas* spp.が含まれ、78.4%(352)は国外（米国-267、ブラジル-62、インド-23)から依頼された。国内株は *Aeromonas* spp.、*V. cholerae* non-01, non-0139 が主で、血清型別依頼菌株の大部分は環境分離株であった。(荒川英二、田村和満；沖津忠行、鈴木理恵子（神奈川衛研))

2.コレラ毒素遺伝子陽性の *V. cholerae* 08 感染事例

福岡県内の下痢症患者（78 歳男性、海外渡航歴なし）からコレラ毒素遺伝子陽性の *V. cholerae* が分離された。市販の抗 01 および抗 0139 血清には凝集が見られず、当部において血清型別を行ったところ、*V. cholerae* 08 と同定された。同時にコレラ毒素遺伝子、ヘモリジン遺伝子の検出を行ったところどちらも陽性で、ヘモリジンについてはエルトール型であった。*V. cholerae* non-01, non-0139 であってもコレラ毒素遺伝子保有株は毒素の産生により、コレラ菌と同じ病原性を示す可能性もあり、*V. cholerae* が検出された場合は、コレラ毒素遺伝子の検出、血清型別を行い、監視していく必要があるものと考えられた。(荒川英二、田村和満；堀川和美、村上光一、長野英俊、濱崎光宏、石黒靖尚（福岡県保環研))

3. *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。*V. vulnificus* の病原性についてはいまだ明らかになっておらず、分離株が起炎菌であるかどうかも判別できない。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。capsular polysaccharide synthesis (*wza*) 、 mannose-sensitive hemagglutinin (*mshD*) 、 type 4 prepilin peptidase (*vvpD*) 、 vulnibactin utilization protein (*viuB*) 、 4-hydroxyphenylpyruvate dioxigenase (*4-hppd*, *vlI*)、heme receptor (*hupA*)、manganase transport protein (*mntH*, NRAMP family)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．菌学的、疫学的研究

(1) 日本で分離された *Legionella pneumophila* 血清群 1 の sequence-based typing (SBT)による型

別

日本国内の冷却塔からの分離株 11 株、浴場施設からの分離株 12 株、温泉が原因と考えられる患者由来株 2 株の計 25 株について *flaA*、*mompS*、*proA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列を決定した。*flaA*、*proA* ではそれぞれ 6 種類、*mompS* では、8 種類にタイピングすることができた。すべてを合わせると、25 株は 13 種類にタイプに分けられた。冷却塔 11 株はすべて 1 種類のタイプであった。残りの 14 株は 12 種類に分けられた。(前川純子、倉　文明、常　彬、渡辺治雄)

(2) 宮崎県日向市におけるレジオネラ症集団感染 - 2002 年 7 月

医療機関から保健所に報告のあったレジオネラ症患者及び疑い患者（以下「発症者」とする）は、295 名であり、うち 7 名が死亡した。発症者のうち、検査 の結果、46 名がレジオネラ症と確定した。原因となった施設は、2002 年 6 月 20 日のプレオープンから 7 月 23 日まで営業しており、19,778 人が 利用していた（営業日数 22 日、1 日平均約 900 人）。患者喀痰の培養検査で 4 名から検出された *L.pneumophila* SG1 と、浴槽水から分離された *L.pneumophila* SG1 について、PFGE 型が一致し本事例は入浴施設が原因と結論した。〔河野喜美子、東　美香、齋藤信弘、鈴木　泉（宮崎県衛生環境研究所）；倉　文明、前川純子、渡辺治雄〕

(3) 宮崎県日向市における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の環境調査

検出されたレジオネラ属菌は浴槽水、ろ材とも *L.pneumophila* SG1、SG8、*L.dumoffii* 等であった。6 基のろ過装置のうち 5 基のろ材からレジオネラ属菌が検出された。浴槽水からは、*L.londiniensis* も多量に検出された。また宿主アメーバはろ過装置　R4、R5 のろ材から大量に検出され、この系統のろ過槽及び関連する浴槽でのレジオネラ属菌濃厚汚染をうかがわせる結果となった。〔河野喜美子、東　美香、齋藤信弘、鈴木　泉（宮崎県衛生環境研究所）；倉　文明、前川純子、渡辺治雄；八木田健司　遠藤卓郎（寄生動物部）〕

(4) 客船に関連したレジオネラ症の集団発生における感染源の分子疫学

2003 年 1 月、大型客船による台湾および国内のクルーズに参加した 70 歳代の乗客 3 名が肺炎になった。男性喀痰由来の株と環境分離株が比較され、感染 源が循環式浴槽およびそのろ材であると分子疫学的に同定された。この報告は、*L.pneumophila* SG5 が起因菌であると分子疫学的に特定した最初の客船関連の報告である。また、客船に関連したレジオネラ症は本邦で最初である。〔倉　文明、前川純子、渡辺治雄；八木田健司、遠藤卓郎（寄生動物部）；池野まり子、辻　英高（兵庫県立健康環境科学研究センター）；田口真澄、小林一 寛（大阪府立公衆衛生研究所）〕

2. レジオネラの病原性に関する研究

(1) B10.A-*Lgn1*^{s}コンンジェニックマウスの作成

Legionella pneumophila SG1 は、ヒトマクロファージ（Mφ）内で増殖することが知られている。マウスにおいては、A/Jマウス由来腹腔Mφでは増殖できるのに対して、他の近 交系マウス由来Mφでは増殖できずLgn1 で支配されていることが明らかになっている。我々は、Lgn1 の機能を解析するために、A/JマウスとB10.Aマウスとの間で戻し交配と兄妹交配を交互に繰り返して 16 サイクル行い、Lgn1 領域のみA/Jマウス由来であるB10.A- *Lgn1*^{s}コンンジェニックマウスを作成した。〔倉　文明、前川純子、渡辺治雄〕

(2) B10.A-*Lgn1*^{s}コンンジェニックマウスの組み換え領域の決定

B10.A- *Lgn1*^{s}は、STS mappingにより、Lgn1 近傍のテロメアから*D13Die3*まで、およびセントロメアから*D13Die24* までは少なくともB10.Aマウス由来であること、また*D13Die12*は、A/Jマウス由来であることが判明した。このことから作成したコンジェニックマウスはB10.Aマウス由来の Naip2 をもつことが示唆された。〔小林静史、倉　文明、前川純子、高橋朋子（星薬科大学)、渡辺治雄〕

(3) *Legionella pneumophila*感染におけるLgn1 遺伝子の機能について、コンンジェニックマウスを用いた解析

チオグリコレート誘導腹腔マクロファージ（Mφ）内や鼻腔内投与マウスの肺における*L. pneumophila* SG1 80-045 株の増殖性を比較したところ、コンジェニックマウスでは顕著に菌数が増加していた。また*L. pneumophila*加熱死菌やZymosanをそれぞれのチオグリコレート誘導腹腔Mφに添加しスーパーオキサイド産生量を測定したところ、 B10.A（*Lgn1*^{r}）マウスMφの方が有為に高かった。今回作成したB10.A-*Lgn1*^{s}コンンジェニックマウスは、*L. pneumophila*に対して感受性が高く、レジオネラ症の研究に極めて有用である。〔小林静史、倉　文明、前川純子、高橋朋子（星薬科大学)、渡辺治雄〕

(4) *Legionella dumoffii*の産生する新規蛍光物質の同定

レジオネラ症の起因菌であるレジオネラ属菌のうち*L. dumoffii, L. gormanii, L. bozemanii*など一部の菌種は、長波長の紫外線を照射すると青白色の蛍光を発することが知られている。*L. dumoffii* の菌体より総脂質を抽出し、シリカゲルカラムを用いたHPLCにより青白色蛍光物質を精製した。マススペクトロメトリーおよび NMR を用いてその構造を決定したところ、新規イソクマリン化合物であることが判明した。
［前川純子、倉　文明、常　彬、渡辺治雄、森林敦子（昆虫医科学部)、杉江　元（農環研)、早川洋一（東大・分生研、現・東京理科大・薬学部)］

(5) レジオネラ感染がヒト肺胞上皮 II 型細胞のサイトカイン発現・分泌を誘導する作用の解析

レジオネラはグラム陰性の細胞内寄生菌である。レジオネラ感染における肺胞上皮細胞のサイトカイン応答について調べた。*Legionella pneumophila* 感染により、肺胞上皮細胞は IL-6、IL-8、TNF-α および MCP-1 などサイトカインの発現と分泌が見られた。これらのサイトカインの発現量および分泌量は感染したレジオネラの生菌数および感染時間に依存した。また、*L. pneumophila* の病原性の強さや外膜タンパクの存在はサイトカインの発現と分泌に関わっていた。[常　彬、前川純子、倉　文明、渡辺治雄]

(6) レジオネラのヒト肺胞上皮 II 型細胞への uptake pathway の研究

病原細菌の細胞への侵入を阻害する inhibitor を用いて、*Legionella pneumophila* 2 株（80-045 株と Philadelphia-1 株）のヒト肺胞上皮 II 型細胞（A549）への uptake pathway を調べた。その結果、この 2 株とも microtubule-dependent および microfilament-dependent pathway によって細胞内に侵入するが、pinocytosis により細胞に摂取されることは見られなかった。また、Philadelphia-1 株のみは receptor-mediated endocytosis により肺胞上皮細胞に侵入することが明らかになった。［常　彬、前川純子、倉　文明、渡辺治雄]

(7) レジオネラの肺胞上皮細胞への接着因子

レジオネラはレジオネラ肺炎やポンティアック熱の起炎菌である。我々はレジオネラのヒト肺胞上皮 II 型細胞への接着に関わる遺伝子 *laiA* を同定した。レジオネラ染色体上に *laiA* の paralog は 3 つ存在し、これらの paralog の塩基配列およびコードするアミノ酸配列を決定した。この 4 つの遺伝子間は約 80%の相同性があった。２つの paralog（*laiB* と *laiC*）は *laiA* のすぐ上流に、*laiD* は他の 3 つの遺伝子と異なる部位に存在することが明らかになった。[常　彬、前川純子、倉　文明、渡辺治雄]

VI. 黄色ブドウ球菌に関する研究

1.　グリコペプタイド系薬剤耐性に関する研究

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新たな遺伝子を同定した。テイコプラニン耐性株では、*Clostridium* の転写調節因子 MarR と 38%の相同性を示す産物をコードする遺伝子に、感受性株と比べ 1 塩基の変異が見られた。この遺伝子を破壊することにより耐性株のテイコプラニン MIC は 4 μg/ml に低下し、これを相補することにより、耐性が回復した。

２．細胞壁合成酵素に関する研究

methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)の増殖に細胞壁合成酵素PBP 1が必須であるかどうかを調べるために、遺伝学的手法を用いた検討を行った。最初に、染色体上のPBP 1遺伝子*pbpA*を形質導入により破壊しようとしたが、このような形質導入株を得ることはできなかった。あらかじめエピゾームに*pbpA*が存在するときは、染色体*pbpA*破壊株を得ることができたが、染色体*pbpA*が破壊されてしまった株からは、今度はエピゾームの*pbpA*を取り除くことはできなかった。PBP 1はMRSAにおいてもMSSA同様、その増殖に必須であるという結論を得た。(和田昭仁; 大内史子、佐藤慈子、山河芳夫[細胞科学部]; 巻　秀樹 [塩野義製薬]; Nadine McCallum, Markus Bischoff, Brigitte Berger-Bächi [Univ. Zürich])

VII.　ボレリアに関する研究

１．ライム病ボレリアの病原性に関する研究

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種の 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* 破壊株を作成し、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* 破壊により感染性の変化は見出されなかったことから、本研究でえられた変異株がライム病の慢性化メカニズム解明などに使用可能であると考えられた。そこで、現在１）ライム病ボレリアの慢性感染機序、２）関節炎重症化機構の解析を行うべく、以下研究が進行中である。

(1) ライム病ボレリア関節炎重症化機構の解明に関する研究

国内ライム病患者で関節炎を示す重症例が見いだされない理由について、現在までに明確な回答は得られていない。一方で国内型ボレリアが分離される欧州においても、国内型ボレリアによる関節炎の報告はほとんどなされていないことから、ライム病ボレリア感染に起因する重度の関節炎は、米国型の強毒型ボレリア感染に起因する、すなわち病原体側の何らかの因子によって関節炎が引き起こされていると考えることができる。そこで本研究室において開発された形質転換可能な感染性

ボレリアのプラスミド欠失株を詳細に調べ、約28kb の領域（lp28-4）に関節炎を重症化させる因子がコードされていることを明らかにした。使用変異株はゲノムシークエンス株であり、microarray によって各遺伝子の発現は明らかにされていることから、この領域で特に in vivo で発現量が上昇するいくつかの遺伝子群に焦点を絞り、現在相補試験、および純系マウスを用いた関節炎再現試験を行っている。(川端寛樹、渡邉治雄)

(2) ライム病ボレリア慢性感染機構の解明に関する研究

ライム病は抗生剤による治療を行わなかった場合、進行性の慢性の感染を引き起こす。しかしながらその慢性化機構については、多継代にて弱毒化させた株において非慢性化する現象が報告されているのみで、いずれの因子が慢性化に関係しているかは不明であった。本研究室では、上記関節炎発症メカニズム研究の過程で、関節炎に関与する領域とはことなる約 28kb の領域（lp28-1）がライム病慢性化と強く相関していることを偶然見いだした。この領域を欠失している株では慢性感染がおこらないばかりではなく、さらに関節炎も発症しないことが明らかになった。この領域には抗原変換遺伝子群がコードされており、この遺伝子による宿主免疫からの逃避機構が慢性化に関係していると考えられる。(川端寛樹、渡邉治雄)

2. 小児顔面神経麻痺患者におけるライム病ボレリア抗体の検索

ライム病患者では顔面神経麻痺などの神経症状がみられることがある。特に欧州で endemic である *Borrelia garinii* 感染の場合、neuroborreliosis 患者が見いだされる傾向にあるとされる。本邦における流行種も *B.garinii* であることから、不明神経疾患のなかにライム病ボレリア感染に起因する患者が含まれている可能性があった。そこで我々は、ライム病の流行地である北海道で顔面神経麻痺を指標とするボレリア抗体の検索を試み、成人ではライム病性の顔面神経麻痺患者は欧州と比較し低頻度であることを明らかにしてきた。本研究では小児顔面神経麻痺についても同様に調べ、成人同様、ライム病性の小児顔面神経麻痺患者は極めて低頻度であることを明らかにした。欧州での調査結果と比較し、その頻度は低いことから、本邦に浸潤しているボレリアの病原性が低い可能性が考えられた。また小児顔面神経麻痺の主因として HSV-1, VZV が確認された。（川端寛樹、渡邉治雄、古田康（北海道大学））

3. 新種ボレリア *Borrelia turcica* の発見

トルコで見いだされる *Hyalomma aegyptium* からボレリア、*Borrelia turcica* を発見し、新種記載を行った。回帰熱ボレリアとライム病ボレリアはともにボレリア属細菌ではあるが、急性の菌血症を起こし致死率も高い回帰熱ボレリアにくらべ、ライム病ボレリア感染では慢性の持続的感染が起こる。本ボレリアは遺伝学的に回帰熱型ボレリアとライム病ボレリアの中間に位置することから、これらボレリアの臨床上の性格を調べるために貴重な材料となる可能性がある。(川端寛樹、増沢俊幸（静岡県立大)、角坂照貴（愛知医科大))

4. ダニ介性疾患に関するリスク評価に関する研究

回帰熱浸潤のリスク評価を目的として、主に南西諸島に生息し、海鳥を吸血源としている *Ornithodoros* 属ダニ(*O.sawaii*)、及び吸血源鳥類の病原体調査を行った。ダニ、海鳥血液、ともに回帰熱病原体は PCR、分離培養ともに陰性であった。また形態学的に *Ornithodoros* ダニとされ、回帰熱媒介ダニであることが危惧された *O.sawaii* ではあるが、遺伝学的に *Ornithodoros* ではなく *Carios*

である可能性がミトコンドリア DNA の塩基配列より確認されたことから、本地域では回帰熱浸潤の可能性は極めて低いことが明らかとなった。(川端寛樹、渡邉治雄、藤田博己（大原研究所)、鶴見みや古、佐藤文男（山階鳥類研究所））

VIII. レプトスピラに関する研究

1. レプトスピラ感染防御抗原 Lig タンパク質の解析

レプトスピラ血清型 Manilae の感染防御抗原 LigA-m, LigB-m が，他の血清型のレプトスピラ感染においても防御抗原となり得るかを調査し，その活性部位の同定を試みた． LigA-m, LigB-m 間で相同性の高い LigB-m の N 末端(LigB-mN)，相同性の低い C 末端(LigB-mC)の組換えタンパク質とも，Manilae 感染に対して防御活性を示した．また LigB-mN は，血清型 Icterohaemorrhagiae に対しても感染防御活性を示した．これまでに，相同性の高い *lig* 遺伝子の N 末端配列をプローブにしたサザンブロット解析により，*lig* 遺伝子は多くの血清型のレプトスピラに存在することが明らかになっている．また，Manilae, Icterohaemorrhagiae 以外の血清型に感染したレプトスピラ病患者の血清中にも，Lig タンパク質に対する抗体が誘導されることから，Lig タンパク質は，多くの血清型に有効なワクチン候補となり得ることが示唆された．(小泉信夫，渡辺治雄)

2. 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

新たに東京都内 5 ヶ所で捕獲した，レプトスピラの主要な保菌動物であるドブネズミ 30 頭中４頭からレプトスピラが分離された．また分離はできなかったものの，腎臓培養液の PCR により，これまで本邦では報告のなかった遺伝種 *noguchii* と相同性のある遺伝子断片が検出された．これまで都内のドブネズミから分離されたレプトスピラ 13 株は，*flaB* 遺伝子の部分塩基配列，制限酵素 *Not* I によるパルスフィールド電気泳動切断パターンおよび抗血清に対する反応性がすべて同一であり，*Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae と同定された．(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)，渡辺治雄)

3. アライグマからのレプトスピラの分離

神奈川県および長崎県のアライグマから分離されたレプトスピラ 3 株について，1 株は *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae と同定できたが，残り 2 株については，抗血清の反応性からは serovar Hebdomadis であることが示唆されたが，*flaB* 遺伝子の部分塩基配列，制限酵素 *Not* I によるパルスフィールド電気泳動切断パターンが Hebdomadis 標準株とは異なっており，Hebdomadis に類似するがこれまで国内では未報告の serovar の可能性が示唆された．(小泉信夫，牧野敬（神奈川県自然環境保全センター)，渡辺治雄)

4. 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 13 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 5 検体で抗体価が陽性となった。(小泉信夫，渡辺治雄)

5. 全国規模での野鼠由来人獣共通感染症のリスク評価に関する研究

野鼠由来人獣共通の新興再興感染症のリスク評価を目的として、全国で野鼠捕獲を行い病原体保菌率の調査を、各地検疫所、地方衛生研究所、大学と共同で行っている。平成 15 年度は全国で 421 個体を捕獲、31 個体で病原性レプトスピラが分離

（分離率 7.4%）された。このうち、奄美諸島で分離された 7 株はすべて沖縄型のレプトスピラであったことから、水のレジャーにより流行が散見される沖縄地方同様、この地域でも水のレジャーに起因する流行が起こりうる危険性を明らかにした。(川端寛樹、小泉信夫、渡邉治雄、藤田博己（大原研究所)、増沢俊幸（静岡県立大)、角坂照貴（愛知医科大)、後藤郁夫（神戸検疫所)、中村正治（沖縄衛生研究所）ほか)

IX. 髄膜炎菌に関する研究

1. 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（△*ggt*）髄膜炎菌は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、*⊿ggt* 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。[高橋英之、廣瀬健二、渡辺治雄]

2. 髄膜炎菌識別マーカー、
γ-glutamylaminopeptidase の生化学的機能の解析

髄膜炎菌のγ-glutamyl aminopeptidase(GGT)が髄液中での髄膜炎菌の成育に重要である他に GGT の生理的機能を掘り下げて解析する目的で抗 GGT 抗体を作成し、それを用いて髄膜炎菌 GGT の生化学的な解析を試みた。部位特異的変異導入 *ggt* 変異体を構築して抗 GGT 抗体を用いて解析した結果、髄膜炎菌 GGT は翻訳後プロセシングにより産生される二つのサブユニットから構成され、そのプロセシングには 427 番目のスレオニン残基が重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに細胞内局在について抗 GGT 抗体を用いて解析した結果、他種生物の GGT には見られない、細胞質内の局在を示し、髄膜炎菌 GGT は他種生物の GGT とは異なり、独自の進化を遂げた性質を保持する可能性が示唆された。[高橋英之、渡辺治雄]

3. 髄膜炎菌識別マーカー、
γ-glutamylaminopeptidase の分子進化に関する解析

髄膜炎菌の近縁菌である淋菌や *Branhamella catarhallis* には GGT 活性は見出されておらず、その遺伝子も存在しないものと推定されていた。しかし、その２種の菌の染色体上に髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子と 90%以上の相同性を保持する偽遺伝子として例外なく存在していることを見出した。またその偽遺伝子の遺伝子配列の菌種内のバリエーションは髄膜炎菌の *ggt* 遺伝子の遺伝子配列のバリエーションと比較しても大きいことが明らかとなり、その偽遺伝子は進化上で比較的自由度をもって変異を蓄積していった可能性が示唆された。さらに淋菌と髄膜炎菌の *ggt* 遺伝子とその周辺遺伝子の遺伝子配列の相互比較した結果、*ggt* 遺伝子を含む周辺遺伝子の配列順序が２種の病原菌で 100%同一であることが見出された。以上の結果は *ggt* 遺伝子と周辺遺伝子を含む DNA 領域は *Neisseria* 属が髄膜炎菌と淋菌に分岐する前の進化上の祖先菌に導入され、その後、進化上で淋菌の *ggt* ホモロ

グは変異を蓄積して不活化される一方で髄膜炎菌の *ggt* 遺伝子は機能を維持されてきた可能性を示唆している。これは髄膜炎菌が中枢系に対しては病原性を示すのに対して一般的に淋菌や *Branhamella catarhallis* は示さない事実や髄膜炎菌のγ-glutamyl aminopeptidase(GGT)が髄液中での髄膜炎菌の成育に重要である解析結果と非常に合致すると考えられた。［高橋英之、渡辺治雄］

X. レンサ球菌に関する研究

1. 日本における 2002 年の溶レン菌感染症サーベイランス

2002 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、2677 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、T4 (499/2677, 18.6%)、T12 (477/2677, 17.8%)、T1 (474/2677, 17.7%)、T25 (223/2677, 8.3%)、TB3264 (210/2677, 7.8%)であった。T4、T12、T1 型は 1992 年以降、毎年、高い分離頻度を示している。T25 型は、2001 年の全国集計では増加はおさまったが、2002 年では再び増加している(2000, 7.8%; 2001, 7.2%; 2002, 8.3%)。TB3264 型は、2000 年以降増加傾向にある(2000, 6.0%; 2001, 6.8%; 2002, 7.8%)。昨年度増加した T3 型は、2002 年度急増した(2000, 0.4%; 2001, 1.1%; 2002, 5.6%)。特に東海・北陸、関東甲信静ブロックで分離比率の増加がみられる。T2、T8、T22、T14/49 型は、昨年に引き続きの減少傾向にある。[池辺忠義、平澤恭子（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), 河原隆二（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 A 群レンサ球菌感染症のサーベイランスと起因株の *emm* 型別

2002 年、35 症例報告があり、そのうち 26 症例が劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準を満たしていた。T1 分離株 19 例は、*emm* 遺伝子はすべて *emm1* と相同性を示した。一方、M 血清型別では 19 例中、17 例が M1 型であったが、2 例 (NIH187, 219) は型別不能であった。2002 年、T3 型が 3 例で分離され、すべて *emm3.1* (M3)であった。T11 (NIH208), T22 (NIH197)分離株の *emm* の塩基配列は、それぞれ、*emm89* (M 型別不能), *emm22.2* (M 型別不能)であった。T 型別不能であった分離株 (NIH211, 216)の *emm* 遺伝子の塩基配列は、それぞれ *emm49* (M 型別不能)、*emm3.1* (M3)であった。[池辺忠義、平澤恭子（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), 河原隆二（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]

３．劇症型／重症溶血性レンサ球菌感染症分離株の薬剤感受性と非感受性株の遺伝子型の解析

1992 年から 2003 年に劇症型／重症溶血性レンサ球菌感染症患者から分離された 201 株について検討した。薬剤感受性試験は、エリスロマイシン、クリンダマイシン、アンピシリン、イミペネム、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 6 種薬剤について E-test を用いて実施した。すべての株において、アンピシリン、イミペネム、セフォタキシムに対して感受性であった。一方、クリンダマイシン、エリスロマイシンおよびシプロフロキサシン耐性株は、それぞれ 4.0, 1.5 および 0.5%存在した。また、シプロフロキサシンに対する低感受性株が 10.9%存在することが判明した。(池辺忠義、渡辺治雄)

４．日本における *emm49* 型 *Streptococcus pyogenes*

による劇症型/重症溶血性レンサ球菌感染症起因菌について

2000 年から 2003 年において、1999 年以前に劇症型/重症溶血性レンサ球菌感染症起因菌として分離されなかった *emm49*型 *Streptococcus pyogenes* による劇症型/重症溶血性レンサ球菌感染症が 5 例(2000 年 1 例、2002 年 3 例、2003 年 1 例)発生した。これらの株について、制限酵素 *Sma*I 処理によるパルスフィールド電気泳動（PFGE）を行ったところ、NIH200, NIH211, NIH230 については PFGE のパターンに違いが見られなかった。一方、その他の株の PFGE パターンはこれらのパターンと異なっていた。このことは、2000 年になって引き起こされた *emm49* 型 *Streptococcus pyogenes* による劇症型/重症溶血性レンサ球菌感染症は、必ずしも同じ菌株によるものではないことが示唆された。[池辺忠義、渡辺治雄、遠藤美代子(東京都健康安全研究センター)、上田有香(近畿大学)、岡田京子(川崎市衛生研究所)、鈴木理恵子(神奈川県衛生研究所)、南健(聖マリアンナ医科大学病院)、田中博(愛媛県立衛生環境研究所)、中西徳彦(愛媛県立中央病院)、冨田正章(山口県環境保健研究センター)、西江宏行、石井典子、佐々木恵美(社会保険広島市民病院)、三浦裕司、山村徹(河北総合病院)}

XI. ペスト菌に関する研究

1. 全国規模での野鼠由来人畜感染症・サーベイランス、リスク評価、ペスト菌感染症：国内で捕獲された野鼠におけるペスト菌の潜在の可能性の検証

1920 年代以降本邦においてペスト菌によるペスト患者の報告はないが、それが日本国内においてペスト菌が撲滅されたことを意味する訳ではない。全国規模での野鼠由来人畜感染症・サーベイランスの一環として潜在的なペスト菌の検出と検査体制の再構築を行う目的で、全国で捕獲された野鼠のうち 114 匹に関してその摘出脾臓を用いたペスト菌の培養検出を試みた。その結果、雑菌（大腸菌、セラチア菌を含む）4 種を除いて菌は検出されなく、ペスト菌も検出されなかった。今後はより感度の高い方法（間接抗体法、PCR 法）などを用いて系の確立と共に引き続きサーベイランスを実施していく予定である。[高橋英之、小泉信夫、川端寛樹、渡辺治雄；増澤俊幸、大橋典男（静岡県立大学)、角坂照貴（愛知医科大学)、藤田博己（大原綜合病院付属大原研究所）]

XII. 結核に関する研究

1. BCG 東京株ワクチンにおける RD16 領域の異なりについて

BCG 東京株ワクチンにおいて 379bp 又は 401bp のどちらかのバンドのみを示すワクチンをそれぞれ調整し、モルモットを皮下免疫した。免疫成立後に微量の結核菌をエアロゾル経気道感染し、ワクチンの結核防御能をしらべた。同様にして免疫した Tokyo172 株と剖検所見を比較すると、肺臓の大きさに差は認められなかった。又肺臓内の結核性結節の程度は軽く、その差も認められなかった。肝臓の病変は認められなかった。気管リンパ節及び脾臓の大きさは 401bp のバンドを示す株のみが 379bp のバンドを示す株又は Tokyo172 株免疫動物より若干大きかった。(芳賀伸治、山崎利雄、山崎剛；山本三郎（細菌第二部))

2. これまでに作成したリコンビナント BCG 東京株ワクチンの RD16 領域の異なりについて

GMP グレイドのエイズワクチンとして調製した 3 株の BCG を RD16 プライマーを用いて型別したところ rBCG-V3J1 は 379bp 、rBCG-pSOV3J1 及び rBCG-pSO-gagE は 401bp のバンドのみが認められた。

（芳賀伸治、井関博（日大獣医臨床病理学研究室）、本多三男（エイズ研究センター））

３．結核菌の迅速薬剤感受性試験法に関する研究

(1) 多剤併用療法に則した薬剤感受性試験法の検討

昨年度に続き、RFP0.010μg/ml、INH0.10μg/ml、SM1.0μg/ml（あるいはEB1.0μg/ml）の混合薬剤に対する併用効果を、結核菌参照菌 6 株と臨床分離菌 20 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、多剤併用療法による実際の治療結果と一致していた。[山崎利雄]

(2) ATP 測定による多剤併用療法に則した薬剤感受性試験法の検討

主要 5 薬剤に耐性を持つ ATCC 参照菌 6 株と臨床分離菌 20 株を、それぞれの単剤と RFP･INH･SM、RFP･INH･EB の混合薬剤をそれぞれ含む Middlebrook 7H9 液体培地に接種し、ATP 測定を行った。肉眼判定では判定までに 7 日から 10 日間を要し、判定に苦慮した場合もあったが、ATP 測定法では、5 日間で判定が可能であり、新しい迅速薬剤感受性試験法（ATP 法）の確立ができた。 [山崎利雄]

(3) ATP 法のミクロ化の検討

主要 5 薬剤を所定濃度に固着させ、RFP0.010μg/ml、INH0.10μg/ml、SM1.0μg/ml（あるいはEB1μg/ml）の混合薬剤を固着させたマイクロプレートに、主要 5 薬剤に耐性を持つ ATCC 参照菌 6 株と臨床分離菌 50 株を接種し、培養 5 日目に ATP 測定法を実施した。判定結果は、試験管法で得られた結果と完全に一致したことから、新しい迅速薬剤感受性試験法のミクロ化も可能であった。[山崎利雄；佐藤直樹、山下研也、岡沢　豊（極東製薬工業）]

(4) 2 次抗結核薬を用いた場合の ATP 法の有用性の検討

二次抗結核薬である Capreomycin (CPM)、Cycloserine (CS)、Ethionamide (TH)、para-Aminosalicylic acid (PAS)、Emviomycin (EVM)について ATP 法の有用性を検討した。結核菌 H37Rv 株を用いて ATP 法による結果の再現性を確認した。臨床分離菌 49 株を用いた、ATP 法と寒天比率法との一致率は、各薬剤とも 92%以上であり、ビットスペクトル法との一致率は、88%以上と比較参照法との一致率は高く、二次抗結核薬についても、結核菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法は有用であると考えられた。[山崎利雄；佐藤直樹、山下研也、岡沢　豊（極東製薬工業）]

4. BCG 免疫モルモットからの結核菌の還元培養

RD16 領域を PCR にて増幅させたとき BCG-Tokyo 株は、379bp と 401bp の 2 本バンドが観察される。単一バンドを生ずる様にクローン化した BCG 株にてモルモットを免役し、結核菌 H37Rv 株を噴霧感染した。5 週間後に解剖し、肺臓、肺門リンパ節、肝臓、脾臓から、結核菌の還元培養を行った。379bp を生ずる BCG 株と 401bp を生ずる BCG 株によって免疫されたモルモットの各臓器からの結核菌数に、顕著な差は認められなかった。[山崎利雄、山崎剛、芳賀伸治、山本三郎（細菌第二部）]

5. 飼いイヌの臓器からの抗酸菌の分離

飼い主が結核患者であり、イヌの咽頭部ぬぐい液より、結核菌が分離されたため、安楽死させたイヌの肺、肺門リンパ節、肝臓より抗酸菌を分離した。脾臓からは抗酸菌の分離はできなかった。各臓器由来の分離菌の同定試験の結果は、*M. tuberculosis* であった。分離菌は、主要抗結核薬

すべてに感受性菌であった。イヌの結核症は非常に稀であり、RFLP 分析の結果、飼い主から感染したものであろうと推察された。[山崎利雄、芳賀伸治、渡邊治雄、神山恒夫（獣医科学）、高橋光良（結核研究所）宇根有美（麻布獣医科大学）]

XIII. セラチアに関する研究

1. セラチアの病原性因子の探索

尿路感染症の起因菌である、*Serratia marcescens* は尿路感染症や集団院内感染の原因菌であるが、その感染経路解明に関する研究は、国内外を問わずあまり行なわれていない。*S. marcescens* の基本的な感染経路が解明されない現在では、その治療法は他の感染症と同様に、種々の抗生物質に依存しているのが現状であり、新たな耐性菌を生み出す温床となっている。*S. marcescens* 独自の感染メカニズムが解明出来れば、抗生物質以外での治療法の確立にも期待がもてる。よって、本研究では *S. marcescens* のホストへの感染経路の詳細を明らかにすることを目的とした。現在までに、培養細胞(T24)を用いた感染モデルを構築した。更に、この時に観察される培養細胞の detachment という現象がその病原性に関係しているのかどうか、更なる研究を進めている。(志牟田　健、渡辺治雄)

XIV. 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* のバイオフィルム形成能の違いについて

平成１４年度に行った横浜市在住の親子（３歳児と母親）の口腔より単離された *S. mutans* の遺伝子は、17 の異なった PFGE パターンを示した。これらの *S. mutans* のバイオフィルム形成能を静止系の実験方法（96 穴マイクロプレート）にて検討すると、FSC-3 のようなバイオフィルム形成能の高い株と FSC-4 のようなバイオフィルム形成能の低い株を見つけることができた。この２菌種を用いて流路系の実験方法（フローセルシステム）にて検討を行うと、静止系と同様に FSC-3 はバイオフィルム形成能が高く FSC-4 はバイオフィルム形成能が低いことが明かとなった。これらの結果、選択培地上形態的に同じ *S. mutans* であっても、遺伝子的、機能的に異なる *S. mutans* が 3 歳児の口腔に存在することが明かとなった。このバイオフィルム形成能の異なりが、母から子への感染にどのよう影響しているのか現在検討中である。[茂木瑞穂、中尾龍馬、寺嶋淳、渡辺治雄、泉福英信]

2. *Streptococcus mutans* および *Streptococcus gordonii* の歯表面への付着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 gordonii* 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。平成１４年度からの研究で、*S. mutans* の歯表面付着に最も関わる菌体表層蛋白質領域 PAc(365-377)に共通部分の多い *S. gordonii* 菌体表層蛋白質(SspB)の 390-T400K-402 は、BIAcore において唾液成分と強く結合することが明かとなった。そこで、唾液成分が結合したハイドロキシアパタイト(sHA)をその SspB(390-T400K-402)ペプチドにより前処理した場合、*S. gordonii* や *S. mutans* の sHA 結合へどのように影響するか検討を行った。その結果、そのペプチドは、両菌の sHA への結合を約 50%阻害した。これらの結果、SspB(390-T400K-402)ペプチドは、歯表面への *S. mutans* および *S gordonii* の付着を抑制できる製剤として有用であると考えられた。[泉福英信、奥田健太郎、中尾龍馬、浜田

具之、渡辺治雄]

3. ヒト型 PAc peptide 抗体の誘導に関与する HLA-DRB1 遺伝子の検討

Streptococcus mutans の菌体表層蛋白質抗原(PAc)のPAc(361-386)ペプチドに対する唾液IgA抗体価を多く有する人は、唾液中の*S. mutans*量が少ないことが明かとなった。よって、PAc(361-386)ペプチドに対する抗体は、*S. mutans*の歯表面付着阻害抗体であることが考えられた。この抗体の産生を制御する因子としてHLA-*DRB1*遺伝子が認められ、中でも*DRB1**1501* を有するヒトは唾液中抗PAc(361-386)ペプチドIgA抗体量が高く唾液*S. mutans*量が少ないことも明かとなった。以上の検討により、HLA-*DRB1* 遺伝子の検査はう蝕リスク判定に使用できる可能性が示唆された。[津覇雄三、M. A. Salam、泉福英信]

4. 歯周疾患における *S. mutans* の歯表面付着阻害抗体の意義

唾液PAc(361-386)ペプチドに対する抗体が歯周検査における指標とどのように関係するか解析をおこない、歯周疾患におけるこの抗体の意義について検討した。新潟市在住 74 歳の高齢者 100 名を無作為に抽出し、調査対象とした。そのうちデータの得られた 87 名（男性 60 名）を分析対象者とした。抗体価の高いグループ（＞２²）と低いグループ（＜２²）に分け、１人あたりの歯石付着部位、最大歯周ポケットの深さ（PD)、最大付着歯肉の減少量（AL）において、グループ間の比較を行った。その結果、プロービング時の出血(BOP)やPD値において低いグループと高いグループに差が認められなかったが、歯石の付着（低；5.4±6.9%, 高；1.3±2.0%）とAL値（４mm以上：低: 38.2±27.7%, 高；20.4±19.7%、6mm以上: 低; 11.6±16.6%, 高; 2.4±4.6%)においては5%危険率で有意差が認められた。よって、この唾液抗体を検査することは、歯周疾患の予知予後を的確に把握するために有用となるかもしれない。[泉福英信、多田章夫（千葉市健康企画課)、宮崎秀夫（新潟大学）]

５. 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

昨年度に引き続き、唾液分泌が減少したマウスを用いて口腔バイオフィルム形成モデル動物を作製する検討を行った。E2F-1 ノックアウトマウスは、コントロールマウスである C57BL/6 や 129SV マウスに比べ有意に唾液分泌が低下しており、唾液アミラーゼおよびムチン量も多いことが明かとなった。また、いくつかの oral streptococci を口腔に接種すると、*Streptococcus salivarius* の歯表面における付着量が多いことが明らかとなった。Oral streptococci を口腔に接種する前に、1%スクロース水を１昼夜飲ませることによって *S. mutans* の歯表面付着量が他の oral streptococci の付着量よりも多くなることが明かとなった。これらの結果は、ヒト口腔で起る現象に似ていることが明かとなった。[松本直子、サラムアブドウス、渡辺治雄、泉福英信]

6. Oral streptococci の菌種菌株間におけるバイオフィルム形成能の検討

本研究では *Streptococci* の 6 菌種 15 菌株を用いて、バイオフィルム形成能の違いについて、唾液とスクロースの影響も含め検討を行った。唾液コートと唾液非コートの 96-well microtiter plate を用いて、biofilm formation assay で評価した。培地として、TSB w/o dextrose+0.25%sucrose とスクロース非含有の SDM 培地を用いた。スクロース非存在下のとき、唾液をコートした plate では、全菌株でバイオフィルム形成抑制がみられた。スクロース存在下では、*S. mutans*（MT8148,ATCC 25175,GS5,OMZ175）,*S. sobrinus* AHT , *S. mitis*

ATCC 6249, *S. sanguinis* ATCC 10556 において高い値が認められたが、唾液をコートすると *S. mitis* ATCC 6249 と *S. sanguinis* ATCC 10556 は強く抑制された。菌種間の差だけでなく同菌種においても菌株の違いでバイオフィルム形成に差がみられた。バイオフィルムにはスクロース依存性と非依存性の2種類あり、菌株によって唾液の及ぼす影響に差があることが示唆された。[田村昌平、茂木瑞穂、中尾龍馬、泉福英信]

７．乳酸菌による *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成阻害の評価

う蝕原因菌の一種である *Streptococcus mutans*(SM)のバイオフィルム形成に対する *Streptococcus faecalis*(SF)の影響について、フローセルシステムを用いて検討した結果、ＳＭとＳＦを混合接種するとＳＭが形成するバイオフィルム内部の空洞化、間隙増加、密度の減少が認められた。そこで、本研究では９６-well microtiter plate を用いた静止系によるその形成阻害を評価した。*S.mutans ATCC25175,*MT6229 を用いて９６-well microtiter plate（ＳＤＭ培地）によりバイオフィルムが最も形成される菌液濃度を測定した。次いで最適濃度の 2 菌種に *Streptococcus faecalis* の超音波抽出液（１０ul）を各濃度において接種し９６-well microtiter plate で培養し評価した。コントロールにはＢＳＡを用いた。*Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成に *Streptococcus faecalis* の抽出液を接種した結果、高タンパク質濃度の場合にバイオフィルムの形成阻害が起こった。またＢＳＡを用いた場合にも同様に阻害が起った。これらからバイオフィルム形成阻害は、タンパク質濃度に依存して起こることが示唆された。[熊田昌幸、田村昌平、中尾龍馬、泉福英信]

8. *Porpyromonas gingivalis* 外膜タンパク Omp85 ホモログの歯周病進展への関わり

Neisseria の細胞外膜タンパク Omp85 が LPS や構成タンパクの生合成に関わり、かつ生命維持に必須のものであるという報告を基に、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の Omp85 ホモログにおける歯周病への関わりについて検討を行った。まず *Porphyromonas* の Omp85 ホモログとして、アミノ酸レベルで 25%の identity を示す PG0191 をゲノム DB から特定した。続いて β バレル型外膜タンパクの配向性予測プログラムにより PG0191 の細胞外表出領域を予測し、その３ヶ所のペプチドを合成、これをウサギに免疫して抗体を得た。また、PG0191 全長を大腸菌発現ベクター系に導入し組換えタンパクを発現精製し、これをウサギに免疫し抗体を作製した。結果、３つのペプチド抗体のうち１つは、全長の組換え PG0191 に高いアフィニティーを持っており、PG0191 抗体は *Porphyromonas* の表層に結合することが、それぞれ ELISA および金コロイドによる免疫電顕て確認された。また、*Porphyromonas* の PG0191 変異株も現在作製中である。今後、これらの抗体による LPS 発現や歯周病バイオフィルム形成への影響を検討し、*Porphyromonas* 外膜タンパク PG0191 の歯周病進展への関わりを明らかにしていく。〔中尾龍馬　泉福英信　渡邊治雄〕

9. 免疫不全マウスにおけるヒト免疫システムの構築

近年、SCID マウスなどの免疫不全マウスを用いて、マウスにヒトの免疫システムを再構築することができるようになってきている。しかしながら、再構築できるヒトの免疫システムは完全なものではないことが知られている。１次免疫応答を常に誘導できるヒトの免疫システムを再構築することを最終目的として、NOD/SCID β2 マイクログロブリンノックアウトマウス （NOD/SCID β2m KO マウス）

にヒト造血幹細胞を移植する実験を行った。臍帯血、末梢血、脾臓のリンパ球を NOD/SCID β2m KO マウスの腹腔に注射して、ヒトの免疫システムを再構築した。臍帯血リンパ球や脾臓細胞の移植では、移植5週目からマウス末梢血中に高い割合（70%以上）でヒトリンパ球の定着が見られた。また、末梢血リンパ球の移植では、移植7週間後にマウス末梢血細胞・骨髄細胞・腹腔細胞・脾臓細胞中に高い割合でヒトB細胞の定着が見られた。これまでの報告では、免疫不全マウスにヒト B 細胞はわずかにしか定着しないとされているので、NOD/SCID β2m KO マウスで再構築されたヒトの免疫システムを用いて、1次免疫応答を誘導できる可能性が高い。〔千葉丈　中尾龍馬　泉福英信〕

XV. ボツリヌス症に関する研究

これまでに単発及び集団ボツリヌス（中毒）症（宮崎のキャビヤと熊本の芥子蓮根による食餌性ボツリヌス中毒等）の対応を経験した。この経験から留意事項を列記する。ボツリヌス症は迅速な対応が必要であるが希少な疾病の為に病状からの臨床診断に手間取る。そのために疾病の重篤化と共に集団発生の対策が迅速に行えない事もある。それには医療従事者はコンピューター-による臨床診断が参考になる。都道府県と国は常時治療用抗血清を備蓄しその管理状況を常時掌握する必要はある。医療従事者が治療用抗血清管理状況と供給体制の情報を得られるようにする。食餌性ボツリヌス中毒の場合患者の摂取食品の流通経路の迅速に解明できる体制を整える。ボツリヌス症もしくはボツリヌス様患者を診た医療従事者関係機関に積極的に情報を提供する。（北村　勝）

XVI. 依頼検査およびその他の事項

１．体外診断薬

「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、３件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件のイムノクロマト法（磁力を併用し、反応時間短縮の改良あり）によるキットは規格試験に合格した。１件のイムノクロマト法によるキットは検出感度不足を示した。（中山周一、志牟田　健、芳賀伸治）

２．JICA 国際協力・研修生受け入れ

1）地方衛生研究所の職員1名を4日間、レジオネラの検査法（16SrDNA のシークエンスによる種の同定）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　科長　河野喜美子　7 月 22 日-25 日〔前川純子〕

2）JICA のタイ・国立衛生研究所機能向上プロジェクト短期派遣専門家として、レジオネラの検査法、特に臨床検体からの検出法をタイで指導した。タイ　NIH　、　Dep.　of　Medical　Sciences　、Wantana　Paveenkittiporn　6 日間現地指導、8 月 17 日-26 日出張〔倉　文明〕

3）JICA 衛生・環境分析技術者 II 研修、4 名
インドネシア環境省 Tri Utomo；ケニア水資源管理・開発、James Icika；マレーシア科学・技術・環境、　Elliza Matnor；マレーシア保健省、Puvanesvari Kuppusamy：10 月 14 日：日本におけるレジオネラ症の現状を講議した。〔倉　文明〕

3. 出願中の特許

(1)【特許出願】
出願番号 2004-0048115; 出願日　平成 16 年 2 月 24 日

発明者：中山周一、久代　明*、田中隆一郎*、渡辺治雄（*＝ヤクルト中研）
発明の名称：1, 2-Propanediol によるサルモネラ病原遺伝子発現の抑制

(2)【特許出願】
特許 2004-044889;　提出日平成 16 年 2 月 20 日
発明者：前川純子、渡邊治雄、倉　文明、常　彬、森林敦子、杉江　元、早川洋一
発明の名称：新規イソクマリン系蛍光物質

(3)【職務発明】
感染研発第 140 号　平成 16 年 3 月 10 日
発明者：倉　文明、前川純子、渡邊治雄、小林静史、高橋朋子
発明の名称：マクロファージのレジオネラ・ニューモフィラ感受性を支配する遺伝子の導入マウス

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

1. 欧文発表

1) Nagai, T, Sobajima, H., Iwasa, M., Tsuzuki, T., Kura,F., Amemura-Maekawa, J., and Watanabe, H.: Neonatal sudden death due to *Legionella pneumophila* associated with water birth in a domestic spa. J Clin Microbiol. 41:2227-2229, 2003.

2) Hirose,K., Tamura,K., and Watanabe,H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolone by PCR-rstriction fragment length polymorphism. Microbiol. Immunol. 47:161-165.2003.

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

4) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and H. Watanabe. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. Current Microbiology .46：224-227. 2003

5) Hirose,K., Itoh,K., Arawawa,A, Tamura,K., Watanabe,H. DNA-based diagnosis method for typhoid and paratyphoid fever, and the screennng method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP). Res.Adv.in Microbiology. 3:109-121. 2003.

6) Ikebe,T., Murai,N., Murayama,S., Saito,K., Yamai,S., Suzuki,R., Isobe, J.,Tanaka,D., Katsukawa,C., Tamaru,A., Katayama,A., Fujinaga,Y., Hoashi,K., Ishikawa,J., Watanabe,H., and The working group For group A streptococci in Japan. Changing prevalent T serotypes and *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock-like syndrome (TSLS) patients in Japan. Epidemiol & Infect. 130: 569-572. 2003

7) Izumiya, H., Nojiri, N., Hashiwata, Y., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, Japan. Emerg. Infect. Dis. 9: 1650-1651, 2003

8) Lim, YH., Hirose, K., Izumiya, H., Arakawa, E., Takahashi, H., Terajima, J., Itoh, K., Tamura, K., Kim, SI., and Watanabe, H. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis. 56(4):151-5, 2003

9) Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E.., Terajima, J., and Watanabe, H. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4676-4682, 2003

10) Shaikh, N., Terajima, J., and Watanabe, H. IpaC of *Shigella* binds to the C-terminal domain of b-catenin. Microbial Pathogenesis 35, 107-117, 2003

11) Takayuki Taniya, Jiro Mitobe, Shu-ichi Nakayama, Qi Mingshan, Kenji Okuda, and Haruo Watanabe. Determination of the InvE binding site required for expression of IpaB of the *Shigella sonnei* virulence plasmid: Involvement of a ParB boxA-like sequence. J. Bacteriol. 185, 5158-5165. 2003

12) Shu-ichi Nakayama, Akira Kushiro, Takashi Asahara, Ryu-ichiro Tanaka, Lan Hu, Dennis J. Kopecko, and Haruo Watanabe. Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiol. 149, 2809-2817. 2003

13) Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. Hepatology Research 27 (1): 1-5 2003.

14) Koizumi N, Watanabe H. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. FEMS Microbiology Letters 226 (2): 215-219 2003.

15) Koizumi N, Watanabe H. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. Journal of Medical Microbiology 52 (7): 585-589 2003.

16) Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H. Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. Microbiology and Immunology 47 (4): 305-306 2003.

17) Halpern M, Broza YB, Mittler S, Arakawa E, Broza M. Chironomid Egg Masses as a Natural reservoir of *Vibrio cholerae* Non-01 and Non-0139 in freshwater habitats. Microb. Ecol. Dec. 23 2003

18) Zhang YL, Lau YL, Arakawa E, Leung KY. Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. Microbiology. 149(Pt 4):1051-60, 2003

19) 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.

20) Watanabe H, Terajima J, Izumiya H, Iyoda S.: Molecular typing methods for STEC. Methods Mol Med. 73:55-65.2003

21) Nakao, R., Hanada, N., Asano, T., Hara, T., Salam, MA., 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: 271-82, 2003.

22) Matin, K., Senpuku H., Hanada, N., Ozawa, H. and Ejiri, S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) around immediate implants: A pilot study in Rats. Int J Oral Maxillofac Implants. 18: 211-217. 2003.

23) Kawashima, M., Hanada N., Hamada, T., Tagami, J. and Senpuku H. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. Oral Microbiol. Immunol. 18: 220-225. 2003.

24) Senpuku, H., Sogame, A., Inoshita, E., Tsuha, Y., Miyazaki, H. and Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. Gerontology 49: 301-309. 2003.

25) Hideyuki Takahashi, Kenji Hirose and Haruo Watanabe: Necessity of meningococcal γ-glutamyl aminopeptidase for *Neisseria meningitidis* growth in rat cerebrospinal fluid (CSF) and CSF-like medium. Journal of Bacteriology 186:253-257, 2004.

26) Salam, MA., Matsumoto, N., Matin, K., Tsuha, Y., Nakao, R., Hanada, N.,Senpuku, H.: Establishment of an animal model using recombinant NOD.B10.D2 mice to study initial adhesion of oral streptococci. Clin Diagn Lab Immunol. 11: 379-86, 2004.

27) Harada, S., Kamata, Y., Ishii, Y., Eda, H., Kitamura, R., Obayashi, M., Ito, S., Ban, F., Kuranari, J., Nakajima, H., Kuze, T., Hayashi, M., Okabe, N., Senpuku, H., Miyasaka, N., Nakamura, Y., Kanegane, H., and Yanagi, K. Maintenance of serum immunoglobulin G antibodies to Epstein Barr Virus (EBV) nuclear antigen 2 in healthy individuals from different age groups in Japanese population with a high childhood incidence of asymptomatic primary EBV infection. Clin Diagn Lab Immunol 11: 123-130. 2004.

28) Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H. A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. Microbiol. Immunol. 48, 49-52, 2004

29) Nadine McCallum, Markus Bischoff, Hideki Maki, Akihito Wada, and Brigitte Berger-Bächi. TcaR, a putative MarR-like regulator of *sarS* expression. J. Bacteriol.186:2966-2972.2004

30) Hideki Maki, Nadine McCallum, Markus Bischoff, Akihito Wada, and Brigitte

Berger-Bächi. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 48:1953-1959. 2004.

31) Masuzawa T, Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y: New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. Journal of Medical Microbiology. 53(5):421-426. 2004.

32) Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. Vaccine, 22: 1545-1552. 2004.

33) Ahmed AM, Nakagawa T, Arakawa E, Ramamurthy T, Shinoda S, Shimamoto T. New aminoglycoside acetyltransferase gene, aac(3)-Id, in a class 1 integron from a multiresistant strain of *Vibrio fluvialis* isolated from an infant aged 6 months. J. Antimicrob. Chemother. 53(6):947-51, 2004

34) Kawabata H, Norris SJ, Watanabe H.: bbe02 disruption mutants of *Borrelia burgdorferi* B31 have a highly transformable, infectious phenotype. Infection and Immunity. (2004) in press

35) Güner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T: *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from hard tick, Hyalomma aegyptium in Turkey. International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology. (2004) in press

2. 和文発表

1) 寺嶋 淳、広瀬健二、渡辺治雄。最近の細菌性赤痢、チフス、パラチフスについて。診断と治療、91, 1207-1210, 2003

2) 寺嶋 淳。 細菌性赤痢。 動物由来感染症その診断と対策、 神山恒夫、山田章雄編、真興交易書籍出版部、174-177、2003

3) 廣瀬健二.最近の腸チフス・パラチフスの薬剤感受性の動向.日本細菌学会 関東支部ニュース Vol.42, 16-17. 2003.

4) 廣瀬健二 渡辺治雄.キノロン薬.Medical Practice 臨時増刊号 実践 抗生物質・抗菌薬療法ガイド 2003年 Vol.20 170-176. 2003年8月

5) 廣瀬健二 ほか執筆者 104 名.分子生物学歯科小事典 西沢俊樹(監修) 花田信弘 今井奨 西原達次(編集). 財団法人口腔保健協会 2003年6月発行

6) 廣瀬健二. 腸チフス・パラチフス. 総合臨床 感染症診療・投薬ガイド vol52 増刊号 580-585. 永井書店、大阪 2003.

7) 泉谷秀昌、渡辺治雄：施設における食中毒の傾向と対策。医薬ジャーナル、第39巻第5号、106-111.2003.

8) 泉谷秀昌、渡辺治雄：食中毒起因菌における耐性菌の現状と問題点。獣医畜産新報 JVM、第56巻第10号、828－832、2003。

9) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium。IASR第24巻第8号、181、2003。

10) 小泉信夫, 渡辺治雄, 梅澤和夫, 飯塚朝明, 猪口貞樹. PCRにより早期診断が行えたレプトスピラ病の1例. 感染症学雑誌 77 (8): 627-630 2003.

11) 小泉信夫, 渡辺治雄. 人獣共通感染症としてのレプトスピラ病. Infovets 6 (6): 18-21

2003.

12) 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

13) 常 彬、渡辺治雄：レジオネラ感染症の臨床病型と疫学。化学療法の領域、2004.

14) 荒川英二、島田俊雄；食品中の食中毒検査法「5.腸炎ビブリオ」 防菌防黴誌, 31(8), 445-456-3, 2003

15) 池辺忠義, 渡辺治雄. 劇症型A群レンサ球菌感染症. In 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 52: 1061-1065 (2003).

16) 池辺忠義, 渡辺治雄. レンサ球菌属（劇症型溶血性レンサ球菌感染症起因菌を含む). In 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- 日本臨床増刊号 61 suppl 3: 665-669 (2003).

17) 池辺忠義, 渡辺治雄, 遠藤美代子, 上田有香, 岡田京子, 鈴木理恵子, 南健, 田中博, 中西徳彦, 冨田正章, 西江宏行, 石井典子, 佐々木恵美, 三浦裕司, 山村徹. わが国における劇症型／重症溶血性レンサ球菌感染症起因菌 *emm49* 型 *Streptococcus pyogenes* について. 病原微生物検出情報 24: 112-113 (2003)

18) 堀川和美、村上光一、長野英俊、濱崎光宏、石黒靖尚、荒川英二、渡辺治雄、近藤正治、森田繁、原一美、江崎泰之；*Vibrio cholerae* 08 感染事例-福岡県 病原微生物検出情報, 25(1), 10, 2004

19) 荒川英二, 渡辺治雄 病原菌の今日的意味 改訂第三版「赤痢菌」, 482-492, 2003

20) 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.

21) 川端寛樹：ライム病. 感染症. 家庭医学大全科. 法研（株）.（印刷中）2004.

22) 川端寛樹：回帰熱. 感染症. 家庭医学大全科. 法研（株）.（印刷中）2004.

23) 川端寛樹：レプトスピラ症. 感染症. 家庭医学大全科. 法研（株）.（印刷中）2004.

24) 川端寛樹：ライム病. 感染症の辞典.（印刷中）2004.

25) 川端寛樹：回帰熱. 感染症の辞典.（印刷中）2004.

26) 中村正治, 平良勝也, 大野惇, 増澤俊幸, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博巳, 宮城朝光. 沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物調査. 日本獣医学雑誌. 57(5), 321-325, 2004.

27) 伊豫田淳、渡辺治雄：志賀毒素産生性大腸菌食中毒, 臨床検査, 47(5): 459-465, 2004

28) 伊豫田淳、渡辺治雄：腸管出血性大腸菌感染症, 化学療法の領域, 20(2): 56-59, 2004

29) 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

30) 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

31) 森望、周藤豊、田川陽子、渡辺祐子、浅井良夫、新川隆康、高橋英之、渡邉治雄、海外渡航歴のあった髄膜炎菌性髄膜炎の一例、IASR、24 号、P.26、2003

32) 中尾龍馬、泉福英信、ウイルス感染と口腔の関わり:HIV/AIDS-1、日本歯科評論,731: 22-24, 2003

33) 中尾龍馬、泉福英信、ウイルス感染と口腔の関わり:HIV/AIDS-2、日本歯科評論,732: 22-24, 2003

34) 泉福英信、血液感染症を知り適切な対応を、アポロニア 21、3: 52 - 55. 2003.

35) 泉福英信、宇宙時代は歯科の時代、日本歯科評論, 728: 22-24, 2003.
36) 泉福英信、西沢俊樹：第２章 今後期待される技術、p175－182、2003 年；第 5 部 ミュータンスレンサ球菌の除金技術、ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学、監修花田信弘
37) 泉福英信、他 110 名：分子生物学歯科小辞典、監修西澤俊樹、6 月 30 日、2003.
38) 泉福英信：歯周病関連バイオフィルムの特性、p112-115、2003 年；Dental Diamond 増刊号、監修鴨井久一
39) 泉福英信、要介護高齢者の口腔微生物叢の改善のための歯科保健医療データバンクの構築、８０２０財団法人８０２０推進財団会誌、1: 85-87, 2004.
40) 和田昭仁、倉　文明、前川純子、池辺忠義、常　彬、渡辺治雄：23 価肺炎球菌ワクチンの感染防止効果および医療経済効果について、病原微生物検出情報、25:44、2003.
41) 小林敦子、山本佳史、長　澄人、井上　申、倉　文明、前川純子：台湾クルーズの客船に関連したレジオネラ肺炎・事例１ － 大阪府、病原微生物検出 情報、25:40, 2003.
42) 前川純子：レジオネラ。SRL 宝函、27:73-76, 2003.
43) 渡辺治雄。バイオテロ，ボーダレス時代への対応。Campus Health. p.101-105. 全国大学保健管理協会。2003 年
44) 渡辺治雄。日常生活における食中毒の予防法。診断と治療。91：1147-1149. 2003.
45) 渡辺治雄。モダン or クラシック。化学療法の領域。19：15. 2003
46) 渡辺治雄。ペスト。臨床と微生物。31: 31-35. 2004
47) 北村　勝：ボツリヌス毒素　廣川タンパク質化学　第１巻　毒素タンパク質　II 植物・微生物由来毒素タンパク質　（林　恭三、池田　潔、太田光熙　編集）134-145, 廣川書店.2003
48) 伊豫田淳，渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌症. 動物由来感染症 その診断と対策 186-189 2003

II. 学会発表

１．国際学会

1) Takayuki Taniya, Jiro Mitobe, Shu-ichi Nakayama, Qi Mingshan, Kenji Okuda, and Haruo Watanabe. Determination of the InvE binding site required for expression of IpaB of the *Shigella sonnei* virulence plasmid: Involvement of a ParB boxA-like sequence. 38th US-Japan Cholera and Other Related Enteric Infections Joint Panel Meeting. Lister Hill Auditorium, National Institutes of Health, Bethesda, MD. October, 2003.
2) Munirul Alam, Shu-ichi Nakayama, and Haruo Watanabe. Identification of *gatD* as a ranscription modulator for *virF* gene expression in *Shigella sonnei*. 3rd FAPMS Conference. Kuala Lumpur. October, 2003.
3) Iyoda S. and Watanabe H.: Isolation and characterization of positive regulatory genes on the expression of locus of enterocyte Effacement (LEE) -genes in Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. VTEC2003, June 2003, Edinburg, UK.
4) Nakao, R., Amagasa, T., Aoba, T., Hanada, N., and Senpuku, H.: Assessement of oral transmission using cell-free HIV-1 in mouse

models reconstituted with humana peripheral blood leukocytes. The 81th general session and exhibition of the International Associaciton for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

5) Salam, MA., Tsuha, Y., Nakao, R., Matsumonto N, Hanada, N, and Senpuku,H.: Human T-cell responses to oral biofilm bacteria in humanized NOD/SCID mice. The 81th general session and exhibition of the International Associaciton for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

6) Senpuku, H., Tsuha, Y., Salam MA, and Hanada N. Recolonization of *Streptococcus mutans* on the tooth surface in microgravity. The 81th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

7) Arakawa, T.,Ishizaki,T., Hayman, RE., Hanada N, and Senpuku. H. Interaction of Small Crystal Form of Hydroxyapatite with Mutans Streptococci. The 81th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

8) Tsuha, Y., Salam, MA., Hanada N, Kurosaki, N/, and Senpuku, H., DRB1 genotypes associated with induction of the inhibiting antibody to *Streptococcus mutans* in humans. The 81th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

9) Motegi, M., Takagi, Y., Sato, T., Tanaka, T., Hanada, N., and Senpuku, H., The current status of oral transmission of *S. mutans* from mother to 3-year-old child in Japan. The 81th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, Jun 25-29. 2003. Goteborg, Sweden.

10) Senpuku, H., Kawata, M., Yamamura, H., Hanada, N., Watanabe, H. Effects of lactic acid bacteria in biofilm foramation of *Streptococcus mutans*. ASM Conference Biofilm 2003, Victoria, British Colonbia, November 1 - 6, 2003. Canada.

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-oxodase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. Gordon Research Conference on Phagocytes. June 2003, New London, USA.

12) Kura, F: Incidence of Legionnaires' disease and epidemiological study: diagnosis, prevention and control in Japan. Seminar in JICA project, Strengthening of National Institute of Health capability for research and development of AIDS and emerging infectious diseases. August 2003, Bangkok, Thailand.

13) Watanabe,H. Emergence of new pathogens and control of infectious diseases. International Symposium of Research Center for Pathogenic fungi and microbial Toxicoses. Tokyo. Nov. 21-22. 2003

14) Watanabe,H. Genetic diversity and its application to epidemiology. The 8th

Pan-pacific Emerging Infectious Diseases Conference. Bangladesh. Dec. 10-12. 2003

15) Terajima J., Iyoda S.,Watanabe H: Molecular epidemiological investigation of EHEC isolates in Japan 2001-2002., The 7th annual Enter-net workshop, Jun ,2003, Edinburgh, Scotland

16) Terajima J., Izumiya H., Iyoda S., Mitobe J., Tamura K., and Watanabe H.: Molecular epidemiological investigation of EHEC isolates in Japan 2001-2002. The 5th International Symposium on Shiga Toxin(Verocytotoxin)producing *Escherichia coli* Infections, Jun., 2003, Edinburgh, Scotland

17) Hideki Maki, Nadine McCallum, Markus Bischoff, Akihito Wada, and Brigitte Berger-Bächi . TcaA inactivation leading to reduced glycopeptide susceptibility, found in clinical vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA). 11th International Congress on Infectious Diseases, Cancun, Mexico, March, 2004.

18) Salam, MA, Matsumoto, N., and Senpuku, H. Initial adhesion of oral streptococci in recombinant non-obese diabetic mice. Human T-cell responses to oral biofilm bacteria in humanized NOD/SCID Mice. The 82th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, March 10-13. 2004. Honolulu, USA.

19) Arakawa, T., Ishizaki, R., Hayman, E., Hanada, N., and Senpuku, H. Reduction of oral streptococci by small-crysrtal hydroxyapatite. The 82th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, March 10-13. 2004. Honolulu, USA.

20) Maeda, T., Kitasako, Y., Senpuku, H., Hanada, N., and Tagami, J. Identification of mutans streptococci, lactobacilli in the lowest-pH carious dentin. The 82th general session and exhibition of the International Association for Dental Research, March 10-13. 2004. Honolulu, USA.

21) Kawabata H and Watanabe H. Establishment of transformable/infectious Lyme disease *Borrelia burgdorferi* B31: Retention of lp25 in *bbe02* disrupted mutants. The Gordon Research Conference, The Biology of Spirochetes. Ventura, CA, USA. 2004.

3. 国内学会

1) 廣瀬健二、荒川英二、高井信子、田村和満、渡辺治雄.日本国内で分離されたニューキノロン低感受性 *Salmonella* Typhi 及び *Salmonella* ParatyphiA の最近の分離状況.日本感染症学会総会,福岡,2003

2) 廣瀬健二　渡辺治雄.日本国内でのチフス菌・パラチフスＡ菌の分離状況.薬剤耐性菌研究会　群馬・伊香保温泉　2003

3) 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７６回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

4) 久代　明、朝原　崇、田中隆一郎、中山周一、渡辺治雄.サルモネラ*cpxR*変異株のキャラクタリゼーション。第７６回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

5) 清水 健介、久代 明、田中隆一郎、中山周一、

渡辺治雄．エルシニア菌及び大腸菌の*cpxR-cpxA*オペロンによるpH依存的な転写制御について。第８６回日本細菌学会関東支部会、2003 年、横浜

6) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：*Salmonella* Enteritidis関するファージ型別および薬剤耐性の傾向。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本県熊本市。

7) 板垣道代、白木豊、山田万希子、所光男、河合直樹、泉谷秀昌、渡辺治雄：インターネットを利用した岐阜県下におけるサルモネラ症発生動向調査-*S.* Enteritidisのパルスフィールドゲル電気泳動による解析-。第 24 回日本食品微生物学会学術総会、2003 年 10 月、岡山県岡山市。

8) 池辺忠義、渡辺治雄．近年分離された*Streptococcus pyogenes* M3 型株に特異的に存在するファージ様DNA断片にコードされる遺伝子産物の解析．第 12 回Lancefieldレンサ球菌研究会、岡山、2003

9) 増澤俊幸，角坂照貴，小泉信夫，川端寛樹，中村正治，平良勝也，今井康之．ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状．第 3 回人と動物の共通感染症研究会学術集会．東京，2003 年

10) 林栄治，赤尾信明，小泉信夫，谷川力，藤田紘一郎．　東京都心部における野ネズミの広東住血線虫の寄生状況と中間宿主の調査．第 63 回日本寄生虫学会東日本支部大会．横浜，2003 年

11) 小泉信夫，渡辺治雄．レプトスピラの新規抗原タンパク質の探索．第 76 回日本細菌学会総会．熊本，2003 年

12) 小泉信夫，星野真酉，谷川力，牧野敬，林栄治，川端寛樹，黒木俊郎，川中正憲，田栗利紹，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．福岡，2003 年

13) 小泉信夫，渡辺治雄．病原性レプトスピラの新規リポタンパク質の同定．第 40 回レプトスピラシンポジウム．福岡，2003 年

14) 増澤俊幸，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．福岡，2003 年

15) 伊豫田淳、田村和満、伊藤健一郎、渡辺 治雄：LEE遺伝子群非保有型志賀毒素産生性大腸菌に存在する病原性遺伝子の解析、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

16) 常　彬、前川純子、倉　文明、渡辺治雄：IVIAT法による *Legionella pneumophila* の新たな病原因子の同定。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

17) 常　彬、前川純子、倉　文明、渡辺治雄：*Legionella pneumophila* の新たな接着因子の同定。第 86 回日本細菌学会関東支部会、2003 年 10 月、横浜

18) 大倉正稔，大澤朗，井口純，高木道浩，荒川英二，寺嶋淳，渡邊治雄　AP-PCR断片のDNA配列を利用した新興型腸炎ビブリオ同定用PCR法，第 37 回腸炎ビブリオシンポジウム，2003，11 月，青森

19) 鈴木理恵子，楠本正博，荒川英二，沖津忠行神奈川県における沿岸魚介類･汽水域からの腸炎ビブリオおよび*Vibrio vulnificus*検出状況，第 37 回腸炎ビブリオシンポジウム，2003，11 月，青森

20) 平川宣幸，中川知子，Faruque SM，Ramamurthy T，Nair GB，荒川英二，三好伸一，篠田純男ベンガル地域におけるコレラ菌およびナグビブリオの分子疫学的研究，第 37 回腸炎ビブリ

オシンポジウム，2003，11 月，青森

21) 大倉正稔，大澤朗，井口純，荒川英二，寺嶋淳，渡邊治雄　新興型腸炎ビブリオの遺伝子型と同定用PCR法の開発，第 24 回日本食品微生物学会，2003，10 月，岡山

22) 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

23) Tuyoshi Yamazaki，Makiko Hamatake，Saburou Yamamoto，Mituo Honda，Shinji Haga，IFN-γELISPOT 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

24) 川端寛樹、榊原省司、今井康之、増澤俊幸、藤田博己、渡邉治雄. 奄美諸島におけるレプトスピラの浸潤.第 41 回レプトスピラシンポジウム。2004.

25) 川端寛樹、渡邉治雄. 制限修飾遺伝子破壊株による形質導入とその感染性. 第 41 回レプトスピラシンポジウム。2004.

26) 川端寛樹、渡辺治雄：ライム病ボレリア推定制限・修飾遺伝子破壊による感染性株の形質転換法確立。第 86 回日本細菌学会関東支部会（横浜）。2003.

27) 川端寛樹:ポストゲノムにおけるライム病研究新戦略と展望-ライム病ボレリア遺伝子改変技術の現状。講演。第 11 回SADI（ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー）（長野）。2003.

28) 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.

29) 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.

30) 前川純子、倉　文明、渡辺治雄：レジオネラ属菌のカタラーゼの解析。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年、4 月、熊本

31) 高橋英之、渡辺治雄. 髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* のγ-glutamyl aminopeptidaseの病原因子としての機能解析. 第 76 回日本細菌学会　2003 年 4 月

32) 武内博朗、井田亮、野色浩美、早川浩生、奥田健太郎、由川英二、野村義明、泉福英信、花田信弘、3DS(Dental Drug Delivery System)によるミュータンスレンサ球菌の臨床的除菌法の問題点とその対策、第 52 回口腔衛生学会総会、小倉、9 月 25 日～9 月 27 日、2003.

33) 田中とも子、北田加代美、野村義明、泉福英信、佐藤勉、花田信弘、桐村和子、鴨井久一、唾液を用いた歯周疾患診断のための臨床検査の可能性　第３報　疫学診断応用のためのアンケート調査結果の分析、第 52 回口腔衛生学会総会、小倉、9 月 25 日～9 月 27 日、2003.

34) 中村諭、佐藤勉、泉福英信、花田信弘、由川英二、井田博久、定期的口腔ケアを実施している特別養護老人ホーム入所者（４施設）における口腔微生物検出状況、第 52 回口腔衛生学会総会、小倉、9 月 25 日～9 月 27 日、2003.

35) 北田加代美、田中とも子、野村義明、泉福英信、花田信弘、佐藤勉、桐村和子、鴨井久一、唾液を用いた歯周疾患診断のための臨床検査の可能性　第２報歯周疾患治療に対する予後因子の解析　第 52 回口腔衛生学会総会、小倉、9 月 25 日～9 月 27 日、2003 年.

36) 野村義明、田中とも子、北田加代美、泉福英信、花田信弘、佐藤勉、桐村和子、鴨井久一、唾液を用いた歯周疾患診断のための臨床検査の可

能性　第 1 報基準値設定のための解析　第 52 回口腔衛生学会総会、小倉、9 月 25 日～9 月 27 日、2003 年.

37) Salam, MA., Senpuku H. *E2f1* mutation induces early onset of autoimmune diseases in non-obese diabetic mice. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、12 月 8 日～12 月 10 日、2003 年.

38) 泉福英信、中尾龍馬、渡辺治雄、唾液分泌低下遺伝子組み換えマウスを用いた oral streptococciによる歯面付着の検討、第 77 回日本細菌学会総会､大阪､4 月 1 日～4 月 3 日、2004 年.

39) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H. Contribution of myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 第 76 回日本生化学会大会, 2003 年 10 月, 横浜。

40) Shimono, M., Endo, R., Takahashi, H., Sugino, N., Kura, F., Dinauer, M., Maeda, N. Koyama, H., and Aratani, Y.：Increased sensitivity of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH-oxidase to dextran sulfate-induced colitis. 第 76 回日本生化学会大会, 2003 年 10 月, 横浜。

41) Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N., and Koyama, H.: Contribution of myeloperoxidase-dependent oxidative system to the host defense against *Cryptococcus neoformans*. 第 9 回MPO研究会、2003 年 10 月、東京。

42) 東　美香、河野喜美子、斉藤信弘、鈴木　泉、倉　文明、前川純子、渡辺治雄：循環式入浴施設におけるレジオネラ症集団感染事例, 第 77 回日本感染症学会総会, 2003 年 4 月, 福岡。

43) 倉　文明：レジオネラ感染症、衛生微生物技術協議会第 24 回研究会､シンポジウム講演､2003 年 7 月、福岡。

44) 河野喜美子、東　美香、斉藤信弘、鈴木　泉、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 集団感染事例について、衛生微生物技術協議会第 24 回研究会、シンポジウム講演、2003 年 7 月、福岡。

45) 荒谷康昭、倉　文明、鈴木和男、小山秀機：*Cryptococcus neoformans*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の役割. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月、福岡。

46) 倉　文明、前川純子。レジオネラ。平成 15 年度特別課程細菌学コースレジオネラ講義･実習、2004 年 1 月、東京。

47) 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

48) 渡辺治雄。輸入感染症としての細菌性下痢症の細菌の問題点。ワークショップ“輸入感染症の今：ボーダーレス時代に生じた新しい問題”。第５２回日本感染症学会東日本地方会。 2003 年１０月。横浜。

49) 泉谷秀昌、寺嶋　淳、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：0157 を中心とした、2003 年分離EHECの動向について。第 8 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2004 年 3 月、東京

50) 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

51) 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

52) 渡辺治雄。ワクチンの現状と展望-特に腸管感染症について。第７７回日本感染症学会。2003年４月。福岡

53) 小林博司、藤原康司、斉藤義弘、大島左希子、久保政勝、衛藤義勝、門間千恵、北村　勝：Abotulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of *Clostridium botulinum* type Ab　第 50 回毒素シンポジウム、2003 年７月、和歌山県

54) 寺嶋　淳、泉谷秀昌：PFGEによる分子疫学的解析：　国立公衆衛生院平成 15 年度特別課程、2004 年１月、東京、

55) 三戸部治郎　渡辺治雄. 二成分制御系センサーCpxAを介した赤痢菌病原遺伝子の転写後調節. 2004 年４月第 77 回日本細菌学会総会

56) 榊原省司、増沢俊幸、川端寛樹. *gyrB*解析によるレプトスピラ蝕清型推定法の開発.第 41 回レプトスピラシンポジウム。2004.

57) 増澤俊幸、渡邉むつみ、Ece S. Guner、角坂照貴、河村好章、江崎孝行、川端寛樹、今井康之、金田一秀. 回帰熱ボレリアとライム病ボレリアの中間に位置する新種*Borrelia turcica*の性状. 第 41 回レプトスピラシンポジウム。2004.

58) 増澤俊幸、渡邉むつみ、河村好章、川端寛樹、今井康之、金田一秀、江崎孝行：回帰熱ボレリアとも、ライム病ボレリアとも異なる新規なボレリア*Borrelia turcica* sp. nov. . 日本細菌学会総会（大阪）. 2004.

59) 泉谷秀昌:サルモネラによる食中毒の発生状況とその傾向について。第５回感染症フォーラム、2004 年１月、東京都。

60) 泉谷秀昌：分子生物学概論。国立保健医療科学院平成 15 年度特別課程、2004 年１月、東京都。

61) 柏木美智子、増田高志、佐野世乃、川森文彦、三輪憲永、倉重英明、泉谷秀昌、渡辺治雄:2003年に静岡県内で発生した*Salmonella* Enteritidisによる食中毒事例の疫学的解析。地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第 16 回総会・研究会、2004 年２月、山梨県東山梨郡春日居町。

62) 吉田英樹、砂川富正、大山卓昭、谷口清洲、岡部信彦、田村和満、寺嶋　淳、渡辺治雄：細菌性赤痢国内発生事例の疫学的検討-2001 年 11 月～2002 年３月-。2003 年４月、福岡

63) 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*の相同性について。第 74 回日本細菌学会総会、2003 年４月、熊本

64) 泉谷秀昌、寺嶋　淳、田村和満、渡辺治雄：*Salmonella* Enteritidisに関するファージ型別および薬剤耐性の動向。第 74 回日本細菌学会総会、2003 年４月、熊本

65) 廣瀬健二、荒川英二、高井信子、田村和満、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. 日本細菌学会総会　熊本　2003

66) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2001-2002 年における O157:H7 を中心としたEHECの動向について。第７回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2003 年６月、奈良

67) 寺嶋　淳：赤痢菌の PFGE。第 24 回衛生微生物技術協議会、2003 年７月、福岡

68) 寺嶋　淳、泉谷秀昌、伊豫田　淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2002 年における0157:H7を中心としたEHECの動向について。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年４月、熊本

69) 和田昭仁. Penicillin-binding protein 1 は*Staphylococcus aureus*の増殖に必須である、

薬剤耐性菌研究会、伊香保町、群馬県、2003 年 11 月

70) 和田昭仁 大内史子、佐藤慈子、山河芳夫、Brigitte Berger-Bächi.黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性に影響を与える因子の解析、、第 52 日本感染症学会東日本地方会、第 50 回日本化学療法学会東日本支部会、第 86 回日本細菌学会関東支部会合同学会、横浜市、神奈川県、2003 年 10 月

71) 寺嶋　淳:細菌性食中毒における分子生物学的識別。JICA臨床検査技術研修講義、2003 年 11 月、
東京.

72) 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、生物発光を用いた結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討、第 78 回日本結核病学会総会、2003、4 月、倉敷

73) 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、結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討、第 73 回実験結核研究会、2003、4 月、倉敷

74) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一、らい菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討、第 76 回日本ハンセン病学会、2003、7 月、神戸

75) 赤川清子、金澤祐子、山崎利雄、岸文雄、芳賀伸治、ヒトマクロファージの結核菌の増殖抑制機構およびそれに関連したシグナル伝達機構の解析、平成 15 年度日米医学協力結核ハンセン病専門部会議、2004、3 月、京都

76) 寺嶋　淳：腸管出血性大腸菌 0157 の近年の遺伝子型別の動向とその疫学調査への有用性。第 86 回.
日本細菌学会関東支部会、2003 年 10 月、横浜

77) 高橋英之、渡辺祐子。平成 15 年度特別課程細菌学コース髄膜炎講義・実習。2004 年 1 月、東京。

5. 細菌第二部

部 長　荒川 宜親

概　要

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、旧細菌製剤第二室）の5つの室から構成され、抗生物質製剤、DPT ワクチン、抗毒素血清、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などに従事している。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などに従事し、同時に、生物学的製剤の試験結果の解析、評価などに関し生物統計学的側面から支援を行った。さらに、これらの生物学的製剤等の試験・検査、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たのに伴い、厚生労働省の審査管理課、監視指導・麻薬対策課、国立医薬品食品研究所、公定書協会などと協力し、切り替え作業に参加した。さらに、日本薬局方の無菌試験法、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と支援を行った。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、同時に研修生等の受入れや技術研修などの支援を行った。

細菌第二部への組織再編後は、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「院内感染対策サーベイランス事業」への専門的な視点からの支援

2. 特定疾患の IgA 腎症などと微生物感染症の関連についての研究

3.アジア諸国における細菌ワクチン製剤の品質管理の向上に関する国際共同研究

4.生物学的製剤の品質管理等に関する WHO（WPRO）コラボレーションセンターとしての協力

5. 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*、*Bartonella quintana*、*Haemophilus influenzae* などの病原細菌の分離・同定、病原性や病原因子、検査法、疫学などにかかわる様々な研究が実施された。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金による各種の研究事業に協力し、新興・再興感染症研究事業、医薬安全総合研究事業、ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント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様々な研究等も実施された。

常勤職員の異動としては、平成15年10月1日付けで鈴木里和研究官が、12月1日付で小澤良之主任研究官が採用された。また八木哲也主任研究官の国立長寿医療センターへの異動、土井洋平研究員の退所（米国ニューヨーク市 Roosevelt 病院における臨床研修のため）があった。細菌第二部に客員研究員として木ノ本雅通、協力研究員として山本十糸子、黒川博史、陳　平紆、大石和恵、高塚尚和、井上雅可、沼田昇、久保田眞由美、流動研究員として石川暁志、研究生として小島　禎、三枝智美、児玉温子、実習生として和知野純一、猪股夢乃、本間　操、山田友紀、畑中公基らが在籍し、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、横川滋子、南條友子、粕谷裕子、吉村由美子、増田まり子、久保田眞由美、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

今年度も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品質評価試験を行った。今年度中に 9 品目の評価が完了し新規標準品(新規ロット)の交付を開始した。また、緊急対応として旧日抗基常用標準品ロットを日局標準品にするべく Bioassay 法での品質再評価試験を行い 20 品目が交付された。[加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、南條友子、山根一和、土井洋平、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

今年度も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品質評価試験を行った。今年度中に 22 品目の評価が完了し新規標準品(新規ロット)の交付を開始した。また、緊急対応として旧日抗基常用標準品ロットを日局標準品にするべく HPLC 法及び吸光度法での品質再評価試験を行い各々1 品目が交付された。[山根一和、柴田尚宏、土井洋平、鈴木里和、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

昨年度までの研究結果を基に、今年度から(1)日局一般試験法「抗生物質の微生物学的力価試験法」の試験菌液及び試験芽胞液の調製について、客観的な数値化を目指し、各菌種の試験菌液ロット間での精度管理を容易に行えるような検討を加えること、(2)力価試験法の円筒平板法と穿孔平板法の比較について、試験菌の発育阻止円の最適な直径を示すようなの至適濃度を目指して、溶液濃度に対する阻止円直径との関係について統計学的な再検討を行うこと、(3)力価試験法の力価計算法について、統計学的な平行線定量法の計算法を採用して、各種抗生物質の力価についての試験測定誤差の範囲を明らかにすること、の主な3項目の研究を実施することとし、各項目で一部基礎データが得られた。[近田俊文、南條友子、加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、山根一和、土井洋平、粕谷裕子]

4. 抗生物質の日本薬局方標準品の整備に関する研究

昨年度から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、等)、標準品の保存法改良(システム的なフリーザー保存管理)、標準品の在庫管理及び製品交付並びにその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施してきたが、本年度は更にスムーズにそれらが実施できるように種々の改良、改善を実施した。なお、日本薬局方抗生物質標準品の在庫とその準備状況についての諸情報は、厚生労働省審査管理課、製薬企業団体(東京医薬品工業協会、大阪医薬品協会、日本抗生物質学術協議会)にも順次提供した。[近田俊文、土井洋平、柴田尚宏、加藤はる、山根一和、鈴木里和、南條友子、粕谷裕子]

5. 収去検査による抗生物質医薬品の品質管理研究

平成 15 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(ホスホマイシンカルシウム:13 ロット、硫酸ポリミキシンB:4 ロット)ついて力価試験、確認試験(IR 及び NMR 解析)を、注射剤(セフメタゾールナトリウム:10 ロット、リン酸クリンダマイシン:6 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、山根一和、鈴木里和、土井洋平、南條友子、粕谷裕子、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

新規の抗生物質(ドリペネム水和物)の特別審査を受け付けて、申請書の品質管理試験法の精査を行った。今後、申請書の試験法に沿って実地試験を行う予定である。[近田俊文、山根一和、鈴木里和、柴田尚宏、加藤はる、南條友子、粕谷裕子、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

7. 依頼試験による抗生物質医薬品の品質管理研究

注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)(特別審査:2001 年度受付、2002 年度力価試験等で「判定保留」とな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」判定)の一部変更承認書に記載された力価試験法(比濁法)について、厚生労働省(審査管理課、審査センター)の指導により、申請者(アベンティスファーマ株式会社)が本試験方法の確認のために感染研へ実地試験を依頼した。その結果、この力価試験(比濁法)については安定した再現性のある方法とは認められなかった理由により、力価品質規格を評価することは非常に困難という判定となった。その試験検査成績書は検定協議会で報告審議され、申請者に報告するとともに厚生労働省当局にも報告され、その後、感染研所長の意見書としても審査管理課長宛に送付された。今後、厚生労働省当局がどのような取り扱いをするか決める予定である。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、鈴木里和、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、吉倉廣(所長)]

Ⅱ. 抗生物質に対する耐性菌の研究及び検査

1. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌(IMP-1 型、IMP-2型、VIM-2 型)の検出と解析

メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌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と IMP-1 型、IMP-2型、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーを作製し行う、PCR 法を確立し、報告してきた。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、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も報告してきたが、新たな都府県で、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出を認め、全国的な拡散が示唆された今後もブドウ糖非発酵菌群や腸内細菌科において、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、鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

2. β-ラクタマーゼ産生菌(CTX-M 型)の検出状況調査研究

我が国では、欧米に比べ、CTX-M 型β-ラクタマーゼ産生菌の検出が多いとされているが、実体は明らかでない。我々は、全国 19 施設から分離された約 400 株の臨床分離株の CTX-M 型β-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況を PCR 法を用い、調査した。その結果、CTX-M-1 グループ、CTX-M-2 グループ、CTX-M-9 グループの大きく 3 種類に分類されることが明らかとなった。我が国で発見された、Toho-1 型β-ラクタマーゼ産生菌は検出されなかった。菌種としては、腸内細菌科全般に拡がっていたが、クレブシエラ、大腸菌、プロテウスが多く検出された。一部院内感染の様相を示している施設もあり、今後も調査すべきと考えられた。[柴田尚宏、鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

3. ESBL 産生菌やメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌におけるβ-ラクタマーゼ遺伝子を担う因子の検討

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。我々の調査では、我が国におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生株は、IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型を問わず、大部分の菌株がクラス1型インテグロンに担われていることが明らかとなった。また、近年インテグロン関連構造として報告されている、ORF513 遺伝子は、CTX-M 型β-ラクタマーゼ遺伝子に隣接して存在することが明らかとなっており、これらについても関連を調査した。その結果、CTX-M 型β-ラクタマーゼ産生菌は、すべてインテグラーゼ遺伝子や ORF513 遺伝子を保有しているわけではないことが明らかとなった。別のトランスポゼースや IS との関連も考えられた。[柴田尚宏、荒川宜親]

4. 臨床分離株のβ-ラクタマーゼ遺伝子の依頼検査

臨床分離株の薬剤耐性遺伝子検査依頼があり、特に 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査を中心に行った。検査方法は、主にディスク拡散法と PCR 検査など行い報告した。対象施設は、全国約 40 施設で、検査総数は約 600 件であった。対象菌種は、腸内細菌科では大腸菌、クレブシエラ、セラチアなどで、ブドウ糖非発酵菌群では、緑膿菌、アシネトバクターなどが多かった。また、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、甲斐久美子、横川滋子、荒川宜親］

5. ESBL 産生大腸菌による院内感染事例の疫学調査および細菌学的解析

ESBL 産生大腸菌よる院内感染事例が発生した医療機関との共同研究により、事例の疫学的および細菌学的検討を行った。事例は院内感染対策が適切に行われていた血液内科病棟で発生しており、疫学調査により大腸菌のような腸内細菌叢を構成する菌の伝播には医療スタッフや医療処置のみならずトイレなどにおける患者間の接触もまた関与している事が示唆された。そのご積極的なスクリーニング検査などで、他病棟などにおいても ESBL 産生菌が分離されたが、院内において伝播している所見は無く、当該病棟においても事例は終息したと考えられた。細菌学的検討より、今回の事例は CTX-M-9 型 ESBL 産生大腸菌 O25:H4 によるものであり、PFGE による遺伝子解析上も同一株であった。［鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親］

6. ESBL 産生大腸菌 O25 の広域伝播に関する解析

医療機関より送付された CTX-M-9 型 ESBL 産生大腸菌のなかで血清型 O25、O86 のものが多く、また血清型 O25 に関しては疫学的関連のない医療機関より分離された株のPFGEが一致する。これらのことから、海外でしばしば報告される同一株による耐性菌の広域伝播がわが国においても発生している可能性があり、その分子疫学的調査を進めている。また、大腸菌の O 抗原と ESBL 産生との間の関連についての検討も行っている。［鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親］

7. オキシイミノセファロスポリンとセファマイシンに耐性を示す臨床分離大腸菌株が産生する阻害剤感性 AmpC β-ラクタマーゼの解析

1994 年に国内の病院で分離された広域セフェム耐性大腸菌 HKY-28 株の染色体性 AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子をクローニングしたところ、オキシイミノセファロスポリン、セファマイシン耐性、β-ラクタマーゼ阻害剤感性という特殊な表現型を示した。この AmpC は H-10 ヘリックス領域に 3 アミノ酸の欠失が認められ、この欠失を変異導入により復元するとAmpC に一般的な β-ラクタマーゼ阻害剤耐性が回復し、オキシイミノセファロスポリン、セファマイシンへの耐性は低下した。この現象は精製酵素を用いた酵素解析によっても裏付けられた。β-ラクタマーゼ阻害剤に対し感性化した変異型 AmpC を遺伝学的、酵素学的に検討したのはこれが世界で初めてである。［土井洋平、和知野純一、黒川博史、荒川宜親］

8. アルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *rmtA* 遺伝子の周辺構造の解析

臨床分離されたアルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *rmtA* の周辺構造を調べた結果、*rmtA* を含む周辺 6.2kbp（*rmtA* locus）は水銀耐性遺伝子を保有する Tn5041 に挿入される形で存在した。rmtA locus は両端にκγ element と呼ばれる IS 様構造を持ち、トランスポゾンに類似した構造を持っていることが明らかとなった。またこれらの塩基配列は既存の病原細菌との相同性は低く、むしろ環境細菌と相同性が高いことから環境中の細菌から緑膿菌がこれらの構造を獲得した可能性が示唆される。［山根一和、土井洋平、荒川宜親］

9. アミノグリコシド耐性を示す臨床分離株の解析

臨床分離されたアミノグリコシドに耐性を示す腸内細菌、*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属について 16S rRNA メチラーゼの保有状況を調べた。方法はアルベカシン濃度 50 mg/L 入り LB 培地に菌を接種し、コロニーを形成した菌株に対して既存の 16S rRNA メチラーゼ（RmtA, RmtB, ArmA）を

multiplex PCR 法で検査した。現在のところ検査の依頼があった菌株については 16S rRNA メチラーゼを産生している菌株は認められない。[山根一和、和知野純一、甲斐久美子、荒川宜親]

10. アミノグリコシド高度耐性を付与する *rmtB* を保持するプラスミドの解析

16S rRNA メチラーゼの一種である *rmtB* は臨床分離された *Serratia marcescens* から初めて報告された。その後大腸菌(C-316 株)からも同様の遺伝子が分離され、プラスミドに保持されていることが判明した。このプラスミドは大きさが 80-90 kbp で、shot gun sequence 法により塩基配列を調べるとグラム陰性菌に広く分布している R100 と呼ばれる薬剤耐性プラスミドがプロトタイプであることが判明した。現在どのような薬剤耐性遺伝子を保有されているか解析中である。[山根一和、和知野純一、蒲地一成、荒川宜親]

11. アミノグリコシド高度耐性を示すセラチア・マルセッセンス臨床菌株が産生する 16S rRNA メチラーゼの解析

2002 年に国内の病院で分離されアミノグリコシド系抗菌薬に高度耐性を示したセラチア・マルセッセンス菌株より新規 16S rRNA メチラーゼ RmtB を同定した。RmtB は緑膿菌より同定された RmtA と 82%の相同性を有し、その責任遺伝子は大腸菌に接合伝達された。ヒスチジンタグ法を用い精製された RmtB は大腸菌の 16S rRNA に対し明らかなメチル化活性を示した。更に *rmtB* 遺伝子を保有する組み換えプラスミドをアミノグリコシド感性大腸菌に導入したところ、ストレプトマイシンとネオマイシンを除く全てのアミノグリコシドに高度の耐性を示した。今回の研究により腸内細菌科にも 16S rRNA メチラーゼによるアミノグリコシド耐性機構が存在することが明らかになった。[土井洋平、山根一和、荒川宜親]

12. アシネトバクター属臨床分離株が保有する新規アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Iad* 遺伝子の同定

2002 年に国内で分離されたアシネトバクター属菌株より新規アミノグリコシド 6'-N-アセチル化酵素遺伝子 *aac(6')-Iad* を同定した。HPLC 法により 6'-N-アセチル化活性を有することを確認したこの新たな酵素は、既知の同種酵素とアミノ酸配列で最高で 37%の相同性しか示さず、産生菌にアミカシン、トブラマイシン、シソマイシン、イセパマイシンへの耐性を付与した。そこで同時期に国内で分離されたアシネトバクター属 264 株について調査したところ、アミカシン非感性を示した 16 株のうち 7 株から PCR 法で *aac(6')-Iad* が検出され、推定アミノ酸配列は全て同一だった。このことから国内で日和見感染菌として問題となりつつあるアシネトバクター属のアミノグリコシド耐性に *aac(6')-Iad* が一定の役割を果たしていることが示唆された。[土井洋平、和知野純一、荒川宜親]

13. リネゾリド耐性 *Enterococcus faecium* の耐性機序の解析

リネゾリドは 2000 年に開発された新しい抗菌薬で日本ではバンコマイシン耐性腸球菌の治療薬として臨床で利用されている。依頼菌株はリネゾリドを長期投与された患者由来の *Enterococcus faecium* であった。耐性の機序を調べたところリネゾリドの作用部位である 23S rRNA 遺伝子の 2576 番目の塩基がグアニンからチミンに変異を起こしていることが明らかになった。この変異は黄色ブドウ球菌や腸球菌のリネゾリド耐性に関与する変異として外国では報告がなされている。今回の結果からリネゾリドの長期投与は容易に腸球菌などの耐性化を引き起こす可能性があることを示しており、臨床での使用に際しては注意を要すると思われる。[山根一和、荒川宜親]

14. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の PCR による *van* gene 検出あるいは菌種同定

以下の解析依頼について(1)尾道小児外科(広島県) *vanC1* type、(2)日本鋼管福山病院(広島県) *vanA* type、(3)静岡県立静岡ガンセンター(静岡県) *vanC1* type、(4)焼津市立総合病院 (静岡県) *vanC1* type、(5)藤田保健衛生大学病院(愛知県) *vanA* type(16S rRNA gene の sequencing による菌種同定)を研究ベースにて受け、検討した。〔加藤はる、甲斐久美子、吉村由美子、横川滋子、荒川宜親〕

15. 臨床分離された黄色ブドウ球菌の病原因子の解析

臨床から分離された黄色ブドウ球菌の毒素産生性について検査を行った。依頼を受けた 6 株の黄色ブドウ球菌について

enterotoxin A,B,C,D,E, TSST-1, exfoliative toxin A,B の 8 種類についてラテックス凝集反応による毒素の検出と PCR 法による毒素遺伝子の検出を行った。2 株で enterotoxin C と TSST-1 がラテックス凝集反応、PCR 法の両方で陽性となった。また 1 株は enterotoxin B が PCR 法で陽性となったが、ラテックス凝集反応は陰性だった。[山根一和、甲斐久美子、荒川宜親]

Ⅲ. 院内感染対策に関する研究

1. 院内感染対策サーベイランスシステムに関する研究

現在、厚生労働科学研究費によってすすめられている 200 床以上の医療機関を対象とした院内感染対策サーベイランス(JANIS)と、200 床以下の中小規模病院を対象とした院内感染対策サーベイランスに関する研究の一環として、より実用性、実行性を改善したシステム設立のため、既存の細菌検査室データを用いた解析を行っている。また、米国をはじめ諸外国における院内感染サーベイランスとわが国のそれとを比較しつつ、わが国の実情に応じたシステム設立のため、実際にサーベイランスを行っている医療機関との共同研究を行っている。[鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

2. 院内感染対策サーベイランス随時報告の検討

厚生労働省の院内感染対策サーベイランス担当に集積された随時報告データの送付を受け、種々の検討を加えた。[加藤はる、荒川宜親]

Ⅳ. *Clostridium difficile* に関する研究及び検査

1. *Clostridium. difficile* における slpA シークエンスタイピングの確立と応用

C. difficile の新しいタイピング法として、細胞表面タンパクのひとつである SlpA 蛋白をコードする遺伝子のシークエンスを行う方法を検討し、他の方法によるタイピング結果と比較した。糞便検体から抽出した DNA からの直接タイピングにも応用を試みた。〔加藤はる、横山敏之(久美愛病院)〕

2. 抗菌薬関連下痢症／腸炎の原因菌の究明

臨床的に抗菌薬関連下痢症／腸炎と診断された症例の糞便検体について、糞便検体中の、細胞毒素、*C. difficile* の toxin A、および *Clostridium perfringens* の enterotoxin の検出を行い、*C. difficile*、*C. perfringens*、および *Bacteroides fragilis* の分離培養を行った。分離菌株における毒素遺伝子の検出に加え、糞便検体から DNA を抽出し、毒素遺伝子の検出を行った。〔加藤はる、横山敏之(久美愛病院)〕

3. *Clostridium perfringens* の毒素型同定

肝膿瘍を伴った敗血症死亡症例の血液から分離された *C. perfringens* の major toxin の毒素型の同定の解析依頼があり、研究ベースにて解析を行った。〔加藤はる、吉村由美子、清水敬樹(さいたま赤十字病院救命救急センター救急医学科)〕

4. 院内感染が疑われた複数の *Clostridium difficile*

関連下痢症／腸炎症例および再発症例から分離された菌株の解析と比較解析依頼があり、研究ベースにて C. *difficile* 分離菌株の毒素産生性とタイピングを行った。〔加藤はる、吉村由美子、中村敦(名古屋市立大学附属病院)、加藤秀章(豊川市民病院)〕

5. *Clostridium difficile* 菌株の毒素産生性の解析

非典型的な毒素産生パターンを示す菌株の疑いで、毒素産生性の同定の解析依頼があり、研究ベースにて解析を行った。〔加藤はる、吉村由美子、豊川真弘(大阪大学医学部附属病院)〕

6. *Clostridium difficile* 感染症についての対応

検査診断や院内感染を中心に E-mail や電話等による質問、相談に個別に回答した。〔加藤はる〕

Ⅴ. マイコプラズマに関する研究

1. プロテオーム解析を用いた *Mycoplasma penetrans* の新規抗原探索と診断法開発への応用

血清抗体価測定用抗原として使用されてきたリポ蛋白群が抗原変異機構を有し、抗原性が一定でないことがゲノム解析から明らかになった為、新たな主要抗原を探索した。ピルベート、デヒドロゲネース(PDH)が主要抗原の一つである事から、*pdh-c* の一部を大腸菌にクローニングし、リコンビナント抗原を作成し、抗体測定系を作成した。作成した ELISA 系において、健常人と *M. penetrans* 感染者の血中抗体価には明らかな違いが認められた。

(佐々木裕子1、新開-大内　史子2、山河芳男2、川上隆雄 3、西村俊秀 3、見理　剛1、堀野敦子1、佐々木次雄1、1:細菌第二部、2:細胞化学部、3:東京医科大学、臨床プロテオームセンター)

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:IgA 腎症患者血中の抗マイコプラズマ抗体価測定の為の新規抗原作成と、血清抗体価測定

特異性のより高い抗体価測定系確立の為、*M. pneumoniae* と *M. penetrans* のリコンビナント抗原を作成し、*M. fermentans* 糖脂質 GGPL-III(松田分与)に対して、血中抗体価を測定した。IgA 腎症患者群における抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価は、健常人と比較すると $p<0.0001$ と有意に高値を示し、抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価は、$p=0.023$ と高く、抗 *M. penetrans* 抗体価は群としては変化がないものの 1 名が陽性であった。IgA 腎症患者の治療用摘出扁桃から、*M. pneumoniae* あるいは *M. fermentasn*-DNA が検出され、陰窩上皮層の細胞浮腫、IgA 陽性細浸潤等の病理変化が見られた。

(佐々木裕子1、松田和洋2、永田典代 3、見理　剛1、堀田修4、宮崎真理子4、荒川宜親1、1:細菌第二部、2:国立ガンセンター研究所、薬効試験部、3:感染病理部、4:仙台社会保険病院、内科・腎臓)

3. *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造に関する研究

M. pneumoniae は細胞壁をもたないが、内部に細胞骨格様の構造を持ち、細胞形態を支えていると考えられている。細胞骨格構造は *M. pneumoniae* の接着器官の形成に密接に関連しており、接着性や運動性においても重要な役割を担っていると考えられる。細胞骨格様構造の詳細を知るのを目的に、蛍光タンパク質を利用して *M. pneumoniae* のタンパク質の細胞内局在を調べている。これまで使用していた Enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)に加えて、本年は Enhanced cyan fluorescent protein (ECFP)を *M. pneumoniae* で使用する系を確立した。これらを使用して *M. pneumoniae* の *crl* 遺伝子座 (cytadherence regulatory locus) にコードされるタンパク質の細胞内局在を調べると、接着器官の構成成分と考えられる P65、HMW2 タンパク質は接着器官部分に明らかな局在を示したが、機能未知の P41、P24 タンパク質は接着器官の基幹部に存在していることがわかった。この結果から P41、P24 タンパク質は接着器官をささえる細胞骨格の構成因子だと推測された。[見理　剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、瀬戸真太郎(明海大学・歯)、宮田真人(大阪市大・院理)]

4. マイコプラズマ肺炎の分子疫学

1995 年以降に日本で肺炎や気管支炎患者から分離された *M. pneumoniae* 株の P1 遺伝子型別結果を集計した。その結果 1995 年以降、日本で分離される *M. pneumoniae* はほとんどすべて II 型菌であったが、2001 年頃から I 型菌が分離されはじめ、現在は I 型菌が主流になっていることが明らかになった。I 型菌が分離されるようになった頃から、マイコプラズマ肺炎患者はやや増加傾向にあり、今後I 型菌によるマイコプラズマ肺炎の流行が生じる可能性が考えられる。〔見理　剛、佐々木次雄、岡崎則男(神奈川衛研)、成田光生(札幌鉄道病院)山崎勉(埼玉医大)〕

5. マクロライド耐性 *M. pneumoniae* 感染症に関する研究

Mycoplasma pneumoniae を原因菌とするマイコプラズマ肺炎には、主にマクロライド抗生物質が治療薬として用いられるが、2000 年以降、本抗生物質に耐性を示す *M. pneumoniae* が臨床より分離されている。本研究では、近年流行の兆しをみせているエリスロマイシン(EM)耐性 *M. pneumoniae* の耐性機構解析を目的とし、本薬剤の作用部位である 23S rRNA の domain II 及び domain V(ペプチジルトランスフェラーゼ領域)、23S

ribosomal protein L4, L22 の解析を行った。その結果、2000-2003 年に北海道、神奈川県、高知県の離れた場所から分離された *M. pneumoniae* 76 株のうち、13 株(17%)が EM 耐性を示した。このうち 12 株は EM に高度耐性(MIC>200 μg/ml)、1 株は中等度耐性(MIC>3.13 μg/ml)であった。高度耐性を示した菌は、EM の作用部位である 23S rRNA ペプチジルトランスフェラーゼ領域(ドメインV)内の 2063 又は 2064 位(*E. coli* の 2058, 2059 位)のアデニン残基(A)がシトシン残基(C)に置換されたもので、当該変異は EM 耐性菌の多くで認められる。一方、中等度耐性を示した菌ではドメインVの 2617 位でシトシンからグアニン残基への置換が見られた。

マイコプラズマ肺炎患者からは EM 耐性 *M. pneumoniae* が検出されたにもかかわらず、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンによって治癒した例がみられ、このことはマクロライド抗生物質の抗炎症作用をもマイコプラズマ肺炎治癒の一因として考慮する必要性を示唆している。[久保田眞由美、成田光生(札幌鉄道病院)、岡崎則男(神奈川県衛生研究所)、見理 剛、荒川宜親、佐々木次雄]

6. *Mycoplasma penetrans* における *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター逆位の検出

我々はこれまでに *M. penetrans* の *p35* リポタンパク質遺伝子群の発現が多数の逆位可能なプロモーターによって、調節されているモデルを提唱してきた。しかし、これまで 30 個以上発見されたリポタンパク質遺伝子のプロモーター領域のうち、逆位が実験的に確認されていたのは、*p42* 遺伝子のプロモーター領域のみであった。

今回我々は、PCR を用いてプロモーター領域の逆位を検出する実験系を作成した。この方法を用いて *M. penetrans* のリポタンパク質プロモーター領域 8 カ所について調べると、すべてのプロモーター部位で実際に *p42* のプロモーターと同様な DNA 逆位が起きていることが明らかになった。これ以外の *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域も、今回 DNA 逆位が検出されたプロモーターと類似したモチーフを有しているので、これらはみな *M. penetrans* の細胞内で DNA 逆位を起こすものと思われる。

[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

7. *Mycoplasma penetrans p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域の逆位に関与する酵素について

部位特異的な遺伝子組み換えは、多くの場合、作用部位に特異的な酵素によって触媒される。この酵素としては λ-integrase family の tyrosine recombinase がよく知られている。*M. penetrans* のリポタンパク質遺伝子の逆位に関与する因子について、ゲノム情報を利用して BLAST 検索を行い、tyrosine site-specific recombinase にホモロジーのある二つの ORF、MYPE2900 と MYPE8180 を同定した。これらの ORF が *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域の逆位を触媒するか検討を行った。*M. penetrans* はこれまでのところ遺伝子操作ができないため、*M. pneumoniae* 細胞内で MYPE2900, MYPE8180 を発現させて検討を行った。その結果、MYPE2900 を導入した *M. pneumoniae* では、*p42* と *p35* プロモーター領域に DNA 逆位が起こることが確認された。一方、MYPE8180 を組み込んだ *M. pneumoniae* では、これらのプロモーター領域に DNA 逆位は起こらなかった。このことから、MYPE2900 がリポタンパク質遺伝子のプロモーター領域の逆位を触媒する酵素であることが確認された。我々は MYPE2900 を MipR (Recombinase for Multiple Invertible Promoter)と名付けた。

[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

VI. バルトネラ感染症に関する研究

1. 東京都豊島区において年2回行われている路上生活者対策事業を、昨年度に引き続き国立感染症研究所、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行った。インフォームド・コンセントを行い、採血及び衣類の一部提供を求めた。採取された血液及びコロモジラミからの *B. quintana* 分離及び *B. quintana* DNA 検出、血清抗体価測定を行った。対象者数 188 名中コロモジラミ寄生者は 7 名(3.7%)、コロモジラミ中から *B. quintana* DNA 検出者は 2 名、血液中からの *B. quintana* DNA 検出者はなかった。IgG 抗体価 IFA:128 以上は 85 名(74.6%)で、前回の当該対策事業における 38.3% を大きく上回り、わが国都市部に住む路上生活者間に、コロモジラミを介して *B. quintana* 感染症が広がりつつあることを示唆している。[久保田眞由美、関なおみ(豊島区池袋保健所)、佐々木年則、澤邊京子、小林睦夫、荒川宜親、佐々木次雄]

2. *B. quintana* 感染症の臨床診断における簡便性を目的とし、特異的血清診断法の開発に着手した。本研究では、ホームレス血清と特異的に結合する *B. quintana* 由来タンパク質のひとつが HbpD (hemi-binding protein D)であることを見いだし、発現用ベクターpET30c にクローニングした後、大腸菌中で当該タンパク質の発現を確認した。このタンパク質を用いた診断キットの開発に向け更に研究を進めている。[久保田眞由美、荒川宜親、佐々木次雄]

Ⅶ. *Haemophilus influenzae* に関する研究

1. *H. influenzae* type b コンジュゲートワクチンの免疫原性の検討

破傷風トキソイドをキャリア蛋白とする *H. influenzae* type b コンジュゲートワクチンを単独接種した場合の PRP に関する免疫原性について検討した。マウス(ICR、雄、4 週)にワクチンを 1/5 single human dose ずつ 2 週または 3 週間隔で計 4 回、皮下(5 匹)または筋肉内(5 匹)に接種し、各回の 2 週間後に尾静脈より部分採血した。自家製チラミン化 PRP を固相化した ELISA により血中抗 PRP 抗体価を測定した。個体差はあるが 3 回免疫後に血中抗体価の上昇が見られた。[新谷三春、佐々木裕子、長岡芳昭、高橋元秀、佐々木次雄、荒川宜親]

Ⅷ. 行政科学に関する研究

1. 生物学的製剤基準の改定作業

平成 5 年に改正が行われて以来全般的な見直しが行われていなかった生物学的製剤基準の大改正が行われ、本改正作業に従事した。今回の改正において、細菌第二部としては、BCGワクチンの含湿度、抗毒素製剤の力価表現の改定、試験用動物規定、エンドトキシン試験法、無菌試験法、通則のロット定義の見直し等に積極的に貢献した。[佐々木次雄、堀内善信、山本三郎、高橋元秀、荒川宜親]

2. 日本薬局方活動

生物試験法委員会と製薬用水委員会活動に参加した。生物試験法委員会では、国際調和無菌試験法に沿って日局無菌試験法の改正作業、遺伝子解析による微生物の迅速同定法の作成を担当し、更に非無菌医薬品の国際調和作業に従事した。製薬用水委員会では、常水や注射用水の見直し作業に従事した。[佐々木次雄]

3. ISO/TC198 活動

WG9 (Aseptic processing of health care products)国際委員として、今年度は凍結乾燥、アイソレータ、定置洗浄、定置滅菌の国際規格(ISO 規格)作成に従事した。また、これまで ISO/TC198 から出された ISO 規格の国内導入を目標に解説書出版作業にも係わった。
[佐々木次雄]

4. 無菌医薬品ガイドライン作成

平成 17 年 4 月の改正薬事法施行に合わせて、監視指導・麻薬対策課より「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針(案)」及び「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針(案)」作成要請があった。厚労省科学研究班「無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究(主任:棚元憲一)」の一員として今年度は、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針(案)」作成作業に従事した。[佐々木裕子、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"の多様性

"1-1 ORF2"はジフテリア菌に広く存在する抗原蛋白質であるが、菌株によっては、プロリンに富む高度反復配列を備えた variant を産生する。この反復領域を DNA レベルで見ると、5 塩基からなる単位が(3 x n)回並んだあとにさらに 3 塩基が付加されて、総塩基数が 3 の倍数になり読み取り枠と合うような大きな単位を構成し、その大きな単位が繰り返すことにより、蛋白レベルでの繰り返し構造が実現されていることが明らかに

なった。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

2. ″1-1 ORF2″抗原遺伝子の内部欠失

ジフテリア菌 TMIH5 株(東京都健康安全センターより分与)が産生する″1-1 ORF2″ variant のプロリンに富む高度反復配列の安定性を検討するため、TMIH5 株を 30 日間毎日継代培養したのち 50 の独立したクローンを単離して、それらの″1-1 ORF2″遺伝子の塩基配列を調べたところ、1クローンで反復配列の内部に欠失が起こっていた。欠失は2つの 5 塩基単位の間で相同的組換えによって起こったものと推測された。そのような組換えでは読み取り枠が損なわれる場合が多いと予想されたにもかかわらず、欠失した塩基数は、読み取り枠を損なわず蛋白質の産生を維持する 3 の倍数であった。このことから、この蛋白質がジフテリア菌にとって重要な蛋白質である可能性が示唆された。[猪股夢乃、三枝智美、岩城正昭、高橋元秀]

3. ″1-1 ORF2″反復領域の遺伝子クローニングと抗原性の解析

TMIH5 株総DNAより、″1-1 ORF2″遺伝子内部の高度反復配列を含む領域を大腸菌発現ベクターpQE30 にPCRクローニングし、$(His)_6$タグを利用して産物を精製した。この産物に対する抗血清をマウスで作成し、ジフテリア菌 14 菌株のライセートに対する反応性をWestern blottingで検討したところ、TMIH5 および類似の″1-1 ORF2″蛋白質を発現するTMIH4 株では抗体に反応するバンドが見られたのに対し、他の全ての菌株ではバンドは見られなかった。プロリンに富む高度反復配列がこの蛋白質の抗原性に決定的な役割を果たしていることが示唆された。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

4. コラーゲンコート固相へのジフテリア菌の付着

ジフテリア菌の宿主への付着の機構の解析は、防圧の戦略を考える上で極めて重要である。我々はモデル系として、細胞外マトリクスへのジフテリア菌付着アッセイ系の確立を試みた。I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンでそれぞれコートされた 96 穴プレートで、BHI 液体培地にジフテリア菌 C4、C7、DMST15613 (タイ NIH より分与)、PW8 株を培養したところ、I 型コラーゲンコートプレートにDMST15613 株が高い細胞付着能を示した。現在、このアッセイ系を用いて、付着能を失った変異株の単離を試みている。[三枝智美、猪股夢乃、岩城正昭、高橋元秀]

5. *Corynebacterium ulcerans* とジフテリア菌の共通抗原について

C. ulcerans はジフテリアに極めて類似する感染症の起因菌として近年注目されており、国内でも患者が発生している。我々がすでに遺伝子を単離している 12 種のジフテリア菌抗原が *C. ulcerans* 感染症の診断に有用かどうかを知るため、抗 *C. ulcerans* 抗血清をウサギで作成し、12 種のジフテリア菌抗原との反応性を検討した。12 種の抗原のうち 3 種が抗 *C. ulcerans* 抗血清と反応し、*Corynebacterium ulcerans* とジフテリア菌の共通抗原である可能性が示された一方、残りの抗原がジフテリア菌特異的な抗原としてジフテリアの診断に有用であることも示唆された。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

6. 地方衛生研究所で保存されていたジフテリア菌について生化学的および分子生物学的検査をおこなった結果、Api コリネキットによる生化学的検査とバイオタイプの確認は、菌の性状を確認する上で有意義であることが再確認された。ジフテリア毒素原性試験の感度の比較では、PCR 法≧培養細胞法≧ウサギ皮内法＞Elek 法の順であった。また、毒素を定量的に測定した場合、培養細胞法はウサギ皮内法より 4 倍程度感度が優ることが確認された。平成 15 年 10 月ー平成 16 年 2 月に、12 医療機関の小児科担当医療従事者 49 名について毎月 1 回ジフテリア菌の分離検査を実施した結果、ジフテリア菌は検出されなかった。なお、期間中に血中ジフテリア抗毒素価測定を 2 回行ったが、1名を除いて抗毒素価の変動は確認されなかった。
[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀、秋田県衛生科学研究所、東京都健康安全研究センター、千葉県衛生研究所、三重県科学技術振興センター、福岡県保健環境研究所]

X. 破傷風に関する研究

1．2003 年 8 月から 6 ヶ月間にパキスタンのペシャワール子供病院で破傷風と診断された 100 名の患者から、糞便、臍のうスワブ及び血清を採取した。検体は 2004 年 2 月に、パキスタン側と日本側の検疫、税関手続き後を完了後に搬入した。100 検体のうち、年齢が 1 歳以上で新生児破傷風患者の区分にはいらない検体が 23 例あり、これらを除いた 77 例の患者情報を分析した。患者の平均年齢は 8.5 日であった。患者の性別は、男児は 59 例、女児は 19 例であった。入院後に臨床診断までに要した日は、平均日数は 3.8 日、入院期間の平均日数は11.5 日であった。臍帯切断後の処理方法では、牛の油でギーが 18 例(23%)、何らかの薬品が 12 例、灰が 4 例、HINA が 3 例、アルコール消毒が 2 例、粉が 2 例、無処理、不明が 24 例(47%)であった。患者の母親の破傷風トキソイド接種歴は、2 回接種が 5 例、1 回接種が 1 例、未接種が 46 例、不明が 24 例であった。菌分離試験については、現在試験中である。[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、小宮貴子、櫻田紳策、Iftikhal]

2．破傷風患者の実験室内診断に関する再検討

破傷風患者由来の分離菌から破傷風毒素が検出された場合、感染症法では患者診断は、「臨床診断」から「病原体診断」となるので、毒素の検出は診断の確定に重要である。毒素の検出では、動物を用いて破傷風の特徴的症状を確認すると供に、抗毒素(中和)抗体による毒素の中和を確認する必要がある。毒素中和試験では、試験管内で抗体と破傷風毒素を反応させる試験法と、動物に抗体と毒素を別々に注射して体内で反応させる試験法があるが、これらの二法では、一定量の抗体が中和できる毒素量の相違について明確でなかった。そこで、マウスを用いて生体内と試験管内で 0.1 単位の抗体が中和する毒素量を比較した結果、抗体により中和される毒素量は、試験管内では 3.7×10^3 マウスLD_{50}、生体内では 110 マウスLD_{50}であった。この結果から、試験管内中和法では生体内中和法よりも多くの毒素を抗体は中和できるので、毒素中和試験では試験管内中和法の利用が推奨される。[福田靖、高橋 元秀]

XI. ボツリヌスに関する研究

1．ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究:ボツリヌス A 型および B 型毒素による細菌テロを想定した時に、特定の対象者への予防を目的とした試作トキソイド作出のために、ボツリヌス A, B, E 及び F 型菌を培養、産生した毒素の精製を行い、最終 4 型混合トキソイド換算として約 500 用量相当の標品を得た。各型毒素ともに高度に精製し、過去に製造されたトキソイドに用いた毒素純度に比べて、安定且つ基本分子構造であるM型毒素標品を得た。各毒素は個々にホルマリンで無毒化し、4型混合トキソイドとして製剤化する。今後、安全性と有効性の評価は、実験動物を用いて確認する。[高橋元秀、岩城 正昭、福田 靖、小宮 貴子、小崎 俊司、幸田 知子(大阪府立大学)、大隈 邦夫、諸熊 一則、大塚 幹夫、中西喜彦(化血研)]

2．ボツリヌス毒素を用いて、さまざまな筋肉の異常興奮症の治療がおこなわれようとしている。ボツリヌス毒素は微量で生物活性を発現するために、毒素そのものの品質管理方法を確立する必要がある。今までに、人体に直接用いられた細菌毒素にジフテリア毒素があり、この生物学的製剤基準に準拠してボツリヌス毒素の基準案を作成し、品質管理試験として必要な項目、内容を整理した。また、微量の毒素を連続投与により抗毒素を誘導する動物モデルとして、ラットを用いて毒素を複数回投与、観察した。実験期間 210 日内に全身麻痺が出現するか、又は外見的に無症状のラットの血清中には、皮下注射法の検出レベルである 0.003IU/ml の抗毒素価は検出されなかった。[高橋元秀、岩城 正昭、福田 靖、小宮 貴子、小崎 俊司、幸田 知子(大阪府立大学)]

XII. 抗毒素に関する研究

1．抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究:ウマ抗毒素製剤は、数種の製剤が国内数社の製造所により数年前までは製造されていた。しかし、製剤の使用頻度が少なく、さらに GMP 対応施設の充実が近年求められており、企業として採算が見合わないことで製造を廃止する企業が多くなった。また、千葉血清は廃業に追い込まれたことにより、化血研で国内製剤のすべてを製造することとなった。化血研では承継した製剤については新規施設の立ち上げが終了し、増産が必要な製剤の製造計画・体制の調整も終了し、実製造がおこなわ

れている。一方、ウマ抗毒素製剤の供給体制については、経済性から鑑みると海外から輸入することが容易な手段と考えられるが、海外製造企業もGMP導入が必要な状況である。国内製造品よりも品質の良い製剤を輸入ことは困難である。従って、効率的に抗毒素を製造し、備蓄体制の充実を計るには、医薬品の開発分野で先行しているバイテク技術の応用が考えられる。複数の手法により安全なヒト型(化)抗体の安定的且つ大量生産を目標とした基礎的研究を開始し、今年度は研究立ち上げの基盤を整えた。[高橋元秀、佐々木次雄、千葉　丈(東京理科大学)、野崎周英(化血研)、向本雅郁(大阪府立大学)]

XIII. ワクチンの品質管理に関する研究

1. ジフテリアトキソイド・破傷風トキソイドの抗原量測定法の検討

ジフテリアトキソイド・破傷風トキソイド製剤中の抗原濃度(Lf値)は、これらの製剤の抗原純度を評価する際に蛋白濃度と同様に重要である。製造所と感染研では、生物学的製剤基準に沿った方法でこれらを測定しており、特に Lf 値に関しては 1994 年に共同でキャリブレーション作業(目合わせ)を行なったが、その後 10 年を経て各所での測定値に「ずれ」が生じることが懸念された。そこで、国内5製造所で製造されたジフテリアトキソイドと破傷風トキソイドについて Lf 値を測定し、それぞれの製造所での測定値と比較した。感染研での測定値は、ジフテリアトキソイドでは各製造所での 93.5ー100%、破傷風トキソイドでは 82.6ー100%を示し、製造所での測定値が感染研での測定値を若干上回る傾向がみられた。今後、各製造所との一層の協力の下、これらの測定法の技術交流や情報交換を進めていく事が必要と考えられる。
[福田　靖、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

2. 代表的な海外ワクチンとして Aventis Pasteur(Aventis)、Glaxo Smithcline Beecham(GSK)、Chiron の欧州3社の DTaP ワクチンを入手し、我が国の試験法による評価を行った。その結果、上記欧州製ワクチンは、いずれも力価は日本の基準に適合したが、特に破傷風、百日せきの力価について製造所間でかなりの違いがみられた。Hib ワクチン:キャリアー蛋白として破傷風トキソイドが用いられていることから、DTaP との破傷風免疫における干渉の有無を評価した。その結果、欧州製 Hib ワクチンは、マウス、モルモットの何れにおいても、破傷風免疫に対して明らかにブースター効果を示すことが確認され、使用時に過剰免疫に関連した副反応に注意が必要であることが示唆された。
[小宮貴子、福田　靖、岩城正昭、高橋元秀]

3. 不活化ポリオワクチン、ヘモフィルスインフルエンザ b 型菌ワクチンおよびその混合ワクチンの国内導入 E 実用化に向けた基準案作成のための国内外の情報を整備し、今後検討が必要な科学的事象を整理した。また、過去に入手した DTaP-Hib ワクチンについて、日本国内の力価試験を実施した結果、破傷風トキソイドの力価が国内の DTaP と比較して、約 10 倍高い力価であった。ワクチンは力価が高いことが品質を保証するものでなく、疾病が征圧できる最低量の抗原量、免疫誘導することが副反応等の軽減にも結びつく。国内の予防接種計画(接種経路、ワクチン品質)に適合した規格、品質のワクチン使用・接種が望まれる。
[高橋元秀、岩城正昭、福田　靖、小宮貴子]

XIV. BCG・ツベルクリン及び結核免疫に関する研究

1. 結核菌噴霧感染モルモットのサイトカイン産生と結核菌増殖に及ぼす 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の類似性から、ヒト結核症のモデル動物として適している。モルモットを微量の結核菌で噴霧感染後、11 日目、15 日目、20 日目、25 日目及び 35 日目に脾臓を採取し、抗原特異的に刺激したときの脾細胞の TNF-α 産生を測定した。非免疫モルモットを噴霧感染装置内で結核菌を気道感染させると、20 日目ころから脾細胞は大量の TNFーα を産生することが認められた。一方、BCG 免疫動物では、TNF-α 産生は感染前と同程度に抑制され、結核菌の増殖も抑制されることがわかった。
〔Toshiko Yamamoto, Christine McFarland, David McMurray (Texas A&M 大学)、山本三郎〕

2. α 抗原過剰発現 rBCG で免疫したモルモットの抗結核防

御効果の長期持続性

α抗原ファミリーを過剰発現するrBCGで免疫したモルモットの結核菌噴霧感染5週後の初期結核防御能は、BCGに比べ高く、3種類の抗原を同時発現させたrBCG(BA51)は、さらに強い効果があることが認められた。そこで抗結核防御免疫の長期持続性を調べるためrBCGまたはTokyo 172 BCG 103個を接種したモルモットに結核菌H37Rvを噴霧感染装置内で気道感染させ、その後1年以上にわたり各群間の生存日数を比較しrBCGの抗結核防御効果の長期持続性を調べている。なお、用いたrBCGのRD16 PCR産物はすべて401bpであった。[Toshiko Yamamoto, David N. McMurray (Texas A&M University), Lisa Brandt, Todd Lasco, Ian Orme (Colorado State University)、大原直也、山田毅(長崎大歯)、山本三郎]

3. BCGによる肉芽腫形成とMyD88の役割

MyD88はToll Like Receptor (TLR)の細胞内シグナル伝達のアダプター分子として機能し、サイトカイン産生に深く関わることが知られている。そこで、BCG感染におけるMyD88の役割を明らかにするため、MyD88 KOマウスまたは正常マウスにBCGを経静脈接種後、肺・肝臓・脾臓を採取し、肉芽腫数、臓器内菌数、組織内マクロファージ数およびサイトカイン・ケモカインの発現を調べた。臓器重量、肉芽腫数、肉芽腫の平均面積は、MyD88 KOマウスでは、正常マウスと比べ減少していた。またBM-8陽性細胞またはMac-1陽性細胞は、いずれも約2分の1から4分の1程度にまで減少していた。しかし、TNF-α、IL-1β、IFN-γ、MCP-1の発現ならびに臓器内菌数はMyD88 KOマウスと正常マウスで差は認められなかった。[高塚尚和1,2、伊保澄子1、松木孝澄1、山本三郎2、審良静男3(1福井大医、2感染研、3阪大微研)

4. BCGのRD16クローンの解析

日本株BCG Tokyo 172-1のRD16領域をPCRで増幅して379bpと401bpにバンドを示す2種類のクローン(BCG-I、BCG-II)をそれぞれ7H9培地またはソートン培地で継代培養し、PCRを指標にクローンが変異する可能性を検討した。その結果、いずれの培地でも、RD16のPCR産物は、BCG-Iは379bpに、BCG-IIは401bpにあって、変異は認められなかった。〔山本三郎、持田恵子、柴山恵吾;芳賀伸治、山崎利雄(細菌第一部)〕

5. BCG株のRD2及びRD16に関する研究

MPB64たんぱくは、結核菌や早期に分与された日本株BCGでは産生されるが、後期に分与されたパスツール株BCGではRD2遺伝子が欠損している。一方、RD16はブラジル株BCGでは欠損しているが、ほかのすべてのBCG亜株に存在し、日本株BCGでは379bpと401bpのPCR産物が、それ以外のBCG亜株では401bpに認められる。感染研に長期保存のBCG株7株(アルゼンチン、インドネシア、エクアドル、タイ、台湾、ブルガリア、ベトナム)についてRD16部位のPCR産物及びRD2のMPB64たんぱく発現を検討した。対照としてTokyo 172株とATCCパスツール株BCGを用いた。免疫クロマト法によるMPB64たんぱく検出は、Tokyo 172株、タイBCG、台湾BCG、ブルガリアBCGは陽性、他は陰性であった。RD16のPCR産物は、Tokyo 172株と台湾BCGが379bpと401bp、他は401bpのみであった。〔山本三郎、持田恵子、柴山恵吾〕

6. 細菌CpG DNAによるヒト形質細胞様樹状細胞(PDC)の活性化機序

細菌DNAは感染免疫の成立に重要な役割を担う菌体成分である。PDCにおけるIFN-aおよびMIP-1aの産生はCpG特異的であり、9-12時間以降の培養上清中に確認される比較的遅い反応である。これに対しRANTESはCpGだけでなくnon-CpG DNAによっても誘導され、早期に産生増強があり以後の変化は認められなかった。IFN-aおよびMIP-1aの産生はクロロキン、wortmannin、SB203580によって阻害され、エンドゾーム成熟化およびPI3K、p38 MAPKが関わるが、RANTES産生は必要としない可能性が示唆された。[伊保澄子1、高塚尚和1,2、山本三郎2(1福井大医、2感染研)]

7. 北西太平洋ミンククジラの抗酸菌症、ブルセラ症に関する研究

これまでに北西太平洋に棲息する鯨類、特にミンククジラにおけるブルセラ菌の感染を血清学ならびに病理学的検索により示唆したが、抗酸菌症については確認できなかった。調査

捕鯨により北西太平洋にて2000年に捕獲した6頭、2001年に捕獲した 16 頭の精巣病変部から PCR 法によりブルセラ菌 DNA の検出を試み、10 個体でブルセラ菌特異的 PCR 産物が観察された。5個体については遺伝子配列を決定し、解析の結果、北西太平洋ミンククジラ由来のブルセラ菌遺伝子配列は、既知のブルセラ菌とは異なるが、大西洋アザラシ由来株に最も類似していると考えられた。[大石和恵 1,2、山本三郎 1、後藤義孝 3、坂東武治 4 (1 感染研, 2 海洋研究開発機構, 3 宮崎大農, 4 鯨類研]

8. 非定型抗酸菌におけるプラスミド保有株の解析

結核菌及び牛型結核菌においては、現在までのところプラスミドの存在は報告されていないが、非定型抗酸菌においては、数種についてプラスミドの存在が報告されている。これまで、非定型抗酸菌のプラスミドについては、病原性や薬剤耐性にかかわる遺伝子が認められず十分な解析はされていなかったが、最近になり、病原性にかかわるプラスミドの存在も示唆されるようになり、プラスミドの存在も重要視されてきている。そこで、非定型抗酸菌のうち迅速発育菌種15種(211株)また遅速発育菌6種(227株)につき、プラスミド保有の有無をアルカリ少量法により、解析中である。(小澤良之)

9. 結核菌におけるアポトーシス関連物質の解析

H37Rv や M.bovins 等の強毒菌は、マクロファージのアポトーシスを抑制しマクロファージ内で共存しているのに対して、H37Ra や BCG の弱毒菌はアポトーシスを誘導し、この結果、生体はアポトーシスをきたしたマクロファージの排除とともに弱毒菌を排除している。このアポトーシスの抑制反応は生菌だけに認められ、死菌やタンパク合成が阻害された菌ではみとめられないことから、強毒結核菌は、共存するマクロファージのアポトーシスの抑制に関わる何らかの物質を分泌していると思われる。本研究では、結核菌の病原性因子としてのアポトーシス関連物質の同定を目的として研究を進めている。(小澤良之、石川暁志)

10. ガンマー線不活化結核ワクチン開発に関する研究

ガンマー線照射不活化 BCG の免疫持続効果を BCG 生菌および加熱処理BCGと比較した。モルモットに各種BCG免疫14ヶ月後に PPD に対する遅延型過敏症誘導能を調べた。ガンマー線照射不活化 BCG 免疫群の遅延型過敏症反応は加熱処理 BCG 免疫群より有意に高く、BCG 生菌群とは有意差が認められなかった。さらにこの 6 週間後、モルモット静脈内に BCG 生菌を投与し、1 週間後に脾臓、肝臓、肺を摘出した。現在、還元培養による残存生菌数からの生体防御能を検討中である。本実験により、ガンマー線照射不活化 BCG の免疫持続期間は BCG 生菌と同程度であることが確認された。[持田恵子、荒川宜親]

11. *Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導機序の解析

胃潰瘍、胃ガンの原因とされている *H. pylori* のアポトーシス誘導蛋白γ-glutamyltranspeptidase によるアポトーシス誘導メカニズムについて、生化学的な解析を行った。[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]

12. 乾燥 BCG 製剤及び精製ツベルクリン製剤の品質管理

平成 15 年度に実施した BCG ワクチン 5 ロット及び膀胱内用 BCG(日本株)4 ロット計 9 ロットの定量培養による力価試験成績は 41.2 ± 9.6 x 106 CFU/mg(昨年は 42.6 ± 10.1 x 106 CFU/mg であった。膀胱内用 BCG(コンノート株)4 ロットの力価試験成績は6.2 ± 2.3 x 106 CFU/mg であった。浮遊菌液 1 mg/ml の OD による菌量測定試験は 0.120 ± 0.030 (昨年は 0.134 ± 0.013)であった。精製ツベルクリンは一般診断用 20 ロット、確認診断用 1 ロット計 21 ロットについて力価試験を行った平均値は+0.10 ± 3.24 (昨年は+0.79 ± 1.05)であった。[山本三郎、持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、小澤良之、井口由美子]

XV. 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 DTaP ワクチンの安全性に関する研究

昨年に引き続き輸入した海外の市販 DTaP ワクチン及び DTaP-IPV ワクチンについて、マウスの足蹠およびウサギ背部

皮内での局所反応原性を検討した。海外ワクチンでは同時に比較した国産ワクチンにみられないマウス足蹠での強い腫脹およびウサギ皮膚での長期にわたる硬結が認められた。病理組織学的検討の結果、国産ワクチン接種局所では一過性の軽い炎症を認めるだけであったが、海外ワクチンは強い炎症を惹起し、その結果ウサギでは壊死巣が繊維化し、長期の硬結として観察されることが明らかとなった。[片岡紀代、山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、永田典代、倉田毅(感染病理部)]

(2)DTaP ワクチン追加接種時の局所反応原性に対する動物モデルの評価

当研究室で開発したDTaPワクチンあるいはDTトキソイド追加接種時の局所反応に対する初回DTaPワクチンの感作能評価動物実験モデルについて、細胞レベルでの感作機構解析を試みた。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、2週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時間後の動物の脾臓細胞を採取し、ジフテリアトキソイドによる細胞増殖を測定したが、百日咳毒素量による明確な相違はみられなかった。さらに詳細な検討が必要である。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(3)DPT ワクチン中のエンドトキシン量評価

平成 16 年の生物学的製剤基準改正に伴い、DPT ワクチンにエンドトキシン試験が適用された。そこで、本年度国家検定に提出された全 DPT ワクチンのエンドトキシン含量を測定した。ワクチン中のエンドトキシン量は、すべて0.034 EU/mL 以下であり、新基準(4.0 EU/mL 以下)に適合す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. その他のワクチンに関する研究

(1)インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少試験に関する研究

マウス白血球数減少試験の試験精度向上のための検討を行った。採血法を改良することで、試験精度および再現性が向上した。また施設間での試験結果の再現性も改善した。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(2)マウス白血球数減少試験用参照インフルエンザワクチンの標準化

マウス白血球数減少試験用参照インフルエンザワクチン Lot 3 候補品が調製され、細菌製剤協会(4製造所)および当研究室 計5施設共同で活性単位の標定を行った。同参照インフルエンザワクチン Lot 2 に対して活性を比較したところ、参照インフルエンザワクチン Lot 3 は、12 単位/vial と評価された。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、細菌製剤協会]

(3)インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少活性の機構に関する研究

マウス白血球数減少試験の臨床的意義を検討する目的で、免疫部と一緒に白血球減少の機構について検討した。不活化ウィルス粒子を用いたワクチンでは、マウス腹腔投与により5時間および16時間後に2峰性の末梢白血球減少がみられることが、黒川らにより報告されている。今回この現象を確認するとともに、関連すると思われる生体内での変化を観察した。今後白血球減少活性に違いのあるHAワクチン原液等の比較により、関連性反応の特定を進める計画である。[藤猪英樹、高橋宜聖、山本紀一(協力研究員)、横田恭子、阪口雅弘、大西和夫、高須賀直美、橋本修一、磯貝まや(協力研究員)(免疫部)、落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、竹森利忠(免疫部)]

(4)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評価

ヨーロッパのワクチン製造所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測定した。LAL試験によりワクチン中の LAL 活性は、ロットにより約 1ー200 EU/dose と幅広いばらつきを示し、ロット間均一性が確認できなかった。強いLAL活性を示したロットは、*in vitro* エンドトキシン試験法およびウサギ発熱試験においても強いエンドトキシン活性を示した。従って、本ワクチンの安全性を確保するためには、エンドトキシン量の管理が必要であると考えられた。[落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

(5)インフルエンザ b 型菌(Hib)ワクチン中のエンドトキシンに関する研究

Aventis Pasteur 製の破傷風トキソイドをキャリアーとした Hib ワクチンを輸入し、混入エンドトキシンを評価した。リムルス試験の結果、ワクチン中に 300 EU/ml を超えるエンドトキシン汚染が認められたので、その生物活性をヒト由来 28SC 細胞に対する IL-6 産生誘導により評価した。その結果、リムルス試験同様、ヒト由来細胞でも強い IL-6 産生誘導が認められた。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

3. エンドトキシンに関する研究

(1)内毒素の *in vitro* 生物活性測定法の定量的評価

製剤のエンドトキシン汚染に関する安全性管理には、製剤によるエンドトキシン活性増強を考慮に入れる必要がある。セフェム系抗生物質 6 種について、マウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞における高感度 TNF-α 産生誘導を用いて評価した。臨床濃度に希釈した抗生物質とエンドトキシンの段階希釈を同時に RAW264.7 細胞培養に加え、20時間後に ELISA により培養上清の TNF-α を定量した。その結果、これらの抗生物質はエンドトキシンによる RAW264.7 細胞での TNF-α 産生に対して増強は示さなかった。さらに人末梢血とエンドトキシン反応性が相似の人モノサイト由来 28SC 細胞を用いて、同様の確認を行った。その結果、28SC 細胞でもβラクタム系、セフェム系抗生物質によるエンドトキシン生物活性の増強は認められなかった。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(2)ウサギ発熱試験の高感度 *in vitro* 代替試験法の開発

ウサギ末梢血のエンドトキシン刺激により産生される、発熱最終メディエーターであるプロスタグランジンE_2量測定を用いた *in vitro*試験法を開発した。本*in vitro*試験法により、高感度にエンドトキシン活性の定量が可能であった。また、種々の由来の異なるエンドトキシンに対する反応性で比較したところ、本試験法はウサギ発熱活性と相同のエンドトキシン反応性を持つことが確認されたことから、多数のウサギを必要する発熱試験に替わり、エンドトキシンの発熱活性を定量的に測定可能な高感度代替試験法としての可能性が示された。[落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、山本明彦、蒲地一成、堀内善信]

(3)ファージディスプレイ法による LPS 結合ペプチド作成の試み

安全性の高い低分子 LPS 親和性ペプチドは、臨床や医薬品製造において有用性が高い。ランダム配列の7アミノ酸からなるペプチドを発現する *E. coli*ファージライブラリーより、Lipid A 親和性ペプチド発現ファージを単離し、その DNA 配列よりペプチドを作成した。3種類の直鎖状ペプチドのうち 1 種類に、エンドトキシンの LAL 活性および 28SC 細胞での IL-6 誘導活性に対する明らかな中和能が認められた。しかしポリミキシン B の中和能に比べて明らかに弱く、今後さらに環状ペプチドを含め、より強い親和性ペプチドの検索を行う予定である。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、蒲地一成、鈴木政嗣(協力研究)、松本めぐみ(協力研究)、丹羽允(協力研究)、堀内善信]

(4)日本薬局方(日局)エンドトキシン 100 標準品の力価評定

日本公定書協会で日局エンドトキシン 100 標準品(Lot 6, 7)候補品が調製され、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施設で力価共同評定を実施した。WHO エンドトキシン国際標準品、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 6 候補品が 150 EU/vial、Lot 7 候補品が 160 EU/vial と評価された。[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(日本公定書協会)]

4. 百日咳菌に関する研究

(1)百日咳菌に認められた広宿主域プラスミドの解析

百日咳死亡患児から分離された百日咳菌にプラスミド(pBP136)の存在が確認され、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遺伝子解析を行なった。その結果、pBP136 は 41,268-bp からなる広宿主域 IncP-1βプラスミドであることが判明した。プラスミドには 46 個の ORF が確認されたが、薬剤耐性遺伝子や既知の病原性遺伝子は認められなかった。このことから、プラスミド pBP136 の存在が患児死亡の直接的原因となった可能性は低く、患児は通常の百日咳感染により死亡したものと考察された。

[蒲地一成、曽田匡洋(環境科学技術研究所)、玉井友治(大

分県立病院)、永田典代、近田俊文、井上敏郎(大分県立病院)、荒川宜親]

(2)日本における百日咳菌の抗原変異と病原性の解析
1988年から2001年に我が国で分離された百日咳臨床分離株について、ワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株の出現状況を調査した。解析菌株 107 株はパルスフィールドゲル電気泳動により 3 タイプ(Type-A, -B, -C)に大別され、1994-1995年からType-B株の分離率が上昇していることが判明した。分離菌株の百日咳毒素 S1 遺伝子(*ptxS1*)とパータクチン遺伝子(*prn*)を解析したところ、Type-B 株は主にワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株であることが示され、我が国でも欧米諸国と同様に抗原変異株が出現していることが明らかとなった。日本では1991年以降、百日咳報告患者数は減少傾向にあることから、Type-B 株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性は低く、ワクチンの有効性とは無関係な出現であると考察された。[児玉温子、蒲地一成、堀内善信、近田俊文、荒川宜親]

(3)福岡県内で分離された百日咳流行株の抗原遺伝子解析
昨年に引き続き、1991 年に福岡県で発生した百日咳 outbreak を解析した。家族内感染事例を除いた 25 株の百日咳臨床分離株についてその抗原遺伝子(*ptxS1*、*prn*)を解析したところ、22 株(88%)がワクチン株と同じ *ptxS1B/prn1* 遺伝子を持つことが判明した。なお、2 株はワクチン株と異なる *ptxS1A/prn2*、1株は *ptxS1B* と新規の *prn* を有していた。欧米諸国では抗原変異株が百日咳 outbreak の原因菌と考えられているが、本事例解析によりワクチン株と同じ抗原遺伝子を持つ百日咳菌も outbreak の原因菌となることが明らかとなった。[蒲地一成、堀川和美(福岡県保環研)、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、岡田賢司(南福岡病院)]

◆研究課題一覧

1. 厚生労働科学研究費補助金 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
厚生労働省の「院内感染対策サーベーランス事業」に専門的な視点から、支援協力を行った。
(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(群馬大学医学部))
分担研究課題:カルバペネム耐性菌広域 β-ラクタム薬耐性菌及びアミノグリコシド耐性菌のレファレンスと研究(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(国立国際医療センター))
分担研究課題:院内感染起因菌の薬剤耐性
(分担:荒川宜親、研究協力者:柴田尚宏、鈴木里和、山根一和)

d. ツベルクリン検査・BCG 等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及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-線照射処理抗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)

e. 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)

f. 百日咳菌、ジフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と分子疫学的解析に関する研究班(主任:佐々木次雄)
分担研究課題:マイコプラズマ肺炎の分子疫学的研究(分担者:見理剛)
分担研究課題:*Haemophilus influenzae* 臨床分離株の型別分布及び薬剤感受性分布に関する研究(分担研究者:荒川宜親、協力研究者:新谷三春)
分担研究課題:百日咳菌の解析(分担:堀内善信)

2. 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業

a. 集中治療部門(ICU,NICU)等、易感染症患者治療を担う部門における院内感染防止対策に関する研究
(主任:武澤　純(名古屋大学医学部))
分担研究課題:ICU・NICU における感染症の起因菌として問題となる多剤耐性菌に関する検討
(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. 院内感染の防止のための監視体制の整備、細菌検査室の機能向上に関する研究(主任:山口恵三　東邦大学)
分担研究課題:中小規模病院に対する院内感染対策支援に関する研究(分担:荒川宜親、研究協力者:鈴木里和、山根一和)

d. 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)

e. 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バ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)

f. 人工ポリクローナル 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)

g. 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. 厚生労働科学研究費補助金　難治性疾患克服研究事業

a. 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、国立感染症研究所、感染病理部)
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プラズマの探索
(分担研究者:荒川宜親、協力研究者:佐々木裕子)

4. 厚生労働科学研究費補助金　医薬品等医療技術リスク評価研究事業

a. 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究(主任:高橋元秀)
総括研究課題: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)

b . 無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究(主任:棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所))
分担研究課題:無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針案作成(分担者:佐々木次雄)
分担研究課題:防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究(共同研究者:佐々木次雄)

c. 混合ワクチンの品質確保に関する研究
(主任:宮村達男)
分担研究課題:百日せきワクチンおよび混合ワクチンの検討
(分担:堀内善信)
分担研究課題:*Heamophilus influenzae type b(Hib)*コンジュゲートワクチンの品質管理に関する研究(分担:新谷三春)

5. 厚生労働科学研究費補助金　厚生科学特別研究事業

a. 国、自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究(主任:小林寛伊(NTT 東日本関東病院))
分担研究課題:全国規模の院内感染対策サーベイランスの普及と活用に関する研究(分担:荒川宜親、研究協力者:鈴木里和、山根一和、藤本修平(群馬大学医学部))

6. 厚生労働科学研究費補助金　医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

a. 国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究(主任:竹森利忠)
協力研究課題:風疹 IgG 抗体標準品に対する相対抗体価測定法の応用(分担:海野幸子、研究協力:堀内善信)

7. ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント事業

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)

8. 厚生労働省国際医療協力研究委託事業

a. ポリオ根絶後の拡大予防接種計画及び麻疹の制御に関する研究(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)

9. 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

a. ボツリヌスAーF 型神経毒素を用いたジストニア等の難治性神経筋疾患の治療薬の開発(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:ボツリヌス毒素・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)

b. 結核防御粘膜免疫誘導性ワクチンに関する研究(主任研究者:山本三郎)

10. 文部科学研究費補助金

a. 遺伝子解析技術を用いたディフィシル菌院内感染発生時における流行株の解明(主任:加藤はる)

b. 腸内細菌群におけるプラスミド性クラスＣβ−ラクタマーゼの解析と簡易検出法の検討(主任:土井洋平)

c. ヘリコバクターピロリのアポトーシス誘導因子の精製(主任:柴山恵吾)

d. *Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質抗原変化機構の解析(主任研究者　堀野敦子)

その他、業務に関連する事項

第1室

Ⅰ. 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
抗生物質医薬品:経口剤(ホスホマイシンカルシウム)13 ロット

抗生物質医薬品:経口剤(硫酸ポリミキシンB)
4 ロット
抗生物質医薬品:注射剤(セフメタゾールナトリウム)
10 ロット
抗生物質医薬品:注射剤(リン酸クリンダマイシン)
6 ロット
(2)特別審査
抗生物質医薬品:フィニバックス(ドリペネム水和物
1 件
(3)依頼試験
抗生物質医薬品:注射用シナシッドの力価試験(比濁法)
1 件
(4)細菌行政検査
埼玉県から院内感染調査のために多剤耐性緑膿菌(4検体)を受け付けて遺伝子解析を実施した。[柴田尚宏、山根一

和、荒川宜親

2. 標準品、参照品等の作製状況(交付、分与の実績)

(1)交付

日本薬局方抗生物質標準品　　83 品目 計 530 本

日本薬局方外医薬品規格第四部常用標準品

2 品目 計 2 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:近田俊文]

(2)日本薬局方調査会・標準品委員会へ委員として参加協力[委員:近田俊文]

第2室

1. 無菌試験

(1)生物学的製剤(159 頁参照)

(2)抗生物質製剤(159 頁参照)

(3)マイコプラズマ否定試験(159 頁参照)

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(DTaP 最終段階)	27ロット
沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド	6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
DTaP に使用するジフテリアトキソイド原液	8ロット
DTaP に使用する破傷風トキソイド原液	6ロット
乾燥まむしウマ抗毒素	1ロット
ガスえそウマ抗毒素	1ロット
抗破傷風人免疫グロブリン	9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	41本
参照沈降ジフテリアトキソイド(混合ワクチン用)	98本
標準ジフテリア抗毒素	9本
参照ジフテリア抗毒素(フロキュラシオン用)	21本
ジフテリア試験毒素(ウサギ試験用)	3本
シック試験毒素(動物用)	5本
ジフテリア試験毒素(培養細胞法用)	22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	51本
参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用)	44本
標準破傷風抗毒素	14本
標準抗破傷風人免疫グロブリン	5本
参照破傷風抗毒素(フロキュラシオン用)	12本
破傷風試験毒素	27本
標準はぶ抗毒素	5本
はぶ試験毒素(出血Ⅱ)	5本
標準まむし抗毒素	3本
まむし試験毒素(致死)	4本
標準ボツリヌス A 型抗毒素	1本
標準ガスえそ抗毒素 *Cl.perfringens* Type A	3 本
標準ガスえそ抗毒素 *Cl.septicum*	3 本
標準ガスえそ抗毒素 *Cl.oedematiens*	3 本

(2)分与

標準ジフテリア抗毒素を以下の研究所に1本ずつ分与した。

茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、中国 蘭州生物製品研究所　　合計 8 本

ジフテリア試験毒素(培養細胞法用)を以下の研究所に2本ずつ分与した。

茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研

究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、甲子園大学　　合計 16 本

VERO 細胞を以下の研究所に1本ずつ分与した。

茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、甲子園大学

合計 8 本

3.標準菌株等(交付、分与の実績)

(1) 分与

Corynebacterium diphtheriae(PW8 株): 大阪府立大大学院　1 本

Corynebacterium ulcerans(ジフテリア毒素産生性): 大阪府立大大学院　1 本

4. 行政検査の受入れ状況

(1)ジフテリア関係[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

平成 15 年 5 月 9 日と平成 16 年 1 月 9 日、 国保旭中央病院より、平成 14 年に千葉県旭市で発生したジフテリア毒素産生ウルセランス菌による患者の血中ジフテリア抗毒素価変動を経時観察するために、平成 15 年 4 月 14 日採血血清と平成 15 年 12 月 24 日採血血清のジフテリア抗毒素価測定依頼を受けた。今までの結果をまとめると、平成 14 年 11 月 11 日 0.334IU/ml、平成 14 年 12 月 2 日 1.89IU/ml、平成 15 年 4 月 14 日 2.76IU/ml、平成 15 年 12 月 24 日 1.18 IU/ml であった。

(2)破傷風関係[福田　靖、岩城正昭、高橋元秀]

平成 15 年 4 月 17 日付けで、旭中央病院内科より、破傷風の疑いのある患者からの組織と血清に対して「患者由来組織からの破傷風菌の検出、患者血清からの破傷風毒素の検出・定量、患者血清からの破傷風抗体の検出・定量」の依頼を受けた。検査の結果、依頼された患者由来組織から破傷風毒素を産生する菌は検出されなかった。また、患者血清から、破傷風毒素は検出されなかったが、破傷風抗体(0.08 単位／mL)が検出された。

平成15年10月27日付けで、広島県(県保健環境センター)より、患者分離菌に対して「破傷風に関する菌検査」の依頼を受けた(行検第 37064)。検査の結果、依頼された分離菌は、菌の形態が多くの破傷風菌とは異なっていた。そして、破傷風毒素遺伝子を保持していなかった。

5. 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ー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

乾燥 BCG 製剤	29 ロット
内訳	
乾燥 BCG ワクチン(最終製品)	5 ロット
80mg	1 ロット
40mg	1 ロット
12mg	3 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用日本株(最終製品)	4 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用コンノート株	4 ロット
乾燥 BCG ワクチン (中間段階)	10 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用日本株(中間段階)	6 ロット
精製ツベルクリン	21 ロット
内訳	
一般診断用(5μg)	1 ロット
一般診断用(1μg)	2 ロット
一般診断用(一人用)	17 ロット
確認診断用(一人用)	1 ロット
ウイルスワクチン(結核菌否定試験)	3 ロット
内訳	
乾燥弱毒生風しんワクチン	2 ロット
乾燥弱毒生麻しんワクチン	1 ロット

書類審査

ユニセフ向け乾燥 BCG ワクチン(皮内用 0.5 mg)

53 ロット

2. 標準品等

交付

標準精製ツベルクリン	60 本
BCG Tokyo-172 株	8 本

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(小分け製品)	27 件
(2)血液製剤	
エンドトキシン試験	540 件
(3)生物製剤	
エンドトキシン試験	7 件
(4)インフルエンザ HA ワクチン	
マウス白血球数減少試験	60 件
(5)コレラワクチン	
マウス体重減少試験	1 件
(6)抗生物質	
エンドトキシン試験	18 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	74 本
イ 百日せきワクチン毒性参照品	112 本

Ⅱ. 国際協力

第1室

1. 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所薬品試験部の要請により、JICA 研修生(Bureau of Food and Drugs, Philippines)へ日本薬局方抗生物質標準品の品質管理業務についての解説と実地見学の研修を行った。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、山根一和]

第3室

1. JICA 等研修生、実習生等受け入れ

(1)平成 14 年 9 月 1 日より平成 15 年 8 月 8 日まで 1 ヵ年、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、抗毒素製剤の品質管理の研究を実施した。

(2)平成 15 年度ジフテリア流行予測事業ジフテリア抗毒素価測定法(培養細胞法)の講習会を開催した。(平成 15 年 8 月 4 日 村山庁舎 参加者 茨城県衛生研究所 高木英、福井県衛生環境研究センター 宇都宮央子、宮崎県衛生環境研究所 東美香、山形県衛生研究所 安孫子千恵子 以上 4 名)

2. その他

平成 15 年 7 月 9 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7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]

平成 16 年 2 月 5 日、国立保健医療科学院の主催する 15 年度特別過程コース ボツリヌス毒素の検出で実験動物の試験法の実習を行った。[高橋元秀]

第5室

WHO 国際共同研究「精製百日せきワクチン力価試験法に関する第 II 期 WHO 国際共同研究」および総括会議(5月:Ferney-Voltaire)参加。

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Keiko Yokoyama, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Keigo Shibayama, Tetsuya Yagi, Haru Kato and Yoshichika Arakawa: Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* Lancet, Vol.362, 1888-1893 December 2003,

2) Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Yohei Doi, Keigo

Shibayama, Kazunari Kamachi, Tetsuya Yagi, and Yoshichika Arakawa: A New TEM-Derived Extended-Spectrum β-Lactamase (TEM-91) with an R164C Substitution at the -Loop Confers Ceftazidime Resistance
Antimicrob. Agents Chemother. 2003 47: 2981-2983

3) Yohei Doi, Keiko Yokoyama, Kunikazu Yamane, Jun-ichi Wachino, Naohiro Shibata, Tetsuya Yagi, Keigo Shibayama, Haru Kato, and Yoshichika Arakawa: Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides
Antimicrob. Agents Chemother. 48(2): 491-496 2004

4) Kunikazu Yamane, Jun Asato, Naofumi Kawade, Hajime Takahashi, Bon Kimura, and Yoshichika Arakawa: Two Cases of Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Photobacterium damsela* in Japan.
J. Clin. Microbiol. 42(3): 1370-1372 2004

5) M. Komatsu, H. Kato, M. Aihara, K. Shimakawa, M. Iwasaki, Y. Nagasaka, S. Fukuda, S. Matsuo, Y. Arakawa, M. Watanabe, Y. Iwatani: High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. Europian Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 22:525-529, 2003

6) E. Ozaki, H. Kato, H. Kita, T. Karasawa, T. Maegawa, Y. Koino, K. Matsumoto, T. Takada, K. Nomoto, R. Tanaka,S. Nakamura: *Clostridium difficile* colonization in healthy adults:transient colonization and crrelation with enterococcal colonization. Journal of Medical Microbiology. 53:167-172, 2004

7) Naohiro Shibata, Y. Doi, K. Yamane, T. Yagi, H. Kurokawa, K. Shibayama, H. Kato, K. Kai, Y. Arakawa: PCR Typing of Genomic Determinants for Metallo-b-Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron.
Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 2003

8) Noriyuki Nagano, N. Shibata, Y. Nagano, Y. Arakawa: Nosocomial Outbreak of Infections by Proteus mirabilis That produces Extended-Spectrum CTX-M-2 Type β -Lactamase.
Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 2003

9) Masafumi Goto, Hisami Yasuzawa, Toshihiro Higashi, Yoshihiro Yamaguchi,Akiko Kawanami, Shiho Mifune, Hiromasa Mori, Hitoshi Nakayama, Kumiko Harada and Yoshichika Arakawa: Dependence of Hydrolysis of β-Lactams with a Zinc(II)-β-Lactamase Produced from *Serratia marcescens*(IMP-1) on pH and Concentration of Zinc(II) Ion: Dissociation of Zn(II) from IMP-1 in Acidic Medium
Biological & Pharmaceutical Bulletin Vol.26(5) 589-594

10) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K., Yamamoto, S., and Goto, N.: Effects of Recombinant Cholera Toxin B Subunit (rCTB) on Cellular Immune Responses: Enhancement of Delayed-Type Hypersensitivity Following Intranasal Co-Administration of Mycobacterium bovis-BCG with rCTB. Microbiol Immunol 48(6): 457-463, 2004.

11) 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.

12) Flannagan SE,ChowJW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, Ozawa Y, Clewell DB.: " Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. " Antimicrob. Agents Chemother. 2003.Dec;47(12):p3954-p3959.

13) Yamamoto, A., Ochiai, M., Kamachi, K., Kataoka, M., Toyoizumi, H. and Horiuchi, Y. : A cell line assay system for predicting the response of human blood to endotoxin, Jpn. J. Infect. Dis. 56, 93-100, 2003.

14) Ochiai, M., Kataoka, M., Toyoizumi, H., Kamachi, K., Yamamoto, A. and Horiuchi, Y. Evaluation of endotoxin content of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines that interfere with the bacterial endotoxin test. Vaccine, 21, 1862-1866, 2003

15) Ochiai, M., Kataoka, M., Toyoizumi, H., Kamachi, K., Yamamoto, A. and Horiuchi, Y. A quantitative in vitro assay method for detecting biological activity of endotoxin using prostaglandin E_2 induction in rabbit peripheral blood.

Microbiol. Immunol., 47, 585-590, 2003

16）Kamachi K, T Konda, Y Arakawa: DNA vaccine encoding pertussis toxin S1 subunit induces protection against *Bordetella pertussis* in mice. Vaccine 21: 4609-4615, 2003.

17）Iwaki M, Komiya T, Fukuda T, Arakawa Y, Takahashi M. Collaborative study: Standardization of Japanese reference diphtheria and tetanus toxoids, (adsorbed, lot 2), for potency determination of diphtheria-tetanus- acellular pertussis combined vaccine. Jpn J Infect Dis. 56(4) 183-185, 2003 Aug.

18）Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β-lactamase in cattle, Japan.
Emerg. Infect. Dis.,10(1) 69-75, 2004 Jan.

19）Yamamoto A, Sakai T, Ochiai M, Kamachi K, Kataoka M, Toyoizumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y.
Augmenting effect of antibiotics on endotoxin activity may cause a safety problem.Microbiol. Immunol. 48(2) 97-102, 2004.

2. 和文発表

1）荒川宜親：院内感染症対策サーベイランスの意義と現状 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 増刊号2 2003

2）荒川宜親：厚生労働省「院内感染対策サーベイランス事業」 特集 院内感染
最新医療情報誌アニムス Winter 2003 No.29, 2003

3）荒川宜親：バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA)出現のインパクト 病院感染に一言 Front Essay
INFECTION CONTROL Vol.12 2003

4）荒川宜親：肺炎桿菌（*Kiebsiella pneumoniae*）
病原菌の今日的意味 改訂3版
医薬ジャーナル社 2003

5）荒川宜親他：EBM に基づく院内感染予防対策 Q&A
（編集：国立病院大阪医療センター感染対策委員会）
南光堂 2003

6）柴山恵吾・荒川宜親：*Helicobacter pylori* 感染と細胞内シグナル伝達。日本細菌学会雑誌 59(2)415-424 2004

7）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

8）加藤はる、加藤直樹：Toxin A陰性toxin B陽性 *Clostridium difficile*。検査と技術 31(7):666-669,2003

9）小宮山謙一、田村英行、多田圭子、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出去れた CTX-M-1 型 β-ラクタマーゼ産生菌の一症例. 新潟県臨床衛生検査技師会誌, 43, 4, 2003

10）荒川宜親：薬剤耐性菌の出現を支える細菌の遺伝的超能力. フォーラム「薬剤耐性菌に関する研究の現状」
日本細菌学会関東支部ニュース第 42 号 19-22 2003

11） 佐々木裕子：マイコプラズマのゲノム解析、臨床と微生物：マイコプラズマ感染症の基礎と臨床、30（1）：9-13、2003

12）佐々木次雄：マイコプラズマ肺炎の細菌学的診断法、日本臨床微生物学雑誌、13: 101-106、2003.

13）佐々木次雄、棚元憲一：製薬用水の製造及び品質管理に関する調査研究、医薬品研究、34: 703-716, 2003.

14） 佐々木次雄：細菌感染症、日本輸血学会認定医精度審議会カリキュラム委員会編、改訂版日本輸血学会認定医制度指定カリキュラム、p.301-302、2003 年.

15） 佐々木次雄：日本の医療安全性規制の現状と医療関係マネージメントシステムの動向について、ISO/TC198（ヘルスケア製品の滅菌）、JIS ハンドブック（医療安全）、日本規格協会 577-582, 2004.

16）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

17）高氏留美子、伊保澄子、山本三郎：CpG DNA による plasmacytoid 樹状細胞の活性化. 臨床免疫 41(1):107 - 112, 2004.

18）落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、山本明彦、豊泉裕美、堀内善信、「局方エンドトキシン標準品力価共同検定における測定値の変動因に関する研究」研究報告、医薬品研究、34(4)、230-233、2003

II. 学会発表

1. 国際学会

1）Maja Rupnik, Geric Barbara, Stuart Johnson, Hanna Pituch, Haru Kato: Comparison of variant *Clostridium difficile* strains found in different hospitals. 13th Europian Congress of

Clinical Microbiology and Infectious Diseases April, 2003

2) Naohiro Shibata, Y. Doi, K. Yamane, J. Wachino, K. Yokoyama, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa: Genotyping of Metallo-β-Lactamases Produced by *Chryseobacterium* and *Myeroides Species* in Japan. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

3) Y. Doi, H. Kurokawa, K. Yamane, K. Shibayama, Naohiro Shibata, K. Yokoyama, T. Yagi, Y. Arakawa: Molecular and Biochemical Characterization of Inhibitor-Sensitive and Extended-Spectrum AmpC β-lactamase from an *Echerichia coli* Clinical Isolate. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

4) T. Yagi, Y. Doi, Naohiro Shibata, H. Kato, K. Shibayama, K. Yamane, K. Yokoyama, T. Kawabata, H. Baba, M.Nagasawa, Y. Iinuma, Y. Arakawa: Survey of Antimicrobial Resistance Among Glucose-Nonfermenters Including acinetobacter spp., *Burkhorderia cepacia*, and *Peudomonas aeruginosa*. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

5) K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, Naohiro Shibata, K. Shibayama, H. Haru, Y. Arakawa: Genetic Environment of 16S genetic Environment of 16S Ribosomal RNA Methylase (magrA) gene of *Pseudomonas aeruginosa* Conferring resistance to Aminoglycosides. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

6) K. Shibayama, K. Kamachi, N. Nagata, T. Yagi, Y. Doi, Naohiro Shibata, K. Yamane, H. Kato, Y. Iinuma, Y. Arakawa: A Novel Apoptosis-Inducing Protein from *Helicobacter Pylori*. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

7) K. Shibayama, K. Kamachi, T.Yagi, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, Y. Arakawa: A Novel Apoptosis-Inducing Protein from *Helicobacter pylori*. XVIth International Workshop, European Helicobacter Study Group, 2003,September 3-6, Stockholm, Sweden

8) Sasaki T. and Tanamoto K., Rapid identification of micro-organisms based on molecular biological method. Microbiological Control Methods in the European Pharmacopoeia: Present and Future. Copenhagen, Denmark, 5-6 May 2003.

9) Yamamoto, S., Haga, S., Yamazaki, T., Yamazaki T., Yamamoto, T., Taneichi, M., Kamachi, K., Toida, I., Hashimoto, T., Yamada, T., Ohara, N. and Honda, M.: Protective ability of anti-HIV recombinant BCG on guinea pig pulmonary tuberculosis, and safety and stability. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, N.J. July, 2003.

10) Takauji, R., Iho, S., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Kitagawa, H., Iwasaki, H., Iida, R., Yokochi, T. and Matsuki, T.: CpG-DNA Induced IFN-α Production Involves p38 MAPK-Dependent STAT1 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, N.J. July, 2003.

11) Tokunaga, T., Yamamoto, S. and Yamamoto, T.: Historical Review of CpG DNA. Nobel Forum 2003, Karolinska, Sweden, August, 2003.

12) 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、2003, Tokyo.

13) Masaaki Iwaki, Tomomi Saegusa, Yumeno Inomata, Takako Komiya and Motohide Takahashi. Proline-rich repeat structure found in novel antigen of *Corynebacterium diphtheriae*, based on pentanucleotide repeat structure in its gene. 11th European Meeting on Bacterial Protein Toxins, June 2003, Prague (Czech Republic).

2. 国内学会

1)加藤はる、加藤直樹、荒川宜親、小松方、相原雅典、佐藤洋子。Toxin A陽性およびtoxin A陰性 *Clostridium difficile* の

分離と院内感染。第 77 回日本感染症学会総会 2003 年4月

2)加藤はる *Clostridium difficile* 関連下痢症 - 分子疫学と細菌検査。第 16 回臨床微生物迅速診断研究会教育講演 2003 年6月

3)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

4)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

5)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

6)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

7)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

8)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

9)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

10)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

11)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

12)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

13)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

14)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

15)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

16)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

17)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

18)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

19)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

20)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

21)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

22）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

23）柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、荒川宜親：*Pseudomonas putida* におけるクラス3型インテグロンに担われるメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

24）土井洋平、黒川博史、山根一和、柴山恵吾、柴田尚宏、横山佳子、加藤はる、八木哲也、荒川宜親：大腸菌臨床分離株より同定された阻害剤感受性・基質拡張型 AmpC β-ラクタマーゼの解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

25）和知野純一、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、伊藤秀郎、荒川宜親：IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を担うクラス3型インテグロン構造の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

26）柴山恵吾、蒲池一成、八木哲也、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76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

27）八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、横山佳子、荒川宜親：緑膿菌の産生する抗抗酸菌物質の精製と解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

28）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が保持するmagrA遺伝子の周辺構造の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年

29）柴田尚宏、土井洋平、山根一和、和知野純一、八木哲也、荒川宜親：CTX-M-タイプβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌におけるインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年

30）荒川宜親、飯沼由嗣、長沢光章、加藤はる、八木哲也、柴田尚宏、土井洋平、山根一和：我が国における多剤耐性のグラム陰性桿菌の分離状況と特徴について。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、
2003年

31）戸島洋一、服部万里子、和知野純一、柴田尚宏、荒川宜親：国内で初めて検出された DHA-1 型クラス Cβ-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella oxytoca* の臨床的検討。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、
2003年

32）中野学、井端英憲、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離したメタロβ-ラクタマーゼ産生株7症例の臨床的検討。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年

33）飯田眞佐栄、柴田尚宏、荒川宜親：当研究所におけるメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出状況。第52回日本医学検査学会総会、埼玉、5月16日、2003年

34）山森章、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出されたCTX-M-2とIMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生菌について。第52回日本医学検査学会総会、埼玉、5月16日、2003年

35）斉藤優子、長野則之、長野由起子、岡本了一、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabilis* による院内感染事例。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年

36）長野則之、長野由起子、岡本了一、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-2 型β-ラクタマーゼ産生および AmpCβ-ラクタマーゼ同時産生性 *Acinetobacter baumannii* の解析。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年

37）吉田耕一郎、二木芳人、宮下修行、小橋吉博、河口豊、荒川宜親、柴田尚宏、松島敏春：当院で分離されたメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の臨床的検討。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年

38）柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、黒川博史、柴山恵吾、加藤はる、甲斐久美子、荒川宜親：我が国におけるメタロ-β-ラクタマーゼとインテグロンの遺伝子型別。第32回薬剤耐性菌シンポシウム、東京、8月25日、2003年

39）横山桂子、土井洋平、山根一和、黒川博史、柴田尚宏、柴山恵吾、八木哲也、荒川宜親
16S rRNA メチラーゼ遺伝子の獲得によりアミノ配糖体に高度かつ多剤耐性を獲得した緑脳菌の出現と拡散。第32回薬剤耐性菌シンポシウム、東京、8月25日、
2003年

40）本間操、大貫雅子、江原和人、森川征彦、柴田尚宏、荒川宜親：β-ラクタマーゼを産生するグラム陰性桿菌検出法に

ついての検討。第23回小児臨床学会、大阪、9月23日、2003年

41）柏倉千賀志、和田綾子、武田祐子、古川好美、齋藤公男、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離された ESBL 産生 *Serratia marcescens*。第44回東北医学検査学会、弘前、10月17日、2003年

42）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、横山桂子、加藤はる、荒川宜親：臨床分離株から新たに検出された IMP-2型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検討。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年

43）小寺聡、柴田尚宏、荒川宜親：*Erysipelothrix rhusiopathiae* による感染性心内膜炎の一例。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年

44）山根一和、横山桂子、土井洋平、柴田尚宏、八木哲也、荒川宜親：グラム陰性桿菌に高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA methylase の保有状況について。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年

45）柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、荒川宜親：グラム陰性桿菌における CTX-M-型β-ラクタマーゼの型別とインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査。第1回薬剤耐性菌研究会、群馬、11月14日、2003年

46）柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、荒川宜親：CTX-M-型β-ラクタマーゼ遺伝子とIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を同時に保有するグラム陰性桿菌の検出。第1回薬剤耐性菌研究会、群馬、11月14日、2003年

47）宮本則央、辻恵美、河辺逸朗、河辺洋一郎、吉田昌弘、柴田尚宏、荒川宜親：当院における ESBLs 産生菌の検出状況とその臨床的背景。第52回日本農村医学学会学術総会、広島、10月9日、2003年

48）朝妻義徳、柳田良子、星周一郎、松永克美、八木恵子、柴田尚宏、荒川宜親：*Streptococcus suis* type2（ブタ連鎖球菌）による細菌性髄膜炎の2症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

49）小宮山謙一、田村英行、多田圭子、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出された CTX-M-1 typeβ-lactamase 産生 *Esherichia coli* の4症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

50）石川良子、塩練秀一、中澤陽子、柴田尚宏、荒川宜親：血液から検出された CTX-M-9 型β-ラクタマーゼ産生 *Esherichia coli* の3症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

51）市原美華、島貫美代子、柴田尚宏、荒川宜親：IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae/Citrobacter freundii* の分離例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

52）藤森和美、塩練秀一、中澤陽子、柴田尚宏、荒川宜親：血液から検出されたメタロβ-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* の 3 症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

53）山田友紀、昆浩、黒田牧子、山端久美子、伊東みち子、野々宮百合子、小畑律子、辻村正雪、小笠原理恵、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親：岩手医科大学附属病院におけるメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出状況とその臨床背景。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

54）土屋憲、橋本千紗子、米沢佳寿子、柴田尚宏、荒川宜親：メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の臨床的検討。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

55）小濱邦彦、片岡美由紀、柴田尚宏、荒川宜親：微量液体希釈法を用いて検出したメタロβ-ラクタマーゼ産生菌について。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

56）神田成夫、大石和伸、柴田尚宏、荒川宜親：尿より検出された VIM-2 型メタロβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌の一例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

57）黒川博史、和知野純一、八木哲也、山根一和、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-型β-ラクタマーゼに類似した新しいβ-ラクタマーゼの発見。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

58）服部万里子、柴田尚宏、荒川宜親：下痢症より検出された IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の検討。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

59）木下まり、柴田尚宏、荒川宜親：当院における薬剤耐性グラム陰性桿菌の分離状況と検出時の対応について。第15回

日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

60）和知野純一、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、黒川博史、八木哲也、窪田隆子、荒川宜親：GES 型β-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の解析。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

61）畑中公基、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離されたESBL および CTX-M-型β-ラクタマーゼ産生菌の検出状況と臨床的解析。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

62）飯田寿江、吹貝姿子、西倉紀子、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-2 型β-ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabillis* について。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

63）小林治、浅香敏之、千田靖子、三宅澄子、柴田尚宏、荒川宜親：石川県下における ESBL/CTX-M-タイプ β-ラクタマーゼ産生菌の分離状況。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

64）本間操、大貫雅子、柴田尚宏、荒川宜親：白血病患者より検出された *Chryseobacteriom meningosepticum* の一例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年

65）柴山恵吾、蒲地一成、八木哲也、土井洋平、柴田尚宏、山根一和、加藤はる、荒川宜親：*Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導蛋白の精製、同定。第 9 回日本ヘリコバクター学会総会、2003 年 6 月

66）柴田尚宏：グラム陰性桿菌の耐性の動向と検出法。平成15年度臨床微生物特別卒後教育セミナー、東京、7月25日、2003年

67）柴田尚宏：グラム陰性桿菌を中心とした耐性菌について。第10回中部微生物検査研究班研修会、三重、11月1日、2003年

68）佐々木裕子、堀野敦子、見理　剛、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* ゲノムにおける未知病原遺伝子の探索、第 76 回日本細菌学会、2003 年 4 月1−3日、熊本。

69） 佐々木裕子：マイコプラズマ科における *Mycoplasma penetrans* ゲノムの特徴、日本進化学会第5回大会、2003 年8月2日−4日、福岡

70）見理　剛、瀬戸真太郎、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、荒川宜親、宮田真人：YFP 蛍光タンパク質を用いた *M. pneumoniae* の接着器官の視覚化

第 76 回日本細菌学会　2003 年 4 月、熊本。

71）見理　剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、蛍光タンパク質を用いた *M. pneumoniae* の細胞構造の観察、第 30 回日本マイコプラズマ学術集会、2003 年 10 月、東京

72）佐々木次雄：無菌医薬品の無菌製造法ガイドラインの現状と運用について、第19回GMPとバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム、2004.03.05、東京。

73）佐々木次雄：日本薬局方15局へ向けての新しい考え方、日本PDA主催「製薬用水の調和動向に関する国際シンポジウム、2003.11.17、大阪。

74） 川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親：*Haemophilus influenzae* type b 莢膜多糖体の精製と利用、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本。

75）新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親：呼吸器由来 *Haemophilus influenzae* の型別及び薬剤感受性について、平成 15 年度日米医学協力研究会第 8 回急性呼吸器感染症部会日本側合同会議、2004 年 1 月、東京。

76）山本三郎、瀧井猛将、小野崎菊夫、高橋光良：BCG ワクチンの多様性について. 第 73 回実験結核研究会、2003 年 4 月　倉敷市.

77）Yamazaki, T., Hamanaka, M., Yamamoto, S., Honda, M. and Haga, S.: IFN-γ ELISPOT assay analysis of the lymphocytes in guinea pigs vaccinated with BCG Tokyo. 第 73 回実験結核研究会、2003 年 4 月　倉敷市.

78）山崎剛、山本三郎、芳賀伸治：ELISA 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 年 4 月、倉敷市.

79）山本十糸子、山本三郎：モルモット肺結核モデルにおける TNF-α 産生の調節. 第 78 回日本結核病学会総会、2003 年 4 月、倉敷市.

80）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、栃久保邦夫、後藤紀久：BCG との同時経鼻投与でみた組換えコレラ毒素 B サブユニットの細胞性免疫増強効果. 第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本市.

81）高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、山本三郎、松木孝澄：CpG DNA によるヒト Plasmacytoid 樹状細胞の MIP-1α 及び IP-10 誘導機構. 第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月、東京都.

82）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、栃久保邦夫、後藤紀久：細胞性免疫増強効果からみた鼻粘膜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. 第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋市.

83）山本三郎、山本十糸子、前山順一、後藤紀久、David N. McMurray：BCG 経鼻免疫モルモットの抗結核作用と CpG DNA の免疫増強効果. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.

84）山本十糸子、David N. McMurray、山本三郎：BCG 免疫モルモット細胞の TNF-α 産生と結核感染の影響.
第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.

85）前山順一、井坂雅徳、安田陽子、栃久保邦夫、山本三郎、後藤紀久：B. brevis で産生させた組換えコレラ毒素 B サブユニットの粘膜アジュバント効果. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.

86）高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、山本三郎、松木孝澄：CpG DNA によるヒト Plasmacytoid 樹状細胞の MIP-1α および IP-10 誘導機構. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.

87）山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、抗生物質のエンドトキシン活性増強、第 76 回日本細菌学会学術集会、熊本、2003 年4月

88）山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、荒川宜親、倉田 毅、堀内善信：海外 DPT ワクチンの安全性の検討、第回日本ワクチン学会学術総会、名古屋、2003 年 10 月

89）山本明彦、落合雅樹、堀内善信：抗生物質によるエンドトキシン活性増強作用、第7回エンドトキシン研究会、盛岡、2003 年 11 月

90）落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、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量の評価について、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

91）落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、海外製の DTaP ワクチンおよび Hib ワクチン中エンドトキシン量の評価、第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋

92）蒲地一成、永田典代、近田俊文、荒川宜親：百日咳死亡事例から分離された百日咳菌の細菌学的解析、第 86 回日本細菌学会関東支部会合同学術集会、2003 年 10 月、横浜

93）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、2003 年 4 月、熊本

94）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、4月、熊本

95）小宮貴子、岩城正昭、福田靖、堀川和美、村上光一、帆足喜久雄、緒方喜久代、八柳潤斎藤志保子、内村眞佐子、小岩井健司、荒川宜親、高橋元秀：ウシ、ネコ、イヌを対象とした *Corynebacterium ulcerans* の予備的疫学調査：第 76 回日本細菌学会総会、平成 15 年 4 月、熊本。

96）角田篤信、畑中章生、中村朗、大江健二、小宮貴子、高橋元秀：*Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア様症状を呈した 2 例：第 77 回日本感染症学会総会、平成 15 年 4 月、福岡。

97）岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀. ジフテリア症原因菌 *C. diphtheriae* と *C. ulcerans* の共通抗原について。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年4月、熊本。

98）高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親. 国内で発生した 2 例のジフテリア症から分離された *Corynebacterium ulcerans* の細菌学的性状について。第76回日本細菌学会総会、2003 年4月、熊本。

99）岩城正昭、福田靖、小宮貴子、高橋 元秀. 標準抗破傷風人免疫グロブリンの標準化試験。第7回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋。

100）岩城正昭、福田靖、小宮貴子、高橋 元秀. 標準抗破傷風人免疫グロブリンの標準化試験。第7回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋。

101）小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親、高橋元秀、国内で発生した *Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア症。平成15 年度日米医学協力研究会 第 8 回急性呼吸器感染症部会、2004 年 1 月、東京。

III　その他の研究発表

1. 平成 15 年 12 月 12 日、東京農工大学におけるバイオ人材育成事業のバイオハザード評価概論で「バイオトキシンハザード」について講義した。[高橋元秀]

１．無菌試験の実績

(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	60	60	0	0	0
5	54	54	0	0	0
6	65	65	0	0	0
7	87	87	0	0	0
8	76	76	0	0	0
9	124	124	0	0	0
10	98	98	0	0	0
11	60	60	0	0	0
12	89	89	0	0	0
1	63	63	0	0	0
2	55	55	0	0	0
3	69	69	0	0	0
計	900	900	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	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	8	8	0	0	0
3	8	8	0	0	0
計	16	16	0	0	0

(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	0	0	0	0	0
6	1	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	1	1	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	3	3	0	0	0

6. 寄 生 動 物 部

部　長　　遠 藤 卓 郎

概　　要

寄生動物部における研究活動は専門性と継続性の重視と社会還元を基調とし、原虫・蠕虫類に係る疫学、生理学、生化学、分子生物学ならびに、これらに起因する疾病の予防と診断に関する研究を行っている。研究事業としては、所内関連部の協力を得つつ「食生活と環境の変化に伴う寄生虫・原虫症の対策と監視強化に関する研究」を継続している。

本年度は、原虫類としてミクロスポリジア、クリプトスポリジウム、ジアルジア、自由生活性アメーバ類、赤痢アメーバ、マラリア、蠕虫類として多包条虫(エキノコックス)、アライグマ回虫、広東住血線虫、肺吸虫、アニサキス等々が研究・検査の対象となっており、近年の寄生虫症の多様化傾向が顕著に現れている。一方、研究手法としては全ての分野において分子生物学的手法が導入されている。寄生虫学研究にあって研究対象、研究手法の変遷ぶりには今昔の感がある。

わが国におけるエキノコックス対策の一環として、厚労省科学研究助成による『動物由来寄生虫症の流行地拡大防止対策に関する研究』が実施されているが、当該部では飼い主の転居等により北海道から他都府県へ移動するイヌを対象に感染実態調査を実施している。また、動物展示施設あるいは、野生化・定着した地域におけるアライグマ回虫症の感染予防対策にも力を注いだ。昨年度、首都圏を流れる河川に生息する汽水性のカニに高率に大平肺吸虫の幼虫(メタセルカリア)が寄生していることを報告したが、その寄生率は周年を通じて 30%前後と一定していた。近年、都市部を流れる河川は憩いの場として復権しつつあり、不慮の感染事故を防ぐ観点から本種の人への感染性について検討する必要があるものと考えている。その他、昨年に引き続き、吸虫類の中間宿主貝の殺貝試験が行われている。赤痢アメーバ症は感染症法のもとで患者の全数把握が義務化されているが、年間の届け出数がおよそ 500 例ほどで推移している。当該部では赤痢アメーバの代謝経路の研究から原虫に特有の酵素系を標的とした創薬研究を続けている。また、赤痢アメーバではその旺盛な貪食能が病原性との関連で議論されており、当部では貪食に係る膜輸送 (cytosis) について分子レベルでの機能解析を進めている。昨年度から導入したミクロスポリジア研究では検査法開発、疫学調査、流行株の収集を行なうと共に、網羅的な蛋白解析、遺伝子情報の収集に努めている。クリプトスポリジウム等の耐塩素性原虫類による水道水汚染問題は、(1) 各種排水による河川等の汚染負荷の増大、(2) 水の再利用の加速、それに伴う (3) 水の再生循環に要する時間の短縮、という諸要因が背景にある。わが国の立地条件および都市構造から判断すれば、今後ともこれらの汚染リスクの増大が懸念される。当該部ではこれら原虫類の活性評価法開発と各種消毒処理による不活化の効果判定および、クリプトスポリジウム／ジアルジアの特異遺伝子解析と遺伝子情報の拡充に努め、分子疫学研究への基礎資料としてきた。自由生活性アメーバは環境水中におけるレジオネラの宿主であることが判明したことで多方面からの研究の必要性が増しているが、それ自体の病原性が問題となるアメーバ種に対して改めて注目し、わが国の入浴施設等における汚染の実態調査、分離株の病原性について検討を行った。

本年度は人事面での移動はなく、現在は当部職員が 10 名、これに研究臨時職員４名、客員研究員、協力研究員および流動研究員 22 名、実習生 1 名の協力を得て運営されている。限られた陣容で多様化する原虫・蠕虫問題に対峙せざるを得ず、効率化を迫られる日々である。

研 究 業 績

Ⅰ. 疫 学

1. 微胞子虫(Microsporidia)の感染、診断、疫学、予防に関する研究

微胞子虫(Microsporidia)は細胞内で発育・増殖する微小な病原性寄生虫で、およそ150属1000種からなる。感染宿主も昆虫・魚類・爬虫類・哺乳類等に及ぶ。ヒトに感染する微胞子虫は7属(*Enterocytozoon*、*Encephalitozoon*、*Pleistophora*、*Trachipleistophora*、*Vittaforma*、*Brachiola*、*Nosema*)が知られている。このうち、わが国で存在が確認され、流行の定着・拡大が懸念されている微胞子虫は *Encephalitozoon cuniculi* である。今のところ動物での流行が問題となっているが、新興病原体・人獣共通感染性病原体であり、また播種性疾患であることから、ヒトへの健康影響を含めた疫学調査研究が緊急の課題となってきている。そこで、*Encephalitozoon* を中心としたヒトに感染性の微胞子虫に関する検査法の開発・確立、流行株の集積と分子生物学的解析、疫学調査、流行対策などを柱とする総合的な研究を 2003 年度から開始している。また、腸管寄生性微胞子虫(*Enterocytozoon bieneusi*、*Encephalitozoon intestinalis* など)流行株の遺伝子データの集積などを主な目的に、本虫の臨床原虫学的研究が進んでいるマレーシア国ケバングサーン大学と共同研究に向けての基礎的検討を行っている。

[古屋宏二、八木田健司、朝倉登喜子]

2. 動物における *Encephalitozoon* 感染の血清疫学

わが国の動物における *Encephalitozoon* 感染の疫学研究の一環として、関東地方におけるイヌの *Encephalitozoon* 感染の血清疫学的調査を行った。供試血清は 2003 年に関東地方のフィラリア検診時に収集したイヌ血清 159 検体であった。これらの検体(200倍希釈血清)について、先ず、精製 *E. cuniculi* 胞子から抽出した可溶性抗原—ELISA 法を用いてスクリーニングし、ELISA 値 0.5 以上を示す9検体を選別した。ELISA 結果は 0.5 以下の検体 150 例、0.5—1.0 の検体8例、1.0 以上の検体1例であった。これらの ELISA 値が高めな9検体について、次に、感染細胞を用いた in situ EIA 法により *Encephalitozoon* 胞子抗体の測定を行った。その結果、胞子に対する抗体反応性が 50 倍希釈でも認められず、最終的に9検体全例を陰性と判定した。

今回の調査結果は、血清 159 検体と少ないものの、関東地方の健康なイヌの *Encephalitozoon* 感染の流行状況を反映したものと考えられ、最近のノルウエー、スイスでの調査研究報告と同様、健康犬には *Encephalitozoon* 胞子抗体保有犬を確認できなかったことを示すものである。今後、神経症状を有するイヌ、encephalitozoonosis を疑うイヌを対象にした調査が行われる必要があると考えられた。

[佐々木志朗(日獣大)、朝倉登喜子、古屋宏二]

3. クリプトスポリジウム症の地域集団発生事例

2002 年 4 月北海道において、室蘭保健所管内(胆振支庁)の宿泊施設を利用した札幌市の専門学校生 300 名のうち 170 名にクリプトスポリジウム感染による集団下痢症が発生した(札幌市保健衛生部)。北海道保健福祉部保健予防課が中心となって行った原因究明のための調査と検便で、同時期に当該宿泊施設を利用した江別市の大学生にも下痢症状(153 名中 8 名)を訴える者がいることが分かり、宿泊施設の従業員を含めた検便を実施した。その結果、検便が可能であった江別市大学生 3 名のうち 2 名、当該施設従業員 350 名のうち 28 名の便からクリプトスポリジウム・オーシストを検出。札幌市専門学校生有症者からの分離オーシストを含めて、ポリスレオニン遺伝子、COWP 遺伝子を標的にした PCR−RFLP 解析及び塩基配列の決定を行い、3 地域の有症者を *C. parvum* genotype1(ヒト型)の感染と判定。感染源と感染経路は特定できなかったが、宿泊施設を起点にしたヒト型 *C. parvum* による広域のクリプトスポリジウム症集団発生の事例と判断された。

同年6月に千葉県でもクリプトスポリジウム感染による集団下痢症が発生した。北海道に修学旅行した高校生 303 名のうち、牧場で農業体験した 9 名中 8 名が下痢症を発生、検便で5名からクリプトスポリジウム・オーシストを検出。ポリスレオニン遺伝子、COWP 遺伝子を標的にした PCR−RFLP 解析から有症者を *C. parvum* genotype2(ウシ型)の感染と判定。感染源と感染経路は特定には至らなかったが、牧場体験と密接なウシ型 *C. parvum* によるクリプトスポリジウム症集団発生事例と判断された。

いずれの事例も研修旅行、修学旅行、地域特性などをキーワードとする新たなタイプのクリプトスポリジウム症集団発生の事例と考えられた。

[八木欣平(北海道衛研)、福嶋得忍(千葉衛研)、古屋宏二]

4. レジオネラの宿主アメーバに関する研究

1) 浴槽モデルを用いたアメーバ汚染のモニタリング

循環式浴槽の微生物汚染防止対策を考案する目的で、前年度に引続き、循環浴槽実験プラントを用いて宿主アメーバなら

びにレジオネラ等細菌類による汚染のモニタリングを行った。本年度は塩素、紫外線等の消毒効果の試験を行い、ろ過装置内の加熱操作(67℃、10分間、1回/日)、またろ過装置内の塩素による逆洗浄操作(5mg/L、5 分間、1 回/日)を行う条件では、アメーバ数の上昇は認められず、試験中は低値を持続した。その結果、レジオネラ菌数も比較的低値で推移した。バイオフィルム量としてはろ過装置内のろ材中に多量に蓄積されることから、ろ過装置を直接的に消毒する方法がアメーバの低減に効果を示したものと考えられた。
[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) レジオネラ症集団発生事例に関連した宿主アメーバ調査

国内で発生した客船レジオネラ症集団発生事例に関し、感染源調査の一環として宿主アメーバの調査を行った。感染源と推定された入浴施設に、附設のろ過装置内より採取されたろ材を試料として、その表面に付着するバイオフィルムを回収しアメーバの分離を行った。しかしながら、ろ材回収前に消毒作業が行われていたことから、アメーバ検出には至らなかった。原因究明には現場保全がきわめて重要で、保全の義務付けに関して行政的な対応を図るべきものと考える。
[八木田健司、倉　文明(細菌第一部)]

5.　北海道から移動するイヌの多包条虫感染実態調査

ヒトの多包虫症は多包条虫の幼虫寄生によって引き起こされる人獣共通寄生虫症である。わが国における常在地は現在のところ北海道であり、それ以外の都府県におけるヒト多包虫症も、少数の原発疑い例を除いて、ほとんどが北海道に関連する症例である。このため終宿主の移動もしくは人為的移入を介して多包条虫が北海道外へ伝播されることが懸念されている。そこで我々は、北海道から他都府県へ移動するイヌに注目し、2003 年 9 月より北海道から飼い主の観光や転居によって移動するイヌの多包条虫感染状況に関する調査を開始した。2003 年度末までに 102 検体の検査を行い、そのうち 2 検体の抗原陽性例を検出した。陽性 2 例の本来の飼育地は、それぞれ北海道および他都府県の各 1 例であった。
[森嶋康之・杉山　広・荒川京子・川中正憲]

6. 広東住血線虫症の疫学と予防に関する研究

1) 沖縄県での血清疫学的調査

沖縄県では 1999 年 12 月～2000 年 6 月までの 4ヶ月の間に、症状は軽微ながら感染源が特定されない 10 例もの広東住血線虫(Ac)感染事例が続発した。このことは沖縄県での Ac の感染様式に何らかの変化が現われてきた可能性があり調査が必要となった。本年度は粗抗原を用いた ELISA 法により血清疫学的調査を実施した。検査対象とした一般住民の血清は 1139 本であり、これらは 10 市町村 11 箇所の地区において各地区につき約 100 名の住民から市町村を通じてインフォームドコンセントの手続きを経た後に提供された。これらの被験血清について Ac 粗抗原による ELISA を実施した。予め既知の陰性血清群の ELISA の値を求めてカットオフ値を設定したが、それを超えて陽性を示した「ELISA 陽性」の被験血清は、全体の 7.7%に上った。大きく3地域に分けて地域別に「ELISA 陽性率」の高い順に見てみると、沖縄本島南部が 3.7～13.4%(平均 10.1%)、離島が 3.1～20.0%(平均 7.5%)、本島北部が 0～9.2%(平均 6.6%)であった。更に特異的な Ac 抗原によって検討している。
[川中正憲、荒川京子、杉山広、森嶋康之、安里龍二(沖縄衛環研)]

7. アライグマ回虫による幼虫移行症の発生予防と監視

1) 動物展示施設におけるアライグマ回虫症の感染予防対策について

動物展示施設は、レクリエーションの場であると共に、教育、調査・研究、種の保存等といった大切な使命を担っており、今日の社会において欠かせない存在となっている。しかしながら、動物展示施設の特殊性から、通常、ヒトと触れあうことのない野生動物等が飼育係等の従事者や来園者と直接的・間接的に接触する可能性がある。アライグマ回虫はヒトに感染すると致死的な神経障害を惹起しうるが、動物展示施設においてアライグマの本種寄生例が少なからず確認されている。これらの陽性動物展示施設に対して、昨年度に策定した「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」に基づく検査と対策を継続している。
[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継続実施している。検査には神奈川県はアライグマ駆除業者、自治体から、また愛知県は開業獣医師から、直接送付された糞便を用いた。平成 15 年度の検査件数を県別に挙げると、神奈川県(112)、愛知県(7)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、杉山　広、森嶋康之、川中正憲]

8. 東京都における肺吸虫の発生分布に関する研究:大平肺吸虫メタセルカリアの寄生状況の季節消長

東京都内を流れる荒川のクロベンケイガニに、大平肺吸虫のメタセルカリアが寄生することは既に報告した。今年度はメタセルカリアの寄生状況の季節消長を調べた。調査地には冬季でもカニ採集が比較的容易であった西葛西地区(江戸川区)を選んだ。その結果、クロベンケイガニでの寄生率は 7 月:25%、8 月:29%、12 月:29%、2 月:32%と、夏季と冬季とでほとんど差異がないことが判明した。

[杉山 広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲]

Ⅱ. 分 類

1. *Naegleria* 属アメーバの多様性

温水環境中に生息するアメーバの *Naegleria fowleri* は原発性アメーバ性髄膜脳炎を引き起こすことから、温水環境中に存在する *Naegleria* 属アメーバの迅速検出法の検討を行なっている。これまでの研究では ITS1/2 領域の PCR-RFLP を行い、上述の *N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* に特化した型別を検討してきた。本年度では ITS1/2 領域ならびに 18S rRNA 遺伝子の塩基配列決定を行い、*Naegleria* 属アメーバの多様性について検討を行なった。その結果、*N. lovaniensis*、*N. australiensis*、*N. tihangensis*、*N. philippinensis*、*N. endoi*、*N. clarki*、*N. Jamiesoni*、*N. mexicana* の ITS1/2 領域と相同の配列を有する株が分離された。また、*N. italica*、*N. laresi*、*N. andersoni* と高い相同性を有する株の存在を確認した。一方、本属アメーバにおいては 18S rRNA の配列に多様性が見られ、*N. fowleri* ではわが国の患者分離株と基準株 NF66 株との間に 2 塩基の差異が認められた。また、フィリピンの臨床分離株である *N. philippinensis* は 18S rRNA 遺伝子内にイントロンを有するのに対して、わが国の分離株はイントロンを欠いていた。今後の *Naegleria* 属アメーバの研究は病原性因子の探求が重要性を増すものと考える。本研究は、厚生労働科学研究費補助金健康科学総合研究事業「温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体 Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究」(H13-生活-042)の一部として行われたもので、多数の協力研究者の協力を得て行なわれた。

[泉山信司、朝倉登喜子、下河原理江子、八木田健司]

2. 分子生物学的手法による肺吸虫種の同定・鑑別

1) マルチプレックス PCR による本邦産人体寄生性肺吸虫のメタセルカリアでの種鑑別

我が国には人体寄生性肺吸虫として、ウェステルマン肺吸虫(以下、ウ肺吸虫)と宮崎肺吸虫の 2 種が分布している。カニに寄生するメタセルカリアが感染源となるが、メタセルカリアの形態は両種で相互に酷似するため、鑑別は容易ではない。そこで両種の ITS-2 領域に認める配列の差異を利用して、同定・鑑別に関する検討を行った。ITS2 領域内の異なる部位にウ肺吸虫あるいは宮崎肺吸虫に特異的なプライマーを設計し、これと吸虫類の ITS2 領域に共通のプライマーセットを共存させて PCR(マルチプレックス PCR)を行った。その結果、ウ肺吸虫では 140bp と 520bp、宮崎肺吸虫では 300bp と 520bp、更に大平肺吸虫では 520bp の産物が増幅された。今回開発したマルチプレックス PCR により、肺吸虫類の同定(520bp)と、ウ肺吸虫(140bp)か宮崎肺吸虫(300bp)かの鑑別が、1本のチューブでの反応で行い得ることが明らかになった。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)]

2) メタセルカリアでのタイ産ヒロクチ肺吸虫の同定

タイには 6 種類の肺吸虫が分布するが、ヒトへの感染が証明されているのはヒロクチ肺吸虫 *Paragonimus heterotremus* だけである。本虫の ITS2 領域の配列を基にして本種に特異的なプライマーを設計し、このプライマーとタイで得た各種肺吸虫(ヒロクチの他に、ウェステルマン、ハリナスタ、タイの 4 種)のメタセルカリア由来 DNA をそれぞれ用いて、PCR を行った。その結果、ヒロクチ肺吸虫 DNA のみで予想サイズの PCR 産物が得られた。カニからの検出過程で脱嚢してしまったメタセルカリアは、感染力を保持しているにもかかわらず、形態での種の決定が極めて困難であったが、本法で迅速・正確に種鑑別ができた。本法は、タイでの人体寄生性肺吸虫(症)の疫学調査において有効なツールになると考えられた。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐(遺伝子資源)、アチャリア・ラングジルジ、パンシン・ケツダット(スリナカリンウイロート大学・タイ国)]

Ⅲ. 生理・生化学・分子生物学

1. クリプトスポリジウム等消化管寄生性原虫類に関する研究

1) HIV 感染者におけるクリプトスポリジウム症の遺伝子型解析

国内におけるクリプトスポリジウム症例の遺伝子型は、*C. parvum* ヒト型が最も多く(約 63%)、これまで調べた HIV 感染者はすべて(10 例)ヒト型という特色がある。本年度、都内および近郊の病院より HIV 感染者のクリプトスポリジウム症例が相次ぎ、集団発生の可能性が考えられた。*C. parvum* ヒト型はポリスレオニン領域の塩基配列解析から4つのサブタイプに分類され、

HIV 感染者はすべて同一のサブタイプを示した。非 HIV 感染者はそれ以外の 3 タイプに属した。また、一部の男性同性愛者間ではSTDとしてクリプト症が広がっている可能性が示唆された。
[八木田健司、泉山信司、朝倉登喜子、菊池　嘉(国立国際医療センターエイズ治療研究開発センター)、増田剛太(都立北療育医療センター)、相楽裕子(横浜市立市民病院感染症部)]

2) 旅行者下痢としてのジアルジア症の遺伝子型解析

ジアルジア症は国内での集団感染例はないが、散発的な発生はこの数年間およそ 100 例/年のレベルにある。その多くは旅行者下痢症と考えられ、国内へのジアルジアの流入が続いていると想定される。これに関連して本年度、アフリカ、東アジア、東南アジア諸国に派遣された海外青年協力隊より検出されたジアルジアの遺伝子型解析を行った。ヒト感染性の遺伝子型としては、ヒトを含めた哺乳類に広く感染性を有する Assemblage A1 および B とヒトのみに感染するA2 があるが、現在まで調べた材料はすべて A1 に限られていた。
[八木田健司、泉山信司、朝倉登喜子、朝日博子、東京都予防衛生協会]

2. 病原性関連タンパクの探索を目指した *Naegleria* 属アメーバ総タンパクのウエスタンブロット

1) N*aegleria fowleri* のモノクローナル抗体と総タンパクとの反応性

Naegleria fowleri の病原性追跡あるいは、診断法の確立のために必須となるモノクローナル抗体の作成を進めている。得られた 11 系統のクローンについて、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た。7種のうちの１種(アイソタイプ IgMκ)は *N. fowleri* に対して特異的な反応パターンを示し、市販のモノクローナル抗体の示すパターンとは異なっていた。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 に反応したため、さらに糖鎖に対する反応性を検討し抗体の特徴の詳細を分析中である。
[下河原理江子、小村麻子、中村　健(北里大・寄生虫学)、泉山信司、八木田健司]

2) 抗回虫アクチンポリクローナル抗体を用いた *Naegleria* 総タンパクとの反応性

*Naegleria fowleri*ならびに *N. lovaniensis* の生化学的特徴をプロテオーム解析し病原性特異性を明らかにする目的で、アメーバの総タンパクの 2D-PAGE を進めているが、各タンパクスポットの性質を明らかにしてゆく研究の一環として、各種抗体による性質を検討した。抗回虫アクチン抗体は、42KD の総タンパクの約7%を占めるスポットと反応し、2D-PAGE の分離タンパクの1つを特定することができた。さらに弱いながら反応するスポットを 3 種認め、アクチン関連タンパクとして解析を進めている。一方、抗-αチューブリン抗体ならびにアメーバプロテウスのアクチンに特異性を示すモノクローナル抗体では反応が認められなかった。
[下河原理江子、小村麻子、中村　健(北里大・寄生虫学)、泉山信司、八木田健司]

3. GenomiPhi による *Cryptosporidium* の鋳型 DNA の増幅

Cryptosporidium 等耐塩素性微生物は水系集団感染を引き起こすことから問題となっている。実用的な *Cryptosporidium* の試験管培養系は確立されておらず、集められる試料には限りがあり、DNA の精製回収効率も高くないことから、分子疫学的解析等に用いる試料を増やす何らかの方法が求められていた。本研究ではランダムプライマーとファージ DNA ポリメラーゼを応用した GenomiPhi(AmershamPharmacia)による非特異的な DNA 増幅を *Cryptosporidium* に適用したところ、得られた増幅産物を鋳型とした PCR が可能であることを確認した。元々の試料の純度が低い、あるいはコピー数が十分ではなかった場合では増幅産物からの PCR は成功しなかったが、限られた試料を有効に活用する方法として改良に努めている。
[田栗利紹(長崎県衛生公害研究所)、泉山信司、朝倉登喜子、八木田健司]

4. *Eimeria* オーシストの紫外線耐性

当該研究では、紫外線による耐塩素性微生物対策の有用性について検討している。すでに、*Giardia* 嚢子および、*Cryptosporidium* 嚢子は紫外線への感受性が高く、極めて低線量で不活化され、光/暗回復が確認できないことが示されている。これは、むしろ例外的と考えられることから、今年度はクリプトスポリジウムと分類学的の胞子虫類のオーシストを用いて紫外線感受性を検討した。本研究では鳥類の胞子虫である*Eimeria acervlina* を用いて評価を行った。紫外線照射した*E. acervulina* の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。投与嚢子数と排出嚢子数の関係を表す検量線を作成し、紫外線照射後の嚢子を投与したトリから一定期間に排出されるオーシスト数より消毒の効果を評価した。その結果、8mJ/cm^2 の照射で 2-log程度の嚢子の不活化効果が得られた。すなわち、*Eimeria* においては、2-logの嚢子を不活化するのに必要な線量は*Cryptosporidium*、*Giardia*の 8 倍に相当し、微生物の不活化手段としての紫外線の照射線量の検討には慎重を期す必要があることが指摘された。
[泉山信司、笹井和美(大阪府立大学)、八木田健司]

5. 2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* 総タンパク質の解析

前年度に引続き、自由生活性アメーバで強い病原性を持つ *N. fowleri* について、2D-PAGE 解析、N 末端アミノ酸配列解析を行い、数種の抗体を用いて Western blot による 2D-PAGE スポットパターンの解析を行った。さらに N 末端ブロックのタンパク質について中間配列の解析方法を検討した。また、これまでに得られた情報をもとに *N. fowleri* の 2D-PAGE マップを作成し、データベース構築を試みた。ちなみに、今年度までに 56 個のスポットについてN末端アミノ酸配列解析を行い、その内 30 個について 20 残基前後の N 末端アミノ酸配列が得られた。さらに 10 個のスポットについて中間アミノ酸配列解析を完了した。

[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)]

6. 真菌類より抽出された抗ネグレリア物質

*Naegleria fowleri*等の病原性アメーバに対する真菌類由来の抗アメーバ物質の検索を行った。有効性評価には一般的に薬剤感受性試験に用いられるペーパーディスク法を応用し、*Naegleria lovaniensis* あるいは *Acanthamoeba castellanii* を一定密度で増殖させた大腸菌塗布寒天培地上に試料を含むディスクをのせ、形成される阻止円の大きさを調べた。検索の結果、800試料中2試料に有効性が認められ、*N. lovaniensis* の方が高い感受性を示した。そのうちの F1557 株からの抽出物に関しては、*in vitro* 試験で *N. lovaniensis* に対する細胞膨化とそれに続く崩壊という細胞障害性が確認された。現在、その物質の分子構造等を詳細に解析している。

[長谷川 賢、 東岸和明(玉川大農学部)、八木田健司]

7. 原虫における含硫アミノ酸合成・分解経路の解析

1) 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機能解析及び創薬

宿主哺乳動物に存在せず、原虫にだけ選択的に存在している代謝経路及び酵素は創薬の合理的標的である。我々は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の解析を継続して行った。メチオニンガンマリアーゼはメチオニン、ホモシステイン、システインを分解する一部の嫌気性細菌と原虫だけに存在する酵素である。メチオニンアナログトリフルオロメチオニンは原虫に取り込まれ、代謝され原虫を殺滅することが示された。メチオニンガンマリアーゼ特異的阻害剤プロパジルグリシンによりトリフルオロメチオニンの効果は失われたことよりトリフルオロメチオニンの標的がメチオニンガンマリアーゼであることが確認された。トリフルオロメチオニンはほ乳動物培養細胞に対しての毒性を示さなかった。準備的動物感染実験によるとトリフルオロメチオニンはアメーバ性肝膿瘍の治療に優れた効果を示した。

[小林正規(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)、所正治(金沢大学医学部寄生虫学教室)、野崎智義]

2) 赤痢アメーバのセリン生合成経路の解析

寄生原虫は一般に単純化された生合成経路をもつが、赤痢アメーバはその中でも例外的に比較的自己充足的なアミノ酸合成経路をもっている。上述の含硫アミノ酸の生合成はそのもっともよい一例である。我々は含硫アミノ酸生合経路の調節機構を明らかにすることを目的として、上流に存在するセリン代謝経路を解明することを目指した。赤痢アメーバにはリン酸化並び非リン酸化セリン代謝経路と呼ばれる2つの独立した経路が存在する。本年度は昨年度の遺伝子同定に次ぎ、リン酸化セリン代謝経路のグリセリン酸リン酸デヒドロゲナーゼ(PGDH)について酵素学的解明を行った。赤痢アメーバの PGDH はバクテオリデス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 PGDH の酵素学的性状から、非リン酸化セリン代謝経路がセリンの分解と糖新生に機能するのに対して、本経路はセリンの生合成の方向に機能していることが示された。従って、セリン代謝経路はいずれも下流のシステイン生合成経路の基質濃度を調節する重要な役割を果たすと考えられた。

[Vahab Ali、橋本哲男(筑波大学)、繁田泰男、野崎智義]

8. 原虫における鉄硫黄タンパク質生合成の解析

鉄硫黄クラスターを活性中心とする鉄硫黄タンパク質は電子伝達・窒素同化・光合成など様々な役割を果たすし、すべての細胞にとって必須である。嫌気性原虫赤痢アメーバにおいてはフェレドキシン、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などが鉄硫黄タンパク質と嫌気的電子伝達において重要な役割を果たす。赤痢アメーバにおける鉄硫黄クラスター生合成は Nif と呼ばれるもっとも単純な系で行われる。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 の二つのタンパク質だけで機能することが示された。また、鉄硫黄クラスター生合成能を欠質した大腸菌株を用いた発現機能解析により、赤痢アメーバの NifS, NifU は多種生物内で嫌気的条件下でのみ鉄硫黄クラスター合成を行えることを明らかにし、赤痢アメーバの嫌気的代謝の理由のひとつが明らかとなった。

[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]

9. 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おける分子機構を包括的に理解することを目的として、ファゴソームタンパク質の網羅的プロテオーム解析を行った。細胞表面レセプター、加水分解酵素、低分子量 GTP 結合タンパク質、細胞骨格タンパク質などが時間依存的に動員されることが明らかとなった。更に、経時的に頻度の変化する代表的なタンパク質に関して免疫蛍光抗体法によりプロテオーム解析の結果を確認した。現在更に分離株間のファゴソームタンパク質のプロファイルの相違を解析している。

[岡田麻美、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

ア 貪食における *Eh*Rab7 アイソタイプの機能解析

Rab7 はリソソーム及び後期エンドソームで機能する低分子量 GTP 結合タンパク質である。他種生物とは異なり赤痢アメーバには8種類のアイソタイプが存在する。赤痢アメーバが単細胞生物であること、その細胞分化が他の真核生物と比較して単純であることを考慮すれば、この Rab7 アイソタイプの多様性の生物学的な意義は興味深い。現在 *Eh*Rab7A–H の 8 つのアイソタイプの細胞内局在、貪食、リソソーム酵素の輸送、病原性などへの関与に関して、詳細な解析を行っている。

[中野由美子、津久井久美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義]

イ *Eh*Rab7A の結合タンパク質の解析

赤痢アメーバ *Eh*Rab7A は貪食胞に消化酵素を運搬するのに重要な Rab タンパク質である。微生物や宿主細胞の貪食と分解に必須な Rab の機能調節機構を理解することを目的として、*Eh*Rab7A に結合するタンパク質をアフィニティ精製し、タンパク質を同定した。これは哺乳動物と酵母でレトロマーと呼ばれる複合体であった。この複合体は他種生物では5つのコンポーネントからなるが赤痢アメーバではそのうち3つの分子しか同定されなかった。また、Rab7A との結合も他種生物では例がなかった。現在、細胞内局在、機能を詳細に解析している。

[津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義]

ウ 貪食の分子機構の可視化

赤痢アメーバにおける貪食の過程、ファゴソームの成熟過程の分子機構を詳細に明らかにすることを長期的目的とした研究を行った。高感度・高解像度生細胞観察システムを用いて、生きた赤痢アメーバ細胞の貪食と貪食後の分解の過程をリアルタイムで解析できるシステムを構築した。様々なオルガネラマーカーと緑色蛍光タンパク質で標識した Rab5, Rab7A タンパク質を用いて、貪食後のオルガネラの pH の変化、Rab の動員、加水分解酵素の輸送などを明らかにしようとしている。本年度は観察システム、観察条件の至適化、貪食胞の酸性化の過程を明らかにした。

[ビスワ ミトラ、津久井久美子、中野由美子、野崎智義]

10. 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

キネトプラスチド科に属する原虫はトリパノソーマやリーシュマニアなどが含まれ、これらの原虫に起因する疾病に関しては、いずれも安全で有効な治療法が開発されていない。我々はすでにこれらの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。本年度はリーシュマニア原虫に関して詳細の解析を行い、*Leishmania major* からプロスタグランジン F 合成酵素遺伝子を単離するとともに、タンパク質の酵素学的同定を行った。更に、PCR、免疫蛍光抗体法により本酵素が *L. major, L. donovani, L. infantum* などの旧世界リーシュマニアに選択的に存在することを明らかにした。リーシュマニア原虫の産生するプロスタグランジンが宿主の生理と病理を修飾している可能性が示唆された。

[Bruno K. Kubata(ケニア医学研究所)、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]

11. 赤痢アメーバの低分子量 GTP 結合タンパク質の脂質修飾酵素の同定と解析

赤痢アメーバの Rab の膜への局在に不可欠なカルボキシル末端部のイソプレニル化の分子機構解析を長期的目的として、まず、Ras, Rac, Rho などの低分子量 GTP 結合タンパク質のファルネシル化酵素を解析した。

[牧岡朝夫 (慈恵医科大学), 熊谷正広 (同), 野崎智義]

12. SYBR Green I を用いたフローサイトメトリーによるマラリア血球感染率測定

マラリアのコントロールには臨床分離株における薬剤感受性

のモニタリングや新規薬剤の開発等が重要であり、これらの目的には信頼性が高く、かつ簡便迅速な測定法が求められる。そのような測定法の 1 つとして、フローサイトメトリーによる感染率測定が挙げられる。フローサイトメトリーは顕微鏡と良く相関した結果が得られることが多くの研究者より報告されているが、利用される機会は多くない。従来の染色法では高価なUVレーザーが必要であること、バックグラウンドが高いことなどがその障害となっている。本研究では染色試薬、染色条件、および試料の保存方法の検討を行い、簡便で信頼性の高い改良法を確立した。詳細な染色条件の検討から、1mlの 1×SYBR Green I / 0.85% NaCl - 20mM Tris緩衝液(pH8.8)と 0.5%の血球濃度に希釈した感染赤血球 16μlを混合し、5 分間室温で静置する方法が良好であった。試料の固定は、1%Paraformaldehydeを含むAlsever液を用いる方法が良好で、1 週間以上の保存が可能であった。全血を用いた場合でも白血球の影響を受けることなく測定が可能と考えられた。一例として、Chloroquineを用いた薬剤感受性試験の結果をフローサイトメトリーと顕微鏡計数との間で比較したところ、感染赤血球の計数およびIC_{50}の評価において、同等の結果が得られた。方法は、簡便迅速であること、また原虫の発育段階に関する情報も同時に得られること等々の利点があり、薬剤のスクリーニングや薬剤感受性試験等への応用が期待される。

[泉山信司、朝日博子]

13. 新規 GPI アンカー阻害剤の抗マラリア作用

高速スループットスクリーニング法で自然界の物質から見い出された GPI アンカー阻害効果のある新規構造物の抗マラリア作用について試験した。In vitro 試験は熱帯熱マラリア原虫を用いて、新規に標準化した Flow cytometry により評価した。誘導体 9 種の中で2種が比較的高い増殖抑制効果を示し、50%抑制濃度が 0.6-1.7 μg／ml であった。ネズミマラリアをた予備的な in vivo 試験では、100mg／kg の高い投与量においても治療効果は得られなかった。マラリア原虫特異的な GPI アンカー阻害を誘導する薬剤開発のリード化合物として注目される。

[朝日博子、泉山信司]

Ⅳ. 検査・診断

1. クロモトロープ染色変法による下痢症患者便中 microsporidia 胞子の検出

Microsporidia 症と診断された患者凍結糞便 10 試料を融解して、クロモトロープ染色変法による microsporidia 胞子の検出を試みた。凍結患者便約 0.5g を融解し、精製水 10 mL に懸濁。ガーゼ濾過、酢酸エチル処理後、遠心沈渣をスライドに塗布・風乾した。次にスライドを gentian violet 液、Gram's iodine 液にそれぞれ1分間浸漬、脱染色液及び水で洗浄した。スライドを更にクロモトロープ染色液に 5 分間浸漬、90%酸アルコール、95%エチルアルコール及び 100%エチルアルコールで洗浄・乾燥後油浸で鏡検した。

全ての便試料にグラム陽性で卵形の、中央部にベルト様ストライプを有する胞子を認めた。凍結前の塗抹染色標本に較べ、ガーゼ濾過、酢酸エチルによる前処理のせいか、バックグランドはある程度きれいになったものの、胞子数は明らかに減少していた。

[C. Fatmah (Universiti Kebangsaan Malaysia)、N. Moktar (UKM)、古屋宏二]

2. 病原性アメーバ類に関する研究

1) 温水環境における *Naegleria* 属アメーバ実態調査

前年度に引続き、国内温水環境における *Naegleria* 属を中心とする病原性アメーバ調査を行った。本年度は調査地域数を 25 に拡大、全アメーバクローン数 3,167 に関して解析した。試料総数 1,173 に対する *Naegleria* 属アメーバの検出率は 14.7%であり、非病原種の *N. lovaniensis* とともに、実験的ではあるが病原性をもつ *N. australiensis* が全国的に検出されたことが特筆される。その他の病原性種として *N. italica, N. philippinensis* が低い検出率ではあるが、国内に定着していることが再確認された。なお最も病原性の強い *N. fowleri* は非検出であった。

[八木田健司、下河原理江子、小村麻子、朝倉登喜子、泉山信司、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)]

2) 国内アメーバ性脳髄膜炎症例に関する免疫組織学的再検討

これまで国内にて報告されたアメーバ性脳髄膜炎全6症例の病理組織標本について、*Naegleria fowleri* ,*Acanthamoeba* sp. ならびに *Balamuthia mandrillaris* に対する特異抗体による免疫組織学的再検討を行った。その結果、各症例における原発性アメーバ性脳病変の病原アメーバは明確に識別され、全6症例は *N. fowleri* および *Acanthamoeba sp* による感染が各1例、そしてこれまで同定が困難であった 3 例を含む 4 例が実際には *B. mandrillaris* によるものであることが判明した。*B. mandrillaris* 感染に関しては、国内におけるその生息域、分布、ヒトとの接触機会等についてほとんど解っておらず、早急な調査が必要であると考えられた。

[林 森太郎、高橋 均(新潟大学脳研究所病理学分野)、八木田健司、下河原理江子]

3) バラムチア *Balamuthia* の分離培養に関する研究

バラムチア(*Balamuthia mandrillaris*)は、*Naegleria fowleri* および *Acanthamoeba* 属アメーバと並んで、重篤、致死性の中枢神経感染症を引起す病原性アメーバである。世界的にはおよそ100 例、国内でも致死的感染例の報告がある。注意すべきは、未だにその感染源が特定されないことで、環境からの検出は国外での数例に限られる。通常のアメーバ用大腸菌塗布寒天培地では分離増殖不能なため、細胞系を栄養とした培養系が必要とされる。現在、自然環境からの分離方法を確立するために、栄養、イオン環境等の培養条件を調べており、小型原虫類を栄養とする寒天培地培養法を確立しつつある。

[八木田健司、泉山信司]

3. 組織標本を用いた包虫症鑑別法の検討

包虫症のおもな原因種は単包条虫と多包条虫の 2 種である。一般的に両種は特徴的な発育像により鑑別できる。しかし、幼虫が発育途中で自然死したり、通常とは異なる発育型(多嚢型単包虫など)を示す組織標本では両種の鑑別が困難な場合がある。PAS 反応(組織化学)や抗胚層抗体を用いる免疫染色は「包虫症」の診断には有用であるが、両種の鑑別はできない。この点が組織標本のみしか保管されていない過去の症例を調べる上での問題であった。そこでこのような組織標本につき、PCR 法を用いることで原因虫種を鑑別する方法について検討した。既報にもとづきプライマーを作製、試験感染動物由来の組織標本からテンプレート DNA を調整し、12S rDNA 領域を標的部位とした nested PCR 法を行った。その結果、多包虫から増幅があることで鑑別可能なことが示唆された。本法は包虫症の原因虫種の同定に有用な補助的方法であると考えられたので、臨床材料に加え、研究機関・検査機関に保存されている材料を対象としてさらに検索を加える予定である。

[森嶋康之・杉山 広・川中正憲・古屋宏二・土井陸雄(横浜市大医学部)]

4. 市販エキノコックス症血清診断キットの評価

北海道の多包虫症の血清検査については、これまで自家製抗原の製造・調製が可能な二三の研究・検査機関でのみ検査が実施されてきた。しかしながら最近、同症の患者が多いとされるヨーロッパからの市販キットが入手可能となり一般の臨床衛生検査所でも検査ができる状況になってきた。そこで、最近販売された多包虫症のみならず単包虫症も診断可能とするフランス製の高感度イムノブロットアッセイキットについて、北海道の患者血清材料を用いた場合の感度と免疫染色パターンを調べた。この結果を、北海道立衛生研究所が 1987 年から 1993 年の間に実施した自家製抗原によって得られた結果と比較検討し, 臨床検査的評価を行った。その結果、本キットは高感度で有用な試験法であると結論付けられた。

[古屋宏二、川中正憲, 山野公明、佐藤直樹(北大病院)本間寛(道衛研)]

5. 魚介類摂食後の食物アレルギーに関与する寄生虫アニサキスの研究:原因虫種の検討

魚介類の摂食後に発症するアレルギーは、実は魚介類に寄生するアニサキスを真の原因とする、このような知見が 1990 年頃から我が国で認知されるようになってきた。一方ヨーロッパでも、魚食量の多いスペイン・イタリアで、アニサキスアレルギーと考えられる症例が 1995 年以降多数報告されるようになってきた。その病態は我が国の症例とは異なり、多彩でしかも重症化するものが多い。病態の違いが、病因となる虫体の系統分類学上の差異に起因しているのではないかと推察し、太平洋産(日本・中国)と大西洋産(米国・スペイン)のアンコウからアニサキス *Anisakis simplex* の幼虫を得て検討を加えた。各虫体から DNA を調整し、線虫類のリボソーム DNA・ITS2 領域をターゲットとするコンセンサスなプライマーで PCR 増幅して、得られた産物の配列を解読した。その結果、増幅産物はいずれも 465bp で、配列も相互に完全に一致することが分かった。更に詳細な解析を行うため、現在 ITS1 領域等の解読を進めている。また最近アニサキスアレルゲンが精製され、アミノ酸配列・塩基配列も報告されたので、これをターゲットとした解析にも取り組む予定である。

[杉山 広、森嶋康之、川中正憲]

6. 平成15年度・依頼血清の寄生虫抗体の検査

検査は通常、酵素抗体法(DOT-ELISA)により実施した。抗原として、線虫類6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、広東住血線虫)、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 13 種類を用いた。酵素抗体法で得られた結果のみでは判断がつけがたい場合は、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をあわせて行った。本年度は 28 検体(18 人)の検査を実施し、そのうち抗体陽性が 18 件(10 人)、陰性が 10 件(8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:2件(2人)、有鉤嚢虫症:4件(3人)、旋尾線虫症:6件(1人)、日本住血吸虫症:2件(2人)、ビル

ハルツ住血吸虫症：2件（1 人）、顎口虫症：2件（1 人）であった。
[荒川京子、杉山　広、森嶋康之、川中正憲]

Ⅴ．その他

1. 国内で分離されたネグレリア病原種の病原性確認試験

国内実態調査で検出率の高かった *N. australiensis* は 16 株中 6 株（10 地域中 6 地域）が脳内接種で致死的病原性を示した。剖検マウスより再分離されたアメーバを用い、経鼻および皮下接種を行ったが、異常は認められなかった。また、他の 3 株は行動異常のみを呈する非致死的病原性を示し、感染 1 ヶ月時点でアメーバの再分離を試みたが回収できなかった。今後はさらに長期的な感染の影響を検討する予定である。*N. philippinensis* は 1 株を試験し、脳内接種で致死的病原性を確認し、剖検によりアメーバを再分離した。*N. italica* は 2 株について試験したが病原性は認められなかった。
[八木田健司、泉山信司、下河原理江子]

2. 植物由来殺貝剤の検討

1) ブタクサ由来セスキテルペンのミヤイリガイ殺滅作用

エジプト産ブタクサ（*Ambrosia maritime*）には充血吸虫の中間宿主貝である *Biomphalaria alexandria* や *Bulinus truncates* を殺滅する作用が知られており、セスキテルペンである damsin や ambrosin が分離精製されてそれぞれ 8.5 から 13.5ppm の濃度で殺滅効果があることが報告されている。我々は、同種植物から ambrosin を精製し、*Biomphalaria glabrata* とミヤイリガイ（Oncomelania nosophora）について殺滅効果を検討したところ、LC50 及び 95%信頼限界はそれぞれ 6.14 mg/L [5.04, 7.53] と 4.2 mg/L [3.5, 5.3] という結果を得た。。
[川中正憲、荒川京子、折原裕、Sameh Abou Zid（東大・薬）]

2) ブタクサ毛状根抽出物由来ポリアセチレンの殺貝活性

エジプト産ブタクサ（*Ambrosia maritime*）の毛様根からの代謝産物としてポリアセチレンである Thiarubrine A とその前駆体が知られている。これらの代謝産物にはバクテリア、真菌、ウイルス、昆虫などへ殺滅効果があることが報告されているが殺貝活性については調べられていない。そこで、Thiarubrine A の *Biomphalaria glabrata* とミヤイリガイに対する殺滅効果を検討した。また、Thiarubrine A の前駆体である Thiarubrine A diol と Thiarubrine A epoxide の *Biomphalaria glabrata* への殺滅効果についても検討している。
[川中正憲、荒川京子、折原裕、Sameh Abou Zid（東大・薬）]

Ⅵ　症例

1. 喀痰から虫卵が検出され形態と塩基配列から種同定したウェステルマン肺吸虫症の 1 例

持続性血痰を主訴とし、硬化性病変を右肺上葉に認めた外国人女性の喀痰から、肺吸虫卵が検出された。虫卵の形態を精査し、また虫卵を出発材料としてリボソーム DNA・ITS2 領域の塩基配列を解読したところ、2 倍体型ウェステルマン肺吸虫と同定できた。排卵を認める肺吸虫症例は 3 倍体型ウェステルマン肺吸虫を原因とすることが多く、本例は貴重な症例と考えられた。
[杉山　広、森嶋康之、荒川京子、川中正憲、亀岡洋祐（遺伝子資源）、鈴木雄二郎、西山秀樹（日赤和歌山医療センター呼吸器）]

Ⅶ 発表業績一覧

Ⅰ 誌上発表

1. 欧文発表

1. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani and Takuro Endo. : Occurrence and Distribution of *Naegleria* Species in Thermal Waters in Japan. J.Eukaryot. Microbiol., 514-513, 2003.

2. P.R.Hunter, Y.Andersson, C.H.Von Bonsdorff, R.M.Chalmers, E.Cifuentes, D.Deere, T. Endo, M.Kadar, T.Krogh, L.Newport, A.Prescott and W.Robertson. Surveillance and Investigation of Contamination Incidents and Waterborne outbreaks. Chapter 7. Assessing Microbial Safety of Drinking Water－Improving Approaches and Methods.World Hearth Organization, OECD , 205-236, 2003.

3. W.Koster, T.Egli, N.Ashbolt, K.Botzenhart, N.Burlion, T.Endo, P.Grimont, E.Guillot, C.Mobilat, L.Newport, M.Niemi, P.Payment A.Prescott, P.Renaud and A.Rust. Analyticl Methods for Microbiological Water Quality Testing. Chapter 8. Assessing Microbial Safety of Drinking Water－Improving Approaches and Methods. World Hearth Organization, OECD , 237-292, 2003.

4. M. Omura, R. Furushima-Shimogawara, K.Yagita, S. Izumiyama, and T. Endo: 2D-PAGE protein profiles of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* species., Ⅹth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings., pp115―123.

5. Mako OMURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO. Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE. (in preparation)

6. Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K., Ikebuchi, K., Yamauchi, M., Yamada, Y., Sato, N., Fujihara, M., Kroemer, G., Ikeda, H.: Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death In the T cell line Jurkat. Journal of Leukocyte Biology, 73, 399-406, 2003.

7. Yu, S.H., Kawanaka, M., Li, X.M., Xu, L.Q., Lan C.G., Lin.R., Epidemiological investigation on *Clonorchis sinensis* in human population in an Area of South China. Jpn. J. Infect. Dis., 56, 168-171, 2003.

8. Rangsiruji, A., Sugiyama, H., Morishima, Y., Kawanaka, M., Binchai, S. and Ketudat, P.: Genetic diversity of lung flukes in central and southern Thailand. Srinakharinwirot Univ. Sci. J. 25, 1-11, 2003.

9. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 35(Suppl. 2), 77-80, 2004.

10. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y., Arakawa, K. and Kawanaka, M.: *Paragonimus ohirai* metacercariae in crabs collected along the Arakawa River in Tokyo, Japan. J. Vet. Med. Sci. 66, 927-931, 2004.

11. Tsuchida, K., Jouni, Z.E., Gardetto, J., Kobayashi, Y., Tabunoki, H., Azuma, M., Sugiyama, H., Takada, N., Maekawa, H., Banno, Y., Fujii, H., Iwano, H., Wells, M.A.: Characterization of the carotenoid-binding protein of the Y-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. J. Insect. Physiol., 50, 363-372, 2004.

12. Haghighi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geograhic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. J. Clin. Microbiol., 41, 3748-3756.

13. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. Parasitol. Int. 52, 169-173.

14. Kawazu, S, Nozaki, T., Tsuboi, T., Nakano, Y., Komaki-Yasuda, K., Ikenoue, N., Torii, M., and Kano, S. (2003) Expression profiles of peroxiredoxin proteins of the rodent malaria parasite Plasmodium yoelii. Int. J. Parasitol. 33, 1455-1461.

15. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. Biochem. J. 375, 729-736.

16. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takecuhi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine g-lyase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histoltyica*. J. Biol. Chem. 278, 42717-42727.

17. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. J. Med. Chem. 47, 175-187.

18. Kumagai, M, Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. J. Biol. Chem. 279, 2316-2323.

19. Asahi, H. and Stadecker, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection (review). Parasitol. Internat. 52, 361-367, 2003.

20. Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger E., Hernandez, H.J. Rutitzky, L.I. and Sun, J. The immunobiology of Th1 polarization in high pathology schistosomiasis. Immunol. Rev., in press, 2004.

21. Asahi, H., Kanazawa, T., Hirayama, N., and Kajihara Y. Investigating serum factors promoting erythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. Exp. Parasitol. In press, 2004.

2. 和文発表

1. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. レジオネラ汚染とその対策. 環境技術 32(6), 29-33, 2003.

2. 黒木俊郎、宇根有美、遠藤卓郎. 爬虫類のクリプトスポリジウム感染. Jpn. J. Zoo Wildl. Med. 8(1):27-34, 2003.

3. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. レジオネラ属菌の水系感染―宿主アメーバの果たす役割. 水環境学会誌. 26(1):14-19, 2003.

4. 河野喜美子、東 美香、齊藤信弘、鈴木 泉、倉 文明、前川純子、渡辺治雄、八木田健司、遠藤卓郎. ＜特集関連情報＞循環式温泉入浴施設を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 病原性微生物検出情報. 24(2), 3-5, 2003.

5. 八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎. ＜特集関連情報＞温水環境におけるレジオネラ宿主アメーバ類. 病原性微生物検出情報. 24(2), 8-9, 2003.

6. 遠藤卓郎、八木田健司、泉山信司. 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－原虫感染症 ジアルジア症. 61（Suppl 2), 2003.

7. 佐藤直樹、内野純一、小笠原和宏、藤堂省、古屋宏二：肝エキノコックス症の病態と予防―とくに職業との関連において― 日本職業・災害医学会会誌 第 51 巻 17－23, 2003.

8. 日本原生動物学会第 36 回大会,「2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる *Naegleria fowleri* の総タンパク質の解析」,（遠藤卓郎,小村麻子,八木田健司,泉山信司,下河原理江子,中村健(北里大)）2003 年 11 月 22～24 日,抄録集,21 頁

9. 福井大祐、坂東元、小菅正夫、山口雅紀、中岡祐司、古屋宏二、村田浩一：動物園飼育カイウサギにみられたエンセファリトゾーン症の臨床および病理学的検索、日本獣医師会雑誌 第 56 巻 464－469, 2003.

10. 八木欣平、伊東拓也、山野公明、古屋宏二：2002 年、北海道で集団発生したクリプトスポリジウム症の原因となった Cryptosporidium parvum の遺伝子型について、道衛研所報、53、39－42、2003.

11. 福嶋得忍、日野隆信、後藤史子、進藤悦男、古屋宏二：牧場体験した高校生のクリプトスポリジウム症集団発生事例、千葉衛研報告、27、70－72、2003.

12. 土井陸雄、伊藤 亮、山崎 浩、森嶋康之。2003. 単包虫症―わが国における患者発生動向と対策。日本公衆衛生雑誌, 50, 1066-1076.

13. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の 1 例、Clinical Parasitol.、14、57-60、2003.

14. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、亀岡洋祐、川中正憲：幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫、獣医寄生虫学会誌、2、13-19、2003.

15. 川中正憲：イヌ・ネコ・アライグマ回虫による幼虫移行症、「動物由来感染症 その診断と対策」267-271、真興交易（株）医書出版部、2003.

16. 川中正憲：エキノコックス症、「動物由来感染症 その診断と対策」272-275、真興交易（株）医書出版部、2003.

17. 川中正憲：アニサキス、旋尾線虫幼虫、裂頭条虫、旋毛虫、肺吸虫、有鉤（嚢虫）条虫、その他淡水魚由来の寄生蠕虫、「HACCP：衛生管理計画の作成と実践 改訂データ編」226-240、中央法規出版、2003.

18. 川中正憲：国内施設で「アライグマ回虫」検出、野生化アライグマにひそむ危険、自然保護、No.474, p19, 2003.

19. 杉山 広：寄生虫. 食品衛生責任者ハンドブック 日本食品衛生協会 pp78-79, 2004.

20. 野崎智義 （2003） 赤痢アメーバのゲノムと病原遺伝子 細胞工学 第 22 巻, 11 号, 1160-1163.

21. 野崎智義 （2003） 話題の抗微生物薬をめぐって 赤痢アメーバ症 臨床と微生物 第 30 巻, 631-636.

22. 野崎智義 （2003） アメーバ赤痢 in 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、pp244-249.

23. 野崎智義 （2003） 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 in 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012.

24. 野崎智義 (2004) 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 in 今日の治療指針 医学書院 pp1098-1101.

25. 大前比呂思、朝日博子、千種雄一、松田肇、 輸入感染症としての日本住血吸虫症をどう捉えるか。Clinical Parasitology 13(1):148-150, 2002.

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

1. Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Reiko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani And Takuro Endo:Occurrence and Distribution of Naegleria Species in Thermal Waters in Japan、VIII International workshops on opprtunistic protists and the international conference on anaerobic protists (Hawaii)、2003 年 7 月

2. Shinji Izumiyama 、 Kenji Yagita 、 Rieko Furushima-Shimogawara、Tokiko Asakura、Mako Omura、Tatsuya Karasudani、Takuro Endo:Characterization of the Naegleria Isolates from Thermal Waters in Japan. Xth International conference on the biology and pathogenicity of free-living amoebae (Ciudad Obregon, Sonora, Mexico.)、October 5-10, 2003.

3. M. Omura, R. Furushima-Shimogawara, K.Yagita, S. Izumiyama, and T. Endo. 2D-PAGE protein profiles of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* species. Ⅹth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. (Ciudad Obregon, Sonora, Mexico.) October 5-10, 2003.

4. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.: A multiplex PCR for discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. The 4th Seminor on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, Bangkok, 2-4 Dec. 2003.

5. Nozaki, T. (2003) Functional characterization of a complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on pathogenesis of amebiasis: from genomics to disease Paris, May 19-21, 2003.

6. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and biochemical characterization of phosphoglycerate dehydrogenase and D-glycerate dehydrogenase of serine metabolic pathway from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28, 2003.

7. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U.., and Takahashi, Y.(2003) Molecular and biochemical characterization of iron-sulfur cluster biosynthesis in the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28, 2003.

8. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase Ⅰ from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.

9. Nozaki, T., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., Nudeshima, M., Tokumaru, F., and Saito-Nakano, Y. (2003) Functional characterization of roles of Rab7 isotypes and Rab7-binding proteins during phagocytosis. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2002.

10. Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C.D., Mann, B.J., and Nozaki, T. (2003) Proteomics analyses of phagosome proteins from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.

11. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Rab5 and Rab7 play unique roles in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. The 14th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, U.S.A., Sept 14-18, 2002.

12. Asahi, H., Ohmae, H., Sy, O.S., Tanabe, M., Matsuda, H., Kanazawa, T., Yamada, K., Kajima, J. and Ohta, N. Characteristics of specific antibodies in urine from *Schistosoma japonicum*-infected individuals. The 10th International Congress of Parasitology, August 2002.

13. Asahi, H. and Stadecker, M.J. : Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. Centenary Symposium to Celebrate the Discovery of *Schistosoma japonicum*. March 2003.

14. Asahi, H., Oke, T., Lopes da Rosa J., Williams D.L., and Stadecker M.J. Sm-p25: A new egg component stimulating T cell and antibody responses in murine schistosome infection. The 52nd annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, December 2003.

2. 国内学会

1. 八木田健司、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した ELISA による抗体価調査. 第 77 回日本感染症学会総会(福岡県・久留米)、 2003 年 4 月.

2. 朝倉登喜子、下河原理江子、八木田健司、烏谷竜哉：わが国の温水環境より初めて分離された Naegleria australiensis、環境技術研究会、2003 年 6 月.

3. 泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎、藤原正弘：紫外線照射による Giardia の不活化、環境技術研究会、2003 年 6 月.

4. Rieko Furushima-Shimogawara, Kenji Yagita, Shinji Izumiyama, Mako Omura, Tokiko Asakura and Takuro Endo. Characterization of Japanese Naegleria environmental strains by ITS sequences and several marker proteins. 弟 76 回日本生化学会大会(横浜)、2003 年 10 月.

5. 佐々木志朗、朝倉登喜子、澤田拓士、古屋宏二：関東地方におけるイヌの Encephalitozoon 感染の血清疫学的調査、日本原生動物学会第 36 回大会(東京)、2003 年 11 月.

6. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、中村健、遠藤 卓郎：2D-PAGE 及びウェスタンブロットによる Naegleria fowleri と総タンパク質の解析、日本原生動物学会第36回大会(東京)、2003 年 11 月.

7. 朝倉登喜子、八木田健司、下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎：温水環境より分離した Naegleria 属アメーバの遺伝子型別、日本原生動物学会第36回大会(東京)、2003 年 11 月.

8. 杉山 広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐：東京の荒川河川敷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、第 135 回日本獣医学会学術集会 (東京)、2003 年 4 月.

9. 杉山 広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の 1 例、第 14 回日本臨床寄生虫学会大会 2003 年 6 月、長崎

10. 杉山 広：動物由来寄生蠕虫症：幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫、平成 15 年度希少感染症診断技術研修会 2004 年 2 月、東京

11. 森嶋康之：動物由来寄生蠕虫症：エキノコックス症、平成 15 年度希少感染症診断技術研修会 2004 年 2 月、東京

12. 森嶋康之、杉山 広、川中正憲、今成敏夫、飯塚信二、青木英雄、横浜市港湾区域のドブネズミに寄生する広東住血線虫に関する調査、日本寄生虫学会東日本大会、2003.

13. 藤田 修、河津信一郎、野崎智義(2003)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及び機能について 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

14. 野崎智義、Vahab Ali、高橋康弘(2003)赤痢アメーバにおける鉄―硫黄クラスターの生合成の分子論的解析 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

15. 岡田麻美、保田友義、Barbara J. Mann、野崎智義(2003)プロテオーム解析による赤痢アメーバのファゴソームタンパク質の同定 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

16. 中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義(2003)赤痢アメーバの病原性因子の輸送に関与する EhRab7 アイソタイプにおける機能特異性 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

17. 小林正規、Ali Haghighi、野崎智義、竹内 勤(2003)無病毒性赤痢アメーバ分離株の性状解析とその病原性について 第 72 回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

18. 所 正治、浅井隆志、小林正規、竹内 勤、野崎智義(2003)トリフルオロメチオニン：メチオニンアナログを用いた赤痢アメーバ特異的殺原虫効果の解析 第 72 回日本

寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

19. 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内 勤、野崎智義(2003)赤痢アメーバファルネシル転移酵素の解析(2)第72回日本寄生虫学会大会 久留米 Mar 28-30, 2003.

20. 中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義(2003)赤痢アメーバの貪食におけるEhRab7ならびにEhRab11アイソタイプ 第 56 回日本細胞生物学会大会 大津 May 14-16, 2003.

21. 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバゲノミクス 第 11 回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.

22. 岡田麻美、Chris D. Huston, 中野由美子、Barbara Mann、野崎智義_(2002) 赤痢アメーバのファゴソームバイオジェネシス 第 11 回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.

23. 津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバの貪食の調節機構の解明 第 11 回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.

24. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase I of Entamoeba histolytica. 弟 76 回 日本生化学会大会 2003 年 10 月 15-18 日、横浜.

25. Okada, M., Huston, C., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Mann, B., and Nozaki, T. (2003) Identification of phagosomal proteins in Entamoeba histolytica. 弟 76 回 日本生化学会大会 2003 年 10 月 15-18 日、横浜.

26. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2003) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in the enteric parasitic protist Entamoeba histolytica. 弟 76 回 日本生化学会大会 2003 年 10 月 15-18 日、横浜.

27. 野崎智義, Vahab Ali, 徳本梅千代, 高橋康弘 (2003) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの同定と機能解析 弟 2 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2003 年 10 月 31 日、金沢.

28. 牧岡朝夫, 熊谷正広, 竹内 勤, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10-13 日、神戸.

29. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 繁田泰男, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバ Rab 結合分子の検索 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10-13 日、神戸.

30. 野崎智義 (2004) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝の解明と創薬 第 5 回感染症フォーラム 2004 年 1 月 19-20 日、東京.

31. 大前比呂思、朝日博子、千種雄一、松田 肇 輸入感染症としての日本住血吸虫をどう捉えるか。 第13回臨床寄生虫学会大会、2002 年 6 月.

32. 朝日博子:Detection of specific antibodies in the urine as markers of human *S. japonicum* infection. 長崎大学熱帯医学研究所共同利用研究集会 2002 年 8 月.

33. 大前比呂思、千種雄一、Orlando S. Sy, GerundioP. Portillo, 朝日博子、田辺将信、松田 肇:日本住血吸虫症における肝線維化マーカーの有用性 第 72 回日本寄生虫学会大会、2003 年 3 月.

34. 長田良雄、熊谷 貴、奈良武司、朝日博子、竹尾 暁、羽藤真理子、鈴木高史、小島荘明、太田伸生、金澤 保 住血吸虫の防御免疫機構に関する解析(シンポジウム) 第63回日本寄生虫学会 東日本支部大会、2003 年 10 月.

35. 泉山信司、朝日博子、遠藤卓郎:SYBR Green I を用いたフローサイトメトリーによるマラリア血球感染率測定 第63回日本寄生虫学会 東日本支部大会、2003 年 10 月.

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、第一室(診断病理室)、第二室（感染病理室)、第三室（実験病理室)、第四室（分子病理室）と改称され、4室体制で現在に至っている。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が、相互に密接な関係をもって活動している。

長谷川秀樹主任研究官は平成15年4月1日に第二室長に昇任した。ケースウエスタン・リザーブ大から飛梅　実を第三室研究員として平成15年7月1日付けで採用した。片野晴隆第一室室長は平成15年8月31日に米国NIHから帰国し、同年9月1日より復職した。

本年度の特徴として、平成15年の3月から東南アジアを中心に問題となったSARSについて、部内はもとより所内各部で共同して迅速に対応できた。これらの成果は翌年度にはまとまって行くであろう。また行政検査として行っているBSE確認検査で3例の陽性例を確認したが、病理免疫組織化学では1例のみ陽性となった。

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. ヒト病理検体におけるウイルス感染症に関する研究
2. 原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス8の関連
3. BCL-6陽性ヒトヘルペス8型関連固形リンパ腫の病理学的研究
4. SARSコロナウイルスに関する研究
5. 脳炎および心筋炎疾患由来の病理検体における起因ウイルスの分子生物学的検索
6. ウイルス肝炎に関する研究

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. ピコルナウイルスに関する研究
3. インフルエンザウイルスに関する研究
4. HIV/SIVに関する研究
5. HIV-1 Nefのウイルス感染性増強能に関する解析

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
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

IV. プリオンに関する研究
1. プリオン検出法
2. BSEプリオン接種サルの病理学的検索
3. わが国のBSE牛3頭の諸臓器におけるプリオン局在についての検索
4. BSEモデル動物を用いた病理学的解析
5. 異常型プリオン蛋白質の迅速な病原性解析法の開発
6. 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

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. ヒト病理検体におけるウイルス感染症に関する研究

国内外の医療並びに医学教育施設との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症について病理学的に検討している。2003年度、人体由来の検体数は103例であった。現在までにSARS 9例ほか、ヒトヘルペスウイルス1型及び8型、水痘、帯状疱疹ウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、日本脳炎ウイ

ルス等、またウイルス以外ではトキソプラズマやクロイツフェルト・ヤコブ病についても免疫組織化学的ないし分子病理学的に解析した。
（佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、飛梅　実、尾崎泰子、佐多徹太郎）

2. 原発性肺高血圧症とヒトヘルペスウイルス 8 の関連

米国のグループが原発性肺高血圧症（PPH）にカポジ肉腫の原因ウイルスとして知られるヒトヘルペスウイルス 8（HHV-8）を検出し、本疾患との関連が示唆された。われわれは日本人 PPH 症例 10 例について HHV-8 の検索を行った。その結果、免疫染色、PCR ともすべての検体において HHV-8 は陰性であった。これらの結果から、日本人 PPH 症例では HHV-8 の関与はあってもまれであることが推察された。
（片野晴隆、伊藤金次［東邦大・病理］、渋谷和俊［東邦大・病理］、佐地　勉［東邦大・小児科］、佐藤由子、佐多徹太郎）

3. BCL-6 陽性ヒトヘルペス 8 型関連固形リンパ腫の病理学的研究

ヒトヘルペスウイルス 8 型（HHV-8）感染 BCL-6 陽性 B 細胞リンパ腫の病理学的な検索を行った。リンパ腫細胞は CD20, CD45, BCL-6 陽性であり epithelial cell membrane antigen, CD30, CD45RO, CD138/syndecan-1 が陰性で germinal center B 細胞起源であることが示唆された。患者は血清学的に HHV-8 陽性で、肝臓の生検材料において PCR 法で HHV-8 陽性、免疫組織染色により HHV-8 の LANA 抗原が陽性であった。本症例は濾胞中心 B 細胞由来の HHV-8 関連リンパ腫としては初めての症例である。
（長谷川秀樹、片野晴隆、丹野正隆［JR 東京病院］、増尾茂［JR 東京病院］、阿江孝子［JR 東京病院］、佐藤由子、高橋秀宗、岩崎琢也［長崎大・熱医研］、倉田　毅、佐多徹太郎）

4. SARS コロナウイルスに関する研究

(1) SARS コロナウイルス感染動物モデルの作製

重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因である SARS コロナウイルス（SARS-CoV）の感受性動物を検討し動物モデル系を確立することを目的として、カニクイザル、マウス、ラットの SARS-CoV（HKU39849 株）感染実験を実施し、病理学的解析を行った。まずカニクイザルに経鼻、気管内、胃内、静脈内接種を試みたところ気管内接種が最も効果的で、接種 7 日目の肺で肺胞上皮にウイルス抗原が検出され、マクロファージを主体とする炎症性反応がみられた。次にマウス、ラットに経鼻接種した結果、接種 3 日目の肺、鼻腔内の上皮にウイルス抗原が検出された。ウイルスは早期に排除され、いずれの動物も SARS 発症には至らなかった。病変は肺と鼻腔内に局在したが、サルとマウスは肺胞上皮、ラットは細気管支上皮が主なウイルス抗原陽性細胞で、感染の組織内局在に相違があった。これらの動物は SARS-CoV に感受性で、種々の薬剤、ワクチンの感染阻止効果の検討が可能であり、SARS 発症機序の解明への応用が期待できる。
（永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎、森川　茂［ウイルス第一部］、西條政幸［ウイルス第一部］、板村繁之［ウイルス第三部］、西藤岳彦［ウイルス第三部］、網　康至［動物管理室］）

(2) SARS患者病理組織標本におけるウイルス核酸の局在

新興感染症である SARS において原因ウイルスである SARS-CoV 核酸の塩基配列は速やかに決定されたので、我々は新しい *in situ* Hybr AT-CSA 法を用いて SARS 患者病理組織標本における SARS ウイルスの局在を SARS-CoV 特異抗体を作製する前に明らかにすることができた。この結果は後日、SARS-CoV 特異抗体を用いた免疫組織学的方法で得られたものと一致した。
（中島典子、樋口好美［非常勤職員］、佐藤由子、佐多徹太郎）

5. 脳炎および心筋炎疾患由来の病理検体における起因ウイルスの分子生物学的検索

脳幹脳炎または心筋炎例の起因ウイルスは不明なことが多い。本年度、同症例の患者病理検体から病原体ウイルスを検索した。計 7 名の剖検例病理組織から核酸を抽出し、RT-PCR および nested-PCR 法によりウイルスゲノムを検出した。対象は、エンテロ、インフルエンザ A・B 型、C 型肝炎、パルボ B19、EB、アデノ、サイトメガロウイルスとした。その結果、1 症例（心筋）から EB およびパルボ B19 ウイルスが、1 症例（腰髄・延髄）からパルボ B19 ウイルスが、両者とも nested-PCR にて陽性であった。両者ともウイルスコピー数は極めて少なく、組織標本の免疫染色法ではウイルス抗原は検出されないことから起因ウイルスと断定はできなかった。
（尾崎泰子、笠井恵美［実習生］、中島典子、永田典代、佐藤由子、佐多徹太郎）

6. ウイルス肝炎に関する研究

(1) 世界における HBV preS 変異株の流行様式と肝疾患進展との関連

アジアを主とする世界 12 ヶ国との共同研究から、HBV preS gene 変異株の地域流行様式を分子疫学的に検討した。その結果、ベトナムでの検出率が 36%と最も高く、次いでネパール（27.3%）、ミャンマー（23.3%）、中国（22.4%）、韓国（14.3%）、タイ（10.5%）、日本（7.7%）であった。高い検出率を示したのは、いずれも HBV 浸淫地域であった。興味あるのは、これらの変異が肝疾患の進展と共に高頻度に出現する傾向が認められたことである。特に肝癌発生との関連が注目された。これらの HBV 変異株の出現は、免疫応答逃避株として宿主と共存を図っているものと思われる。
（Huy TT Tran［協力研究員］、阿部賢治）

(2) HBV ゲノタイプ C の新しい分類

アジアに流行する HBV ゲノタイプ C は、他のゲノタ

イプに属す HBV に比べて病原性が強いことが分っている。そこでアジア各国の協力を得て、ゲノタイプ C に属す HBV を分離して、その分子ウイルス学的特徴を詳細に解析した。その結果、東南アジア型と日本・韓国・中国（北部）型に大きく二つに大別できることが分った。前者を HBV C1、後者を HBV C2 と命名した。沖縄由来 HBV は、この中間に位置した。この新所見は、HBV アジア株の起源や病態・治療抵抗性との関連を考える上で重要である。
（Huy TT Tran［協力研究員］、阿部賢治）

（3）ベトナムにおける HCV variant の流行

東南アジア地域では、通常のゲノタイピング法では検出できない HCV variant がしばしば存在することが知られている。そこで 29 例のベトナム人肝疾患患者から PCR 法にて HCV の 5'-UTR～core 領域と NS5b 領域を各々分離して、塩基配列決定後、分子系統樹解析を行った。その結果、ゲノタイプ 6（或いは clade 6）に属すバリアントが 17 例（59%）に存在した。今ある多くの HCV ゲノタイピング法は、1～5 型は検出できるが、6 型はカバーしておらず、今後簡便な同定法を確立したい。
（阿部賢治、Huy TT Tran［協力研究員］）

（4）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

モスクワの小児における肝炎ウイルスおよび GBV-C の疫学的特徴を分子レベルで明らかにすることを目的とした。モスクワ市内およびその近郊に在住し、ロシア州立医大小児病院を受診した小児 183 例を対象とした。肝疾患群では、急性肝炎 90 例中 HBV 50 例（55.5%）、HCV 19 例（21%）、GBV-C 1 例（1.1%）が陽性であった。また慢性肝炎では 93 例中、HBV 72 例（77.4%）、HCV 12 例（12.9%）、GBV-C 18 例（19.4%）が陽性であった。これに対し非肝疾患群では、HBV 11 例（10.3%）、HCV 1 例（0.9%）、GBV-C 3 例（2.8%）が陽性であった。Double infection が 17 例（9.3%）、Triple infection が 2 例（1.1%）で観察された。ウイルスゲノタイプは、HBV はタイプ D が 85%と最も多く、次いでタイプ A4%と E0.8%であった。モスクワ在住の小児は、高率に血液媒介性ウイルスに感染している実態が明らかとなった。特に HBV は小児肝疾患の主要な要因であることが示された。
（早川依里子［協力研究員］、Andrei V. Smirnov［ロシア州立医大・小児感染症］、Vasily F. Uchaikin［ロシア州立医大・小児感染症］、丁　欣［協力研究員］、Huy TT Tran［協力研究員］、阿部賢治）

（5）国内の小児における HEV 感染の実態調査

小児における原因不明の急性肝炎例の中に、HEV が原因と考えられる症例が存在するかどうかを検討した。2000 年 6 月から 2002 年 5 月までに当院小児科を受診し、下痢、嘔吐などの消化器症状と肝障害が認められた症例のうち、肝障害の原因が判明している症例を除いた 47 例を対象とした。男児 21 例、女児 26 例で、採血時年齢は生後 1 か月から 15 歳までであった。GPT は 78 IU/l から 292 IU/l まで、全例 HAV、HBV、HCV、CMV、EBV の関与は否定的であった。その結果、HEV IgM 抗体が 47 例中 1 例（2.1%）で陽性であった。本症例は 2 歳 8 か月の男児で、発熱、下痢を主訴に 2002 年 2 月に当科に入院し、発熱が 3 日間、下痢が 1 週間、嘔吐が 2 日間持続し、喘息性気管支炎も合併していた。
（伊藤玲子［協力研究員］、寺澤総介［松波総合病院・小児科］、丁　欣［協力研究員］、李　天成［ウイルス第二部］、阿部賢治）

（6）沖縄県の肝疾患患者における HEV 感染の血清疫学調査

従来まれと考えられていた E 型肝炎ウイルス（HEV）感染が本邦でも多く見られる可能性が報告されている。今回、沖縄県における肝疾患例での HEV 重感染の頻度を検討した。1993 年から 1998 年までに当院で採血された肝疾患患者の保存血清 87 例（HBV 陽性 23 例、HCV 陽性 47 例、両者陽性 9 例、NANBNC 慢性肝疾患 6 例、NANBNC 急性肝疾患 2 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 法により行なった。結果は 87 例中 33 例（38%）で IgG HEV 抗体が陽性であった。うち 2 例（2.3%）は IgG および IgM HEV 抗体の両者が陽性であった。IgG HEV 抗体陽性率は HBV 陽性肝疾患では 9 例（39.1%）、HCV 陽性では 14 例（29.8%）、HBV, HCV 両者陽性では 3 例（33.3%）、NANBNC 慢性肝疾患では 3 例（50%）、NANBNC 急性肝疾患では 1 例（50%）であった。HEV 重感染率は全体で 38%と高率に見られた。
（菊地　馨［沖縄県立中部病院・消化器科］、丁　欣［協力研究員］、李　天成［ウイルス第二部］、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）免疫不全型エプスタイン・バーウイルス（EBV）関連リンパ腫の治療法に関する研究

高コレステロール血症治療薬であるスタチンが EBV で形質転換したヒト B 細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することを見いだした。スタチンは細胞接着因子である LFA-1 に結合し、EBV の癌蛋白である LMP-1 の働きを阻害することにより EBV リンパ腫細胞にアポトーシスを誘導する。スタチンの抗リンパ腫作用は免疫不全型 EBV 関連リンパ腫の動物モデルでも実証された。これによりスタチンはエイズ合併 EBV 関連リンパ腫の新たな治療薬となる可能性が示された。
（片野晴隆、Jeffrey Cohen［NIH, U.S.A.］）

（2）HCMV 粒子の細胞内輸送に関する研究

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）の細胞内輸送のメカニズムは全く不明であった。本研究ではHCMVの細胞内輸送に関わる宿主細胞の細胞骨格系を同定するため解析を行い、HCMVの細胞質内侵入後の核膜への移行が微小管に依存する過程であること、さらにHCMVカプシドが微小管に沿って局在することを蛍光抗体法およびTEM観察により初めて示した。
（後藤希代子[協力研究員]、田中恵子[流動研究員]、倉田毅、佐多徹太郎）

(3)より簡便で迅速な大腸菌内での組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ると同時に、いくつかの遺伝子をターゲットとして、実際に組換えウイルスの作製を行っている。
（田中道子、川口　寧[名大・医]、西山幸廣[名大・医]、佐多徹太郎）

2. ピコルナウイルスに関する研究

(1)ピコルナウイルスの神経病原性に関する研究

ピコルナウイルスの神経病原性機構を調べる目的で、エンテロウイルス71（EV71）と同様に手足口病の原因となるコクサッキーA16（CA16）をカニクイザルの脊髄内及び静脈内に接種した（一群３頭）。その結果、脊髄内接種群の全頭で弛緩性麻痺を発症し致死的となり、病理学組織的に脊髄、脳幹部、大脳の神経細胞におけるウイルス感染が認められた。静脈内接種群では２頭で弛緩性麻痺を発症し、脊髄の神経細胞にウイルスの感染とそれに伴う炎症が認められた。CA16の流行は髄膜炎と関連しないことが知られており、神経病原性は無いと考えられていたが、神経に侵入した場合は神経細胞でウイルスが増殖し神経病原性を発揮することが病理学的に明らかとなった。
（永田典代、佐藤由子、原嶋綾子、岩崎琢也［長崎大・熱医研］、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

ヒトポリオウイルスレセプターを導入したトランスジェニックマウスTgPVR21 鼻粘膜感染モデルを用いてポリオウイルス１型強毒Mahoney株に対する弱毒Sabin 1株の免疫効果を調べた。10^6CCID_{50}/2μl/mouseのSabin 1弱毒株を3週間隔で3回、経鼻接種し、その後10^6および10^7CCID_{50}/2μl/mouseのMahoney株の経鼻的接種による攻撃実験を試みた。免疫群と非免疫群の強毒株接種後の糞便中のウイルス排泄は免疫群であきらかに2、3日目のウイルス陽性便が減少した。また、麻痺の発症率は免疫群で有意に低かった。免疫群の感染鼻粘膜上皮では感染初期で単核細胞による強い炎症性反応が観察されることより、鼻粘膜部位におけるウイルス増殖に対する防御効果が示唆された。TgPVR21の経鼻粘膜免疫によって局所のウイルス増殖に対する防御効果が示された。この動物モデルを用いて強毒のワクチン由来ポリオウイルスに対するSabin 1 ワクチンの効果を調べることが可能である。
（永田典代､波多野煜持[非常勤職員]､原嶋綾子､佐藤由子、吉河智城[協力研究員･東大･院]､佐多徹太郎､倉田　毅、清水博之[ウイルス第二部]、網　康至[動物管理室]、須崎百合子[動物管理室]、岩崎琢也[長大・熱医研]、野本明男[東大]）

3. 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HAタンパク質に特異的に結合する合成ペプチドの感染阻害剤としての有用性を上気道感染のマウスモデルを用いて検討した。in vitro の実験において強い感染阻害効果を示した2種類の合成ペプチドを含有したリポソームを様々な濃度と投与回数とでウイルス感染後3日間経鼻投与し、上気道のウイルスの増殖阻害効果を測定したが、有意な効果は認められなかった。今後ペプチドのドラッグデリバリーシステムや中和能の向上等の基礎的な研究が必要である。
（呉培星[協力研究員・慶応大]、尾崎泰子、長谷川秀樹、佐多徹太郎）

(2)老齢マウスにおけるインフルエンザ感染後の免疫動態の研究

老齢マウスの気道粘膜免疫応答低下の背景の解明を目的とし、インフルエンザ感染もしくはワクチン経鼻接種後の粘膜局所のサイトカイン産生能について検討している。各サイトカイン（IL-2, -4, -5, -6, -10, IFN-g, TGF-b）のmRNAの発現は、TaqMan real-time PCR法により定量するため、各々のプライマーとプローブを構築し、予備実験として非感染マウスのNALTのリンパ球のサイトカインの発現を測定した。今後、本手法を用いて老齢マウスのNALTのリンパ球について検討を行う。
（浅沼秀樹[協力研究員･東海大]､尾崎泰子､佐多徹太郎）

(3)マウス鼻腔中に含まれるインフルエンザウイルス感染阻害物質の同定

感染性を持つウイルスを定量するプラークアッセイ法とウイルスゲノムコピー数を定量するreal-time PCR法でストックウイルスを定量すると､約50ゲノムコピーあたり1 PFUの感染性ウイルスが存在するが、同じウイルスをマウス鼻腔に投与し鼻腔洗浄液を測定すると感染性を持つウイルスは500ゲノムコピーあたり1PFUと減少し

た。そこで鼻腔の感染阻害物質の同定を試みた。ゲル濾過クロマトグラフィーでは非常に高分子のフラクションに阻害活性が集中し、さらにレクチン染色により糖鎖組成を調べた結果、シアル糖鎖と O-グリカンを持つ物質であった。マウス鼻腔中に含まれる感染阻害物質はムチンなどの高分子糖蛋白であることが示唆された。
（吉河智城［協力研究員・東大・院］、田村慎一［阪大・微研］、佐多徹太郎）

(4)イソロイシン経鼻接種によるインフルエンザ感染予防の研究

インフルエンザに対し安全でしかも低コストで感染を防御する方法が望まれている。その方法の一つに自然免疫を増強させ、ウイルス感染を防御する方法が考えられる。一方、leucin, isoleucine, valine 等の側鎖を持つアミノ酸は哺乳類の上皮細胞で antimicrobial peptide を誘導する事が知られている。今回我々はマウスインフルエンザモデルを用いて isoleucine, leucine を 経鼻接種したときのインフルエンザ感染の予防効果について調べた。必須アミノ酸であるイソロイシンの経鼻接種によるインフルエンザウイルスの感染予防が示された。この効果は感染価が低いほど高く antimicrobial peptide 等の自然免疫の誘導が考えられた。
（長谷川秀樹、渡邉　泉［研究生］、森山雅美［慶応大・医］、一戸猛志［研究生］、伊藤智史［研究生］、田村慎一［阪大・微研］、千葉　丈［東京理科大］、倉田　毅、佐多徹太郎）

4. HIV/SIV に関する研究

(1) SIV 脳症の *in vitro* 実験系の開発

HIV 脳症のモデルである SIV 脳症の病態を解析するために、サル神経幹細胞を用いた培養系で、アストロサイトやニューロンにおける SIV の感染動態を解析した。T 細胞向性である SIVmac239 は感染増殖しなかったが、マクロファージ向性である SIV17E-Fr は SIVmac239/316E と比べ、はるかに培養上清中の SIV p27 産生量が多く、*in vivo* での Neurovirulence がこの培養系で追試・確認できた。SIV17E-FrΔnef-GFP の感染では GFP 陽性細胞は培養上清中の SIV p27 量の増加と並行して増加していった。感染による明らかな細胞変性や細胞融解は観察されなかった。
（中島典子、岩田奈織子、高橋秀宗、佐多徹太郎）

(2) HIV-1 ゲノム RNA の発芽前後における性状変化と宿主因子の解析

発芽直後の HIV-1 粒子において、ゲノム RNA に大量のニックが生じることを見出した。サイトカイン mRNA 等の短命な mRNA 制御に共通していると推測し、RNA フラグメント化機構を調べた。双方ともに AU 配列に富む部分を中心にニックが入ることが判明し、topoisomerase I など共通する因子の制御を受けていた。さらに、フラグメント化のゲノム組換えへの影響を調べ、フラグメント化の促進によってゲノム組換えが亢進することが判明した。本研究の結果は、宿主因子による HIV-1 複製制御の解明につながると考えられた。
（高橋秀宗、前田才恵［科技団 CREST・技術員］）

(3) HIV 侵入の無細胞解析系における感染阻害剤の効果判定

HIV は Env とリセプター・コリセプターの結合・膜融合・脱殻を経て感染する。この HIV 侵入を反映する in vitro 無細胞反応解析系をこれまでに確立した。この解析系を用いて、X4 HIV の侵入阻害剤 SDF-1α、R5 HIV の侵入阻害剤 MIP-1β の効果を検討した。その結果、endocytosis による非特異的侵入ではなく、Env とリセプター・コリセプターの結合を介する特異的侵入を、X4 HIV/R5 HIV 特異的に、侵入阻止剤 SDF-1α, MIP-1β の阻害効果を細胞感染系と一致した強弱で識別できる、ことを示した。
（小島朝人、原田貴之［協力研究員・現阪大・医］、佐多徹太郎）

(4) HIV-1 の逆転写酵素を阻害する抗体の遺伝子を使った治療技術の開発

HIV-1 の逆転写酵素（RT）を阻害する新たなモノクローナル抗体を作製した。RT の p66 サブユニットを発現するプラスミドをマウスに投与し DNA 免疫した。その結果、誘導された RT 特異的な血清抗体中に、既に報告した RT 阻害モノクローナル抗体 7C4 と競合的に結合する抗-RT 抗体の存在が判明したことから、抗血清による RT 阻害可能性を示した。そこで、この競合的 RT 結合性をもつモノクローナル抗体を作製した。現在、特異性、RT 阻害活性を解析している。DNA 免疫法は抗原蛋白免疫法と比べ阻害抗体が高い効率で誘導できると考えられる。
（大場浩美［協力研究員］、千葉 丈［東京理科大］、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

HIV-1 はスフィンゴミエリン（SM）・コレステロール含量が細胞膜より高く、膜の特定部位から発芽する。一方、HIV-1 Nef は膜の脂質ラフト微小領域でチロシンリン酸化を正に制御すること、HIV-1 感染のコレステロール要求性等を報告してきた。そこで、脂質ラフト主成分 SM の無毒化プローブを開発した。これを用い細胞膜 SM を集合させると、7 回膜貫通受容体下流に位置する GTP 結合蛋白質を経由して細胞は活性化されることが示唆された。HIV-1 感染がこれらプローブで制御可能か否か検討したところ、プローブの脂質親和性が無毒化で低下する事が判明した。親和性を保持した無毒プローブの開発が必要であろう。
（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

これまでに我々は系統樹解析によりガーナ株 HIV-1 プ

ロテアーゼ遺伝子（PR）がサブタイプ B・D・F 及び C から離れたところにクラスターを形成し、A・G または A/G のグループに属することを明らかにした。さらに、サブタイプ B 用にデザインされ臨床応用されてきたプロテアーゼ阻害剤（PI）に対して、ガーナ型 PR が低感受性を示す可能性を示唆した。今回実際に、患者由来 PR 組換え型 HIV-1 の薬剤感受性試験を 6 種類の PI を用いて行った結果、程度の差はあるものの薬剤によっては、ほぼ全てのガーナ株 PR で薬剤感受性が低下していることが明らかになった。このガーナ株 PR の PI 低感受性は、サブタイプ B との PR 立体構造の違い及び PR-PI 結合様式の違いからも示唆された。
（徳永研三､木ノ本正信［研究生］、Regina Appiah-Opong、Nicholas Nii-Trebi［ガーナ野口研］、横山　勝［遺伝子解析室］、佐藤裕徳［遺伝子解析室］、佐多徹太郎）

(7) 高いシンシチウム形成能を規定する HIV-1 Env 領域の同定

HIV-1 持続感染 L-2 細胞株は融合活性の高い HIV-1 を産生する。我々は、この L-2 細胞株より得られたプロウイルス DNA クローン pL2 及びその親株である pLAI と pNL4-3 との組換えまたは点変異導入によって、Env gp41 の 36 番目のアミノ酸が高融合活性の決定部位（NL 型：G、L2/LAI 型：D）であることを明らかにした。定量的ウイルス結合テスト及び融合テストを行ったところ、36 番目のアミノ酸が L2/LAI 型である D に変わった場合、結合能でなく融合能が高まることが明らかになった。また、立体構造解析により、36 番目のアミノ酸の違いによる融合効率の違いの原因を予測することができた。
（木ノ本正信［研究生］、横山　勝［遺伝子解析室］、佐藤裕徳［遺伝子解析室］、生田和良［阪大・微研］、佐多徹太郎、徳永研三）

(8) HGV のエイズ発症遅延機構の解明に関する研究

G 型肝炎ウイルス（HGV）感染 HIV/AIDS 患者における AIDS 発症遅延の原因を探るため、in vitro での HGV 感染実験系の確立を目指して、HGV 遺伝子のクローニングを行った。血清中ウイルス RNA の RT-PCR により得られた PCR 産物 12 断片を乗換え PCR で連結させる手法を取り、T7 プロモーターを有する発現ベクターに挿入して全長 HGV DNA を構築した。各断片増幅時の PCR エラーによる変異部分は点変異導入法により全修復した。In vitro 転写による RNA レプリコンの 293T 細胞への導入によってウイルス産生を試みた。RT-PCR によるウイルス RNA の検出は可能であったが、蛋白レベルでの確認はできなかったことから今後更に遺伝子発現を増強すべく発現系の改良を行う必要性が求められた。
（徳永研三、阿部賢治、佐多徹太郎）

(9) APOBEC3F による HIV-1 の複製阻害

細胞性因子 APOBEC3G が HIV-1 の逆転写時に G→A 高頻度変異を誘導することにより感染性を低下させ、その活性は HIV-1 Vif 蛋白によって阻害されることが先頃報告されたが、今回我々は他の APOBEC ファミリー（3A から 3F まで）の機能検索を行った。その結果、APOBEC3F も同様の活性を有し、3G 同様に Vif によるプロテオソーム分解促進によって不活化され、ウイルス粒子中への APOBEC3F の取り込みが減少することを見出した。
（Yong-Hui Zheng［UCSF, USA］､徳永研三、佐多徹太郎、B Matija Paterlin［UCSF, USA］）

5. HIV-1 Nef のウイルス感染性増強能に関する解析

HIV-1Nef によるウイルス感染性増強機序を解明するため、ウイルス粒子の標的細胞上での融合部位の感染価に与える影響について解析した。VSV-G を持ったシュードタイプウイルスでは Nef によるウイルスの感染性増強は認められない。また、酸性条件下で VSV-G シュードタイプウイルスを細胞膜上で融合させた場合でも Nef によるウイルスの感染性増強は認められなかった。さらに数種のエンドサイトーシスの経路を経由する他ウイルスの Env について検討したところ、Nef によるウイルス感染性増強を示すものが認められた。これらより、Nef によるウイルス感染性増強能は膜融合部位に規定されないことが明らかとなった。（飛梅　実、佐多徹太郎）

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 H5N1 インフルエンザ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アジュバントと共に BALB/c マウスに経鼻または皮下投与し、免疫応答性を検討した。その結果、経鼻免疫では鼻腔洗浄液中に IgA が、血清中に IgG が誘導された。一方、皮下接種では IgA は誘導されないが、血中および鼻腔洗浄液に IgG が検出された。そこで、様々なアジュバントと共に免疫したマウスに致死量の強毒型 H5N1 ウイルス株のチャレンジ感染をおこない防御効果の比較を行っている。さらに、そのメカニズムの違いについても検討を加える予定である。
（尾崎泰子､長谷川秀樹､板村繁之［ウイルス第三部］､佐多徹太郎）

(2) 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 の粘膜輸送能に欠損のある pIgR 欠損マウスと野生型マウスを用いて、異なる抗原性（B/Victoria および B/Yamagata 系統）を持つ 5 株の B 型インフルエンザウイルスの感染免疫、または各ワクチンの経鼻免疫を行い、両系統株に対する交叉防御効果を比較した。野

生型マウスでは、感染・ワクチン免疫とも同じ系統株に対してのみならず別系統の株に対しても交叉性のある IgA が鼻腔に誘導された。野生マウスでみられた交叉感染防御能は pIgR 欠損マウスでは著しく低下し、鼻腔の IgA 抗体価とウイルス価には強い負の相関がみられた。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 が重要であることが示唆された。
（尾崎泰子、田村慎一[阪大・微研]、佐多徹太郎）

(3) 新しい粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発

自然免疫系を刺激する TLR のリガンドを用いた新しい粘膜ワクチンアジュバントの開発を行った。HA ワクチンと共に TLR のリガンドである合成二重鎖 RNA を経鼻免疫することにより気道粘膜に交叉反応性の高い分泌型 IgA 抗体を誘導できることが明らかとなった。このリガンドはマウスへの脳内接種の実験から安全性にも優れていることが示され、ヒトでの実用化を念頭に置いた粘膜ワクチンの強力なアジュバントに成りえる可能性があると考えられる。
（長谷川秀樹、一戸猛志[研究生]、渡邉 泉[研究生]、伊藤智史[研究生]、千葉 丈[東京理科大]、田村慎一[阪大・微研]、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

我が国の LC16m8 ワクチン株（m8）を分子遺伝学的に検討した。m8 株が WHO 痘瘡根絶採用株（Lister 株:LO）から弱毒 LC16mO 株（mO）を経て樹立された過程を 3 株全ゲノム塩基配列で比較した。LO 株は 50 塩基に 1 箇所の頻度で多型が観察され、多様なウイルス混合株であることが示された。mO 株は、LO 遺伝子亜型の 1 つから派生した可能性が示された。一方、mO 株と m8 株は相同性が高く、約 190 kbp 全ゲノムの僅か 6 箇所の 1 塩基置換しか差異は検出されず、アミノ酸置換を伴う変異は 3 箇所に過ぎなかった。唯一、終止コドン生成による遺伝子欠失が B5R エンベロープ遺伝子にマップされた。
（国立ガンセンター研:崎山博士, 吉田博士との共同実験）
（小島朝人、長谷川秀樹、尾崎泰子）

3. 日本脳炎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

製造上も安全なウイルス不使用次世代ワクチン開発のため、昨年度 JEV cDNA 高発現 J12#26 細胞株の無血清培地馴化細胞 J12#26SF の樹立に成功し、その性状・抗原産生量は親細胞と同等である事ことを示した。そこでゲノムに挿入された JEV cDNA をサザンハイブリダイゼーションで検討したところ、馴化前後或いは継代に拘わらず同等に検出され、本細胞株安定性の遺伝子的背景を示した。精製 J12#26 抗原を不活化処理等せず、現行ワクチン検定法に準じ抗原性・免疫原性を検討した結果、現行ワクチンと同等或いは高い中和抗体価を誘導し、JEV 北京株の腹腔内感染攻撃に対して抗原免疫マウスは 100%の感染防御効果を示した。
（小島朝人、武藤栄次[研究生]、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）

4. 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

昨年度にひきつづき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検討した。海外で用いられているワクチン 1 株と日本のワクチン 2 株およびワクチン由来の継代株、そして患者由来の臨床分離株 2 株の合計 6 株の神経毒力をラットで比較した。乳のみラット一匹あたり 10^2PFU/10μl を脳内接種し、接種後 3、6、9 日目の脳乳剤におけるウイルス量測定と 3、6、9、30 日目に病理組織学的検索を実施した。その結果、患者由来の 2 株およびワクチン株を数代継代したワクチン由来株を接種した群のラット脳組織において有意なウイルス増殖と病変の発現がみられた。ウイルスの感染は、接種後 6 日目の脳室上衣細胞と脈絡膜細胞におけるウイルス抗原の検出によって確認され、病変部に一致して炎症が惹起されていた。接種後 30 日目には野外株を接種した群において重度の脳室拡張がみられた。以上から弱毒生ワクチン株と患者分離株および継代を重ねたワクチン由来株との間で病理学的な差がみられた。また、海外で用いられているワクチン株と日本で使われているワクチン株の弱毒化は乳のみラットにおいて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[ウイルス第三部]、荻野倫子[ウイルス第三部]）

5. 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 Sabin 1 株の *in vivo* における免疫原性を明らかにするためにヒトポリオウイルスレセプターhPVR 導入トランスジェニックマウス TgPVR21 を用いて免疫—攻撃実験を実施した。今回は、不活化ポリオワクチン（IPV）の皮下接種による免疫の他に、経鼻接種による粘膜免疫の誘導を試み、抗体誘導と発症防御について比較した。TgPVR21 において IPV の 3 回皮下接種により血清中のポリオウイルス特異 IgG 抗体と中和抗体が誘導されたが、IgA の誘導は見られなかった。一方、IPV の経鼻接種では 40%で IgA の誘導が認められ、IPV にアジュバントとして CTB* を加えた場合では 60%で IgA の誘導があった。また鼻腔分泌液中に IgA の誘導が経鼻免疫によって認められた。さらに強毒株の経鼻感染をおこない麻痺発症の防御効果を検討したところ、IPV 皮下免疫群および CTB*添加 IPV 経鼻免疫群で

十分な防御効果が認められた。
（永田典代、波多野煜持[非常勤職員]、原嶋綾子、岩崎琢也[長崎大・熱医研]）

Ⅳ．プリオンに関する研究

1．プリオン検出法

2003 年度には 3 例の BSE 陽性例があり、食肉衛生検査所の協力で 1 例のほぼ全身の臓器組織について検討できた。また確認試験にかかる時間を短縮することを目的に、MW 装置を使用しての標本作製、染色条件などを検討した。現在は 1 日半かかるが、この方法だと検査受付日の夕方には結果が判明し、検出感度も同様であった。正式な確認検査法とするべく、検討をつづけている。
（佐藤由子、佐多徹太郎）

2．BSE プリオン接種サルの病理学的検索

vCJD の動物モデル作成を目的として、国内 BSE 牛の脳乳剤をカニクイザルに経胃あるいは腹腔内投与した。サルは接種後 3、6、12～24、24 ヶ月以降で解剖し全身諸臓器の組織病理、プリオンの局在を検索する予定で、現在まで接種後 3、6 ヶ月のサルを解剖した。これらのサルの諸臓器には肉眼的、組織学的変化は認められず、免疫染色でもプリオンも検出されなかった。
（岩田奈織子、佐藤由子、樋口好美[非常勤職員]、小野文子[予防衛生協会]、佐多徹太郎）

3．わが国の BSE 牛 3 頭の諸臓器におけるプリオン局在についての検索

日本国内で BSE と診断された牛 3 頭の中枢神経系を含む諸臓器を病理学的に検索し、プリオンの局在を調べ BSE の病理像について検討を行った。3 頭の脳では神経細胞の空胞変性、神経網の海綿状変化は認められなかった。3 頭とも線条体、視床、延髄迷走神経背側核等の神経細胞にプリオンが免疫染色により検出された。また脊髄でも 3 頭ともほぼ全長にわたって腹角、背角の神経細胞、神経線維および脊髄背根神経節の衛星細胞にプリオンが検出された。中枢神経系以外の組織では 1 頭のみに回腸遠位端のアウエルバッハ神経叢の神経細胞にプリオンが検出された。パイエル板やリンパ節、リンパ装置には検出されなかった。日本で発見された BSE 牛も回腸末端の特定危険部位にプリオンが局在していることが確認された。
（岩田奈織子、佐藤由子、樋口好美[非常勤職員]、佐多徹太郎）

4．BSE モデル動物を用いた病理学的解析

ウシプリオンの大量発現による診断技術の高感度化、病態病理の解析を最終目的としてウシプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスを作成し解析した。BSE 脳を含む複数サンプルのプリオン遺伝子シークエンスを行い、ホルスタインプリオン cDNA を選出した。発現ベクターによって培養細胞での発現を確認したため、マウスプリオンノックアウトマウスを作成した。ウシプリオン発現マウスプリオンノックアウトマウスのウシプリオン蛋白発現は免疫染色によって確認した。大脳および、脊髄の神経細胞、脾臓の 2 次濾胞中心部に特に強い発現を認めた。

一方プリオン病の患者脊髄液中において 14-3-3 蛋白のガンマアイソタイプが 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 蛋白をウエスタンブロットによって定量し、脳細胞の破壊状況を推測した。
（高橋秀宗、飛梅　実、前田才恵[科技団 CREST・技術員]、松田潤一郎[獣医科学部]、佐多徹太郎）

5．異常型プリオン蛋白質の迅速な病原性解析法の開発

BSE 等を引き起こす異常型プリオン蛋白質の病原性を迅速に診断するため、プリオンノックアウトマウスより神経幹細胞を分離、樹立した。また、さまざまな動物種由来の異常型プリオン蛋白質に対応するため、レンチウイルスベクターを用いてプリオン遺伝子を導入する系を確立した。レンチウイルスによりプリオン遺伝子を導入された神経幹細胞は成長因子添加によりニューロン等に分化することが確認された。試験管内で今回樹立した細胞を用いて異常型プリオン蛋白質を増幅後、マウスに導入することで迅速に病原性を評価できると期待される。
（飛梅　実、高橋秀宗、佐多徹太郎）

6．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し、マウスを用いたプリオン病発症実験を行い、脳と脾のPrP^{SC}の局在を観察した。その結果、BSE乳剤を脳内接種後、プリオン病を発症したB6マウスの脳幹白質の神経線維と大脳皮質およびB細胞領域の濾胞中心にPrP^{SC}の存在を認めた。T細胞領域あるいは赤脾髄では陰性であった。これらの結果は前年度に検索したPrP^{C}の局在と相関した。また、脾におけるPrP^{SC}陽性細胞のCD分類を試みたが、蟻酸処理済みパラフィン切片では抗体の使用は不可能であった。
（永田典代、原嶋綾子、佐藤由子、長谷川秀樹、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 15 年度も順調に運用された。今年度はプロジェクトが開始されてから丸 10 年を迎え、電子顕微鏡を入れ替えることになった。8 月に S-5000 を撤去、9 月に S-5200 を設置した。今までより低培率での観察範囲が 250 倍か

らが 60 倍からに広がった。また、元素分析装置も Kevex から堀場製に入れ替えた。今まではドライタイプであったが、新装置は測定時にのみ液体窒素を使用する。本年度中に処理した検体数は 104 検体で、その内訳は感染研内部 55 検体、外部との共同研究 35 検体、外部のみ 14 検体であった。（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 15 年度は 24 件の申請を受け付けた。うちネガテイブ染色は 49 検体で、Sapo virus や HPV の VLP、培養上清中の HCV 等であった。エポン包埋は 26 検体でブロック数は 169 個となり、SRV Type D や HPV 感染細胞等である。感染病理部、ウイルス第一部、第二部、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。うち 1 枚の写真が J Virol の表紙に採用された。本年度から各利用者に消耗品代を請求した。
（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

平成 15 年度の総依頼件数は 19 件であり、透過電子顕微鏡利用は 16 件、走査電子顕微鏡は 4 件であった。依頼者は感染病理部の他、細菌第二部、ウイルス第一部、ウイルス第二部、ウイルス第三部、エイズ研究センターであった。昨年度に比べてさらに増加し、電子顕微鏡写真の利用率（投稿論文、写真提供など）も増加した。11 月からより解像度の高い新しい走査電子顕微鏡の利用も可能となった。透過電子顕微鏡標本作製の技術は利用者の協力もあり向上した。また、今年度から戸山庁舎と同様に消耗品にかかる費用の請求を行うようになった。
（波多野煜持[非常勤職員]、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 感染予防に関する研究	佐多徹太郎
	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	ウイルス感染によるヒトがん発病機構の解明と予防・治療に関する研究	佐多徹太郎
	厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業	HAART 時代の日和見合併症に関する研究	安岡 彰（富山医科薬科大学）
	厚生労働科学研究費 新興再興感染症研究事業	インフルエンザ脳症の発症因子の解明と治療及び予防方法の確立に関する研究	森島恒雄（岡山大学）
	厚生労働科学研究費 医薬品等医療技術リスク評価研究事業	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	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	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	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
	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	本多三男
	厚生労働科学研究費 難治性疾患対策研究事業	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 食品安全確保研究事業	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
	厚生労働省 国際医療協力研究委託費	HIV-1 ガーナ株の薬剤感受性試験とモニタリング法の構築	岡 慎一（国立国際医療ｾﾝﾀｰ）
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
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 食品安全確保研究事業	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
	創薬等ﾋｭｰﾏﾝｻｲｴﾝｽ総合研究事業	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行（併任研究員）
長谷川秀樹	文部科学省 原子力試験研究費	放射線に対する細胞内センサーと生体防御に関する研究	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 特別研究事業	食肉に由来する E 型肝炎ウイルスのリスク評価に関する研究	宮村達男
	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（国立国際医療ｾﾝﾀｰ）
	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）
徳永研三	文部科学省科学研究費 基盤研究(C)(2)	HIV-1 ガーナ株のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性の検索	徳永研三
中島典子	厚生労働科学研究費 エイズ対策研究事業	HIV 感染予防に関する研究	佐多徹太郎
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
田中道子	文部科学省科学研究費 若手研究(B)	より迅速で簡便な大腸菌内での組換え単純ヘルペスウイルス作製法の確立	田中道子

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
	調査	JICA ガーナ野口研感染症プロジェクト終了時調査団長	2003.7.17-7.31
	共同研究	HS 日本-タイ共同 HIV ワクチンプロジェクト研究	2003.11.14-11.17
	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
片野晴隆	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
高橋秀宗	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
徳永研三	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
長谷川秀樹	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
	研修	平成 15 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）	2004.2.17
中島典子	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1
田中道子	研修	第 10 回エイズ国際研修講師（国立感染研・JICA）	2003.12.1

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	後藤希代子	ヒトヘルペスウイルスの研究
	流動研究員	田中恵子	ウイルス感染の電子顕微鏡による解析
	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	加藤敏彦	ヒトパピローマウイルスの病理学的研究
	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	柏瀬光寿	ヘルペスウイルスの眼疾患のウイルス病理学的研究
	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
	協力研究員	澤田　靖	BSE 確認検査技術向上のため
	協力研究員	加藤啓子	BSE 確認検査技術向上のため
	協力研究員	岩本百合子	BSE 確認検査技術向上のため
	協力研究員	服部俊治	プリオン病診断に関する研究
	協力研究員	牛木祐子	プリオン病診断に関する研究
	協力研究員	山本卓司	プリオン病診断に関する研究
	実習生	笠井恵美	ヒト感染症の病理学的検討
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関する研究
	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関する研究
	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関する研究
	協力研究員	清川悦子	HIV 感染における膜脂質の役割に関する研究
	協力研究員	勇　史行	ウイルス遺伝子機能解析に関する研究
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
	協力研究員	庄谷祐子	HIV-1 の複製過程の解析
	研究生	高山三和	抗プリオン抗体の開発
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
徳永研三	研究生	木ノ本正信	高いシンシチウム形成能を規定する Env 領域の同定
	協力研究員	Nicholas Nii-Trebi	HIV 薬剤耐性試験法の開発
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	枝元良広	肝炎ウイルスと肝癌発生の関連に関する研究
	協力研究員	中島　旭	感染症領域における新しい遺伝子診断法の開発と応用
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	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
	協力研究員	呉　培星	インフルエンザウイルス感染阻害剤の開発

Ⅹ．検査業務等への参加状況

1．検定検査

神経毒力試験

本年度は依頼がなく実施しなかった。

2．行政検査

本年度も引き続き BSE 確認試験（病理、免疫組織化学染色）を行った。ホルマリン固定されたウシ延髄組織計 11 検体を受付けた。うち 2 例の陽性例（1 例はウエスタンブロット法のみ）がみつかった。

（樋口好美[非常勤職員]、佐藤由子、長谷川秀樹、岩田奈緒子、田中道子、中島典子、飛梅　実、高橋秀宗、片野晴隆、永田典代、佐多徹太郎）

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

1．欧文発表

1) 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 of T-cell-rich paracortex in lymph nodes. J Virol 77: 4169-4180, 2003.
2) Takakuwa H, Goshima F, Nozawa N, Yoshikawa T, Kimata H, Nakao A, Nawa A, Kurata, T, Sata T, Nishiyama Y: Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice. Arch Virol 148: 813-825, 2003.
3) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N: Rapid Tumor Formation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cell Lines in Novel NOD-SCID/gammac(null) Mice: Suppression by an Inhibitor against NF-kappaB. J Virol 77: 5286-5294, 2003.
4) Kimata H, Takakuwa H, Goshima F, Teshigawara O, Nakao A, Kurata T, Sata T, Nishiyama Y: Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-compettent herpes simplex viruses. Hepato-Gastroenterology 50: 961-966, 2003.
5) Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Morisihi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T: Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. J Virol 77: 8541-8547, 2003.
6) Izumi Y, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Sata T, Yamamoto N, Honda M: Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus DIs expressing simian immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic simian-human immunodeficiency virus in monkeys. J Virol 77: 13248-13256, 2003.
7) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T, the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan: Atypical protease resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23 month old Holstein steer. Jpn J Infect Dis 56: 221-222, 2003.
8) Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, Takeda M, Tashiro M: Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. Virus Res 94: 11-16, 2003.
9) Shibayama K, Kamachi K, Nagata N, Yagi T, Nada T, Doi Y, Shibata N, Yokoyama K, Yamane K, Kato H, Iinuma Y, Arakawa Y: A novel apoptosis-inducing protein from Helicobacter pylori. Mol Microbiol 47: 443-451, 2003.
10) Nakajima N, Ionescu P, Sato Y, Hashimoto M, Kuroita T, Takahashi H, Yoshikura H, Sata T: in situ hybridization AT-tailing with catalyzed signal amplification and specific in situ detection of human immunodeficiency virus-1 mRNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 162: 381-389, 2003.
11) Nakajima N, Asahi-Ozaki Y, Nagata N, Sata Y, Dizon F, Paladin FJ, Olveda RM, Odagiri T, Tashiro M, Sata T: SARS Coronavirus-infected cells in lung detected by new in sitru hybridization technique. Jpn J Infect Dis 56: 139-141, 2003.
12) Ito R, Asahi-Ozaki Y, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Suzuki Y, Inoue R, Morishima T, Kondo N, Sata T, Kurata T, Tamura S: Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. Vaccine 21: 2362-2371, 2003.
13) Yamamoto Y, Teruya K, Katano H, Niino H, Yasuoka A, Kimura S, Oka S: Rapidly progressive human herpesvirus 8-associated solid anaplastic lymphoma in a patient with AIDS--associated Kaposi sarcoma. Leuk Lymphoma 44: 1631-1633, 2003.
14) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Tetsuka T, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T and Fujii M: Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Interacts with Human Myeloid Cell Nuclear Differentiation Antigen Induced by Interferon alpha. Virus Genes 27: 237-247, 2003.
15) Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, and Kawaguchi Y: Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type I: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. J Virol 77: 1382-1391, 2003.
16) Kawaguchi Y, Kato K, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, and Yamanashi Y: Conserved protein kinases encoded by herpesviruses and cellular protein kinase cdc2 target the same phosphorylation site in eukaryotic elongation factor 1δ. J Virol 77: 2359-2368, 2003.
17) Inoue S, Sato Y, Hasegawa H, Noguchi A, Yamada A, Kurata T, Iwasaki T. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific antirabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. Pathol Int 53: 525-33, 2003.
18) Watanabe I, Ross TM, Tamura S, Ichinohe T, Ito S, Takahashi H, SawaH, Chiba J, Kurata T, SataT, HasegawaH* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. Vaccine 21: 4532-4538, 2003.
19) Richardson RM, Tokunaga K, Marjoram R, Sata T, and Snyderman R: Interleukin-8 cross-desensitizes cellular responses to both CCR5 and CXCR4 but inhibits HIV-1 infection only to CCR5: role of receptor cross-internalization and signal strength. J Biol Chem 278: 15867-15873, 2003.

20) Kojima A, Yasuda A, Asanuma H, Ishikawa T, Takamizawa A, Yasui K, Kurata T: Stable high-producer cell clone expressing virus-like particles of the Japanese encephalitis virus E protein for a second-generation subunit vaccine. J Virol 77: 8745-8755, 2003.
21) Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K: Impaired processing and presentation of cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 78: 1324-1332, 2004.
22) Matsuoka T, Katoh K, Hoshino N, Matsunaga T, Saito N, Suzuki K, Yamada M, Shimojo N, Kono Y, Arai T, Suzuki K: Disorganization of actin polymerization in neutrophilis of a patient with leukocyte adhesion dysfunction: A bioimaging aanalysis using a polarized microscopic system LC-Pol scope. Bioimages 11: 105-114, 2003.
23) Hirano M, Ding X, Huy T-T Tran, Li T-C, Takeda N, Sata T, Nakamura S, 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 Infec Dis 56: 8-11, 2003.
24) Hirano M, Ding X, Li T-C, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Sata T, Watanabe H, Abe K: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. Hepatol Res 27: 1-5, 2003.
25) Ding X, Gu H, Zhong Z-H, Zilong X, Huy T-T Tran, Iwaki Y, Li T-C, Sata T, Abe K: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. Jpn J Infec Dis 56: 19-22, 2003.
26) Huy T-T Tran, Ushijima H, Trinh Thi Ngoc, Hayashi S, Sata T, Abe K: Recombination of genotypes B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. Jpn J Infec Dis 56: 35-37, 2003.
27) Abe K, Kiuchi T, Aiba N, Huy T-T Tran, Ding X, Yamaguchi M, Sata T, Tanaka K: Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from two infants with fulminant hepatitis. Jpn J Infec Dis 56: 38-39, 2003.
28) Aiba N, Nishimura H, Arakawa Y, Abe K: Complete nucleotide sequence and phylogenetic analyses of hepatitis B virus isolated from two pileated gibbons. Virus Genes 27: 219-226, 2003.
29) Ding X, Li T-C, Hayashi S, Masaki N, Tran TT Huy, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan Hepatol Res 27: 169-173, 2003
30) Moriyama M, Mikuni M, Longren W, Zi-Yi Z, Xueqing W, Oshiro S, Matsumura H, Aoki H, Ichijima S, Iwasaki H, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y: Epidemiology of SEN virus infection among patients with hepatitis B and C in China. Hepatol Res 27: 174-180, 2003
31) Tran TT Huy, Ushijima H, Khin Maung Win, Pairoj Luengrojanakul, Pradeep Krishna Shrestha, Gu H, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K: High prevalence of the hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotypes and chronicity. J Clin Microbiol 41: 5449-5455, 2003
32) Shoya Y, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Ueno T, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sata T, Kurata T, Hall WW, Cullen BR, Takahashi H: Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci USA 100: 8442-8447, 2003.
33) Abe K: Direct PCR from serum - application to viral genome detection. In: JMS Bartlett and D Stirling eds. “PCR protocols”, New Jersey, USA, Humana press, 2003, pp161-166.
34) Tobiume M, Lineberger JE, Lundquist CA, Miller MD, Aiken C: Nef does not affect the efficiency of human immunodeficiency virus type 1 fusion with target cells. J Virol 77: 10645-10650, 2003.

2. 和文発表

1) 佐多徹太郎、島崎加恵、佐藤由子、倉田　毅：ウイルス性出血熱．日本臨床 61(sppl) : 281-287, 2003.
2) 島崎加恵、佐藤由子、倉田　毅、佐多徹太郎：ウイルス性出血熱の病理．病理と臨床 21: 94-101, 2003.
3) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎：ヒトヘルペスウイルス８（HHV-8）．病理と臨床 21: 102-109, 2003.
4) 佐多徹太郎、倉田　毅：新興・再興感染症．病理と臨床 21: 2-8, 2003.
5) 佐多徹太郎：ウイルス感染症の病理診断．眼科診療プラクテイス．文光堂、6: 110-112, 2003.
6) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．総合臨床 52: 1236-1240, 2003.
7) 中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎： ウイルス感染症の診断．ビジュアル皮膚科学 2: 167-173, 2003.
8) 永田典代、佐多徹太郎：ウマ脳炎．動物由来感染症―その診断と対策―．真興交易医書出版, 2003, pp83-87.
9) 佐多徹太郎：鼻疽、類鼻疽．動物由来感染症－その診断と対策－．真興交易医書出版, 2003, pp196-198.
10) 高橋秀宗、佐多徹太郎：プリオン病．化学療法の領域 19: 778-783, 2003.
11) 高橋秀宗、佐多徹太郎：クロイツフェルド-ヤコブ病．検査と技術 31: 392-3396, 2003.
12) 佐多徹太郎、森石永子：アデノウイルス．電子顕微鏡ウイルス学、畑中正一編、朝倉書店、2003, pp48-55.
13) 片野晴隆、佐多徹太郎：ヒトヘルペスウイルス８：腫瘍性疾患との関連．Molecular Medicine 40: 896-903, 2003.
14) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．Molecular Medicine 40: 912-917, 2003.
15) 佐多徹太郎、永田典代：重症急性呼吸器症候群 (SARS) ．診断病理 20: 197-204, 2003.
16) 高橋秀宗、佐多徹太郎：プリオン病．感染症字典．感染研学友会編、朝倉書店、2003.
17) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．感染症字典．感染研学友会編、朝倉書店、2003.

18) 佐多徹太郎、永田典代、中島典子、佐藤由子、長谷川秀樹、熊坂利夫：SARS ウイルスと SARS の病理．日本胸部臨床 62: 796-803, 2003.
19) 高橋秀宗、佐多徹太郎：プリオン病、狂牛病、医原性クロイツフェルト・ヤコブ病の教えるもの．日本内科学会誌 92: 123-129, 2003.
20) 岩崎琢也、清水博之、永田典代：エンテロウイルス 71. 病理と臨床臨時増刊号、感染症－病態と病理診断へのアプローチ 21: 110-114, 2003.
21) 片野晴隆、佐藤由子、佐多徹太郎：ヒトヘルペスウイルス８（HHV-8）．新興・再興感染症、輸入感染症の臨床と病理、病理と臨床（増刊号）、感染症 21: 44-54, 2003.
22) 片野晴隆：ヒトヘルペスウイルス８の感染病理．ウイルス 53: 95-102, 2003.
23) 中島典子：グラム染色. 小児科研修医ノート、診断と治療社, 2003, pp316-318.
24) 中島典子：ΔTth polymerase を用いた新しい in situ 核酸検出法－in situ hybridization AT-tailing (ISH-AT)法－によるホルマリン固定パラフィン包埋組織標本からの HIV-RNA の検出．TOYOBO BIOCHEMICALS Upload 72, July 2003.
25) 阿部賢治：新世紀の感染症学（上）．TT ウイルス感染症．日本臨床 61 巻 増刊号 2: 254-260, 2003.
26) 阿部賢治：E 型肝炎の国内発生とウイルスの潜伏先．医学のあゆみ 206: 993-994, 2003.

Ⅱ．学会発表

1．国際学会

1) 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.
2) Sugitani M, Sheikh1 A, Abe K, Shikata T, Nishimura S, Mizuno K: Analysis of nucleic and amino acids sequence in HVR-1 of HCV in chimpanzee reinfection experiments. 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases, Sydney, Australia, April 2003.
3) Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Straus SE, Cohen JI: Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection Associated with Mutations in Perforin that Impair Its Maturation. 28th International Herpesvirus Workshop, Madison, Wisconsin, USA, July 2003.
4) Sugitani M, Abe K, Shikata T, Nishimura S, Mizuno K: Immune response against non-structure, core and hypervariable region 1 of HCV in chimpanzees - twice reinfected with the same strain of HCV. 10th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, Kyoto, Japan, December 2003.
5) Abe K: Current topics on HBV. Meeting of liver transplantation and viral hepatitis, Nagoya, Japan, December 2003.

2．国内学会等

1) 佐多徹太郎：BSE 検査について．岡山獣医師研修会（岡山）2003. 1. 24.
2) 佐多徹太郎：ウシ海綿状脳症(BSE)．日本臨床微生物学会講演（名古屋）2003. 2. 2.
3) 佐多徹太郎：サル CJD 動物モデル．予防衛生協会セミナー（筑波）2003. 2. 14.
4) 佐多徹太郎：エイズの感染病理．第 10 回エイズ国際研修（感染研）2003. 2. 17.
5) 佐多徹太郎：新興再興感染症．日赤中央血液問診者研修会（日赤本社）2003. 2. 18.
6) 佐多徹太郎：BSE 検査と BSE 陽性例．神奈川食肉衛生検査所（厚木）2003. 2. 21.
7) 佐多徹太郎：ポリオの病理．国際ポリオ研修（感染研村山庁舎）2003. 2. 28.
8) 佐多徹太郎：BSE 検査．食品衛生協会研修会（札幌）2003. 3. 4.
9) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．臨床感染症研修（国立国際医療センター）2003. 3. 7.
10) 佐多徹太郎：エボラ出血熱．日本医学会総会新興再興感染症シンポジウム（福岡）2003. 4. 6.
11) 藪添敦史、古岡秀文、堀内基広、横山　隆、品川森一、佐多徹太郎：動物プリオン病の免疫組織化学的染色における抗原賦活化法の検討．日本獣医学会総会（東京）2003. 4.
12) 佐多徹太郎：SARS と原因ウイルス－感染病理学の立場から．第 92 回日本病理学会総会特別企画・教育セミナー「新型肺炎～重症急性呼吸器症候群(SARS)について」（福岡）2003. 4.
13) 高橋秀宗：剖検から学ぶ感染症，クロイツフェルト・ヤコブ病の病理学的診断．第 92 回日本病理学会総会（福岡）2003. 4.
14) 長谷川秀樹、丹野正隆、早川欽也、佐藤由子、片野晴隆、倉田　毅、佐多徹太郎：Human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen.　第 92 回日本病理学会総会（福岡）2003. 4.
15) 岩田奈織子、中島典子、佐藤由子、秋山ひと美、佐多徹太郎：レーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いた SIV 感染サルリンパ節における SIV 感染動態の解析．第 92 回日本病理学会総会（福岡）2003. 4.
16) 久米佳子、堀内　啓、佐多徹太郎、松谷章司：多臓器に HSV-2 型感染症を認めた三重癌成人男性の一剖検例．第 92 回日本病理学会総会（福岡）2003. 4.
17) 佐多徹太郎：SARS coronavirus と感染病理．特別講演．第 44 回日本臨床細胞学会総会（東京）2003. 4.
18) 阿部賢治、平野　真、丁　欣、Tran TT Huy、佐多徹太郎、李　天成、武田直和、川端寛樹、小泉信夫、渡辺治雄、角坂照貴、後藤郁夫、増沢俊幸、中村正治、平良勝也、黒木俊郎、谷川　力：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（１）日本に生息する野ネズミ類における疫学調査と感染流行の実態．第 39 回日本肝臓学会総会（福

岡）2003. 5.

19) 平野　真、丁　欣、Tran TT Huy、岩城陽子、佐多徹太郎、李　天成、武田直和、中村　伸、阿部賢治：E 型肝炎ウイルスの動物宿主を探る（2）各種霊長類における疫学調査とニホンザルにおける感染流行．第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

20) 丁　欣、平野　真、Tran TT Huy、伊藤玲子、早川依里子、佐多徹太郎、李　天成、武田直和、山口真理、薄井　貢、正木尚彦、林　茂樹、阿部賢治：東京地域における HEV 感染の実態と予防対策の必要性．第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

21) 岩城陽子、丁　欣、Huy TT Tran、佐多徹太郎、荒川泰行、阿部賢治：日本人肝癌組織からの新種 Helicobacter 遺伝子の分離. 第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

22) Huy TT Tran, Ding X, Hayakawa E, Sata T, Ushijima H, Abe K: Geographic distribution of HBV genotypes A through G in 13 countries: International collaborative survey. 第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

23) Huy TT Tran, Ushijima H, Hirano M, Ding X, Iwaki Y, Trinh Thi Ngoc, Hayashi S, Abe K: Characteristic of basal core promoter and pre-core stop codon mutation of HBV isolated in Vietnam. 第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

24) 菊地　馨、島袋容司樹、宮城政剛、慶田喜秀、丁　欣、阿部賢治：沖縄県における肝疾患例の E 型肝炎ウイルス感染の血清疫学的検討．第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

25) 寺澤総介、伊藤玲子、丁　欣、阿部賢治：消化器症状と原因不明の急性肝炎と診断された小児における E 型肝炎ウイルスの関わり．第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

26) 小松陽樹、十河　剛、野崎昌俊、乾　あやの、藤澤知雄、李　天成、丁　欣、阿部賢治：小児における E 型肝炎ウイルス抗体保有率の検討．第 39 回日本肝臓学会総会（福岡）2003. 5.

27) 上野智規、後藤希代子、佐多徹太郎、入江伸吉：GFP-PML 発現細胞株を用いた HCMV IE1 タンパク質の新規検出法の開発．第 18 回ヘルペスウイルス研究会（香川）2003. 6.

28) 後藤希代子、上野智規、片野晴隆、入江伸吉、佐多徹太郎：PML/p180 発現細胞を用いたヒトサイトメガロウイルス感染過程の解析．第 18 回ヘルペスウイルス研究会（香川）2003. 6.

29) 田中道子、佐多徹太郎、川口　寧：HSV 遺伝子全長を保持する大腸菌を利用した様々な変異ウイルス作製法の試み．第 18 回ヘルペスウイルス研究会（香川）2003. 6.

30) 佐多徹太郎：新興再興感染症と SARS．福島医大講演（福島）2003. 9. 12.

31) 飛梅　実、高橋秀宗、佐多徹太郎、Michael Miller, Chris Aiken：HIV-1 Nef の融合、進入過程における影響、第 4 回熊本エイズセミナー（熊本）2003. 9.

32) Yamakawa Y, Hagiwara K, Nishijima M, Nohtomi K, Sata T: Tissue distribution of proteinase resistant prion protein in bovine spongiform encephalopathy (BSE) using Western blotting assay. 日本生化学会（横浜）2003. 10.

33) 鹿島眞人、佐多徹太郎：水疱に乏しい紅色扁平隆起を呈した顔面の帯状疱疹の 1 例－組織、免疫組織化学的所見－．日本皮膚科学会東京支部地方会（東京）2003. 10.

34) 山中新也、小田真喜子、清島真理子、佐多徹太郎：カポジ肉腫より診断に至った AIDS の一例. 第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会（松山）2003. 10.

35) 原　正幸、佐多徹太郎、棚林　清、明里宏文、山田章雄、向井鐐三郎：新型 SRV/D の分離・同定とウイルス検出法の確立．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

36) 一戸猛志、渡邊　泉、伊藤智史、千葉　丈、森山雅美、田村慎一、倉田　毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：新しい粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンの作製．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

37) 高橋秀宗、前田才恵、佐多徹太郎：HIV-1 RNA の安定性制御機構の解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

38) 田中道子、田中恵子、佐多徹太郎、川口　寧：UL13 欠損 HSV-1 感染細胞における宿主細胞依存的な核膜構造の変化．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

39) 川口　寧、田中道子、野沢直樹、佐多徹太郎、西山幸廣：大腸菌遺伝学とウイルス学の融合；ヘルペスウイルスの新しいリバースジェネテイックス．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

40) 神田忠仁、森清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎：アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの体内動態. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

41) 中島典子、尾崎泰子、永田典代、佐藤由子、樋口好美、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎：ホルマリン固定パラフィン包埋剖検肺組織標本における SARS コロナウイルス感染細胞の同定．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

42) 長谷川秀樹、渡邊　泉、森山雅美、一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、千葉　丈、倉田　毅、佐多徹太郎：イソロイシン経鼻接種によるインフルエンザウイルスの感染予防の検討．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

43) 伊藤智史、一戸猛志、渡邊　泉、田村慎一、千葉　丈、倉田　毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：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．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

44) 徳永研三、木ノ本正信、生田和良、倉田　毅、佐多徹太郎：HIV-1 西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．第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.

45) 永田典代、清水博之、吉河智城、波多野煜持、原嶋綾子、佐藤由子、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 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.
46) 上野智規、入江伸吉、片野晴隆、倉田　毅、佐多徹太郎、後藤希代子：GFP-PML 発現細胞株を用いた HCMV 感染細胞の新規検出法. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.
47) 一戸猛志、渡邉　泉、伊藤智史、田村慎一、千葉　丈、倉田　毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：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. 第 7 回日本ワクチン学会（名古屋）2003. 10.
48) 木ノ本正信、向井　徹、李　永剛、辻祥太郎、徳永研三、佐多徹太郎、後藤俊幸、生田和良：シンシチウム形成能の高い非感染性 HIV-1 粒子の Env 機能検索. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都) 2003. 10.
49) 高橋秀宗、前田才恵、佐多徹太郎：HIV-1 RNA の安定性制御機構の解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会（京都）2003. 10.
50) 大城戸健二、福島暁子、中村仁美、森山光彦、荒川泰行、阿部賢治：当院に入院した非 A－C 型肝疾患症例における HEV 感染の現状. 第 7 回日本肝臓学会大会（大阪）2003. 10.
51) 木ノ本正信、向井　徹、李　永剛、辻祥太郎、徳永研三、佐多徹太郎、後藤俊幸、生田和良：高いシンシチウム形成能を規定する Env 領域の同定. 第 17 回日本エイズ学会総会（神戸）2003. 11.
52) 後藤希代子、佐多徹太郎、田中恵子、田中啓友、上野智規、倉田　毅、入江伸吉：小胞体膜 coiled-coil 蛋白質 p180 は微小管関連蛋白質(MAP)である. 日本分子生物学会（神戸）2003. 12.
53) 飛梅　実、高橋秀宗、徳永研三、佐多徹太郎、Michael Miller, Chris Aiken　：HIV-1 Nef の融合、進入過程における影響、第 17 回日本エイズ学会総会（神戸）2003. 12.
54) 飛梅　実、高橋秀宗、倉田　毅、佐多徹太郎：長期未発症者における HIV-1 Nef の機能、長崎大学熱帯医学研究所平成１５年度研究集会（長崎）2004. 2.

特許等

長谷川秀樹、佐多徹太郎
1. 感職第 79 号　平成 15 年 4 月 15 日
   発明の名称：インフルエンザウイルス感染予防剤
2. 感染研発第 398 号　平成 15 年 7 月 23 日
   発明の名称：異常プリオン蛋白質の増殖の抑制方法
3. 感染研発第 491 号　平成 15 年 9 月 18 日
   発明の名称：粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン

後藤希代子、片野晴隆、佐多徹太郎
特願 2003-138932
発明の名称：ヘルペスウイルス前初期遺伝子産物の検出方法
発明者：上野智規、後藤希代子、入江伸吉、片野晴隆、佐多徹太郎
出願日：平成 15 年 5 月

8. 免 疫 部

部 長　竹 森 利 忠

概　　要

平成 15 年度免疫部で行われた研究業務の項目と主な要約を以下に述べる。

I.　検定・検査に関する免疫学的研究

インフルエンザワクチンの検定で用いられる白血球数減少試験の免疫学的な検証を行った。

II.　ワクチンに関する免疫学的研究

(1) SARS コロナウィルス(SARS-COV)に対するワクチン開発の基礎研究を行った。

(2) 新規結核ワクチン開発を目的とし、遺伝子欠損結核菌及びリコンビナント BCG を作成し、これらの株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た。

(3) 新規ワクチンデリバリー開発のために、弱毒インフルエンザウィルスやサルモネラ菌ベクターを開発・整備しその効果を検証した。

(4) ワクチン安全性の向上を目的としてアレルギー性反応の少ないワクチン安定剤の開発を行った。

III. 免疫学的診断法に関する研究

(1) SARS コロナウィルス感染の血清学的診断系を確立するために UV 照射ウィルスに対するモノクローナル抗体を作製し検査システムを確立整備した。

(2) 結核診断に関してツベルクリン反応に代わる迅速で特異的な細胞免疫診断法の開発を行った。

IV.　感染免疫防御に関する研究

(1) HIV 感染免疫反応に関する研究を行った。この結果マクロファージ感染 HIV 活性化因子が同定され、HIV 感染防御に対する CD8 T 細胞の重要性が新たな観点から明らかにされ、更に HIVnef 発現により生体内 T 細胞のダイナミクスや樹状細胞の生存が異常となることが示唆された。

(2) マクロファージによる結核菌殺菌作用を誘導するシグナル伝達分子が明らかにされた。

(3) C 型肝炎ウィルスにおける short RNA がウィルス複製に抑制的に作用する可能性を明らかにした。

(4) マラリア感染防御に関わる免疫細胞の同定が行われた。

V.　粘膜免疫・免疫記憶に関する研究

(1) 免疫記憶維持に必要となる因子が同定され、このうち脊髄性筋萎縮症(SMA)の原因遺伝子である *SMN* が重要な役割を果たすことが明らかにされた。

(2) 感染防御に有効な高親和性記憶 B 細胞産生に必要となる因子を明らかにした。

VI.　免疫細胞機能発現に関する研究

(1) 骨髄前 B 細胞抗原受容体の構造学的な解析を行い活性に関する機序を推定した。

(2) 染色体転座部位に結合する Translin 遺伝子の機能解析を行いこの分子が末梢リンパ球前駆細胞の分裂増殖に関与する可能性を明らかにした。

VII. スギ花粉症に関する研究

VIII.破傷風神経毒素に対する神経細胞表面受容体に関する研究

IX.　共同大型利用機器管理

細胞自動解析装置の使用

人事では平成 15 年 4 月高須賀直美研究員が育児休暇より復職した。4 月、加地友弘博士が東京大学より研究員として採用された。

研 究 業 績

I. 検定・検査に関する免疫学的研究

1. インフルエンザワクチン検定の白血球減少試験の免疫学的検証

インフルエンザワクチン検定項目の一つである白血球減少試験の免疫学的な検証を行った。検定では血中の細胞核を計測するが、本研究においてマウス腹腔にワクチン接種後 5 時間、及び 16 時間に末梢血中の白血球細胞の数が減少することを明らかにした。細胞分画を特異的抗体を用いて識別し、白血球減少は主として T 細胞、B 細胞のリンパ球分画の減少に依存することを明らかにした。血中の細胞数減少と並行して、脾臓では 16 時間後に B 細胞数が増殖する一方、骨髄ではリンパ球及び顆粒球の減少が認められ、ワクチン接種を契機とする血中の白血球減少が組織間での移動と局在に関連する可能性が推察された。接種 5 時間後の血中の炎症性サイトカイン TNFαの値を解析したが接種前後での大きな差は認められなかった。しかし、接種後 16 時間において血中のシアル酸の上昇が観察され、白血球減少が炎症反応に起因する可能性が示唆された。

[論文投稿中]

(藤猪英樹、高橋宜聖、山本紀一(協力研究員)、横田恭子、阪口雅弘、大西和夫、高須賀直美、橋本修一、磯貝まや(協力研究員)、落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信(細菌第二部)、竹森利忠)

II. ワクチンに関する免疫学的研究

1. 不活化 SARS ウィルス全粒子ワクチンの基礎研究

SARS コロナウィルス(SARS-CoV)は、重症急性呼吸器症候群を引き起こす今まで未同定であったコロナウィルスであり、その再来に備えて、ワクチン開発が急務である。我々は、作成が容易で、現実的にヒトに応用可能な方法、すなわち不活化全粒子ワクチンを経皮投与した場合にどのような免疫反応が惹起されるかを、マウスモデルを用いて検討した。UV 照射により不活化した精製 SARS-CoV を抗原(virion)として用い、BALB/c マウスに virion 単独、あるいは Alum 共存下に皮下接種した。Virion 単独投与により血中に抗 SARS-CoV 抗体が産生され長期に保持し、Virion そのものに液性免疫を強く刺激する抗原性があることが示唆された。Alum 添加により、抗体価はさらに上昇した。追加免疫後の血中抗体値は更に上昇し、ウィルスの Spike と Nucleocapside 蛋白両方を認識し、SARS-CoV 感染に対する中和活性を示し、将来的に不活化全粒子をベースとしたワクチンの可能性が開かれた。さらに、所属リンパ節のT細胞を In vitro で virion により刺激すると、T細胞増殖とサイトカイン(IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ, TNF-α)産生が認められ、細胞性免疫も感作する可能性が示唆された。

[*Int. Immunol.,* 印刷中]

(高須賀直美、藤猪英樹、横田恭子、高橋宜聖、葛西正孝、阪口雅弘、大西和夫、大島正道、橋本修一、竹森利忠(免疫部)、森川茂(ウィルス第一部)、板村繁之(ウィルス第三部)、石井孝司(ウィルス第二部)、小田切孝人(ウィルス第三部)、田代真人(ウィルス第三部)、吉倉廣(所長))

2. 新規結核ワクチン開発に関する基礎研究

(1) 遺伝子欠失結核菌の作成とそ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2千数百人が死亡しており、世界中では、毎年数百万人が死亡する感染症である。結核のワクチンとしてBCGが投与され乳幼児の重症結核感染症に有効とされているが、成人ではその効果に疑問が持たれている。我々は、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した。これら欠失菌の抗結核ワクチンとしての有用性を検討したところ、モルモットおよびマウスの結核感染系において、欠損株の1つであるpks4-KO が現在日本で使用されている BCG 株より強力な抗結核ワクチン効果を示すことを明らかにした。

(谷山忠義、中山慶子(研究生・早稲田大)、橋本直樹(実習生・早稲田大)、橋本和治(実習生・早稲田大)、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

本研究では、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 株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を目的とした実験の結果、BCGパスツール株に欠損している結核菌由来の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。次に、Mpt64 抗原とモルモットインターフェロンーガンマーの両者を発現するリコンビナントBCGの作成し、モルモット結核感染系においても、既存の BCG 株より強い抗結核防御効果があることを明らかにした。

(谷山忠義、中山慶子(研究生・早稲田大)、橋本直樹(実習生・早稲田大)、橋本和治(実習生・早稲田大)、菅原勇(結核研究所))

(3) 呼吸器粘膜を標的とした抗結核ワクチンの開発

結核の好初発部位である呼吸器粘膜免疫を賦活するデリバリーの開発を目的とした。結核菌及び BCG の共通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ィルスを作製し BALB/c マウス鼻腔に感染させ抗 Ag85A 免疫賦活を検討した。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ィルスを用いて、prime-boost を行い、マウスの胸部および頸部リンパ節T細胞の反応を見たところ、in vitro での PPD 刺激によって低濃度の IFN-γを産生する傾向があり、弱いながらも局所T細胞が感作されている可能性が示唆された。しかし、prime-boost vaccination の 1 ヶ月後に高濃度 BCG を鼻腔よりchallengeして、肺におけるBCG菌の数を調べたところ、特に感染初期において、むしろインフルエンザ感染マウスの肺により多くのBCG菌が検出される傾向がみられ、現存のベクターの改良の必要性が明らかとなった。

(高須賀直美、榎並正芳(金沢大)、藤猪英樹、君島祐介(実習生、東海大)、竹森利忠)

3. ワクチンの安全性に関する研究

(1) ワクチンの安定剤としての組換え体ヒトコラーゲンの検討

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副反応の原因が、ワクチンに含まれる牛ゼラチン(コラーゲンが主要成分)であることが明らかにした。また牛ゼラチンに対する IgE 抗体を保有している小児の一部が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も報告した。

最近、米国においても、ワクチン接種後のアナフィラキシーの原因アレルゲンはゼラチンであることがCDCの調査で示唆され、世界的にアレルゲン性のない安定剤の開発が急務となっている。

本研究においてワクチンの安定剤としての組換え体ヒトコラーゲンに対するIgE反応性を検討した。IgE反応性の少ない組換え体ヒトコラーゲン断片を作製するため、ヒトとウシのコラーゲンⅠ型のアミノ酸配列を比較し、相同性の高い部位の組換え体コラーゲン断片(ゼラチン)(8.5kDa)に対応する組換え体を作成した。この組換え体タンパクに対する反応性をELISA法を用いて調べたところ、ヒトコラーゲンに対して高いIgE反応性を持つ小児3例の血清中のIgE抗体及びヒトコラーゲンに対してIgE反応性を持たない小児3例の血清中のIgE抗体は組換え体ヒトゼラチンに反応しなかった。従って、この組換え体ヒト・ゼラチンはアレルゲン性の低いワクチンおよび薬剤の安定剤として有望であると考えられた。
(阪口雅弘、堀久江(東京医科歯科大難治研)、服部俊治、入江伸吉(ニッピ)、宮沢博(杏林大学))

4. ワクチンデリバリー開発に関する研究

(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

経口免疫は安全かつ簡便な免疫方法であるが、十分な免疫効果が得られる方法はまだ開発されていない。我々はサルモネラ菌を担体とするdelivery systemの確立のため、HIV GagとEGFPの融合蛋白をサルモネラ菌で効率よく発現するベクターを作成し、Gag-EGFP発現弱毒サルモネラ菌ワクチンをマウスに投与して腸管粘膜組織における抗HIV免疫応答誘導能について解析した。サルモネラ菌の経口投与により、腸管に抗Gag IgA抗体産生を誘導したが、これのみでは腸間膜リンパ組織(MLN)や腸管上皮リンパ球のCTL活性誘導は不十分であった。そこで、あらかじめHIV-1 Gag p24蛋白とコレラトキシンアジュバントを経鼻投与したマウスに、Gag-EGFP発現弱毒サルモネラ菌ワクチンを追加免疫した。この方法により全身性および鼻リンパ組織とその所属リンパ節および腸管リンパ組織においてGagに対するCTL活性が増強することが明らかとなった。
(横田恭子、宇多洋美(非常勤職員)、高頴画(非常勤職員)、石毛真行(協力研究員・天藤製薬㈱創薬セ)、長谷川旭(実習生・東京医薬専門学校)、村上正裕(客員研究員・天藤製薬㈱創薬セ))

(2) 新規腸管内ワクチンデリバリーの開発

工業的に製造可能な腸管免疫指向性ワクチン・デリバリー(DDS)を設計・製造し、性能試験を行った。作製した腸溶性DDSについて、経口投与後、ゲスト分子の腸管への到達と腸管内での放出を確認した。さらに、腸管免疫賦活化能についてOVAをモデル分子として検討した結果、抗OVA−IgM抗体の産生をOVA単独投与に比較して強く誘導したことから、基本的な腸管免疫賦活化能を持つことを確認した。しかし、腸管のIgA抗体反応の誘導に結びつかなかった。この結果は、腸管内における抗原提示・抗体産生誘導機構がIgMとIgA/IgG応答で異なり、キトサン共充填腸溶性カプセルは前者をのみ有効に賦活化すると考えられた。今後ゲスト分子充填過程の更なる改善を行うことにより、腸管・腹腔の免疫系を効率良く賦活化するワクチンDDSの改良を行う。
(大西和夫、村上正裕(客員研究員・天藤製薬㈱創薬セ)、山口沙由理(非常勤職員)、竹森利忠)

III. 免疫学的診断法に関する研究

1. SARSコロナウィルスに対するモノクローナル抗体の確立とウィルス抗原検出法への応用

重症急性呼吸器症候群(SARS)の診断法を開発する目的で、SARSコロナウィルスに対するモノクローナル抗体を作製し、ウィルス抗原を検出する各種試験への応用を検討した。不活化SARSウィルス全粒子を抗原としてBALB/cマウスを過免疫し、脾細胞をSP2/Oミエローマと細胞融合してSARSウィルス反応性ハイブリドーマを

作製した。これまでに30株のハイブリドーマが確立でき、そのうちの27株がS抗原と反応し、3株がN抗原と反応した。これらのモノクローナル抗体によって、ウィルス S 抗原および N 抗原の蛍光抗体染色法、病理組織(パラフィン)切片染色、ウエスタン・ブロットによる高感度検出が可能であった。抗 S 抗原に対するモノクローナル抗体のうち 4 種については、ウィルス中和活性を認めた。さらに、これらの抗体を組み合わせ、数十ピコグラムのSARS ウィルス蛋白質を迅速に検出できる高感度の抗原捕足検出システムを構築することが出来た。

[論文投稿中]

(大西和夫、阪口雅弘、加地友弘、葛西正孝、谷山忠義、赤川清子、横田恭子、大島正道、山本紀一(協力研究員)、高須賀直美、橋本修一、藤猪英樹、高橋宣聖、竹森利忠(免疫部)、森川茂(ウィルス第一部)、石井孝司、宮村達男(ウィルス第二部)、田代眞人、小田切孝人、板村繁之(ウィルス第三部)、佐多徹太郎(感染病理部)、高木弘隆(バイオセーフティー管理室))

2. 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求め、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。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 をアデノウィルスベクターに組み込み、ウィルス粒子を得た。このウィルス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(IFNγ)を測定した。この結果、Ag85A 組み込みアデノウィ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。更に Ag85A 組込みアデノウィルスを BCG 接種マウスより得た脾細胞に感染させると強い Ag85A 特異的 T 細胞反応が惹起された。

[論文投稿中]

(藤猪英樹、君島祐介(実習生・東海大)、竹森利忠)

IV. 感染免疫防御に関する研究

1. HIV 感染防御に関する免疫学的研究

(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-1 の増殖応答の解析

マクロファージ(Mϕ)指向性 HIV-1 は、ヒト単球由来 M-Mϕで増殖が強く誘導されるが、GM-Mϕやヒト肺胞 Mϕでは増殖が抑制され、この増殖能の違いは Hck および転写因子 c/EBPβの発現の違いに一致することを明らかにした。更に、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でのウィルス産生を完全に抑制されることを明らかにした。更に、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 CEBP/βの発現を抑制し、高分子型 CEBP/βと低分子型 CEBP/βの比を 1 以上に増加させると、GM 型 Mϕでの HIV-1 の増殖が誘導された。これらの結果は、Hck と CEBP/βのアイソフォームの発現パターンが Mϕにおける HIV-1 の増殖制御に重要であることを示唆する。[*J. Exp. Med.* 198:443-453, 2003]

(小室巌、横田恭子、岩本愛吉(東大医科研)、赤川清子)

(2) HIV の増殖制御と病態に関する研究: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

HIV 感染者由来 DC に yeast 由来 gag 類似粒子(VLP)を添加して CD4 陽性 T 細胞と共培養すると、T 細胞は組換え p24 蛋白よりも VLP により強く反応した。VLP に対する反応性が高い個体では CD8 陽性 T 細胞の活性化も同時に誘導されたことから、VLP は DC により

cross-presentation されることが示唆された。一方、Gag 発現アデノベクターを DC に感染させると主に CD8 陽性 T 細胞が強く活性化された。治療・未治療含めた 11 人の感染者の解析から、Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の活性化は血中ウィルス量の高い個体で強く誘導される傾向であったが、VLP に対する CD4 陽性 T 細胞の反応性は血中ウィルス量や CD4 数には依存しないことが示唆された。更に、慢性 HIV 感染者由来 PBMC を VLP 添加 DC と 7 日間共培養すると、長期未発症者では一部 Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞での perforin 産生が誘導されたのに対し、slow progressor では全く誘導されなかった。これらの結果は、ウィルスの増殖を制御できていない個体では CD8 陽性 T 細胞の機能的障害が特に強いと考えられる。[*J. Virol.* 77:10250-10259, 2003]

(横田恭子、森川裕子(北里大)、磯貝まや(協力研究員)、川名(立川)愛(東大医科研)、岩本愛吉(東大医科研)、Brigitte Autran(パリ大 Pitie Salpetriere Hospital)

(3) HIV-Nef 発現による T 細胞ダイナミクスの異常

HIVnef発現によるT細胞免疫への影響を明らかにすることを目的とした。すなわち、OVA特異的T細胞抗原受容体を発現するDO11.10 トランスジェニック(TG)マウスと、コクサキー・アデノウィルス受容体発現TGマウスをかけあわせたdouble TGマウスより精製した。精製$CD4^+$T細胞にnef発現アデノウィルスを感染させ、GFPとCD4の発現量を指標にFACSを用いてnef発現細胞とnef非発現細胞に分離し、抗原特異的増殖能、サイトカイン産生、ケモカインへの遊走能を解析した。その結果、nef発現T細胞のOVAペプチド刺激による増殖は非発現細胞に比べて遅延し、また刺激後IFN-γ、IL-4 の産生量は減少し、更にSDF-1、MIP-1への遊走がnef発現細胞では顕著に減弱していることを明らかにした。Nef発現による$CD4^+$T細胞の生体内ダイナミクスへの影響を細胞移入の系を用いて検討した結果、OVA刺激後$CD4^+$T細胞の免疫局所リンパ節への移入がnef発現により著しく減少することが明らかとなった。

(藤猪英樹、中村真美(非常勤職員)、竹森利忠)

(4) HIV-Nef の樹状細胞(DC)機能に関する研究

Nef発現による樹状細胞の抗原提示機能に対する影響を解析する目的で、nefとその変異体を発現するアデノウィルスベクターを用い、ほぼ 100%のDC及びマクロファージにnefを発現させた。Nef発現によりDCが発現するCD4 とMHC Class Iの発現が抑制されたが、MHC class Iの発現低下は顕著ではなかった。DC分化に伴う生存率の低下はnef発現により増強される傾向であったが、nef発現DCを結核菌由来PPD存在下でT細胞と共培養すると、活性化$CD69^+IFN\text{-}\gamma^+$T細胞の頻度はnef発現の有無にかかわらず同頻度であった。従って、nef発現によりDCは細胞死に陥るが抗原提示細胞としてT細胞活性を誘導する機能は保存されていると考えられた。最近HIV感染者の血中DCは減少することが報告され、我々の結果からnef発現がその原因となることが推察される。

(横田恭子、宇多洋美(非常勤職員)、磯貝まや(協力研究員)、石毛真行(協力研究員・天藤製薬㈱創薬セ)、長谷川旭(実習生・東京医薬専門学校))

2. 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

既に、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 キナーゼの活性化と関連するか否かについて検討した。この結果、結核菌感染時においてM 型 Mϕでは p38MAPK、ERK1/2、JNK の MAP キナーゼの活性化が認められたが、GM 型 Mϕではこれら

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型マクロファージ及びGM型Mϕの感受性の相違は、MAPキナーゼの活性化の違いを原因とする可能性が示唆された。
(赤川清子、金沢裕子、山崎利雄(細菌第一部)、芳賀伸治 (細菌第一部))

3. C型肝炎ウィルス感染に見られるshort RNAに関する研究

Quadri & Negroによる104:1に及ぶ5' subgenomic RNAの報告とパラインフルエンザウィルスにおけるmRNA転写停止機構を基に吉倉は、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)。この仮説が予見するプラス鎖 5' short HCV RNA は実際に感染肝組織や血清中に検出されること、ウィルスコア蛋白と結合していること、またこのshort RNA fragmentが感染価に関する指標となりうることはすでに示した。このshort RNAがウィルス活動性の指標となりうるかについて検討した。C型肝炎患者の経時的採血パネルにより血中ウィルス genome titerとshort RNAとの関係を調べた。genome titerはshort RNAと逆比例する動態を示しshort RNAがウィルス複製に対して抑制的な役割を果たしている可能性が示唆された。
(大島正道、鈴木美香子(実習生・東京医薬専門学校)、清水洋子(国立国際医療セ)、土方美奈子(国立国際医療セ)、吉倉廣(所長))

4. マラリヤ感染防御に関与する免疫細胞の同定

紫外線(UV)を前照射したマラリヤ抵抗性のB-6やB-10マウスは亜致死量のマラリヤ感染に対して感受性が増大し死亡する。免疫を司る担当細胞が UV で損傷を受けたと考えられるが、これを細胞レベルで解析することを目的に細胞移入によるrescueの実験を行った。未感染マウス由来の脾細胞は防御効果を示さず、感染を経験したマウスの感作脾細胞移入が有効であることから、これを対象としてMACSカラムに依り細胞選別を行った結果、NK及びNK T細胞は防御に無関係であるが、マクロファージ・顆粒球系細胞の関与が推察された。一方防御効果のあった個体における IFN-γの産生を測定すると、感染5日目で極めて低い価のIFN-γしか産生されておらず、IFN-γの関与しない防御の存在が示唆された。
(山本紀一(協力研究員)、高橋宜聖、藤猪英樹、竹森利忠)

5. 住血吸虫感染防御に関する研究

ヒトの住血吸虫症のモデルとなるマウスを用いて、感染を防御するワクチン開発を目指し、弱毒化幼虫の作成をDNA 合成阻害剤(主に抗がん剤)を用いて試みている。これまでに、in vitro 培養セルカリアの系に加えた 17 試薬中、2 試薬が、培養幼虫の in vivo での成熟を阻害することに適していることが判明した。この 2 試薬の処理幼虫をマウスに接種し、その後住血吸虫を感染させ、この感染に対する防御効果を調べた。結果は 2 種の試薬処理幼虫いずれも感染防御効果を示した。その効果は対照群の 70-80%程度で、有効であったが 100%近い防御効果は得られなかった。現在、その他の試薬のスクリーニングと併せて、接種回数や接種方法、アジュバントなどの検討を行っている。
(平山中己、朝日博子(寄生動物部)、吉成正裕(横浜市大医)、南陸彦(横浜市大医)、金沢保(産業医科大医))

V. 粘膜免疫・免疫記憶に関する研究

1. 免疫記憶に関する研究

免 疫 部

(1) 免疫記憶の維持と二次免疫反応に関わる因子の同定

免疫記憶の長期維持と高親和性の中和抗体産生を促す因子の同定は、持続性と感染防御効果の優れたワクチン開発の技術基盤に重要となる。我々は記憶 B 細胞に脊髄性筋萎縮症 (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 が高度に発現することを明らかにした。SMN 遺伝子を過剰発現した B 細胞株では生存が延長され、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では B 細胞産生が抑制された。SMN が B 細胞の生存維持に寄与する可能性が示唆された。また優性抑制型 Ras を過剰発現したトランスジェニックマウスでの免疫記憶の応答を解析したところ、高親和性細胞の選択と二次刺激に対する記憶B細胞の抗体産生分化が強く抑制され、Ras が記憶 B 細胞の選択と最終分化に必要であることが明かとなった。[論文投稿中]

(高橋宜聖、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)、原口草知子(実習生・玉川大)、竹森利忠)

(2) 記憶 B 細胞で高発現するケモカインレセプターの解析

記憶 B 細胞の長期維持には特定の組織への局在と細胞外環境との相互作用が必要であると考えられている。この仮定に基づき、記憶 B 細胞で高発現する細胞表面分子の探索を行った結果、炎症性ケモカインに広く結合する分子である D6 ケモカインレセプターが、記憶 B 細胞、脾臓辺縁帯 B 細胞、および腹腔 B1 細胞で高発現することを見出した。これらの B 細胞は D6 のリガンドとなるケモカインに対する遊走性を示さなかったが、脾臓辺縁帯 B 細胞については、その組織内局在に重要であるスフィンゴシン-1-リン酸に対する遊走性が、MIP-1αを介した刺激で増強する可能性が示唆された。これらの結果から、感染後に一過性に発現の変化するサイトカインである MIP-1αが、脾臓組織内の B 細胞の分布に影響を与え、免疫反応を制御している可能性が示された。

(橋本修一、佐野仁美(非常勤職員)、道祖土陽一(研究生・東海大)、竹森利忠)

(3) 記憶 B 細胞産生に関する研究

抗原刺激後 B 細胞は活性化され胚中心を形成する。これまでに記憶 B 細胞は胚中心で産生されると考えられていた。我々は記憶 B 細胞産生に必要となる ICOS-ICOS リガンド相互反応をブロックすることにより免疫後の記憶 B 細胞の産生時期を特定した。この結果、記憶 B 細胞の産生は免疫初期及び胚中心形成後にそれぞれ低親和性及び高親和性細胞の産生をもって 2 相性に誘導されることを明らかにした。

[論文投稿中]

(稲嶺絢子(研究生・東京理科大)、高橋宜聖、安部良(東京理科大)、竹森利忠)

2. SMA における重篤感染症誘発因子の同定

脊髄性筋萎縮症(Spinal Muscular Atrophy: SMA)は、四肢と肋間のアトロフィーを主徴とし重篤な呼吸器感染症が死亡の主要因となる。我々は、SMA の原因遺伝子であり RNA 代謝を調節する SMN (Survival of Motor Neuron)遺伝子が免疫記憶 B 細胞で高発現していることを明らかにし、SMA に認められる重篤な感染症が、免疫不全を背景とする可能性を提起した。さらに B 細胞株に SMN 蛋白質を強発現させることで細胞死抵抗性が賦与されることを明らかにした。この新たな SMN の機能が SMN に結合する蛋白質により制御されると仮定し、SMN 結合蛋白質を検索したところ、その一つが抗酸化分子として作用し、定常状態では細胞生存を促進すると推察されている apoptosis-inducing factor (AIF)であることを明らかにした。

（加地友弘、高橋宣聖、竹森利忠）

3. リンパ球に発現するカドヘリン分子と粘膜免疫に関する研究

BILL カドヘリン(cadherin-17)は、我々がリンパ球に発現するカドヘリン・スーパーファミリー分子として初めて同定したもので、B 細胞の発生・分化を通してその発現量は大きく変動し、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。また、BILL カドヘリンは腸、鼻腔、肺などの粘膜免疫組織上皮にも集中して発現している。この分子の免疫系における機能を明らかにするために遺伝子欠損マウスを作製して解析を続けている。腸管での BILL カドヘリンの発現は遺伝子欠損マウスで完全に消失していたが、小腸上皮の形態には大きな変異は無かった。しかし、IEL(腸管上皮細胞間リンパ球)特に B 細胞の数が減少する傾向が有った。このことは、腸管粘膜免疫系の構成に BILL カドヘリンが関与していることを示唆しており、現在詳細に検討している。

（大西和夫、山口沙由理(非常勤職員)）

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

抗体の抗原認識多様性獲得を知る目的でプレ B 細胞受容体の機能を解析した。プレ B 細胞受容体を構成する代替軽鎖は非免疫グロブリン領域(non-Ig 領域)と呼ばれる特徴的なドメインを持ち、この構造が受容体の活性化に重要な働きを担うと考えられている。代替軽鎖ヘテロダイマーのうちλ5 の non-Ig 領域については、そこに存在する進化的に保存された複数の Arg 残基が受容体の架橋・活性化に寄与していることをすでに明らかにした。もう一方の代替軽鎖構成分子である VpreB の non-Ig 領域の機能について突然変異体を作製して検討した結果、λ5とVpreB1 双方のμH 鎖への結合がプレ B 細胞受容体の細胞表面への発現に必要であること、ヘテロダイマーにおいて VpreB の non-Ig 領域を欠失させると受容体の細胞表面への発現量は有意に低下することから、この部分がプレ B 細胞受容体のアッセンブリ、または活性化機構に重要であることが示唆された。

[*Nature Immunology* 4, 849-856, 2003]

（柳沢有紀(筑波大院)、Lill Martensson(Babraham Institute)、清水健之(東京理科大)、Fritz Melchers (Basel University)、山口沙由理(非常勤職員)、大西和夫）

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 員環マクロライドの 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 EM201 が IL-2 依存性のヒト活性化 T 細胞の増殖を抑制し、IL-2R 下流の ERK1/2 のリン酸化を抑制することを報告した。また、その抑制作用は EM よりも EM201 の方が強いことも報告した。今回、EM と EM201 による IL-2 依存性活性化 T 細胞の増殖抑制機構をさらに解明すべく、マクロライド系抗生物質 Rapamycin 及び PI3K 阻害剤 LY294002 の抑制機構と比較しながら作用点を検討した。その結果、EM 及び EM201 は ERK1/2 と p70S6K のリン酸化を抑制し、その抑制作用は T 細胞増殖抑制と同様に EM より EM201 の方が強かった。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。これらの結果距より、EM 及び EM201 は、Rapamycin や LY294002 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た。
（大澤瑞穂、砂塚敏明（北里研究所）、大村智(北里研究所)、赤川清子）

3. エリスロマイシン生体内代謝産物 EM201 の樹状細胞の分化及び機能に対する影響

樹状細胞(DC)は、プロフェッショナルな抗原提示細胞として、T細胞の活性化に重要な役割を果たしているが、DC の分化や機能に対する 14 員環マクロライドの作用はほとんど報告されていない。今回 EM 及びその生体内代謝産物で抗菌活性を持たない EM201 の樹状細胞分化に対する影響を検討した。その結果、EM 及び EM201 は、GM-CSF と IL-4 によるヒト単球からの未熟 DC(imDC)の分化に対し、抑制的に作用し、CD1a, CD1b, HLA-DR および DC-SIGN などの発現を抑制したが、一方では、CD86 の発現を増強することが知られた。また、EM に比べ EM201 の方がより強い作用を示した。現在、これら薬剤存在下に形成された DC の APC 機能やサイトカイン産生能、また imDC から成熟 DC(mDC)への分化に対するこれら薬剤の作用を検討中である。
（岩田汐里、砂塚敏明(北里研究所)、大村智(北里研究所)、赤川清子）

4. 免疫不全マウスにおける末梢血リンパ球の分裂増殖の異常

これまでの研究において、Translin(TSN)蛋白の発現と細胞分裂増殖の密接な関連が明らかにされているが、本研究では遺伝子欠損マウスを作成してTSN蛋白の詳細な機能解析を試みた。幼年期のTSN遺伝子欠損マウスは、野生マウスと比較して極めて小さく体重は約50%に満たなかった。この時期の遺伝子欠損マウスにおける末梢血の組成を調べてみると、赤血球や血小板に変化は見られなかったが、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)と同様に白血球数が激減していることが判明した。リンパ球表面マーカーを用いたFACS解析によると、白血球の減少は末梢血Bリンパ球が未分化な状態（$B220^{-}$ $CD43^{+}$ $IL\text{-}7R^{+}$)で停止して分化増殖が著しく阻害されていることに起因するものであった。一方、この現象は脾臓や骨髄では認められず、幼年期の末梢血で最も顕著に観察された。また、TSN遺伝子欠損マウスでは野生マウスと比較して末梢血リンパ球における免疫グロブリン(Ig)遺伝子、D_H-J_Hの組み換えレベルが低下していた。以上の結果は、TSN蛋白がIg遺伝子、D_H-J_Hの再構成に係わって末梢血リンパ球前駆細胞の分裂増殖を制御していることを示唆している。
[*Mol. Biol. Cell.*, 印刷中]
（福田裕子、石田礼子、松田潤一郎（獣医科学部）、葛西正孝）

VII. スギ花粉症に関する研究

1. イヌにおけるスギ花粉主要アレルゲン（Cry j 1)アレルゲンに対するT細胞エピトープの解析

スギ花粉症の根治治療のためのT細胞エピトープを用いたペプチドワクチンの開発が進められている。また、イヌにおいてもスギ花粉症の発症が認められており、スギ花粉症のモデル動物として期待されている。本研究はイヌにおいてスギ花粉症のペプチドワクチンの有効性と安全性を検討するために、22 頭のスギ花粉アレルゲン実験感作犬においてCry j 1 のT細胞エピトープの解析を行った。Cry j 1 アレルゲンオバーラップペプチドを 35 個作成し、イヌから採取した末梢血リンパ球におけるペプチド特異的T細胞増殖反応をH^3-チミジンの取り込みにより解析した。22 頭のイヌの末梢血リンパ球は 35 ペプチド中 15 ペプチドに反応した。その中でもNo.8 (p71-90),

No.10(p91-110), No.11(p101-120)のペプチドに対して強く反応し、そのT細胞反応陽性者頻度はそれぞれ 41, 50, 41%であった。No.10 とNo.11 のペプチドは、反応するイヌが異なることから別々のT細胞エピトープと考えられた。また、これらのイヌ血清中IgE抗体とこの 3 つのペプチドとのIgE反応性は認められなかった。これにより、これらのペプチドはT細胞反応性を有するが、アレルゲン性がないことが判った。これらの結果から、スギ花粉感作犬を用いたスギ花粉アレルゲンペプチドワクチンの検討が可能であることが示唆された。

(阪口雅弘、斎藤三郎(慈恵医大)、増田健一、辻本元(東大))

VIII.破傷風神経毒素に対する神経細胞表面受容体に関する研究

破傷風神経毒素(T.Tn)は神経筋接合部から運動神経終末部に特異的に結合して、神経細胞内に取り込まれる。この時の神経細胞表面受容体は未だに不明である。これまで、種々のヒト、マウス、ラット等の神経細胞株で、T.Tn との結合を調べてきたが、ラットの PC12 細胞株のみが結合を見た。しかし、この細胞を用いての受容体の同定と単離は、本研究のみならず、多くの研究者が試みているが、未だに同定されていない。その原因は不明であるが、用いた細胞株が運動神経由来でないことも大きな要因として考えられる。そこで、運動神経細胞株を用いた実験系を新たに構築するために、最近トロント大学の N. Cashman 教授らが樹立した motor neuron cell line の細胞の分与を受け、現在これを始めている。

(平山中己)

IX. 共同大型利用機器管理

平成 15 年度細胞自動解析装置の使用は 1,079 回、計 2,097 時間でその内訳は感染研 954 回、1,835 時間、感染研以外の研究機関 125 回、262 時間であった。機器は適切に管理され、実験申請時の書類も適切に保存された。

(渡辺恵理(非常勤職員)、高橋宜聖、竹森利忠)

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌上発表

1. 欧文発表

2003 年

1) Ohnishi, K., Melchers, F. The nonimmunoglobulin portion of λ5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling.
Nature Immunology 4, 849-856, 2003

2) 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.、198: 443-453, 2003

3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A. Yeast-derived HIV type-1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8+ T cells by cross-presentation of DCs.
J. Virol. 77:10250-10259, 2003

4) 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

5) Inouye, K., Ito, T., Fujimaki, H., Takahashi, 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

6) 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

7) 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

8) 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

9) Ishida, R., Masuda, 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) 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

2004 年

1) Oshima, M., Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Rein, A. Effects of blocking individual maturation cleavages in murine leukemia virus Gag.
J Virol., 78:1411-1420, 2004

2) Kusano,K., Nishimura,T., Ebara,S., Tachibana,S., Sato,S. Kuwaki,T. and Taniyama,T. A Potential therapeutic role for small nonpeptidyl compounds that mimic human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood, 103:836-842, 2004*

3) Kuwahara, K., Fujimura, S., Takahashi, Y., Nakagata, N., Takemori, T., Aisawa, S., Sakaguchi, N. Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses.
Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 1010-1015, 2004

4) Sugiura, I., Sasaki, C., Hasegawa, T., Kohno, Sugio, T., Moriyama, H, Kasai, M. and Matsuzaki, T. Structure of human Translin at 2.2A resolution
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60:674-679, 2004

5) 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., 27:47-55, 2004

6) 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., 27:81-92, 2004

7) Kurata, K., Yasunaga, S., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Expressions of IL-4 and IFN-γ mRNA lymphocytes in 4 dogs with allergic rhinitis. *J. Vet. Med. Sci., 66:25-29, 2004*

8) Maeda, S., Ohmori, K., Kurata, K., Sakaguchi, M., Masuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Expression of LacZ gene in canine muscle by intramuscular inoculation of a plasmid DNA.
J. Vet. Med. Sci., 66:337-39, 2004.

9) Takeno, M., Yoshikawa, H., Kurokawa, M., Takeba, Y., Kashiwakura, J.I., Sakaguchi, M., Yasueda, H. and Suzuki, N. Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model.
Clin. Exp. Allergy, 34:965-970, 2004

10) Hidaka, C., Norose, Y., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ohwaki, A., Nohtomi, K., Toda, M., Kusagawa, S., Sakaguchi ,M., Kudo, S., Takebe, Y. and Takahashi, H. Dermal dendritic cells sensitized with plasmid DNA encoding immunostimulatory sequence by gene gun efficiently prime murine HIV-1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes.
Biomed. Res., 25:83 -91, 2004

11) Ohmori, K., Sakaguchi, M., Kaburagi, Y., Maeda, S., Masuda, K., Ohno, A. and Tsujimoto, H. A descriptive study of 85 dogs with suspected allergic reactions after vaccination in Japan.
Vet. Rec., in press, 2004.

12) Kurata, K., Iwasa, A., Masuda, K., Sakaguchi, M., Ohno, K. and Tsujimoto, H. Identification of CpG

oligodeoynucleotide sequences to induce IFN-gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells.

Vet. Immunol. Immunopathol., in press, 2004

13) Maeda, S., Ohmori, K., Yasuda, N., Kurata, K., Sakaguchi, M., Masuda, K. Ohno, K. and Tsujimoto, H. Increase of CCR4-positive cells in the peripheral CD4+ cells in dogs with atopic dermatitis or experimentally sensitized to Japanese cedar pollen.

Clin. Exp. Allergy, in press, 2004

14) Masuda, K., Sakaguchi, M., Saito, S., Yasueda, H., Iwabuchi, S., Tsukui, T., Hayashi, N., Kurata, K., Maeda, S., Ohno, K. and Tsujimoto, H.: Identification of peptides containing T cell epitopes of Japanese cedar (Cryptomeria japonica) pollen allergen (Cry j 1) in dogs.

Vet. Immunol. Immunopathol., in press, 2004

15) Miyazawa, H., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Saito, S., Tanaka, K., Nagata, K. and Inouye, S. Non-IgE,-IgG4 antibody to Japanese cedar pollen allergens: Comparison of its prevalence and titers between pollinosis patients and non-patients.

Allergol. Int., in press, 2004

16) Kasai, M. A significant role for the peripheral blood in juvenile hematopoiesis.

Mol. Biol. Cell,. in press, 2004

17) Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, S., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice.

International Immunology, in press, 2004

2. 和文発表

1) 赤川清子「エリスロマイシンを代表とする14員環マクロライドの新作用について」 BMSA会誌、15:12-17, 2003

2) 竹森利忠「記憶B細胞産生維持にかかわるシグナル」医学のあゆみ、207 巻 3 号、185-191、2003

3) 大西和夫「pre-BCRシグナルはいかにして用意されるか」 臨床免疫、41 巻 6 号、629-637、2004

4) 高橋宣聖「メモリーB細胞の生存維持とその制御分子」臨床免疫、40 巻 4 号、359−363、2003

5) 高橋宣聖、藤猪英樹、橋本修一、竹森利忠「MACS, FACS による細胞精製、ソーティング」 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル、羊土社、124-138、2004

6) 阪口雅弘、戸田雅子、平原一樹、白石明郎「スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法」 臨床免疫、39 巻、308-314、2003

7) 阪口雅弘、高橋裕一「環境アレルゲンの定量」 総合臨床、52 巻、539-544、2003

8) 阪口雅弘、戸田雅子、平原一樹、 白石明郎「スギ花粉症に対するペプチド療法の現状」アレルギー科、15 巻、133-139、2003

9) 阪口雅弘、平原一樹「花粉症の治療はどこまで進んだか」 現代化学、386 巻、39-43、2003

10) 大森啓太郎、阪口雅弘、増田健一、辻本 元「犬におけるワクチン接種後アレルギー反応」 Journal of Small Animal Medicine 6:30-36, 2003.

11) 成田雅、谷山忠義「TNF誘導アポトーシスに関与する新規アダプター蛋白CIN85」 臨床免疫、印刷中、2004

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

2003 年

1) 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
2) Yokota, Y., Isogai, M., Otake, K.. “The effect of HIV-1 Nef expression on dendritic cells and macrophages.” International AIDS Symposium. Paris, July, 2003
3) Fujii, H., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Takemori, T. “Expression of HIVnef impairs the antigen-specific T cell response.” The Awaji International Forum on Infection and Immunity, August, 2003
4) D. Muriaux, M.Oshima, J. Mirro, and A. Rein. “Trans-dominant effect of mutant at the N-terminus of MLV capsid protein.” Retroviruses, Cold Spring Harbor, June, 2003
5) Shimizu, Y., Hijikata, M., Oshima, M., Yoshikura, H. “Characterization of the 5’ side subgenomic Forms of hepatitis C viral RNA in the liver and serum.” 10th International Meeting on Hepatitis C virus & Related Viruses, December, 2003
6) Takemori, T., kaji, T. and Takahashi, Y. “Survival motor neuron(SMN) gene supports B cell survival.” The new frontier of RNA science, Kyoto, November, 2003

2004 年

7) Takahashi, Y., Inamine, J., Yoshioka, E., Shimanuki, E., Abe, R., Takemori, T. “Unique role of p21ras on the memory B cell response” Keystone Symposia, Lymphocyte activation and signaling, Colorado, 2004
8) Takemori, T. “Memory B cell express their gene products at high levels, which exert an anti-apoptic effect in B cell lymphoma cell lines under pro-apoptotic culture conditions.” The immune system. Development, activation and manipulation. Tokyo, 2004

60th Annual meeting of American Academy of Allergy Asthma & Immunology, San Francisco, USA, March 2004.

9) Sakaguchi, M., Miayzawa, H., Hori, H., Ebihara, T., Hattori, S., Irie, S. and Inouye, S. “Reactivity of IgE and IgG antibodies to human collagen type I in children with bovine and gelatin Allergy.”
10) Tukui, T., Maeda, S., Ohmori, K., Masuda, K., Ohno, K., Sakaguchi, M., Tsujimoto, H., and Iwabuti, S. “Expression analysis of macrophage-derived chemokine gene in canine atopic dermatitis.”

76th Annual Meeting of Association for research of vision and ophthalmology, 2004

11) Hori, J., Wang, MC., Murano, N., Takemori, T., Auma, M., Yagita, H. "PD-1 and PD ligans are necessary for corneal allograft survival."
12) Murano, N., Wang, MC., Ohara, K., Takemori, T., Hori, J. "Dorect confirmation of migration of bone marrow cells into normal and inflamed cornea."
13) Hori, J., Wang, MC., Takemori, T., Auma, M., Yagita, H. "Role of programmed death 1 and B7-H1 in survival of allogeneneic corneal transplants."

12th International Congress of Immunology, 2004

2. 国内学会

（第 33 回日本免疫学会総会、福岡、平成 15 年 12 月）

14) Takemori,T., Takahashi, Y., Inamine, J., Kaji, T., and Hashimoto, S-I. "The molecular basis for memory B cell development and maintenance." (Symposia: Diversity of Immunological memory cells)

15) 藤猪英樹、中山俊憲、谷口克、竹森利忠 「HIVnef発現により誘導される成熟T細胞の機能異常」

16) 高橋宜聖、稲嶺絢子、加地友弘、安達貴弘、鍔田武志、安部良、竹森利忠「Survival motor neuron 遺伝子による記憶B細胞生存の制御」

17) 稲嶺絢子、高橋宜聖、安達貴弘、鍔田武志、安部良、竹森利忠「記憶B細胞に発現増強する新規分子は細胞の生存を支持する」

18) Yoshioka, E., Takahashi, Y., Inamine, J., Abe, R., Takemori, T. Ras is required for the establishment of functional B cell memory。

19) 橋本修一、道祖土陽一、竹森利忠「記憶B細胞で高発現する膜蛋白の同定及び既知ケモカインレセプターの解析」

20) 桑原一彦、藤村睦、高橋宜聖、竹森利忠、阪口薫雄「B細胞特異的GANP欠損マウスにおける親和性成熟の異常」

21) 蕪木由紀子、戸田雅子、竹森利忠、安枝浩、阪口雅弘 「CpG ODN結合杉花粉アレルゲン(Cry j 1)によるスギ花粉特異的IgE産生抑制」

22) 本間季里、鵜殿平一郎、河野友子、竹森利忠、鈴木章一、熊取厚志、松山俊文、由井克之 「LPS応答性における interferon regulatory factor-4(IRF-4)の機能解析」

23) 柳沢有紀、竹森利忠、大西和夫 「代替L鎖と結合できずプレB細胞レセプターを形成できないH鎖でもκL鎖と結合してB細胞レセプターを形成できる」

24) 大西和夫、フリッツ・メルヒャース、清水健之 「BILLカドヘリン(cadherin-17)遺伝子欠損マウスの作製と表現型の解析」

25) 横田（恒次）恭子、磯貝まや、岩本愛吉、立川（川名）愛「HIV感染における樹状細胞によるcross-presentationの重要性について」

26) 成田雅、西村忠洋、吉崎和幸、谷山忠義 「CIN85はTNFによるAkt活性化を阻害してアポトーシスを促進する」

27) 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」

28) 蕪木由起子、戸田雅子、竹森利忠、安枝浩、阪口雅弘「CpG-ODN結合スギ花粉アレルゲン(Cry j 1)によるスギ花粉特異的IgE産生抑制」

（第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都、平成 15 年 10 月）

29) 大島正道、清水洋子、土方美奈子、吉倉廣 「C型肝炎ウィルスにおけるshort RNA の相対量比と感染性の解析」

30) 藤猪英樹、藤井陽一、竹森利忠 「HIVnefによる成熟T細胞の機能異常」

31) 磯貝まや、藤井陽一、藤田美歌子、足立昭夫、竹森利忠、横田（恒次）恭子 「HIV-Nef発現が樹状細胞機能に及ぼす影響の解析」

32) 広瀬敏治、竹森利忠、黒田和道、榎並正芳 「結核菌由来Ag85Aを発現する遺伝子組み換えインフルエンザウィルスの作成」

33) 飯島沙幸、木全清典、三輪正道、横田恭子、間陽子「HIV-1 感染・複製におけるvpr遺伝子の機能」

34) 笠原（仁田原）優子、宗田光峰、飯島沙幸、横田恭子、間陽子 「最終分化マクロファージ細胞内importin αによるHIV-1 vprの核移行解析」

35) 倉光球、橋爪智恵子、我妻昭彦、横田恭子、間陽子

「HIV-1 VprによるpreーmRNAのスプライシング反応阻害のin vivo およびin vitro解析」

36) 大平みはる、並木秀男、谷山忠義、楠慎一郎、堀江健二、ヌグェンバン・サー、小沢智 「空気中のインフルエンザウイルスを捕捉する鶏卵抗体フィルター」

（第 78 回日本結核病学会総会、倉敷、2003 年 4 月）

37) 谷山忠義、中山慶子、菅原勇 「遺伝子ノックアウト結核菌の病原性とワクチン効果の検討」

38) 中山慶子、菅原勇、谷山忠義 「遺伝子組み換えBCG(rBCG)を用いた新規抗結核ワクチンの開発」

（第 17 回日本エイズ学会学術集会、神戸、平成 15 年 11 月）

39) 笠原（仁田原）優子、宗田光峰、飯島沙幸、横田恭子、間陽子 「HIV-1 標的細胞おいてimportinαにより促進されるVpr核移行の解析」

40) 倉光球、橋爪智恵子、我妻昭彦、横田恭子、間陽子「HIV-1 VprによるpreーmRNAスプライシング阻害反応の解析」

41) 飯島沙幸、木全清典、横田恭子、三輪正直、間陽子「ウィルス増殖におけるHIV-1 Vprの機能解析」

（第 2 回沖縄若手研究者フォーラム、沖縄、平成 16 年 2 月）

42) 大島正道、清水洋子、土方美奈子、吉倉廣「C型肝炎ウイルスにおけるshort RNA の相対量比と感染性の解析」

（第 53 回日本アレルギー学会総会、岐阜、平成 15 年 10 月）

43) 高橋裕一、安部悦子、伊藤健、大橋武、邊見眞子、武田久子、安枝浩、阪口雅弘、名古屋隆生 「空中スギおよびイネ科花粉アレルゲンのインターネットによる情報提供と今後の課題」

44) 宮沢博、藤田真衣、梅宮梨可、阪口雅弘、大砂博之、池澤善郎、堀久江 「大正エビ第2アレルゲンと各種魚介類との交差反応性の検討」

45) 阪口雅弘 「室内環境中の空中アレルゲンの定量とアレルゲン回避策」

（第 136 回日本獣医学会、青森、平成 15 年 10 月）

46) 蟻川奈緒子、阪口雅弘、紺野克彦、桃井康行、岩崎利郎「犬におけるMajor allergen Can f 1 の発現について」

47) 津久井利広、阪口雅弘、蔵田圭吾、大森啓太郎、鈴木日吉、増田健一、大野耕一、辻本元、岩淵成紘 「リコンビナントイヌ高親和性IgEレセプターを用いたイヌIgE検出系の確立」

（第 10 回マクロライド新作用研究会、東京、平成 15 年 7 月）

48) 赤川清子、砂塚敏明、大村智 「EM703, 免疫担当細胞（マクロファージ、リンパ球）に対する作用について」

49) 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」

50) 岩田汐里、砂塚敏明、大村智、赤川清子 「エリスロマイシン生体内代謝産物EM201 の樹状細胞の分化及び機能に対する影響」

（第 20 回日本角膜移植学会、米子、平成 16 年 2 月）

51) 堀純子、王明聡、村野奈緒、竹森利忠、東みゆき 「角膜アログラフト正着におけるprogrammed death ligand 1(B7-H1)及びB7-DCの役割」

52) 村野奈緒、堀純子、王明聡、大原国俊、竹森利忠 「角膜への骨髄細胞への遊走」

（第 108 回日本眼科学会、福岡、平成 16 年 4 月）

53) 堀純子、王明聡、村野奈緒、竹森利忠、東みゆき、八木田秀雄 「角膜移植の免疫特権におけるProgrammed Death 1 とB7-H1 及びB7-DCの役割」

54) 村野奈緒、堀純子、王明聡、大原国俊、竹森利忠 「角膜アログラフトにおける骨髄細胞の関与」

（第 38 回日本眼炎症学会、札幌、平成 16 年 7 月）

55） 堀純子、王明聡、種元桂子、高橋浩、竹森利忠、東みゆき、八木田秀雄 「眼免疫特権におけるProgrammed Death 1/B7-H1 経路の役割」

（RNA ウィルス研究の新展開 III、鈴鹿、平成 16 年）

56） 広瀬敏治、郭潮潭、高須賀直美、竹森利忠、黒田和道、榎並正芳 「インフルエンザウイルスベクターを用いた結核ワクチン開発の試み」

（Annual Meeting of Japanese Molecular Biology Society (Symposium)、神戸、平成 16 年 12 月）

57） Okado,H, Kawano,H, Matsuda, J, Terashima,T, and Kasai,M. “Transcriptional repressor, RP58, is essential for development of the cortical layer formation and the reciprocal connectivity between cortex and thalamus”

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・治療薬と診断法の開発に関する基礎研究を行うことを目的としている。当部が取り扱う主な生物活性物質は、真菌制御物質（第1室）、情報伝達制御物質（第2室）、生体防御調節物質（第3室）および抗生物質耐性菌制御物質（第4室）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15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及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. 好中球機能解析及びその機能不全の解析
IV. バイオイメージング解析
V. サイトカイン LECT2 の解析
VI. 抗生物質耐性と放線菌ゲノムに関する研究
VII. 我が国における輸入真菌症のサーベイランス

研究費としては、基盤的研究費、真菌感染症対策事業費、特別研究費のほかに厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業、医薬安全総合研究事業、難治性疾患克服研究事業）、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、文部科学省科学研究費補助金及び未来開拓学術研究推進事業ゲノム研究等の支援を受けた。厚生労働科学研究事業の特別研究事業では、「深在性真菌症及び輸入真菌症対策に向けた総合的基盤研究」（上原至雅ら）を行い、「医薬安全総合研究」および「難治性疾患克服研究事業」では鈴木室長が主任者となっている2課題において、感染症誘発の慢性疾患への対策研究を推進した。

国際交流の一環として、鈴木室長はヒューマンサイエンス振興財団、（財）公定書協会、（財）医療機器センターの支援事業により、Richard Banati 教授（英国・ロンドンーハンマースミス病院）、Peter Ward 主任教授（米国・ミシガン大学医学部・病理）、Nicolas Demaurex 教授（スイス・ジュネーブ大学）、Haward Petty 教授（米国・ミシガン大学医学部）および Peter Spaeth 教授（スイス・ベルン大学）を招へいし、研究交流を推進した。

人事面では、堀田国元第四室長が今年度末をもって定年退官された。堀田室長の研究は、抗生物質生産菌の自己耐性機構の解明、薬剤耐性を指標とした生物活性物質のスクリーニング、遺伝生化学的手法を駆使したアミノグリコシド抗生物質の修飾酵素の研究へと局面を展開し、臨床における薬剤耐性菌の出現動向予測研究へと発展した。その間、これらの功績に対して住木・梅澤賞、放線菌学会賞などの栄誉に浴された。また後年は、強酸性電解水の有効性に着目、その主たる殺菌力が次亜塩素酸であることを証明し、その利用を医療分野にとどまらず、食品、農業分野へ広めることに尽力された。基礎研究を臨床、応用分野、ひいては社会に還元することを常に念頭においた堀田先生の研究スタイルは、後続の研究者の良い規範となろう。

以下に本年度の主な研究業績を記す。

研 究 業 績

I. 新しい活性評価系とスクリーニング及び生物活性物質の研究

1. 抗真菌剤の探索研究

(1) *Candida albicans* の形態変換を特異的に阻害する物質の探索

新しい作用機序の新規抗真菌剤開発を目的に *C. albicans* の菌糸形変換を阻害する物質の活性評価系を確立し探索を行った。スクリーニングの結果、*C. albicans* の成育は阻害しないが、菌糸形成・凝集体形成を阻害する anisomycin が取得できた。anisomycin は約 31μg/ml の濃度で成育阻害を示し、1ー3μg/ml の濃度で菌糸形変換阻害活性を示した。現段階ではまだ Anisomycin の菌糸変換に関する標的分子は不明である。

[花岡　希、梅山　隆、高野幸枝、新見昌一、上原至雅；鈴木賢一（山之内製薬）]

(2) 酵母の薬剤排出ポンプ阻害剤の探索

真菌細胞膜に局在する排出ポンプが機能亢進するとアゾール系抗真菌剤に対して耐性になる。従って、ポンプ阻害剤はアゾール剤耐性菌を感受性化することが期待されるため、我々はフルコナゾールとの併用によって耐性菌の増殖を阻止する物質を探索してきた。これまでの探索結果からクエスチオマイシン A、エニアチン、ミルベマイシンが耐性菌を感受性化することが分った。免疫抑制剤 FK506 がポンプ阻害作用を示すことはすでに知られているが、我々の開発した出芽酵母発現系（7つの内在性輸送体が破壊されているためにフルコナゾール高度感受性となった株）に種々の病原真菌の排出ポンプ遺伝子を導入・発現してフルコナゾール高度耐性株を作製し、各種排出ポンプに対する阻害活性を比較検討

している。またスクリーニングを継続し、排出ポンプ阻害活性を有する新規物質の探索を行っている。
[高野幸枝、新見昌一、上原至雅;K Niimi、BC Monk、RD Cannon(オタゴ大学);奥田 徹、沖 俊一(玉川大学]

2. 癌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 阻害剤により anoikis 感受性になる細胞があり、その時 BH3-only protein である BimEL の蛋白量が増加していることを報告した。in vitro で BimEL は ERK により69番目のセリンがリン酸化された。抗リン酸化特異的抗体を作製し、この残基が実際に細胞内でもリン酸化されることを確認した。変異体を用いた実験から、セリン 69 のリン酸化はユビキチン化の引き金となっていることが明らかとなった。癌によってはリン酸化に依存した、ユビキチンープロテアソーム系による BimEL の分解が生存に重要であり、MEK 阻害剤はその過程を阻害し、蛋白質量を増加させて anoikis 感受性を誘導することが示された。
[深澤秀輔、野口耕司、村上裕子、上原至雅]

(2) polyHEMA 細胞培養法による癌化シグナル抑制物質の探索
新規抗癌剤リードの発見をめざし、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。アオキの葉内生放線菌として分離され、*Streptomyces thermoviolaceus* TP-A0648 と同定された放線菌の産生する癌化シグナル抑制物質 TT-2149-C が新規物質であることを確定した。また、真菌由来の新規テルペノイド anicequol の作用を解析し、足場非存在下の細胞においてのみ apoptosis を誘導することを見いだした。anicequol の構造活性相関の解析が進展したので、この知見を生かした新規誘導体の創製を行っている。
[上原至雅、福田恵子、小野基子、深澤秀輔;五十嵐康宏、古米 保(富山県立大);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評価を担当しており、今年度は 128 検体(延べ 39 人)の評価を行った。その結果、有効と判定されたのは 10 検体であった。このうち、有機合成に新しい試みがなされた JCI-12296、12298 等の化合物に興味深い結果が得られた。これらは、JCI-12294(lavendasutin C)の骨格を出発物質とし、ホウ素(Boron)を導入することにより標的蛋白との共有結合を可能にすることで、より強力な EGFR インヒビターの開発をめざしたものである。これまでの化合物において、活性の増強はなかったものの、EGFR と Flt-1 の受容体型チロシンキナーゼの阻害スペクトルに変化が認められたので、今後さらに優れた誘導体の創製を行う。
[上原至雅、近藤潤子、福山まり、村上裕子、深澤秀輔;中村浩之(学習院大);矢守隆夫(癌研)]

3. 持続性感染に関わるウイルス蛋白質複合体の解析
(1) EB ウイルス EBNA1 蛋白質複合体の解析
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 EBNA1 蛋白質に Flag 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。昨年に引き続き EBNA1 蛋白質複合体の解析をした。マスによって同定された蛋白質は、HAUSP/USP7、TAF-Iα、β、 CKII、p32/TAP であった。現在、TAF-Iα、β、CKII との関係について解析を進めている。
[山越 智、村上裕子、上原至雅、深澤秀輔]

(2) HHV-8 LANA 蛋白質複合体の解析
LANA 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保有する様々な抗ヒト核内蛋白質抗体を用いて試みた。50 種類の抗体を用いて調べたところこれまで報告されていない 2 種の蛋白質を同定した。
[山越 智、村上裕子、上原至雅、深澤秀輔]

(3) HIV-1 tat 蛋白質複合体の解析
HIV-1 tat 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を調べた。電気泳動上で 30 種類以上の蛋白質を検出した。現在、その同定を試みている。
[山越 智、村上裕子、上原至雅、深澤秀輔]

(4) HHV-8 LANA の機能解析
HHV-8 LANA の機能を調べるため、LANA が細胞内で結合する分子を探索し Daxx を同定した。Daxx は転写因子 Ets1 の活性を抑制するとの報告があるので、293T 細胞を用いて Ets1 に依存して発現する VEGF レセプター1 のレポーターアッセイ系をつくった。カポジ肉腫組織に多く発現している VEGF レセプター1 の発現は、Daxx により抑制された。この系に LANA を導入したところ、発現は再活性化した。ウエスタンブロットを行うと、LANA 導入量依存的に LANA と Daxx の結合が増加し、Daxx と Ets1 との結合は逆に減少していた。LANA は Daxx と結合し、Ets1 に対する Daxx の転写抑制作用を解除して VEGF レセプター1 を発現させることが示唆された。
[村上裕子、山越 智、近藤潤子、上原至雅、深澤秀輔]

4. プロテインキナーゼ Nek11 の機能解析
我々が発見したヒト新規プロテインキナーゼ Nek11 は、アスペルギルス NIMA キナーゼに類似している細胞周期関連分子である。昨年度までの解析から、この Nek11 は DNA 複製が阻害されると活性化することが示されている。この活性化機構を解明するため Nek11 と相互作用する因子を探索したところ、Nek11 の活性化因子として新たに Nek2A を同定した。また細胞周期の間期において Nek2A と Nek11 が共に Nucleolus(核小体)に局在することが明らかになり、哺乳類の NIMA キナーゼファミリーが Nucleolus において何らかの機能を持つことが示唆された。
[野口耕司、深澤秀輔、上原至雅]

5. DNA 損傷応答における poly(ADP-リボース)合成酵素

−1 による ATM キナーゼ活性制御

ATM (ataxia telangiectasia mutated)は、DNA損傷による細胞内応答を調節する。昨年度はPARP−1 (poly(ADP−ribose) polymerase−1)とATMの相互作用を検討した結果、DNA損傷におけるPARP−1 のクロマチン画分への局在性増加や、DNA損傷を誘導した*Parp−1*$^{-/-}$細胞におけるATM活性の著しい亢進を報告した。本年度はin vitroのATM活性におけるPARP−1 の影響を検討し、DNA存在下においてATM活性を阻害した。以上から、PARP−1 はATM活性を抑制的に調節することが示された。

［渡邊文晶、深澤秀輔、上原至雅；益谷美都子（国立がんセ）；鈴木宏志（中外製薬）；水谷修紀（東京医歯大）］

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と病原性因子の解析

(1) *Candida glabrata* ABC タンパク質 Cdr1p のリン酸化による薬剤排出活性と ATP 加水分解活性の調節

病原真菌 *Candida glabrata* のABCタンパク質、Cdr1pとPdh1pはアゾール系抗真菌薬耐性の主要な原因となっている。我々は、Cdr1pとPdh1pを出芽酵母において大量発現させて、タンパク質のリン酸化状態と薬剤排出機能の相関を調べた。抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット解析により、両者はそれぞれ異なるPKAの触媒サブユニットによってリン酸化されること、またそのリン酸化量がストレスや栄養条件によって変動することを明らかにした。さらに、Cdr1pの予測されるリン酸化部位を変異させたタンパク質を用いて解析を行った。その結果、307 番目のセリンと、484 番目のセリンをアラニンに置換させると、リン酸化量と酵素活性が低下し、薬剤耐性能も低下することを明らかにした。これらのリン酸化部位は近傍にあるABCタンパク質の機能にとって重要であるNBD（nucleotide binding domain）の活性を調節し、タンパク質全体の機能を調節するものと考えられる。

[和田俊一、田辺公一、山崎亜希子、新見昌一、上原至雅；K Niimi、E Lamping、RD Cannon、BC Monk（オタゴ大学）]

(2) *Candida albicans* におけるプロテインキナーゼ CaHsl1p および下流の経路の解析

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。これらの表現型は、活性型変異体 CaCdc28p(Y18F)の導入や *CaSWE1* 遺伝子の破壊により抑制されたことから、CaHsl1p−CaSwe1p−CaCdc28p の経路が細胞の伸長に関わっていることが示唆された。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、*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］

(3) *Candida albicans* におけるサイクリン依存性プロテインキナーゼ CaCdc28p 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（HWP1, ECE1等）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CaEfg1pおよびCaNrg1p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、上原至雅、新見昌一］

(4) *Candida albicans* におけるダブルタグ法を用いたセプチン複合体の精製

カンジダのゲノム解読が完成間近であるが、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。酵母の出芽部位に出現し、形態を制御しているセプチンの構成因子 Cdc11p と相互作用する蛋白を精製し、質量分析によって同定を行った。相互作用する蛋白を精製するために、Cdc11p の C 末端に 6xHis タグおよび FLAG タグ（ダブルタグ）をタンデムに付加し、抗 FLAG 抗体アガロースおよびニッケルキレートレジンの二段階の精製によって Cdc11p 複合体を回収する方法を確立し、得られた複合体の構成因子として既知のセプチン構成因子を質量分析で確認した。また、同定された各々の蛋白質にダブルタグを付加した株を作製し、同様に精製を行ったところ、いずれの株においても5つの蛋白質が認められた。以上の結果から、ダブルタグを用いた二段階精製の有効性と、C. albicans におけるセプチン複合体においてこれらの蛋白質が相互に複合体を形成していることを明らかにした。

［金子亜希、梅山 隆、上原至雅、新見昌一］

(5) *Candida albicans* におけるプロテインフォスファターゼをコードする遺伝子の網羅的な破壊

公開されている *C. albicans* のゲノム情報より 29 種類のプロテインフォスファターゼ (CaPPase)を見出した。通常二倍体である *C. albicans* の 2 つの相同染色体部位を別々に破壊するため、簡便な遺伝子破壊法を開発し、29 種類の CaPPase の中で既に破壊が報告されている遺伝子、致死的であると推定される遺伝子を除く、22 種類の CaPPase についての破壊に成功した。破壊株の増殖や形態変換能、各種抗真菌剤に

対する感受性等の表現型を中心に網羅的な解析を行った結果、いくつかの欠失株に特徴的な表現型が認められたが大半は顕著な表現型を示さなかった。これら破壊株の表現型をより詳細に解析することによって、形態変換・病原性に関するシグナル伝達経路の解明につながることが期待できる。
[花岡　希、梅山　隆、上野　圭吾、上原至雅、新見昌一]

(6) *Candida albicans* における *CaSIT4* 遺伝子の解析
プロテインフォスファターゼ PP2A をコードしている *CaSIT4* の遺伝子破壊株は親株と比較して顕著な成育の遅延が観察された。CaSit4p が酵母形、菌糸形生育条件下で構成的に発現していることを示した。血清を用いた菌糸誘導条件下では破壊株の発芽管形成は遅れるが、ノーザン法を用いた解析では既知の形態変換経路に影響を与えないことを示した。マウスに対する感染実験では *CaSIT4* 遺伝子欠失株は野生株に比べて病原性が低下した。以上から、*CaSIT4* 遺伝子を介する新たな菌糸形変換経路の存在が示唆された。
[花岡　希、梅山　隆、上原至雅、新見昌一]

(7) *Candida albicans* における *CaYVH1* 遺伝子の解析
二重特異性蛋白脱リン酸化酵素をコードしている *CaYVH1* 遺伝子の破壊株は親株と比較して顕著な成育の遅延が観察された。また、血清を用いた菌糸誘導では、発芽管誘導には影響を与えないが菌糸伸張に差のあることを見いだした。マウスに対する感染実験では *CaYVH1* 遺伝子欠失株は野生株に比べて病原性が低下した。以上のことから細胞の増殖や菌糸伸長、病原性に関わることを明らかにした。
[花岡　希、上野　圭吾、梅山　隆、上原至雅、新見昌一]

2.　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
野生型、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)ノックアウトマウス、および CGD マウスのカンジダ菌に対する生体防御能を比較した。その結果 MPO は多量の菌が感染した際の初期生体防御機構として、NADPH オキシダーゼと同等の重要性を有していることが判った。
[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) *Cryptococcus neoformans* 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の役割
活性化された好中球から産生される活性酸素の個体レベルでの生体防御に果たす役割は必ずしも明確ではない。我々は、MPO ノックアウト(MPO-KO)マウスを作製し、クリプトコッカス感染に対する生体防御における MPO の役割を解析した。
[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）]

(3) 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）]

(4)マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討
C. albicans アルカリ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することによる系統的血管炎惹起モデルを確立し、検討した。その病理組織学的には冠状動脈、大動脈などに増殖性炎が認めら、CD11b 陽性細胞に混じて少数の CD4 陽性細胞、CD8a 陽性細胞、CD45RB 陽性細胞が認められた。
[鈴木和男、大川原明子；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）]

(5)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
昨年にひきつづき、*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWSのDBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性について解析した。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は認めず、CAWS接種マウス血漿中に存在する可溶性成分に効果を認めた。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；三川浩輝, 安達禎之, 三浦典子、大野尚仁（東薬大・免疫）；大原関利章、高橋啓、山田仁美、直江史郎（東邦大・医・大橋）]

(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。また、日本においてこれまで解析された MPO 欠損症のうち完全欠損例 3 例のうち 2 例は点突然変異で 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 の変異頻度を求めた。

[鈴木和男、Amanda Persad；亀岡洋祐、橋本雄之（遺伝子資源）]

(7)真菌多糖の in vitro における IFN-gamma 産生増強作用の検討

様々な strain のマウス脾細胞を真菌多糖 SCG の共存下 48 時間培養し，サイトカイン産生を測定した結果、DBA/2 のみが高い反応性を示し IFN-γ 産生を増強した。また、IL-12p70 産生の増強が観察され、IL-10 産生誘導は観察されなかった。

[鈴木和男；原田敏江、三浦典子、大野尚仁（東薬大・免疫）]

(8)真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響ーIRF-8 欠損マウスの解析ー

IRF-8 遺伝子欠損マウスにおいて、骨髄細胞由来白血球の分化誘導における真菌由来多糖の影響を検討した。GM-CSF の共存下に SCG を添加により、TNF-α，IL-6 が上昇した。GM-CSF と IL-4 の共存下にて培養し樹状細胞を誘導により、SCG の添加によって CD80 の発現が上昇するとともに、培養上清中の TNF-α および IL-6 が上昇した。LPS では、これらの傾向は認められなかった。以上から、本欠損マウスの myeloid 系細胞は、真菌多糖に強く反応し、樹状細胞の分化および成熟が促進され、MPO-ANCA 産生能との関連を示唆した。

[鈴木和男；栗原和記（東京理科大）；原田敏江、三浦典子、安達禎之、大野尚仁（東薬大・免疫）；Keiko Ozato（米国 NIH）]

(9) *Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性

CAWS の腹腔内投与により、C3H/HeN、DBA/2、C57BL/6 は高い IL-6，IFN-γ 産生が認められたが、CBA/J では認められなかった。一方，IL-10 産生においては CBA/J の方が高かった。

［大川原明子、鈴木和男；新郷裕子、三浦典子、大野尚仁（東薬大・免疫）；大原関利章、高橋 啓、直江史郎］

III. 好中球機能解析及びその機能不全の解析

(1)腎炎発症 SCG/Kj マウスにおける脾臓 MPO

SCG/Kj マウスは、血漿 MPO-ANCA 活性は週齢に従って上昇した。脾臓重量は週齢にしたがって約 10 倍に腫大し、リンパ小節の増生と赤脾髄の脾細胞と多核白血球の増加が見られた。Gr-1 陽性細胞が週齢に従って増加した。脾臓組織中の MPO mRNA 発現も週齢および Gr-1 陽性細胞の比率に従って増加した。脾臓における骨髄系細胞の分化が SCG/Kj マウスの血管炎の進行にかかわっている可能性がある。

[大川原明子、鈴木和男、；太刀川仁、相澤義房（新潟大・院医）；徳中一寛（日本化薬）]

(2)MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝的解析

SCG/Kj マウスは、MPO-ANCA の上昇と pauci-immune 型半月体形成性腎炎を自然発症する興味深いモデルである。SCG/Kjの腎炎発症機構と免疫学的形質の支配遺伝子の解明を試みた。

[鈴木和男、大川原明子；濱野慶朋、広瀬幸子（順天堂大・医）；徳中一寛（日本化薬）]

(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

昨年にひきつづき、ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン(IVIg) 治療効果を検討した。ACNA 関連急速進行性糸球体腎炎・血管炎症候群 13 例にヒト免疫グロブリン(400mg/kg/日，5 日間)で初期治療を行った。臨床的治療効果判定を Birmingham vasculitis activity score (BVAS), CRP, 1/Cre 変化率を用いて評価した。IVIG 治療後の BVAS, CRP は有意に低下。1/Cre 変化率は有意に上昇し、腎機能の改善がみられた。IVIg 治療は MPO-ACNA 関連腎炎血管炎症候群において有効な補助療法になり得ると考えられた。

［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) 血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討

昨年度にひきつづき、検討した。血管炎発症の初期機構を解析する目的で、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における IL-1β および TNF-α による apoptosis 誘導時のシグナルを解析した。p38 の燐酸化が認められ、好中球による誘導も観察された。

[鈴木 和男、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)植物の Nox の機能と Ca2+を介した活性調節機構

昨年にひきつづき、植物の Nox の機能と Ca2+を介した活性調節機構について解析した。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、O2- 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）]

(6)CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type Ⅱコラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制

CD69 ノックアウトマウス（CD69—KO）を樹立し、本分子の関節炎発症における役割を解析した。CD69-KO では、関節炎の発症が有意に抑制され、Wild type の好中球を CD69-KO に移入したところ、関節炎の発症は完全に回復したことから、好中球に発現する CD69 分子が重要な役割をもつことがわかった。

[鈴木和男、長尾朋和；村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、谷口克、中山俊憲（千葉大・院医]

(7)活性化好中球における CD69 分子の表面局在

血管炎の発症の要因の一つとして、活性化した好中球の影響が考えられている。活性化した好中球の細胞膜表面に局在してくる分子の一つに CD69 分子があり、好中球活性化による本分子の局在変化を解析した。

[鈴木和男、長尾朋和、越尾　修;村山　研、新井孝夫(東京理科大・理工);長谷川明洋、中山俊憲(千葉大・院医)]

IV.　バイオイメージング解析

(1)活性酸素誘導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

昨年にひきつづき検討した。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。CD69 ノックアウトマウスを樹立し、関節炎モデル及び血小板血栓形成のイメージングシステムを用いて解析した。CD69-KO では、関節炎の発症が有意に抑制され、浸潤している好中球での CD69 の役割が示唆された。また、CD69-KO と wild type との間で血小板血栓によって血流が停止するまでの時間を比較したところ、明らかに CD69-KO の方が血流停止により長い時間を要した。

［鈴木 和男、長尾 朋和;伊藤明洋、村田　薫、稲見真倫、中山俊憲(千葉大・院医)］

(2)免疫異常による腎微小血管傷害のイメージング

昨年度にひきつづき、免疫異常による腎臓血管傷害のイメージング解析を検討した。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。腎微小血管傷害の誘導とその血流動態の観察について検討し、anti-mMPO 投与により、血流停止、広範囲にわたる腎表面血流の悪化が観察された。

［鈴木 和男、長尾 朋和、越尾 修;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) In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析

in vivo において、好中球活性化による血管傷害機構の解明を目的とし、腎微小血管傷害の誘導とその血流動態の観察について検討した。

[鈴木和男、長尾朋和、越尾　修、馬渕綾子;大野尚仁(東京薬大);高橋　啓、南谷晴之、直江史郎(東邦大・医)]

(4)生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用

量子ドット(Quantum dot: QD)は直径 4 ナノメートル前後の超微粒子で、その量子サイズ効果による蛍光は高輝度かつ耐光性に優れていることが知られている。 これらの特性のため QD は従来の有機色素に替わる蛍光標識物質としてライフサイエンス分野における幅広い応用が推進されている。 今回我々は、生体内に移入した細胞を高感度に追跡する実験系へ QD を応用する方法について検討した。また、セレン化カドミウム/硫化亜鉛・コア/シェル型量子ドットの蛍光は、高輝度かつ耐光性に優れている特性をもつ。この特性を利用して生体内に移入した細胞を高感度に追跡する実験系における QD の応用を検討した。

[鈴木　和男;星野昭芳、花木賢一、山本健二(国立国際医療センター研・医療生態)]

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関節炎モデルの解析

昨年までに、抗コラーゲン抗体をもちいてノックアウトマウスに関節炎を誘導すると、野性型マウスに比べ関節炎が重篤化し、炎症性サイトカインの亢進が見られることを報告した。今回、LECT2 遺伝子をノックアウトマウスに導入しその影響を調べた。その結果、関節炎は軽減化し、LECT2 が関節炎の抑制効果を持つことが推定された。

［奥村彰規、大川原明子、鈴木和男、山越　智］

(2) LECT2 トランスジェニックマウスの解析

3 系統樹立したうちの2系統についてこれまで維持することができた。LECT2 遺伝子を数コピー有する Tg33 について解析を行った。ニワトリのアクチンプロモーターを用いた為、血球細胞に発現し、組織特異的な発現を検討できなかった。野性型では、60-80ng/ml の血中 LECT2 濃度が、このマウスでは 1ug/ml 以上の高発現をしていることが判った。さらに肝臓 NKT 細胞の割合を調べたところ、野性型に比べて約 1.3 倍の有意な減少が見られた。

［奥村彰規、鈴木和男、山越　智］

(3) マウス脳における LECT2 の発現解析

昨年度にひきつづき、LECT2 の脳での役割を検討した。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;奥水洋平、古賀大輔、大富美智子(東邦大・理)]

(4) 好中球走化性因子 LECT2 の X 線結晶構造解析

昨年度にひきつづき検討し、40μm 程度の太さの硬い棒状の良質な結晶も得られた。X 線回折強度測定を行ったところ、約 2Åの分解能までの回折データを得ることができた。

[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)]

(5) 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

昨年度にひきつづき、LECT2 の多型における構造の安定

性について解析した。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。LECT2 の3次構造をあきらかにするために、得られた NMR データを理論的に補強し、構造解析を行った。

［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. 抗生物質耐性と放線菌ゲノムに関する研究

1. アミノグリコシド耐性 MRSA に関する研究

(1) ブドウ球菌におけるコアグラーゼ遺伝子型とコアグラーゼ血清型との関連

304 株のブドウ球菌のタイピングとして昨年度までに確立したコアグラーゼ遺伝子（*coa*）型別（3’末端繰返し領域 PCR–*Alu*I RFLP）とコアグラーゼ血清型（8 パターン）との相関性を試験した。*coa* 遺伝子型 31 タイプ中、28 タイプの菌株はそれぞれ同一の血清型を示した。各血清型には異なる *coa* 型が含まれていた。また、*coa* 遺伝子型に相関するアミノグリコシド（AG）耐性プロファイルが存在る。以上のことから、AG 耐性菌の動向を調査する場合、*coa* 遺伝子型のモニタリングが有用と判断された。

［石野敬子、土崎尚史（日本微生物クリニック）、堀田国元］

(2) *In vitro* アルベカシン耐性化 MRSA の機能解析

アルベカシン（ABK）濃度勾配選択培地により MIC が 8 倍上昇した 5 系統の ABK 耐性 MRSA を得た。4 系統でアミノグリコシド（AG）アセチル化およびリン酸化修飾活性の上昇が、2 系統で AG 修飾二機能酵素の mRNA およびタンパク量の増加が認められた。また、AG 修飾活性の変化を認めない 1 系統においては、増殖能の顕著な低下を示し、AG 修飾酵素以外の耐性因子の存在が示唆された。

［石野敬子、松本 寛、堀田国元］

(3) MRSA に対するアミノグリコシド抗生物質の有効性評価法

MRSA のアミノグリコシド（AG）耐性を左右する鍵因子が AAC(6’)/APH(2″)遺伝子であり、この遺伝子を保持する菌株は必ず gentamicin (GM)耐性を示す。このことを基に、この遺伝子を保持する MRSA 菌株に対する kanamycin (KM)系 4 種と GM 系 4 種の AG の有効性を、GM 耐性を横軸、比較対象 AG 耐性を縦軸にプロットすることにより評価する方法を確立した。この方法により、半合成 AG が天然 AG より有効性が高く、中でも arbekacin (ABK)の有効性の高さが一目瞭然に観察可能となった。

［堀田国元、土崎尚史（日本微生物クリニック）、石野敬子］

2. 強酸性電解水に関する研究

(1) 強酸性電解水処理によるアミノ酸からの塩化物の生成

強酸性電解水の主殺菌要因が次亜塩素酸（HOCl）であることから、酸性電解水処理によってアミノ酸のアミノ基の塩化反応が起きるかどうかを Rydon–Smith 反応の原理に従って検討した。メチオニンを処理した結果、塩化物の生成が確認された。なお、昨年度、酸性電解水処理によってメチオニンの S の一酸化物と二酸化物の生成を確認している。

［堀田国元、土崎尚史（日本微生物クリニック）］

3. 放線菌のゲノム解析

(1) *Nocardia farcinica* IFM 10152 のゲノム解析

前年度に得たドラフト配列に残るギャップ部分の塩基配列を、プライマーウォーキング法、転写シークエンス法等を用いて決定し、完成配列を得た。IFM 10152 のゲノムは 6,021,225–bp の環状染色体と 184,027–bp ならびに 87,093–bp の環状プラスミドからなり、染色体上に、病原性因子、薬剤耐性因子ならびに二次代謝産物生合成遺伝子を含む、5,674 個のタンパク質コード遺伝子を見出した。

［石川 淳、 山下敦士（北里生命科学研究所）、栗田晴代、三上襄（千葉大）、星野泰隆（千葉大）、柴忠義（北里大）、服部正平（北里生命科学研究所）］

(2) *Nocardia farcinica* IFM 10152 の *rpoB2* 遺伝子のリファンピシン（Rif）耐性への関与

IFM 10152 株における *rpoB2* 遺伝子の発現を RT–PCR およびリアルタイム RT–PCR 法で解析した結果、Rif 存在下では非存在下に比べて発現が約 8 倍上昇することが明らかになった。また、*rpoB2* 遺伝子は *Nocardia* 属に広く分布しており、Rif 耐性ともよく相関することから、*rpoB2* 遺伝子の Rif 耐性への関与が強く示唆された。

［石川 淳、栗田晴代、堀田国元］

(3) *Streptomyces griseus* IFO 13350 のゲノム塩基配列の決定

ストレプトマイシン生産菌 *S. griseus* のゲノム塩基配列の決定をホールゲノムショットガン法を用いて行い、約 56,000 リードから約 1,200 個の contig を得た。

［石川 淳、大西康夫（東京大学）、堀之内末治（東京大学）、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. 我が国における輸入真菌症のサーベイランス

―ヒストプラスマ症およびトリコスポロンに関する調査―

［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）、渋谷 和俊（東邦大学医学部・病院病理学研究室）、上 昌広（国立がんセンター中央病院・薬物療法部）杉田 隆（明治薬科大学・微生物学教室）］

(1) 輸入真菌症のサーベイランス

輸入真菌症は病原性がきわめて強いため、患者の発生は医療制度を始め様々な問題となる。これまでの発生総数はコクシジオイデス症 36 例、ヒストプラスマ症 40 例、パラコクシジオイデス症 18 例である。コクシジオイデス症、ヒストプラスマ症は増加を続けている。特にヒストプラスマ症には、国内感染の可能性など問題が多く、実態の把握と届出制度の設定が急

務である。

(2) 我が国のヒストプラスマ症に関する調査

国内報告 40 例の内、17%は国内での感染が疑われている。ヒストプラスマはコウモリの腸管に生息し、洞窟入洞後に呼吸器症状を呈する急性ヒストプラスマ症を海外では「洞窟熱」と称している。そこでコウモリの多い洞窟環境内を対象に調査したが、24 箇所の洞窟の 62 サンプルからはヒストプラスマは検出されなかった。今回の調査はコウモリの冬眠時期に行われ、アンケート調査で入洞後に呼吸器症状を呈したとされる洞窟は対象に入っておらず、ヒストプラスマの検出条件を十分に満たしていなかったからであろう。今後はコウモリが活動し始める春以降、また入洞後に呼吸器症状を呈する人が発生した洞窟についても調査を行う必要がある。抗ヒストプラスマ抗体について、洞窟探検家を対象に症状の有無との関連性を大規模に調査する必要がある。

(3) コウモリグアノ中の *Trichosporon* の検出

Trichosporon が多数分離された。環境中の *Trichosporon* 分生子を反復吸入すれば III/IV 型アレルギーである夏型過敏性肺炎を発症する。*Trichosporon spp.*は血清学的には 4 型に大別されるが、グアノから分離された株は II 型以外のすべての血清型が含まれていた。入洞後、呼吸器症状を呈した 3 例のうち 2 例から I および III 型に対する抗 *Trichosporon* 特異抗体が検出され、菌相解析の結果と相関した。従って、呼吸器症状の原因に *Trichosporon* が関与している可能性が考えられる。今後も継続的な血清学および真菌学的な調査が必要である。

(4) 抗 *Histoplasma capsulatum* 抗体保有率の検討

陽性者は確認されなかった。この原因として、対象被検者数が少ない、測定に用いた抗体価が感染後1年から劇的に低下する等の理由が考えられる。対応策として、十分な準備・実施期間を用意し、十分な被検者数を設定する必要性があり、高感度の抗体検出の開発・採用(ELISA 法等)や持続性のある検査方法の開発・採用(リンパ球刺激試験)等が考えられるが、後者は検体の保存に難点があり、抗体測定には、交差抗原性による特異度の問題が存在することにも注意を要する。より特異性が高い血清検査法を用いて、確実な国内感染例を確認する事が必要になろう。ヒストプラスマ症に関する十分な情報を提供し、本症起因菌の分離／培養／同定のプロセスを積極的にサポートする体制の整備が必要である。

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Gutzkow, K. B., Lahne, H. U., Naderi, S., Torgersen, K. M., Skaalhegg, B., Koketsu, M., Uehara, Y. and Blomhoff, H. K.: Cyclic AMP inhibits translation of cyclin D3 in T-lymphocytes at the level of elongation by inducing eEF2-phosphorylation. Cell. Signalling 15, 871-881, 2003.

2) Uehara, Y.: Natural product origins of Hsp90 inhibitors. Current Cancer Drug Targets 3, 319-324, 2003.

3) Hori, H., Nagasawa, H., Uto, Y., Ohkura, K., Kirk, K. L., Uehara, Y., Shimamura, M.: Design of hypoxia-targeting protein tyrosine kinase inhibitor using an innovative pharmacophore 2-methylene-4-cyclopentene-1,3-dione. Biochim. Biophys. Acta 1697, 29-38, 2004.

4) Matsuoka, T., Kato, K., Hoshino, N., Matsunaga, T., Saito, N., Suzuki, K., Yamada, M., Shimojo, N., Kono, Y., Arai, T. and Suzuki, K.: Disorganization of actin polymerization in neutrophils of a patient with leukocyte adhesion dysfunction: A bioimaging analysis using a polarized microscopic system LC-Pol scope. Bioimages 11, 105-114, 2003.

5) Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F. and Suzuki, K.: Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. Free Radical Research 37, 481-489, 2003.

6) Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M, Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H. and Nakayama, T.: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. Int. Immunol. 15, 987-992, 2003.

7) Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H. and Suzuki, K.: Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan. Microbiol Immunol. 47, 527-531, 2003.

8) Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K. and Nakayama, T.: Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. Bioimages 11, 1-8, 2003.

9) Suzuki, K.: Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis. Internal Med. 42, 552-553, 2003.

10) Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K. and Suzuki, K.: Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. Gene 327, 195-200, 2004.

11) Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K.: Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. Biochem. Biophys. Res. Comm. 314, 46–53, 2004.

12) Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M.,

Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. and Omura, S.: Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. Nature Biotechnol. 21, 526-531, 2003.

13) Ikebe T., Murai N., Endo M., Okuno R., Murayama S., Saitoh K., Yamai, S., Suzuki R., Isobe J., Tanaka D., Katsukawa C., Tamaru A., Katayama, A., Fujinaga Y., Hoashi K., Ishikawa J. and Watanabe, H.: Changing prevalent T serotypes and emm genotypes of *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock-like syndrome (TSLS) patients in Japan. Epidemiol. Infect. 130, 569-572, 2003.

14) Lamb, D. C., Ikeda, H., Nelson, D. R., Ishikawa, J., Skaug, T.,Jackson, C., Omura, S., Waterman, M. R. and Kelly, S. L.: Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 610-619, 2003.

2. 和文発表

1) 上原至雅:抗癌物質、in vitro、clonogenic assay「生物薬科学実験講座第 13 巻抗生物質 I」(國元、長縄編)pp175-178、廣川書店、2003.

2) 上原至雅:抗癌物質、in vitro、oncogene 発現「生物薬科学実験講座第 13 巻抗生物質 I」(國元、長縄編) pp184-187、廣川書店、2003.

3) 上原至雅:プロテインキナーゼ阻害薬、がん分子標的治療 1(テーマ:分子標的治療薬の開発戦略)、18-25、メディカルレビュー社、2003.

4) 上原至雅:がん細胞のシグナル伝達、臨床腫瘍学第 3版 pp16-26(日本臨床腫瘍学会編)、癌と化学療法社、2003.

5) 鈴木和男: 血管炎をめぐる世界の動き. 医学のあゆみ 206, 123-126, 2003.

6) 鈴木和男: 血管炎発症機構の解析研究―活性化好中球の関与. 医学のあゆみ 206, 133-139, 2003.

7) 鈴木和男: ANCA 関連血管炎の発症機序―活性化好中球の関与. リウマチ科 29, 228-236, 2003.

8) 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀 寛、根本久一:半月体形成性腎炎モデルとしての SCG/Kj マウスの好中球機能. Pharma. Medica. 21, 157-161, 2003.

9) 石川 淳, 堀田国元: 放線菌への遺伝子導入.「生物薬科学実験講座 13 抗生物質 (國元武彦, 長縄博 編集)」, pp.388-394, 廣川書店、2003.

10) 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の展望－迅速簡便なゲノムモニタリングによる耐性菌の動向予測－. 獣医畜産新報 56、846-849、2003.

11) 土屋桂、堀田国元: 酸性電解水と酸化還元電位. 機能水研究 2、9-15、2003.

12) 堀田国元、糸川嘉則: 電解機能水の進歩と 21 世紀の医療における展望. 第 26 回日本医学会総会会誌 [I], p.27、2003.

13) 石川 淳: 創薬ターゲットとしての放線菌ゲノム. Bio ベンチャー 4、26-29、2004.

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

1) Niimi, M., Wada, S., Kaneko, A., Tanabe, K., Takano, Y., Umeyama, T., Uehara, Y., Lamping, E., Niimi, K., Holmes, A.H., Monk, B.C., and Cannon, R.C.: An efficient system for functional hyper-expression of multidrug efflux pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. Frontier Studies and International Networking of Genetic Resources in Pathogenic Microorganisms, November 21-22, 2003, Tokyo.

2) Umeyama, T., Kaneko, A., Nagai, Y., Niimi, M. and Uehara, Y.: CaHsl1p protein kinase regulates cell elongation and virulence in *Candida albicans*. ASM Conferences on *Candida and Candidiasis* (7th) March, 2004, Austin, USA.

3) Kaneko, A., Umeyama, T., Uehara, Y. and Niimi, M.: A tandem affinity purification of the septin protein complex in *Candida albicans*. ASM Conferences on *Candida and Candidiasis* (7th) March 18-22, 2004, Austin, USA.

4) Cannon, R.D., Tsao, S., Ong, S., Niimi, K., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B.C. and Holmes A.R.: Allelic variation affecting drug pump function in Candida albicans. ASM Conferences on *Candida and Candidiasis* (7th) March 18-22, 2004, Austin, USA.

5) Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., and Uehara, Y.: Mechanism of induction of anoikis sensitivity in breast cancer cell lines by MEK inhibitors. 2003 AACR-NCI-EORTC International Conference. Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Biology, and Clinical Applications. November 17-21, 2003. Boston, MA, USA.

6) Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., Uehara, Y.: Mitotic protein kinase Nek11 as a novel target for Nek2. 2003 AACR-NCI-EORTC International Conference. Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Discovery, Biology, and Clinical Applications. November 17-21, 2003. Boston, MA, USA.

7) Uehara Y.: Induction of anoikis sensitivity of cancer cells by signal transduction inhibitors. 21th Century Tokyo Tech COE, 1st Itnl Symp Chem

Biol-Regulation of signal transduction and cancer. March 23, 2004. Tokyo International Forum.

8) Suzuki, K.: Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging. Seminar in the Department of Biochemistry, New York City, USA.

9) 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. Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.

10) Suzuki. K.: Role of activated neutrophils in vasculitis development. Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.

11) Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A., Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani, H., Suzuki, K..: Imaging of renal microvascular injury induced by immune abnormality. Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.

12) Koshio, O, Nagao, T., Ishida-Okawara, A., Mabuchi, A., Suzuki, K.: The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human endothelial cell. Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.

13) Okumura, A., Saito, T., Otani, I, Okawara-Ishida, A., Kanayama, K, Asano, M., Iwakura, Y., Suzuki, K., Yamagoe, S.: Early onset and facilitate severity of monoclonal antibody-induced arthritis in LECT2-deficient mice. Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.

14) Suzuki. K.: Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging. Seminar in Marine Biological Laboratories, Woods Hole, USA

15) Suzuki. K.: In-vivo Imaging of Vasculitis. International Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, July. 19, 2003. Sapporo

16) Manger, B., Suzuki, K.: Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, Sep. 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland.

17) Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E.: Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, Sep. 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland.

18) Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M.: Induction of F4/80^{Mac-1} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?. American Association of Liver Diseases in 2003, Oct. 24-28, 2003, Boston, USA.

19) Ogasawara, Y., Yamagoe, S., Suzuki, K., Kuchitsu, K.: Functions and Ca^{2+}-mediated activation of a plant respiratory burst oxidase (nox) homolog. The 16th Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology, Oct. 28-30, 2003, Hayama, Japan.

20) Suzuki, K.: Cytokine levels in the development of vasculitis in human and mice. Seminar in Addenbrookes Hospital. 2004, Jan 29, 2004, Cambridge, UK.

21) Suzuki, K.: Contribution of MPO and neutrophil activation to vasculitis development -in vivo and in vitro. Seminar in Department Medicine-2004, Feb 23, 2004, San Antonio, USA.

22) Suzuki, K.: Contribution of MPO and neutrophil activation to vasculitis development -in vivo and in vitro. Seminar in Inflammation Group-2004, Feb 25, 2004, Iowa, USA.

23) Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Oshima, K., Furuya, K, Yoshino, C., Nakazawa, A., Shiba, T. and Hattori, M.: Genome sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. International Symposium of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba Univ., Nov. 2003, Shijuku, Tokyo.

24) Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Oshima, K., Furuya, K, Yoshino, C., Nakazawa, A., Hoshino, Y., Kurita, H., Shiba, T., Hotta, K. and Hattori, M.: The Genome Sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Dec. 2003, Melbourne, Australia.

2．国内学会等

1) 花岡 希、梅山 隆、新見昌一：*Candida albicans* における蛋白質脱リン酸化酵素の機能解析 第 76 回日本細菌学会総会、平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本.

2) 鳥海佳美、梅山 隆、杉田 隆、西川朱實、新見昌一：*Candida albicans* におけるサイクリン依存性プロテインキナーゼ CDC28 の発現抑制による影響 第 76 回日本細菌学会総会、平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本.

3) 梅山 隆、新見昌一：*Candida albicans* における形態形成に関与するプロテインキナーゼの解析 第 76 回

日本細菌学会総会、平成 15 年 4 月 1-3 日、熊本.
4) 梅山 隆:病原性真菌 *Candida albicans* における酵母−菌糸間の形態変換機構 日本生化学会関東支部シンポジウム、平成 15 年 4 月、東京.
5) 新見昌一:真菌の薬剤耐性機構と排出ポンプ阻害剤の探索、第 13 回感染研シンポジウム、平成 15 年 5 月 21 日、東京.
6) 梅山 隆、金子亜希、永井有紀、新見昌一、上原至雅:病原性酵母 *Candida albicans* における形態形成に関与するプロテインキナーゼの解析 第 36 回酵母遺伝学フォーラム、平成 15 年 7 月 24-26 日、かずさ.
7) 新見昌一、和田俊一、高野幸枝、上原至雅:*Candida glabrata* のアゾール系抗真菌薬耐性機構 第 36 回酵母遺伝学フォーラム、平成 15 年 7 月 24-26 日、かずさ.
8) 新見昌一:薬剤耐性遺伝子のパン酵母における発現と機能解析 第 47 回日本医真菌学会総会、平成 15 年 10 月 16-17 日、東京.
9) 梅山 隆、金子亜希、永井有紀、新見昌一、上原至雅:プロテインキナーゼによる *Candida albicans* の形態制御および病原性への関与 第 47 回日本医真菌学会総会、平成 15 年 10 月 16-17 日、東京.
10) 仲村健二郎, Erwin Lamping, 金子亜希, 久和彰江, 新見昌一, 青木茂治 *Cryptococcus neoformans* ABC 輸送体 CneMdr1p の *Saccharomyces cerevisiae* での発現と薬剤耐性 第 47 回日本医真菌学会総会、平成 15 年 10 月 16-17 日、東京.
11) 下川 修、新見昌一、青木茂治:*Candida albicans* ステロール 14 位脱メチル化欠損株に見られる酢酸塩による増殖停止現象の機序:活性酸素の関与の検討 第 47 回日本医真菌学会総会、平成 15 年 10 月 16-17 日、東京.
12) 金子亜希、梅山 隆、新見昌一、上原至雅:*Candida albicans* におけるダブルタグ法を用いた蛋白質複合体精製法の確立 第 26 回日本分子生物学会、平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸.
13) 梅山 隆、鳥海佳美、杉田 隆、西川朱實、新見昌一、上原至雅:病原性真菌 *Candida albicans* における *CDC28* の発現抑制による形態変化への影響 第 26 回日本分子生物学会、平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸.
14) 上原至雅:細胞がん化のシグナル伝達の解析と抗がん剤リードの探索、がん特定6領域合同研究発表会、平成 15 年 8 月 4-7 日、東京.
15) 山崎佳波、旦慎吾、上原至雅、矢守隆夫:ヒトがん細胞パネルによるプロテインキナーゼ阻害剤の包括的比較、第 62 回日本癌学会総会、平成 15 年 9 月 25-27 日、名古屋.
16) 村上裕子、山越 智、深澤秀輔:カポジ肉腫ウイルスの遺伝子 LANA の機能解析。第 51 回 日本ウイルス学会学術集会・総会、平成 15 年 10 月 27-29 日、京都.
17) 渡邊文晶、深澤秀輔、益谷美都子、鈴木宏志、水谷修記、上原至雅:DNA 損傷応答における poly(ADP−リボース)合成酵素-1 による ATM の キナーゼ活性制御。第 26 回日本分子生物学会年会平成 15 年 12 月 10-13 日、、神戸.
18) 野口耕司、深澤秀輔、上原至雅:G2/M 期関連キナーゼによる Nek11 の機能制御。第 26 回日本分子生物学会年会、平成 15 年 12 月 10-13 日、神戸.
19) 堀 浩、佐藤誠悟、五十嵐康弘、東岸和明、石山忠之、古米 保、沖 俊一、上原至雅:Hibarimicin の絶対配置とアトロプ異性、2004 年度日本農芸化学会、平成 16 年 3 月 28-31 日、広島.
20) 大津幸四郎、上原至雅、五十嵐康弘、尾仲宏康、古米 保:癌細胞足場非依存性増殖阻害剤 TT2149 に関する研究、2004 年度日本農芸化学会、平成 16 年 3 月 28-31 日、広島.
21) 小田佳史、伊藤三恵、山越智、山本健二、鈴木和男、田之倉優:好中球走化性因子 LECT2 の X 線結晶構造解析. 日本農芸化学会 2003 年度大会、平成 15 年 4 月 1 日-3 日、藤沢.
22) 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男、武曾恵理: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 46 回日本腎臓病学会学術総会、平成 15 年 5 月 23 日、東京.
23) 鈴木和男:血管炎の研究がめざす新たな展開:特に ANCA 関連血管炎. 第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日-18 日、札幌.
24) 高橋 啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎:マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討. 第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日-18 日、札幌.
25) 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、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 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日-18 日、札幌.
26) 原田敏江, 三浦典子, 安達禎之, 鈴木和男, 大野尚仁:真菌多糖の in vitro における IFN-産生増強作用の検討. 第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日-18 日、札幌.
27) 長谷川明洋、長尾朋和、村田 薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲:関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割. 第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日-18 日、札幌.
28) 越尾 修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬渕綾子、

鈴木和男：血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討．第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日−18 日、札幌．

29) 奥村彰規、斉藤　武、大谷　功、大川原明子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、金山喜一、鈴木和男、山越　智：関節炎モデルを用いた LECT2 の役割解析．第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日−18 日、札幌．

30) 奥水洋平、古賀大輔、山越　智、鈴木和男、大富美智子：LECT2 のマウス脳における発現解析．第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日−18 日、札幌．

31) 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：サイトカイン LECT2 の NMR および X 線を用いた立体構造解析．第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、平成 15 年 7 月 17 日−18 日、札幌．

32) 鈴木和男：レビュートーク：血管炎に関与するインターフェロンγ．第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

33) 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋　啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁：Candida albicans 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性．第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

34) 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁：真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響― IRF−8 欠損マウスの解析から―．第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

35) 越尾　修、長尾朋和、石田−大川原明子、馬渕綾子、鈴木和男：血管炎に関与するTNFαおよびIL−1βによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討．第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

36) 斉藤　武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、安保　徹、岩倉洋一郎、鈴木和男、山越　智：Concanavalin A 肝障害モデルを用いたサイトカイン LECT2 の機能解析．第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

37) 奥村彰規、斉藤　武、大谷　功、浅野雅秀、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 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、平成 15 年 7 月 23−24 日、東京．

38) 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山　研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋　啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦：血管炎発症における活性化好中球の関与．第14回日本生体防御学会、平成 15 年 7 月 31 日−8 月 2 日、京都．

39) 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato：血管炎に関与する異常好中球：IRF−8 ノックアウトマウスによる解析．第14回日本生体防御学会、平成 15 年 7 月 31 日−8 月 2 日、京都．

40) 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山　研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋　啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦：血管炎発症における活性化好中球の関与．第14回日本生体防御学会、平成 15 年 7 月 31 日−8 月 2 日、京都．

41) 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和：公開シンポジウム「ナノとバイオの融合　学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ．日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」シンポジウム、平成 15 年、9 月 10−11 日、松島．

42) 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾　修、馬渕綾子、南谷晴之：新しいイメージング技術へ向けて― IVI 技術（in−vivo imaging）―．日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」シンポジウム、平成 15 年、9 月 10−11 日、松島．

43) Wayne DAWSON、Mie ISHIDA、Yosuke KAMEOKA、Satoshi YAMAGOE、Yasuhiro FUTAMURA、Kenji YAMAMOTO、Masaru TANOKURA、Kazuo SUZUKI：Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies．日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」シンポジウム、平成 15 年、9 月 10−11 日、松島．

44) 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男：糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割− SCG/Kj マウスを用いた解析．第15回腎とフリーラジカル研究会、平成 15 年 9 月 20 日、東京．

45) 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬渕綾子、鈴木和男：The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell. 第 76 回日本生化学会大会、平成 15 年 10 月 16 日−18 日、横浜．

46) 鈴木和男、長尾朋和、越尾　修、馬渕綾子、大野尚仁、高橋　啓、南谷晴之、直江史郎：In−vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析．第8回血管炎研究会、平成15年10月18日、秋田．

47) 三浦典子，三川浩輝，安達禎之，大川原明子，大原関利章，高橋　啓，直江史郎，鈴木和男，大野尚仁：*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析．第

9回 MPO 研究会、平成 15 年 10 月 24 日−25 日、八王子.

48) 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二：生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用. 第12回日本バイオイメージング学会学術集会、平成 15 年 10 月 29 日−31 日、横浜.

49) 鈴木和男：細胞・組織障害のメカニズム解析－血管炎を分子とバイオイメージングで解析する－. 第12回日本バイオイメージング学会学術集会、平成 15 年 10 月 29 日―31 日、横浜.

50) DAWSON, W., ITO-ISHIDA, M., KAMEOKA, K., YAMAGOE, FUTAMURA, Y., YAMAMOTO, Y., TANOKURA, M., SUZUKI, K. : Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies. 第12回日本バイオイメージング学会学術集会、平成 15 年 10 月 29 日−31 日、横浜.

51) 長尾朋和、長谷川明洋、超尾 修、馬渕綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男：活性酸素誘導の血小板血栓形成におけるCD69の役割. 第12回日本バイオイメージング学会学術集会、平成 15 年 10 月 29 日−31 日、横浜.

52) 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二：生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用. 第12回日本バイオイメージング学会学術集会、平成 15 年 10 月 29 日−31 日、横浜.

53) 山越 智、斉藤 武、奥村彰規、渡部久実、浅野雅秀、安保 徹、岩倉洋一郎、鈴木和男：Concanavalin A 肝障害モデルを用いたサイトカインLECT2 の機能解析. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成15年12月8日−10日、博多.

54) 奥村彰規、斉藤武、大谷功、大川原明子、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. 第33回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

55) 大川原明子、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男：*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について. 第33回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

56) 村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、長尾朋和、鈴木和男、谷口克、中山俊憲：CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制. 第33回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

57) 長尾朋和、長谷川明洋、越尾 修、馬渕綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男：活性酸素誘導性の血小板血栓形成におけるCD69の役割. 第33回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

58) 村山 研、長尾朋和、越尾 修、長谷川明洋、中山俊憲、新井孝夫、鈴木和男：活性化好中球におけるCD69 分子の表面局在. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

59) 三川浩輝, 三浦典子, 安達禎之、大川原明子、大原関利章, 高橋啓, 直江史郎、鈴木和男、大野尚仁：*Candida albicans* 由来の血管炎誘発多糖画分 CAWS に対するDBA/2マウスの反応性の解析. 第33回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

60) 濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男：MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kjマウスの遺伝的解析. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

61) 武曾恵理、大川原明子、鈴木和男：遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日―10 日、博多.

62) 鈴木和男：Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

63) Aratani, Y., Kura, F., Suzuki,K., and Koyama, H.：*In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal and bacterial infectios. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

64) 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀機：*Cryptococcus neoformans* 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の役割. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

65) 三川浩輝, 三浦典子, 安達禎之, 大川原明子, 大原関利章, 高橋 啓, 直江史郎, 鈴木和男, 大野尚仁：*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分 CAWS による致死的血管炎誘発メカニズムの解析. 第 33 回 日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月 8 日−10 日、博多.

66) Dawson, W., Ishida, M., Kameoka, Y., Yamagoe, S., Futamura, Y., Yamamoto, K., Tanokura, M., Suzuki, K.：Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies. 第 26 回 日本分子生物学会年会、平成 15 年 12 月 10 日−13 日、神戸.

67) 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木 和男：ミエロペルオキシダーゼの第 8 ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度. 第 26 回 日本分子生物学会年会、平成 15 年 12 月 10 日−13 日、神戸.

68) 鈴木和男：「ガンマグロブリン：血管炎治療のための人工ガンマグロブリン」4）発症機構とガンマグロブリン開発. 公開シンポジウム「ナノとバイオイメージングの融合と医用への展開」― 安全な医薬・治療法へのアプローチ ―、平成 16 年 1 月 9 日、東京.

69) 石野敬子, 土崎尚史, 堀田国元: 臨床分離高度アルベカシン耐性 MRSA の解析. 第 51 回日本化学療法学会総会, 2003 年 5 月, 横浜.

70) 土崎尚史, 石野敬子, 石川 淳, 堀田国元: MRSA におけるアミノグリコシド(AG)修飾酵素遺伝子の菌株局在性とAG 耐性. 第51回 日本化学療法学会総会, 平成 15 年 5 月, 横浜.

71) 石川 淳: *Nocardia farcinica* ゲノムの特徴と比較解析.

日本放線菌学会大会，平成 15 年 6 月，東京
72) 土崎尚史，石野敬子，石川　淳，堀田国元：*Streptomyces kasugaensis* における aminoglycoside 2'- N-acetyltransferase，AAC(2')，遺伝子に関する検討．日本放線菌学会大会，平成15年6月，東京．
73) 石野敬子、土崎尚史、堀田国元：MRSA のアミノグリコシド耐性における AAC(6')/APH(2")遺伝子の役割と特徴、第 32 回薬剤耐性菌シンポジウム、2003 年 8 月、東京．
74) 土崎尚史，石野敬子，石川　淳，堀田国元：MRSA におけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 1．平成15年度薬剤耐性菌研究会，平成15年11月，群馬．
75) 石野敬子，土崎尚史，石川　淳，堀田国元：MRSA におけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 3．平成15年度薬剤耐性菌研究会，平成15年11月，群馬．
76) 堀田国元，石野敬子，土崎尚史，石川　淳：MRSA におけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 4．平成15年度薬剤耐性菌研究会，平成15年11月，群馬．
77) 堀田国元：酸性電解水の効能と科学的基盤．電気化学会第 27 回電解技術討論会、平成 15 年 11 月，横浜．
78) 石川　淳，山下敦士，三上　襄，星野泰隆，栗田晴代，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* IFM 10152 株のゲノム解析．日本分子生物学会第26回年会，平成 15 年 12 月，神戸．
79) 石川　淳，山下敦士，栗田晴代，星野泰隆，三上　襄，服部正平：病原性放線菌 *Nocardia farcinica* ゲノムの特徴．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 6 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 16 年 3 月，木更津．

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、ウィルス、プリオン等の病原体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)の行政検査を担当し、平成 15 年度は 11 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、引き続き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、また、平成１５年度の日本薬学会賞を受賞した。なお、久下　理室長は平成 15 年 4 月 1 日付けで九州大学に出向し、同大学大学院理学研究院化学部門生体情報化学研究室教授に就任した。同氏の益々の研究発展と活躍を期待する次第である。また、平成 15 年 10 月に中村優子氏が細胞化学部第一室研究員として採用され、プリオンの検査・研究等に従事することになった。

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。

以下に本年度の研究成果を記す。

研　究　業　績

Ⅰ．　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（HCV）のコアタンパク質が細胞内で形成する複合体の分離とその構成タンパクの同定

C 型肝炎ウイルスのコアタンパクと細胞内で相互作用する宿主細胞のタンパク質を同定することを目的として、コアタンパクの N-末端に複合型タグ（Myc-TEV-Flag：MEFtag）を付した融合タンパクを HEK239 細胞に発現させ、細胞の 1%　TX-100 可溶性画分からそれぞれのタグに対する抗体を用いた免疫沈降法でコアタンパクを含むタンパク質複合体を精製した。精製した複合体には、従来からコアタンパクと相互作用があると報告されている DEAD box Protein 3 (RNA-helicase)及び Ki-nuclear autoantigen (Proteosome Activator PA28)を含め 10 種のタンパクが電気泳動で認められ、全て、ダイレクトナノフローLC-MS-MS 法で同定した。タンパク質の染色結果を考え併せると、コアタンパクは細胞内でこれらのタンパク質と比較的安定な複合体を形成していることが強く示唆された。[山河芳夫　佐藤慈子　深澤征義　西島正弘（細胞化学部）、勝二郁夫、鈴木哲郎（ウイルス第２部）、市村徹（東京都立大学大学院理学研究科化学専攻）]

（2）C 型肝炎ウィルスのコア蛋白発現による肝細胞の脂質分子種組成への影響について

C 型肝炎ウィルス（HCV）コア蛋白発現トランスジェニックマウスで肝脂肪化と肝癌発症が示唆されている。しかし詳細な機序は解明されていない。本研究はコア蛋白発現が肝細胞脂質分子種組成に及ぼす影響をガスクロマトグラフィーとマススペクトロメトリーにより解析し、HCV 感染による肝脂肪化機構の解明を目的とした。コア

蛋白発現トランスジェックマウスの脂質プロファイリングを行い、多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質分子種組成に顕著な変動を見い出した。コア蛋白発現が肝脂質代謝調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。メカニズム解明に向け更にコア蛋白発現培養肝細胞も用いて詳細に解析中である。[田中康仁、加藤健吾、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）；北條俊章、田口　良（東京大学医学部メタボローム）；森屋恭爾（東京大学医学部感染制御）；小池和彦（東京大学医学部感染症内科）]

2.　プリオン病に関する研究

（1）ウシ・プリオンタンパク発現トランズジェニック（Tg）マウスにおける異常型プリオンタンパク（PrP^{SC}）の増殖

ウシ海綿状脳症（BSE）の高感度バイオアッセイ系を開発することを目的として、ウシ・プリオンタンパクを発現するTgマウスを獣医科学部および感染病理部と共同で開発しつつある。現在までに、PrP遺伝子の導入部位の異なる３系統（#39,#91,#94）のTgマウスを作出しているが、本年度はプリオンタンパクの発現量が多く、また個体数を揃えることが出来た#39 系統にBSE病原体（和歌山例、５%脳乳剤２５ul）を接種して脳、脾臓などへのPrP^{SC}の蓄積の径時変化をウエスタンブロット法で調べ実験動物としての有効性を評価した。その結果、#39TgマウスにおいてPrP^{SC}は接種後１００日前後に脾臓で最初に検出され、免疫組織化学的方法でFDC（follicular　dendritic cell）に蓄積していることが確認された。一方、PrP^{SC}の蓄積が脳で確認されたのはTgホモのマウスでは接種後１７５日後であり、その時点で神経失調を思わせる震えが認められた。接種後２００日で瀕死となった為にすべて殺処分としたが、マウスの脳におけるPrP^{SC}の蓄積は少なく、海綿状変性もおこっていなかった。従って、これらのマウスが伝達性海綿状脳症を発症してで致死に至ったか否かは不明である。Tgヘミ（ヘテロ）のマウスでは接種後２５６日程度でPrP^{SC}の蓄積が脳で認められる様になるが、３００日を超えた時点でも未だ神経失調を示唆する臨床症状は認められていない、さらに経過を観察中である。[山河芳夫、納富香子、萩原健一、中村優子（細胞化学部）、松田潤一郎（獣医科学部）、佐藤由子、樋口好美、佐多徹太郎（感染病理部）]

（2）硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスの作成

汚染硬膜移植によるプリオン病の発症モデル動物を作成することを目的として、コラーゲン膜に病原体（プリオン病発症マウスの脳ホモゲネート）を染み込ませたものを汚染硬膜の代用として用いて病原体の脳表からの間接接種を試みた。その結果（1）病原体を脳（室）内に直接接種したものに比べて約 20 日の遅れをもって全てのマウスが発症、死亡した。これらのマウス脳には異常型プリオンタンパク質（PrP^{SC}）の蓄積がウエスタンブロット法あるいは免疫染色法により確認された。（2）マウス脳の海綿状態及びPrP^{SC}が強く免疫染色される部位はPrP^{SC}を接触させた脳表面と、同側の視床および反対側の小脳である。これらのことから、PrP^{SC}の侵入経路は脳表からの経神経線維性による伝播の可能性が高く、本法により発症せしめたマウスはヒト汚染硬膜移植後プリオン病の発症モデル動物となりうると考えられた。[山河芳夫、西島正弘 (細胞化学部)、古屋一英、川原信隆（東京大学　医学部)、金子清俊（国立精神･神経センター　疾病研究第七部)]

（3）硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスに及ぼす防御型プリオンタンパク（$recPrP^{218K}$）の発症遅延効果

硬膜移植後プリオン病発症モデルマウスに防御型プリオンタンパク質（リコンビナントプリオン 218Ｋ：$recPrP^{218K}$）を体内埋め込み型の浸透圧ポンプで脳室内に連続投与して、その治療／発症延伸効果について検討した。その結果、非治療群（ｎ=11）で病原体接種後 117±7.7 日で 50%のマウスが死亡したが、接種後 30 日目に治療を開始した群（ｎ=７）では 129.4±12 日で 50%のマウスが死亡し、これら二群の間では$recPrP^{218K}$の延命効果に関して有意差が認められた。一方、病原体接種後 60 日で治療を開始した群（ｎ=9）では 121±12.8 日で 50%のマウスが死亡し、非治療群と比べて、$recPrP^{218K}$の効果は認められなかった。[山河芳夫、西島正弘(細胞化学部)、古屋一英、川原信隆（東京大学　医学部)、金子清俊（国立精神・神経センター　疾病研究第七部)]

（4）プリオン蛋白質由来のペプチドによる異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の蓄積阻害機構の解析

プリオン蛋白質由来のペプチドP9FDを用い、プリオン病発症に深く関与すると予想される、異常型プリオン蛋白質（PrP^{Sc}）の蓄積阻害について解析を行った。約２０アミノ酸残基よりなるP9FDの添加により、培養細胞中のプロテイナーゼK抵抗性のPrP^{Sc}量の減少が、12 時間後より認められた。また、内在性のプロテアーゼによると思われるPrP^{Sc}の蓄積量の減少も認められた。しかし、アセチル化したP9FDやP9FDの部分配列を有するペプチドではこの阻害効果は確認されなかった。以上より、P9FDが一定の立体構造を有することがPrP^{Sc}の蓄積阻害には必要であることが示唆された。一方、P9FDを添加した培養細胞では分子量が 65,25,15kDaの蛋白質の細胞内含有量の上昇が認められ、これらの蛋白質の詳細な性状について、さらなる検討を現在行っている。[中村優子、大内史子、萩原健一、西島正弘、山河芳夫]

（5）BSE 罹患ウシの PRNP の塩基配列分析

ウシ・プリオン蛋白質遺伝子（PRNP）のプリオン蛋白

質コード領域上の DNA 塩基配列の多型を解析するための分析プロトコールを確立した。条件検討の結果、ウシ組織から調製したゲノム DNA に対して、プライマーA (5'-TGCTGGCATTCTACATTTATCAAGTTA-3') および B (5'-AAGCGCCAAGGGTATTAGCATAC-3')を用いた PCR によりプリオン蛋白質コード領域全長を含む２本鎖 DNA を調製し、次にこの２本鎖 DNA を鋳型としてプライマー A および B を用いた非対称 PCR により１本鎖 DNA を得た後に、常法による DNA シークエンサーによる塩基配列分析を実施するという方法が最も迅速・良好な方法であると結論した。健常ウシと従来型 BSE 罹患ウシおよび非定型 BSE 罹患ウシの PRNP の塩基配列を本法を用いて比較・解析した。その結果、分析した検体の幾つかにおいて Gln^{78} あるいは Asn^{192} のコドンの第３塩基にサイレント変異の多型が認められたが、アミノ酸の置換を生じさせる DNA 変異は無かった。また、上記のサイレント変異と BSE 発症との間にも明確な因果は認められなかった。［萩原健一、納富香子、西島正弘、山河芳夫］

（6）ＭＨＭ２-正常型プリオン蛋白質を発現する神経芽細胞腫 N2a 細胞を用いたプリオン蛋白質の構造変換機構の解析

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と考えられているが、その変換機構の詳細は解明されていない。そこでプリオンの伝搬・感染の初期過程を解析するモデル系の開発を目的として、マウス神経芽細胞腫 N2a 細胞へ遺伝子導入を行うことにより、ＭＨＭ２-タグを有するマウス・正常型プリオン蛋白質を恒常的に発現する細胞を作出した。この細胞を異常型プリオン蛋白質を持続産生する ScN2a 細胞と共培養するか、あるいは ScN2a 細胞から調製した膜画分を培地に添加すると、正常型のＭＨＭ２-プリオン蛋白質が proteinase K 消化に対して抵抗性を示す異常型へと変換することを示した。この場合、ScN2a 細胞との共培養によっても膜画分の添加によっても、異常型ＭＨＭ２-プリオン蛋白質の蓄積がウエスタンブロット法により検出可能な量に達するまでには、約１０日間の培養期間を要した。今後、本系を応用したプリオン伝搬の初期過程の解析を行なう。［萩原健一、中村優子、納富香子、西島正弘、山河芳夫］

Ⅱ．エンドトキシンに関する研究

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

グラム陰性菌細胞壁由来のリポポリサッカライド（LPS）はしばしば致死的なエンドトキシンショックを引き起こすが、免疫反応を様々に誘導し賦活化することもまた知られている。ところで、LPS の活性部位である lipid A の部分加水分解産物 monophosphoryl lipid A（MPL）は LPS と異なり細胞毒性が弱いこと、LPS によるエンドトキシンショックを抑制することなどが知られている。しかしながら、その分子メカニズムは未だ不明である。本研究では LPS の毒性と免疫活性化の経路を区別して考え、MPL 刺激と LPS の毒性発現に関与することが知られている caspase-1 の活性に着目した。その結果、マウスマクロファージの caspase-1 は lipid A により活性化されたが、MPL では活性化されなかった。ところが、caspase-1 の活性化に必須と報告されている caspase-11 遺伝子は lipid A と MPL のどちらの刺激でも活性化が認められた。MPL は TLR-4 を介した MyD88/NF B 経路を活性化する一方で LPS とは異なり caspase-1 の活性化に関わる未知の経路を活性化しないことが示唆される。本研究では LPS と同一のレセプター（TLR-4）を介しながら、MPL がマクロファージに対して異なる活性化パターンを示す事を明らかにした。Caspase-1 は様々な炎症性疾患にも関与していることから、本研究の結果は炎症性疾患の発症機構の解明に寄与することが期待される。[桶本和男、川崎清史、西島正弘]

2. サルモネラ菌リピド A 修飾の免疫応答における意義に関する研究

（1）リピド A 修飾と Toll-like receptor 認識に関する研究

サルモネラ菌などのグラム陰性病原細菌は宿主組織内で生存するためにリポ多糖を含むその表面構成成分の再構成を行う。これまでにサルモネラ菌外膜構成成分リポ多糖の膜アンカー部位リピド A の脂肪酸の付加・脱離が起こることが知られていた。本研究ではこの現象の宿主免疫応答との関わりを解析する目的で脂肪酸の付加・脱離が起きているリピド A 種を分離精製し、リピド A 受容体である Toll-like receptor 4 を発現させた細胞株に対する NF- B 活性化能を解析した。その結果、脂肪酸の付加及び脱離がともにリピド A の NF- B 活性化能を低下させることがわかった。このことから、サルモネラ菌のリピド A 修飾は宿主免疫系から逃れるために機能していると推察された。[川崎清史、Sam Miller（ワシントン大学）]

（２）リピド A 修飾の制御に関する研究

サルモネラ菌のリピド A 修飾酵素は感染環境を模倣すると考えられている低マグネシウム培地培養下で発現誘導される。脱アシル化酵素 PagL も低マグネシウム培地培養下で発現誘導されるが、不思議なことにリピド A の脱アシル化はこの培養条件下では認められない。一方、別のリピド A 修飾であるアミノアラビノース付加が起こらない変異株では、低マグネシウム培地培養下でリピド A の脱アシル化が認められた。このことから、リピド A 修飾は相互に関連しあっており、アミノアラビノース付

加が脱アシル化を抑制することがわかった。この制御がサルモネラ菌の病原性とどのように関わっているのか解明することが今後の課題である。[川崎清史、Sam Miller（ワシントン大学）]

Ⅲ．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、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重要なアミノ酸残基を明らかにした。ＰＳＳ1 のＰＳ合成活性は通常､外来性ＰＳにより著しく阻害されるが、この制御に少なくとも 6 アミノ酸残基が関与していた。また、単独のアラニン置換により、ＰＳ合成活性がほとんど失われるアミノ酸は少なくとも 13 残基あった。このうち 1 残基は基質特異性に関わり、5 残基はこの蛋白の発現或いは安定性に影響を及ぼした。同定したアミノ酸残基の分布より、この酵素の活性中心と調節部位は独立して存在するものと考えられた。[大沢智子、久下　理*、西島正弘（*九州大学大学院理学研究院）]

（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）の役割

ア．SIN レプリカーゼによる遺伝子発現における PS の関与

我々はこれまでに、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に、宿主の PS またはホスファチジルエタノールアミン(PE)が関与することを見いだしている。PS の関与をより明確にする目的で、PE 含量を正常に保ったまま、PS 含量だけを減少させることができる PSB-2 株を用いて、SIN レプリカーゼ依存の遺伝子発現に対する PS 含量低下の影響を調べた。その結果、PS 含量が低下する条件で同遺伝子発現が低下することを見いだし、SIN レプリカーゼによる遺伝子発現に PS が関与することが明らかになった。また、レプリカーゼの転写産物のレベルは PS 含量が低下する条件で低下しないことから、遺伝子発現の低下は転写以降、翻訳までのいずれかの過程が阻害されているためと考えられた。[齊藤恭子､西島正弘､久下　理]

イ．mRNA キャッピング酵素 nsP1 の膜結合における PS の関与

SIN の mRNA キャッピング酵素 nsP1 は膜結合蛋白質で、PS に結合すると予想されるアミノ酸配列を有している。nsP1 の膜結合における PS の関与を調べる目的で、PSB-2 細胞に nsP1 を発現させたところ、正常なリン脂質組成を示す条件と PS 含量が低下する条件のいずれにおいても、nsP1 は膜に結合していた。nsP1 は脂肪酸修飾を受けるが、その修飾を阻害する変異を nsP1 に導入しても､PS 含量が低下する条件の nsP1 の膜結合は変化がなかった。従って、nsP1 の膜結合に PS が関与する証拠は得られなかった。[齊藤恭子､西島正弘､久下　理（九州大学大学院理学研究院）]

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）CERT によるセラミドの膜間転移

CERT は、細胞内セラミド輸送欠損 CHO 細胞変異株(LY-A 株)を相補する cDNA がコードする 68 kDa の親水性タンパク質である。天然型セラミドは疎水性が極めて高く、自律的に脂質膜の間を転移することはない。セラミドの膜間転移を人工リン脂質膜を用いた無細胞検出系で調べたところ、精製組換え体 CERT はセラミド転移を劇的に促進した。また、その活性は、CERT のカルボキシル末端約 210 アミノ酸領域から成る START ドメインが担うことを明らかにした。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

（２）CERT の START ドメインが認識する脂質特異性

CERT の START ドメインによって膜から引き抜かれ、他の膜へ転移される脂質の選択性を無細胞検出系で解析した。CERT は、スフィンゴシンやスフィンゴミエリンは全く認識しなかった。また、CERT 以外で START ドメインを持つタンパク質に対する特異的基質と報告されているコレステロールまたはホスファチジルコリンも CERT は認識しなかった。セラミドと構造的に近いジアシルグリセロールに対する活性はセラミドに対する活性の５%程度であった。したがって、CERT はセラミド選択的な膜間転移活性を持つと考えられる。[熊谷圭悟、花田賢太郎]

（３）CERT による小胞体からのセラミド引き抜き

CERT が小胞体と相互作用して、そこからセラミドを引き抜くことができることを以下のように示した。生化学的に分離した小胞体膜において、内在するセラミド合成酵素活性を利用して放射性セラミドを生産させ､次に、この放射性セラミド含有小胞体膜を精製組換え体 CERT とともにインキュベートするとセラミドが膜から遊離した。対照実験の一つとして、疎水性物質を非特異的に結合することが知られているアルブミンを用いたが、アルブミンではセラミドは遊離しなかった。よって、CERT は小胞体からセラミドを効率よく遊離させる特異的活性

を有すると結論した。[河野美幸、花田賢太郎]

（４）CERT の細胞内分布

CERT は、そのアミノ末端領域にプレクストリン相同(PH)ドメインを持っている。PH ドメインはリン酸化イノシトール結合ドメインとして知られおり、特にホスファチジルイノシトール４リン酸(PI4P)特異的な PH ドメインは、PI4P が局在するゴルジ体へのターゲット機能を発揮する。CERT の PH ドメインは PI4P 特異的であるが、セラミド輸送欠損株・LY-A 株の CERT は、PH ドメイン中にアミノ酸置換（G67E 変異）が起こっており、PI4P 結合能が失われている。CERT と緑蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質の細胞内分布を蛍光顕微鏡レベルで解析したところ、CERT-GFP は細胞質全体に分布しつつも、ゴルジ体領域に顕著に濃縮していた。一方、G67E 変異型 CERT-GFP では、ゴルジ体への会合が損なわれていた。これらの結果から、CERT はその PI4P 結合性 PH ドメインに依存してゴルジ体に会合することが明らかとなった。[花田賢太郎]

（５）亜無傷細胞を用いたセラミド小胞体-ゴルジ体間輸送の解析

細胞膜に小孔を開けた亜無傷細胞において、セラミドの小胞体-ゴルジ体間輸送を再現することが可能である。この再構成系を用いて解析したところ、LY-A 株由来の細胞質に野生型の精製 CERT を添加することで輸送活性が正常レベルに回復した。興味深いことに、人工脂質膜を用いたアッセイの場合、PH ドメイン欠失 CERT や G67E 変異 CERT も野生型 CERT と同様のセラミド転移活性を示すのだが、亜無傷細胞を用いた再構成系においては、これら変異体は回復能を示さなかった。細胞の中のように様々なオルガネラ膜が混在している状態において CERT がゴルジ体へ効率よく到達するには、PI4P 認識 PH ドメインの存在が必要なのであろう。再構成系においての CERT 依存性セラミド輸送は ATP を除くと阻害された。一方、Sar1（小胞体からゴルジ体への膜小胞輸送に必須の因子の一つ）の優性欠損型を添加しても CERT 依存性セラミド輸送は全く阻害されなかった。[熊谷圭悟、安田智、花田賢太郎]

（６）細胞内セラミド選別輸送モデル

昨年度の成果および上述した本年度の成果を総合して、CERT は ATP 依存性のセラミド小胞体-ゴルジ体輸送を仲介する分子であると我々は結論した。そして、脂質セラミドの輸送は非輸送小胞機構で仲介されていると結論し、CERT が特異的にセラミドを小胞体膜から引き抜いた後、ゴルジ体膜に選択的に到達して受け渡すというモデルを提唱した。これら一連の研究成果は、膜リン脂質生合成に関わる特異的な脂質選別輸送装置を分子レベルで同定した最初の例であり、我々が提唱するセラミド輸送モデルは、他の脂質についてもその選別輸送メカニズムを考えるうえでの土台になると思われる。[花田賢太郎、熊谷圭悟、安田智、三浦有紀子、河野美幸、深澤征義、西島正弘]

（７）中性スフィンゴミエリナーゼの基質特異性

中性 pH 領域に至適 pH のあるスフィンゴミエリナーゼ (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。リソ型スフィンゴミエリンすなわちスフィンゴシルホスホコリン(SPC)に対するホスホリパーゼＣ活性測定法を開発し、哺乳動物、マラリア原虫および細菌由来の nSMase は SPC ホスホリパーゼＣ活性をも有することを明らかにした。これら nSMase は、リソホスファチジルコリンやリソ血小板活性化因子も加水分解するがそのジアシル体は分解できないことを併せ考え、nSMase 酵素の基質となるには脂質基質の C2 位は水素結合供与グループでなければならないと示唆した。[三浦有紀子、後藤恵理子、西島正弘、花田賢太郎]

（８）光増感作用おけるスフィンゴ脂質新合成と活性酸素種生産

光増感作用で起こる細胞死にはスフィンゴ脂質新合成が必要であることをわれわれは以前示していた。光増感作用で起こる細胞死には活性酸素種(ROS)生産も必要であるが、ROS 生産にはスフィンゴ脂質新合成は必要なかった。よって、細胞死シグナル経路においてスフィンゴ脂質新合成の関わるステップは ROS 生産の下流であることが示唆された。[花田賢太郎: Vladislav Dolgachev、Biserka Nagy、 Bonita Taffe、 Duska Separovic (ユージン・アップルバウム薬学衛生科学大学)]

（９）細胞内スフィンゴ脂質によるアミロイド前駆体切断の調節

アルツハイマー病脳変のプラークに蓄積するアミロイドベータペプチドは、アミロイド前駆体(APP)のベータおよびガンマ部位での切断によって生ずる。細胞内スフィンゴ脂質が減少すると APP のアルファ部位での切断が顕著に上昇し、可溶性の sAPP42 の分泌が高進することを見出した。スフィンゴ脂質減少細胞では、MAPK/ERK 活性が上昇しており、MAPK/ERK 阻害剤処理すると sAPP42 の変化も阻害された。よって、スフィンゴ脂質減少は、MAPK/ERK 経路の活性化を介して sAPP42 分泌を上昇させると結論した。[花田賢太郎:　澤村直哉、 Mihee Ko、 Wenxin Yu、 Kun Zou、 Toshiharu Suzuki、 Jian-Sheng Gong、 柳澤勝彦、道川誠(長寿研) : 鈴木利治（北大）]

1-3.　SNARE 分子 Ykt6 の細胞内局在・膜融合活性発現の分子基盤

SNARE 分子群は生体膜融合過程において、膜相互の特異的認識・融合の起動に関わる鍵分子である。その一つ Ykt6 は蛋白性膜貫通領域を持たず、局在も大部分細胞質でごく一部膜に存在する。変異体解析等から、細胞質内では Ykt6 はC末で farnesyl 化されているが N 末領域が覆うことで可溶化できると考えられた。膜結合型はさらに palmitoyl 化も受け、構造変化・膜結合力を獲得し、膜融合能を示すこともわかった。以上から、C 末脂質修飾・N 末領域により Ykt6 は細胞内局在及び膜融合活性が調節されていることが強く示唆された。[深澤征義、James E. Rothman（米国・Sloan-Kettering 研究所）]

Ⅳ. 細胞膜の構造・機能と細胞病態変化の解析

（1）ヒトがん細胞における糖輸送タンパク質ファミリーの発現とラフト膜分布

動物細胞の表面には 10 数種の糖輸送タンパク質（GLUT)が存在し、糖輸送を仲介する。これらは 12 回膜貫通型の糖タンパク質であるが、輸送特性や組織発現に特異性があり、生理的な役割や機能調節機構はそれぞれ異なると考えられる。我々は、腫瘍性の Hela 融合細胞に発現するGLUT1とGLUT3が異なる細胞膜ドメインに分布することを、非イオン性界面活性剤の可溶化分画、ならびに共焦点コンフォーカル顕微鏡観察により明らかにした。GLUT1 は界面活性剤に難溶性のラフト膜ドメインに分布し、細胞骨格系の F-actin と共分布した。これらの膜分布の分子制御機構について更に検討中である。最近、GLUT1 はヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1)の新規受容体であることが判明し、GLUT1 の膜分布機構の解析は感染症治療薬の新たな分子標的探索においても有用であろう。[佐京智子、北川隆之]

（2）肺炎クラミジアのin vitro感染評価系の確立と阻害薬検索への応用

肺炎起因菌である肺炎クラミジア（C.p ）は動脈硬化発症の危険因子として注目され、感染・増殖とラフト膜の関連が示唆されている。我々は C.p の in vitro 培養法：標準株 HEp-2 細胞に感染した C.p の封入体を FITC 試薬によって特異的に蛍光染色する方法を確立し、抗クラミジア化合物の評価系を構築した。ついで本評価系を適用した新規 in vitro スクリーニング系の確立を目的として、カベオリン含量の異なるヒト HeLa 融合細胞系において C.p の感染・増殖性を検討した結果、カベオリン含量の高い細胞株では C.p の封入体量が標準株 HEp-2 細胞の約 2 倍多く、カベオリン含量の低い細胞株では約１／４に低下した。両細胞の C.p の増殖様式に着目しながら、評価系と化合物のスクリーニングを開始した。[難波憲司（第一製薬)、北川隆之]

Ⅴ. 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 15 年度（自平成 15 年 4 月 1 日至平成 16 年 3 月 31）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　11　（ 陰性 8、陽性 3 ）

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

01) O. Kuge, and M. Nishijima: Biosynthetic regulation and intracellular transport of phosphatidylserine in mammalian cells. ***J. Biochem.*** 133, 397-403, 2003

02) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kawai, M. Shiozaki, and M. Nishijima: Molecular basis for lipopolysaccharide mimetic action of Taxol™ and flavolipin. ***J. Endotoxin Res***., 9, 301-309, 2003

03) K. Kawasaki and M. Nishijima: Purification of phosphatidylglycerophosphate synthase from cultured mammalian cells. in Membrane Protein Protocols: Expression, purification, and Characterization, (ed. by B. S. Selinsky), ***Methods in Molecular Biology,*** vol. 228, pp.175-186, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey.

04) K. Hanada and M. Nishijima: Purification of mammalian serine palmitoyltransferase, a hetero-subunit enzyme for sphingolipid biosynthesis, by affinity-peptide chromatography. in ***Membrane Protein Protocols,*** (ed. by B. S. Selinsky), ***Methods in Molecular Biology,*** vol. 228, pp.163-174, 2003, Humana Press, Totowa, New Jersey.

05) K. Hanada: Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. ***Biochimica et Biopysica Acta***, 1632, 16-30, 2003

06) M. Nakamura, Y. Mori, K. Okuyama, K. Tanikawa, S. Yasuda, K. Hanada, and S. Kobayashi: Chemistry and biology of khafrefungin. Large-scale synthesis, design, and structure-activity relationship of khafrefungin, an antifungal agent. ***Organic & Biomolecular Chemistry***, 1, 3362-3376, 2003

07) V. Dolgachev, B. Nagy, B. Taffe, K. Hanada, and D. Separovic: Reactive oxygen species generation is independent of de novo sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. ***Experimental Cell Research***, 288, 425-436, 2003

08) Y. Nakamura, R. Matsubara, H. Kitagawa, S. Kobayashi, K. Kumagai, S. Yasuda, and K. Hanada: Stereoselective synthesis and structure-activity relationship of novel ceramide trafficking inhibitors. (1*R*,3*R*)-*N*-(3-Hydroxy-1 hydroxymenthyl-3-phenylpropyl)dodecanamide and its analogues. ***J. Med. Chem.***, 46, 3688-3695, 2003

09) Y. Yamakawa, K. Hagiwara. K. Notomi, Y. Nakamura, M. Nishijima, Y. Higuchi, Y. Sato, T. Sata, and the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Atypical proteinase K-resistant prion protein(PrP^{res}) observd in an apparently healthy 23-month-old holstein steer. ***Jpn. J. Infect. Dis.,*** 56, 221-222, 2003

10) K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, and M. Nishijima: Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. ***Nature***, 426, 803-809, 2003

11) O. Kuge, K. Hasegawa, T. Ohsawa, K. Saito, and M.Nishijima: Purification and characterization of Chinese hamster phosphatidylserine synthase 2. ***J. Biol. Chem.***, 278, 42692-42698, 2003

12) T. Oishi, K. Hagiwara, T. Kiumi, Y. Yamakawa, M. Nishijima, K. Nakamura, and H. Arimoto: Effects of b-Sheet Breaker Peptides Polymers on Scrapie-infected Mouse Neuroblastoma Cells and Their Affinities to Prion Protein Fragment PrP(81-145). ***Org. Biomol. Chem***., 1, 2626-2629, 2003

13) A. Masumi, Y. Yamakawa, H. Fukazawa, K, Ozato, and K. Komuro: Interferon Regulatory Factor 2 Regulates Cell Growth through Its Acetylation. ***J. Biol.Chem.***, 278, 25401-25407, 2003

14) Y. Nakamura, A. Sakudo, K. Saeki, T. Kaneko, Y. Matsumoto, A. Toniolo, S. Itohara, and T. Onodera: Transfection of prion protein gene suppresses coxsackievirus B3 replication in prion protein gene-deficient cells. ***J Gen Virol.***, 84, 3495-502, 2003

15) A. Sakudo, D. C. Lee, K. Saeki, Y. Nakamura, K. Inoue, Y. Matsumoto, S Itohara, and T. Onodera: Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 308, 660-7, 2003

16) N. Sawamura, K. Lee, W. Yu, K. Zou, K. Hanada, T.Suzuki, J.-S. Gong, K. Yanagisawa, and M. Michikawa: Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. ***J. Biol. Chem.***, 279, 11984-11991, 2004

17) Y. Miura, E. Gotoh, F. Nara, M. Nishijima, and K. Hanada: Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. ***FEBS Letters***, 557, 288-292, 2004

18) K. Hagiwara, A. Wada, M. Katadae, M. Ito, Y. Ohya, P.J. Casey, and Y. Fukada: Analysis of the Molecular Interaction of the Farnesyl Moiety of Transducin through Use of a Photoreactive Farnesyl Analogue. ***Biochemistry***, 43, 300-309, 2004

19) H. Kishida, Y. Sakasegawa, K. Watanabe, Y. Yamakawa, M. Nishijima, Y. Kuroiwa, N. S. Hachiya, and K. Kaneko: Non-glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchorecd recombinant prion protein with dominant-negative mutation inhibits PrP^{Sc} replication *in vitro*. ***J. Protein Folding Disord***, in press

20) A. Volchuk, M. Ravazzola, A. Perrelet, W. S.Eng, M. De Liberto, O. Varlamov, M. Fukasawa, T. Engel, T. H. Söllner, J. E. Rothman, and L. Orci: Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. ***Mol. Biol. Cell,*** in press

21) M. Fukasawa, O. Varlamov, W. S. Eng, T. H. Sollner, and J. E. Rothman: Localization and activity of the SNARE Ykt6 determined by its regulatory domain and palmitoylation. ***Proc Natl Acad Sci U S A***., in press

22) V. Dolgachev, M. S. Farooqui, O. I. Kulaeva, M. Tainsky, B. Nagy, K. Hanada, and D. Separovic: De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. ***J. Biol. Chem.***, in press

23) K. Kawasaki, R. K. Ernst, and S. I. Miller: 3-*O*-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-lke receptor 4. ***J. Biol. Chem.***, (Epub ahead of print)

２． 和文発表

01) 平林義雄，花田賢太郎: 概説：スフィンゴ脂質合成とその膜輸送，蛋白質 核酸 酵素, 47, 400-402, 2002

02) 花田賢太郎，平林義雄: スフィンゴ脂質の生合成，蛋白質 核酸 酵素, 47, 403-408, 2002

03) 花田賢太郎: 膜脂質合成の欠損した培養細胞変異株−膜脂質ドメイン研究のキーツール，蛋白質 核酸 酵素, 47, 425-430, 2002

04) 西島正弘: 国立感染症研究所に生きる，生化学，75,

267, 2003
05) 萩原健一: 狂牛病とプリオン，化学と薬学の教室（廣川書店）, 148, 16-19, 2003
06) 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
07) 西島正弘: 生体膜脂質の細胞内輸送の分子機構−セラミド輸送蛋白質(CERT)の発見−，学術月報, 57, 252-256, 2004
08) 花田賢太郎: 膜脂質セラミドを輸送する分子装置 CERT，細胞工学, 23, 332-333, 2004
09) 花田賢太郎: 膜脂質セラミドを輸送する分子装置：CERT の発見，実験医学，印刷中

II. 学会発表

1. 国際学会

01) 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
02) M. Nishijima, K. Kawasaki, and H. Nogawa: Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS andTaxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis, The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2003.8.24-27, Awaji Island

2. 国内学会

01) 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の発現と細胞膜分布，第 123 年回がん分子標的治療研究会総会, 2003.6（東京）
02) 萩原健一，納富香子，大内史子，中村優子，山河芳夫: プリオン病−古くて新しい疾病の克服に求められているもの，第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2003.8.4（富士吉田）
03) 花田賢太郎：セラミド選別輸送分子装置，公開シンポジウム「マイクロドメインの機能と病態」，2003.10（東京）
04) 萩原健一 ：プリオン病の克服に向けて− 病理の多様性と治療の現状，日本薬学会関東支部会，2003.10.4（東京)
05) 佐京智子，石館光三，北川隆之: Studies on distribution of mammalian glucose transporter GLUT1 to a raft-like detergent resistant membrane in human epithelial carcinoma cells，第 76 回日本生化学大会, 2003.10（横浜）
06) 中村優子，萩原健一，大内史子，納富香子，西島正弘，山河芳夫: A Synthetic Peptide Fragment from Prion Protein Inhibits the Accumulation of Proteinase K-resistant Prion Protein，第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.16（横浜）)
07) 山河芳夫，萩原健一，西島正弘，納富香子，佐多徹太郎: Tissue Distribution of Protease Resistant Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy(BSE) using Western Blotting Assay, 第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.17（横浜）
08) 大沢智子，西島正弘，久下理: Alanine mutagenesis of phosphatidylseirne synthase (PSS) 1 revealed 21 amino acid residues crucial for its activity or regulation，第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.17（横浜）
09) Kazuo Okemoto, Kiyoshi Kawasaki, and Masahiro Nishijima: Distinctive cytokine induction pattern via TLR-4 between macrophages stimulated by ornithine-containing lipid and LPS，第 76 回日本生化学会大会, 2003.10.18（横浜）
10) 花田賢太郎，三浦有紀子，後藤恵理子，奈良太，西島正弘： Recognition of sphingosylphosphocholine, lyso-sphingomyelin, by neutral sphingomyelinases(中性スフィンゴミエリン加水分解酵素によるスフィンゴシルホスホコリン、リソスフィンゴミエリンの認識)，第 76 回日本生化学会大会, 2003.10（横浜）
11) Yasuhito Tanaka, Kengo Kato, Shigeko Sato, Yuki Nagai, Ryo Taguchi, and Masahiro Nishijima: Effect of the expression of hepatitis C virus core protein on the lipid profile of liver in mice，第 76 回日本生化学会大会, 2003.10（横浜）
12) 川崎清史，西島正弘: アラニンスキャニングによる MD-2 の機能解析，第 9 回日本エンドトキシン研究会, 2003.11（盛岡）
13) 花田賢太郎：セラミド選別輸送分子装置，高エネルギー加速器研究機構ＰＦセミナー, 2003.11（つくば市）
14) 桶本和男，川崎清史，西島正弘: Monophosphoryl lipid A によるマクロファージからの IL-1　産生誘導機構の解析，第 33 回日本免疫学会総会, 2003.12.8（福岡）
15) 桶本和男，川崎清史，西島正弘: LPS の部分分解産物 monophosphoryl lipid A は NF　B を活性化するが caspase-1 を活性化しない，第２回感染症若手研究者沖縄フォーラム, 2004.2.13（那覇）

16) 山河芳夫: BSE 検査をめぐる問題，国際シンポジウム「動物のプリオン病の診断と疫学」, 2004.2.21（東京）
17) 山河芳夫: PrP^{BSE}の生体内分布と非定形BSEプリオンの検出，神奈川県食肉衛生協会技術研修会，2004.2.25（平塚）
18) 西島正弘: 体細胞変異株を用いた膜リン脂質の生合成と機能に関する研究，第 124 回日本薬学会，2004.3.29（大阪）

１１．昆虫医科学部

部　長　　小林　睦生

概　　要

平成１5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，4月１日より伊澤晴彦が第２室の研究員として採用された．新たに，森林敦子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，安居院宣昭，倉橋　弘，二瓶直子が客員研究員として，デ・マ・テーラー，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.　衛生昆虫類の分類・生態に関する研究

都市域におけるウエストナイルウイルス（WNV）媒介蚊の調査を首都圏の11ヶ所で実施し，約3,400匹の蚊を捕集したが，その76%はアカイエカ，23%はヒトスジシマカであった．また，生物発酵法を応用した二酸化炭素発生装置の開発を試み，捕集効果はドライアイスとほぼ同等の結果を得た．この装置は，ドライアイスが入手困難な開発途上国などで利用可能であることが示された．また，ドライアイストラップがどの程度の範囲の蚊を誘引するかを二酸化炭素の濃度勾配を測定して検討したところ，約3mの範囲が有効であることが示された．また，ドライアイストラップと通常のライトトラップとの蚊成虫捕集効率を比較したが，明らかにドライアイストラップがより多くの蚊を捕集した．成虫の発生状況の調査と同様に，幼虫が都市部でどの程度発生しているか調べることは重要である．東京および大阪の道路側溝および公園に存在する雨水マスの調査結果は，両地域において，雨水マスに水が溜まっている傾向が認められ，水が溜まっている雨水マスには高率にアカイエカまたはヒトスジシマカの幼虫が発生していることが明らかになった．都市部における蚊の行動に関して，地上7-8mの樹上でアカイエカが多数捕集される傾向があり，少数のヒトスジシマカも捕集された．この結果は，これらの蚊が樹上で野鳥から吸血する傾向があることを示しており，WNVの都市部での伝播を考える上で重要な発見である．　WNVの我が国への侵入を考えると，飛行機によって感染蚊が運ばれてくる可能性が高い．そこで，成田空港周辺３ヶ所で定期的に蚊の捕集を行い，WNVの分離を試みた．３回の捕集で，14種類，780匹の成虫を得たが，アカイエカ，ヒトスジシマカ，ヤマダシマカ等が優占種であった．また，北海道の東部に位置する能取湖において，ドライアイストラップによって蚊の捕集を試み，4属8種が捕集された．1トラップ当たりの最大捕集数は837匹で，灌木の中の空間に設置したトラップでの捕集であった．トラップの設置場所が捕集数に大きく影響することが明らかとなった．東北地方でのヒトスジシマカの分布調査では，今回初めて盛岡市内で幼虫が採集された．WNVが我が国へ侵入する可能性を考え，継続して分布調査を行う必要がある．北海道におけるマラリア媒介蚊の再考を行い，３種類が形態で区別できることが明らかとなった．高病原性鳥インフルエンザの流行が起こった京都府丹波町で，冬季に活動するハエ類の調査を行い，鶏舎から500-2,500mの範囲で採集を試みた．2日間で約900匹のハエ類を採集し，鶏舎に近いほど多数のクロバエ類が採集された．地理情報システムを用い，感染症の防圧戦略を立てることが可能になっており，マラリアのリスクマップの作成など今後の応用範囲の拡大が期待される．また，我が国の衛生害虫として重要な毒グモに関して，分散解析にも応用された．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行い，白色系統と黒色系統との産卵行動に差が認められた．ハエ類が多包条虫卵の伝播に関係するか否かを実験的に明らかにした．不快害虫としてのチョウバエ類の発生調査を周年行い，種類によって発生消長が異なっていることが示された．第1室における外部からの衛生動物同定依頼検査では，31件，477個体の昆虫，マダニ，クモ類の同定依頼を受けた．

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り，形態的分類結果とほぼ一致した．WNV媒介蚊の吸血源を調査し，日本産のアカイエカは野鳥（カモ類およびスズメ類）と人から積極的に吸血していることが明らかとなった．これは，WNVが日本に移入された場合，都市部でWNVの感染が容易に起こることを示している．また，アカイエカと形態的に区別できないチカイエカをPCR法および個眼の数で同定できることが示され，今後，都市部のアカイエカをより詳細に区別する事が可能となった．本年新たに3人の路上生活者由来のコロモジラミから塹壕熱の病原体である*Bartonella quintana* の遺伝子を検出され，本疾病が特定集団で静かに流行していることが示唆された．

蚊体液に含まれるレクチンの部分精製品であるペプチドの配列を解析し，全体の構造決定を目指している．WNV媒介蚊の調査において，全体で15,000匹の成虫を都市部を中心に捕集し，約7,000匹を用いてWNVの検出をTaq-Manプローブ法，C6/36細胞接種等によって行った．2003年の捕集蚊においては，WNVの遺伝子は検出されていないが，一部，日本脳炎ウイルスの遺伝子が都市部の蚊から検出された．フタトゲチマダニ唾液腺から新規生理活性物質を探索し，２種類の新規トロンビンインヒビターを同定した．ブラジルサシガメ唾液腺に存在する血液凝固阻害活性の性状を検討し，第XII因子および高分子キニノゲンに特異的に結合することが明らかとなった．マラリア原虫のハマダラカ唾液腺への集積機構に関して，接着，侵入に重要な働きをするタンパク質（MAEBL）の機能解析を行った．ヤブカ類に寄生する原虫*Ascogregarina* spp.について，リボゾームDNAおよび熱ショックタンパク質70遺伝子のクローニングを行い，分子系統樹を作成した．クロバエ類の卵巣発育と体内のエクジステロイドの関係を調べ，エクジステロイドの増加時期が両種で異なることが示された．

コガタアカイエカの有機リン抵抗性系統ではアセチルコリンエステラーゼ（Ace 2）に３個のアミノ酸置換が認められ，それらの置換が殺虫剤非感受性に関わっていることが，変異を導入する実験で明らかとなった．コロモジラミのAChE遺伝子の発現を転写産物量で比較したところ，Ace2はmRNAのレベルが体のどの部分でも高く，Ace2がアセチルコリンの加水分解を行っていることが示された．首都圏で採集したWNV媒介蚊の殺虫剤抵抗性レベルを調べたところ，ヒトスジシマカでは全ての殺虫剤に対して感受性であったが，アカイエカ種群ではピレスロイド剤であるetofenproxに感受性低下が認められた．野外集団での殺虫剤感受性を効率的に調査する手法の確立が急務である．アカイエカ種群のピレスロイド殺虫剤抵抗性集団において，酸化酵素P450が薬剤抵抗性に関係していることが，協力剤（PBO）を用いることによって明らかとなった．また，アカイエカ種群のピレスロイド系殺虫剤の作用点であるナトリウムチャンネルの構造解析から，ロイシン999の置換が認められ，典型的なkdr型抵抗性遺伝子の存在が確認された．不快害虫であり，一部病原体の伝播との関わりが指摘されているゴキブリ類は，発育が遅く，各地で採集されたゴキブリ類の殺虫試験を行うことが難しい．そこで，簡易診断法の確立を目指して，ナトリウムチャンネルの構造解析を行った．日本産のチャバネゴキブリから初めて，ロイシン993の変異が見つかった．外国産のチャバネゴキブリの解析より，このアミノ酸置換が単一起源に由来しないことが示唆された．

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

アイルランガ大学獣医学部（インドネシア・スラバヤ市）の動物舎内部に吸血させたネッタイシマカ白色系統と黒色系統を放逐し，産卵場所選択行動にみられる系統間の違いを調査した．動物舎内外の25ヶ所に設置したトラップに産卵された卵を孵化させ，実験室で飼育して羽化した成虫の構成比率を調べた．屋内に産卵された卵の割合は黒系統が87%，白系統が72%であった．白系統の卵の分布は屋内の比較的明るい部屋と動物舎の外回り（庇の下）に集中する傾向があり，黒系統の卵は比較的暗い部屋に集中的に産卵されていた．

［津田良夫，澤邉京子；江下優樹（大分大）；高木正洋（長崎大）］

(2) 都市域におけるドライアイストラップによる蚊類の発生状況調査

2003年5月より12月まで，週1回，ドライアイストラップを24時間設置して蚊成虫の定期採集を行った．捕獲された昆虫はすべて実験室に持ち帰り種類の同定を行った．採集地は東京都５，埼玉県３，神奈川県１，千葉県２の合計11ヶ所である．採集総数約15,000頭のうち蚊類は23％(約3,400頭)を占めた．アカイエカ(含むチカイエカ)，ヒトスジシマカなど10種類の蚊が採集されたが，アカイエカが全体の76%，ヒトスジシマカが23%を占めた．

［津田良夫，倉橋　弘，林　利彦，葛西真治，伊澤晴彦，佐々木年則，澤邉京子，冨田隆史，二瓶直子，小林睦生］

(3) 蚊成虫捕集トラップのための二酸化炭素源：酵母による生物発酵法

蚊成虫捕集の際に誘引物質として使われる二酸化炭素を，酵母による生物発酵によって供給する簡便な方法を開発した．この装置によって少なくとも27時間にわたり平均32.4ml/分の二酸化炭素を産出することができた．吸引型トラップと組み合わせて野外に設置し，産出された二酸化炭素の誘引効果を調べた結果，誘引効果は明らかで，以下の６種の蚊が捕獲された：ヒトスジシマカ，オオクロヤブカ，トラフカクイカ，アカイエカ，ヤマトヤブカ，キンパラナガハシカ．

［津田良夫；斉藤康秀（麻布大）；二瓶直子，倉橋　弘，小林睦生］

(4) 蚊類の発生源としての公園の雨水マス調査

多摩川水系沿いの東西約34kmの範囲に存在する大小30の公園で蚊の幼虫調査を実施した．雨水マスを対象として，その総数，水の溜まっている数を調べ合わせて公園の状況を記載した．水の溜まっていたマスでは，柄杓によって幼虫を採集した．調査総数672の雨水マスのうち，224個に水がたまっていた．ボウフラが発生していた雨水マスの総数は111で，これは調査総数の16.5%，水が溜まっていたマス全体の49.6%に相当する．発生が確認された蚊の種類は個体数の多い順に，アカイエカ，ヒトスジシマカ，トラフカクイカ，の3種であった．

［津田良夫］

(5) 都市域の公園で発生する蚊の季節的変化

都立林試の森公園を調査地として，公園内の雨水マス（約90個）に発生する蚊幼虫および園内16ヶ所で吸血飛来する蚊成虫の季節消長を調べた．水の溜まっている雨水マスは年間を通じてほぼ決まっており全体の24～30％であった．これらの雨水マスの約1/3に幼虫が発生していた．発生が確認されたのはアカイエカ，ヒトスジシマカ，トラフカクイカ，ヤマトクシヒゲカの4種類であった．採集された幼虫（総数7,360）の82.3%はアカイエカで，ヒトスジシマカとヤマトクシヒゲカがそれぞれ8.2%，8.9%を占めていた．昼間に吸血飛来した成虫は99.6%がヒトスジシマカであった．

［津田良夫］

(6) 都市域における蚊の発生状況調査

2003年6月より10月にかけて大阪府内10ヶ所，西宮市2ヶ所の計12ヶ所で週１回ドライアイストラップを設置し蚊の捕集をおこなった．幼虫調査はトラップ設置場所6地点で雨水マスを中心におこなった．成虫は調査地点で捕集数に大きな違いが見られ，アカイエカとヒトスジシマカが主であった．幼虫は雨水マスにアカイエカとヒトスジシマカの発生量が多い傾向が認められた．

［吉田政弘，山下敏男（いきもの研究社）；小原豊美（鵬図商事）；小林睦生］

(7) ドライアイストラップの誘引範囲と採集効率に関する研究

1kgのドライアイスはどれほどの範囲から蚊を誘引するか（誘因範囲），誘引された蚊の何割がトラップに捕獲されるか（捕獲効率）を実験室内で調べた．室内に縦4.5m，横2.5m，高さ2mのケージを吊し，その中央の床上1.3mの位置にドライアイスとトラップをつるした．二酸化炭素濃度の勾配を測定し，誘因範囲の広さを推定したところ約3mであった．ケージ内にヒトスジシマカとアカイエカを放逐し，24時間後に捕獲された個体数を調べて捕獲率を推定した．ヒトスジシマカ，アカイエカの捕獲効率は0.35，0.57であった．

［津田良夫；高木正洋，川田　均（長崎大）］

（8）ドライアイストラップとライトトラップの蚊成虫採集効率の比較研究

蚊成虫調査でライトトラップを用いた場合と1kgのドライアイストラップを用いた場合に，どちらが効率的であるかを知るために比較実験を行った．実験は東京都，埼玉県，神奈川県の住宅で合計18回実施した．捕獲された蚊はアカイエカとヒトスジシマカが主であった．18回の調査でドライアイストラップの捕獲数の方が多かったのは14回，ライトトラップの捕獲数の方が多かったのは2回，どちらも同じ捕獲個体数であったのは2回だった．これらの結果から，ドライアイストラップの方がはるかに効率よく蚊を採集できることがわかった．

［津田良夫，倉橋　弘，二瓶直子，小林睦生］

（9）樹木の存在と吸血飛来蚊の密度に関する研究

東京，長崎，盛岡の3ヶ所で樹上と地上にドライアイストラップを設置して，捕獲される蚊の種類と個体数を調べた．アカイエカは樹上で多く捕獲され，ヒトスジシマカは地上で多く捕獲されることがわかった．吸血飛来するアカイエカの数は，樹冠の位置する高さに影響されるのではなく，樹冠の存在とその状態によって影響されると思われる．樹上で捕獲されるヒトスジシマカの割合は，繁殖期の初めには低く，徐々に高くなっていた．これに対して，アカイエカの樹上で捕獲される割合は，季節を通じてほぼ一定であった．

［津田良夫，倉橋　弘，林　利彦；高木正洋（長崎大）］

（10）ビルの環境衛生からみた屋上緑化

ヒートアイランド現象の緩和，ビルの省エネルギー，大気浄化，自然環境の回復などの効果が期待されるとして「屋上緑化」が促進されている．屋上に設置された緑地にどのような昆虫類が移住し，それがビルの環境衛生保全とどのように関係するのかを調べるために，約1,300平方メートルのビオトープを屋上に持つ6階建ての建物で定期調査を開始した．各階の屋内（24ヶ所）に粘着トラップを設置すると共にビオトープに生育している樹木にムシロを巻きつけトラップされる昆虫類を採集した．これまでの調査で屋内のトラップからはチョウバエ，ゴキブリ，アリ類が捕獲された．

［林　利彦，津田良夫］

（11）成田空港周辺における疾病媒介蚊調査

2003年7,8,9月に成田空港周辺の3ヶ所で疾病媒介蚊の発生状況調査を実施した．調査は1kgのドライアイスに誘引される成虫をトラップによって捕獲して行い，種類と個体数を記録した．その結果14種類780頭の成虫が捕獲された．最も個体数の多かったのはアカイエカ（326頭）でついでヒトスジシマカ（235頭），ヤマダシマカ（80頭），フタクロホシチビカ（29頭）の順であった．水田発生性のコガタアカイエカやハマダライエカ，シナハマダラカも少数だが採集された．

［津田良夫，葛西真治，伊澤晴彦，林　利彦，佐々木年則，澤邉京子，冨田隆史，倉橋　弘，小林睦生］

（12）北海道能取湖におけるドライアイストラップによる蚊の捕集：設置場所と捕集数との関係を中心に

2003年8月上旬の３日間に網走市郊外の能取湖周辺で蚊の捕集を行った．捕集蚊は４属８種で，アカイエカ(88.3%)，ハマダライエカ(9.4%)がおもで，その他アカエゾヤブカ，セスジヤブカ，キンイロヤブカなどであった．１トラップ当たりの最大捕集数は837匹で，3-4mほどの灌木の中に設置したトラップで，近くに設置したトラップでは100匹ほどであったことから，トラップの微環境が捕集数に影響していることが示唆された．

［小林睦生，伊澤晴彦，佐々木年則，二瓶直子，澤邉京子，津田良夫］

（13）東北地方におけるヒトスジシマカの分布拡大と関連する要因

2001年に新たに分布が確認された新庄市，横手市で再調査を行った．新庄では2年前と同様に市内に広範に分布が確認されたが，横手では市内の一部に分布が限局していた．また，過去数回の調査で分布が確認されていなかった盛岡市で初めて2コロニーのヒトスジシマカが確認された．今後，定着するのか継続して調査する必要がある．

［小林睦生，二瓶直子，栗原　毅］

（14）首都圏での媒介蚊類の発生状況と指標昆虫による環境解析

媒介蚊類の発生状況と都市環境との関連を知るためにドライアイストラップで蚊類とともに捕集された小形昆虫類を同定し，指標昆虫の構成割合を分析した．2003年5月～12月，週1日24時間12地点の捕集成績は8目となり，双翅目が最も多く，カ科を含め21科であった．特に多かったものはチョウバエ科（4,363頭），タマバエ科（3,502頭）カ科（3,465頭），クロバネキノコバエ科（1,259頭）の順であった．捕集昆虫の構成割合から，捕集地点間の類似性を5種のクラスター分析法で解析した．蚊の捕集割合の大きい6地点と他の昆虫類の占める割合の大きい6地点とに2分された．

［倉橋　弘，津田良夫，林　利彦，葛西真治，伊澤晴彦，佐々木年則，澤邉京子，冨田隆史，二瓶直子，小林睦生］

（15）日本産ハマダラカ属３種の卵および蛹の形態比較

日本産ハマダラカ属3種，シナハマダラカ，エンガルハマダラカ，オオツルハマダラカは成虫での区別が困難であり，特にシナハマダラカとエンガルハマダラカは有効

な区別点が無いとされている．そこで我々は卵および蛹の形態を調べ，区別点を探してみた．卵では有効な区別点が見いだせなかったが，蛹の脱皮殻では翅鞘部分の斑紋や腹部VII-9の棘の形態などで区別が可能であった．
［林　利彦，澤邉京子，二瓶直子，栗原　毅，小林睦生］

（16）トリインフルエンザ流行地の昆虫学的調査
2004年2～3月にトリインフルエンザが発生した大分県の鳥小屋および京都府の養鶏場周辺を視察し，ハエ類を中心とした昆虫学的調査を実施した．魚肉を使用した採集によってどちらの地域でもオオクロバエを主としたクロバエ類が多数採集された．京都府の調査地では養鶏場から500～1,000mに位置する７ヶ所，2,000～2,500mに位置する2ヶ所を採集場所として選んだ．2日間の調査でハエ類約900頭を捕獲した．養鶏場に最も近い地点で採集した181頭の種類構成はオオクロバエ，ケブカクロバエがそれぞれ約40%，オオイエバエが約16%であった．
［倉橋　弘，津田良夫，林　利彦］

(17) 地域特性を考慮した地球規模のマラリア制圧戦略に関する研究
大陸レベルのマラリア感染率の予測と動向については植生の活性度を示すNDVI値を利用して検討している．島嶼マラリアについては，媒介蚊やマラリア原虫の種や系統が限定され，現地調査に基づく詳細な解析が求められる．本年度は島嶼マラリアについてはソロモン諸島国ガダルカナル島やマライタ島の夫々２カ村で調査を行い，各島嶼間のマラリア原虫の遺伝的背景，特定地域のマラリア原虫の年次的変異，熱帯熱マラリアのクロロキン耐性遺伝子Pf-mdr1の型判定による島嶼間の差異，疫学調査における簡易迅速診断キットの評価，マラリア媒介蚊発生源の調査，媒介蚊成虫のより安全な捕集法，デジタルマップや医療統計を収集した．
［二瓶直子，小林睦生，太田伸生(名古屋市大)，川端眞人(神戸大)，石井　明(自治医大)］

（18）ソロモン諸島国におけるマラリアリスクマップの作成
民族紛争後のインフラの不備や，急峻な山地あるいは低湿な低地の地形的特徴から，現地調査が困難で，しかもマラリア検査も不十分な島嶼におけるマラリアリスクを推測する方法を，地理情報システムGISおよび衛星画像や空中写真によるリモートセンシングで開発した．対象地域は，ソロモン諸島国のうち，内紛終了後のガダルカナル島やマライタ島で，各種血液検査によるマラリア感染状況と，媒介蚊の発生源調査を行った．マラリア感染率と，媒介蚊の発生や人の生活を規定する森林・土壌などの環境要因との関係から，両島のリスクマップを作成した．その他のソロモン諸島国の島嶼については森林分類図から推定し，マラリアリスクの医学地理的解析を継続している．
［二瓶直子，小林睦生，太田伸生(名古屋市大)，金田弘幸(パスコGIS総研)］

（19）GISによるセアカゴケグモ拡散の地域性について
セアカゴケグモの生息地は未だに拡大し，県外にも分布域を広げている状況にある．1995年から2002年までの大阪府におけるセアカゴケグモの移動・拡散様式を，地理情報システムGIS特にspider diagramを作成して解析している．その結果，移動距離，移動範囲，移動手段，移動年からみて地域的差異が認められ，セアカゴケグモが自力で超えることのできない河川やJRの線路を境に，セアカゴケグモの生息する大阪府は３地域に区分されることが明らかになった．これらの分布の特徴を踏まえて監視体制を検討している．
［二瓶直子，小林睦生；吉田政弘（いきもの研究社）；金田弘幸（パスコGIS総研）］

(20) 衛星画像による感染症の分布解析
宇宙開発事業団（現宇宙航空研究開発機構）と昆虫医科学部では研究契約を締結し，マラリア・デング熱・住血吸虫症などの媒介動物の分布やその密度の解析のために，各種の衛星画像を用いたリモートセンシングの利用を検討している．また打ち上げが予定されている陸域観測衛星（ALOS）の利用計画に参画し，すでに入手可能な国内外の各種衛星画像を用いて上記等の感染症対策への基礎調査を実施している．
［二瓶直子，小林睦生；太田伸生(名古屋市大)；平山謙治(長崎大)；川端眞人(神戸大)；松田肇(獨協医大)；近藤昭彦(千葉大)］

（21）無弁翅ハエ類の分類・生態学的研究
東洋区産フンコバエ科のトゲナシフンコバエ属について調べた．ベトナムから１新種が発見され，*Lotophila nepalensis* Hayashiがタイ国から新たに発見された．*Lotophila bicolor* Norrbom et Marshall は従来ネパール東部でのみ発見されていたが，中央部からも記録された．また，ヒロクチバエ科のツマグロホソナガヒロクチバエ*Elassogaster hilgendorgi* Enderleinの日本における分布を調べた結果，従来日本からは本州のみで記録されていたが，北海道から沖縄に至るほぼ全域に分布していることが判明した．
［林　利彦，倉橋　弘］

（22）ハエ類が多包条虫感染に関与する可能性に関する研究
北海道の多包条虫症のヒトへの感染経路の一つとして，ハエ類の関与の可能性を検討した．前年に引き続き北海道でキタキツネの糞に集まるハエ類を採集し，腸管内の多包条虫卵の有無とPCRによる検査を行ったが，結果的

に検出できなかった．また，センチニクバエを用い，実験室内で殺卵した多包条虫卵の摂食と排泄を観察した結果，雌のハエで摂食が活発で，排泄は24時間以内に完了し，虫卵の形態は保持されていたことから，ハエ類が多包条虫症の感染に関与していることが示唆された．
［林　利彦，二瓶直子，小林睦生；堀尾政博，荻野和正，金澤　保（産業医大）；小林文夫，巌城　隆，奥祐三郎，神谷正男（北海道大）］

（23）不快昆虫チョウバエの分類学的研究
首都圏12地点で年間ドライアイストラップで蚊類と同時に捕集された不快害虫のチョウバエの同定を試みた．オオケチョウバエ*Clogmia albipunctatus*（Williston, 1893），ホシチョウバエ*Tinearia alternata*（Say, 1824）など夏に家屋に侵入する普通種のほかに，晩秋から冬にかけて*Psychodocha shikokuensis*（Tokunaga, 1958），*P. itoco*（Tokunaga et Etsuko, 1954），*Psychoda severini* Tonoir, 1922などの微小種が発生していることがわかった．
［倉橋　弘，津田良夫，林　利彦］

（24）衛生動物同定検査報告
平成15年４月から平成16年３月までの間, 31件477個体の昆虫・マダニ・クモ等の同定依頼を受けた．多くは双翅目昆虫であった．ヒトへの被害例では，ヒトヒフバエによる輸入ハエ症例，オオハリアリによる刺症例，フタトゲチマダニによる咬着例等があった．また，不快生物としてアシダカグモとクガビルが初めて持ち込まれた．
［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）チトクロームb遺伝子解析による吸血源動物種の同定
ウエストナイルウイルスの人への感染で重要になる蚊の種類は，吸血源として鳥と人の両方を利用する種類に限られる．そこで蚊の吸血嗜好性を考察するために，PCR法を用い吸血した蚊の動物血液由来DNAから吸血源動物種を同定する方法を確立した．解析の結果，我々の身近に生息するアカイエカやヒトスジシマカはいずれも人も鳥も吸血する種であり，ウエストナイルウイルスの人への伝播を考えた場合，両種ともに人と鳥の間のブリッジベクターとして大きな役割を果たすであろうことが示唆された．また，鳥類種の中で主要な吸血源動物であったカモやスズメは本ウイルスの増幅動物として有力である．
［澤邉京子，伊澤晴彦，佐々木年則，Sudipta Rhoychoudhury；西海　功，濱尾章二（国立科学博物館）；津田良夫，小林睦生］

（2）日本産アカイエカ*Culex pipiens pallens*とチカイエカ*Cx. p. molestus*の鑑別法
ウエストナイルウイルス媒介蚊の吸血嗜好性を評価する上で，形態的に酷似しているためその分類が困難であるが，生態的・生理的には大きく異なる特徴を持つ2種アカイエカ（*Cx. p. pallens*と*Cx. p. molestus*）は明らかに区別して考えなければならない．そこでrDNA ITS1領域の解析と個眼の数によって両者を区別しようと試みた．各実験室内系統に対してITS1領域の塩基配列比較ではほぼ100%，個眼数でも90%の確率で両種を区別しうることを確認した．野外採集蚊に対してもこれらの方法が有効であるか，あるいは他の遺伝子領域の比較も加える必要があるかなどの検討を行っている．
［澤邉京子，比嘉由紀子，葛西真治，伊澤晴彦，佐々木年則，小林睦生］

（3）日本産ハマダラカ属hyrcanus種群の分類と近年の北海道における分布域の推定
1900年代初め北海道においてマラリアの流行が報告されたが，その媒介蚊の特定はなされなかった．北海道には数種類のハマダラカ属hyrcanus種群の蚊が分布するが，形態的特徴のみでの分類には限界があることから，同一個体を用いて，1）成虫における肘節白帯の対節比，2）蛹の形態比較，3）rDNA ITS2領域の塩基配列，の3点から分類を行った．得られた分類結果はほぼ一致し，成虫および蛹の形態にも分類可能な特徴の存在を見出した．これらの分類結果をもとに近年の北海道における分布域を推定したところ，Kanda and Oguma（1978）が報告した当時とはかなり異なることが示唆された．
［澤邉京子，二瓶直子；高井憲治（聖マリアンナ医大）；林　利彦，栗原　毅，小林睦生］

（4）長距離移動性昆虫アカトンボ属*Sympetrum* spp.の日本国内への飛来と定着について
長距離移動性昆虫の我国への飛来と定着を考察するために，朝鮮半島から九州北部へ飛来しその後国内を北上するとされるアカトンボ属のミトコンドリア16S rRNA領域の塩基配列を解析した．その結果，北海道に分布するアキアカネ*S. frequens*は国内の他の地域で採集された集団とは異なり，むしろ韓国産タイリクアキアカネ*S. depressiusculum*に近い配列を持っていた．本種は樺太には分布しないことから樺太経由の侵入ルートは否定され，よって北海道産に見られる遺伝的差異は，アキアカネが氷河期に日本列島に侵入した後，長年にわたって地理的に隔離されたためにもたらされたのであろうと推察した．
［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）］

（5）路上生活者より採取されたコロモジラミからの塹壕熱病原体*Bartonella quintana*（*B. quintana*）の検出（4）
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PCR法で調べた．その結果，衣類にコロモジラミの寄生が見られた8人中3人のシラミから*B. quintana*のクエン酸合成酵素A遺伝子断片もしくは16S-23S rRNA遺伝子intergenic spacer region 1（ITS1）が検出された．これによって，1999年以降コロモジラミからの*B. quintana*の検出率は12.5%となった．

［佐々木年則，関　なおみ，伊澤晴彦；久保田眞由美（細菌第二部）；矢口　昇，望月信宏（豊島区池袋保健所）；澤邉京子；佐々木次雄（細菌第二部）；小林睦生］

（6）オオクロヤブカ*Armigeres subalbatus*由来レクチンのアミノ酸配列

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構造を決定するため，本活性化系が強力なオオクロヤブカ*Armigeres subalbatus*を用いレクチンの部分精製品からアミノ酸配列の解析を行った．今回新たに2つのポリペプチドに対して気相アミノ酸シークエンサーでN末端アミノ酸配列を解析した．その結果，データベース上で特に一致するものは得られなかったが，これまでに得た4つのポリペプチドに対しLC-MS/MSでデノボシークエンシングを行った結果，多くのペプチドの配列を解析することに成功した．

［佐々木年則，伊澤晴彦，澤邉京子，小林睦生］

（7）Taq-Manプローブ法による日本国内で捕集された蚊からのウエストナイルウイルス遺伝子検出の試み

日本国内の蚊におけるウエストナイルウイルスのサーベランスを目的に，蚊からのウエストナイルウイルス遺伝子の検出を試みた．成田，盛岡，北海道，富山，大阪，首都圏，沖縄，長崎で捕集された蚊プールを破砕後，ヒトスジシマカ由来C6/36細胞に接種し，培養上清からRNAを抽出した．その後，Taq-Manプローブ法にてウエストナイルウイルス遺伝子の検出を試みたが，いずれの蚊プールからも検出されなかった．2003年国内捕集蚊においてウエストナイルウイルスは認められなかった．

［佐々木年則，伊澤晴彦，澤邉京子，小林睦生］

（8）本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの検出と分離

日本国内に生息する蚊類のウイルス保有状況，ならびに蚊媒介性アルボウイルスの国内分布現況を把握する目的で，野外捕集蚊からのウイルス分離とその種の同定を行った．2003年5月から10月にかけて，国内8地域においてドライアイストラップ等を用いて蚊類（9属20種7,281個体）を捕集し，種別および地域ごとに分けた乳剤を調製し，培養細胞接種によるウイルス分離に供した．また，これら細胞上清からRNAを抽出し，遺伝子解析によりウイルス種の同定を行っている．

［伊澤晴彦，澤邉京子，佐々木年則，津田良夫，倉橋　弘；高崎智彦，小滝　徹（ウイルス一部）；吉田政弘（いきもの研究社）；渡辺　護（富山衛研）；小林睦生］

（9）フタトゲチマダニ唾液腺由来トロンビンインヒビターの同定および機能解析

フタトゲチマダニ*Haemaphysalis longicornis*唾液腺に含まれる新規生理活性物質を探索するために，唾液腺遺伝子の大量解析を行い，２種の新規トロンビンインヒビターを同定した．これらは，分子量6～7kDaの蛋白質で吸血後期に大量に発現し，トロンビンによるフィブリノーゲンからフィブリンへの転換を阻害することが判明した．さらに，トロンビンのフィブリノーゲン結合部位に特異的に結合することから，トロンビン-フィブリノーゲン間の相互作用を阻害することで抗血液凝固活性を示すことが示唆された．

［伊澤晴彦；岩永史朗（神戸大）；油田正夫，鎮西康雄（三重大）］

（10）マラリア原虫スポロゾイトのハマダラカ唾液腺への特異的集積機構に関する解析

マラリア原虫のハマダラカ唾液腺への特異的集積機構を解明するために，ネズミマラリア原虫*Plasmodium berghei*のスポロゾイト期に発現し，ハマダラカ唾液腺への接着・侵入に重要な働きを持つ蛋白質MAEBLの機能解析を行った．大腸菌にて発現させたMAEBL組換え蛋白質は，マウス赤血球に対する強い凝集活性を有していた．また，組み換え蛋白質に対する抗体を作製し，蛍光抗体法によりスポロゾイトでの発現と局在を調べたところ，当該蛋白質は原虫の前方先端部で強い発現が見られることが判明した．

［伊澤晴彦，佐々木年則，澤邉京子；油田正夫，鎮西康雄（三重大）］

（11）ヤブカ寄生性原虫*Ascogregarina culicis* および*A. taiwanensis*のリボゾームDNAおよび熱ショック蛋白質70遺伝子のクローニング

*Ascogregarina culicis*および *A. taiwanensis*は，それぞれネッタイシマカおよびヒトスジシマカに特異的に寄生する原虫であるが，形態的に酷似していることからその区別は困難であった．そこで両種を明確に区別し，他のアピコンプレクス原虫との分子進化的類縁関係を検証する目的で，リボゾームDNAおよび熱ショック蛋白質70遺伝子のクローニングを行った．次いで，これら遺伝子に基づく分子系統樹を作成し，他の胞子虫類の原虫との類縁関係を明らかにした．

［Sudipta Rhoychoudhury，伊澤晴彦，澤邉京子，佐々木年則，小林睦生］

（12）ブラジルサシガメ唾液腺に見いだされた接触相活

性化阻害活性蛋白質の性状解析

シャガス病を媒介する吸血昆虫ブラジルサシガメ*Triatoma infestans*の唾液腺から分子量約22kDaの新規生理活性蛋白質を同定した．この唾液腺蛋白質は，血液凝固第XII因子および高分子キニノゲンに対して特異的に結合し，これら血漿蛋白質の異物表面への結合を阻止することで，内因系凝固反応および接触相活性化を強く阻害することが明らかとなった．またこの結果として，炎症反応の原因物質であるブラジキニンの産生を強く抑制することが判明した．

［伊澤晴彦；油田正夫，織戸由貴，神宮司成弘，鎮西康雄（三重大）；岩永史朗，加藤紀子（神戸大）］

(13) オオクロバエとケブカクロバエの卵巣発育とエクジステロイド

卵黄蛋白の蓄積を誘導するホルモン，エクジステロイドの羽化後の変動をラジオイムノアッセイ法によって検討した．その結果エクジステロイドの増加が認められだした時点において，卵の発育が始まることを確認した．ケブカクロバエのエクジステロイドは羽化後3日目，オオクロバエのそれは羽化後10日目から顕著な増加がありその増加と共にそれぞれの卵黄蛋白の蓄積が始まることを確認した．このことはまたケブカクロバエに比べるとオオクロバエの卵巣発育が遅いことを，またオオクロバエの飛翔距離がケブカクロバエより長いことを裏付ける結果と一致していた．

［森林敦子，主藤千枝子，倉橋　弘］

(14) チカイエカの着色物質の体内動態

当部で継代されているチカイエカ（洞穴系統）の変態過程において緑青に着色した物質が脂肪体に蓄積していくことが観察された．その物質は終齢幼虫後期に顕著に蓄積が開始されることがわかった．その物質を手がかりに幼虫の♂，♀の分離を試みたところその物質を多く含む固体は91.8±9.5%の確率で♀であった．またこの物質は羽化後2日で体外に排泄されはじめた．体外に排泄された物質は，メタノール，アルコール，アセトン，クロロフォルム等には不溶性で水に可溶性の物質であることがわかった．今後この物質の構造決定と生理的特性を明らかにすることを試みる．

［森林敦子，津田良夫，澤邉京子；斎藤典子（電顕室）］

(15) アセチルコリンエステラーゼ遺伝子（*Ace2*）の *in vitro* 発現

コガタアカイエカとナミハダニの有機りん剤抵抗性系統，およびモモアカアブラムシのピリミカーブ抵抗性系統では，*Ace2* のアシルポケットに位置する Phe331 座位（シビレエイ配列に準拠）に，それぞれ，F331W, F331C, S331F 置換が特異的に生じている．殺虫剤感受性コガタアカイエカの *Ace2* cDNA にこれらのアミノ酸置換変異をそれぞれ導入し，AcMNPV-Sf9 系で発現させた酵素の殺虫剤感受性を調べ，抵抗性昆虫より直接抽出した酵素の感受性と比較することにより，これら３つの変異は，それぞれ，殺虫剤非感受性をもたらす構造変化であることを確かめた．

［古崎利紀；鍋島　武，河野義明（筑波大）；葛西真治，冨田隆史］

(16) コロモジラミにおける２つのアセチルコリンエステラーゼ（AChE）遺伝子の発現

有機りん系殺虫剤のマラチオンは，海外ではヒトジラミの駆除薬として広く利用されているが，作用点である AChE の感受性低下により，抵抗性コロニーが出現している．アタマジラミと同種であるコロモジラミの殺虫剤感受性 NIID 系統を用い，２つの AChE 遺伝子，*Ace1* と *Ace2*，の転写産物量を定量 PCR により測定した．*Ace2* は *Ace1* に比較して，頭・胸部および腹部において，それぞれ，9.3倍と6倍高い mRNA レベルを示したことから，*Ace2* 酵素が神経伝達物質アセチルコリンの加水分解を行う主要な分子種であることが示された．

［冨田隆史，李時雨，葛西真治］

(17) コガタアカイエカ有機りん剤非感受性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子（*Ace2*）の分布

2003年に富士見，横浜，成田，小矢部，岐阜，諫早の各市より採集した計135頭の成虫を用い，全頭に対してフェニトロオクソンを用いた酵素阻害試験と定量PCR装置を用いたアリル特異的PCRを行い，有機りん剤非感受性要因となる *Ace2* の F455W（TTT-TGG） 置換に関する遺伝子型を推定した．その結果，抵抗性遺伝子頻度は，採集地により 83-100% の範囲，全頭プールでは 94% であった．cDNA の直接配列決定により F455 座位を含む250塩基長を解析したところ，調べた 48頭 の抵抗性遺伝子は同一の配列を示し，抵抗性突然変異の単一起源が示された．

［李時雨，葛西真治，冨田隆史］

(18) 首都圏を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の殺虫剤感受性試験

ウエストナイルウイルスの日本への侵入に備え，媒介蚊の有機リン剤，ピレスロイド剤，キチン合成阻害剤，幼若ホルモン様殺虫剤に対する感受性を調査した．ヒトスジシマカでは全ての殺虫剤に対して高い感受性が認められたのに対し，アカイエカ群においてはピレスロイド剤であるetofenproxに対して感受性低下を示す個体の存在が首都圏の広範な地域から確認された．今後，全国的に調査を展開し，抵抗性機構を詳細に解明することで，抵抗性の発達速度や交差抵抗性のスペクトルを予測するシステムを構築すると共に，野外集団の薬剤感受性を効率的に調査する手法の確立が急務であると考察された．

［葛西真治；石川　剛（シェル商事（株）；正野俊夫，津田良夫，小林睦生，冨田隆史］

（19）アカイエカ群のピレスロイド剤抵抗性に対する解毒酵素の関与

首都圏より採集したアカイエカ種群の中で，etofenprox抵抗性の度合いが高かった集団について，抵抗性機構を調べた．渋谷，新宿，市川産チカイエカおよび林試の森公園産アカイエカについてetofenproxに対する半数致死濃度（LC_{50}）を算出するとともに，酸化酵素チトクロムP450の阻害剤であるPBO処理下でのLC_{50}値を求めた．P450の抵抗性への貢献度合いを示す共力係数は9～548であり，全系統の抵抗性にチトクロムP450酸化酵素系が関与していることが明らかとなった．これにより，アカイエカ群のetofenprox抵抗性には解毒酵素の活性増大と神経感受性低下の少なくとも2つの機構が働いていることが示された．

［葛西真治，正野俊夫，津田良夫，冨田隆史］

（20）ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群における殺虫剤作用点の種特異的構造変化

首都圏で採集されたetofenprox抵抗性アカイエカおよびチカイエカについて，ピレスロイド系殺虫剤の作用点であるナトリウムチャネルの構造解析を行った．抵抗性チカイエカ3コロニーでは，ともにロイシン999がフェニルアラニンへと置換されており，典型的な*kdr*型抵抗性遺伝子を有する蚊が日本に存在することを初めて確認した．一方，抵抗性アカイエカ5コロニーでは999番目のアミノ酸がフェニルアラニンではなく，全てセリンへと置換されていた．アカイエカ，チカイエカは種特異的なアミノ酸変化によってそれぞれの抵抗性を発達させており，亜種か別種かで議論が分かれる両種が，独立種として分化している可能性を示唆した．

［葛西真治，正野俊夫，李時雨，冨田隆史］

（21）チャバネゴキブリのピレスロイド剤抵抗性機構解明

世代間のサイクルが長く，殺虫試験を行うのに時間と労力を要するため殺虫剤抵抗性の全国調査が進んでいないチャバネゴキブリについて簡易診断法を確立するため，permethrin抵抗性系統（新幹線系）を用いて抵抗性機構の解明を試みた．作用点であるナトリウムチャネルの構造解析を行ったところ，日本産のチャバネゴキブリとしては初めて，Leu993Pheを有する*kdr*型の変異を確認した．また，解析したcDNA配列内には，新幹線系統と米国産Ectiban-R系統の比較において3つの塩基座位に同義置換があったことから，日本産と米国産の*kdr*型ナトリウムチャネル遺伝子のLeu993Phe置換変異が単一起源に由来するものではないことが明らかになった．

［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）Satho, T., Tsuda, Y., Somboon, P., Kawada, H. and Takagi, M.: Difference in the larval susceptibility to pyriproxyfen in nine colonies of six vector mosquito species. Med. Entomol. Zool., 54: 155-160, 2003.

2）Dieng, H., Boots, M., Mwandawiro, C., Satho, T., Hasegawa, M., Nyambura, G. J., Saita, S., Kawada, H. Tsuda, Y. and Takagi, M.: Effects of a copepod predator on the survivorship and development of *Aedes albopictus*（Diptera: Culicidae）. Med. Entomol. Zool., 54: 187-192, 2003.

3）Nihei, N., Yoshida, M., Kobayashi, M., Kaneta, H., Shimamura, R. and Agui, N.: Geographic information systems（GIS）analysis of the distribution of the redback spider *Latrodectus hasseltii*（Araneae: Theridiidae）in Osaka, Japan. Med. Entomol. Zool., 54: 177-186, 2003.

4）Kurahashi, H.: Blow flies recorded from Irian Java, Indonesia, with description of one new species（Diptera, Calliphoridae）. Jpn. J. Syst. Entomol., 9: 127-134, 2003.

5）Tomita, T., Yaguchi, N., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Kasai, S.: Molecular analysis of a *para* sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis*（Anoplura: Pediculidae）. J. Med. Entomol., 40: 468-474, 2003.

6）Kurahashi, H. and Shudo, C.: Photoperiodically induced delayed oogenesis in the blow fly, *Aldrichina grahami*（Diptera: Calliphoridae）. Med. Entomol. Zool., 54: 275-281, 2003.

7）Tuno, N., Tsuda, Y., Takagi, M. and Swonkerd, W.: Pre- and postprandial mosquito resting behavior around cattle hosts. J. Am. Mosq. Control Assoc., 19: 211-219, 2003.

8）Kurahashi, H.: Blow flies from the Solomon Islands, with description of a new species（Diptera: Calliphoridae）. Jpn. J. Syst. Entomol., 9: 277-289, 2003.

9）Tsuda, Y., Maekawa, Y., Saita, S., Hasegawa, M. and Takagi, M.: Dry ice-trap collection of mosquitoes flying near a tree canopy in Nagasaki, Japan with special reference to *Aedes albopictus*（Skuse）and *Culex pipiens pallens* Coquillett（Diptera: Culicidae）. Med. Entomol. Zool., 54: 325-330, 2003.

10）Kasai, S., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Tomita, T.: An artificial blood feeding system for body louse, *Pediculus humanus*. Med. Entomol. Zool., 54: 343-351, 2003.

11）Hayashi, T.: A new species and distributional notes on the genus *Lotophila* Lioy（Diptera: Sphaeroceridae）from the Oriental Region. Med. Entomol. Zool., 54: 367-370, 2003.
12）Hu, X.-M., Tsuda, Y. and Takagi, M.: Survival and development of larvae of three tropical malaria vectors（Diptera: Culicidae）under a seasonally changing temperature condition in Nagasaki, Japan. Med. Entomol. Zool., 54: 371-379, 2003.
13）Dieng, H., Boots, M., Tuno, N., Tsuda, Y. and Takagi, M.: Life history effects of prey choice by copepods: implications for biocontrol of vector mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc., 19: 67-73, 2003.
14）Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T. and Kono, Y.: An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. Biochem. Biophys. Res. commun., 307: 12-22, 2003.
15）Sukontason, K., Sukontason, K. L., Piangjai, S., Chaiwong, T., Boonchu, N., Kurahashi, H. and Vogtsberger, R. C.: Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux*（Thomson）(Diptera: Sarcophagidae). Micron, 34: 359-364, 2003.
16）Sukontason, K., Sukontason, K. L., Piangjai, S., Chaiwong, T., Boonchu, N. and Kurahashi, H.:Hairy maggot of *Chrysomya villeneuvi*（Diptera: Calliphoridae）, a fly species of forensic importance. J. Med. Entomol., 40: 983-984, 2003.
17）Nagao, Y., Dachlan, Y. P., Soedarto, Hidajati, S., Yotopranoto, S., Kusmartisnawati, Sri Subekti, Ideham, B., Tsuda, Y., Kawabata, M., Takagi, M. and Looareesuwan, S.: Distribution of two species of malaria, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, on Lombok Island, Indonesia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 34: 495-500, 2003.
18）Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H., Morita, A., Yuda, M. and Chinzei , Y.: Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. Eur. J. Biochem., 270: 1926-1934, 2003.
19）Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D. W., Kono, Y. and Tomita, T.: An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 313: 794-801, 2004.
20）Nihei, N., Kajihara, N., Kirinoki, M., Chigusa, Y., Saitoh, Y., Shimamura, R., Kaneta, H. and Matsuda, H.: Fixed-point observation of *Oncomelania nosophora* in Kofu Basin-establishment of monitoring system of schistosomiasis japonica in Japan. Parasitol. Int., 52: 395-401, 2003..
21）Sawabe, K., Takagi, M., Tsuda, Y., and Tuno N.: Molecular variation and phylogeny of the *Anopheles minimus* complex（Diptera: Culicidae）inhabiting Southeast Asian countries, based on ribosomal DNA Internal spacers, ITS1 and 2, and the 28S D3 sequences. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 34, 771-780, 2003.
22）Omar, B., Marwl, M A., Sun, C. M., Jeffrey, J. and Kurahashi, H.: Distribution of medically important flies at various altitudes of Titiwangsa Range near Kuala Lumpur, Malyasia. Trop. Biomed., 20:137-144, 2003.
23）Kurihara, T., Shinohara, A. and Kurahashi, H.: Type specimens of mosquitoes（Diptera, Culicidae）deposited in the National Science Museum, Tokyo. Bull. Natl. Sci. Mus. Ser. A（Zool.）, 30:45-60, 2004.
24）Miyagi, I., Toma, T. and Higa, Y.: A new species of *Mimomya*（*Ingramia*）from Indonesia（Diptera: Culicidae）. Med. Entomol. Zool., 55: 11-20, 2004.
25）Nihei, N., Yoshida, M., Kaneta, H., Shimamura, R. and Kobayashi, M.: Analysis on the dispersal pattern of newly introduced redback spider *Latrodectus hasseltii* in Japan by spider diagram. J. Med. Entomol., 41（in press）, 2004.
26）Scott, J.G. and Kasai, S.: Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. Pesticic. Biochem. Physiol., 78: 171-178, 2004.

２．和文発表

原　著

1）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
, 朝倉書店.
2）栗原　毅：日本におけるデング熱媒介蚊研究の概要．Med. Entomol. Zool., 54: 135-154, 2003.
3）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：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, 2003.
4）小林睦生：疫学調査の重要性．生活と環境，48(6): 11, 2003.
5）小林睦生：「ウエストナイル熱媒介対策に関するガイドライン」解説．生活と環境，48(7): 40-43, 2003.
6）小林睦生：気になる病気MONTHLY,アタマジラミ．日経ヘルス，No. 67: 77. 2003.
7）小林睦生：Seminar:［蚊が媒介する感染症］ウエストナイル熱－米国での流行から何を学ぶかー．感染症，33(4): 33-39, 2003.
8）小林睦生：危険なゴケグモに注意！　ゴケグモを知る必要性．小学保健ニュース，第695号付録，1, 2003.
9）葛西真治，冨田隆史：cDNAアレイ法によるチトクロム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．日本農薬学会誌，28:473-478, 2003.
10）二瓶直子：感染症の拡大を予測する．地理，48(1): 74-83, 2003.

11）二瓶直子：宇宙から住血吸虫症をみつめて．日本住血吸虫発見100年．医学のあゆみ，208(2): 91-94, 2004.
12）津田良夫：デング熱媒介蚊の生態（東南アジアを例として）．病原微生物検出情報，25(2): 9-10, 2004.
13）小林睦生，二瓶直子，栗原　毅：わが国のデング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布拡大について．病原微生物検出情報，25(2): 10-11, 2004.
14) 小林睦生:海外旅行と感染症－虫よけ. 治療学, 38(3): 42-44, 2004.
15）林　利彦，倉橋　弘：日本におけるツマグロホソナガヒロクチバエ（新称）*Elassogaster hilgendorfi* Enderlein, 1924（双翅目：ヒロクチバエ科）の分布について．はなあぶ，17: 1, 2004.

Ⅱ．学会発表

１．国際学会

1）Tomita, T., Kasai, S., Nabeshima, T., Kozaki, T. and Kono, Y.:Insecticide-resistance due to structural changes of target sites in medical pests. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 28-31, 2003, Pusan.
2）Lee, S-W, Tomita, T., Kasai, S.: Preservation of louse, *Pediculus humanus*, DNA for PCR with gene specific primers. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 28-31, 2003, Pusan.
3）Kozaki, T., Tomita, T., Kono, Y.: Structural changes of acetylcholinesterase accompanied the insecticide resistance in the housefly, *Musca domestica*. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 28-31, 2003, Pusan.
4）Kasai, S. and Tomita, T.: Sex specific expression of cytochorome P450s in *Drosophila melanogaster*. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 28-31, 2003, Pusan.
5）Tomita, T., Yaguchi, N., Mihara, M., Agui, N. and Kasai, S.: Sodium channel point mutations associated with pyrethroid-resistance in the head louse, 3rd Pan-Pacific Conference on Pesticide Science, June 1-3, 2003, Honolulu.
6）Iwanaga, S., Kato, N., Isawa, H., Yuda, M. and Chinzei, Y.: Identification and characterization of novel anticoagulants from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. International Symposium: The Expression Mechanism of Insect Functions, September 21-23, 2003, Tokyo.
7）Scott, J.G. and Kasai, S.: Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. 2003 Entomological Society of America Annual Meeting and Exhibition, October 26-29,　2003, Cincinnati Convention Center, Cincinnati, Ohio, USA
8）Nihei, N. and Nakamura, S.: Establishment of monitoring system of schistosomiasis japonica in Japan；Breeding of the intermediate snail of schistosomiasis, and　fixed-point observation of *Oncomelnia nospohora* in Kofu Basin. The 4th RNAS (The Regional Network for Research, Surveillance and Control of Asian Schistosomiasis) Workshop, November 25-27,2003, Vienchian, Laos.

２．国内学会

1）津田良夫：人為選抜したネッタイシマカ白色系統と黒色系統の個体群形質の比較．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
2）前川芳秀，高木正洋，津田良夫，Subagyo, Y., Yoes, D., 川田　均，　吉永一未，　神原廣二：インドネシアロンボク島ムニンティング郡のマラリア媒介蚊について．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
3）才田　進，津田良夫，杉山　章，Hu, X. M., Nyambur, J., 高木正洋：西浜川周辺（石垣島）における*An. minimus*の分布調査－2002年－．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
4）高井憲治，小熊　譲，栗原　毅，二瓶直子，澤邉京子，小林睦生：ハマダラカ*An. engarensis*成虫の形態分類形質について．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
5）澤邉京子，小林睦生，二瓶直子，栗原　毅，高井憲治：日本産ハマダラカ属*hyrcanus*種群の分子系統分類の試み．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
6）Sudipta Roychoudhury，小林睦生：Extraction method of *Ascogregarina* sporozoite, a potential tool of gene vector approach．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
7）葛西真治，李時雨，冨田隆史：ピレスロイド剤抵抗性ネッタイイエカの作用点変異．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
8）冨田隆史，葛西真治，李時雨，矢口　昇，三原　實，安居院宣昭：アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性に関連するナトリウムチャネル遺伝子の点突然変異．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
9）二瓶直子，吉田政弘，小林睦生，金田弘幸，嶋村竜太：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について．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
10）二瓶直子，橋田良彦，川端眞人，小林睦生，Bacotee, B., Leafasla, J.，石井　明：ソロモン諸島国におけるマラリアリスクマップ作成に向けて．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.

11）小林睦生，二瓶直子，栗原　毅：東北地方におけるヒトスジシマカの分布調査：山形市の事例を中心に．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
12）倉橋　弘：旧世界のオビキンバエ属の再検討．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
13）林　利彦：日本産ヒメフンコバエ属（Genus *Spelobia*）の分類学的研究（双翅目，フンコバエ科）．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
14）渡辺　護，長谷川澄代，安居院宣昭：富山県におけるコガタアカイエカとシナハマダラカ捕集数の年変動とその要因解析．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
15）伊澤晴彦，油田正夫，織田由貴，鎮西康雄：ハマダラカ唾液腺蛋白質ハマダリンによる接触相活性化阻害の分子機構．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
16）佐々木年則，澤邉京子，江下優樹，伊藤美佳子，高崎智彦，倉根一郎，小林睦生：VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
17）青木千春，大塚　靖，高岡宏行，林　利彦：大分県におけるメマトイ類３種の*Thelazia*幼虫自然感染．第55回日本衛生動物学会大会，15年3月31日-4月2日，大分医科大学.
18）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-4月2日，大分医科大学.
19）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-4月2日，大分医科大学.
20）小林睦生：我が国におけるウエストナイルウイルス媒介蚊の分布，生態およびその対策．　第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会シンポジウム，「ウエストナイル熱の疫学と予防対策」，15年5月15-16日，小樽市.
21）佐々木年則，澤邉京子，伊澤晴彦，江下優樹，伊藤美佳子，高崎智彦，倉根一郎，小林睦生：イムノクロマトグラフィーによる蚊からのウエストナイルウイルスの検出．第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会，15年5月15-16日，小樽市.
22）伊澤晴彦，油田正夫，織戸由貴，　鎮西康雄：ハマダラカ*Anopheles stephensi*唾液腺由来新規抗凝固蛋白質の解析．第67回日本生化学会中部支部例会，15年5月24日，津市.
23）小林睦生：ウエストナイル熱とその予防．東京都健康局・病院経営本部専門性向上研修「公開講座」，15年6月10日，東京都.
24）小林睦生：ウエストナイル熱及びその媒介蚊対策について．日本家庭用殺虫剤工業会・日本防疫殺虫剤協会主催講演会，15年7月4日，東京都.
25）小林睦生：ウエストナイル熱とその予防－ウエストナイル熱の媒介蚊とその対策．北多摩北部地域保健医療圏感染症予防講演会，15年7月10日，小金井市.
26）津田良夫：ウエストナイル熱と媒介蚊について．日本環境衛生センターウエストナイル熱媒介蚊防除対策実技講習緊急セミナー，15年7月15日，30日，9月3日，川崎市.
27）小林睦生：ウエストナイル熱媒介蚊対策．日本ペストコントロール協会創立35周年記念講演会，15年10月2日，大阪市.
28）小林睦生：ウエストナイル熱媒介蚊対策の現状．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会特別講演，15年10月3日，横浜市.
29）小林睦生，津田良夫，澤邉京子，佐々木年則，伊澤晴彦，二瓶直子，栗原　毅：北海道，能取湖においてドライアイストラップと人囮法で採集されたアカエゾヤブカについて．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
30）倉橋　弘，森林敦子，主藤千枝子，津田良夫，K. & K. Sukontason：タイ国チェンマイ産センチニクバエの非休眠コロニー．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
31）澤邉京子，佐々木年則，伊澤晴彦，Sudipta Roychoudhury，小林睦生：野外採集蚊からのウエストナイルウイルスの検出－2003年度前期報告－．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
32）高井憲治，小熊　譲，栗原　毅，二瓶直子，澤邉京子，小林睦生：*Anopheles engarensis*と北海道産*An. sinensis*の前脚白帯による識別．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
33）秦　和壽，栗原　毅：衛生害虫の伝統的な対応法（12）ゴキブリと“油虫”の関係．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
34）斉藤康秀，服部順子，芽根士郎，二瓶直子，津田良夫，小林睦生：酵母を用いた生物発酵に寄り産生された炭酸ガスを利用した蚊の捕集について．第55回日本衛生動物学会東日本支部大会，15年10月3日，横浜市.
35）小林睦生：ウエストナイル熱媒介蚊防除における問題点．第47回全国環境衛生大会，15年10月15-16日，岐阜市.
36）加藤紀子，岩永史朗，伊澤晴彦．油田正夫，鎮西康雄：Characterization of two Kunitz type domains of novel contact system inhibitor, Haemaphysalin. 第76回日本生化学会大会，15年10月15日-18日，横浜市.
37）二瓶直子：感染症媒介ベクターの実態，生息防止対策に関する研究―GISによる解析について．獨協医科大学社会医学系セミナー，15年10月17日，栃木県壬生町.
38）才田　進，津田良夫，川田　均，高木正洋：CDC型電動昆虫吸引機を用いた休息蚊採集の試み．第56回日本

寄生虫学会南日本支部・第53回衛生動物学会南日本支部合同大会，15年10月25-26日，鹿児島市.
39）堀尾政博，荻野和正，金澤　保，小林文夫，巌　城隆，奥祐三郎，神谷正男，八木欣平，林　利彦，二瓶直子：ハエ類がヒトの多包条虫感染に関与する可能性の検討ーセンチニクバエの多包条虫卵の取り込みと排泄．第56回日本寄生虫学会南日本支部・第53回日本衛生動物学会南日本支部合同大会，15年10月25-26日，鹿児島市.
40）小林睦生：ウエストナイル熱の媒介蚊対策．平成15年度狂犬病予防等（動物由来感染症対策を含む）技術研修会，15年10月31日，東京都.
41）小原豊美，吉田政弘，平良常弘，芝生幸夫，小林睦生：都市域における蚊の発生源について．第58回日本衛生動物学会西日本支部大会，15年10月31日-11月2日，金沢市.
42）伊藤美佳子，高崎智彦，新井　智，小林睦生，倉根一郎：地球温暖化と節足動物媒介性ウイルス感染症．シンポジウム「気候変化と健康」，気候影響・利用研究会・バイオクリマ研究会．15年11月8日，東京都.
42）小林睦生：ねずみ・衛生害虫駆除活動と地区衛生活動．新潟市住みよい郷土推進協議会衛生活動研修会，15年11月21日，新潟市.
44）小林睦生：衛生動物をめぐる最近の話題．第39回ねずみ衛生害虫駆除技術研修会，15年12月2日，川崎市.
45）澤邉京子，伊澤晴彦，佐々木年則，津田良夫，小林睦生：チトクロームb遺伝子解析によるアカイエカ類とヒトスジシマカの吸血源動物種の同定．日米医学協力研究会寄生虫疾患専門部会国内研究会議，16年1月24日，東京都.
46）二瓶直子，橋田良彦，金田弘幸，小林睦生，川端眞人，太田伸生，Bakote'e, B., Leafasia, J.，石井　明：GISによるソロモン諸島国マラリアリスクの推定．日米医学協力研究会寄生虫疾患専門部会国内研究会議，16年1月24日，東京都.
47）二瓶直子：位置情報と地理情報システムー基礎・応用・渡り鳥調査の事例から学ぶー．（オーガナイザー講演），＋第42回日本衛生動物学会東日本支部例会，16年1月30日，東京都.
48）小林睦生：ウエストナイル熱媒介蚊対策ー昆虫学的研究の最前線ー．第38回ねずみ・衛生害虫駆除研究協議会，16年2月26-27日，名古屋市.
49）佐々木年則：蚊における生体防御機構の解明と創薬への応用に関する研究．創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業（第Ⅱ期）研究成果発表会，16年3月12日，東京都.
50）葛西真治：ピレスロイド剤抵抗性の要因としてのシトクロムP450に関する研究．日本農薬学会第29回大会奨励賞受賞講演，16年3月24日-26日，神戸市.
51）冨田隆史，葛西真治：殺虫剤作用点探索と抵抗性機構解明のためのチトクロムP450遺伝子発現の解析．第48回日本応用動物昆虫学会大会「昆虫ゲノムの解析と利用」小集会，16年3月26日-28日，京都市.
52）李時雨，葛西真治，冨田隆史：コガタアカイエカ集団における殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の全国的分布．第48回日本応用動物昆虫学会大会，16年3月26日-28日，京都市.
53）土`田聡，駒崎進吉，冨田隆史，河野義明：ワタアブラムシのピリミカーブ抵抗性に関与するアセチルコリンエステラーゼ遺伝子上の突然変異．第48回日本応用動物昆虫学会大会，16年 3月26-28日，京都市.

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），マレーシア，15年8月18日－29日.
2）津田良夫：都市化がもたらすデング熱媒介蚊の生態遺伝的変化(科学研究費補助金)インドネシア・スラバヤ，.16年1月19日－2月1日.
3）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），タイ・チェンマイ，16年2月11日－22日.
4）二瓶直子：ソロモン諸島国におけるマラリアリスクマップの作成（厚生労働省国際医療協力研究委託費），ソロモン諸島国ガダルカナル島・マライタ島，16年2月4-13日.
5）小林睦生：台湾におけるデング熱流行地の媒介蚊対策に関する調査．台北．高雄，16年3月15日－18日.

12.獣 医 科 学 部

部長　　山田　章雄

概　　要

平成15年度は中国に端を発した重症急性呼吸器症候群（SARS）が世界中を席巻した年であったが獣医科学部も様々な面で影響を受けた。またこの疾患の原因であるSARSコロナウイルスがハクビシンに由来した可能性が指摘されたことや、アメリカでサル痘の発生があったことなどから動物由来感染症対策の重要性があちらこちらで強調された。

人事面では9月に朴　天鎬が第1室研究員、加来義浩が第2室研究員として採用された。また10月には第3室に堀田明豊、第4室に山田こずえが研究員として採用された。更に平成16年1月には奥谷晶子が第2室研究員として採用された。第1室の朴研究員は就任半年ではあったが、北里大学獣医学部助手として請われたため、3月付で退職した。

研究面では厚生労働科学研究費補助金等の支援を受け、例年同様滞りなく進められた。詳細は個々の報告を参照されたい。

研　究　業　績

Ⅰ.　動物由来感染症に関する研究

１．　愛玩動物の衛生管理の徹底に関する研究

近年、愛玩動物の飼育状況は大きく変化している。飼育される愛玩動物の数が増加したことに加えて、イヌ、ネコをはじめとした従来からの愛玩動物のみならずエキゾチック・アニマルと呼ばれる野生由来動物が飼育されるようになった。また、集合住宅等での飼育が容認傾向にあり人間との密着度が高まり、高齢者等の免疫低下者が愛玩動物を室内飼育する例も増加している。またほとんどの小学校等では種々の小動物を飼育している。このように、これまでにないペットブームといわれる現在、愛玩動物はヒトとの距離と接触時間の面から、動物由来感染症予防の目的で日常生活において最も注意を払うべき動物と理解される。本研究では、今後わが国でも大きな公衆衛生問題となることが危惧される愛玩動物由来感染症の調査研究を進め、飼育状況と疾病発生の調査、診断法の開発と普及等を行うとともに、これらの成績を公開して教育・啓発活動も積極的に進め、愛玩動物の衛生管理の徹底を図ることを目的としている。[神山恒夫、今岡浩一、岸本寿男＊（＊感染研・ウイルス第一部）、荒島康友（日大・医）、宇根有美（麻布大・獣医）、佐野文子（千葉大・真菌センター）、丸山総一（日大・生物資源）]

２．　ブルセラ症・病に関する研究

（１）ブルセラ属菌の菌種同定のための特異的PCR法の開発に関する研究

感染症法で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ある。今回、人での感染報告のあるブルセラ属菌4菌種（*B. abortus*（以下 *BA*）、*B. melitensis*（*BM*）、*B. suis*（*BS*）、*B. canis*（*BC*））を同定するためのPCR法を開発した。プライマーは、細胞表面タンパク(BCSP31: プライマーセット B4/B5)および外膜タンパク(OMP2: 同 JPF/JPR2ab, JPF/JPR2ca、OMP31: 同 1S/1AS)領域遺伝子中に4セット設定した。PCR反応条件は共通となるよう検討した。*BA* は B4/B5、JPF/JPR2abで検出され、*BM*はB4/B5、JPF/JPR2ab、1S/1ASで、*BC* は B4/B5、JPF/JPR2ca、1S/1AS で検出される。また、*BS* は B4/B5、JPF/JPR2ab、JPF/JPR2ca、1S/1ASすべてで検出される。このように、4種のプライマーセットを用いることによりブルセラ属菌のうちヒトに感染しうる主要4菌種を同定することが可能となった。[今岡浩一、木村昌伸、神山恒夫、山田章雄]

（２）イヌブルセラ病の疫学的調査・研究

ブルセラ属菌のうち *Brucella canis* はイヌを自然宿主とし、イヌにおける流産や不妊等の原因となることが知られている。また、ヒトにも感染することがある。そこで現在のイヌの感染状況を知るために *B. canis* に対する抗体検査をおこなった。イヌ血液はK市動物愛護センター（以下、K市）および東京大学動物医療センター（以下、東大）より入手した。K市では102頭中3頭（2.9%）が陽性であった。東大では陽性例は見あたらなかった。今回の調査では約3%が陽性であり、現在も *B. canis* 感染が、国内のイヌに常在していることが示された。今回の陽性例はすべてペットとして飼育されており、ヒトでの症状が比較的軽症であることから、感染に気づかない飼育者の存在も疑われる。イヌでの調査とともに、ヒトにおける抗体調査も必要だと考えられる。[木村昌伸、今岡浩一、山田章雄、神山恒夫、辻本元＊、

佐々木郁＊（＊東大・獣医）］

（３）某イヌ繁殖施設におけるイヌブルセラ病の集団発生に関する研究

静岡県内Ａ市Ｂイヌ繁殖施設（百数十頭飼育）において流産が多発し、ブルセラ病の疑いもあるため検査協力を求める旨、Ｂ施設で診察を行っているＡ市Ｃ動物病院より依頼があった。Ｃ病院を介して提供を受けた飼育犬血液 114 検体のうち 51 検体で *B. canis* 特異的抗体が陽性であり（陽性率 45%）、27 検体から *B. canis* 特異的遺伝子が検出され、Ｂ施設におけるイヌブルセラ病の集団発生が確認された。また１頭だけ提供を受けた流産胎仔から *B. canis* が分離・同定された（*B. canis* Shizuoka03）。Ａ市Ｄ病院で採血したＢ施設従業員およびＣ病院職員の血液の検査を行ったが、*B. canis* 特異的抗体ならびに遺伝子は検出されず、その時点では、ヒトへの感染は起こっていないことが確認された。[今岡浩一、木村昌伸、神山恒夫、朴天鎬＊（＊現 北里大・獣医）］

３．　ペスト菌の微量迅速検出法の開発に関する研究

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。さらに、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ため、特異的迅速診断法の開発が必要とされている。今回、*Y. pestis* の検出法として、invasin と 41.7 kb 領域それぞれに特異的な Real-time PCR（LC: Light-Cycler）、LAMP 法を確立し、比較を行った。PCR、LC、LAMP とも invasin のプライマーは *Y. pestis* と *Y. pseudtuberculosis*（*Y. pseud.*）を、41.7 kb 領域のプライマーは *Y. pestis* の DNA のみを増幅し高い特異性を示した。また、invasin のみ検出は *Y. pseud.*、invasin 及び 41.7 kb 領域の検出は *Y. pestis* と、両者の鑑別が可能であった。感度は PCR は 250 pg/assay、LC、LAMP は 2 pg/assay と PCR の約 100 倍の感度を示した。所用時間は LC が最も短く 50 分、次に LAMP であった。LC は専用の機器を必要とするが所用時間が短く、LAMP は特別な装置を必要とせず簡便に実施できる。それぞれ状況に応じて利用でき有用な検出法である。[今岡浩一、木村昌伸、神山恒夫]

４．　狂犬病に関する研究

（１）不法上陸犬の見られる港湾地域の犬のワクチン接種状況に関する研究

昨年に引き続き、海外から狂犬病が侵入するリスクの高いと考えられる港湾地域で捕獲・引き取りされるイヌの狂犬病ウイルス防御抗体（中和抗体）保有率を調べた。これにより、狂犬病を発症したイヌが上陸した場合に狂犬病の流行を未然に阻止することが可能な防御抗体価を保有するイヌの比率が WHO の推奨する値（８０%）を大きく下回っていることが明らかとなった。また、引き取り犬での防御抗体保有率の低値は未登録犬等の低いワクチン接種率が原因と考えられ、飼育犬に対するワクチン接種が十分に行われていないことが示唆された。[井上　智（感染研・獣医）、野口　章（感染研・獣医）、加来義浩（感染研・獣医）、佐藤　克（佐藤獣医科医院長）、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）、山形　章（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）、出村尚子（富山県・高岡厚生センター）、林　裕一（富山県・高岡厚生センター）、高附敏幸（富山県・動物管理センター）、山田章雄（感染研・獣医）］

（２）東京における捕獲・引き取り犬のワクチン接種状況に関する研究

東京都で捕獲・引き取りされる犬について捕獲・引き取りされるイヌの狂犬病ウイルス防御抗体（中和抗体）保有率を調べた。イヌとヒトとの生活空間がより緊密である都市部においても飼育犬のワクチン接種率とイヌの登録率の低下が明らかとなった。偶発的な狂犬病の侵入阻止を目的とする狂犬病対策である飼育犬のワクチン接種が都市部、港湾地域で十分機能していないことが示された。今後、各自治体で適正なイヌの登録率とワクチン接種率についての検証が必要と考えられた。[井上智（感染研・獣医）、野口　章（感染研・獣医）、加来義浩（感染研・獣医）、根本卓弥（北海道・食品衛生課）、竹重都子（東京都・動物愛護相談センター）、景森令克（東京都・動物愛護相談センター）、佐藤　克（佐藤獣医科医院長）、山田章雄（感染研・獣医）］

（３）狂犬病の初期対応における診断と検査方法に関する研究

自治体における不審犬（狂犬病の疑われるイヌ）の発見から初期診断、解剖、検体の採材方法についての対応フローと簡便な解剖方法の検討を行ない、不法上陸犬の多い港湾地域で狂犬病が疑われた場合の初期対応について啓発を行った。［井上　智（感染研・獣医）、佐藤克（佐藤獣医科医院長）、野口　章（感染研・獣医）、加来義浩（感染研・獣医）、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）、景森令克（東京都・動物愛護相談センター）、山田章雄（感染研・獣医）］

（４）自治体における狂犬病対策の課題点に関する研究

自治体の担当者と狂犬病対策に関係する課題点の検討を行ない、(1)動物行政システム、動物の生活環境、

ペット・野生動物等の社会的経済的価値観の異なる地方自治体で効果的な狂犬病対策を行なうには各自治体の状況を反映した独自の狂犬病ガイドライン作成が必要である、(2)自治体ごとに狂犬病のリスクアナリシスを行ない、より現実的で効果的かつ現実的な狂犬病対策を提案していく必要がある、(3)現行の狂犬病対策の重要な柱である「イヌの登録率」と「イヌのワクチン接種率」の実数把握が現在のシステムでは困難である、(4)狂犬病の発生が疑われた際の関係部局の意見調整と相互理解が平常時から必要である、(5)発生時に必要となる疫学調査、動物の隔離・観察・解剖・検査、ヒトとイヌのワクチン接種対応の施設整備と人員の再配置および行動計画を具体化しておく必要性がある、(6)狂犬病の発生を想定したシミュレーションが必要であるといった点が指摘された。[井上　智(感染研・獣医)、野口　章(感染研・獣医)、加来義浩(感染研・獣医)、佐藤　克(佐藤獣医科医院長)、坂上　博(兵庫県・生活衛生課)、鈴木哲也(兵庫県・動物愛護センター)、赤沢　博(岐阜県・生活衛生課)、村瀬真子(岐阜県・生活衛生課)、山田章雄(感染研・獣医)]

（５）鶏卵法を利用した安全で簡便な抗狂犬病ウイルス中和抗体産生法に関する研究

狂犬病ウイルス暴露後の発症予防には狂犬病の特徴である長い潜伏期間を利用した予防的ワクチン接種と、傷口へのヒトもしくはウマ免疫グロブリン（HRIG、ERIG）の同時接種を行うことが推奨されている。しかし免疫グロブリンは大量生産が困難であり高価なため、アジア等の狂犬病流行国では常に不足している。今回、大腸菌を利用した狂犬病ウイルス G 蛋白発現系と免疫鶏卵法を併用して安全かつ簡便な抗狂犬病ウイルス中和抗体の産生方法を確立した。[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）、野口　章（感染研・獣医）、井上　智（感染研・獣医）、山田章雄（感染研・獣医）]

（６）狂犬病のレセプターに関する研究

狂犬病は神経親和性の高い狂犬病ウイルスによる感染症であり、NCAM(神経細胞接着因子)はレセプター蛋白の役割をすると考えられている。そこで、本研究ではNCAM発現が見られないラット横紋筋細胞(L-6細胞)にNCAM蛋白を発現させてCVS-11株の感染性を調べた。L-6細胞では72時間以降でも感染細胞巣の形成は見られず初感染した細胞内のみでウイルスの増殖が観察された。NCAMをトランスフェクトしたL-6細胞では20%の細胞で NCAM 発現が見られ、CVS-11 株を感染させたところ感染 24 時間以降に感染細胞巣の形成が見られた。以上の成績から、狂犬病ウイルスのレセプター蛋白と考えられている NCAM は感染細胞巣の形成に関与する可能性が示唆された。[佐藤こずえ（岐阜連合大学院）、本井ゆり恵（岐阜連合大学院）、野口　章（感染研・獣医）、井上　智（感染研・獣医）、山田章雄（感染研・獣医）]

５．　炭疽菌に関する研究

（１）炭疽菌の遺伝子診断に使用可能な安全な陽性対照鋳型 DNA の作出

米国の同時多発テロに連続した国内の炭疽菌事件以降、生物テロへの迅速な対応を可能とするために炭疽菌（*B. anthracis*）の遺伝子診断が一般的に行なわれている。遺伝子診断は高感度な検出系ではあるが、生菌を利用した陽性対照使用時の安全性と陽性対照鋳型 DNA の汚染による擬陽性が課題となっている。そこで今回、国内で使用されている炭疽菌検出用プライマー（PA5、PA8およびCAP1234、CAP1301)の増幅する遺伝子領域をプラスミドに組み込み安全かつ簡便に陽性対照用の鋳型DNAが増幅できるようにした。また、陽性対照用の鋳型DNAに制限酵素配列を組み込むことによって鋳型DNAのコンタミネーションによる擬陽性の確認も可能にした。[井上　智、野口　章、奥谷晶子、棚林　清、山田章雄（感染研・獣医）]

６．　野兎病に関する研究

（１）野兎病の血清抗体測定法の条件検討

野兎病の血清学的診断に用いる微量凝集反応法における抗原調製および反応条件を検討した。保存菌株から自家凝集およびアクリフラビン反応陰性の 38 株とYama株を選定した。微量凝集反応は、96 穴U底プレートに 2 倍階段希釈した血清 0.025ml と濁度OD_{550} 0.5 に調整した不活化菌液(0.005％サフラニン加 0.5％ホルマリン生理食塩水)を等量混合し、37℃で 18 時間保温した時に明瞭な凝集像が観察され、再現性良く判定することができることがわかった。この条件で、作製した４羽のウサギ免疫血清は 80～320 倍の抗体価を示し、非免疫血清では 10 倍でも凝集像は認められなかった。また、ブルセラ菌免疫血清との交差反応もなく、野兎病の血清診断に応用可能と考えられた。[堀田明豊、藤田　修、棚林　清、山田章雄]

（２）*Francisella tularensis* に対するモノクローナル抗体（MAb）の作出

F. tularensis に対する MAbs を 10 種作出した。MAbsはウエスタンブロットにおける反応から 6 群に分けられた。I 群の 3 種はリポ多糖体を認識すると思われた。II～V 群はそれぞれ 14-kDa、17-kDa、43-kDa、75-kDaのバンドに反応した。また VI 群の種はウエスタンブロットでは反応しなかった。I 群の 3 種は菌凝集能を示し、他種の細菌および *F. tularensis* subsp. *novicida*、*F.*

philomiragia に反応しなかったため、*F. tularensis*、subsp. *tularensis* および subsp. *holarctica* の検出に有用な MAbs と考えられた。一方、他 7 種は *F. tularensis* subsp. *novicida* や *F. philomiragia* にも反応した。今後 *Francisella* 属菌の詳細な抗原構造解析に活用したい。

［堀田明豊、藤田　修、棚林　清、山田章雄］

（３）野兎病の迅速診断法の開発に関する研究

人工培地を用いた野兎病菌の分離培養は少なくとも２日以上を要するため、近年 PCR を応用した様々な遺伝子検出法が検討されている。LAMP 法は１つの酵素(*Bst* polymerase)を使用して 60℃前後の一定温度で連続的な効率の高い DNA 増幅法であり、増幅用プライマーは６領域を認識するように設計され特異性も高い。今回、野兎病菌の高感度迅速遺伝子検出法として LAMP 法を用いて *Fop*A 遺伝子の検出を行った。野兎病菌 LVS 株では genomic DNA 1pg/reaction から検出可能で、さらに他の日本国内分離５株および Russian Vaccine 株でも同様に遺伝子を検出できたことより、野兎病の特異的迅速診断法として有用性が高いと判断された。[藤田　修、巽　正志、堀田明豊、棚林　清、山田章雄]

７．　SARS コロナウイルスに関する研究

（１）リアルタイム PCR による SARS コロナウイルス(SARS-CoV)遺伝子検出系の構築

SARS-CoV遺伝子を特異的かつ高感度に検出する方法としてLightCycler330システムを用いたリアルタイム PCR 法の構築を試みた。SARS-CoV N遺伝子をターゲットにした増幅用プライマーおよび蛍光標識プローブを作製した。ウイルス感染細胞培養上清より抽出したRNAを鋳型して逆転写反応後、DNA増幅を実施した。検出感度はN遺伝子cDNAフラグメント濃度から約 10 コピー、またウイルス感染価から 0.1$TCID_{50}$相当と算出された。ヒトコロナウイルスOC43、マウス肝炎ウイルス、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス、ヒト胃腸炎コロナウイルスのcDNAとの非特異的反応は認められず、本法はSARS-CoV遺伝子検出に有用であると考えられた。[棚林　清、巽　正志、藤田　修、山田章雄]

（２）実験用カニクイザルへの経口的感染と糞便からのウイルス分離

カニクイザル 2 頭にSARSコロナウイルス(HKU39849株 10^8 $TCID_{50}$)をカテーテルにて胃内投与し、臨床観察をするとともに糞便材料から10％乳剤を調整しその遠心上清をVeroE6細胞に接種してウイルス分離とリアルタイムPCRによる遺伝子検出を行った。４週間の観察期間中、ウイルスを投与された 2 頭ともに、呼吸器の症状や下痢等を呈することなく経過した。ウイルス投与後 1、2、4、8、10、14、17 日目の便からのウイルス分離および遺伝子検出は陰性だった。また、抗体上昇も認められなかった。（ウイルス投与、飼育観察、検体の採材およびウイルス抗体測定は、国立感染症研究所ウイルス第一部、第三部、感染病理部、動物管理室の研究グループの協力により実施された。）

［棚林　清、巽　正志、藤田　修、山田章雄］

（３）SARS コロナウイルスの環境中での安定性

SARS コロナウイルスを 2%牛胎児血清加細胞培養液中で冷蔵または室温保存し、経時的に残存する感染価測定した。冷蔵では 28 日後でわずかに感染価が低下したが、室温では 28 日後では検出限界以下となった。マウス肝炎ウイルス(MHV)、ブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)について同様に測定した結果、TGEV は SARS コロナウイルスと同等の安定性を示したが、MHV はやや低い傾向にあった。ウイルス液をプラスチック表面に塗布乾燥させた後の残存感染価を測定したところ、冷蔵では 21 日までに約 100 分の 1 となり、室温では 14 日までに検出限界以下に低下した。ウイルス遺伝子は感染価が検出限界以下となっても検出された。［棚林　清、巽　正志、藤田　修、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）低分子化合物によるモデルマウスの治療法開発

GM1 ガングリオシドーシスの chemical chaperone による治療法開発を目的として、ヒト GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒト変異β-Gal 発現マウス (TG/KO、BK48)に、新規低分子化合物(NOEV)の 1mM を飲水として１週間投与したところ、脳のβ-Gal 活性の顕著な増加とともに、免疫組織化学的には大脳皮質の神経細胞での GM1、GA1 の蓄積減少を認めた。本化合物は神経遺伝病である GM1 ガングリオシドーシスの中枢神経系をターゲットとした新たな治療薬として期待される。

［山本美江、野口章、野口洋子、竹川奈穂、秦　朋子、鈴木治、大島章弘、松田潤一郎、鈴木義之（国際医療福祉大)］

（２）GM1 合成酵素高発現マウスの作製

GM1/GA1 合成酵素 Tg マウスの独立したファウンダーを６匹作出し、次世代の得られた５ラインのうち４ラインの脳と肝臓において RT-PCR により遺伝子発現を確認した。このうち３ラインで、もとの C57BL/6 マウスの肝臓では存在しないはずの GM1 が合成されていることが HPTLC により確認された。現在、Tg マウスとβ-Gal KO マウスとの交配を行っており、GM1 ガングリオシドーシスの早期発症型モデルマウスとなることが期待される。

［秦　朋子、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、滝本一広（動物管理

室)]

２． 心筋症モデルマウスのレクチンによる組織解剖学解析

当研究室で開発したシアル酸転移酵素導入による心筋症モデルマウス 4c30 のレクチン染色による組織解剖学的解析を行なった。心筋、大腿筋ともに 4c30 系マウスの筋細胞膜の染色性は、B6 系に比して小麦胚芽レクチンでは若干強く、イヌエンジュレクチンは同程度だった。一方、西洋ニワトコレクチンは双方とも染色されなかったことから、4c30 系の筋細胞膜ではα2,3 シアル酸量の増加が示唆された。導入遺伝子の過剰発現による筋細胞膜シアル酸組成の変化が 4c30 系マウスの筋症発症の一因であると思われる。
［山本美江、野口洋子、小浦美奈子、高野　薫、鈴木治、松田潤一郎］

３． Meg1/Grb10 遺伝子導入マウスの糖尿病発症に及ぼす飼料の影響

母性発現インプリント遺伝子である Meg1/Grb10 過剰発現トランスジェニックマウスはⅡ型糖尿病モデルと考えられている。本モデルマウスに高脂肪、高カロリー、脂質添加飼料（クイックファット、日本クレア(株)） を摂取させたところ、糖尿病の発症率が著しく増加した。Meg1/Grb10 遺伝子導入マウスはヒトⅡ型糖尿病モデルとして環境要因，特に食餌の影響を調べる上で有用であることがわかった。(東京工業大学石野研究室、東海大学石野-金児研究室との共同研究)
［山本美江、秦朋子、竹川奈穂、山田-内尾こずえ、鈴木　治、松田潤一郎］

４． プリオン病モデルマウスの開発

ウシプリオン遺伝子導入マウスファウンダー４匹を作出し、各臓器でウシプリオン蛋白が過剰発現していることを確認した。プリオン KO マウスにトランスジーンを導入したマウス Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp-/-および Tg#39(BoPrP+/+)/Prnp-/-へ BSE 乳剤の脳内および腹腔内接種を開始した。現在までに、脳内接種後 104 日の Tg#39(BoPrP+/-)/Prnp-/-の脾臓においてウシ異常型プリオンと考えられる蛋白が検出されており、高感度バイオアッセイ系として期待される。(感染病理部、細胞化学部との共同研究)
［秦　朋子、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．トランスジェニック動物のトランスジーンのマッピング

プリオン遺伝子導入マウス４系統（#39，#91，#94，#96）について，二段階 Genome Walking による導入遺伝子のマッピングとホモ・ヘミ個体判定用プライマーを設計した。各々の系統のゲノムライブラリーから導入遺伝子の近傍配列を求め，Ensembl データベースによりその近傍配列の位置を特定したところ，それぞれ，導入遺伝子の挿入染色体は，13 番，2 番，3 番，10 番であった。現在，それぞれについて近傍プライマーを設定し，PCR 検査により，導入遺伝子のホモ・ヘミ判定が可能となっている。
［Thorbjorg Einarsdottir，竹川奈穂，秦　朋子、鈴木治、松田潤一郎］

６． 遺伝性腎疾患モデルマウスの解析

遺伝性腎疾患モデルマウスである ICGN マウスの病態解析を行った。このマウスは生後まもなく腎糸球体の基底膜の肥厚および糸球体上皮細胞足突起消失が認められる。そこで、これらの病変に関与する細胞外マトリックスや細胞接着因子の局在および発現量を解析し、発症メカニズムを調べた。その結果、糸球体基底膜成分であるラミニンの変換機構の異常が示唆された。
[山田-内尾こずえ、山本美江、高野薫、小浦美奈子、野口洋子、竹川奈穂、秦朋子、鈴木治、松田潤一郎]

III. 実験小動物の繁殖・育成に関する研究

１． 初期胚・精子・卵巣の凍結保存
（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、新規 31 系統を含む 44 系統（計 63 ライン）について、16,631 個の胚を凍結保存した。胚凍結を開始した 1989 年から 2004 年 3 月末までの総計は、合計 128 系統、胚数 76,883 個に達した。
[高野　薫、秦　朋子、小浦美奈子、野口洋子、鈴木　治、山本美江、山田-内尾こずえ、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 29 系統を含む 39 系統（ストロー608 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、76 系統、雄 375 匹分である。
［小浦美奈子、秦　朋子、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
昨年度までに凍結保存用液の最適条件がほぼかたまったので、今年度は凍結融解精子による人工授精及び体外受精を試みたが、供試雌から効率的に未受精卵を回収することが難しく、雌側の条件及び採卵方法を再検討しているところである。凍結融解精子は良好な運動精子率を示しており、受精能の判定については体外受精、人工受精、ハムスターテストなどを用いて検討しているが、未だ確認はできていない。
[向井一馬、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
昨年度検討した凍結保存用液を使って保存したスナネズミ精子を用いて、人工授精及び体外受精を行い、凍結融解精子の受精能を検証した。人工授精による受精卵は得られなかったが、体外受精では透明帯を除去した卵子を用いた場合のみで、精子の侵入と膨化が認められた。また、融解後の遠心処理により運動性の良い精子が多く回収され、受精率が向上している。今後は未処理の卵子で受精卵を得ることや人工授精を成功させ、産仔につなげていく予定である。
[小浦美奈子、半田寛子、高野　薫、松原純子、松田潤一郎]

（5）マウス卵巣の凍結保存法に関する研究
マウス系統保存法として卵巣ガラス化保存が有用であるが，卵巣移植が必要なため移植免疫を考慮する必要がある。そこで卵胞発育培養系により卵巣移植を経ずに胚を得る方法について検討した。マウス卵巣をガラス化保存したのち解凍した。卵胞発育培養および卵子体外成熟培養で得られた成熟卵子を体外受精し，媒精後 120 時間まで体外培養した。成熟卵子（210.7±28.6 個，実験３回分の平均±標準誤差）のうち，２細胞期へ 61.7±7.3%が，胚盤胞へは 9.9±1.6%が発生した。低率ではあるが，ガラス化保存卵巣由来卵子から胚盤胞が得られ，体外発育培養による胚の入手が可能であることがわかった。
［秦　朋子，鈴木　治、小浦美奈子、野口洋子、高野　薫、山本美江、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

卵子形成時における胚発生能関連遺伝子の検索を Suppression subtractive hybridization 法により行なった。24 日齢由来成熟卵子に特異的に発現する可能性の高い遺伝子クローン 513 個について DNA 配列を決定した。BLAST 検索により *spindlin*, *bmi-1*, *cyclin B1*, *E330034G19Rik*, *Jagged1*, *Ndfip2* などが同定された。その中でも *spindlin* は細胞分裂に関与する遺伝子として発見された蛋白質で，卵子の発生能獲得と関連性が高いと思われる。
［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の維持・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、山田-内尾こずえ、秦　朋子、竹川奈穂、松原純子、松田潤一郎]

Ⅴ．その他の研究

１．包虫組織より分離した 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの組織内局在と診断抗原としての有用性

多包虫組織からペルオキシレドキシン(Prx)DNA を得た。大腸菌で組換えタンパク質(EmPrx)を作成し、各発育ステージにおけるこのタンパク質の局在診断抗原としての有用性と診断抗原としての有用性を検討した。EmPrx は主に次宿主の感染に関わる原頭節および形態的に成熟した六鉤幼虫膜と六鉤幼虫内部での局在が認められた。これは自己の呼吸代謝と宿主免疫などで派生した様々な活性酸素種に対する寄生虫自身の回避機構に相当する部位と考えられる。また健常人の陰性コントロール血清を含め様々な寄生虫症患者血清とも交叉反応を示し特異性は認められなかったことより、診断抗原としては適さないと結論付けた。［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)］

２．HIV に関する研究　（詳細はエイズセンターの項参照）

（1）HIV-1 感染性クローン樹立法の確立　（エイズ研究センターの項参照）（巽　正志）
１）HIV-1 ゲノムクローニングベクターの構築（エイズ研究センターの項参照）（巽　正志）
２）Half and Half クローニング戦略による Full-genome クローン樹立の効率化　（エイズ研究センターの項参照）（巽　正志）
３）Zambia 由来 HIV-1 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析　（エイズ研究センターの項参照）（原　敬志、市山浩二、Francis Kasolo(Zambia 大学教育病院)，照沼　裕(日本バイオセラピー研究所)、本多三男、山本直

樹、巽正志）

４）Ghana で流行する HIV-1 の感染性クローンの樹立（エイズ研究センターの項参照）（木ノ本正信、徳永研ニ、N. Nii-Trebi（野口記念医学研究所、ガーナ）、佐多徹太郎（感染病理）、巽　正志）

（２）HIV-1 感染価迅速測定細胞 MAGIC-5/SEAP の樹立と薬剤耐性試験法への応用

（エイズ研究センターの項参照）（橋本　修、石子博昭（三菱化学 BCL）、蜂谷敦子、岡　慎一（国立国際医療センター）、巽　正志）

発 表 業 績 一 覧

I. 誌 上 発 表

１． 欧文発表

原著

（１）Shimazaki, Y., Inoue, S., Takahashi, C., Gamoh, K., Etoh, M., Kamiyama, T. and Makie, H. Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs. 2003. J.Vet.Med. B50:95-98.

（２）Inoue, S., Sato, Y., Hasegawa, H., Noguchi, A., Yamada, A., Kurata, T. and Iwasaki, T. 2003. Cross-reactive antigenicity of nucleoproteins of lyssaviruses recognized by a monospecific anti-rabies virus nucleoprotein antiserum on paraffin sections of formalin-fixed tissues. Pathology International. 53:525-533.

（３）Inoue, S., Motoi, Y., Kashimura, T., Ono, K. and Yamada, A. 2003. Safe and Easy Monitoring of Anti-Rabies Antibody in Dogs Using His-Tagged Recombinant N-Protein. Jpn.J.Infect.Dis. 56:158-160.

（４）Igimi S, A. Kajikawa, and A. Okutani. 2003. Development of oral vaccines based on lactic acid bacteria. Milk Science. 52:185-187.

（５）Sasaki, E., Hikino, H., Kaku, Y., Kuwana, T., Naito, M., Sakurai, M. *Eah49*, a novel avian receptor tyrosine kinase gene Gene, 316, 103-110, 2003.

（６）Andoh, M., Hotta, H., Zhang, G.Q., Yamaguchi, T., Fukushi, H. and Hirai, K.：SCID mouse model for lethal Q fever. Infection and Immunity 71: 4717-4723, 2003.

（７）Uda, A., Tanabayashi, K., Mukai, R., Terao, K., and Yamada A.： Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). J Med Primatol 32: 105-110, 2003.

（８）Hachiya A., Matsuoka-Aizawa S., Tsuchiya K., Gatanaga H., Kimura S., Tatsumi M. and Oka S. "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. J Virol Methods. 2003, 111:43-53.

（９）Takebe Y., Motomura K., Tatsumi M., Lwin H.H., Zaw M. and Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. AIDS. 2003, 17:2077-87.

（１０）Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. Biol Reprod, 69:1394-400, 2003.

（１１）Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y, Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 15912-15917, 2003.

（１２）Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Ono M, Maruyama K, Takahashi M, Mochida K, Matsuda J, Lane MD, Ezaki O. Regulatory sequence elements of mouse GLUT4 gene expression in adipose tissues. Biochem Biophys Res Commun, 312: 277-84, 2003.

（１３）Uchio K., Graham M., Dean N.M., Rosenbaum J., Desmouliére A. Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. Wound Repair and Regeneration, 12: 60-66, 2003.

（１４）Goto Y., Manabe N., Uchio-Yamada K., Yamaguchi-Yamada M., Inoue N., Yamamoto Y., Ogura A.,

Nagano N., Miyamoto H. Augmented cytoplasmic Smad4 induces acceleration of TGF-β1 signaling in renal tubulointerstitial cells of hereditary nephritic ICGN mice with chronic renal fibrosis; possible role for myofibroblastic differentiation. Cell and Tissue Research, 315:209-221, 2004.

（１５）Uchio K., Manabe N., Yamaguchi-Yamada M., Goto Y., Yamamoto Y., Ogura A., Miyamoto H. Changes in the localization of type I, III and IV collagen mRNAs in the kidneys of hereditary nephritic (ICGN) mice with renal fibrosis. The Journal of Veterinary Medical Science 66: 123-128, 2004.

２． 和文発表

（１）山田章雄：ヒトと動物共通感染症のサーベイランス、臨床医、29, 1844-1847, 2003.

（２）山田章雄：空飛ぶ病原体、Infection and Technology, No.11, 19-20, 2003.

（３）山田章雄：バイオテロリズムと動物由来感染症 神山恒夫、山田章雄(編著) 動物由来感染症その診断と対策 pp47-51 真興交易(株)医書出版部.

（４）山田章雄：今、懸念される人獣共通感染症、臨床獣医、21, 10-13, 2003.

（５）山田章雄：動物由来感染症のサーベイランス、感染症と化学療法、6, 22-24, 2003.

（６） 神山 恒夫：ペスト-再侵入が危惧される人獣共通感染症。医学のあゆみ。208：57-62, 2004.

（７） 神山 恒夫：輸入野生齧歯類感染症。臨床医。29：1812-1815, 2003.

（８）今岡浩一、井上智、棚林清、山田章雄：特集「動物由来感染症」。 Infection and Technology, No.11, 2-13, 2003.

（９）棚林 清：動物由来感染症の微生物検査。Infection and Technology, No. 11: 14-15, 2003.

（１０）今岡浩一: 動物由来感染症の最近の話題。Modern Media, Vol.49, No.12, 337-346, 2003.

（１１）今岡浩一：ブルセラ症。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、pp199-203, 東京 2003.

（１２）井上 智。動物由来感染症-その診断と対策-１．ウイルス感染症／５.狂犬病。(神山恒夫、山田章雄編)、真興交易医書出版部、pp88-91, 東京 2003.

（１３）井上 智。動物由来感染症-その診断と対策-１．ウイルス感染症／１１．リッサウイルス感染症。(神山恒夫、山田章雄 編)真興交易医書出版部、pp115-118、東京 2003.

（１４）棚林 清：Ｂウイルス感染症。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、pp.123-127、東京 2003.

（１５）井上 智。学術：新興、再興感染症-狂犬病-狂犬病の危機管理。神奈川県獣医師会報：第 452 号、10-12、2003.

（１６）井上 智。トピックス：日本の狂犬病予防と危機管理。感染症等情報(World Focus)：No55、1-2、2004.

（１７）五十君靜信、奥谷晶子. 2003. 日本国内におけるリステリア症発生状況の調査。獣医疫学雑誌。The Japan Society of Veterinary Epidemiology. 7:51.

（１８）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ホモ導入マウスに見られた拡張型心筋症。日本疾患モデル学会記録、19, 31-37, 2003.

（１９）加来義浩。豚エンテロウイルス性脳脊髄炎をめぐる近年の状況について。日本豚病研究会報 43, 2003 年 10 月.

（２０）加来義浩。ヘンドラウイルスとニパウイルス感染症。畜産の研究。2004 年 1 月。36-40.

（２１）加来義浩。ニパウイルス感染症。animus 33。2004 年 1 月。21-24.

II. 学 会 発 表

１． 国際学会

（１）Inoue,S., Noguchi,A., and Yamada,A. Serological monitoring of rabies among susceptible animals in Japan. The 2003 “Rabies in the Americas Conference”. Philadelphia, PA, USA, 19-24

October, 2003.

（2）Fujita, O., Kawazu, S., Nozaki, T.：Biological characterization of a 2-cys thioredoxin peroxidase from *Echinococcus multilocularis* metacestode. 52th Annual Meeting, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, December 3-7, 2003, Philadelphia, PA, USA.

（3）Ishida-Okawara A, Muso E, Ito-Ihara T, Takano K, Noguchi Y, Matsuda J, Suzuki K. Analysis of neutrophils activation in ICGN mice, a strain with hereditary nephrotic syndrome. The 11th International Vasculitis and ANCA Workshop, October, 2003. Prague, Czech Republic.

（4）Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Differential display analysis for genes relating to developmental competence of mouse oocytes, The 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, December, 2003, San Francisco, USA.

（5）Suzuki O, Hata T, Koura M, Noguchi Y, Takano K, Yamamoto Y, and Matsuda J. Search for genes involved in developmental competence in mouse oocytes using suppression subtractive hybridization. 2004 IETS Annual Conference of the International Society for Embryo Transfer, January, 2004, Portland, Oregon, USA.

（6）Okada T, Yasoshima A, Takano K, Matsuda J, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Histological changes in the dorsal skin of YPC mice irradiated with UVB for 4weeks. JSTP/IFSTP(IATP) 2004 (Joint International Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology & the International Federation of Societies of Toxicologic Pathologists), February, 2004, Kobe, Japan.

２． 国内学会

（1）黒澤明日香、今岡浩一、鈴木和彦、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136回日本獣医学会、2003年10月、青森。

（2）石村勝之、井上 智、仲真晶子、寺尾通徳、萱島隆之、河本秀一、平 和孝、荻野武雄。*L. monocytogenes actA* 遺伝子PRR配列と血清型の関連性およびmismatch PCR法による系統別遺伝子型別。第２４回日本食品微生物学会学術総会、２００３年、１０月、岡山。

（3）井上 智、野口 章、山田章雄。Pyrosequencing法を用いた炭疽菌株の迅速・簡単な遺伝子型別。第136回日本獣医学会、２００３年、１０月、青森。

（4）妹尾詩織、伊東直人、井上 智、清水泰武、杉山誠、源 宣之。ユーロピウムを用いた時間分解蛍光測定法による狂犬病ウイルスに対する抗体の検出。第136回日本獣医学会、２００３年、１０月、青森。

（5）丸山総一、藤田博己、牧野 敬、浅野 玄、井上智、壁谷英則、見上 彪。わが国のアライグマにおける８種類の人獣共通感染症の抗体保有状況。第136回日本獣医学会、２００３年、１０月、青森。

（6）佐藤こずえ、本井ゆり恵、山田章雄、井上 智。NCAM蛋白を強制発現したL-6細胞におけるCVS-11株の感染像の変化。第51回日本ウイルス学会、２００３年、１０月、青森。

（7）庄司洋子、井上 智、中道一生、酒井健夫、倉根一郎、森本金次郎。P遺伝子欠損狂犬病ウイルスの作出と性状解析。第51回日本ウイルス学会、２００３年、１０月、青森。

（8）奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君靜信。日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベイランス 日本細菌学会総会2003年4月。

（9）加来義浩。豚エンテロウイルス性脳脊髄炎をめぐる近年の状況について。平成15年日本豚病研究会学術集会 2003年5月。

（10）奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君靜信。国内における食品等のリステリア汚染状況の報告 日本食品微生物学会2003年10月。

（11）F Amano, H Karahashi, S Terai, A Okamoto, Y Ishii, S Igimi, A Okutani, M Yamasaki, A Nakamura. Pathogenicity of SEp22, identical to Salmonella Dps, in BALB/c mice, and its relation to H_2O_2 resistance. 日本生化学会 2003年10月。

（12）Pritchard, L. I., Crameri, G., Kaku, Y., B.T. Eaton, B. T., Boyle, D. B. Application of Q-Gene software for the quantitation on Nipah virus in experimental animals using real-time PCR.

International conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 2003年6月。

（１３）Yoshii, S., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K., Ikeda, H. Genetic diversity of Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSVs). 2003 The Conference of Research Workers in Animal Diseases 2003年11月。

（１４）Yoshii, S., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K., Ikeda, H. Phylogenetic Analysis of ORF5 gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses in Japan。第38回天然資源の利用に関する日米会議（US-Japan Cooperative Program in Natural Resources）家畜・家禽疾病専門部会 2003年12月。

（１５）原 正幸、佐多徹太郎、棚林 清、明里宏文、山田章雄、向井鐐三郎：新型SRV/Dの分離・同定とウイルス検出法の確立。第51回日本ウイルス学会学術集会、2003年10月、京都。

（１６）山本美江、野口章、小浦美奈子、高野薫、竹川奈穂、野口洋子、鈴木治、松田潤一郎：拡張型心筋症を呈するシアル酸転移酵素遺伝子導入マウスの組織学的解析. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（１７）竹川奈穂、野口章、小浦美奈子、野口洋子、高野薫、山本美江、鈴木治、松田潤一郎：ゲノムウォーキングとゲノムデータベース検索によるトランスジェニックマウスに導入された外来遺伝子の染色体マッピング. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（１８）鈴木治、小浦美奈子、野口洋子、高野薫、山本美江、松田潤一郎：ディファレンシャル・ディスプレイ法によるマウス卵子発生能獲得遺伝子の検索. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（１９）滝本一広、山本美江、野口章、竹川奈穂、鈴木治、野口洋子、高野薫、小浦美奈子、伊藤雅之、松田潤一郎：GM1ガングリオシドーシス幼児型ヒトβ-ガラクトシダーゼ変異酵素を発現するモデルマウスの病態解析. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（２０）小浦美奈子、平田淳也、高野薫、松原純子、野口洋子、山本美江、鈴木治、太田昭彦、松田潤一郎：スナネズミ精子の凍結保存法の検討. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（２１）平田淳也、小浦美奈子、高野薫、松原純子、野口洋子、山本美江、鈴木治、太田昭彦、松田潤一郎：マストミス精子の凍結保存法の検討. 第50回日本実験動物学会総会、2003年5月、さいたま市。

（２２）鈴木 治，小浦美奈子、野口洋子、高野 薫、山本美江、松田潤一郎，幼若マウスの一過性卵胞成熟由来卵子を用いた胚発生能関与遺伝子の検索，第96回日本繁殖生物学会大会，2003年9月、帯広。

（２３）大川原 明子、武曾 恵理、猪原 登志子、高野 薫、野口 洋子、松田 潤一郎、鈴木 和男：
遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウスICGNの好中球活性化の解. 第９回MPO研究会、2003年10月、東京。

（２４）高村歩美、小川由美、冨永里香、難波栄二、松田潤一郎、大島章弘、松崎祐二、小川誠一郎、鈴木義之：ケミカルシャペロン法によるGM1-ガングリオシドーシスR201C変異細胞のガングリオシド蓄積減少効果. 第46回日本先天代謝異常学会、2003年11月、松江。

（２５）岡戸晴生、川野仁、松田潤一郎、寺島俊雄、葛西正孝：転写抑制蛋白RP58は皮質層構造形成と皮質－視床線維連絡形成に必要である. 第26回日本分子生物学会年会、2003年12月、神戸。

（２６）橋本昌和、小林慎、幸田尚、松田潤一郎、金児-石野知子、石野史敏：マウス新規インプリンティング遺伝子の探索および解析. 第26回日本分子生物学会年会、2003年12月、神戸。

（２７）山本浩一、高村歩美、冨永里香、檜垣克美、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、飯田真己、小川誠一郎、鈴木義之： ２７種類のヒトβ-galactosidase変異細胞株の樹立. 第9回日本ライソゾーム病研究会、2003年12月、東京。

（２８）小浦美奈子、半田寛子、鈴木 治、高野 薫、野口洋子、山本美江、向井一真、平田淳也、太田昭彦、松田潤一郎： マストミスおよびスナネズミ精子の凍結保存法の開発. 第６回生殖工学研究会（SSRE）シンポジウム、2004年3月、大阪。

３． セミナー・講演等

（１）加来義浩：ニパウイルス感染症の防疫の現状。第1回人獣共通感染症談話会 2003年5月。

（２）井上 智：狂犬病の危機管理のための自治体におけるサーベイランス体制等について。平成15年度・動物愛護監視員（狂犬病予防員）研修。2003年、6月26

日、兵庫県。

（３）井上　智：東アジアにおける狂犬病発生状況と危機管理。狂犬病予防に関する市町村担当者研修会。岐阜県獣医師会・岐阜県衛生部。2003 年、7 月 11 日、岐阜県。

（４）井上　智：狂犬病の危機管理。日本大学動物病院セミナー。日本大学動物病院。2003 年、7 月 28 日、神奈川県。

（５）井上　智、佐藤　克：狂犬病が疑われたイヌの臨床診断と解剖および検査方法。犬の不法上陸対策状況の実態調査および検討会。小樽市保健所。2003 年、10 月 16 日、小樽市。

（６）井上　智：狂犬病の危機管理とリスクアナリシス。兵庫県公衆衛生獣医師研修会。兵庫県公衆衛生獣医師会。2003 年、11 月 15 日、神戸市。

（７）井上　智：狂犬病（東アジアに於ける狂犬病発生状況と危機管理への参加）。日本小動物獣医学会・日本獣医公衆衛生学会共催　市民公開シンポジウム動物と暮す−これだけは知っておきたい動物の病気。平成 15 年度三学会年次大会。2004 年、2 月 11 日、横浜。

（８）井上　智：狂犬病の対策に必要な基礎知識（狂犬病の世界状況と日本の現状について）。埼玉県集合狂犬病予防注射実施者講習会。埼玉県獣医師会。2004 年、2 月 26 日、横浜。

（９）鈴木　治:幼若マウス卵巣由来卵母細胞の発生，第 21 回日本受精着床学会・第 48 回日本不妊学会学術講演会合同大会、2003 年 10 月、東京。

（１０）今岡浩一：愛玩動物由来感染症とは。公開シンポジウム。国立感染症研究所学友会主催。2004 年 3 月。

（１１）今岡浩一：ブルセラ症。平成１５年度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。2004 年、2 月 9 日、東京。

（１２）棚林　清：野兎病。平成１５年度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。2004 年、2 月 9 日、東京。

（１３）井上　智：リッサウイルス感染症の実験室診断。平成１５年度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。2004 年、2 月 10 日、東京。

（１４）加来義浩：ニパウイルス感染症の実験室診断。平成１５年度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。2004 年、2 月 10 日、東京。

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/cA	○	○	○	
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
C57BL/6N		○		
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
Bg(w)	○		○	mutant
fz	○			mutant
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	
MCH		○			
5G			○	TG マウス	4 lines
5LG			○	TG マウス	
Acr-GFP		○		TG マウス	
AMPK-CA		○	○	TG マウス	4 lines
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	
EGFP/B6Cr		○		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	
GLUT4-Mut		○	○	TG マウス	
GM1Sy			○	TG マウス	5 lines
Gtl2		○	○	TG マウス	4 lines
Hox11		○	○	TG マウス	
lck-Cre		○		TG マウス	
LECT2		○	○	TG マウス	2 lines
KLF15		○	○	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	
Oct-GFP		○	○	TG マウス	
Octx129		○	○	TG マウス	
OryxPrionTg			○	TG マウス	
PGC-1		○	○	TG マウス	
Prp(Hol)-TG	○	○	○	TG マウス	3 lines
Prp(Mon)-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
Tax		○	○	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	
Chk2		○	○	KO マウス	
gp91-phoxKO		○	○	KO マウス	
LECT2-KO/B6		○	○	KO マウス	
LECT2-KO/BALB		○	○	KO マウス	
Ngfr	○	○		KO マウス	
NZB/MPO KO		○	○	KO マウス	
NZW/MPO KO			○	KO マウス	
P130KO		○	○	KO マウス	
RP58KO		○	○	KO マウス	
Δprf-KO		○	○	KO マウス	
SMN-Δ7		○	○	KO マウス	
SMN-F7		○	○	KO マウス	
BH			○	KO マウス	3 lines
BKO	○	○	○	KO マウス	2 lines
AK	○	○	○	KO/TG	3 lines
BK	○	○	○	KO/TG	3 lines
CK	○	○	○	KO/TG	
OryxTG/KO			○	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15 年度)

動物種	系統	分与先
マウス	AK12	鳥取大学生命機能研究支援センター
マウス	BK48	鳥取大学生命機能研究支援センター
マウス	BKO	鳥取大学生命機能研究支援センター
マウス	C57L	鶴見大学歯学部(2回)
マウス	CK35	鳥取大学生命機能研究支援センター
マウス	GR	東京大学獣医病理
マウス	ICGN	愛知医科大学(4回)
		京都大学
		日本全薬工業(株)中央研究所
		北海道大学実験動物学教室
マウス	JF1	国立医薬品食品衛生研究所
マウス	YPC	東京大学獣医病理(5回)

13. 血液･安全性研究部

部 長　山 口 一 成

概　要

平成 16 年 4 月 1 日に新しく血液･安全性研究部に赴任してまいりました。これまで小室勝利部長の下で研究･業務に携わってこられた皆様に敬意を表したいと存じます。

私の赴任前に第 4 室、後藤紀久室長が退職され独立行政法人医薬品医療機器総合機構に移られ、また第 3 室、青木陽一郎研究員が退職、第 11 パリ大学分子生物部門に移られました。両先生の今後のご発展、ご活躍を期待しています。

今年度の業績、業務実績は私の赴任前のことですが、多岐にわたっており、充実した研究が行なわれていたことを示していると思います。この伝統の上に、新たな業績を積み重ねることが私に課せられた任務だと思っております。全力を尽くしてまいります。

私自身は 3 月まで内科の医者として、白血病や悪性リンパ腫などの血液の腫瘍、感染症などの研究を専門にしてまいりました。ここでも血液の研究は続けていきますが、安全性の研究という新しい分野にもチャレンジできることを楽しみにしています。安全というキーワードはこれからの時代のキーワードですが、今ある血液製剤、ワクチンなどの安全性のみならず、再生医療、移植医療、遺伝子治療などの分野でも、華々しい話題の一方、その安全性に関して、研究者も、医療側も、それを受ける人たちも立ちすくんでいるというのが現状です。

私は安全性の確認のために、その手段として如何に先端テクノロジーを応用できるかに腐心したいと思っております。

今後とも血液･安全性研究部にご理解とご支援をお願いいたします。

研究業績

Ⅰ. 生物学的製剤の品質管理に関する研究

1. 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

ア. 肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PW)への試み

PS-rCTB 結合ワクチンを、rCTB 存在下と非存在下で、BALB/c マウスに 4 回経鼻免疫した。その結果、 PW 特異的血清 IgG、IgA、IgM 抗体価の上昇が認められた。しかし、rCTB を同時接種してもその効果はほとんど見られなかった。それに対して、気管支肺胞洗浄液中の PW 特異的粘膜 IgA 抗体価は、rCTB 添加時に有意に上昇した。[後藤紀久、前山順一、井坂雅徳、安田陽子、杤久保邦夫(名古屋市大･医)]

イ. インフルエンザ HA ワクチンへの試み

インフルエンザ A 型 HA ワクチン[A/ニューカレドニア(NC)/20/99(H1N1)由来、A 型 HA]を rCTB 存在下と非存在下で BALB/c マウスに 4 回経鼻免疫した。最終免疫後 9 日目に赤血球凝集阻止(HI)抗体価および中和(NT)抗体価測定用に血液を採取、14 日目にマウス馴化ウイルスを経鼻投与して 14 日間体重の増減と生死を観察した。その結果、非免疫マウスは 6 日目までに全て死亡し、4 日目まで生き残ったマウスの平均体重は 27%減少していた。A 型 HA 単独の場合は 4 日目までに 3 匹死亡し、生き残った 5 匹の体重の回復に大きなバラツキが見られた。それに対して、A 型 HA+rCTB で免疫されたマウスは 8 匹全てが生き残り、平均体重の減少は 10%前後に過ぎなかった。最終免疫後 9 日目の HI 抗体価と NT 抗体価は rCTB 存在下で有意に高い値を示した。以上の結果より、発症防御のために rCTB の同時投与が必要であることが分かった。[後藤紀久、前山順一、安田陽子、杤久保邦夫(名古屋市大･医)、諸熊一則、大隈邦夫(化血研)]

ウ. 細胞性免疫反応に対する rCTB の作用

rCTBをアジュバントとして用いた場合のモルモットにおける BCG 経鼻投与の条件を確立した。すなわち、前年度と同様にrCTB+BCG初回免疫後、rCTB単独で頻回投与するとき、投与液容量を変えたところ、皮下接種と同程度のPPD による DTH が得られ、その値の分散が小さくなった。また、rCTB単独、PPD単独またはrCTB+PPDで経鼻投与し、その後にrCTB単独で頻回投与を行った場合、PPDおよびrCTBによるDTHは認められなかった。DTHを示すためには、初回 BCG 投与が必要であることがわかった。[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、杤久保邦夫(名古屋市大・医)]

エ. rCTB の *in vitro* での免疫細胞に対する作用

これまでの研究ではマクロファージを用いて検討してきたが、経鼻免疫ということを考え、今年度は鼻粘膜由来の単核球を用いた。これらの細胞を *in vitro* で LPS 刺激した時、rCTB 同時投与によって IL-1 β と TNF- α の産生が増強した。[前山順一、後藤紀久、井坂雅徳、安田陽子、杤久保邦夫(名古屋市大・医)]

オ. カニクイザルに対する rCTB の効果

ジフテリア・破傷風トキソイド(DT・TT)及びHBsワクチン抗原(HBs)を rCTB と共に経鼻投与したところ、TT では血清抗毒素価において、HBs では血清、唾液中の凝集価において、rCTB 存在下で高い値が得られた。一方、DT においては、供給された全てのサルが高いジフテリア抗毒素価をもち、このため、DT に対する抗毒素価の様相について明確な結果が得られなかったが、鼻腔、肺、膣洗浄液に関しては、rCTB 存在下で高い抗毒素価が得られた。唾液に関しては、Vero 細胞を用いた培養細胞法で細胞毒性を示したため明確な結果が得られず、今後の検討課題とした。[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)]

カ. カニクイザルを用いての安全性

rCTB 添加群 3 頭のうち 1 頭の投与部位の鼻腔内嗅上皮(多列線毛上皮)に好酸球浸潤が認められた。しかし血清 IgE 抗体の上昇は見られなかった。頻回投与にもかかわらず、他の特記すべき所見はいずれの臓器においても認められなかった。検索対象臓器は、大脳、小脳、脳幹、脊髄、視神経、鼻腔を含む上顎、扁桃、咽喉頭、三叉神経節、下顎・腋下・鼠径・腸間膜・骨盤腔各リンパ節、胸腺、心、肺、肝、脾、腎、副腎、唾液腺、甲状腺、膵、胃、小腸、大腸、精巣(卵巣)等である。[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)]

キ. カニクイザルを用いての細胞反応

DT・TT・HBs で免疫したサルの扁桃細胞をワクチン抗原で刺激した時のサイトカイン産生を調べたところ、rCTB 添加群では IFN γ の産生は認められず、非添加群で産生が認められた。また、高い抗体価を示した個体では抗原刺激による細胞増殖が認められた。[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

ア. IFN- β の粘膜アジュバント作用

前年度から引き続き、キトサン溶液を併用することを試み、今回は血清抗毒素価を測定した。その結果、キトサン単独でもDTに対する抗毒素価を示したが、さらにIFN- β により有意に高い抗毒素価を得られることがわかった。また、IFN- β の用量に依存して抗毒素価の上昇が認められた。[前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)]

イ. 脾臓細胞反応

粘膜免疫したマウスから得た脾臓細胞を *in vitro* で抗原刺激し、培養上清中のサイトカインを定量した結果、IFN- β に 1%キトサンを添加した群に IL-5 の有意な産生増強が認められた。抗原特異的脾臓細胞増殖反応を検討した結果、高い DT 抗毒素価を示したところの、IFN- β に 1%キトサンを添加して経鼻投与した群では *in vitro* での DT 刺激による脾臓細胞増殖が顕著であった。[前山順一、後藤紀久、蔵田優子、櫻井信豪(東レ)]

2. 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—

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昨年度は、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レチノイド(Retinoic Acid ; RA)の受容体(RXR)とCore タンパクとの関係を検討してきた。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 に比較して RARE の 2-3 倍高い活性が認められた。また、Core 遺伝子(mRNA)を過剰発現させると(20、40、60, 80pg) dose-dependent に網膜(retina)の形成不全が認められた。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。昨年まではアフリカツメガエル胚への Tat, mutant-Tat, Gag 等を接種し、その形態学的解析を行った。mutant-Tat, Gag では変化は認められなかったが、Tat では原腸陥入後の胚葉形成不全が認められた。その形成不全は tadpole(stage40)期まで継続し、Tat 接種を受けた体側は原腸陥入不全のため中, 内胚葉が体外へ露出したままであった。また、embryo の生存率は、stage45 までで0%であった。また whole-mount in situ hybridization にて Brachyury (Xbra:中胚葉形成に必修で、かつ原腸陥入の発生期に特異的に発現する転写因子)をプローブに解析を行ったところ、Tat 接種側では Xbra の発現が特異的に抑制された。また、PCRにても他の中胚葉形成の遺伝子マーカーを含めた解析を行い(Xbra、goosecoid)、Tat 接種により、それらの発現が抑制されていることを示した。以上のことより、我々は Tat が発生初期 embryo における中胚葉形成を特異的に抑制していることを明らかにした。[青木陽一郎、布施　晃、小室勝利]

3. 計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価

本研究プロジェクトでは、ジェノタイプ検査やフェノタイプ検査に並ぶ新しい薬剤耐性検査法として、「コンピュテーショナル検査」を提案している。これを達成するために、以下の2点の検討をおこなった。(1) 既知データとの整合性確認による方法論の確立。(2) 臨床検体を中心とした実用性信頼性等の検討。
既知のデータについておよそ 30 例について解析し、方法的に分析可能であることが確認された。臨床材料については、敏速にウイルスの遺伝子配列を決定する方法を検討した。今後、臨床サンプルを用いて薬剤耐性を迅速に評価することを実施する。[星野忠次(千葉大学　薬学研究院)佐藤武幸(千葉大学医学部附属病院)杉浦　亙(エイズセンター)、布施　晃]

4. cDNA マイクロアレーによる分析Ⅱ:抗ガン剤による細胞死の分析と感受性の事前診断

昨年に引き続き、抗ガン剤の白血病に対する作用を解析するために、白血病細胞株 CMK に抗ガン剤を投与し、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)で解析している。その結果、AraC 処理では細胞死にいたる前に、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。現在、その遺伝子の挙動ををタンパクレベルで分析中である。患者のガン細胞の遺伝子およびタンパクの変化の分析により、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ことを目的とする。[佐藤武幸(千葉大研究院)、関　直彦(千葉大研究院)、布施　晃]

5. 微小重力の生体防御に及ぼす影響Ⅳ :ストレスとウイルス感染の評価法の開発

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、ヒートショックたんぱく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ている。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検討する予定である。航空機あるいは落下装置での短時間微少重力下での予備実験として、まず、疑似微少重力環境を提供する尾部懸垂法を用いて実験を行った。ヘルペスウイルス感染の重篤化が認められた。本研究はストレス下でのウイルス感染増大の危険性を評価する方法の開発を目的とする。[布施　晃、吉田逸郎(旭川医大)、喜多正和(京都府立医大)]

6. 平成 15 年度抜取試験 市販抗生物質医薬品の核磁気共鳴(NMR)スペクトル法による確認試験

(1) セフメタゾールナトリウム(注射用)、リン酸クリンダマイシン(注射液)、 ホスホマイシンカルシウム(経口剤)、 及び硫酸ポリミキシンB(注射用、錠)の各製剤のNMR同定確認を試みた。測定装置:Varian UNITY-400/5mm φ 測定管; 400MHz (^{1}H)、100MHz (^{13}C)、160MHz (^{31}P);測定温度:27℃、30℃、又は室温(温度コントロールなし)。内標準物質としてDSSを 0.04%含んだ重水を標準品と検体に加えて溶解し、同一力価濃度の標準溶液、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を作成した。これらの溶液の 0.6mlを使用して、 ^{1}H-、^{13}C-、又は^{31}P-スペクトルの測定を実施し、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た。各検体の測定濃度と積算数:セフメタゾールナトリウム 30mg(力価)/ml、^{1}H(16)、^{13}C(1024)。リン酸クリンダマイシン 150mg(力価)/ml、^{1}H(16)、^{13}C(1024)。ホスホマイシンカルシウム 2.4mg(力価)/ml、^{1}H(32)、^{31}P(128)。硫酸ポリミキシンB 40 万単位/ml、^{13}Cースペクトル(8608)。
(2) 結果
ア. セフメタゾールナトリウム:5 社、10 ロット。^{1}H-スペクトル:10 ロット全てについて、検体スペクトルは標準品スペクトルと同一のスペクトルパターンを与え、等量混合物スペクトルは標準品と完全に一致した。検体中の不純物ピークとして 3.85 ppmに弱いsingletが全ての検体に観測されたが、他に強い添加物や不純ピークは認められず、ほぼ表示成分のみの検体であることを確認した。^{13}C-スペクトル:標準

品、検体について、15 本のシグナルが完全分離した同一パターンのスペクトルが観測され、等量混合物スペクトルは完全に一致した。1H－スペクトルの結果から予想される様に表示物質以外の強ピークは全く観測されなかった。

イ. リン酸クリンダマイシン：5 社、6 ロット。^{1}H-スペクトル：標準品と検体はメチル、メチレンを多く含む 0.8 ppm～4.0 ppmの領域はほぼ同一のスペクトルを与えたが、4.2 ppm～4.8 ppmのシグナルパターンは全く異なっていた。しかし、6 検体のスペクトルはいずれも非常に類似したスペクトルを与えた。6 検体は、標準品スペクトルとほぼ類似の等量混合物スペクトルを与え、同一物質の確率が高いが、0.8 ppm～4.0 ppmの領域での未分離ピークの不確定部分があるため確実とは断定できなかった。尚、リン酸クリンダマイシン以外に、6 検体全てに添加物のベンジルアルコール由来のシグナルが 4.64 ppm、7.4 ppmに観測された。さらに 5 ppm付近の水の強いシグナルのため、不明な領域が存在した。^{13}C-スペクトル：標準品スペクトルで 18 本の完全分離ピークが得られた。73.0 ppm、73.4 ppm、80 ppm付近にJcpカップリングを有した 3 つのシグナルを観測した。検体スペクトルには標準品スペクトルピーク以外に添加物のベンジルアルコールのシグナルが、66.6 ppm、130.2 ppm、130.5 ppm、131.4 ppm付近に観測された。等量混合物スペクトルでは、標準品のピークは完全に検体ピークと一致した。

ウ. ホスホマイシンカルシウム：7 社、13 ロット（カプセル、錠、シロップ）。 ホスホマイシンカルシウムは水に難溶性で、弱酸性水に易溶であるが、分解されやすいため、安定な中性条件で測定を実施した。希薄溶液のため、^{13}C－スペクトル測定は実施しなかった。^{1}H-スペクトル：検体は低分子（$C_3H_5O_4PCa$）であるため、スペクトルは単純かつ完全分離され、また賦形剤等のシグナルの重複がなかったため、^{1}H-スペクトルのみで同定が完了した。標準品、検体は 1.5 ppm（3H）、3.0ppm（1H）、3.4ppm（1H）に 1 次のカップリングによる多重線を与え、いずれもJ_{HP}が観測された。等量混合物スペクトルは全て一致した。添加物等は以下の様に分類できた。

検体	形状	製造者	乳糖	クエン酸	その他
1	シロップ	A	○	○	○
2	シロップ	B	○	○	○
3	カプセル	B	×	○	×
4	シロップ	C	○	○	○
5	カプセル	D	×	×	×
6	シロップ	D	○	○	○
7	カプセル	E	×	○	×
8	錠剤	F	×	×	trace
9	錠剤	F	×	×	trace
10	シロップ	F	○	○	○
11	シロップ	F	○	○	○
12	カプセル	G	×	○	×
13	シロップ	G	○	○	○

カプセルの 5 は添加物を全く含んでいなかったが、3 と 12 はクエン酸を含んでいた。シロップ（7検体）はすべて 3 成分を含み、極めて類似したスペクトルを与えたことから、同一成分比の添加物の使用が推測された。^{31}P-スペクトル：標準品と検体は 1 本のシグナルを与え、等量混合物は完全に一致した。

エ. 硫酸ポリミキシンB :3 社、4 ロット（注射用、錠）。^{1}H-スペクトル：脂肪族アミノ酸ペプチド構造（$C_{55\sim56}H_{96\sim98}N_{16}O_{13}$）であること、多重重複スペクトルを与えるアルキル基が多いことなどから、同定確認に適さないと判断し、測定を実施しなかった。尚、1 ロット（錠剤）の^{13}C－スペクトルに強い不純物ピークか観測されたため、詳細に調べるため、この検体の^{1}H-スペクトル測定を実施した。^{13}C-スペクトル：標準品は2成分（ポリミキシンB1：C56, B2：C55）の混合物であり、さらに成分比が不明なため各成分と不純物由来のピークとの区別が困難と予想された。測定の結果、一部に未分離ピークが存在したが、大部分は分離ピークとして観測された。これらは強度が大きい 48 ピークと弱い 17 ピークの 2 つのピーク群に分かれ、主成分と微量成分由来と考えられた。これらを主ピーク、微量ピークと区別した。標準品スペクトルの全 65 ピークのうち、主ピークをポリミキシンB由来ピークとみなし、検体スペクトルの比較に使用した。4 検体から得られた検体スペクトルには該当する 48 本のピークのすべてが観測された。等量混合物スペクトルでは、これらは主ピークと全て一致した。また微量ピーク 17 本のうち 11 本が、4 検体の等量混合物スペクトルで完全に一致した。これらの結果から、検体が表示物質であると判断し、同定確認した。錠剤の1ロットは、42 ppm、172 ppmに非常に強いピークが観測された。この検体の^{1}H-スペクトルを測定、検討した結果、この物質はグリシンと同定確認した。60 mg（グリシン）/100 万単位/錠の含有が推定された。残りの注射用 2 ロットと錠剤 1 ロットには強い不純物ピークは観測されなかっ。［矢野茂生］

7. プロテオーム研究―細胞内結合タンパク質のマススペクトルでの同定と解析

(1) インターフェロン転写制御因子の研究

昨年に引き続き IRF-2 のアセチル化の機能を詳細に検討するため、アセチル化 IRF-2 に結合する細胞性タンパク質を LC-MS/MS で同定した。このタンパク質は未修飾の IRF-2 よりアセチル化 IRF-2 に対して結合能力が高いことが確認された。［益見厚子］

(2) HCV タンパク質 NS5A の研究

C 型肝炎ウイルスタンパク質 NS5A が IFN 抵抗性に関与しているなどの報告があったことから、NS5A 結合タンパク質の研究は広くなされている。我々も 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。結合タンパク質は Amphiphysin II というリン酸化タンパク質が主であることが確認され，これは 2003 年に他

の研究者が別法で見い出したタンパク質と同一であったが細胞内において NS5A との結合性が強いことから、肝臓培養細胞においての NS5A と Amohiohysin II の相互作用の生物的意義を検討している。
［益見厚子］

Ⅱ．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
ーリポソーム結合抗原による細胞性免疫の誘導

3種類の脂質組成（飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸-PS 置換）のリポソームを作製し、MHC クラス I を介しての免疫誘導（細胞性免疫誘導）の可否について比較検討した。3種類の脂質組成のうち、不飽和脂肪酸からなるリポソームと OVA との結合物を培養中に添加したときに OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞から最も高値のサイトカインが産生された。また、飽和脂肪酸の PC を PS に置き換えることによって CD8 T 細胞への抗原提供が有意に増強された。［種市麻衣子、内藤誠之郎、加藤博史、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
ーリポソーム結合抗原経口投与の免疫系に及ぼす影響の検討

BALB/c マウスに蛍光標識 OVA あるいはリポソーム結合蛍光標識 OVA を経口投与した後、腸管の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下で抗原の局在を検討した。リポソーム結合 OVA はパイエル板 SED 領域以外に粘膜固有層に直接とりこまれることが明らかになった。また、OVA 喘息モデルにおいてリポソーム結合 OVA の経口投与は BAL 中の好酸球浸潤と血中 IgE 抗体産生を顕著に抑制した。［内藤誠之郎、加藤博史、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也］

3. 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
ーリポソーム結合リコンビナント HBs 抗原による免疫応答の誘導

リコンビナントHBs抗原とリポソームとの結合物を3種類の脂質組成（飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸-PS置換）を有するリポソームを用いて作製し、それぞれについてマウスにおけるHBs特異的免疫応答の誘導を検討した。上記3種類の脂質組成のリポソームを用いて作製したリポソーム結合HBsをマウスに免疫すると、抗HBs IgG抗体産生の誘導については3群の間に有意差が見られなかったが、HBs特異的遅延型過敏症反応(DTH)の誘導については不飽和脂肪酸からなるリポソーム群で他の2群と比較して有意に高値となった。また、いずれの場合においても抗HBs IgE 抗体産生は選択的に抑制された。［加藤博史、種市麻衣子、内藤誠之郎、田中ゆり子、内田哲也］

4. インテグラーゼによるDNA再構成

精製したインテグラーゼ存在下に、細胞のゲノムの一部と相同性のあるDNAを細胞に導入すると、ゲノムの当該部位にDNA再構成が高頻度に起こることを見い出し、その機構の解明を行ってきた。今年度は、再構成の詳細について検討した。その結果、相同部分は0.5kbで十分であること、相同部分の近傍に繰り返し配列がある時は、その内部で組み替えが生じて、リピートにはさまれた配列が欠失すること、数％程度の内部の塩基配列の差は相同性の検索に影響を及ぼさないこと等が明らかになった。［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。

抗原提示細胞の抗原提示能力はT細胞の機能発現の調査と、抗原提示細胞とT細胞との接着面に形成される免疫シナプスのような構造変化の調査で評価される。後者の調査に基づく抗原提示能力の評価法を確立する目的で、GFPを結合したZAP70（GFP-ZAP70）を発現するT細胞を用いて免疫シナプスの構造解析を行った。免疫シナプスのT細胞側において、免疫シナプス形成に関与する F-アクチンの凝集、シグナル伝達に関係するGFP-ZAP70、T細胞受容体epsilon鎖、およびチロシンリン酸化タンパク質の集積、液性メディエイターの放出に関係するMTOCの接近が認められた。さらに、免疫シナプスは時間とともに動的に移動することも確認できた。［笠井道之］

6. マウス胸腺細胞にアポトーシスを誘導した際の胸腺でのマクロファージ挙動

抗CD3抗体をマウスに投与すると CD3+CD4+CD8+胸腺細胞にアポトーシスが誘導されるが、死細胞はマクロファージによって速やかに貪食処理されることを報告してきた。今回、抗CD3投与後、胸腺にリンパ管が多数形成されることを観察した。マウス胸腺細胞のアポトーシスに伴い遊走してきたマクロファージは、死細胞貪食後ケモカインレセプターCCR7を発現していた。そして、マクロファージの多くはリンパ管から産生されるSLCに誘導され、リンパ管を介して胸腺から所属リンパ節へと移行することが示唆された。［小高千加子］

Ⅲ．血液製剤に関する研究

1. 検定に関する研究

(1) グロブリン製剤の抗補体性否定試験に用いる、至適ヒツジ赤血球の検討

抗補体性否定試験とは、製剤中に、一定以上の補体を消費する物質が存在しないことを確認するもので、ヒツジ赤血球の溶血により測定する。ヒツジ赤血球は個体差が在る故、用いる補体、溶血素の組み合わせにより試験自体が不成立となることが多々あり、試験に適合したヒツジ赤血球を得ることは容易ではない。そこで、合計 20 頭のヒツジ赤血球を用いて、試験に適した血球を検討した。その結果、補体価(CH50)は 200ー251 であり、run control 製剤の抗補体価は 17ー23(＜20 で合格)であり、試験に適合したヒツジは数頭のみであった。よって、試験には同一個体の赤血球を定期的に使用することにより、試験不成立を回避できると考えられる。[梅森清子、岡田義昭、小室勝利]

2. プリオンの研究

(1) in vitro 感染系の試み

プリオン病の感染性の評価にマウスが多く使用されているが、動物愛護や結果がでるまでに時間を要することなどから in vitro 感染系の確立を目的に研究を実施した。Scrapie 感染マウスと BSE 感染牛からの脳乳剤を神経系や肺ガン由来の細胞株に感染させた。約一ヶ月間継代後、プロテネースK(PK)処理しウエスタンブロットにてプリオンを検出した。神経系以外の細胞株からも感染を確認することができた。感受性の検討は継続中である。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(2) 血球系におけるプリオン感染細胞の解析

プリオン病が血液製剤を介して感染するのか、重要な問題である。Scrapie 感染マウス由来脾臓と骨髄(感染病理部 長谷川博士より供与)からプリオンの検出を行った。脾細胞を Thy-1、CD11b、CD19 に精製しウエスタンブロットを行い、CD11b に強いシグナルを認めた。また、骨髄においてもプリオンを検出することができた。B 細胞以外にも特定の細胞群にプリオンが蓄積している可能性が示された。骨髄細胞からも検出されたことから輸血用血液と同等のドナーの選択が必要であることが示唆された。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(3) 組換えヒト STI1 タンパクの発現とヒトプリオンタンパクとの結合に関する研究

STI1 はco-chaperonin protein のひとつであるが、その約6%は細胞表面に分布し、プリオンタンパクと結合して神経系細胞の細胞死を阻止することが知られている。本研究では異常プリオンタンパクの感染におけるヒトSTI1 の関与を検討することを目的とし、組み換えヒトSTI1-HisTagタンパク発現プラスミドを作製し、COS7 でトランジェントに発現させたヒトSTI1 とPrP^Cとが結合することを示唆する結果を得た。[水沢左衛子、岡田義昭]

3. 血液を介するウイルスの研究

(1) パルボウイルス B19 感染系を用いた血液製剤での中和抗体の解析

パルボウイルス B19(B19)に対する抗体は成人の50-60%が陽性のため原料血漿中に常に存在する。グロブリン製剤でのB19抗体を測定したところ通常のグロブリン製剤ではほぼ一定の抗体が存在した。しかし、特殊免疫グロブリン製剤では原料血漿を構成するドナーが少ないためか抗体価が低い製剤が存在した。高濃度の B19 が混入した場合には感染を起こす可能性があるので高濃度の B19 陽性血漿を排除する必要がある。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

(2) ヒトパルボウイルス B19 非構造タンパク NS1 の細胞障害機構に関する研究

B19 ウイルスDNAは、全長 5.6 kb により構成され、C末側半分はウイルスキャプシド蛋白 VP1,VP2 を、N 末側半分は非構造蛋白 NS1 をコードする。NS 蛋白はウイルスの複製に関与する調整蛋白であると考えられているが、大量に発現されると、細胞障害作用を有すると考えられている。そこで、NS1 による細胞毒性のメカニズムを解析することを目的とし、NS1 の真核細胞内への誘導発現系の確立を試みている。また、大腸菌株 BL21DE3 を用いて、全長 NS1、及びC末 NS1 のリコンビナント蛋白を作製し、抗 NS1 ポリクローナル抗体を作製中である。[梅森清子、岡田義昭、水沢左衛子、小室勝利]

(3) HBV genotype のパネルの作成

HBVではAからHまでのgenotypeが存在するが、genotype間での核酸増幅検査の感度評価やS抗原の抗原性を評価するための検体を充分量確保することは困難である。そこで恒常的に同一の遺伝子を持ち、同一のS抗原を得るために、PCRによって全長のHBVを増幅し、genotype毎のクローンのパネルを整備した。さらに、細胞に遺伝子導入することで培養上清中にS抗原が分泌されるのでS抗原のパネルとしてもAからGまで作成することができた。整備されたパネルを用いることで、日本では入手困難なgenotypeの感度評価等が可能になった。[岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、小室勝利]

Ⅳ. 標準感度パネルの作製

1. WH0による新規HBsAg国際標準品制定のための collaborative studyへの参加

新規 HBs 抗原 WHO 国際標準品の制定に参画し、またそれを基準にして作製した HBs 抗原リファレンスパネルの評価作業を行った。その結果、2003 年 10 月に開かれた WHO の会議において、新規標準品はサブタイプ adw2, genotypea であり、その抗原量は 33IU/vial と決定された。従来の国際標準品との比較を国内で販売されている種々の測定キットを用いて行い、その整合性を確認した。[水落利明]

2. HBsAg 抗原量表示法の統一に向けた国内標準感度パネルの作製

これまでは ng と IU(International Unit)が混在していた HBs 抗原量の表示法を、traceability の観点からも IU に統一することを提言してきたが、この問題も上記の 2003 年 10 月の WHO 会議で討議され、今後は EU および米国も含めて全て IU 表示に統一されることとなった。これを受けて国内で販売されている HBs 抗原検出用体外診断薬の添付文書に記載されている最小検出感度についても表記法の統一をはかるべく、HBs 抗原国内標準感度パネルの作成に向けた準備を行った。[水落利明]

3. WHO による抗 D 抗体国際標準品制定のための collaborative study への参加

NIBSCより送付された国際標準候補品と国内参照品とを用いて凝集反応を行い、その結果(力価)を報告した。世界各国(13カ国)20カ所の研究施設のデータを集積し、それらをもとにして、今後抗D抗体国際標準品の力価が決定されることになっている。[笠井道之、水落利明]

1. 平成15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	53
人免疫グロブリン	7
乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン	3
乾燥スルホ化人免疫グロブリン	69
乾燥pH4処理酸性人免疫グロブリン	4
pH4処理酸性人免疫グロブリン	8
乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン	15
ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン	53
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	41
抗破傷風人免疫グロブリン	4
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	2
乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ	48
人ハプトグロビン	9
計	321
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	12
人免疫グロブリン(パルボウイルス検査)	0
計	12
合計	343

2. 平成 15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	3
乾燥抗 HBs 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 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	3
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	5
抗 B 血液型判定用抗体	5
抗 D 血液型判定用抗体	7
ゲルカラム遠心凝集法血液型判定用抗体	1
(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	2
(混合血液型抗体を含む製剤)	
ビーズ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	30
依頼検査	
HBs 抗原検出用体外診断キット	2
HCV 抗体検出用体外診断キット	2
ゲルカラム遠心凝集法	5
計	9

標準品の供与	
参照抗 HBs 人免疫グロブリン(1 本)	1
HBs 抗原国内標準品(4 本)	2
計	3
特別審査	
抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン 力価試験(#2003401)	1
計	1
合計	53

3. 平成15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	5
含湿度試験	131
たん白窒素定量試験	208
たん白質定量試験	102
ホルムアルデヒド定量試験	142
チメロサール定量試験	2
ヒスタミン定量試験	2
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	0
計	603
特審・収去・依頼	
含湿度　水分定量法(KF 法)	59
乾燥重量法	32
ガスクロ法	0
水素イオン濃度試験	0
たんぱく窒素定量試験	10
吸光度(紫外吸収)	0
旋光度(特審)	0
赤外吸収(収去)	27
紫外吸収(特審)	0
NMR(収去)	33
残留溶媒(ガスクロ法)	0
HPLC(特審)	3
フェノール定量試験(特審)	1
多糖含量試験(特審)	1
計	166
合計	769

4. 平成15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	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	10	10	0	0	0
5	4	4	0	0	0
6	14	13	0	1	0
7	3	3	0	0	0
8	7	7	0	0	0
9	51	51	0	0	0
10	22	22	0	0	0
11	9	9	0	0	0
12	12	12	0	0	0
1	2	2	0	0	0
2	13	13	0	0	0
3	23	23	0	0	0
計	170	169	0	1	0

(イ)血液製剤

月	試験実施件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	95	95	0	0	0
5	31	30	0	1	0
6	119	118	0	1	0
7	43	43	0	0	0
8	62	62	0	0	0
9	104	102	0	2	0
10	84	81	0	3	0
11	48	48	0	0	0
12	93	91	0	2	0
1	42	37	0	5	0
2	51	51	0	0	0
3	117	115	0	2	0
計	889	873	0	16	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	21	21	0	0	0
6	31	31	0	0	0
7	33	33	0	0	0
8	35	35	0	0	0
9	26	26	0	0	0
10	30	30	0	0	0
11	30	28	0	2	0
12	36	35	0	1	0
1	32	32	0	0	0
2	36	36	0	0	0
3	28	28	0	0	0
計	367	364	0	3	0

研究業績一覧

I. 論文発表

1. 欧文発表

1) T. Ikeda, M. Kasai, J. Suzuki, H. Kuroyama, S. Seki, M. Utsuyama, and K. Hirokawa. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. J. Biol. Chem. 278, 47217-47222, 2003.

2) Y. Tanaka, M. Kasai, M. Taneichi, S. Naito, H. Kato, M. Mori, M. Nishida, N. Maekawa, H. Yamamura, K. Komuro, and T. Uchida. Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. Bioconjugate Chem. 15, 35-40, 2004.

3) H.Kuroyama, T. Ikeda, M. Kasai, S. Yamasaki, M. Tatsumi, M. Utsuyama, T. Saito and K. Hirokawa. Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. Biochem Biophys Res Commun. 315(4), 935-941, 2004.

4) Uchida, T. Stx-liposome conjugates as candidate vaccines. Drugs of Today 39:673-693, 2003.

5) Torihata H, Ishikawa F, Okada Y, Tanaka Y, Uchida T, Suguro T, Kakiuchi T. Irradiation up-regulates CD80 expression through two different mechanisms in spleen B cells, B lymphoma cells, and dendritic cells. Immunology 112:219-227, 2004.

6) Sunohara M, Sato T, Sato I, Sato S and Fuse A, Modulation mechanism of *c-mpl* gene expression in human megakaryoblastic CMK cells. Dentistry in Japan, in press

7) Isaka,M., Yasuda,Y., Taniguchi,T., Kozuka,S., Matano,K., Maeyama,J., Morokuma,K., Ohkuma,K., Goto,N. & Tochikubo,K. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. Vaccine, 21(11-21), 1165-1173, 2003.

8) Yasuda,Y., Isaka,M., Taniguchi,T., Zhao,Y., Matano,K., Matsui,H., Morokuma,K., Maeyama,J., Ohkuma,K., Goto,N. & Tochikubo,K. Frequent nasal administrations of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) containing tetanus and diphtheria toxoid vaccines induced antigen-specific serum and mucosal immune responses in the presence of anti-rCTB antibodies. Vaccine, 21(21-22), 2954-2963,2003.

9) Maeyama,J., Isaka,M., Yasuda,Y., Matano,K., Morokuma,K., Ohkuma,K., Tochikubo,K., Yamamoto,S. & Goto,N. Effects of recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) on cellular immune

responses : Enhancement of delayed-type hypersensitivity following intranasal co-administration of *Mycobacterium bovis*-BCG with rCTB. Microbiol. Immunol., 48(6), 457-463,2004.

10) Isaka,M., Komiya,T., Takahashi,M., Yasuda,Y., Taniguchi,T., Zhao,Y., Matano,K., Matsui,H., Maeyama,J., Morokuma,K., Ohkuma,K., Goto,N. & Tochikubo,K. Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. Vaccine (*in press)*

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. 23, 8295-8305, 2003

2. 和文発表

1) 布施　晃:医薬品等ウイルス安全性試験の具体的対応策. PDA Journal of GMP and Validation in Japan. 5 61-64, 2003

2) 曲田純二、布施　晃:バイオ医薬品のウイルス安全性に対する最近の欧米の動向. PDA Journal of GMP and Validation in Japan. 5 76-80, 2003

3) 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 15 年度創薬ヒューマンサイエンス総合研究事業、報告書。

4) 益見厚子、インターフェロン制御転写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15年度報告書

5) 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 13-15 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

㊫. 学会発表

1. 国際学会

1) Fuse A, Sato T: Modulation of human c-MPL gene expression by thrombopoietin through protein kinase C. The 8th Meeting of European Haematology Association, June12-15, Lyon, France 2003.

2) Fuse A: Modulation of human c-MPL gene. REGA International Symposium Novmber 11-12, 2003, Leuven, Belgium 2003.

3) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation. International Society for Interferon and Cytokine Research. Cairns, Australia, October 25-30, 2003.

国内学会

1) Odaka, C.:Fate of apoptotic cells during phagocytosis by macrophages
(The 16th Naito Conference、平成 15 年 10 月、神奈川県逗子市)

2) 小高千加子、水落利明: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. 第 33 回日本免疫学会総会、平成 15 年 12 月、福岡市

3) 笠井道之、池田通:抗原提示細胞内H2-DM陽性lysosomal compartmentの可視化. 第13回 Kyoto T Cell Conference 2003年6月

4) 田中ゆり子、種市麻衣子、内藤誠之助、加藤博史、笠井道之、内田哲也:フォスファチジルセリン含有によって増大するリポソームのアジュバント効果.
第 33 回 日本免疫学会総会・学術集会 2003 年 12 月)

5) 笠井道之、池田通、水落利明:抗原提示細胞内H2-DM陽性lysosomal compartmentの可視化と分離.第33回 日本免疫学会総会・学術集会 2003年12月

6) 内田哲也:リポソーム結合抗原によって誘導され T 細胞非依存的 IgE 産生抑制 第 53 回 日本アレルギー学会総会、2003 年

7) 加藤博史、内藤誠之郎、種市麻衣子、田中ゆり子、内田哲也:修飾抗原と非修飾抗原によって修飾される T-cell epitope の違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年

8) 内藤誠之郎、田中ゆり子、加藤博史、種市麻衣子、内田哲也:リポソーム結合 OVA に対する MHC 非依存的、strain 拘束性免疫応答 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年

9) 種市麻衣子、加藤博史、田中ゆり子、内藤誠之郎、内田哲也:T-cell epitope の異なる CD4 陽性 T 細胞におけるサイトカインプロファイルの違いについて 第 33 回日本免疫学会総会、2003 年

10)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、杤久保邦夫、後藤紀久. BCG との同時経鼻投与でみた組換えコレラ毒素 B サブユニットの細胞性免疫増強効果. 第 76 回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.

11)趙 艶秋、井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、松井秀之、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、後藤紀久、杤久保邦夫. 組換え CTB を粘膜アジュバントとするインフルエンザワクチンの経鼻接種. 第76回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.

12)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、近田俊文、高橋元秀、後藤紀久、

杤久保邦夫. 組換えCTBを粘膜アジュバントとしたDTP混合経鼻投与の有効性評価. 第76回日本細菌学会総会(熊本)、4/1-3, 2003.

13)蔵田優子、櫻井信豪、前山順一、後藤紀久. マウス経鼻投与における IFN-β のアジュバント作用の増強について. 第68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、7/23-24, 2003.

14)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、杤久保邦夫、後藤紀久. 細胞性免疫増強効果からみた鼻粘膜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. 第7回日本ワクチン学会学術集会(名古屋)、10/18-19, 2003.

15)山本三郎、山本十糸子、前山順一、後藤紀久、McMurray, D.N. BCG 経鼻免疫モルモットの抗結核作用と CpG DNA の免疫増強効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会(福岡)、12/8-10, 2003.

16)前山順一、井坂雅徳、安田陽子、杤久保邦夫、山本三郎、後藤紀久. *B. brevis* で産生させた組換えコレラ毒素Bサブユニットの粘膜アジュバント効果. 第33回日本免疫学会総会・学術集会(福岡)、12/8-10, 2003.

17)布施 晃:医薬品等ウイルス安全性試験の具体的対応策. 日本 PDA 第 11 年会特別講演、平成 14 年 10 月, 東京

18) Atsuko Masumi, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 68 回日本インターフェロン、サイトカイン学会、北里大学、2003 年 7 月

19) Atsuko Masumi, Yoshio Yamakawa, Hidesuke Fukazawa, Keiko Ozato and Katsutoshi Komuro. Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 76 回日本生化学会、パシフィコ横浜 10 月

20) Atsuko Masumi and Katsutoshi Komuro Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation 第 26 回日本分子生物学会、神戸 12 月

21)岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子:免疫グロブリン製剤におけるパルボウイルス B19 の解析。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会、2003 年 10 月、京都市。

22)岡田義昭、梅森清子: MT-2 細胞の fractalkine に対する遊走性の解析。第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月、福岡

１４．国際協力室

室長　　石川　直子

概　　要

国際協力室は、設置後6年目を迎え、国立感染症研究所の所掌事務に係る国際的な調査及び研究の調整を行っている。具体的には、外務省・JICA・JICWELS等から厚生労働省、国立国際医療センター等を通じて依頼される開発途上国等に対する技術協力（外国人研修員の受け入れを含む）の調整、WHO・WPRO等の国際機関及び外国政府機関等との協力（保健大臣等要人の受け入れを含む）の調整、その他、国立感染症研究所の所掌事務に係る国際的な調整を実施している。

近年の国際交流の進展にともない、世界的に公衆衛生上の大きな脅威となるような新興・再興感染症が、地球上のあらゆる地域から、短期間のうちに国内へ侵入する可能性が高まっている。21世紀最初の重篤な新興感染症であるSARSを始め、米国等で流行中のウエストナイル熱、アジアの各国で流行し、ヒトへの感染例が増加している鳥インフルエンザH5N1など、例にいとまがない。このような状況においては、世界規模での情報収集、研究・技術面での国際貢献等、諸外国の研究機関との国際協力の推進が重要になっている。

Ⅰ　開発途上国等に対する技術協力についての調整

開発途上国等に対する技術協力については、外国人研修生の受け入れと、国立感染症研究所からの専門家の派遣の調整が中心である。外国人研修生の受け入れについては、平成9年4月から、平成16年3月までに、延べ374カ国から1212名の外国人研修生を受け入れた。尚、平成15年度の実績ついては別表1のとおりである。また、国立感染症研究所からの専門家の派遣については、平成9年4月から、平成16年3月までに、25カ国へ181名の専門家を派遣した（別表2）。

Ⅱ　国際機関及び外国政府機関等との協力についての調整

国際機関等との協力については、WHOとの協力が中心であるが、主な派遣は以下の通りである。

1）平成 15 年 2 月　中国で発生したH5N1型インフルエンザについてウイルス第三部から1名を派遣

2）平成 15 年 7 月　シンガポール、フィリピンへSARS研究に係る共同研究の構築ための調査及びウイルス、患者検体確保のため、ウイルス第一部長、企画調整主幹を派遣

3）平成 15 年 7 月　台湾へ関係機関とSARS共同研究に関する調整、検体の供与等の必要な協力を得るためにウイルス第三部から1名と国際協力室長を派遣

4）平成 15 年 9 月　シンガポールでのSARSの実験室感染と思われるケース発生に伴いWPROの要請により調査実施のためバイオセーフティ管理室長を派遣

5）平成 15 年 11 月　財団法人交流協会と亜東関係協会間で「重症急性呼吸器症候群（SARS）等共同研究に関する覚書」締結。交流協会より感染症研究所に「SARS及び大規模かつ重篤な新興・再興感染症に関する日台共同研究」についた協力要請

6）平成 16 年 2 月　平成 15 年 12 月に発生した台湾における実験室内SARS感染に伴い、台湾行政院衛生署疾病管制局からの要請により国内基準作成のための助言とバイオセーフティ指導のためバイオセーフティ管理室長を派遣

Ⅲ　その他の国立感染症研究所の所掌事務に係る国際的な調整

国立感染症研究所の所掌事務に係る国際的な調整としては、二国間科学技術協力協定に基づく協力プロジェクト、実地疫学専門家養成コースに係る調整、厚生労働省・JICA・国立保健医療科学院・国立国際医療センター・国立感染症研究所の国際協力連絡・調整等がある。

国 際 協 力 室

別表１

平 成 １ ５ 年 度　　外 国 人 研 修 員 等 国 別 受 入 数

国　　名　　等	人　　数（人）	国　　名　　等	人　　数（人）
アジア地域[１９国]			
アフガニスタン	３	ベナン	３
インド	７	南アフリカ	４
インドネシア	２	モーリシャス	１
韓国	３	モザンビーク	２
カンボジア	２	レソト	１
スリランカ	３		
タイ	１２	**アメリカ地域[１２国]**	
台湾	１８	アルゼンチン	２
中国	１９	ウルグアイ	２
ネパール	２	エルサルバドル	２
パキスタン	２	ジャマイカ	１
バングラディシュ	５	チリ	２
フィリピン	３	ドミニカ共和国	１
ベトナム	１４	ハイチ	１
香港	１０	パラグアイ	１
マレーシア	７	ペルー	２
ミャンマー	１	ボリビア	１
モンゴル	２	ホンジュラス	１
ラオス	１	メキシコ	３
		オセアニア地域[３国]	
アフリカ地域[２１国]		トンガ	１
アルジェリア	１	パプア・ニューギニア	１
ウガンダ	１	フィジー	１
エチオピア	３		
エリトリア	１	**ヨーロッパ地域[５国]**	
ガーナ	２	イギリス	１
ガボン	２	ウズベキスタン	２
ケニア	４	ラトビア	１
ザンビア	７	リトアニア	１
ジンバブエ	１	ルーマニア	１
スワジランド	１		
セネガル	２		
タンザニア	７		
トーゴ	１		
ナイジェリア	８		
ナミビア	２		
ニジェール	２		
		国　　数　　計	６１
		人　　数　　計	２００

国際協力室

平成１５年度　外国人研修生等受入れについて

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
15.5.6 ～6.6	マレーシア	Shamsul　Azhar	感染症研究者	感染症情報ｾﾝﾀｰ	地理情報ｼｽﾃﾑを用いた感染症ﾏｯﾋﾟﾝｸﾞﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ （ＷＰＲＯ）
15.5.6 ～12.12	ｲﾝﾄﾞﾈｼｱ マレーシア ミャンマー タイ ベトナム	Ratna　WAHYUNI Zainuri CHAN Lee Chin THAN LWIN HTUN Sirirat KAWSIRIUDOM PHAM Bang Dang	研究者 医療専門家 健康省 医師 医師	ﾊﾝｾﾝ病研究ｾﾝﾀｰ	ﾊﾝｾﾝ病の治療及び予防の実践 （ＪＩＣＡ）
15.5.9	ウガンダ	ﾊﾌｻ･ﾙｸﾜﾀ	メディカル・オフィサー	感染症情報ｾﾝﾀｰ	熱帯医学研修 （長崎大学熱帯医学研究所）
15.5.19 ～6.6	フィリピン	Felipe Ulep.Jr	細菌学者	血液・安全性研究部 ウイルス第一部 ウイルス第二部 ウイルス第三部 感染病理部 細菌第二部	ﾜｸﾁﾝの品質保証及びGMP （国際厚生事業団）
15.5.23	マレーシア	Sharifah Binti SYED HASSAN	獣医学研究所副所長	ウイルス第一部	JICAﾏﾚｰｼｱ国「疫学」研修 （ＪＩＣＡ）
15.6.9 ～11.7	ガーナ	ﾆｺﾗｽ・ｲｽﾗｴﾙ･ﾆｰ･ﾄﾚﾋﾞ	野口記念医学研究所	感染病理部	ガーナ野口記念医学研究所感染症対策「HIVの分子生物学的解析」研修 （ＪＩＣＡ）
15.6.26	ｱﾌｶﾞﾆｽﾀﾝ ベナン ﾄﾞﾐﾆｶ共和国 エチオピア ガーナ レソト ナミビア ニジェール ナイジェリア パキスタン	SAYED Mohammad　Aninata RIBIERE Albertine Aninata Moore VERAS Arelis Aregahegne Windimu MINDAYE KWASHIE Samuel Tetteh Ella Mealelloang RAMATLA Roselina J.DE WEE DJIBO Ali ANIBUEZ Michael Ejike Rajwal KHAN	EPIﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ　担当官等	ウイルス第二部	ﾜｸﾁﾝ予防可能疾患の根絶ｾﾐﾅｰ （国際保健医療交流センター）

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
15.7.1	ベナン ラトヴィア リトアニア モーリシャス ペルー ルーマニア 南アフリカ ウルグアイ タンザニア ケニア タンザニア ザンビア	ﾌﾗﾝﾃｨﾝ･ｼﾞｬﾝﾏﾘｰ･ﾍﾇﾎ･ｽﾞﾇｰ ﾘﾅﾙｽﾞ･ﾑｯﾂｨﾝｽﾞ ｲｴﾘｬﾅ・ｸﾘｸ ﾅｰﾀﾞｳ･ｼﾞｬｲﾎﾞｰﾙ ﾙｰﾍﾞﾝ･ﾏﾙｼｱﾙ･ﾌﾙｶ･ｷｽﾍﾟ ｸﾘｽﾃｨｱﾝ･ﾆｺﾗｴ･ｸﾙﾁｭ ﾗｯｷｰ･ﾏﾝﾗ･ﾁｬﾜﾈ ﾀﾞﾘｵ･ﾊﾞｼﾞｪﾎ･ｺﾞﾝｻﾞﾚｽ ｺﾞｯﾄﾞﾌﾚｲ･ｼﾞｬｽﾃｨﾝ･ﾊﾞﾛｽﾞｨ･ﾑﾃｨ ｻｲﾓﾝ･ｸﾝｸﾞ･ｷﾏｰﾆ ﾚｲ･ﾑﾘｼｮ･ﾏｽﾓ ﾋﾁｬﾝﾌﾞﾜ･ﾋｶｰﾊﾞ	保健省企画局 保健省次官 健康省健康保健基金次長 保健省主席医務官 国立病院管理課管理補佐 保健省医療援助ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ局 保健省病院再建ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄﾏﾈｰｼﾞｬｰ 国立病院老人ｾﾝﾀｰｱﾄﾞﾊﾞｲｻﾞｰ ﾓﾛｺﾞﾛ郡医務官 公衆衛生学講師 歯科医師 上級医務官	感染症情報ｾﾝﾀｰ	公衆衛生行政管理研修 （国立保健医療科学院）
15.7.15	パキスタン	Rajwal　Khan	EPIｱｼｽﾀﾝﾄ･ﾃﾞｨﾚｸﾀｰ	感染症情報ｾﾝﾀｰ	ﾊﾟｷｽﾀﾝ予防接種拡大ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ「ﾜｸﾁﾝによる疾患予防対策」（ＪＩＣＡ）
15.7.17	ボリビア チリ ケニア ナイジェリア ペルー セネガル スリランカ タイ トンガ ザンビア	Nilsen Ruth Cortez David Oscar Cuitino Garrido Tonnie Kituku Mulli Balarabe Auwalu Sani Sally Candia Fernandez Alioune Faye H.N.S.Soysa Narumanas Korwanich Susitina Fatima Piukala Lilian Chambisha Kabwe	ﾎﾞﾛｰﾆｬ医療ｾﾝﾀｰ ﾏｶﾞﾔﾈｽ医療ｻｰﾋﾞｽ歯科計画局 ナイロビ大学 ｱﾐﾇ･ｶﾉ大学付属病院 ｶｲｪﾀﾉ･ｴﾚﾃﾞｨｱ大学 保健予防省 ﾍﾟﾗﾃﾞﾆｱ大学 ﾁｪﾝﾏｲ大学 保健省 ﾝﾄﾞﾗ地区保険局	国際協力室 ﾊﾞｲｵｾｰﾌﾃｨ管理室	九州大学歯学教育研修ｺｰｽ （九州大学）
15.7.23	台湾	江英隆 黄焜璋 陳國東 呉炳輝 郭宏偉 陳主慈 星淑玲	行政院衛生署 行政院衛生署 行政院衛生署 行政院衛生署 行政院衛生署 行政院衛生署 通訳・薬剤師	副所長 ウイルス第一部	第１類日本感染症医療機関の考察 （東亜科学技術協力協会）
15.7.23 ～7.25	ベトナム	DO Trung Hung DO Quan Ha LAI Kim Anh BUI Khanh Toan LIONG Thu Tram TRAN Man Chu NGUYEN Anh Tuan PHAM Liem BUI Thi Mai An NGUYEN Van Dung	法律専門官 臨床疫学研究者 エイズ制御・防御委員会委員長 ニャチャンパスツール研究所研 ウイルス学者 医師 衛生・疫学研究所研究員 ラオカイ県予防医学センター所 血液学・輸血研究所部長 医師	エイズ研究ｾﾝﾀｰ	ﾍﾞﾄﾅﾑｴｲｽﾞ対策技術研修ｺｰｽ（BMSA）
15.7.24	フィリピン	Luz N.Pagaran	食品医薬品局	細菌第二部	JICAﾌｨﾘﾋﾟﾝ薬局方策定ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ （国立医薬品食品衛生研究所大阪支所）
15.8.21	ｳｽﾞﾍﾞｷｽﾀﾝ	Sharapov Nodirkhon Khashimov Bakhtier Arifgjanovich	保健省	副所長 国際協力室	ｳｽﾞﾍﾞｷｽﾀﾝ国保健医療ｼｽﾃﾑ改善計画調査ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ （ＪＩＣＡ）

国際協力室

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
15.9.1 ～11.27	タイ	Ratigorn Guntapong	公衆衛生省	ウイルス第二部	ｶﾘｼｳｲﾙｽ、ﾉｰｳｫｰｸｳｲﾙｽ等の検出法 （ＪＩＣＡ）
15.9.8	イギリス	Jamie Abdennadher	医師	感染症情報ｾﾝﾀｰ	感染症臨床研修 （国立国際医療センター）
15.9.16	ナイジェリア	Ngozi Nhanerih Fati Abbasidi Jaja Ayo Igbiroba Ogieva	保健省	感染症情報ｾﾝﾀｰ ｴｲｽﾞ研究ｾﾝﾀｰ	JICAナイジェリア感染症予防対策研修コース （北海道大学）
15.9.17 ～9.19	ベトナム	Nguyen Zuan Tung	国立医療生物学的製剤品質管理センター	細菌第二部	ＧＭＰ／検査品質ｼｽﾃﾑ （ＷＰＲＯ）
15.9.18 ～10.6	台湾	紀長文	行政院衛生署	細菌第二部	DPTﾜｸﾁﾝ効果などの研究 （厚生労働省 国際課）
15.9.29 ～10.1	ガボン	Sophie Bipolo	厚生省下痢性疾患対策プログラム長	ウイルス第一部 感染症情報ｾﾝﾀｰ	熱帯医学研究ｺｰｽ （長崎大学熱帯医学研究所）
15.10.14	インドネシア ケニア マレーシア マレーシア	Tri Utomo James Icika Elliza Matnor Puvanesvari Kuppusamy	環境省 水資源管理・開発省 科学・技術・環境省 保健省	細菌第一部	JICA衛生・環境分析技術者Ⅱ研修 （沖縄県衛生環境研究所）
15.10.21	中国	Chen　Jie Dai　Tao Wang　Chen Wu Pengna Lu Baokai	国家発展・改革委員会 中国医科学院執務室 文化部対外文化連絡局 衛生部統計情報センター 山東省出入国検査検疫局	感染症情報ｾﾝﾀｰ	日本の防疫体制及び感染研の役割 （国際善隣協会）
15.10.27 ～12.5	エリトリア フィジー ガボン パプア・ ニューギニア スワジランド タンザニア タンザニア タイ ザンビア ザンビア	Gebregergis Tweolde Mere Sigavere　Cama Keba Stoelle Patricia Anthony Kini Edna Gugu Andrade Grace Bernard Mlingi Epafra Oshorael Anga Kunnika Jeamjeranun Leonald Bizile Bima Chrisitine Mwamba	保健省 保健省 AIDS対策国家計画 国立HIV/AIDSリサーチ研究所 研究者 ﾑﾋﾝﾋﾞﾘ国立病院 保健省 医学者 病院管理指導大学 保健省	ｴｲｽﾞ研究ｾﾝﾀｰ	HIV感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術 （ＪＩＣＡ）
15.11.4 ～11.27	タイ	Benjama Sae-lim	公衆衛生省	動物管理室 血液安全性研究部	ﾜｸﾁﾝ動物接種試験 （ＪＩＣＡ）
15.11.4 ～12.3	韓国	Kisoon Kim	国立衛生研究所研究員	ウイルス第二部 感染病理部 遺伝子解析室	ﾋﾄﾊﾟﾋﾟﾛﾏｳｲﾙｽ感染症のｻｰﾍﾞｲﾗﾝｽと制御に係る解析 （ＷＰＲＯ）
15.11.5	アルゼンチン メキシコ ナイジェリア タイ	Maria Cecilia Copello Humberto Vazquez Rosemary Adaeze Uti Sakalin Trisiriwanich	国立医薬品研究所 国立公衆衛生研究所 国立食品・医薬品行政管理局 保健省	細菌第二部	平成15年度ﾜｸﾁﾝ品質管理技術ｺｰｽに係る施設見学 （阪大微生物研究所）

国際協力室

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
15.11.7	カンボジア カンボジア 中国 中国 インド インド 韓国 ラオス マレーシア マレーシア モンゴル フィリピン スリランカ タイ タイ ベトナム 日本 日本	レン　ベン　セ エン　クン　ブス 陶小潤 蘇　斌 ニディ　ミシュラ サングルナ 柳　勝哲 ラサミ　シパン ナリマ　イブラヒム ロハニ　イスマイル ジャンサン　ハムスレン レティシア　パラケイ ドン　アジット　カラウィタ サオワニー　サオワクン スダニー　ブラナベンジャサティアン トン　タッ　タン 長井　圭子 森　あい子	保健省 保健省 山東省疾病預防控制御中心 安徽省疾病預防控制中心 ﾏﾃﾞｨﾔ･ﾌﾟﾗﾃﾞｨｼｭ州ｴｲｽﾞ対策協会 ﾐｼﾞﾗﾝ州長老派教会ｴｲｽﾞ対策室 韓国エイズ退治連盟 ﾁｬﾝﾊﾟｻｯｸ県保健部 ﾌﾞﾙﾘｽ州保健部 ｹﾀﾞ州保健部 ｴｲｽﾞ世界基金支援ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ ILOCOS保健開発ｾﾝﾀｰ 国立ｴｲｽﾞ性病対策ｱﾇｰﾗﾀﾞﾌﾟｰﾗ総合病院 ﾀｲ赤十字研究ｾﾝﾀｰ看護婦 ﾀｲ保健省ﾒｰﾁｬﾝ地域病院 ﾍﾞﾄﾅﾑ保健省 (株)ｺｰｴｲ総合研究所 筑波大学修士課程	感染症情報ｾﾝﾀｰ ｴｲｽﾞ研究ｾﾝﾀｰ 感染病理部 国際協力室	アジア地域エイズ専門家研修 （エイズ予防財団）
15.11.10	ﾊﾞﾝｸﾞﾗﾃﾞｨｼｭ ﾊﾞﾝｸﾞﾗﾃﾞｨｼｭ ﾊﾞﾝｸﾞﾗﾃﾞｨｼｭ ﾊﾞﾝｸﾞﾗﾃﾞｨｼｭ インド インド インド ネパール ネパール	Sha Badruddoza Akhtaruzzaman Chowdhury Shahjahan Kader Siddiky Tipu Sultan Gand Rajni Agarwal Shilpi Tawsik Sopai Jyotsna Shrestha Tribhuwan Prasad Rajbhandari	Rajshahi医大教授 大学講師 医師 助教授 微生物学者 助教授 病理学者 微生物学者 病理学者	感染症情報ｾﾝﾀｰ ｴｲｽﾞ研究ｾﾝﾀｰ	南ｱｼﾞｱ地域HIV/AIDS対策モデル （JICA大阪）
15.11.10	台湾	司　文儀 王　蓑峰 劉　家秀 謝　雅文 劉　清泉 巌　小梅 張　素眞 林　美燕 楊趙金緞	衛生署疾病管制局 衛生署疾病管制局 衛生署疾病管制局 衛生署疾病管制局 台南市立成大醫院 台南市衛生局 台南市衛生局 台南市議会 台南市政府	所長 副所長 ウイルス第三部 ﾊﾞｲｵｾｰﾌﾃｨ管理室 感染症情報ｾﾝﾀｰ	第一類日本感染症治療医院考察団
15.11.10 ～16.4.28	中国	祝　双利	中国疾病管理・予防センター主管医師	ウイルス第二部	平成15年度中国予防接種事業強化プロジェクト国別研修 （ＪＩＣＡ）
15.11.19	インド	Monoj Chakrabarti Sujit Bhattacharya	国立コレラ・腸炎研究所	細菌第一部 寄生動物 動物管理室	インド下痢症病理学コース （ＪＩＣＡ）
15.11.17 ～12.5	ベナン ハイチ メキシコ モザンビーク ナミビア ナイジェリア セネガル タンザニア トーゴ ザンビア	Zongo Mahamoud Myriam Auguste Daudier Carmen Salazar Perez Richard Nkurunziza Nkandi-Shiimi Helen Ibrahim Alhaji Umar Ndour Chikh Tidiane Ali Ali Salim Lawson Teyi Adem Chibwe Kennedy Allison	Seme Pdjiﾍﾙｽ･ｾﾝﾀｰ Gheskioｾﾝﾀｰ 保健大臣 Maput中央病院 Katatura州病院 NASCP地域ﾏﾈｰｼﾞｬｰ 伝染病病院 Mnazi Mmoja病院 伝染病学者 Gwembe地域保健委員会	筑波医学実験用霊長類センター	AIDS/ATLの疫学及び対策ｾﾐﾅｰ （国立熊本病院）

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
16.1.23	南アフリカ	Simon Moeketsi Modisenyane Anati Judith Canca Dhayalan Chetty	科学技術省 科学技術省 科学工業研究所	エイズ研究ｾﾝﾀｰ 国際協力室	南アフリカ共和国 専門家招へい （文部科学省）
16.1.30	香港	Chow Ka Wang Lu Chin Piu Tse Chau Shong Wong Hiu Man Koo Yin Ling Lam Tsz Ha Lau Kit Chi Li Ting Tam Lai Ching Chan Ka Man	香港教育学院	副所長 感染症情報ｾﾝﾀｰ 国際協力室	SARSからの教訓と日本から学ぶことに関する香港小中学生の訪問 （厚生労働省）
16.2.3 ～2.4	中国	Liang Xiaofeng Hu Shaowen Xie Xue-Hui Meng Lei	中国疾病予防制御ｾﾝﾀｰ 寧夏保健所 青海保健所 甘粛疾病予防制御ｾﾝﾀｰ	副所長 ｳｲﾙｽ第二部 ｳｲﾙｽ第三部 感染症情報ｾﾝﾀｰ	平成15年度中国予防接種事業強化ﾌﾟﾛｼﾞｪｸﾄ （厚生労働省）
16.2.5	ｱﾌｶﾞﾆｽﾀﾝ ｱﾌｶﾞﾆｽﾀﾝ ｴﾙｻﾙﾊﾞﾄﾞﾙ ｴﾙｻﾙﾊﾞﾄﾞﾙ ﾎﾝｼﾞｭﾗｽ タイ タイ ベトナム	Saida Ahmadi Rana Hamidi Jose Joaquin Viana Aguiluz Caballero Moran Violeta Josefina Yadira Yamilet Alvarez Moreno Niumsup Pannika Payaprom Yupares Tran Thi Phuong Thuy	Balkh provincial Non-Military Hospital Balkh provincial Non-Military Hospital Instituto Salvatoreno del Seguro Social Instituto Salvatoreno del Seguro Social Hospital Escuela Department of Microbiology and Parasitology Chiang Rai Hpspital Bach Maoi Hospital	感染症情報ｾﾝﾀｰ	感染症管理指導者養成研修 （国立国際医療ｾﾝﾀｰ）
16.2.16 ～3.5	アルジェリア ﾊﾞﾝｸﾞﾗﾃﾞｨｼｭ エチオピア エチオピア ケニヤ タンザニア タンザニア タイ ザンビア	Mohamed Seghier Ziaul Md.Islam Menberu Tedla Kifetew Tsion Bizuneh Firesenbet Joanne Auma Hassan Davis Sintobile Masapa Mwakagile Grace Peter Lugemwa Taveesak Pokaiyavanichkul Sheila Monde Mwangala	ﾊﾟｽﾂｰﾙ研究所ｱﾙｼﾞｪﾘｱ・ｴﾝﾃﾛｳｲﾙｽ研究室 公衆衛生研究所 エチオピア健康栄養研究所 エチオピア健康栄養研究所 ｹﾆｱ医学研究所 ﾑﾋﾑﾋﾞﾘ大学 ﾑﾋﾑﾋﾞﾘ国立病院 ｽﾘﾅｶﾘﾝｳｲﾛｯﾄ大学 大学付属病院	ウイルス第二部	地球規模ポリオ根絶のためのウイルス検査技術の質的向上（ＪＩＣＡ）
16.3.10	中国	高　星	中国予防疾病ｾﾝﾀｰ	ｳｲﾙｽ第三部	SARS・鳥ｲﾝﾌﾙｴﾝｻﾞについての見学 （産業医学総合研究所）
16.3.10	韓国	朴　寿天	大韓民国保健福祉部	所長 感染症情報ｾﾝﾀｰ 国際協力室	日本視察 （厚生労働省）

年月日	国籍	氏名	所属等	受入担当	研修名等（依頼元）
16.3.15	アルゼンチン チリ 中国 中国 モンゴル パラグアイ ウルグアイ	Patricia Marcela Muzulin Eric Manuel Diaz Guzman Wuliji Tegusi Jianning Xie Tsendeekhuu Naidansuren Zaanuud Lilian Maria Chena Varela Maria Teresa Armua Fernandez	国立研究所・保健施設運営機関 チリ厚生省 中国モンゴル・伝統医学病院 寧夏医科大学 P.Nｼｬｽﾃｨﾝ記念第三中央病院 保健福祉省 ｳﾙｸﾞｱｲ共和国大学	寄生動物部 感染症情報ｾﾝﾀｰ	エキノコックス症対策コース（北海道立衛生研究所）
16.3.18	ジャマイカ メキシコ モザンビーク ニジェール スリランカ タイ ザンビア ジンバブエ	Ivan Emmanuel Vickers Irma Eugenia Guardiola Munoz Rafael Joaquim Malam Bako Maman Slissou Wijitha Weerakoon Wantana Paveenkittiporn Wilfred Mweemba Muvwimi Chiedza Mudiwa	ｳｪｽﾄ･ｲﾝﾃﾞｨｰｽﾞ大学 ｺｱｳｲﾗ州立大学 ｴﾄﾞﾜﾙﾄﾞ･ﾓﾝﾄﾞﾚｰﾝ大学 ｺｰﾄｼﾞﾎﾞﾜｰﾙ保健医療技術養成学院 コロンボ大学 ﾁｭﾗﾛﾝｺﾝ大学 ザンビア大学 ジンバブエ大学	ウイルス第一部 細菌第一部	第５回薬剤耐性病原体の実験室診断 （国際保健医療交流ｾﾝﾀｰ）
16.3.24	台湾	周　志浩	行政院衛生署疾病管制局副局長	所長 副所長 ウイルス第一部 ﾊﾞｲｵｾｰﾌﾃｨ管理室 感染症情報ｾﾝﾀｰ	視察訪問 （交流協会）
16.3.25	中国	黎　毅敏 陳　栄昌 叶　広春 賴　克方	広州医学院第一附属病院 広州呼吸疾病研究所 広州医学院第一附属病院 広州呼吸疾病研究所	ウイルス第三部 ﾊﾞｲｵｾｰﾌﾃｨ管理室 感染症情報ｾﾝﾀｰ	中国重大感染症対策プロジェクト（国別研修）「院内感染防止対策」 （厚生労働省）

国 際 協 力 室

別表２

専門家海外派遣について

（単位：人）

派遣国	平成9年度	平成10年度	平成11年度	平成12年度	平成13年度	平成14年度	平成15年度
ガーナ	8	3	3		3	1	3
中国	7	5	3	1		2	8
インドネシア	2	1	1	1			
バングラディシュ	2						
タイ	2	5	7	8	１０	１０	8
ベトナム	2					2	2
カンボジア	2	1	1	1	2	1	1
フィリピン	1	3	3	3	1		1
エジプト	1	1	2	1		1	1
カメルーン			1				
セネガル			1				
象牙海岸			1				
エチオピア		1				1	1
ウガンダ		1					
タンザニア		1	1	1			
ラオス		2	1				
マレーシア		2	3	2			
トルコ			1	3	2	1	
インド			2	1			3
モンゴル			1	2		2	
フランス				1			
ミャンマー						1	
シンガポール							1
台湾							1
パキスタン							1
合　計	２７	２６	３２	２５	１８	２２	３１

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。遺伝子治療への応用を念頭にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの研究を進めた。また、臨床試験に使われるウイルスベクターの性能と安全性に関する情報を収集、解析した。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、多剤耐性を獲得したヒト免疫不全症ウイルス1型（HIV-1）の逆転写酵素変異体の解析も継続した。今年度は、異種移植に伴うドナー動物由来感染症の可能性に関する情報の収集を行い、厚生労働省によるガイドライン策定に寄与した。

遺伝子治療は、先天性遺伝病に対して根治療法になりうる。これまでに欧米及び我が国で行われた臨床試験では、重症複合免疫不全症に対して良好な治療効果が見られている。前臨床試験では、血友病や糖尿病の治療にも効果が示されている。先天性遺伝病の治療では、治療用遺伝子を長期間に渡って安定に発現させる技術が求められる。AAV ベクターは、患者への直接投与で細胞染色体に導入遺伝子を組み込むことができることから、長期発現に適したベクターとして開発が進められている。我々はAAVモデルベクターを作製し、カニクイサルに接種して体内動態、消長を調べている。また、新たに分離したAAV10、11型を利用して感染標的臓器の異なるAAVベクターの作製を進めている。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臨床応用では、ベクターの安全性確保が重要である。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、有効性に関する情報収集に努めた。

HPV 感染は子宮頸癌を中心に世界の女性の癌の 11%の原因とされている。HPV は、性行為等で生じた粘膜の微少なキズから侵入し、表皮基底層細胞（幹細胞）の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が基底層に留まる限り、HPV の増殖は起こらないが、感染細胞が最終分化を始めるとHPVゲノムの複製とHPV蛋白質の大規模な発現が起こり、子孫ウイルスが形成されて周辺に放出される。このようなHPV潜伏・持続感染の成立と維持を支える角化細胞の分化の機構を解析し、HPV を排除する方法を検討している。また、動物パピローマウイルスでは、感染成立をワクチンで予防できることが示されている。80以上のHPV遺伝子型のうち16、18型等の12種類の遺伝子型（高リスク群）が子宮頸癌の原因となることから、高リスク群HPVの感染防御免疫を誘導できる実用的なワクチン抗原の開発を進めている。

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。

重度の火傷の治療には、マウスの繊維芽由来の細胞をフィーダー細胞として患者の皮膚を培養し、患部に移植する医療が行われている。この培養皮膚はマウス由来細胞と直接接触することから、フィーダー細胞の種類と品質管理が重要となる。我が国で使われているフィーダー細胞を調べた。また、WHO主催の移植医療に関する会議に出席し、異種移植の規制に関する各国の状況を調べた。

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) AAV2型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、接種から長期間経過後のベクターの体内残留・分布の解析に重点を置いた。1頭あたり約10^{11}ゲノムコピーのEGFP-tubulin融合タンパク質発現AAV2型ベクターを計４頭のサルに静脈より接種した。150日後に解剖し、各臓器に存在するEGFP遺伝子をPCRによって増幅、検出した。ベクターゲノムは種々の臓器に認められた。特に各リンパ節、脾臓、肝臓（$>10^3$copy/10^5cells）に多く、扁桃、膵臓、腸管、腎臓、胆嚢、副腎、心臓、肺(10^2ー10^3copy/10^5cells)などに検出された。これまでに明らかにした接種90日後のベクター量に比べ、脾臓で1/10程度、リンパ節、肝臓では同程度のベクターが残存していることがわかった。この成績は、AAVベクターが種々の臓器に、さらに長期間にわたり存在し続けることを示しており、どのような細胞種に、どのような状態で存在して

いるのか、導入遺伝子の発現はあるのか、等を明らかにすることが今後の課題である。(森清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎[感染病理]、神田忠仁)。

(2) カニクイサル由来新規 AAV キャプシドを使用したベクターの解析

カニクイサルより新たに分離した AAV10 型、11 型のキャプシドを使った beta-gal 発現ベクターを作成し、それらの性質を調べた。AAV10 型、11 型ベクターはヒト、サル、マウス由来の培養細胞に遺伝子導入が可能であった。特に、マウス筋芽細胞では、2 型ベクターが分化した細胞に比べ未分化な細胞への遺伝子導入効率が高いのに対し、10 型、11 型ベクターは未分化な細胞より分化した細胞への遺伝子導入効率が高かった。マウス骨格筋へ直接ベクターを接種した場合、10 日後の beta-galactosidase 発現は AAV10 型が最も高く、次いで 11 型、2 型であった。マウス尾静脈からベクター接種後 6 週間目の体内分布を調べたところ、AAV2 型ベクターが主に肝臓、脾臓で検出されたのに対し、AAV10 型ベクターは肝臓、心臓、筋肉、肺、腎臓などで、11 型ベクターは筋肉、腎臓、脾臓、肺、心臓などで検出された。それぞれの型のキャプシド蛋白質に対する抗血清を用いて、中和抗体の交差性を調べた結果、AAV2 型、10 型、11 型の間に中和抗体の交差性は認められなかった。AAV10 型、11 型が現在ベクターとして使用されている 2 型とは臓器親和性、抗原性が異なることから、新たな遺伝子治療用ベクターとして有用であると考えられる。(森清一郎、神田忠仁)

2. 新たなウイルスベクターの開発に関する研究

(1) ウイルスベクターを用いた RNAi 誘導系の作製

U6 snRNA プロモーターを用いた short hairpin RNA (shRNA) 発現カセットをもつ AAV ベクター及びレンチウイルスベクターを作製し、培養細胞レベルでの各々のベクターの遺伝子導入様式の特徴及び遺伝子ノックダウン効率について検討した。AAV ベクターは分裂細胞への遺伝子導入は効率よく行えたものの、発現レベルは急速に低下した。これはエピソームとして存在するベクターゲノムが細胞分裂の際に失われるためと考えられた。また非分裂細胞への遺伝子導入は 3 週間程度ではほとんど認められず、非常に緩徐に進行するものと考えられた。一方レンチウイルスベクターは分裂細胞・非分裂細胞いずれへの遺伝子導入も効率よく行うことができ、遺伝子発現は継続していた。またノックダウン効率はいずれのベクターでも全般に高くはなかったが、ウイルスベクターを用いると導入遺伝子コピー数がより厳密に規定されることから、ウイルスベクターを用いた高効率なノックダウンには shRNA 発現カセット自体の最適化が必要であると考えられた。(竹内隆正、神田忠仁)。

(2) AAV 組み込み標的部位(AAVS1)に存在するインスレーターの解析。

導入遺伝子の長期発現を可能にするため、ウイルスベクターにインシュレーターを組み込む技術の開発を進めた。我々が見出した AAVS1 領域内のインシュレーターの解析を続け、DNaseI 高感受性部位を含む SmaI 断片内の 2 ケ所 (1ー90bp 及び 206bpー353bp) が、独立にインシュレーター活性を持つことがわかった。またβグロビンのインシュレーターとは異なり、AAVS1 インシュレーターは、細胞株によって異なる活性を持つことが分かった。この領域に結合する細胞蛋白質の探索を目指している。また、レトロウイルスベクターにこのインシュレーターを組み込む作業を行っている。 (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

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) HPV の後期プロモーター活性化機構に関する研究

角化細胞の分化に伴って発現が誘導される転写因子 C/EBPβが、16 型 HPV の後期プロモーターP670 の活性に及ぼす効果を検討した。C/EBPβ発現プラスミドを P670 のリポータープラスミドと共に HeLa 細胞に導入すると、10倍程度の P670 活性化が起こった。組み換え C/EBPβ蛋白質を用いたゲルシフト法によって、P670 配列中の C/EBPβ結合部位を三カ所同定した。その内の二カ所に C/EBPβが結合出来ない塩基置換を導入すると C/EBPβによる P670 の活性化が減弱した。C/EBPβは細胞内で P670 に直接結合し、その活性化を引き起こすことが示唆された。(柊元巌、神田忠仁)

(2) HPV16L1 蛋白質の発現抑制機構の解析

HPV16L1 遺伝子は通常の培養細胞で発現しない。最終分化の過程にある角化細胞でのみ発現する。この発現抑制と抑制解除の機構は、HPV の潜伏・持続感染に重要な役割を担っているらしい。これまでの解析で、全長約 1500bp の L1 遺伝子の 5'端から 500 塩基までの領域が、核内での mRNA の安定性を著しく損なうことがわかった。この領域を別の遺伝子の 5'領域につなぐと、やはり mRNA が検出できなくなり、核内での mRNA 分解を促進する機能が示された。この領域が mRNA の 5'端から 1000 塩基長以内に存在すると mRNA の分解がみられるが、5'端からの距離がそれ以上長くなると効果を失った。mRNA の 5'端に結合する細胞因子が、この領域を介す mRNA 分解活性に関わっている

と推定している。(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、複数の高リスク型HPVを中和できる抗体のエピトープ(L2-エピトープ)が存在する。L1 蛋白質のループ部分に 3 つの L2 エピトープを組み込んだキメラ L1 蛋白質を作った。野生型 L1 蛋白質で形成される粒子に比べやや大きいものの、安定で野生型粒子と同様に精製できた。粒子あたり 1080 個の L2-エピトープが存在することから、L2-エピトープに対する抗体を誘導するための優れたワクチン抗原となることが期待される。(近藤一成、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 亜株プロテアーゼの薬剤感受性予測

計算科学的手法を HIV-1 亜株プロテアーゼの薬剤感受性予測に適用した。統合計算化学システム MOE (カナダ CCG 社) を用い、ガーナ流行株 (HIV-1 CRF02AG) と欧米流行株 (HIV-1 subtype B) プロテアーゼのホモダイマーモデルを作製し、薬剤の結合親和性 (結合エネルギー、結合時の阻害剤の構造と配置) を評価した。AG プロテアーゼは B に比べ NFV 親和性が低下し、感受性低下が示唆された。一方 APV 親和性には亜株間で有為差は認められなかった。この予測は、ウイルスを用いた感受性試験の結果と一致した。(横山勝、佐藤裕徳、木ノ本正信[感染病理]、徳永研三[感染病理])

(2) HIV-1 逆転写酵素の結晶化条件検討

HIV-1 逆転写酵素の結晶化条件を検討した。大腸菌で発現したhis-tag付き酵素を、親和性クロマトグラフィー、ゲルろ過、およびハイドロキシアパタイトカラムを用いて高度精製し(クマシー染色純度 95%, 比活性 $>10^5$ unit / mg protein)、動的光散乱装置を用いて酵素の分散状態を検討した後、種々の結晶化条件 (沈澱剤、緩衝液、塩、蛋白質の濃度、温度) を検討した。その結果、単分散状態の活性型ヘテロダイマー酵素精製標品を得た。これを用い、結晶化に適する非晶質 (amorphous) と非沈澱 (clear) の境界条件を絞り込んだ。(横山勝、守宏美、中村浩美、佐藤裕徳)

(3) HIV-1 中和逃避機構の研究

以前の結果 (*J. Virol.* 73: 3551-59, 1999., 74: 1069-78, 2000) をもとに、HIV-1 の未知の V3 抗体逃避機構の存在について検討した。CRF01__AE 感染者血漿１５種について、１) CRF01__AE R5 株および X4 株の V3 を代表する９種の V3 ペプチド配列に対する結合抗体の有無、２) それらの V3 を有する HIV-1 V3 組み換え体２５クローンに対する中和能を調べた。X4V3 結合抗体は約 1/3 の血漿に認められ、結合抗体が存在すると当該 V3 をもつ X4 ウイルスを中和した。一方、R5V3 結合抗体は全ての血漿中に検出されたが、R5 ウイルス中和能は無い、または低かった。R5 株 V3 は、抗体産生のよいエピトープとなるが、産生された抗体に抵抗性である。R5 ウイルスには、エピトープ変異以外の V3 抗体逃避機構 (エピトープマスキング) があると考えられる。(長縄聡[横浜市立大学医]、富田康浩、北村勝彦[横浜市立大学医]、佐藤裕徳)

IV. 培養皮膚の作製に使われるフィーダー細胞に関する研究

ヒト上皮系細胞を移植のために体外培養する際にフィーダー細胞として用いられる 3T3 (Swiss albino) 細胞、及び、名称上混同のおそれがある NIH3T3 細胞及び Balb3T3 細胞を、ATCC、厚生労働省細胞バンク、理研バイオリソースセンターなどから入手し、DNA フィンガープリンティングにより異同を調べた。「3T3」細胞をマウスの系統毎に区別することが可能であった。市販の「3T3」細胞間での名称の混同は見られなかった。しかしながら分与元によっては微妙に異なるパターンを示す細胞もあり、経代中に出現した変異クローンに置き換わった可能性が考えられた。細胞バンクから入手した細胞であってもその性質は固定されたものではなく、臨床使用では厳密な安全性が要求されることから、品質管理の徹底が求められる。(竹内隆正、王麓那、神田忠仁)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Kawana , K., Yasugi, T., Kanda, T., Onda, N., Oda, K., Okada, S., Kawana, Y., Nei, T., Takada, T., Toyoshima, S., Tsuchiya, A., Kondo, K., Yoshikawa, H., Tsutsumi, O, and Taketani, Y. : Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. Vaccine, 21:4256-4260, 2003.

2) Ogata, T., Kozuka, T., and Kanda, T.: Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA. J. Virol. 77: 9000-9007, 2003.

3) Kawana , K., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Kawana, Y., Matsumoto, K., Nakagawa, S., Onda, T., Kikuchi, A., Fujii, T., Kanda, T., and Taketani, Y. : Evidence for the presence of neutralizing antibodies against human papillomavirus type 6 in infants born to mothers with condyloma acuminata. American J. Perinatology, 20:11-15, 2003.

4) Enomoto, K., Enomoto, Y., Ishii, Y., Araie, M., and Kanda, T.: Genes up- or down-regulated by expression of keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a. BBRC, 303:580-585, 2003.

5) Kukimoto, I., Elderkin, S., Grimaldi, M., Oelgeschlage, r T., and Varga-Weisz, P. D.: The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF. Mol. Cell, 13: 265-77, 2004.

6) 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-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Arch Virol. 148:973-988,2003.
7) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. Virology. 313(1): 8-12,2003.

2. 和文発表
1) 森 清一郎、神田忠仁:遺伝子治療に用いられるウイルスベクター。臨床とウイルス、31 巻第 1 号、p3-12、2003 年。

II. 学会発表

1. 国際学会
1) Pumpradit W., Tomita Y., Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Sato H, Sawanpanyalert P. Neutralization Pattern of Plasma from HIV-1 Infected Thai Individuals against CRF01_AE (clade E) Cloned HIV-1s Using Simple, Rapid, and Sensitive Plaque Neutralizing Antibody Assay . "Thai infectious disease society meeting" Hua-Hin beach, Thailand, 4-7 October, 2003.

2. 国内学会
1) Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Ono, F., Sata, T., and Kanda,T.: Systemic administration of recombinant AAV-2 vectors in cynomolgus monkeys:organ-tropism and expression of transgene. 第 9 回日本遺伝子治療学会 (2003 年 7 月、東京)
2)神田忠仁、川名 敬、尾崎さおり、榎本 裕:HPV がんの攻略。第 62 回日本癌学会総会 (2003 年 10 月、名古屋)
3)神田忠仁、森 清一郎、竹内隆正、佐多徹太郎: アデノ随伴ウイルスベクターの体内動態。第 51 回日本ウイルス学会。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 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)
4)佐藤裕徳、富田宏美、横山勝:HIV-1 逆転写酵素のアロステリック調節機構の進化。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)
5) 久保嘉直、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹:CD4-independent HIV-1 感染に対する cyclodextrin の阻害効果。第 51 回日本ウイルス学会総会 (2003 年 10 月、京都)
6)Kukimoto, I., Grimaldi, M., and Varga-Weisz, P.D.:The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding mediated by ACF. 第 76 回日本生化学会年会 (2003 年 10 月、横浜)
7)松田昌和、千葉智子、佐藤裕徳、巌馬華、Lay Mint、柿沢淳子、濱武牧子、植田知幸、西澤雅子、杉浦亙:相同組み換えを用いた CRF01__AE 薬剤感受性の解析。第 16 回日本エイズ学会総会 (2003 年 11 月、神戸)
8)横山勝、富田宏美、佐藤裕徳:HIV-1 逆転写酵素の核酸選択性制御と薬剤耐性の機構。第 16 回日本エイズ学会総会 (2003 年 11 月、神戸)
9)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 insulator。分子生物学会 (2003 年 12 月、神戸)

１６.遺伝子資源室

室　長　　橋　本　雄　之

概　　要

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、精巣から70,000以上のcDNAクローンを分離し、5'末端配列を決定してきた。 その５’端配列を元に、ヒト参照遺伝子配列に対して、ホモロジー検索を行ったところ、45,000クローンがヒト参照遺伝子(RefSeq)の 8,200種に対応した。一方、23,000のクラスターの代表クローンの全長配列を決めることを台湾アカデミアシニカのグループと共同で進め、脳由来約5,000、精巣由来約2,200の全長配列を決定した。

また、チンパンジーの完全長cDNAライブラリーを作製し、約１.5万クローンから得られた5'端配列から、3,771種のヒト既知mRNAに対応する配列が得られた。5'端配列のうち１遺伝子につき複数のクローンが得られた226種の遺伝子について、コンセンサス配列を決定することにより、ヒトとの配列一致度を比較したところ、5'-cDNA全体は99.30%、5'-UTR領域は98.79%、CDS領域は99.42%、アミノ酸は99.44%の値が得られた。この解析過程で、塩基の挿入・欠失（indel)に注目したところ、indelはCDSより5'-UTRで約13倍多く起こっており、これを考慮するとヒトとの配列の違いは、置換率のみの場合より5'-cDNA全体で1.4倍大きくなることが明らかとなった。カニクイザル配列の解析の結果と比較すると、5'-cDNA全体でカニクイザルはチンパンジーの4倍塩基置換が起こっていることなどが示された。

（独）医薬基盤研究所への移行を控え、研究資源供給部門遺伝子バンクの任務、その遂行に関する基本的考え方 をまとめた。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った。この成果はDNA解析技術（オートシークエンサーとコンピュータ処理能力）の飛躍的発展と良質の研究材料（BACクローン）によるものといえる。こうした先導的DNA研究に資する材料として、現段階ではゲノム情報に基づく網羅的遺伝子機能解明のために、分離した完全長cDNAクローンとその配列情報が求められている。このように、DNA研究材料の需要は研究の進展に伴って変遷するので、それに対応する資源を開発・収集し、供給できるバンクの構築にはオール日本として統一した、相当規模の資金と体制が必要となる。そうしたことが望めない現状においては厚生労働省傘下の遺伝子バンクとしては、ヒトゲノム解析プロジェクトの進展にともない、疾病に関係する遺伝子の単離も進み、その構造異常と病気の発生との関係が調べられ、ＤＮＡ解析による疾病診断も可能となってきたことに鑑み、一般的なライフサイエンスの振興ではなく、ヒトの疾病克服のために特化し、とりわけ、医薬品の開発に寄与する遺伝子DNA資源を開発・収集して、内外の研究者、研究機関の要望に応える安定した体制を確立することをめざすこととする。そのためには本来、供給部門も一体化した体制が必要と考えるが、歴史的経過をふまえて、それに近づけるシステムづくりを図ることとする。

(通常経費以外に交付された研究費)
厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服事業、「難治性血管炎に伴う多臓器不全に係わる病態の解明および治療法の開発に関する研究」　分担（亀岡）
厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業)「サル完全長 cDNA の配列決定とヒト遺伝子との比較解析および配列情報に基づく cDNA アレイ作製と応用に関する研究　」主任、橋本

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 の７組織（頭頂葉、側頭葉, 前頭葉、後頭葉、脳幹、小脳皮質、延髄）および精巣から、オリゴキャップ法により完全長 cDNA に富むライブラリーを作製し、cDNA クローン各々 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 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）チンパンジーの完全長cDNAライブラリーを作製し、約15,000クローンから得られた5'端配列について、3,771種のヒト既知mRNAに対応する配列が得られたが、これらのクローンをバンクに登録する準備を行った。
[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．カニクイザル完全長cDNAの配列決定とヒトオルソログとの比較解析

これまでに分離した約７万クローンについて、その５’端配列をもとに、ヒト参照(RefSeq）遺伝子配列に対して、ホモロジー検索を行ったところ、4,5000 クローンがヒト参照遺伝子(RefSeq）の 8,200 種に対応した。一方、23,000 のクラスターの代表クローンの全長配列決定を台湾アカデミアシニカのグループと共同で進め、脳由来約 5,000、精巣由来約 2,200 の全長配列を決定し、公共データベースに登録した。

こうしたヒト遺伝子配列と相同性のあるクローンについて、ORF がほぼ一致する精巣由来クローン 588 ペアについて、塩基置換率を求めたところ、同義置換座位及び非同義置換座位における塩基置換率(Ks 及び Ka）は 5.70%および 1.55%であった。コード領域全体の塩基置換率は 2.54%であり、アミノ酸配列の置換率は 2.78%であった。いづれもチンパンジーのヒト 226 遺伝子に対する値に比べると 4-5 倍高い置換率を示した。
[橋本雄之、楠田潤、田沼玲子、平田誠、平井百樹(東大院・新領域)]

3. カニクイザル神経疾患遺伝子ホモログの転写変異体の収集と解析

カニクイザル脳で発現している神経疾患関連遺伝子ホモログの転写変異体を採集し、ヒト相同遺伝子のものと比較した。75種類のカニクイザルの神経疾患遺伝子ホモログに重複する251クローンについて挿入配列全長を解読したところ、181配列(72%)は完全なORFをコードしており、50配列(20%)はスプライシングの異常によると思われる欠失や挿入を含むことが分かった。なかでも33配列は公的データベース中には該当する配列がみつからず、新規のスプライス変異体である可能性が示唆された。このようなスプライス変異体は霊長類のヒト化に伴う脳機能の精緻化や神経疾患の発症との関連性を明らかにする手がかりになるものと思われる。
[楠田　潤、田沼玲子、平田　誠 長田直樹（シカゴ大)、、橋本雄之]

4.　神経疾患遺伝子の霊長類ホモログに関する研究

神経疾患の原因遺伝子がどのように進化してきたかを知るため、345 種類のヒト神経疾患遺伝子に相同性のあるカニクイザル遺伝子 72 種と、チンパンジー遺伝子 184 種を収集し、相互に比較解析した。遺伝性血管浮腫の原因遺伝子 C1 esterase inhibitor(C1INH)はヒトゲノム上にイントロンを含むものが１コピーしか存在しないのに対し、チンパンジーゲノムにはさらにもうひとつ相同性の高い遺伝子のあることがわかった。この遺伝子にはイントロンがなく、プロセスされた Retropositional
遺伝子であることが予想され、また ORF も完全に保存されているので、発現されれば inhibitor として機能する可能性が高く、炎症の抑制等に関係することが示唆された。
[楠田　潤、田沼玲子、平田　誠、平井百樹（東大院、新領域)、橋本雄之]

5. ヘテロクロマチンタンパク（HP1）と interaction するタンパク及びRNA

染色体のヘテロクロマチン化には、RNAが重要な役割を担っていることが知られている。 HP1αタンパクは、クロモドメイン、クロモシャドウドメインと、それを繋ぐヒンジ部分の３つのドメインで構成されている。
X染色体不活化も、クロマチンがヘテロクロマチン化する現象であり、Xist“ RNA ”が重要な役割を担っている。
そこで、この“ RNA ”とHP1αとの関係を調べると、
HP1αのヒンジ部分に、“ RNA ”が結合することが、認められた。　ただし、この結合は、Total RNAで、かな

り阻害されるので、特異性は低いと考えられる。 また、このヒンジ部分には、X染色体不活化に関与するmacroH2Aタンパクとも結合することが判明した。

このことより、X染色体不活化におけるヘテロクロマチン化においても、HP1αタンパクは、何らかの関与をしているのではないかと思われる。

[高橋　一朗、橋本　雄之]

6. SARSの診断及び手法に関する緊急調査研究――ゲノム疫学

SARSウイルスの遺伝子配列の確認及び、遺伝子変異の検出について、クローニングされた、S，M，N，E各遺伝子DNA及び、RT-PCR 反応によって生成されたds RNAについて、DNAシークエンシングを担当した。

[高橋　一朗、亀岡　洋祐、森川　茂1、山田　靖子2、橋本　雄之 1:ウイルス1部、2:動物管理室]

7. MPO欠損患者からの新規MPO遺伝子変異の検出

マロリーワイズ症候群により来院した患者の血液像解析から、好中球MPOの完全欠損（TypeⅠ）であることを見出した。患者好中球画分からのMPO放出測定ではMPO活性は検出されず、完全欠損を確認した。好中球画分を用いたウエスタンブロット解析ではMPOペプチドを検出できなかった。単球画分のmRNAよりMPO転写産物の検出を行ったところ正常鎖長のMPOcDNAを検出した。このcDNAの塩基配列を解析から３点の突然変異を見出し、その一方はアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であった。リーダーペプチドとの切断点から11残基に位置することから、MPOタンパク成熟過程に影響を与え、MPO欠損症を引き起こしているものと考えられた。

[亀岡洋祐、橋本雄之；鈴木和男（生物活性物質部）；Amanda Persad（フロリダ病院）；池田文恵、仁保善之（千早病院）]

8. 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]

９．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

(1)　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、１０Gy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４０Gy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、ギムザ染色標本の染色体断片数を計測する方法により４０Gyまでの被曝線量を簡単で迅速に推定するプロトコルを開発した。

(2)　前述したギムザ染色標本の染色体断片数を計測する方法により４０Gyまでの被曝線量を簡単で迅速に推定するプロトコルに更に改良を加え、ギムザ染色した染色体断片の最長/最短の比が被曝線量に相関していることに注目し、被曝線量を簡単で迅速に推定するプロトコルの開発を行っている。

[後藤　英介]

10.　放射線によるDNA損傷と、その修復におけるDNA-PKとATM蛋白の役割の解析

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。またATM蛋白は放射線高感受性を示す遺伝性疾患-毛細血管拡張性歩行失調症の原因遺伝子とされていて放射線によるDNA損傷修復に関わっているとされるがその詳細な機能は不明である。ATM欠損株と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]

発表業績一覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧 文 発 表

1) Sakate R.,Hida, M.,Sugano,S.,Hayasaka,I.,Shimohira, N.,Yanagi,S.,Suto,Y.,Osada,N.,Hashimoto,K,Hirai,M.:
Analysis of5'-endsequencesofchimpanzee cDNAs
GenomeResearch13:1022-1026,2003.

2)Iwashita,S.,Osada,N.,Itoh,T.,Sezaki,M., Oshima,K.,Hashimoto,E.,Kitagawa,Y.,Takahashi,I.,Masui,T., Hashimoto,K., andMakalowski,W.:
A transposable element-mediated gene divergence that directly produces a novel type protein including the endonuclease domain of RTE-1: gene duplication of bovine *bcnt*
Mol. Biol. Evol.20(9):1556-1563,2003.

3) Felix M. Mesak, F.M. , Osada, N., Hashimoto, K., Liu, Q.Y. and Ng,C.E.:
Molecular cloning, genomic characterization and over-expression of a novel gene, XRRA1,identified from human colorectal cnacer cell HCT116^{clone2_XRR} and macaquetestis
BMCGenomics4:32.,2003.

4) Arai M, Yokosuka O, Chiba T, Imazeki F, Kato M, Hashida J, Ueda Y, Sugano S, Hashimoto K, Saisho H, TakiguchiM,SekiN.:
Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiologyofmouseliverregeneration.
JBiolChem.278(32):29813-29818,2003.

5) Han B, Dong Z, Liu Y, Chen Q, Hashimoto K, Zhang JT.: Regulation of constitutive expression of mouse PTEN bythe5'-untranslatedregion.
Oncogene22(34):5325-5337,2003.

6) Gotoh,E.,Tanno,Y., and Takakura, K.:
Asimple biodosimetry methodin case of high dose radiaition exposure by scoring chromosome number of Giemsa stained during induced prematurely condensed chromosomes (PCC).
Int J RadiatBiol,2004 (inpress)

7)OhashiYY, Kameoka Y, Persad AS, Koi F, Yamagoe S, HashimotoK,SuzukiK.:
Novel missense mutation found in a Japanese patient with myeloperoxidasedeficiency.
Gene.2004Mar3;327(2):195-200.

8) Takahashi-Omoe H,OmoeK,SakaguchiM, Kameoka Y, MatsushitaS,InadaT.:
Analysis of protein expression by mammalian cell lines stably expressing lactate dehydrogenase-elevating virus ORF 5 and ORF 6 proteins.
CompImmunol Microbiol InfectDis. 2004 Mar;27(2):81-92.

9)Takahashi-Omoe H, Omoe K, Sakaguchi M, Kameoka Y, MatsushitaS,InadaT.:
Production of virus-specific antiserum corresponding to sequences inthelactatedehydrogenase-elevatingvirus(LDV) ORF6protein.
Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Jan;27(1):47-55.

10)Kuzmin IV,OrciariLA,AraiYT,SmithJS,HanlonCA, KameokaY,Rupprecht CE. :
Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences.
VirusRes.2003Nov;97(2):65-79.

11) Hanyuda M, Kasama T, Isozaki T, Matsunawa MM, Yajima N, Miyaoka H, Uchida H, Kameoka Y, Ide H, AdachiM.:
Activated leucocytes express and secrete macrophage inflammatory protein-1alpha upon interaction with synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis via a beta2-integrin/ICAM-1mechanism.
Rheumatology(Oxford).2003Nov;42(11):1390-1397.
Epub2003Jun27.

12) Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F,SuzukiK.
Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction--study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice.
FreeRadic Res.2003May;37(5):481-489.

13) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka,M.：
AmultiplexPCRfordiscrimination
between Paragonimus westermani and P. miyazakii at the metacercarialstage.
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health35(Suppl.2),77-80,2004.

14) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y., Arakawa, K.andKawanaka,M.：
Paragonimus ohirai metacercariae in crabs collected along theArakawaRiverinTokyo,Japan.
J.Vet.Med.Sci.66,927-931,2004.

2．和文発表

1）杉山　広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：
開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の1例
Clinical Parasitol.、14、57-60、2003.

2）杉山　広、森嶋康之、坂本京子、亀岡洋祐、川中正憲：幼虫移行症の原因としてのアライグマ回虫
獣医寄生虫学会誌、2、13-19、2003.
3）後藤英介:
未成熟染色体凝縮法とその放射線生物学への応用。
放射線生物研究、39、14-25、2004

II. 学 会 発 表

1. 国 際 学 会
1) Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M.： A multiplex PCR for discrimination between Paragonimus westermani and P. miyazakii at the metacercarial stage. The 4th Seminor on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses, Bangkok, 2-4 Dec. 2003.

2. 国 内 学 会
1）坂手龍一 肥田宗友　長田直樹、数籐由美子、菅野純夫、早坂郁夫、橋本雄之、平井百樹：
チンパンジー遺伝子配列データベース
第１９回日本霊長類学会大会、仙台、2003 年 6 月
2）高橋一朗、橋本雄之：
遺伝子発現を抑制するタンパクと RNA との ineraction について
第２６回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月
3）楠田潤、長田直樹、田沼玲子、平田誠、橋本雄之
カニクイザルにおける神経疾患関連遺伝子のスプライス変異体の解析
第２６回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月
4)橋本雄之：サル完全長 cDNA の分離とヒト相同遺伝子との比較解析
国立遺伝学研究所共同研究集会「霊長類の遺伝学的研究」
三島、2004 年２月
5)丹野悠司、高倉かほる，後藤英介： 化学薬剤による未成熟染色体凝縮法（PCC）による全染色体数を指標とした大線量の被爆線量を推定する生物学的線量計
第46回日本放射線影響学会大会、京都，2003年10月
6）後藤英介、丹野悠司、高倉かほる：
DNA-PKとATM蛋白によるG2/M細胞周期制御について
第46回日本放射線影響学会大会、京都，2003年10月
7）亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木 和男：ミエロペルオキシダーゼの第8ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度
第26回日本分子生物学会年会，神戸， 2003年12月
8）Dawson, Wayne、Ishida, Mie、Kameoka, Yosuke、Yamagoe, Satoshi、Futamura, Yasuhiro、 Yamamoto, Kenji、Tanokura, Masaru、Suzuki, Kazuo：
Structural determination of the LECT2 protein by combined experimental and computational strategies
第26回日本分子生物学会年会，神戸， 2003年12月
9）亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男：
新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異
第9回MPO研究会、八王子，2003年10月
10）杉山　広、森嶋康之、川中正憲、亀岡洋祐：
東京の荒川河川敷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
第135回日本獣医学会学術集会、東京　2003年4月
11）杉山　広、森嶋康之、坂本京子、川中正憲、亀岡洋祐、鈴木雄二郎、西山秀樹：
開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定した宮崎肺吸虫症の1例
第14回日本臨床寄生虫学会大会、長崎、2003年6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、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および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・運営を担っている。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およびバイオセーフティについての教育・訓練並びにバイオセーフティについての情報収集・提供を行っている。

病原体等安全管理規程に基づく、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を行った。BSL2実験室は各部長の指揮監督のもとに管理運営を行っているが、BSL2実験室安全キャビネット定期点検プログラム等の立案や病原体等の取扱い者の健康管理や血清保存等の所全体に関わる管理業務を行った。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。病原体等安全管理規程の一部改正を行い、BSL分類表にBSE prionを追加し、動物実験におけるBSLを規定し、2003年4月から実施した。

病原体取り扱い者へ感染のリスク、優良な微生物取り扱い技術、安全管理に関する規則を熟知させることは感染事故を防ぐ上に必須である。新規に病原体等を取り扱う者に対しては２ヶ月毎に、また、今年度は継続者に対してバイオセーフティ講習会を実施した。さらに、新規のBSL3実験室利用者へは利用者講習を実施した。その他、緊急時対応訓練等のバイオセーフティ教育・訓練を実施し病原体等の安全管理業務の充実をはかった。

施設整備に関しては、2003年1月24日より運用を開始した村山分室6号棟のBSL3実験室の最初の年次総合点検を11月に実施した。他の指定実験室について例年の年次点検を実施した。筑波支所では大型ケージ・アイソレーターへの取り換えにともなう管理区内実験室の改修および洗浄室の管理区域からの切り離しにつての設計作業並びに準備作業を行った。

研究業務としては、安全キャビネットの給排気量の自動維持機構の検証、実験室前室機能、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、炭疽菌の性状、検出法および不活化法、各種消毒剤によるコロナウイルス等の不活化に関する研究およびノロウイルス代用としてネコカリシウイルスを用いた塩素抵抗性に関する研究等を行った。

第46回米国バイオセーフティ学会総会に出席し、実験室前室のフロート型ダンパーの清浄効果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。本グループは2003年9月に各国の規制等についての資料集としてBiosafety Compendium on Regulations and Information Sourcesを取り纏めた。

国際協力業務としては、JICAタイ国国立衛生研究所機能向上プロジェクト、WHOによるシンガポールでのSARS実験室発生に関するバイオセーフティ調査、および台湾のSARS実験室発生にともなう現地調査に参加し、バイオセーフティについての指導を行った。

バイオセーフティ管理室のホームページには、病原体等取扱申請方法、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、病原体等安全管理規程、関連学会等の日程およ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、１１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、安全キャビネットの正しい使用法および消毒剤の適切な使い方について引き続き指導を行った。

外国人研修生対象として、感染研エイズ国際研修、ポリオ国際研修およ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。

バイオセーフティ管理室

1. バイオセーフティ講習会受講者数

1) 平成 15 年度 継続・新規・臨時講習会

実施年月日		継続	新規	臨時
平成 15 年 4 月	4 日		74	
5 月	7 日	357		
5 月	8 日	226		
5 月	19 日	36		
6 月	3 日	1		
6 月	4 日		49	
7 月	4 日			1
8 月	5 日		47	
9 月	16 日			1
10 月	6 日		45	
12 月	2 日		23	
平成 16 年 2 月	4 日		29	
計		620	267	2

2) 平成 15 年度 外国人対象講習会

実 施 日			受講者数
平成 15 年	4 月	2 日	1
	4 月	9 日	2
	4 月	17 日	1
	5 月	9 日	5
	6 月	10 日	2
	6 月	18 日	1
	9 月	5 日	1
	10 月	24 日	2
	11 月	5 日	1
	12 月	11 日	1
平成 16 年	3 月	15 日	1
計			18

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、高木弘隆研究員および藤井弘毅、千葉裕子非常勤職員が担当した。村山分室においては篠原克明主任研究官および山口安子、甲原照子、佐藤真弓非常勤職員が担当した。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2003年10月31日で併任解除となり11月1日からは新たに明里宏文主任研究官がバイオセーフティ管理室併任となり管理・運営を担当した。引き続き、各庁舎指定実験室の日常の管理・運営、施設管理技術者との作業調整と監督、施設の定期総合点検の計画立案と実施およ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 15 年度 指定実験室（BSL3）登録者数

庁　舎　名	登録者数
戸山庁舎	116
村山分室	46
筑波医学実験用霊長類センター	48
計	210

2. 平成 15 年度 利用者講習会月別受講者数

※ 回数（講習会実施回数）　人数（受講者数）

庁舎名	戸　山		村　山		筑　波	
実施月	回数	人数	回数	人数	回数	人数
4 月	0	0	1	1	2	5
5 月	1	5	1	2	1	2
6 月	2	8	5	20	1	2
7 月	2	5	4	8	1	5
8 月	1	1	4	5	0	0
9 月	4	11	3	14	0	0
10 月	2	4	4	4	1	1
11 月	1	2	0	0	0	0
12 月	2	6	2	2	0	0
1 月	1	2	1	1	0	0
2 月	1	3	4	9	1	1
3 月	1	2	1	6	0	0
計	18	49	30	72	7	16

上記の他に臨時利用者講習会実施
避難訓練（12 月）2 回 60 名

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、行政機関（平成15年健康危機管理保健所長等研修会、東京都特別区保健所衛生検査技師会等）、大学、独立行政法人、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。感染研が受け入れている保健医療科学院および国際協力事業団(JICA)から（エイズ、ポリオ、ハンセン病）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。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の管理運営法およ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、安全装置およ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て、2002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、2003年11月に行われた総会・学術集会の運営にたずさわった。

Ⅳ. 国際協力

１．JICA タイ国国立衛生研究所機能向上プロジェクト

研究所機能向上の一環としてバイオセーフティ体制の強化のために査察と改善指導を行った。2000 年に、NIH のバイオセーフティについて現地調査を実施し問題点を指摘してきた。先の指導項目の達成度、また新たな問題点等について調査を行った。安全装置、安全管理体制の整備、教育・訓練、BSL３実験室の日常の管理運営法および設備の維持管理について等の技術的項目について指導を行いバイオセーフティ体制の確立をはかった。

２. WHO によるシンガポールでの SARS 実験室発生に関するバイオセーフティ調査

2003 年 9 月にシンガポールで SARS コロナウイルスによる実験室感染が発生した。WHO、米国 CDC およびシンガポール当局者からなる調査委員会のメンバーとして実験室の構造と安全管理状況および疫学調査を行った。シンガポール政府はバイオセーフティの安全管理体制、施設基準等の策定を行うよう努めることとなった。感染研としてはこれを教訓とし、規則等の定期的な見直し、講習会での具体的な対応策についての指導および BSL2 実験室の安全管理の充実等を行うようにした。

３．台湾の SARS 実験室発生にともなう現地調査

2003 年 12 月に台湾で発生した SARS コロナウイルスによる実験室感染にともない、台湾の BSL3,4 実験施設 8 ヶ所について立ち入り調査を台湾 CDC と協力して行った。設備は標準を上回るものであったが、管理体制についてはさらに充実させる必要があり、改善のための指導を行った。

研　究　業　績

Ⅰ. バイオセーフティに関する研究

1. BSL3 実験室における安全キャビネットの給排気量の自動維持機構の検証

BSL3 実験室設置マルチダクト接続クラスⅡ安全キャビネットの給排気空気量モニター機能とコントロールシステムの性能を検証中である。現在までのところ、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ている。さらに長期間の観察を行う予定である。

［篠原克明、深見　哲、杉山和良］

2. バイオハザード対策専用防護服の防護性能に関する研究

バイオハザード対策専用防護服の防護性能について、試験装置の開発を含め、実証試験を行っている。現存の試験方法について、国内外の規格や文献並びに海外を含めた関連学会、施設・設備などの調査を行った。さらに、現存防護服の血液透過性や浮遊微生物の透過性について検証を行ったところ、現存の試験装置や試験方法では各防護服素材の防護性能を細かく評価できないことが判明した。そこで、より精細な性能試験を行うための試験装置を新たに開発し、試作機を作製した。現在その試作機を用いて各素材のデータを収集中である。

［篠原克明、高木弘隆、杉山和良］

3. 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

昨年に続き、環境中のNorovirus(Norwalk-like virus)代用とし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(F-9)及び臨床分離されたもの、計 7 株を用いて 10^6～10^7PFU/0.05mlに調製した。塩素系消毒薬としては次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)を用いて有効塩素 1.56～100ppmとなるよう滅菌精製水にて調製した。試験方法はvirus:NaClO = 1:4 で混合し、室温で 10 分作用させた後、チオ硫酸ナトリウム含有EMEを等量加え反応を停止させた。これを段階希釈し、CRFK細胞により残存する感染力価($TCID_{50}$)を測定した。

その結果 F-9 を含む 4 株では有効塩素 100ppm にて 2log10 以上減少し、2 株は 1log10 程度の減少に、1 株では 1log10 未満の減少となった。FCV 不活性化における有効塩素濃度依存性は 20ppm 以上ではほぼ直線的であるが、それ以下では非常に不安定であることも示唆された。また有効塩素 100ppm・10 分の作用で 1log10 程度あるいはそれ未満となった 3 株については plaque 形成速度が速いといった傾向も認められている。今後さらに有効塩素濃度・作用時間のマトリクスによる塩素抵抗性を検討するとともに、これらの増殖能やそれに関わる分子生物学的解析を試みる予定である。

［高木弘隆、篠原克明、杉山和良］

4. 各種界面活性剤によるコロナウイルスの不活性化に関する研究

昨年度 SARS コロナウイルス(SARS-CoV)の感染防止対策の一環として、各種消毒剤による不活性化効果を検討したが、不特定多数が利用する宿泊施設や公共施設などにおいて、その実践は困難なケースが多いことも明らかになった。そこで通常清掃や洗浄などの用途に使用されている界面活性剤原料に着目し、それらによるブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)及び SARS-CoV を用いた不活性化効果を検討した。界面活性剤の市販品原料として直鎖ｱﾙｷﾙﾍﾞﾝｾﾞﾝｽﾙﾎﾝ酸 Na(LAS-Na)、天然型ｱﾙｷﾙｴｰﾃﾙ硫酸ｴｽﾃﾙ Na(AES-Na)、脂肪酸ｱﾙｶﾉｰﾙｱﾐﾄﾞ(FAA)、ﾗｳﾘﾝ酸 K(Lau-K)、市販無添加石けん(Soap)及び塩化ﾍﾞﾝｻﾞﾙｺﾆｳﾑ(BZC)を用い、ウイルス:界面活性剤＝1:1で混合、2 分間の作用による不活性化効果をみた。

また、これまで界面活性剤は細胞毒性の回避は大量希釈のみが有効な手段であり、ウイルスの高力価-不活性化の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ることで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可能となった。

その結果TGEVではLAS-Na 0.06%以上、Lau-K 0.5%以上、Soap 0.25%以上そしてBZC 0.025%以上で約 $6log_{10}TCID_{50}$の減少が認められた。またSARS-CoVではLAS-Na 0.1%以上、Lau-0.5%以上、Soap 0.5%以上そしてBZC 0.02%以上で $5log_{10}TCID_{50}$の減少が認められた。またAES-NaとFAAについては、各々単独では不活性化効果は弱いが、ある比率で混合することにより、不活性化効果が増強される傾向がみられた。これらから市販家庭用洗剤や石けん、逆性石けんによるコロナウイルス不活性化に有効性がみられ、感染防止対策にも十分活用できると考える。

［高木弘隆、篠原克明、杉山和良(バイオセーフティ管理室)
*原料協力:(財)日本石鹸洗剤工業会］

5. コロナウイルスⅠ型及びⅡ型に対する抗体測定システムの開発に関する研究

SARS-CoV 研究において、抗血清作成や血清サンプル中抗体価測定は非常に重要であり、特に抗体特異性については交差反応などを知る上で、既存のコロナウイルスを抗原とした ELISA などによる確認が簡便かつ重要である。今回、SARS-CoV がコロナウイルスⅠ型(CoV-1)と血清学的に交差しやすいことを踏まえ、既存 CoV-1
を抗原とした抗 CoV-1 IgG ELISA キットの開発を行った。

CoV-1 抗原はブタ伝染性胃腸炎ウイルス(TGEV)弱毒ワクチン株 h-5 を用い、無血清下ブタ精巣細胞(ST)により増殖させた後、ホルマリン固定・限外濾過を行い、粗精製 CoV-1 抗原を得た。これを 96well-microplate にコーティングし、各種抗血清による特異性及び非特異反応、プレート保存性などを検討した。コロナウイルスⅠ型及びⅡ型に対する市販ポリクローナル抗血清についてはⅠ型のみと反応し、抗 SARS-CoV ウサギ血清(ウイルスⅠ部より供与)では強い交差反応が認められた。ST 細胞より調製した MOCK サンプルとの比較による非特異反応は殆どみられなかった。またプレート 4℃乾燥状態で 2 ヶ月は使用可能であった。現在 HCoVⅠ型(229E)及び HCoVⅡ型(OC43)を抗原とした ELISA システムの検討を行っている。
[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、森川茂(ウイルスⅠ部)、板村繁之(ウイルスⅢ部)]

6. 母乳中抗コロナウイルス IgA 測定と CoV-1 中和能に関する研究

コロナウイルスは一般的に軽度の風邪様症状を呈し、冬期に流行があるとされている。また培養は非常に難しく、その感染実態を把握するためには血清学的検査にたよる。本ウイルスは乳幼児に感染した場合、肺炎等重症化する場合があるため、特に授乳における移行 IgA は重要なものとなる。今回、東京大学発達医科学教室所有の母乳(出産後9日以内)239 検体について CoV-1 に対する IgA 検出を ELISA にて実施するとともに、その中和能について TGEV を用いた中和試験を試みた。

ELISA による陽性判定を吸光度 0.2 以上かつ MOCK 吸光度の 2 倍以上としたところ、5 検体(2.1%)が陽性となった。また MOCK 吸光度 2 倍以上の吸光度値を示す検体 14 検体と陰性検体 18 検体を各々1:40 希釈での TGEV 中和試験を行ったところ相関性は認められないものの、ほとんどの陰性検体中につよい中和能が認められた。IgA とは別の感染中和物質の存在と母乳による感染防止の重要性が示唆され、今後、継続してこの解析を進めてゆく予定である。
[高木弘隆、杉山和良(バイオセーフティ管理室)、寺尾義孝、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) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M. : Higher levels of IL-18
circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. Virology, 313 (1) : 8-12, 2003.
2) Shinohara, K., Ohtani M., Sato H., Nakamura S., Takagi H., Sugiyama K. Cleanliness effect of new float-type barometric damper in changing room of
BSL3 laboratory. Applied Biosafety, 8 (4), 184, 2003.

2. 和文発表、雑誌解説

1) 杉山和良:実験動物施設におけるバイオセキュリティ. 実験動物と環境 11(2), 105-109, 2003
2) 杉山和良:バイオハザード病原体. ファルマシア Vol.40, No.3, 220-224, 2004
3) 杉山和良:バイオセーフティの考え方と実践. 静電気学会誌 Vol.28, No.3, 160-163, 2004
4) 篠原克明: 感染症とその施設、設備について. 建築設備と配管工事. Vol.42. No.2. 1-7.2004.2 月.
5) 高木弘隆:(特集解説)室内環境とウイルス、静電気学会誌、28(3), 160-163, 2004

Ⅱ. 学会発表

1. 国際学会

1) Shinohara, K., Ohtani M., Sato H., Nakamura S., Takagi H., Sugiyama K. Cleanliness effect of new float-type barometric damper in changing room of BSL3 laboratory. 46th Annual Biological Safety Conference, October 12-15, 2003, Philadelphia, USA.

2. 国内学会

1) 杉山和良:実験動物施設におけるバイオセキュリティ。 第 28 回日本実験動物環境研究会シンポジウム、2003 年 5 月、埼玉
2)杉山和良:シンガポールでの SARS 実験室感染について。第 3 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2003 年 11 月、東京
3)杉山和良:病院、検査センター等検査室が具備すべきバイオセーフティ上の構造設備。 第 15 回日本臨床微生物学会、2004 年 1 月、筑波
4)篠原克明、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良、三木秀樹、青山隆芳:屋外設置ユニット式バイオハザード対策用実験室空調の運転経過。第 21 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、2003 年 4 月、東京
5)佐藤英樹、中村慎二、大谷光幸、篠原克明:フロート式差圧調整ダンパによる室圧制御と空気気流性状の検討。第 21 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、2003 年 4 月、東京
6)篠原克明、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、高橋栄治、高木弘隆、杉山和良:生物学用安全キャビネットの排気安定化
について。日本防菌防黴学会 第 30 回年次大会、2003 年 5 月、大阪

7）三浦智行、コズレフユーリ、阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、鈴木元、伊吹謙太郎、速水正憲：サル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連。日本ウイルス学会　第 51 回学術集会・総会、2003 年 10 月、京都
8）篠原克明：バイオハザード対策設備における防護服について。第一回日本防護服研究会学術総会、2004 年 2 月、東京
9）高木弘隆、篠原克明、杉山和良：汎用洗剤中の各種界面活性剤によるウイルス不活性化効果について。
第 31 回日本防菌防黴学会年次大会、2004 年 5 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)、外国語(５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１１０名、外国語１０名、継続３８６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、今年度は土田、前川が行い、継続者に対して放射線の人体に対する影響及び科学技術庁の通達等を中心に講習した。

4月から室員の橋戸氏が国立精神神経センターへ出向された。10月から橋戸氏の後任として藤本氏が赴任した。放射能管理室併任に引続き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。農工大の山内氏、日大の溝呂木氏が企業関連に進み、日大の小林氏は大学院に進んだ。アリゾナ大のS. Sosnick氏は、BRAVO! Programで短期間滞在した。日大の及川氏、佐藤氏が引き続き在籍した。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	1670099	327750	1425549
^{14}C	335865	35368	252922
^{32}P	2222910	5180750	5153410
^{33}P	0	0	0
^{35}S	1054500	712250	1132500
^{51}Cr	74000	222000	259000
^{125}I	271950	11840	201650

保管量合計１群換算37786.611kBq

２．村山分室

（単位　kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
^{3}H	535630	37000	452515
^{14}C	28656	11470	33145
^{32}P	65675	471750	488575
^{33}P	39160	18500	50710
^{35}S	215980	536500	511980
^{51}Cr	0	0	0
^{125}I	0	0	0

保管量合計１群換算　30901kBq

Ⅱ．従事者登録数

１．戸山庁舎　　397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15年 4月 7日	51	新規
5月 7日	145	継続
5月 8日	152	継続
5月13日	72	継続
5月19日	12	継続
6月 3日	17	新規
8月 4日	17	新規
10月 3日	14	新規
12月 3日	6	新規
平成16年 2月 12日	10	新規
合計	496	

(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15年 4月21日	3	新規
6月17日	2	新規
11月10日	3	新規
12月17日	1	新規
平成16年3月18日	1	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､引き続き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 b側に比べて効率は落ちるが5 `側の挿入もPCRで確認された。

[藤本、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が､導入解析が遅れている。

[藤本、蛭川、松浦（ウイルス２部）、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

<u>放射能管理室</u>

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の中で同じ逆位繰変えし配列を持つグループを比較することで地理的移動を解析できることが示唆できた。この方法を使えば媒介昆虫の移動も追跡に応用できる可能性がある。

[中島(琉球大)、藤本、橋戸、高田、土田、前川]

II． 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

プラスミドpBR322をモデルにしてPCR法によるDNA二本鎖切断検出法を開発した。閉環状構造を持つプラスミドは照射によりPCRによる増幅度が200％も上昇することが明らかになっている。しかし照射線量の設定が30Gy、60Gy、100Gyと大まかであったのでより細かくこの上昇パターンを得ることを計画した。5～10Gy幅で照射を行うことにした。 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。

[佐藤(日大)､ 藤本､ 斎藤（原研東海）、渡辺（原研東海）、土田、高田、福原(日大)、岩野(日大)、前川]

２．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法を応用することができる。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｡そのため、rＤＮＡ、R1Bm、R2m各単位内で高次構造をとっていないかを反対するためゲノムＤＮＡを制限酵素EcoRIで消化したものに放射線を照射しＰＣＲ増幅のパターンを解析した。配列によっては差を観察されたがより多くのデータが必要である。 [及川（日大）、藤本、土田、高田、福原(日大)、岩野(日大)、前川]

III．脂質輸送機構の解析

１．カロチノイド結合たんぱく質（CBP）遺伝子の解析

カロチノイドの取込機構は未だ明確ではない。カロチノイド輸送に関連した突然変異体の解析からCBP遺伝子とY遺伝子の関係を調べた。突然変異体 Y^-、＋^{Y}から単離されたＣＢＰｃＤＮＡのＯＲＦの塩基配列には差が認められなかったが、ｍＲＮＡの大きさに差があった。そのため何故＋^{Y}がＣＢＰを作れないのかを明らかにするためにゲノム遺伝子の解析を計画中である。

[土田、小林（日大）、Sosnick(アリゾナ大)、伴野(九大)、藤井(九大)、前川、高田、福原（日大）､岩野（日大）]

２．CBP遺伝子のＲＦＬＰ解析

ＲＦＬＰを利用した新しい解析法により連関群検索をしたところＣＢＰ遺伝子とＹ遺伝子は第2染色体にマップされ、ほぼ同じ位置にあることが分かった。しかし、ＣＢＰ遺伝子とＹ遺伝子は異なる遺伝子であるのでＹ遺伝子はＣＢＰの発現を制御するものかもしれない。

[土田、原(生資研)、伴野(九大)、小林（日大）、藤井(九大)、前川、高田、福原（日大）、岩野（日大）]

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

1) 欧文

1. Z.Jouni, N.Takada, J.Gazard H.Maekawa, M.A.Wells and K.Tsuchida (2003) Transfer of cholesterol and diacylglycerol from lipophorin to *Bombyx mori* ovarioles *in vitro*: role of the lipid transfer particle. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33, 145-153.

2. Y.Nakajima, T.Nakamura Y.Banno, H.Fujimoto, K.Hashido, K.Shiino, K.Tsuchida and H.Maekawa (2003) Comparison of *mariner*-like elements among *Bombyx mandarina* individuals inhabiting east Asia in the light of the segregation of *B. mori* and *B. mandarina* genomes. Journal of Wild Silkmoth and Silk, 8. 57-64.

3. K.Tsuchida, Z.E.Jouni, J.Gardetto, Y.Kobayashi, H.Tabunoki, M.Azuma, H.Sugiyama, N.Takada, H.Maekawa, Y.Banno, H.Fujii, H.Iwano and M.A.Wells (2004) Characterization of the carotenoid-binding protein of the Y-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology. 50, 363-372.

4. Fujimoto,H., Hirukawa,Y., Tani,H., Matsuura,Y., Hashido,K., Tsuchida,K., Takada,N., Kobayashi,M. and Maekawa,H. (2004) Integration of the 5’ end of the retrotransposon, R2Bm, can be complemented by homologous recombination. Nucleic Acids Res., 32, 1555-1565.

Ⅱ．学会発表

1) 国際学会

1. H. Maekawa, H.Fujimoto, Y.Hirukawa, H.Tani, Y.Mastuura, K.Hashido, K.Tsuchida, N.Takada, M.Kobayashi, ,Integration of the 5’ and 3’ ends of the retrotransposon, R2Bm, can be analyzed by baculovirus, AcNPV, and cultured cells. XIX International Congress of Genetics, Merborne, Aug. 2003.

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 invertebrates including Lepidopteran insects a grasshopper and a coral. XIX International Congress of Genetics, Merborne, Aug. 2003.

3. Y. Nakajima, Y.Banno, T.Nakamura, H.Fujimoto, K.Hashido, K.Tsuchida, N.Takada, H.Maekawa. *Mariner*-like sequences and their possessing insertion sequences classified into *Cecropia*-ITR-MLE family in the genome of some invertebrates including lelidopteran insects, grasshopper and a coral inhabiting Asian region, 6th International workshops of the Molecular Biology and Molecular Genetics of Lepidoptera. Kolymbari Crete Aug. 2003.

4. Y.Nakajima, T.Nakamura, Y.Banno, H.Fujimoto, K.Hashido, T.Shiino, K.Tsuchida, N.Takada and H.Maekawa. Comparison of mariner-like elements among Bombyx mandarina aindividuals inhabiting east asia in the light of the segregation of *B.mori* and *B. mandarina*. Sericultural Science and Research for the Utilization of Insect Properties. Joint meeting of Japanese and Korean Societies of sericultural science and Japnese Society of sericultural science kanto branch. Tsukuba , Nov. 2003.

5. H. Maekawa, E. Yamauchi, H. Fujimoto, R. Watanabe, K.Saito, H. Sato, M. Oikawa, M. Murakami, K. Tsuchida, N.Takada and M. Kobayashi. PCR to genomic DNA irradiated with radical scavenger is useful tool for analysis of highly complicated DNA structure. 2004 Keystone Symposia : Genetic manipulation of insects, Taos, Mar. 2004.

6. K.Tsuchida, W.Hara, S.Sosnick, Y.Kobayashi, N.Takada, H.Maekawa and M.Kobayashi. Y gene encode carotenoid binding protein that transport carotenoid in the midgut epithelium of silkworm, *Bombyx mori*. 2004 Keystone Symposia : Genetic manipulation of insects, Taos, Mar. 2004.

2) 国内学会

1. 中島裕美子、中村隆、伴野豊、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：与那国島のヨナグニ蚕、日本列島のウスタビガ、クスサン、東アジアに生息するクワコにおける *Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列の比較，日本野蚕学会第 9 回大会，京都，2003 年 4 月.

2. 中島裕美子、中村隆、伴野豊、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：鱗翅目昆虫ゲノムにおける水平伝播型トランスポゾン *mariner*（ワークショップでの講演)、日本進化学会、福岡 2003 年 8 月.

3. 前川秀彰、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、普後一、高田直子：PCR 法を用いた放射線によるプラスミド DNA の切断頻度の検出と高次構造解析への利用。第 46 回放射線影響学会、2003 年 10 月、京都

4. 中島裕美子、中村隆、伴野豊、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：*Cecropia*-ITR-MLE 比較によるカイコとクワコの分岐に関する考察，第 69 回関西支部・第 59 回九州支部合同研究発表会，京都，2003 年 10 月.

5. 山内恵美子、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、佐藤紘香、及川美代子：PCR 法とシミュレーション計算を利用した放射線照射ＤＮＡの切断解析と構造解析。第 26 回日本分子生物学会 2003 年，12 月、神戸

6. 藤本 浩文，ミロスラフ ピナック，根本 俊行，坂本 清隆，山田 和幸，星 芳幸，久米 悦雄、前川 秀彰： 酸化損傷による DNA 分子の構造変化―分子動力学シミュレーションによるアプローチ。第 26 回日本分子生物学会

2003 年，12 月、神戸
7. 及川美代子、佐藤紘香、山内恵美子、藤本浩文、土田耕三、高田直子、福原俊彦、前川秀彰：放射線により切断されたゲノムＤＮＡの PCR 法による検出。第 74 回日本蚕糸学会、2004 年 3 月、盛岡
8.　土田耕三、原和二郎、小林悠、Stephen Sosnick、天竺桂弘子、伴野豊、藤井博、高田直子、前川秀彰。黄血遺伝子Ｙとカロチノイド結合タンパク遺伝子ＣＢＰ　派同じか？　第 74 回日本蚕糸学会、2004 年 3 月、盛岡
9. 中島裕美子、中村隆、伴野豊、藤本浩文、橋戸和夫、土田耕三、高田直子、前川秀彰：n=27 のクワコにおける *Cecropia*-ITR-MLE 比較から考察した、日本へのクワコ移入伝播モデル。第 74 回日本蚕糸学会、2004 年 3 月、盛岡

19. 動 物 管 理 室

室長　山田靖子

概 要

浅野敏彦前室長が平成 14 年度をもって定年退官され、平成 15 年 4 月 1 日より山田靖子が室長に就任した。動物管理室は戸山庁舎、村山分室の動物管理区の運営管理を行っているが、従前のシステムを踏襲し、1 年間大過なく維持された。平成15年7月よりバイオセーフティー管理室の管理下で村山分室6号棟に新たにBSL3動物区が稼動し、それまで施設が限られたため制約のあった村山分室での BSL3 動物実験が行いやすくなった。平成 16 年 1 月より田原口元子が研究員として着任し、平成 16 年 3 月に中山一栄主任研究官が定年退官を迎えた。

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、モデル動物の開発研究が進められた。平成15年当初に流行した重症急性呼吸器症候群(SARS)の原因ウイルスが動物管理室で研究を行っているマウス肝炎ウイルス（MHV）と同じコロナウイルスであったため、所内で協力して行ったSARSウイルス研究の一部を担当した。

国際協力に関しては、平成 15 年 11 月の 1 ヶ月間、タイ国立衛生研究所よりMs.Sae-lim Benjamaが「ワクチンの動物接種」の研修で村山分室に滞在し、血液安全性研究部とともに対応した。

所内委員会のひとつである動物実験委員会は感染研で行われる動物実験計画を動物の愛護・福祉の観点から審査するために設置されているが、動物管理室はその事務局を担当している。昨今、実験動物の福祉の向上は世界的な時流である。今年度は、実験動物の福祉の概念を動物実験実施者に理解してもらうため全所を対象とした講習会を行い、また動物実験計画書の審査は愛護・福祉が主目的となるよう大きく修正された。改変に伴う申請者のとまどい、委員会として討議すべき事例などの問題は起きたが、動物の愛護・福祉を目標とした動物実験委員会の改革第一歩を踏み出した 1 年であった。

動物管理区の利用状況

平成 14 年度末に行われた動物実験委員会の全所対象の講習会受講者は戸山 225 人、村山 121 人、筑波 48 人、ハンセン 19 人（合計 413 人）であり、平成 15 年度に申請された動物実験計画は 229 件であった。また、戸山庁舎と村山庁舎の動物管理区における施設利用登録者数は平成 16 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 402 人、村山庁舎 174 人である。

Ⅰ 実験動物施設利用者講習会および動物実験講習会

		受講者数 （新規）		
開催月日	開催場所	施設利用（戸山）	施設利用（村山）	動物実験
4 月 4 日	戸山	35	0	49
4 月 25 日	戸山(臨時)	1	0	0
5 月 1 日	戸山(臨時)	5	0	5
5 月 19 日	戸山(臨時)	1	0	0
6 月4日	戸山	14	0	25
6 月 10 日	村山	0	6	0
6 月 12 日	村山	0	2	0
6 月 18 日	戸山(臨時)	0	0	7
7 月 16 日	戸山(臨時)	1	0	0
8 月 5 日	戸山	11	0	22
9 月 4 日	村山	0	2	0
11 月 19 日	村山	0	1	0
10 月 6 日	戸山	10	0	22
12 月 2 日	戸山	9	0	13
1 月 14 日	村山	0	14	0
1 月 6 日	戸山(臨時)	1	0	0
2 月 4 日	*戸山*	5	0	*10*
合計		93	25	154

イタリック文字は英語講習会（外国人等）を含む

Ⅱ 微生物モニタリング

戸山庁舎、村山分室の各飼育室にモニター動物を配置し，月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。緑膿菌、黄色ブドウ球菌に陽性が散見されたが、これらはいわゆる日和見病原体で免疫機能が正常な動物には病原性はない。それ以外の病原体については全て陰性であり，飼育室は清浄に保たれている。(空欄は検査を実施していない)

病原体検査項目		検査方法	年間検査結果 (陽性数/検査数)					
			戸山庁舎			村山分室		
			マウス	ウサギ	モルモット	マウス	ウサギ	モルモット
サルモネラ	Salmonella spp.	培養	0/374	0/17	0/43	0/194	0/74	0/92
ティザー菌	Clostridium piliforme	血清反応	0/374	0/3	0/8	0/194	0/74	0/92
緑膿菌	Pseudomonas aeruginosa	培養	0/374	0/17	0/43	7/190	0/74	1/92
黄色ブドウ球菌	Staphylococcus aureus	培養	3/374	0/17	5/43	96/190	18/74	55/92
腸粘膜肥厚症	Citrobacter rodentium	培養	0/374			0/194		
パスツレラ	Pasteurella pneumotropica	培養	0/374			0/194		
ネズミコリネ菌	Corynebacterium kutscheri	培養	0/374			0/194		
マイコプラズマ	Mycoplasma pulmonis	培養・血清反応	0/374			0/194		
ウサギパスツレラ	Pasteurella multocida	培養		0/17			0/74	0/92
気管支敗血症菌	Bordetella bronchiseptica	培養		0/17	0/43		0/74	0/92
溶血連鎖球菌	Streptococcus zooepidemicus	培養			0/43			0/92
肺炎球菌	Streptococcus pneumoniae	培養			0/43			0/92
センダイウイルス	Sendai virus (HVJ)	血清反応	0/374	0/3	0/8	0/194	0/74	0/92
マウス肝炎ウイルス	Mouse hepatitis virus(MHV)	血清反応	0/374			0/194		
エクトロメリア	Ectromelia virus	血清反応	0/374			0/194		
ジアルジア	Giardia muris	鏡検	0/374					
スピロヌクレウス (ヘキサミタ)	Spironucleus muris (Hexamita muris)	鏡検	0/374					
ネズミ盲腸蟯虫	Syphacia spp.	鏡検	0/374					
ネズミ大腸蟯虫	Aspiculuris tetraptera	鏡検	0/374					
嚢尾虫	Cysticercus fasciolaris	剖検・肉眼所見	0/374					
ネズミケモチダニ	Myobia musculi	鏡検	0/374					
ラドフォルジア	Radfordia affinis	鏡検	0/374					
コクシジウム	Eimeria caviae, Eimeria spp.	鏡検		0/3	0/8			
嚢尾虫	Cysticercus pisiformis	剖検・肉眼所見		0/3				
ウサギ疥癬ダニ	Psoroptes cuniculi	鏡検		0/3				

(網 康至、須崎百合子、松野久美子、滝本一広、中山一栄、田原口元子、星谷 武、増子芳郎、山田保利、大池正明、吉岡利夫、小川敏雄、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 希少実験動物のセンダイウイルスに対する感受性と抗体検出法の検討

センダイウイルス(HVJ)の宿主域は広く、マストミス、スナネズミ、ハムスターも汚染の可能性があり、HVJ の検査が必要である。当管理室では、CF 法を用いてマストミス、スナネズミ、ハムスターの抗体検査を行っているが、CF 法は感度が低いという短所がある。これら希少実験動物の HVJ 感染血清を得、HVJ に対する感受性を調べると共に、高感度で簡便な ELISA 法による抗 HVJ 抗体の検出を試みた。マストミス、ハムスターでは、二次抗体として Protein G を使用することにより明確な特異反応を示した。スナネズミは ELISA での特異反応が弱かったので、CF 法で抗 HVJ 抗体産生を確認した。

(滝本一広、中山一栄、山田靖子)

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、感染自己単核細胞を同一個体の視床に接種したカニクイザル2頭について、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。そのうちの1頭は、脳脊髄液中にウイルス中和抗体を検出し、持続的な血清中の高中和抗体価の維持され、抗麻疹ウイルス IgM 抗体が持続して検出された。これらの結果は、この個体において中枢神経内に麻疹ウイルスが持続感染していることを示唆するものと考えられる。

(網 康至、須崎百合子)

Ⅱ-2 低分子化合物の GM1 ガングリオシドーシス治療効果

22 週齢の BK48 マウス(GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒトβ-ガラクトシダーゼ変異酵素を発現するβ-GalKO マウス)に、酵素復元効果が認められているガラクトース類似低分子物質 0.5mM、0.1mM、0.02mM 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)]、山本美江[1)] ([1)]獣医科学部)]

Ⅱ-3 GM1 合成酵素高発現マウスの糖脂質解析

ガングリオシド合成能を高めるために作出された GM1/GA1 合成酵素遺伝子導入マウスの大脳および肝臓における GM1、アシアロ GM1の含有量を生化学的に検索した。GM1 は、肝臓では調べた4ラインのうち3ラインで発現が認められたが、大脳では含有量に変化は認められなかった。アシアロ GM1 は、大脳、肝臓ともに検出限界以下だった。

[滝本一広、松田潤一郎[1)]、鈴木 治[1)]、山本美江[1)]、高野 薫[1)] ([1)]獣医科学部)]

Ⅲ 重症急性呼吸器症候群(SARS)に関する研究

Ⅲ-1 SARS ウイルスの遺伝子変異に関する研究

香港より分与された SARS ウイルスから感染研で作成されたシードについて S タンパク下流の遺伝子配列を解析したところ、シードウイルスには非構造タンパク 8a に 2 塩基の欠失があることが判明した。また、SARS ウイルスを高い感染価で連続して継代した各継代歴のウイルスについて遺伝子変異の出現を解析したところ、Sタンパク下流の遺伝子配列に3箇所の変異が認めら、E タンパク 231 塩基中の 24 塩基の欠失が主な変異であった。S,M,N の主要構造タンパクには変異は認められなかった。

[山田靖子、水谷哲也[1)]、高橋一朗[2)] ([1)]ウイルス1部、[2)]遺伝子資源室)]

発表業績一覧

Ⅰ 誌上発表

Ⅰ-1 欧文

(1) Matsuda J, Suzuki O, Oshima A, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Itoh M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Ogawa S, Sakata Y, Nanba E, Higaki K, Ogawa Y, Tominaga L, Ohno K, Iwasaki H, Watanabe H, Brady RO, Suzuki Y. (2003): Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:15912-17.

(2) Oyanagi M., Kato A., Yamada YK, and Sato NL. (2004): Detection of MHV-RNAs in mouse intestines and in filter dust in mouse room ventilation duct by modified RT-nested PCR. Experimental Animals, 53:37-41.

(3) Izumi Y, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Sata T, Yamamoto N, Honda M. (2003): Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus Dis expressing simian immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic simian-human immunodeficiency virus in monkeys. J Virol., 77:13248-56.

(4) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M. (2003): Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. Virology, 313:8-12.

(5) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Izumi Y, Nakasone T, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M. (2003): Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Arch Virol., 148:973-88.

Ⅰ-2 和文

(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、杤久保修、北村勝彦 (2003):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.

(2) 山田靖子(2004):動物のコロナウイルス感染症。Medical Corner, 114(3): 3-6。

Ⅱ 学会発表

Ⅱ-1 国内学会、等

(1) 滝本一広、山本美江、野口 章、竹川奈穂、鈴木 治、野口洋子、高野 薫、小浦美奈子、伊藤雅之、松田潤一郎:GM1 ガングリオシドーシス幼児型ヒトβ-ガラクトシダーゼ変異酵素を発現するモデルマウスの病態解析。第 50 回日本実験動物学会総会、平成 15 年 5 月、大宮。

(2) 網 康至:麻疹ウイルスによる動物脳炎モデル作成の試み。シンポジウム「亜急性硬化性全脳炎(SSPE)現状と展望」第 8 回日本神経感染症学会学術集会、平成 15 年 10 月、宇部。

(3) 網 康至:カニクイザルの子宮内膜症。第8回サル疾病国際ワークショップ、平成 15 年 12 月、筑波。

(4) 吉野直人、兼清 優、染谷健二、松尾和浩、網 康至、佐藤成大、山本直樹、本多三男:リコンビナント Dis ワクチンの経粘膜接種への応用。第17回日本エイズ学会、平成 15 年 11 月、神戸。

(5) 山田靖子:コロナウイルスについて。SARS に関する技術講習会、平成 15 年 5 月、東京。

(6) 山田靖子:コロナウイルスについて。第2回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム、平成 15 年 5 月、東京。

(7) 山田靖子:動物のコロナウイルス感染症。ラジオ短波メディカル・コーナー、平成 15 年 12 月 14 日放送。

(8) 山田靖子 : 実験動物の微生物汚染検査法について。第 29 回日本実験動物技術者協会関東支部懇話会、平成 16 年 2 月、 さいたま市。

20.感染症情報センター

センター長　岡部信彦

概　　要

平成9年4月国立予防衛生研究所は「国立感染症研究所」と名称変更になり、それまでの感染症疫学部は発展解消し「感染症情報センター（初代センター長・井上栄博士)」が発足した。主な機能は、１）感染症サーベイランスデータの集計、感染症情報の収集、解析、その情報の国民への提供、２）外国の感染症機関との情報交換、３）感染症集団発生の疫学調査、およびそれを実行する専門家の養成、４）感染症予防制圧戦略の研究および提言　５)不明病原体に関する検索並びに研究､技術伝達、等である。

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（平成15年11月1−5類に類型が変更された)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。

また平成14年4月より感染症情報センター5室、6室が新設され､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り、軌道に乗っている。なお5室6室の業務は村山庁舎で行っている。

情報センターは現在以下の6室で分担し、業務研究を行っている。

第一室　（感染症対策計画室）

国内外における感染症の流行、 集団発生･異常集積時の疫学調査、感染症対策のための計画立案とそのための研究などを行っている。 ことに積極的疫学調査、 これに関わる感染症実地疫学専門家 （Field Epidemiology Training Program） の養成を行っている。

第二室　（感染症情報室）

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国内感染症サーベイランスデーターの収集・分析、及びその結果の還元と提供及びそのための研究を行っている。 情報の還元・提供は、 感染症情報センターホームページ、 感染症週報 （Infectious Disease Weekly Report: IDWR- ホームページにて週単位に発行）、病原体微生物検出情報 （Infectious Agents Surveillance Report: IASR- ホームページ及び印刷物として月単位に発行） 及び年報告を CDROM 版などにより、 感染症・公衆衛生関係の専門家、 医療・保健行政担当者及び一般国民に対して広く行っている 。

第三室　（予防接種室）

感染症発生動向調査事業の一環として行われている血清疫学調査の立案と実施、現行予防接種の効果と副反応に関するモニタリング、これらの結果の公表と広く一般への情報提供、予防接種対象疾患の感染症として人に与える影響 （disease burden） に関する調査研究、 及び今後の我が国における予防接種の有用性に関する総合的研究を行っている。また感染症研究所として行われている国内血清銀行の管理を行っている。

第四室　（病原診断室）

他の部の所管に属さない病原体に関すると思われる原因不明疾患の微生物学的検査、 レファレンス、 病原診断のための方法の開発を行っている。

第五室　（細菌研修室）

細菌性疾患の検査に関する情報の収集･解析、 情報提供を行っている。また国内外の関連機関と連携し、 公衆

衛生における細菌検査の技術向上・標準化等を支援している。公衆衛生に携わる公的機関の職員を対象に細菌検査に関する講習の立案・遂行、 新規検査法の研究などを行っている。

第六室 （ウイルス研修室）

ウイルス性疾患の検査に関する情報の収集・解析、 情報提供を行っている。また国内外の関連機関と連携し、公衆衛生におけるウイルス検査の技術向上・標準化等を支援している。公衆衛生に携わる公的機関の職員を対象にウイルス検査に関する講習の立案・遂行、 新規検査法の研究などを行っている。

各室の業務、研究、作業は、独立した個別のテーマもあるが、その多くは各室のスタッフが、それぞれが重なり合い、協力し合いながらテーマ別に集合して取り組んでいることが多い。したがってそれぞれの業務研究行政等について各室別に業務研究内容表すのではなく、今年度は以下のような項目に分類して、情報センターのこの１年間の活動内容を記した。

Ⅰ．感染症発生動向調査事業の実施および情報の還元
Ⅱ．感染症発生動向システムの改善
Ⅲ．感染症発生動向調査事業に関する応用研究・業務
Ⅳ．感染症危機管理対策、集団発生・広域流行への連携および対応に関わる事業・研究
Ⅴ．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
Ⅵ．感染症の疫学等の研究
Ⅶ．予防接種、薬剤等に関連した研究・業務
Ⅷ．病原体の病態および診断に関連した研究
Ⅸ．電話、メールによる問い合わせ・メディアへの対応業務、その他

その詳細については以下それぞれの項目別に記されている。

平成 14 年 3 月より新たな感染症 SARS がアジアを中心に世界的な拡がりをみせた。我が国においてもその対応に追われたが、感染症情報センターは発足以来の経験および各方面との交流を生かし、新たな疾患に対する情報の収集、分析、情報提供を行い、国内外での現場における疫学調査協力と対応への協力、国内の行政対応・医療現場での対応への協力、国際的対応への貢献と協力などを広範に行った。全体からみれば決して十分とはいえないが、情報センターは常勤スタッフ、非常勤スタッフ、FETP グループなど総動員でこれに当たり、現有能力の 100 %以上を発揮し相当の役割を果たしたと自負している。またこれをきっかけに主任研究官 6 名の増員が認められたが、これらの経験とスタッフの増加は、平成 16 年に入りアジアを中心に世界的に流行した、家禽類を中心にした鳥インフルエンザの発生とベトナム・タイでの人感染例の発生、そして我が国での養鶏場などでの鳥インフルエンザの発生および人感染の懸念に対する調査、研究、対応に生かされた。

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）
内閣府食品安全委員会専門委員
（肥料・飼料等専門調査会委員
緊急時対応専門調査会専門委員）
農林水産省食料・農業・農村政策審議会臨時委員

情報センターにおける平成 15 年度の常勤スタッフの人事異動は以下のようであった。

平成15年4月厚生労働省情報管理専門官進藤義宏が着任。

平成15年7月感染症情報センターリサーチレジデント（HS 財団）より重松美加、同年 8 月大阪大学経済学部より大日康史、同 10 月東京大学医学部第一外科学教室より森兼啓太、平成16年3月米国疾病予防対策センター(CDC)予防接種プログラム部門より田中政宏が、それぞれ主任研究官として着任。

平成15年9月感染研ウイルス２部より田中幸江が情報センター主任研究官に配置転換。

平成15年3月小坂健主任研究官が厚生労働省老人保健課へ、江頭圭三主査が国立精神神経センター精神研究所へ異動。

WHO ジュネーブ本部感染症サーベイランス・対応部門出向中の進藤（鈴木）奈邦子は、継続して滞在。

業務・研究業績

Ⅰ．感染症発生動向調査事業の実施および情報の還元

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として、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、谷口清州、多田有希、小坂健、橘戸円、重松美加、FETP研修生、江頭圭三、大竹由里子、松岡静香]

２．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：2003年 1月－2003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10,083、検疫所1,706、都市立感染症指定医療機関539であった。ウイルス（リケッチア，クラミジアを含む）に関しては15,596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24巻）および第24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、欧文による1999年年報が、Japan J. Infect. Dis., 2000 Vol.53 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]

３．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、2003年４月号：アメーバ赤痢、5月号：流行性耳下腺炎、6月号：腸管出血性大腸菌感染症、7月号：日本脳炎、8月号：サルモネラ症、9月号：HIV/AIDS、10月号：SARS、11月号：インフルエンザ、12月号：ノロウイルス、2004年1月号：感染症法改正、2月号：デング熱、3月号：麻疹である。［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、多田有希、岡部信彦、谷口清州、重松美加、多屋馨子、伊藤健一郎、西尾治、井上栄、渡邊治雄（細菌第一部）、寺嶋淳（細菌第一部）、泉谷秀昌（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）、高崎智彦（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）、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）、野崎智義（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）、石川直子（国際協力室）、山本茂貴（国立衛研）、奥村二郎（企画主幹）、倉田毅（副所長）、吉倉廣（所長）、中里栄介（厚生労働省）、河村成彦（厚生労働省）、金井要（厚生労働省）、黒野健司（厚生労働省）、浅沼一成（厚生労働省）、中嶋健介（厚生労働省）]

４．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」、および平成15年11月施行の一部改正の主旨のもとに、感染症週報の発行を継続しており、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ー2件取り上げ、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、多田有希、小坂健、谷口清州、多屋馨子、重松美加、齊藤剛仁、菊池　均（成田空港検疫所）、石井俊也（成田空港検疫所）、大竹由里子、松岡静香]

５．感染症発生動向調査事業年報 CD-ROM 版データ集（2002/1-2002/12）の発行

感染症法が施行されてからの感染症発生動向調査の確

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(2002/1-2002/12) を平成 16 年 3 月に発行した。疾患の詳細分類、推定感染地毎の分類を行い、さらに新たにデータの経年変化を追加するなど、内容の充実を図った。［岡部信彦、木村幹男、谷口清州、多田有希、多屋馨子、小坂健、重松美加、FETP 研修生、加藤信子、進藤義宏、江頭圭三］

６．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。

（４） 地方衛生研究所と検疫所の検査情報担当者メーリングリストを整備し、毎月の予定についての連絡、バージョンアップやインフルエンザ検査担当者や SARS 検査担当者への連絡に活用した。［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］

Ⅱ．感染症発生動向調査のシステムの改善

１．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､不具合修正と機能追加のためプログラムの改善を行った。検出病原体コードの追加・修正および 2003/04 インフルエンザシーズン用抗血清コードを追加した Version4.60 を平成 15 年 10 月に、さらに感染症法改正に暫定的に対応するため検出病原体コード、診断名コードなどを追加修正した Version4.61 を平成 16 年 1 月より運用開始した。［山下和予、齊藤剛仁、徳永真里子、加藤信子、赤塚昌江］

２．感染症法改正に関する技術的支援

感染症法の 5 年目の改正に関して、サーベイランス技術ワーキンググループの事務局として、サーベイランス対象疾患の評価と見直しを行い、また、実際のサーベイランスシステムの運用上の評価を行い、必要な改善点につき、厚生労働省に対して、技術的な支援と勧奨を行った。［岡部信彦、谷口清州、木村幹男、重松美加、森兼啓太、大日康史、小坂　健、多田有希、新井　智、大山卓昭、砂川富正、FETP 研修生 4 期&5 期］

３．赤痢菌の同定検査の問題点についての緊急アンケート

平成 15 年度の衛生微生物技術協議会で､他の菌が赤痢菌と誤同定される事例が報告されたことから、赤痢菌検査の実態と問題点を明らかにするためアンケートを実施した。内容は誤同定の件数・推定原因、地方衛生研究所でのチェック体制、現場(病院・検査所・保健所)との連携等である。オンラインシステムによって細菌検出情報が寄せられている地研７１施設に送付し、全てから回答があった。

（１）簡易同定キット・全自動同定機では赤痢菌の鑑別は困難なこと、（２）赤痢菌を経験している機関が少ないこと、（３）遺伝子診断が導入されていないことから、赤痢菌と同定した場合はすべて地研に送って確認するのが妥当と思われた。

菌株送付の根拠については保健医療局長通知(1999 年 3 月 31 日付)[感染症発生動向調査実施要領]が一番の根拠となっているが、現在の通知では不十分であることが浮かび上がった。「可能な範囲で」の文言を通知からはずすだけでは周知徹底されないので、行政・検査機関・保健所・地研の役割を明らかにした新しい通知の必要がある。

［山下和予、吉川昌江、野地元子、齊藤剛仁、伊藤健一郎、岡部信彦、寺嶋淳(細菌第一部)、廣瀬健二(細菌第一部)、渡邊治雄(細菌第一部)］

Ⅲ．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

厚生労働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　谷口清州)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、木村幹男、多田有希、山下和予、橋戸円、大山卓昭、砂川富正、小坂健、重松美加］

２．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

全数報告疾患のうち２類および４類の一部について、1999 年 4 月から 2003 年 12 月までの報告情報の解析を行い、感染症学会、国際旅行医学会などで発表し、情報の還元および今後の改善課題について検討した。［小坂健、重松美加、谷口清州、永井正規（埼玉医大）］

３.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]

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・鳥インフルエンザ関連緊急情報、インフルエンザキャンペーンなどのインターネットホームページのへの掲載、更新、維持

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・鳥インフルエンザ関連緊急情報、およびインフルエンザキャンペーンなどのページについても内容を検討し､HTML ファイルの作成、維持管理を行った。[大竹由里子、松岡静香、小坂健、重松美加、森兼啓太、加藤信子]

５．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提供した。[岡部信彦、木村幹男、谷口清州、多屋馨子、多田有希、新井智、小坂健、重松美加、森兼啓太、大日康史、田中政宏、大山卓昭、砂川富正、齊藤剛仁、FETP 研修生 4 期＆5 期]

６．食品と微生物におけるリスクアセスメント

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（国立医薬品食品衛生研究所)]

７．性感染症（ＳＴＤ）発生動向調査の評価と解析

現行のＳＴＤ発生動向調査に関して、定点の妥当性等を含め、その信頼性を調査研究するとともに、わが国の近年のＳＴＤの最近の動向を解析した｡[橋戸円､小坂健、中瀬克己]

８．院内感染対策サーベイランス事業の支援

厚生労働省事業として行われている「院内感染対策サーベイランス」を支援する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」内の分担研究班:「院内感染サーベイランスにおける解析結果の還元・提供に関する研究」および「手術部位感染症における効果的な感染症発生動向の把握と感染症リスク因子解析に関する研究」に対して横断的に担当し、解析結果のフィードバックに関するアンケート調査や、入力支援・データ提出・解析・フィードバックの流れを一元的に管理できるソフトウエアの開発に参画した｡[森兼啓太、谷口清州、岡部信彦、荒川宜親（細菌第 2 部)、小西敏郎（NTT 東日本関東病院)、針原康（同)、システムプラニングコーポレーション株式会社、黒野健司（厚生労働省医政局指導課)、溝口達也（同)]

Ⅳ．感染症危機管理対策、集団発生・広域流行への連携および対応に関わる事業・研究

１．院内感染アウトブレイクへの対応に関する研究

厚生労働科学特別研究事業「医療機関における院内感染対策の基盤整備に関する緊急特別研究」において、医療機関における院内感染のアウトブレイクへの対応・連携や調査方法に関する研究を行った。当センター (FETP) の対応事例や文献調査およびアメリカ疾病制御予防センター(CDC)での対応方法の聞き取り調査による情報収集ののち、院内感染アウトブレイク時の対応に関する指針を作成した。この指針は、各医療機関の日頃の備えとして、また保健所などが各医療機関からの援助要請への対応に関する備えとして､有用であると考えられる｡また、アウトブレイクの早期察知に役立つ日常の院内感染サーベイランスに関するアンケート調査も行った｡[森兼啓太、上野久美、砂川富正、大山卓昭、中島一敏（大分大学)、安井良則（大阪府堺市保健所)、神谷 元、横田恭子（聖路加国際病院)、西岡みどり（国立看護大学校)、戸谷真理子、谷口清州、岡部信彦]

２．院内感染発生時の報告に関する研究

厚生労働科学特別研究事業「国、自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究」において、「生物別、感染部位別院内感染発生時の報告のあり方に関する研究」分担研究班に参画し、病原体特異的な院内感染アウトブレイクの定義づけや報告に関する提言を作成した。[森兼啓太、大久保憲（NTT 西日本東海病院)、小林寛伊（NTT 東日本関東病院）]

３．インフルエンザ流行期におけるインフルエンザ総合対策（強化サーベイランス、電話、メール問いあわせおよびウェブ情報の提供）

厚生労働省インフルエンザ総合対策の一環として、インフルエンザの発生動向調査に基づく注意報警報システム、インフルエンザ様疾患の迅速報告システムと死亡報告システムを運用、解析、情報提供するとともに、インフルエンザのＱ＆Ａを更新し、医療従事者以外の要望の強い情報も提供した。また、本年より、インフルエンザホットライン業務は医療関係者および地方行政関係者を対象とし、12 月から 3 月までの平日日中時間帯に実施した。［岡部信彦、谷口清州、多屋馨子、重松美加、森兼啓太、大日康史、松岡静香、木村幹男、小坂健、多田有希、新井智、荒木和子、大山卓昭、砂川富正、FETP 研修生 4 期&5 期]

４．SARS に対する情報収集と対策

2003 年第一四半期を中心にアジアの国々で大流行した新興感染症、SARS に対し、2003 年末から 2004 年にかけての再流行が懸念された。日本で SARS 患者が発生した際の公衆衛生的初期対応や、集団発生を想定した院内感染対策などを立案した。WHO、CDC を始め各国が随時発出する情報を常時監視し、適宜日本語に翻訳するとともにそれらを対策立案に反映させた。情報センターのホームページには、医療従事者のみならず国民からのニーズの高い「SARS に関する Q&A」や、医療従事者・病院管理者・公衆衛生部局向けとなる「SARS に対する公衆衛生的対応および院内感染対策」などの文書、および前述の翻訳文（約 200 文書）を掲出し、広く情報提供に努めた。また、流行間期には事前対応型対策の一環として、「非流行期における SARS 対応のガイドライン」をウェブ上に発表した。リスクコミュニケーションとして、情報センター長を中心に、報道機関への連日、あるいは毎週のブリーフィングを行い、社会への正確で、迅速な情報の提供と、科学的知識の普及に努めた。また、厚生労働省、地方自治体や医師会、病院などの要請に応じて、地域での SARS 対策講習会に講師を派遣して、地域での対策に協力した。[重松美加、森兼啓太、大日康史、小坂　健、多田有希、松岡静香、新井智子、上野正浩、上野久美、増田和貴、島田靖、逸見佳美、森伸生、吉田英樹、砂川富正、中島一敏（大分大学)、大山卓昭、木村幹男、多屋馨子、谷口清州、岡部信彦]

５．トリインフルエンザの汎アジア的発生に対する情報収集とヒト流行への予防的対策

2003 年末から 2004 年にかけ日本を含むアジアの国々でトリインフルエンザ（H5N1）が発生した。ヒトへの感染が確認されたタイ・ベトナムを統括する WHO から現地情報収集・解析にあたるスタッフ派遣の要請があり、これに応じて約 1 ヶ月づつ 3 名を WPRO へ派遣した(上野正浩、上野久美、増田和貴)。また、WHO や各国衛生主管部局より発せられる情報の整理を行うために 1 月初旬から 3 月中旬まで毎朝ミーティングを持ち、スタッフ間の情報共有に努めた。必要な情報は日本語に翻訳して情報センターのホームページに迅速に掲出し、国民の情報ニーズに対応することができた。また、SARS 同様に、定期的なメディア・ブリーフィングを実施し、リスクコミュニケーションの向上を図った。並行して、日本でトリインフルエンザのヒト感染が発生した際に備えた初期対応マニュアルや、大規模な感染を想定したガイドライン策定を行った。[重松美加、森兼啓太、大日康史、上野正浩、上野久美、増田和貴、島田　靖、逸見佳美、森伸生、吉田英樹、砂川富正、中島一敏（大分大学)、大山卓昭、谷口清州、岡部信彦]

６．国際的感染症集団発生事例に対する調査協力

香港における重症急性呼吸器症候群の流行に対して、世界保健機関の要請を受けて、メトロポールホテルでの感染拡大、院内感染事例、およびアモイガーデンにおける集団発生に対して、調査協力を行った。[砂川富正、中島一敏（大分大学)]

重症急性呼吸器症候群の中国での 2003 年の集団発生事例に対し、世界保健機関西太平洋事務局からの要請を受けて、院内感染対策、疫学調査手法、サーベイランス、検査室におけるバイオセーフティ対策について、北京市および広西チワン自治区での調査協力を行った。［重松美加]

Ⅴ．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 5 年目となり、平成 15 年 9 月 3 期生 1 名（鈴木里和)、平成 16 年 3 月 4 期生（島田靖、逸見佳

美、森伸生、吉田英樹）が研修終了した。平成 15 年 4 月、5 期生 3 名（上野久美、上野正浩、増田和貴）を迎えた。また平成 13 年度から Dr.John Kobayashi（Washington University, 米国）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 15 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。

- 学童を中心とした麻疹集団発生事例（宮崎県都城市）
- SARS 感染台湾人医師についての事例（大阪府大阪市）
- 成人麻疹集団発生事例（長野県長野市）
- 施設内細菌性赤痢集団発生事例（東京都足立区）
- 無菌性髄膜炎・脳炎集積事例（兵庫県伊丹市）
- 施設内病原性大腸菌 ０１５７感染症集団発生事例（福岡県福岡市）
- 鳥インフルエンザ拡大予防事前対応（京都府）

（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（John Kobayashi；4 月）とともに、熱帯感染症および旅行医学（Robert Steffen；6 月）、国際的なインフルエンザ予防対策および SARS 対応（Timothy Uyeki；7 月）、バイオテロリズム事前対応および大規模感染症対応事例（Michael Bruce；8 月）、予防接種対象疾患の予防対応の実際（Mark Dworkin；2 月）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、青森県、岩手県、福岡県、秋田県、奈良県）での講義・討論をおこなった。

（5） 感染症疫学研究

平成 15 年度に研修終了した 3 期生および 4 期生が以下の長期プロジェクト研究発表をおこなった。

- ワールドカップ開催時の症候群サーベイランスの評価（鈴木）
- 東南アジア（特にミャンマー）におけるマラリアコントロール（案）（島田）
- 研修医及び医学生における予防接種対象疾患（特に麻疹）の抗体保有状況とその意識調査（逸見）
- 学童における麻疹集団発生予防のための提言（森）
- VRE 院内感染対策にむけての体言（吉田）

（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
- 風疹症例増加に対する予防接種推奨とそれに伴う先天性風疹症候群の対応、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、公衆衛生・医療関係者からの SARS に関する問い合わせに対応した。

２．希少感染症診断技術向上事業に関する業務

平成 15 年度は対象疾患として、ブルセラ、野兎病、Q 熱、レプトスピラ、回帰熱、エキノコッカス、深在性真菌症、ボツリヌス、A 型、E 型肝炎、SARS, ウエストナイル熱、天然痘、リッサ、ニパウイルス、高病原性鳥インフルエンザが取り上げられた。

研修会は平成 16 年 2 月、当感染研で 2 日間開催され、56 地研が参加した。それぞれの疾患は細菌 1 部、2 部、獣医科学部、ウイルス 1 部、2 部、3 部、寄生動物部、感染症情報センター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（カンピロバクター、エンテロウイルス、レジオネラ、寄生虫、アデノウイルス、ジフテリアおよび百日咳、レンサ球菌）の運営が国立衛研、東京都健研センター、ウイルス 2 部、細菌 1 部、2 部、寄生動物部、感染症情報センターおよび各地方衛生研支部の協力でなされた。[稲田敏樹、橋戸円、渡邊治雄（細菌部)]

３．国立保健医療科学院による特別課程細菌コースの実施

国立保健医療科学院による特別課程細菌コースとして、平成 16 年 1 月 13 日から 2 月 13 日に、感染症研究所村山分室で研修会を行った。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、細菌学の体系的な理解と現状に対応した新しい知識及び技術の習得を目的としている。参加者は、保健所 12 名・地方衛生研究所 17 名・中核市保健所 3 名の合計 32 名であった。本研修は感染症情報センターを初めとして、感染研関連各部室、本省感染症対策課、横浜検疫所輸入食品検査検疫センター、東京都安全健康研究センター、神奈川県衛生研究所、佐賀県唐津保健所、結核研究所、杏林大学、帝京大学、BML 総合研究所 、海事検定協会の支援・協力を得て遂行された。[伊藤健一郎、西尾治、古川友子（杏林大学大学院）]

４．国立保健医療科学院による平成 15 年度特定研修
新興再興感染症技術研修の実施

国立保健医療科学院による平成 15 年度特定研修新興再興感染症技術研修として、平成 15 年 9 月 29 日から 10 月 3 日に感染症研究所村山分室で研修会を実施した。ノロウイルス検査の現状に対応した新しい知識及び技術を習得することを目的とし、地方衛生研究所または保健所でウイルスに関する業務につく 11 名が参加した。[西尾治、伊藤健一郎、杉山和良(バイオセーフテイ管理室)、篠原克明(バイオセーフテイ管理室)、永田典代(感染病理部)、波多野煜持(感染病理部)、大瀬戸光明(愛媛県立衛生環境研究所)、杉枝正明(静岡県環境衛生科学研究所)、新川奈緒美(鹿児島県環境保健センター)、齋藤美香(群馬県衛生環境研究所)]

Ⅵ. 感染症の疫学等の研究

１．ENTER-NET への参加

腸管感染症に関する海外情報のネットワークである ENTER-NET に参加し、ヨーロッパ各国よりファックスおよびインターネットにより得られるサルモネラ、腸管出血性大腸菌 0157 感染事例および菌情報の迅速収集を行うと同時に、同組織に対しては、情報センターで入手したわが国におけるこれらの菌の検出状況の提供を行い、国際情報交換の窓口となった。[小坂健、岡部信彦、渡邊治雄（細菌第一部)]

２．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（細菌第一部)、荒川英二（細菌第一部)、山本茂貴（国立医薬品食品衛生研究所)]

３．インフルエンザによる超過死亡の評価

人口動態調査の月別全死因死亡者数のデータから、「感染研」モデルを用いて、インフルエンザ流行の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を推定し評価した。2000/01 シーズン 913 人、2001/02 シーズン 1,078 人と２シーズン連続で少なかったが、2002/03 シーズンは比較的大きな流行を経験し、11,215 人を記録した。2003/04 シーズンは流行の規模は中程度で、超過死亡は 2004 年 2 月までに 2,155 人と再び減少している。2002/03 シーズンまでの結果は、病原微生物情報 vol.24,No.11, pp.8-9, 2003 で情報還元した。[大日康史、重松美加、谷口清州]

４．インフルエンザ関連死亡迅速把握に関する研究

本年度より、さいたま市を加えた 14 大都市から提供されるインフルエンザ関連死亡（インフルエンザ及び肺炎死亡）数を用い、「感染研」モデルと同種の超過死亡推定モデルを適用し、各都市ごとの週単位の超過死亡を推定し、迅速な情報還元を行った。昨年以前のデータのある 13 大都市における死亡の状況は、２月遅れの人口動態から推計した結果とよく相関し、この情報は、インフルエンザにおける超過死亡の早期警戒に有用であると考えられた。4 年目の本年度は、初めてシーズン中に、かつデータ入手後 3 日以内のウェブによる還元を実現した。[大日康史、重松美加、谷口清州、松岡静香、NEC、厚生労働省健康局結核感染症課、14 大都市・特別区衛生主幹部局]

５．インフルエンザによる患者数の迅速把握（毎日患者報告）事業の解析と還元システムの構築

インフルエンザ定点 5,000 の 1 割弱に相当する約 300 の定点医療機関より、インフルエンザ様症状で受診した患者数を毎日、直接に、インターネットを利用し報告を受けるシステムを構築。この情報をリアルタイムで統計学的処理し、推計罹患者数を推計したものをウェブ上で提供し、効果的な対策に役立つよう、インフルエンザの流行状況を早期に情報提供した。このデータは、休診日やその前後の影響が非常に強く、そうした曜日効果を排除するアルゴリズムに関して検討を加えた。[小坂健、谷口清州、大日康史、重松美加、松岡静香、数理システム、厚生労働省健康局結核感染症課]

６．新型インフルエンザのパンデミック対策に関する研究

数理モデルを用いて、新型インフルエンザの被害を予想し、また、それに対する公衆衛生的対応を評価、検討している。具体的には、早期の患者隔離、接触者の自宅隔離、抗インフルエンザウイルス薬の曝露後あるいは曝露前の予防投薬、抗インフルエンザウイルス薬の治療目的での使用に関する優先順位に関する研究を行っている。その成果は、Ｇ８やＷＨＯの会合で報告されている。[大日康史、重松美加、谷口清州]

７．わが国におけるエンテロウイルス重症感染症の疫学研究

厚生科学研究：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)で実施した全国アンケート調査につき集計・解析した。[多屋馨子、北本理恵、早川丘芳、新井智、逸見佳美、大山卓昭、岡部信彦]

８．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

厚生科学研究（小田島班）の分担研究3年目としてわが国のヒトメタニューモウイルス感染症に関する疫学調査、インフルエンザの疫学調査を実施した。[佐藤弘、多屋馨子、荒木和子、新井智、岡部信彦]

９．SARSに対する公衆衛生的対応の評価

数理モデルを用いて、2003年5月のSARS事例に対する公衆衛生的対応を、二次感染患者発生の確率分布として評価した。また、仮想的な公衆衛生的対応とその帰結を予想している。その成果は、2003年度公衆衛生学会で報告した。[大日康史、菊池宏幸（大阪大学大学院保健学科）]

10．SARSに対する疫学的対策に関する研究

厚生労働省新興再興感染症研究事業として「SARS特別研究（主任研究者　吉倉廣)」の分担として、SARSに対する医療機関における対応、一般社会における公衆衛生対応や非流行期におけるガイドラインを策定するために、これまで発表された文献や資料をレビューし、基礎的な検討を行った。また、SARSの再興に備えて、電子サーベイランスシステム（eSARS）を計画、開発した。[岡部信彦、谷口清州、小坂健、重松美加、大日康史、森兼啓太、砂川富正、中島一敏(大分大学)、安井良則(堺市保健所)、大山卓昭、多田有希、木村幹男、多屋馨子、新井智、FETP5期生]

11．展示動物などからの動物由来感染症感染リスクに関する研究

展示動物から従業員及び来園者に動物由来感染症の感染リスクが存在するか展示施設に対してアンケート調査を実施した。また、感染症流行予測調査事業の結果を基にした日本脳炎ウイルスの侵淫状況の評価を行った。また、感染症発生動向調査報告結果を基にしたエキノコックス症のサーベイランスの評価を実施した。[新井智、多屋馨子、岡部信彦、大山卓昭、中島一敏(大分医科大学微生物学講座、FETPJ)、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)、高崎智彦(ウイルス一部)、倉根一郎(ウイルス一部)、山田章雄(獣医科学部)]

Ⅶ．予防接種、薬剤等に関連した研究・業務

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14年度(2002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15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6月10日から11月28日までほぼ毎週（合計16回）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31日から2月10日まで計3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15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15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）　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、佐藤弘、早川丘芳、北本理恵、岡部信彦]

２．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14年採血分として平成15年度に受け入れた血清は、計3,991本であった。また、平成15年職員血清として計534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

3件の研究に対して払い出し依頼があり、年度内に2件の研究に対して計2,147本の払い出しを行った。

（３）　血清銀行運営委員会設立（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、事務局担当を行った。血清銀行血清使用申請書を作成した。血清銀行を倫理委員会に申請するための準備を行った。

（４）　保管血清の管理を行った。

[多屋馨子、荒木和子、田中幸江、新井智、早川丘芳、岡部信彦]

３．予防接種情報公開に関する業務

（１）　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2003を公開した。

（２）　感染症情報センターHP予防接種のページを全面

改定した。
（3） 風疹ワクチンキャンペーンポスターを作成した。
（4） ワクチン情報（研友企画出版）11 月 21 日号４面：多屋馨子:風疹　予防接種を受けよう.ワクチン接種率が低い現在の 16～24 歳.　妊娠初期に感染すると赤ちゃんに悪影響を掲載
（5） ワクチンインフォメーション（協和企画）依頼原稿
（6） 日本学校保健研修社月刊「健」編集部「今年の冬流行が予測されるインフルエンザをはじめとした感染症」Q&A 依頼原稿
（7） 笑顔.　水痘ワクチンに関する Q&A
［多屋馨子、新井 智、松岡静香、岡部信彦］

４.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］

５．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］

６．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、その後、名和行文）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充実させた。
また、平成 15 年度には市民公開講座「海外旅行での感染症に対する備え」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 年度に発行した「寄生虫症薬物治療の手引き 2003 年改訂第 5 版」については、その後数回にわたり小規模な改訂を行い、これらは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した。［木村幹男］

７．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 3 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、狂犬病)の測定について研究した。［多屋馨子、橋本迪子（東京検疫所)、新井智、荒木和子、田中幸江、木村幹男、岡部信彦］

８．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］

９．わが国における麻疹の疫学研究
麻疹ワクチン、MMR ワクチンの接種率の推移と患者発生に関連した疫学研究を実施した。また、高齢者の抗体保有率に関して、青壮年期、乳幼児期のそれと比較検討した。［多屋馨子、新井智、佐藤弘、荒木和子、北本理恵、早川丘芳、稲松孝思（東京都老人医療センター)、岡部信彦］

10．風疹・麻疹の抗体調査及び抗体測定方法の比較
医科大学の学生及び附属病院の研修医を対象に、風疹及麻疹に対する抗体の保有状況を調査した。また、風疹は赤血球凝集抑制試験と酵素抗体法、麻疹はゼラチン粒子凝集法と酵素抗体法の抗体測定方法の違いによる成績について比較検討した。［佐藤 弘、多屋馨子、逸見佳美、新井 智、砂川富正、中島一敏、大山卓昭、岡部信彦］

11．インフルエンザワクチン需要予測
インフルエンザワクチンの生産本数を決定するために、世帯調査を実施し、そのコンジョイント分析から予測を行う。特に昨年度は、SARS や鳥インフルエンザの流行という仮想的状況を評価した。［大日康史］

12．高齢者のインフルエンザ予防接種への公費補助の政策評価
高齢者のインフルエンザ予防接種の公費補助における政策評価をその費用対効果から分析した。具体的には、市町村間での公費補助（自己負担額）の違いから、接種率の違いを説明し、接種率の違いが肺炎あるいはインフルエンザにおける死亡率の違いを説明している。この研究成果は、2003 年度 International Conference of Emerging Infectious Disease で報告した。［大日康史］

13．混合ワクチンの品質確保に関する研究
厚生科学研究医薬安全総合研究事業（宮村班）の分担研究 1 年目として、不活化ポリオワクチンの開発に関して検討した。［多屋馨子、新井智、武田直和（ウイルス第二部)、宮村達男（ウイルス第二部)］

14. ポリオワクチンの効果に関する研究

厚生科学研究新興再興感染症研究事業：ポリオ及び麻疹の現状とその予防接種の効果に関する研究（加藤班）の研究協力者として、ポリオウイルス感受性調査を実施した。[長野秀樹（北海道立衛生研究所)、沖村容子（宮城県保健環境センター)、水田克巳(山形県衛生研究所)、岩井雅恵（富山県衛生研究所)、山下照夫（愛知県衛生研究所)、岡本玲子（山口県環境保健研究センター)、近藤玲子（愛媛県立衛生環境研究所)、多屋馨子、佐藤弘、新井智、北本理恵、早川丘芳、岡部信彦、清水博之（ウイルス第二部)、宮村達男（ウイルス第二部)]

15. 水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業（岡部班）の研究の一環として、水痘-帯状疱疹、流行性耳下腺炎に関する基礎、臨床、疫学的研究を実施した。[岡部信彦、多屋馨子、大日康史、砂川富正、中島一敏、多田有希、重松美加、森兼啓太、佐藤弘、新井智、森伸生、荒木和子、安井良則（堺市保健所)、藤井史敏（堺市保健所)、越田理恵（金沢市）金子隆（都立清瀬小児病院)、一戸貞人（千葉県衛生研究所)、齋加志津子（千葉県衛生研究所）]

16. バイオテロ（天然痘）の被害予想と公衆衛生的対応の評価

数理モデルを用いて、バイオテロの被害を予想し、また、それに対する公衆衛生的対応を評価、検討している。具体的には、予防接種の方式として追跡接種か集団接種のどちらが効率的かを、Ｒ０および初期曝露者数毎に判断した。その成果は、2004 年度感染症学会で報告されている。[大日康史、谷口清州、大久保一郎（筑波大学）]

17. 生物学的製剤に起因する感染症に関する安全性関連情報収集業務

移植片、輸血、タンパク製剤など生物由来の医療関連材料によると考えられる感染症を、早期に把握し、情報提供することにより、健康被害の拡大を防ぐことを目的とした情報収集と、そのためのシステム構築を開始。2000 年以降の国内および、2003 年以降の海外の文献情報を遡り検索し、関連情報をデータベース化した。2003 年 9 月以降は、報道機関ニュースと、各国および国際的機関の公式情報を毎日、国内外の文献情報を定期的に収集し、生物学的製剤に関連を検討評価し、データベースに蓄積した上で、事務局として、生物学的製剤由来感染症評価検討委員会へ提出し、その調査、対応の緊急性を評価し、関係諸機関へ報告した。[谷口清州、重松美加、多屋馨子、加藤信子、柴田博子]

18. 国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究

厚生科学研究（竹森班）の研究協力として、風疹の抗体測定調査を実施し，また風疹抗体測定方法について赤血球凝集抑制反応と酵素抗体法の成績を比較検討した。[佐藤 弘、多屋馨子、逸見佳美、大山卓昭、岡部信彦、竹森利忠（免疫部）]

Ⅷ. 病原体の病態および診断に関連した研究

１．腸管付着性大腸菌

（１） 局在性付着大腸菌の検査法

局在性付着大腸菌の標準的生物活性測定法である FAS 試験を検討した。培養細胞に接種すると菌体の直下に F-アクチンの再集合が起こるが、それを FITC-ファロイジンで染めて観察する。細胞には形態の維持等に F-アクチンが存在していて、それとの鑑別が難点であったが、菌体を DAPI で同時に染色することで判定が容易となった。[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。漬物に加え、茹で麺、生カキを対象とした。下痢原性大腸菌分離を目的に、生カキ 36 検体を調査した。19 検体（52.8%）が陽性であった。3 検体が基準（食品衛生法、生食用生カキの規格基準：最確数 230/100 グラム以下)をオーバーしていた。また、セレウス菌分離を目的に、浅漬け 37 検体と麺類 19 検体を調査した。陽性がそれぞれ8件(21.6%)と6件(31.6%)で、分離されたセレウス菌はほとんどがデンカ生研のエンテロトキシンキットで陽性であった。[伊藤健一郎、森屋一雄（佐賀県唐津保健所）]

２．リアルタイム PCR (SmartCycler)による迅速診断法の開発

（１） 赤痢菌

侵入性に関連する *ipaH* 及び *invE* 遺伝子を対象とした。ABI-Prism7000 及び LightCycler でも使用できる。

（２） 大腸菌

耐熱性腸管毒素 *astA* 遺伝子を対象とし。最初に凝集性付着大腸菌から発見され、広く大腸菌に分布していることがわかっている。下痢起因菌としてはまだ明らかではないが、既知の病原因子としてこの遺伝子のみを持つ大腸菌が集団下痢症から分離される事例が経験されている。

（３）ペスト菌

ペスト菌に特異的といわれる 3a 配列を対象とした。[伊藤健一郎、原田誠(横浜検疫所輸入食品検査検疫セン

ター)]

３．ELISA を用いた肺炎球菌抗体価測定法の改良および評価

ELISA 法用いた肺炎球菌抗体測定法の評価および改良を実施した。本 ELISA 法では、ヒト血清をコントロールとして用いるため、ヒトの免疫血清を大量に必要とする。そこで、ヒト以外の動物血清を標準血清として使用できないか検討した。免疫動物としてはウサギを使用し、肺炎球菌ワクチンを接種してその免疫血清をコントロール血清として使用できないか検討した。[新井智、佐藤弘、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]

４．肺炎球菌臨床分離株の性状解析

呼吸器系基礎疾患を有する患者から分離された肺炎球菌について、血清型の決定および薬剤感受性の測定を行った。[佐藤弘、新井智、永井英明(国立療養所東京病院)、齋藤若奈（国立療養所東京病院)、斉藤剛（BML)、大石和徳（長崎大学熱帯医学研究所)、岡部信彦]

５．ダニ媒介性不明熱疾患の解析

ダニによる刺咬後、熱症状を呈するダニ媒介性不明熱疾患の診断および感染リスクの解析を実施した。対象としては、バベシア原虫、エルリキア、およびその他ダニによって媒介される可能性のある病原体の遺伝子診断の方法を検討した。バベシア原虫、エルリキアについては候補となる遺伝子を特定した。更に、既にダニ媒介性疾患が常在している地域の侵淫状況などを調査した。[新井智、田原研司(島根環境研)、板垣朝夫(島根環境研)、辻正義(酪農大)、石原智明(酪農大)、岡部信彦]

６． アデノウイルス診断法の開発
(PCR 法によるアデノウイルス血清型の同定)

大量のアデノ検体を扱う実験室では、ウイルス分離、同定に時間がかかるため、簡便で感度、精度とも高い検査法の開発が要求される。昨年に引き続き、ヒトアデノウイルスＣ亜属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ところ、全ての血清型が同定できた。

また、難同定の分離株は、それに見合う抗血清が用意されていないか、あるいは中和試験における、ウイルス変異の可能性がある。この際、まずその亜属（種）を決定することは以後の同定作業を進める上で有効である。Xu らの開発した種特異的プライマーを用い、難同定分離株および臨床分離株の血清型の予想を試みたところ、時間やコストの短縮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]

７．PCR 増幅によるアデノウイルス 40、41 核酸の型分け

乳幼児性急性胃腸炎の原因ウイルスのひとつである、アデノウイルス 40､41 型は分離､同定作業が困難である。迅速診断のために PCR 増幅によるアデノウイルス 40、41 核酸の型分けを検討した。アデノウイルスの中和抗原を担うヘキソン（Hx)、ファイバー（Fib）遺伝子の塩基配列、アミノ酸綴りは 40 型 41 型とも酷似しているがそれぞれ区別可能な領域を見出し、増幅域を決定した。

40 型標準株（Dugan）41 型標準株（TAK）は Hx、Fib 両遺伝子とも特異的に設定したプライマーで増幅した。

1982 年から 1992 年に日本で分離､同定された 40 型 41 型 20 株では概ね良好な結果になった。一部中和同定と思われる結果と一致しない型､株もみられた。2004 年 ELISA で 40/41 型となった株は培養細胞での分離の有無にかかわらず全て 41 型であった。

[向山淳司、稲田敏樹、A.K.Adhikary、西尾治、岡部信彦(感染研)、北堀吉映（奈良保環研)、大瀬戸光明（愛媛衛研)]

８．不死化ツパイ腎臓細胞のロタウイルス及びカリシウイルスの感受性

不死化したツパイ（喰虫目、ツパイ科）の腎臓細胞(TK 細胞)に種々のウイルスを感染させ感受性の有無を調べている。下痢症系のウイルスが感染増殖するかどうかを見る目的で、ロタウイルス及びカリシウイルス科アストロウイルスを感染させた。両ウイルス共、感染時にアセチル･トリプシンを加えた。ロタウイルスの細胞変性(CP)は一週間で出現し、抗ロタウイルス抗体を用いた蛍光抗体反応によりロタウイルスの感染増殖が確認できた。アストロウイルスの CP の出現は感染後二週間を要した。五代継代して馴化を試みたが CP 出現までの日数は短縮されなかった。ウイルス材料を希釈すると CP はドーズレスポンスを示した。現在、蛍光抗体法による確認を行っている。[田中幸江、向山淳司]

９．ヒトコロナウイルスの分離同定

三重県における急性胃腸炎の集団発生事例（1997 年）から検出されたコロナウイルスの培養および遺伝子の検出を試みた。[松野重夫、荒木和子、矢野拓弥（三重県科学技術振興センター衛生研究所）]

10．エンテロウイルスの同定法の検討

無菌性髄膜炎および不明発疹症の患者から得られた臨床検体からエンテロウイルスの分離同定および遺伝子診断を行うとともに、エンテロウイルス検出同定法の検討

を行った。[荒木和子、小林正明（小林小児科医院)]

11. ノロウイルスの検出法作成

食品およびふん便からの RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法によるノロウイル検査法を改良し、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課から全国の衛生研究所等に通知した。[西尾治]

12. 学校等におけるウイルス性集団発生の防止法の確立に関する研究

文部科学省科学研究研究班として、学校で集団発生を起こし、社会的に問題となっているノロウイルスの防止策に取り組んだ。[西尾治、藤本嗣人(兵庫県立健康環境科学研究センター)]

13. 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、昨年度までに 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構築した。今年度はアストロウイルスとサポウイルス検出のイムノクロマト法の開発を目的とし、アストロウイルスでは診断に用いることができると判断され、サポウイルスは検出の可能性が見出された。[西尾治、大瀬戸光明（愛媛県立衛生環境研究所)、高浜洋一（国際試薬株式会社)、一口毅（国際試薬株式会社)]

14. 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安全確保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し、食品の安全性の確保に努めた。[西尾治]

15. 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]

16. 内閣府食品安全委員会専門委員の任命を国より受けた。[西尾治]

Ⅸ. 電話、メールによる問い合わせ・メディアへの対応業務

１．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、SARS、インフルエンザ、風疹、麻疹、下痢症ウイルス等、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。[岡部信彦、谷口清洲、重松美加、木村幹夫、多屋馨子、新井智、稲田敏樹、伊藤健一郎、西尾治]

２．メデイアへの対応

通常のメデイアへの対応は、情報センター内において対応者を決め、取材等に応じている。しかし SARS 発生対応時には、多数のメデイアからの取材申し込みに個別の対応は困難となり、１週間に１回定期的にメデイアの対する情報の提供、解説、意見交換などを行うことを試みた。感染研の公式見解、公式発表、記者会見と言うことではなく、あくまでも感染症情報センターがセンター長を責任者として、感染症としての付加的説明を行うという形式をとり出席希望社（者）にはこの点を了解してもらった上で取材届けを提出してもらった。

SARS が落ち着いた後もこの形式の説明会継続を望む声が多かったため、Risk communication の新たな試みとして、情報センター・メデイア感染症情報交換会と仮称して月１－２回程度の回数で、時に他部の応援を求めながら定期的に行っている。[岡部信彦、情報センタースタッフ一同]

Ⅹ. 検査実施状況

	行　政	研　究	合　計
ウイルス分離同定	0	１００	１００
核酸・抗原検出	0	７２９	７２９
血　清　反　応	0	５８９	５８９
合　　計	0	１４１８	１４１８

平成 15 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
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-H15.9.30	医師
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
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-	国立保健医療科学院
安井良則	協力研究員	H14.3.1-	大阪府堺市保健所
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
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-	チタゴング大学
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-H15.4.10	(財)日本冷凍食品検査協会
上野久美	協力研究員	H15.4.1-	東北大学
上野正裕	協力研究員	H15.4.1-	東京医科歯科大学
増田和貴	協力研究員	H15.4.1-	東京都健康局
阿部陽子	協力研究員	H15.10.1-H16.3.31	(財)日本冷凍食品検査協会
加藤由美子	協力研究員	H15.10.1-	バイオマトリックス研究所
齋藤利江	協力研究員	H16.3.1-	(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) Urashima M, Shindo N, and Okabe N.: A seasonal model to simulate influenza oscillation in Tokyo. Jpn J Infect Dis 56(2):43-47, 2003.

2) Urashima M, Shindo N, and Okabe N.: A seasonal models of hepangina and hand-foot-mouth disease to simulate annual fluctuations in urban warning in Tokyo. Jpn J Infect Dis 56(2):48-53, 2003.

3) Kamei K, Sano A, Kikuchi K, Makimura K, Niimi M, Suzuki K, Uehara, Y, Okabe N. Nishimura K and Miyaji M.: The trend of imported mycoses in Japan. J Inf. Chenother 2003, 9:16-20.

4) Harada S, Kamata Y, Ishii Y, Eda H, Kitamura R, Obayashi M, Ito S, Ban F, Kuranari J, Nakajima H, Kuze T, Hayashi, M, Okabe N, Senpuku H, Miyasaka N, Nakamura Y, Kanegane H, YanagiK.: Maintenanve of serum immunoglobulin G antibodies to EBV nuclear antigen2 in healthy individuals from different age groups in a Japanese population with a high childhood incidence os asymptomatic primary EBV infection. Clin Diag Lab Immunology Jan. 2004, P.123-130

5) Ohkusa, Y., Honda, C. Horizontal Inequity in Health Care Utilization in Japan. Health Care Manag Sci 6 (3); 189-196, 2003

6) Honda, C., Ohkusa, Y. Subjective Health Evaluation -Advanced Model and International Comparison-. J Pop Soc Secur (J J Soc Secur Policy) 2 (1); 24-31, 2003
http://www.ipss.go.jp/English/WebJournal.files/SocialSecurity/2003/03jun/HondaOhkusa.pdf

7) Takahashi, H. et al. Nosocomial Serratia marcescens Outbreak in Osaka, Japan, From 1999 to 2000. Infection Control and Hospital Epidemiology 25(2); 156-161, 2004

8) Tze-wai Wong, Chin-kei Lee, Wilson Tam, Joseph Tak-fai Lau, Tak-sun Yu, Siu-fai Lui, Paul K.S. Chan, Yuguo Li, Joseph S. Bresee, Umesh D. Parashar, Joseph J.Y. Sung, Nelson Lee, Jean Kim, Kitty Fung, Albert Ng, Kazutoshi Nakashima, Tomimasa Sunagawa, Keiji Fukuda, Tracee Treadwell, Udo Bucholz, M.K. Tham, Thomas Tsang. Cluster of SARS among Medical Students Exposed to Single Patient, Hong Kong. EID (2004) 10(2), 269-76

9) Murakami, Y., Hashimoto, S., Taniguchi, K., Osaka, K., Fuchigami, H., Nagai, M.: Evaluation of a method for issuing warnings pre-epidemics and epidemics in Japan by infectious diseases surveillance. J. Epidemiol., 14(2):33-40, 2004.

10) Hashimoto, S., Murakami, T., Taniguchi, K., Shindo, N., Osaka, K., Fuchigami, H., Nagai, M.: Annual incidence rate of infectious diseases estimated from sentinel surveillance data in Japan. J. Epidemiol., 13(3):136-141, 2004

11) Kano, S., Kimura, M.: Trends in malaria cases in Japan. Acta Trop., 89:271-278, 2004

12) Takahashi, H., Suzumura, S., Shirakizawa, F., Wada, N., Tanaka-Taya, K., Arai, S., Okabe, N., Ichikawa, H., Sato, T. An epidemiological study on Japanese autism concerning routine childhood immunization history. Jpn J Infect Dis. 2003. 56:114-117

13) Arai, S., Tsuji, M., Kaiho, I., Murayama, H., Wei, Q., Okabe, N., Kamiyama, T. and Ishihara, C. Retrospective Seroepidemiological Survey for Human Babesiosis at an Area in Japan Where a Tick-Borne Disease is Endemic. Journal of Veterinary Medical Science , 2003. 65:335-340

14) Amo K, Tanaka-Taya K, Inagi R, Miyagawa H, Miyoshi H, Okusu I, Sashihara J, Hara J, Nakayama M, Yamanishi K, Okada S. Human herpesvirus 6B infection of the large intestine of patients with diarrhea.Clin Infect Dis. 2003, 36(1):120-3

15) Adhikary AK ., Inada T., Numaga J.,Suzuki E., Ushijima H., Banik U., Mukouyama A., Matsuno S., Okabe N., Characterisation of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. J.Clin.Pathol. 57, 95-97; 2004.

16) Yae-Jean Kim, Yun-Kyung Kim, Jung-Yun Hong, Eun-Hwa Choi, Hoan-Jong Lee, Toshiki Inada, Madoka Hashido, Pedro A Peidra. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. J. Clin. Microbiol., 41:4594-4599, 2003.

17) Hirose K, Ito K, Arakawa E, Tamura K, Watanabe H: DNA-based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for Salmonella enterica serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP). Res Adv Microbiology 3:109-121, 2003.
18) Young-Hee L, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Ito K, Tamura K, Sung-Il K, Watanabe H: Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Jpn J Infect Dis 56:151-155, 2003.
19) Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, Munemura T, Mikami T, Kawamoto A, Akiyama M, Kato Y, Nishi K, Kozawa K, Nishio O: Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. Appl Environl Microbiol. 69(10):5782-5786, 2003
20) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H : Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. J Virol Methods. 114:37-44, 2003
21) Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H : Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J Med Virol. 69:588-594, 2003
22) Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H : Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadeic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Tailand. J Clin Microbiol. 42(3):1305-1307, 2004
23) Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H : Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections in Pakistan children with diarrhea. J Med Virol. 73:256-261, 2004

その他

1) Editorial Committee of Findings of Infectious Agents in Japan: Annual Report on Findings of Infectious Agents in Japan, 1999. Jpn. J. Infect. Dis., 53(Suppl), 2000.

２．和文発表

原著・総説・解説

1) 岡部信彦：重症急性呼吸器症候群. 病原微生物検出情報 24(4):88, 2003.
2) 岡部信彦：重症急性呼吸器症候群の現状と対策. 炎症と免疫 11(4):507-514, 2003.
3) 岡部信彦：国内外における麻疹の状況. 小児感染免疫 15(1):69-77, 2003.
4) 岡部信彦：感染症トピックス-麻疹、インフルエンザ、結核など-. 愛知県小児科医会会報 77:23-28, 2003.
5) 岡部信彦:定期予防接種. 内科 91(6):1239, 2003.
6) 岡部信彦：バイオテロ対策. 内科 91(6):1243, 2003.
7) 岡部信彦：新型肺炎 SARS:その発生から最新動向まで. Molecular Medicine 40(8):964-969, 2003.
8) 岡部信彦：SARS アウトブレイク. 感染症学会雑誌 77(8):554-562, 2003.
9) 岡部信彦：重症急性呼吸器症候群総括. Infection Control 12(9):884-888, 2003.
10) 岡部信彦：SARS の疫学と予防対策. 日本胸部臨床 62(9):773-781, 2003.
11) 岡部信彦：重症急性呼吸器症候群. 臨床医 29(10):1828-1829, 2003.
12) 岡部信彦:小児における新興再興感染症. 小児外科 35(11):1309-1313, 2003.
13) 岡部信彦：SARS の病態、疫学. 公衆衛生 67(11):814-819, 2003.
14) 岡部信彦:新型インフルエンザ出現の可能性とその予防対策. 日本臨床 61(11):1904-1908, 2003.
15) 岡部信彦：SARS の疫学. Bio Clinica 18(11):958-964, 2003.
16) 岡部信彦:感染症対策・予防接種の知識. 調剤と情報 9(12):1678-1683, 2003.
17) 岡部信彦：麻疹. 感染と消毒 10(1)3-7, 2003.
18) 岡部信彦：炭疽菌-国立感染症研究所からの最新情報-. 新潟医学会雑誌 118(2):105-110, 2004.
19) SARS 対策チーム. ＜速報＞本邦における SARS：重症急性呼吸器症候群サーベイランスへの報告例. 病原微生物検出情報（IASR） 24 (7): 156-159, 2003
20) SARS 対策チーム. ＜速報＞本邦における SARS：重症急性呼吸器症候群サーベイランスへの報告例. 感染症ニューズレターLABEAM 15 (8): 11-13, 2003
21) 重松美加、谷口清州、岡部信彦. 日本から見た SARS

ー重症呼吸器症候群：現状と教訓．ファルマシア 39 (7)：691-696，2003
22) 重松美加、大日康史、岡部信彦．第５回国際インフルエンザ制圧会議（International Conference：Options for the Control of Influenza V）．病原微生物検出情報（IASR） 24 (11)：293-294，2003
23) 重松美加、岡部信彦．SARS とインフルエンザー疫学．臨床と微生物 31 (1)：59-64，2004
24) 山本茂貴、春日文子、重松美加．カキにおけるノロウイルスのリスクアナリシス．病原微生物検出情報（IASR） 24 (12)：319-319，2003
25) 木村幹男，重松美加：旅行者感染症⑦ 旅行者感染症に関する情報の入手．医学のあゆみ 206(6/7)：434-438，2003
26) 大日康史、重松美加、谷口清州、岡部信彦． インフルエンザ超過死亡「感染研モデル」2002/03 シーズン報告 病原微生物検出情報（IASR） 24 (11)：288-289，2003
27) 大日康史． ＱＡＬＹあたりの社会負担の上限に関する調査研究． 医療と社会 13 (3)：121-130，2003
28) 大日康史、重松美加、谷口清州、岡部信彦．肺炎の罹患率・死亡率．日本医師会雑誌 131 (3)：319-324，2004
29) 森兼啓太．外科手術部位感染サーベイランスによる治療の質改善． 環境感染 19 (2)：297-300，2004
30) 森兼啓太．ヨーロッパにおける全国的病院感染サーベイランスの現状ーオランダ・ドイツへの訪問を終えて． 環境感染 19 (2)：315-319，2004
31) 森兼啓太． SSI サーベイランス． INFECTION CONTROL 10 (Suppl.)：132-139，2003
32) 森兼啓太． 手術部位感染サーベイランスと対策．INFECTION CONTROL 13 (3)：240-245，2004
33) 松井珠乃ら．地方衛生研究所におけるツツガムシ病診断の現状 ーアンケートによる調査結果と感染症発生動向調査との比較ー．日本感染症学雑誌 78 (3)： 248-52，2004
34) 安井良則、砂川富正、藤岡雅司、奥野良信、木田一裕、福田雅一、岡部信彦。大阪における麻疹および麻疹予防接種調査結果と麻疹対策。小児感染免疫。15(1)：95-102，2003
35) 中島一敏、砂川富正。香港 SARS 疫学調査の経験。病原微生物検出情報。24(10)：253-54，2003
36) 砂川富正。話題の感染症 SARS。東京小児科医会報。22(2)：22-26，2003
37) 鈴木里和、砂川富正、大山卓昭、多屋馨子、谷口清州、岡部信彦。インフルエンザ相談ホットラインに基づくインフルエンザの情報提供に関する検討。感染症学雑誌。78(2)：99-107，2004
38) 砂川富正。SARS（重症急性呼吸器症候群）。小児科。45(4)：457-461，2004
39) 谷口清州． グローバル時代の感染症・世界の脅威．日本臨床 61 増刊２ 16-23、2003.
40) 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.
41) 谷口清州． 無菌性髄膜炎． 総合臨床 52 増刊 970-975、2003.
42) 谷口清州． 無菌性髄膜炎． 臨床検査 47 (3) 313-317、2003.
43) 谷口清州．エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱．臨床と微生物 31 (1)、3-72045、2004.
44) 谷口清州．感染症流行情報と臨床での対応．小児科 45(4)：483-490、2004.
45) 谷口清州．地球規模での感染症アウトブレイク対応．感染症 33(5)：188-201，2003.
46) 谷口清州．本邦におけるインフルエンザの最新動向．日本臨床 61(11)：1872-1879、2003.
47) 谷口清州．SARS はどこまでわかってきたか．調剤と情報 9(12)：1668-1672、2003.
48) 谷口清州．疫学の立場からの SARS について．オペリスク 9(1)：7-10、2003.
49) 谷口清州．感染症の国内外の動向．建築整備士 36(3)：37-42、2004.
50) 谷口清州．SARS の疫学状況．日本小児科学会雑誌 107(10)：1327-1332、2003.
51) 谷口清州．インフルエンザによる健康被害．最新医学 59(2)：271-276、2004.
52) 谷口清州．ウイルス性脳炎の世界的状況．化学療法の領域 19(5)：56-60、2003.
53) 村上義孝，橋本修二，谷口清州，小坂 健，渕上博司，永井正規：感染症法施行後における感染症発生動向調査の定点配置状況．日本公衆衛生学雑誌 50(8)：732-738，2003
54) 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．小児感染免疫 15：447-452，2003
55) 小坂 健：新興再興感染症．SARS の教訓．第３部 再興感染症と注目される感染症．サルモネラ感染症．からだの科学〔増刊〕：192-195，2004
56) 小坂 健：ビブリオ・バルニフィカス感染症． 医學のあゆみ 925-926，2003
57) 木村幹男，石井 明：３ 抗生物質・抗菌薬療法の実際/A．感染症からみた抗生物質・抗菌薬の選択と使用の実際．マラリア．Medical Practice 20（臨時増刊号）：408-412，2003

58) 木村幹男，金　惠淑，綿矢有佑：話題の抗微生物薬をめぐって．4 抗原虫薬．マラリア．臨床と微生物 30:621-630，2003
59) 木村幹男，重松美加，小坂　健：第 8 回国際旅行医学会議にみる旅行者感染症のトピックス．臨床と微生物 30:742-745，2003
60) 木村幹男：「輸入感染症の臨床的アプローチ」．旅行者感染症に対する国内外における旅行医学的取り組み．日本臨床寄生虫学会誌 14:23-26，2003
61) 首藤義幸，三ツ井準一，濱田篤郎，木村幹男：疥癬症患者 22 名のイベルメクチンによる治療経験．日本臨床寄生虫学会誌 14:104-106，2003
62) 木村幹男，狩野繁之：特集　日常病にどう対処しますか？―頻度順に考える症状/疾病の対処法―．その他で比較的多い健康問題の対応（感染症・呼吸器系）．輸入感染症．治療 86(3 月増刊号):1130-1132，2004
63) 春木宏介，櫻井　裕，木村幹男：新興再興感染症．SARS の教訓．第 3 部 再興感染症と注目される感染症．マラリア．からだの科学〔増刊〕:229-233，2004
64) 木村幹男：特集「寄生虫病とペット病―新たな認識と実地診療」．輸入感染症．日本医師会雑誌 131:1763，2004
65) 木村幹男，狩野繁之：〔蚊が媒介する感染症〕5．輸入マラリアの現状と治療・予防．感染症 34:81-91，2004
66) 多田有希：SARS について．複十字 292:2-3，2003
67) 多田有希：今冬の SARS 対策．複十字 294:8，2003
68) 多田有希，谷口清州，岡部信彦：重症急性呼吸器症候群（SARS）―これまでに得られた知見から―．小児科 44:1935-1942，2003
69) 多田有希，大森正子，伊藤邦彦，藤生道子：川崎市の結核対策．結核 79:17-24，2004.
70) 松山州徳，多田有希，岡部信彦，田代眞人，田口文広：重症急性呼吸器症候群（SARS）材料取り扱いのための WHO バイオセーフディーガイドライン．臨床検査 48:43-50，2004
71) 多屋馨子．特集：インフルエンザ Q&A Q29,Q30,Q31,Q32．診療新社．編集 岡部信彦。医報フジ．2003．123:29-32，42-43
72) 新井　智、岡部信彦．人獣共通感染症総論．臨床と微生物．2003．　30(4)：339-344.
73) 新井　智、佐藤　弘、岡部信彦．　動物・ペットに由来した感染症．成人病と生活習慣病．2003．33(9)：1037-1042.
74) 多屋馨子．抗体保有状況からみたインフルエンザ流行予測．小児科．2003.44(12):1982-1990
75) 多屋馨子，岡部信彦．ワクチンで予防可能な呼吸器感染症．分子呼吸器病．2003.7(5):401-410
76) 多屋馨子．インフルエンザを再認識する．調剤と情報．2003.9(12):1674-1677
77) 多屋馨子．感染予防に欠かせないワクチン接種で知っておきたい基礎知識．エキスパートナース．2003.19(12):126-129
78) 多屋馨子．話題．風疹ワクチンキャンペーン：「昭和 54 年 4 月 2 日ー昭和 62 年 10 月 1 日生まれの方」今年の 9 月 30 日までに風疹ワクチンを受けましょう！．臨床と微生物．2003.30（4）:408-409
79) 多屋馨子．母子移行免疫の現状．臨床と微生物．2003.30(2):99-104
80) 多屋馨子．疾患各論　4 類感染症(定点把握)　突発性発疹．綜合臨床．2003.52 増刊:854-859
81) 寺田春郎，多屋馨子，宮川広実，天羽清子，指原淳志，砂川富正，三好洋子，山本よしこ，馬場宏一，今井克美，永井利三郎，岡田伸太郎．けいれん性疾患児への予防接種．小児科臨床．2003.56(6):1015-1022
82) 多屋馨子，岡部信彦．風疹抗体の最新動向とワクチン接種．日本医事新報．2003.4144:17-23
83) 石橋道男，多屋馨子．小児腎移植とウイルス感染症．ヒトヘルペスウイルス 6 感染症．今日の移植．2003.16(4):386-391
84) 岡部信彦，森伸生，砂川富正，多屋馨子，谷口清州，中島一敏，安井良則．国内外における麻疹の状況．小児感染免疫．2003.15(1):69-77
85) 福嶌教偉，大竹重彰，澤芳樹，高橋俊樹，西村元延，市川肇，松宮護郎，堀口敬，小野正道，遠藤誠子，斎藤美紀子，白倉良太，浅利誠司，多屋馨子，宮川広美，松田暉．当院における心臓移植後の感染症対策．日本外科感染症研究．2002.14:163-168
86) 橋戸　円、岡部信彦。発生動向調査からみた性感染症の最近の動向。日本性感染症学雑誌。15:Suppl:60-68，2004.
87) 西尾治、西香南子、福田伸冶、西田知子、篠原美千代、三上稔之、沖村容子、新川奈緒美、杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、鈴木宏：ウイルス性食中毒の病因、臨床とウイルス、31：163-170、2003
88) 西尾治:ノロウイルスによる食中毒の発生とその防止について、Kewpie News、357 号、2003
89) 藤本嗣人、近平雅嗣、芥川宏、西尾治：兵庫県阪神地域における妊婦および 0-9 歳児のコクサッキーB 群ウイルスに対する中和抗体保有状況について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2:103-106、2003
90) 藤本嗣人、近平雅嗣、秋山美穂、西尾治：ノロウイ

ルス検査における RNA 抽出コントロールとしてのエコーウイルス 9 型 Hill 株の適用について、兵庫県立健康環境科学研究センター年報、2：107-110、2003

91) 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が、兵庫県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、ひょうごの公衆衛生、18：23-24、2003

92) 山上隆也、大屋とし子、中澤美佳子、窪田玲子、望月町子、大石陽子、嶋村博、秋山美穂、西尾治：最近 2 年間に小児から検出された下痢症ウイルスについて-A 群ロタウイルスの G 血清型別結果-、山梨中病年報、30：80-81、2003

93) 徳竹由美、中村友香、横内文子、村松紘一、西尾治：長野県における食中毒集団発生事例からのノロウイルスの検索、長野県衛公研報告、26：16-22、2003

94) 西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、加藤由美子、秋山美穂、西尾治：市販生食用カキのノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24：317、2003

95) 杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、長谷川斐子、秋山美穂、西尾治:輸入生鮮魚介類におけるノロウイルス汚染状況、病原微生物検出情報、24:317-318、2003

96) 西尾治:ノロウイルス検査法の改訂、食品衛生研究、54(2):9-15、2004

書籍

1) 岡部信彦、森伸生：日本での急性肝炎の現状-感染症発生動向調査成績より -ウイルス性肝炎- 第123会日本医学会シンポジウム記録集 P.6-12 日本医学会 2003.6.

2) 岡部信彦：感染症サーベイランス．小児科研修医ノート P.454-456 編集・五十嵐 隆、渡邊 博、田原卓浩．診断と治療社 2003.4.

3) 岡部信彦：予防接種．研修医の小児医療のための基礎知識 p.31-39 監修・衛藤義勝 三共株式会社 2003.6.

4) 岡部信彦：新興・再興感染症 ダイナミックメデイシン P.17-19-17-20 監修・下条文武、斎藤 康．西村書店 2003.8.

5) 岡部信彦、森田雅之：抗ウイルス薬の使用上の基本的事項．抗微生物薬化学療法 P.122-127 編著・上田 泰、松本文夫、柴 孝也、森田雅之．ライフサイアンス 2003.9.

6) 岡部信彦：健康危機管理における保健所の役割 -国立感染症研究所感染症情報センターの立場から-．現場から発信する課題解決型の公衆衛生を目指して P.87-91 編・第61回日本公衆衛生学会総会学術部会事務局 日本公衆衛生協会 2003.9.

7) 岡部信彦：輸入（外来）感染症 小児感染症マニュアル P.453-470 編・日本小児感染症学会．東京医学社 2003.11.

8) 岡部信彦：学校における感染症対策．平成 15 年度学校保健の動向 編・日本学校保健会 P.1-7 日本学校保健会 2003.11.

9) 岡部信彦：学校における SARS 対策．平成 15 年度学校保健の動向 編・日本学校保健会 P.7-13 日本学校保健会 2003.11.

10) 岡部信彦：感染症の現状、感染症サーベイランス、感染症ワクチンの現状．分子予防環境医学 P.139-149 編集・分子予防環境医学研究会 本の泉社 2003.12.

11) 岡部信彦：輸入感染症 標準感染症学 第 2 版 P.149-164 編集・斎藤 厚、那須 勝、江崎孝行．医学書院 2004.3.

12) 森兼啓太． 手術部位感染サーベイランス． ICD テキスト． ICD 制度協議会（監修）、ICD テキスト編集委員会（編集） メディカ出版 大阪 53-56, 2004.

13) 砂川富正、藤井史敏、藤岡雅司、奥野良信、安井良則。「臨床コアスキル」経験すべき診察法・検査・手技－予防接種－。40(12)： 472-75, 2003

14) 谷口清州． 生物テロに対するサーベイランスと疫学調査． 生物化学テロ対処ハンドブック． 診断と治療社 2003.

15) 谷口清州． 感染症対策． 人と健康． 東京化学同人． 2003.

16) 小坂 健, 他：第５章 細菌のリスクアセスメント例“食の安全とリスクアセスメント” 中央法規出版

17) 木村幹男：I 感染症一原虫感染症．マラリア．“外来診療のすべて” （改訂第 3 版）（高久史麿 総監修）．メジカルビュー社．p969-141, 2003 年

18) 木村幹男, 岡部信彦：第 6 章．主要疾患の現状と予防対策.8. 感染症“管理栄養士講座 公衆衛生学”．建帛社．p130-141, 2003 年

19) 木村幹男：第 11 章感染症．Section II. 感染性疾患の entity. 1. 十分に知っておくべき細菌感染症. H. リケッチア症．内科学（第 2 版, 編集主幹：黒川 清, 松澤 佑次), 文光堂, p2012-2013, 2003 年

20) 木村幹男：第 11 章感染症．Section II. 感染性疾患の entity. 5. どのような寄生虫感染症が問題か. A. マラリア.内科学(第 2 版,編集主幹:黒川 清,

松澤　佑次), 文光堂, p2077-2080, 2003 年
21) 木村幹男：第 11 章感染症. Section II. 感染性疾患の entity. 5. どのような寄生虫感染症が問題か. K. トリパノソーマ症, リーシュマニア症. 内科学 (第 2 版, 編集主幹：黒川　清, 松澤　佑次), 文光堂, p2098-2100, 2003 年
22) 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, 2003
23) 多屋馨子. 2 類感染症ポリオ. 今日の治療指針私はこう治療している 2003 年版. 総編集 山口徹、北原光夫. 医学書院 132, 2003
24) 多屋馨子. 突発性発疹症. 編集 大関武彦、古川漸、横田俊一郎. 医学書院. 今日の小児治療指針第 13 版. 226, 2003
25) 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 24 巻 4 号-25 巻 3 号, 2003-2004 年
26) 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 398-409, 2003-2004 年

単行本

1) 岡部信彦、平山宗宏：予防接種　少年写真新聞社 2003.9. (改訂)
2) 岡部信彦：感染症　少年写真新聞社　2003.9. (改訂)
3) 竹田美文、岡部信彦：SARS は何を警告しているのか. 岩波ブックレット　No.606　岩波書店 2003.10.
4) 生物化学テロ対処ハンドブック　生物化学テロ災害対処研究会 (山本　都、岡部信彦ほか)　診断と治療社　2003.11.
5) 岡部信彦：動物由来感染症　監修・著　岡部信彦　少年写真出版社　2003.12.
6) 岡部信彦：学校における感染症の基本的管理体制について　東京私立中学高等学校協会　東京私学教育研究所・学校安全・健康教育研究会　2003.12.

その他

1) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 非流行期における SARS 対応のガイドライン. 2003 年 12 月 19 日
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update99-GL.html
2) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) に関する Q&A 「一般向け」・「医療従事者向け」.
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/QA/QAver2.html
3) 感染症情報センター. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) 管理例 (感染症情報センター案５訂). 2003/5/22
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/mgmt-05.html
4) 感染症情報センター. 重症急性呼吸器症候群 (SARS) 管理例 (感染症情報センター案６訂). 2003/6/10
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/mgmt-06.html
5) 感染症情報センター. 感染防御マスクについて (案). 2003/6/6
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update73-mask.html
6) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 病院の検査室での対応. 2003/7/22
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update97-room.html
7) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 検体材料の輸送. 2003/04/08
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/info/kanri-apr7rev.pdf
8) 検査材料の採取・送付に関する追加情報. 2003/04/09
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/info/MailingBox2.4.pdf
9) 国立感染症研究所 感染症情報センター. SARS コロナウイルスに関する検査対応について (5 訂). 2003/12/24 (2004/3/9 更新)
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update111-ke.html
10) 感染症情報センター. SARS に関する消毒 (三訂版). 2003/12/18
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/sars03w/index.html
11) WHO CDR (著), 国立感染症研究所 感染症情報センター (訳). 重症急性呼吸器症候群 (SARS) の疫学に関する統一見解文書. 2003 年 11 月 (12 月翻訳)
http://idsc.nih.go.jp/others/sars/update101who.pdf
12) 国立感染症研究所 感染症情報センター. 高病原性鳥インフルエンザが疑われる患者に対する医療機関での対応. 2004/2/10
http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/24idsc.html
13) 感染症情報センター. 鳥インフルエンザに関する Q&A. 2004/4/5
http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/QA040401.html

14) 感染症情報センター. トリインフルエンザの分布図. 2004/02/02～ http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/toriinf-map.html
15) 感染症情報センター. インフルエンザポスター（カラー＆白黒） http://idsc.nih.go.jp/others/topics/t-inful/infl-posA3.pdf http://idsc.nih.go.jp/others/topics/t-inful/infl-posBKA3.pdf
16) 感染症情報センター. インフルエンザ Q&A（平成15年度版）. 2004/2/25 http://idsc.nih.go.jp/others/topics/inf-faq.html

Ⅱ. 学会発表

１. 国際学会

1) Shigematsu, M., Osaka, K., Kimura, M., Okabe, N.: Travel and shigellosis from the data of the national infectious disease surveillance of Japan. 8th Conference of the International Society of Travel Medicine. New York, 2003
2) Shigematsu, M., Osaka, K., Taniguchi, K., Okabe, N. Tetanus in elderly : our options. International Conference on Emerging Infectious Disease. Atlanta, February 2004
3) Osaka, K., Shigematsu, M., Okumura, J., Kimura, M. Antibiotic resistance of Shigella spp. isolated from Japanese international travelers. 8th Conference of the International Society of Travel Medicine. New York, May 2003
4) Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Vuddhakul, V., Jaroenjiratrakul, W., Kalnawakul, S., Chowdhury, A., Shigematsu, M., Osaka, K., Toyofuku, H., Yamamoto, S., Nishibuchi, M. Quantitative Risk Assessment of Vibrio parahaemolyticus in Bloody Clams in Southern Thailand. IAFP 2003-90th Annual Meeting. Louisiana, August 2003
5) Yamamoto, S., Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Vuddhakul, V., W., Kalnawakul, S., Chowdhury, A., Shigematsu, M., Osaka, K., Toyofuku, H., Nishibuchi, M. Quantitative risk assessment of Vibrio parahaemolyticus in bloody clams in Southern Thailand. 天然資源の有効利用に関する日米会議（ＵＪＮＲ）の有毒微生物部会. Tokyo, November 2003
6) Ohkusa, Y., Taniguchi, K. Pandemic Planning using Mathematical Model at Global Health Security Initiative. Technical Working Group on Influenza Pandemic Preparedness. Geneva, March 2004
7) Ohkusa, Y., Taniguchi, K. Use of Antiviral Drug during a Pandemic-Possible Scenario and Mathematical Modeling. WHO Consultation on priority public health interventions before and during an influenza pandemic. Geneva, March 2004
8) Ohkusa, Y. Policy Evaluation for the Subsidy for Influenza Vaccination in Elderly. International Conference of Emerging Infectious Disease. Atlanta, February 2004
9) Morikane, K. et al. The present status of the epidemiology of surgical site infections in Japan - from the report of the Japanese Nosocomial Infections Surveillance (JNIS) system. The 2nd international congress of the Asian Pacific Society of Infection Control. Singapore, March 2004
10) Yoshimi Hemmi, T. Sunagawa, T. Ohyama, J. Kobayashi, K. Taniguchi, N. Okabe: Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) in Japan, 2002. Bi-regional TEPHINET Scientific Conference (Philippines), Nov.2003
11) Mori, N. et al. A Measles Outbreak Investigation among Middle School Students - Japan, 2002. Second SEA and WPR TEPHINET Bi-regional Conference (oral session). Philippines, November 2003
12) Nobuo Mori, K Kaku, T Sunagawa, T Ohyama, K Tanaka-Taya, K Taniguch, J Kobayashi, N Okabe: Measles Outbreak Investigation Among Middle School Students -Japan, 2002. Bi-regional TEPHINET Scientific Conference (Philippines), Nov.2003
13) Hideki Yoshida, T. Sunagawa, T. Ohyama, J. Kobayashi, K. Taniguchi, N. Okabe: Vancomycin-resistant Enterococcus Nosocomial Infection-Kitakyushu, Japan, 1998-2002. Bi-regional TEPHINET Scientific Conference (Philippines), Nov.2003
14) Yoshida, H. et al. Contact Tracing Of A Laboratory Confirmed SARS Case In Japan. International Conference on Influenza and the

Resurgence of SARS (poster session). Taiwan, October 2003

15) Kimura, M., Nawa, Y., Ohtomo, H., Nonaka, A., Ohnishi, K., Kuramoto, M., Ariga, T., Hamada, A., Yamanaka, K., Oana, S.: Successful treatment of amebiasis with intravenous metronidazole. 8th Conference of the International Society of Travel Medicine. New York, 2003

16) Kondo, H., Kimura, M., Hamada, A., Namikawa, K., Umemura, S., Okoshi, H., Ori, M., Nishiyama, T., Yamasawa, F., Kanazawa, T., Nakamura, N., Shimada, M., Osaki, M.: The Japanese Society of Travel and Health: six years experiences and future perspectives. 8th Conference of the International Society of Travel Medicine. New York, 2003

２．国内学会

1) 重松美加, 小坂健, 岡部信彦. 保育園・幼稚園における出血性大腸菌感染症の関する研究. 第 77 回日本感染症学会総会. 2003 年 4 月、福岡

2) 重松美加. SARS 問題に取り組んで・ミニシンポジウム「海外渡航と SARS」. 第 7 回海外渡航者の健康を考える会大会・第 1 回海外渡航者健康学会学術集会. 2003 年 7 月、大阪

3) 小坂健, 田村和満, 春日文子, 斉藤紀行, 尾畑浩魅, 甲斐明美, 山井志朗, 浅井良夫, 杉山寛治, 西尾智祐, 福島博, 宮坂次郎, 荒川英二, 重松美加, 岡部信彦, 山本茂貴. 魚貝類及び環境における Vibrio vulnificus の定量的な解析に関する研究. 第 77 回日本感染症学会総会. 2003 年 4 月、福岡

4) 大日康史. 予防接種の経済効果. 第 7 回ワクチン学会(招待講演). 2003 年 10 月、名古屋

5) 菊池宏幸、大日康史. 数理モデルを用いたＳＡＲＳ対策の評価 第 73 回日本感染症学会西日本地方会総会. 2003 年 11 月、鹿児島

6) 森兼啓太. 病院感染サーベイランスとは？－手術部位感染サーベイランスを中心に. 第２回帝京大学医学部付属病院院内感染予防講習会（講演）. 2004 年 2 月、東京

7) 森兼啓太. 手術部位感染サーベイランスーその理想とは. 第 19 回日本環境感染学会総会(ワークショップ). 2004 年 2 月、横浜

8) 森兼啓太. SSI サーベイランスの導入とフィードバックデータの活用. 第 3 回 SSI サーベイランス研究会（パネルディスカッション・司会）. 2004 年 2 月、横浜

9) 森兼啓太. 院内感染対策のあり方. 函館五稜郭病院院内感染対策講習会（講演）. 2004 年 3 月、函館

10) 森伸生ら. 2002 年茨城県で起こった 2 つの中学校での麻疹集団発生の比較. 第 35 回日本小児感染症学会総会（口演）. 2003 年 11 月、富山

11) 吉田英樹ら. 細菌性赤痢国内発生事例の疫学的検討. 第 77 回日本感染症学会総会（口演）. 2003 年 4 月、福岡

12) 砂川富正. 現地報告－香港における SARS 疫学調査の経験－。第 62 回日本公衆衛生学会総会感染症フォーラム、2003 年 10 月

13) 砂川富正. 今日の新興・再興感染症と対応について。第 50 回日本化学療法東日本支部会・第 52 回日本感染症学会地方会・第 86 回日本細菌学会関東支部会（合同学術集会)、2003 年 10 月

14) 谷口清州. 重症急性呼吸器症候群の疫学状況. 第 106 回日本小児科学会学術集会. 2003 年 4 月、福岡市.

15) 谷口清州. SARS の疫学状況. 第二回医薬品等ウイルス安全性研究会. 2003 年 5 月、東京.

16) 谷口清州. SARS の疫学. 第 44 回日本臨床細胞学会. 2003 年 5 月、東京.

17) 谷口清州. SARS の疫学と今冬の対策. 第 24 回衛生微生物技術協議会. 2003 年 7 月、福岡市.

18) 谷口清州. SARS の疫学と今冬の対策. 第 129 回三重県小児科医会. 2003 年 9 月、津市.

19) 谷口清州. SARS の疫学と今後の流行予測. 第 7 回日本ワクチン学会. 2003 年 10 月、名古屋市.

20) 谷口清州. 感染症に対するグローバルな対応. 東日本化学療法・感染症・細菌学合同会議. 2003 年 10 月、横浜市.

21) 谷口清州. 人獣共通感染症のサーベイランスと対策. 人と動物の共通感染症研究会. 2003 年 11 月、東京.

22) 谷口清州. SARS とはなにか. 第 43 回栃木県総合医学会. 2003 年 11 月、宇都宮市

23) 谷口清州. SARS に対する世界での対応経験. 第 31 回日本救急医学会総会. 2003 年 11 月、東京.

24) 谷口清州. 感染症に対するグローバルな対応～SARS を中心に～. 第 56 回三重県公衆衛生学会. 2004 年 1 月、上野市.

25) 谷口清州. 感染症情報センターにおける SARS 対応. 第 17 回公衆衛生情報協議会. 2004 年 1 月、長崎市.

26) K. Taniguchi. Infectious disease surveillance and control in Japan. 日本小児科学会日中韓小児医学フォーラム. 2004 年 2 月、東京.

27) 谷口清州. SARS－今までにわかってきたこと－. 第 124 回日本薬学会. 2004 年 3 月、大阪市.

28) 木村幹男：シンポジウム「輸入感染症の臨床的アプローチ」. 旅行者感染症に対する国内外における旅行医学的取り組み. 第 14 回日本臨床寄生虫学会 2003 年
29) 首藤義幸, 三ツ井準一, 濱田篤郎, 木村幹男：疥癬患者 24 名のイベルメクチンによる治療経験. 第 14 回日本臨床寄生虫学会 2003 年
30) 木村幹男：シンポジウム「旅行時の発熱性疾患」. 発熱旅行者の診断アルゴリズム. 第 7 回海外渡航者の健康を考える会 2003 年
31) 川上桂子, 木村幹男, 橋本迪子, 青木和子, 浜田　勝, 谷畑健生：日本人海外渡航予定者のマラリアに関する意識. 第 1 回海外渡航者健康学会 2003 年
32) 木村幹男, 川上桂子, 浜田　勝：日本人海外渡航者のマラリア・スタンバイ治療の実態. 第 1 回海外渡航者健康学会 2003 年
33) 大友弘士, 木村幹男, 吉川晃司, 水野泰孝, 柴　孝也：2001-2002 年におけるマラリア治療概況. 第 52 回日本感染症学会東日本地方会総会 2003 年
34) 金　惠淑, 大黒千佳子, 綿矢有佑, 木村幹男：マイクロタイタープレートハイブリダイゼーション法によるマラリアの DNA 診断. 第 44 回日本熱帯医学会・第 18 回日本国際保健医療学会 2003 年
35) 木村幹男, 川上桂子, 浜田　勝：日本人海外渡航者におけるマラリア・スタンバイ治療の現状. 第 59 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2003 年
36) 金　惠淑, 奥田洋平, 木村幹男, 綿矢有佑：熱帯熱マラリア原虫におけるメフロキン耐性化機構の解析. 第 59 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2003 年
37) 木村幹男：シンポジウム「海外赴任者の健康管理」. 予防接種, マラリア予防. 日本総合検診医学会第 32 回大会 2004 年
38) 多屋馨子、稲松孝思、岡部信彦. 高齢者における麻疹抗体保有状況. 第 3 回抗体測定研究会.　東京都. 2003 年 2 月
39) 多屋馨子. わが国の麻疹の現状と麻しんワクチン接種状況について. 第 12 回東日本外来小児科学研究会. 神奈川県横浜市.　2003 年 3 月
40) 斉藤剛、永井英明、新井 智、岡部信彦、高野昇一. 肺炎球菌莢膜多糖体特異的抗体の ELISA 法による定量.　第 76 回日本細菌学会総会.　熊本県熊本市. 2003 年 4 月.
41) 多屋馨子、新井智、岡部信彦. 2002/03 シーズン前の抗体保有状況からみたインフルエンザ(flu)流行予測. 第 106 回日本小児科学会学術集会. 福岡県福岡市. 2003 年 4 月
42) 森伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、岡部信彦. 宮崎県都城・北諸地域での麻疹流行時の小中学生における麻疹ワ
43) クチン接種状況の調査（2003 年)、第 106 回日本小児科学会学術集会. 福岡県福岡市. 2003 年 4 月
44) 新井 智, 高崎智彦, 森 伸生, 多屋馨子, 早川丘芳, 倉根一郎, 岡部信彦. 1982 年から 2002 年までの日本脳炎患者発生状況.　第 44 回日本臨床ウイルス学会.　鹿児島県鹿児島市. 2003 年 6 月.
45) 多屋馨子、稲松孝思、早川丘芳、新井　智、岡部信彦. わが国の高齢者における麻疹抗体保有状況. 第 44 回日本臨床ウイルス学会. 鹿児島県鹿児島市. 2003 年 6 月
46) 多屋馨子. SARS 感染症最新情報. 第 2 回関西感染症フォーラム(FinD in Kansai). 大阪府大阪市. 2003 年 6 月
47) 多屋馨子. ワクチン情報最前線ー日常診療に役立つワクチン情報ー. 小児感染症懇話会. 大阪府大阪市. 2003 年 7 月
48) 多屋馨子. 予防接種・感染症をめぐる最近の動向ーＳＡＲＳの現況も含めてー. 三沢臨床懇話会学術講演会. 青森県三沢市. 2003 年 9 月
49) 多屋馨子. ヘルペスの迅速診断について. 第 7 回多摩ウイルス感染症研究会. 東京都. 2003 年 9 月
50) 多屋馨子. 『ワクチン情報最前線』～診療に役立つワクチン情報～. 第 5 回横浜小児感染症懇話会. 神奈川県横浜市. 2003 年 9 月
51) 多屋馨子. Severe Acute Respiratory Syndrome 重症急性呼吸器症候群（SARS）最新情報. 第６回　高知県感染症研究会. 高知県高知市. 2003 年 9 月
52) 佐藤 弘、永井 英明、斉藤 剛、新井 智、多屋 馨子、大石 和徳、岡部 信彦. 慢性呼吸器疾患患者から分離された肺炎球菌の性状.　第 52 回日本感染症学会東日本地方会.　神奈川県横浜市.　2003 年 10 月
53) 新井　智、多屋馨子、高崎智彦、辻正義、石原智明、倉根一郎、岡部信彦.　日本脳炎ウイルス非構造タンパク質 NS1 の発現.　第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会.　京都府京都市.　2003 年 10 月
54) 新井　智、中島一敏、大山卓昭、多田有希、藤井逸人、成島悦雄、福本幸夫、安藤正樹、吉川徹、岸本寿男、川中正憲、中嶋建介、山田章雄、岡部信彦. 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について.　第 136 回日本獣医学会学術集会.　青森県青森市.　2003 年 10 月.
55) 多屋馨子. 小児腎移植とウイルス感染症ーHHV-6（ヒトヘルペスウイルス６）感染症ー. 第 7 回京滋ヘルペス研究会. 京都府京都市. 2003 年 10 月.
56) 新井 智、高崎智彦、多屋馨子、早川丘芳、倉根一

郎、岡部信彦、感染症流行予測調査事業担当者. 近年の日本脳炎患者発生状況および感染リスク. 第3回人と動物の共通感染症研究会. 東京都. 2003年11月.

57) dhikary Arun Kumar, Inada Toshiki, Banik Urmila, Mukouyama Atshushi, Matsuno Shigeo, Araki Kazuko, Numaga Jiro, Suzuki Eiko, Okitsu Shouko, Ushijima Hiroshi, Okabe Nobuhiko ; Heterogeneous fiber of subgenus Cadenoviruses and fiber application in genotyping. 第51回日本ウイルス学会学術集会（京都）2004年

58) 古川友子、伊藤健一郎他:病原血清型大腸菌のeae、tir、cesT遺伝子多型. 第76回日本細菌学会総会. 奈良、2003.4.

59) 伊豫田淳、伊藤健一郎他：LEE遺伝子群非保有型志賀毒素産生性大腸菌に存在する病原性遺伝子の解析型.第76回日本細菌学会総会.奈良、2003.4.

60) 新川奈緒美、秋山美穂、西尾治: 吐物による感染が推察されたNorovirus集団胃腸炎事例、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26－27日、鹿児島

61) 杉枝正明、新川奈緒美、大瀬戸光明、西尾治: Norovirus感染により排泄されるウイルス量について、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26－27日、鹿児島

62) 森伸生、砂川富正、多屋馨子、谷口清州、西尾治、岡部信彦：2002 年に感染症発生動向調査へ報告されたA型肝炎のまとめ、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26－27日、鹿児島

63) 藤本嗣人、近平正嗣、西尾治：コクサッキーB群ウイルスに対する小児および妊婦の抗体保有調査、第44回臨床ウイルス学会、2003年6月26－27日、鹿児島

64) 野田衛、西尾治、国井悦子、藤井彰人、池田義文、平﨑和孝、荻野武雄: 市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査、全国公衆衛生獣医師協議会平成15年度調査研究発表会、2003年9月5日、東京

65) 入谷展弘、久保英幸、勢戸祥介、春木孝祐、西尾治、武田直和、村上司、簑城昇次、改田　厚、綾田稔　、小倉壽: 平成14年度に検出されたNorwalk virusのプローブ型別および遺伝子型別、平成15年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会総会、2003年9月

66) 徳竹由美、中村友香、横内文子、村松紘一、西尾治：Norovirusが検出された非発症従事者の糞便中ウイルス量、第18回地研全国協議会　関東甲信静支部ウイスル研究部会、2003年9月

67) 顔海念、柳生文宏、沖津祥子、西尾治、牛島廣治: 下痢症ウイルスの迅速診断法の開発―RT-multiplex PCR法を用いた糞便検体からのノロウイルス(GⅠ,GⅡ)、サポウイルス、アストロウイルスの同時検出、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

68) 新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治: 全国各地で発生したノロウイルス（NV）による食中毒事例について、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

69) 西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、春木孝祐、大瀬戸光明、秋山美穂、西尾治: 市販生食用カキのノロウイルスおよびA型肝炎ウイルス汚染状況、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

70) 西香南子、福田伸治、篠原美千代、大瀬戸光明、植木洋、西尾治: カキ及び養殖海域のNV汚染調査とカキ筏における水平垂直分布調査、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

71) 勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田厚、春木孝祐、西尾治、綾田稔、小倉壽: 平成14年度に大阪市で検出されたNorwalk virusの遺伝子型別、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

72) 杉枝正明、古屋由美子、大瀬戸光明、藤本嗣人、新川奈緒美、田中俊光、山口卓、長谷川斐子、西尾治: 輸入生鮮魚介類におけるウイルス汚染状況について、第51回日本ウイルス学会、2003年10月27－29日、京都

73) 藤本嗣人、近平雅嗣、西尾治、岡藤輝夫、岡藤隆夫：平成15年に兵庫県で発生した 過去10年間で最大規模の咽頭結膜熱の流行時におけるウイルス検索結果および臨床現場におけるアデノウイルス迅速診断キットの有効性に関する検討、平成15年度兵庫県公衆衛生協会中央研究会、2003年、神戸

74) 西香南子、山内昭則、杉山明、中山治、西尾治: 2002/2003 シーズンに三重県で検出されたNorovirusの解析、第24回日本食品微生物学会学術総会、2003年、岡山

75) 新川奈緒美、伊東祐治、西尾治、他: ノロウイルスによる食中毒と乳幼児下痢症の発生及び海域汚染について、第45回鹿児島県公衆衛生学会、2003年、鹿児島

21. エイズ研究センター

センター長　山 本 直 樹

概　要

1981 年にエイズのはじめての症例が報告されて以来、2003 年末現在世界の HIV 感染者（累積数）は 6,000 万人以上に達している。さらに年間約 480 万人の新規感染者が発生し、290 万人が死亡していると予測されている。欧米での新たな発生はすでにピークを越えていて、その増加の大部分（85%）はアフリカとアジアにおける流行によるものである。とりわけインド、中国、東南アジア諸国など我が国をとりまくアジア地域での流行の激化が危惧されている。一方、日本国内では、厚生労働省エイズ動向委員会報告によると、2003 年末現在 HIV 感染者報告総数は、5,780 名（男 4,194 名、女 1,586 名）、エイズ患者の届出総数は 2,892 名（男 2,487 名、女 405 名）である。HIV の年間報告数は 1996 年以降増加傾向が続いており、昨年度（2003 年）は過去最高の新規感染者数 640（男 573、女 67）を記録した。異性間（28%）および同性間の性接触（56%）による感染が主体となっている。我が国における HIV 感染者数の実態を正確に把握することは難しいが、厚生労働省「HIV 感染症の疫学」班報告によれば、約 16,000 人という予測がなされている。

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、HAART をもってしても、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、ウイルスとの共存関係をいかにうまく保持するかが重要である。さらに多剤併用療法が標準的なエイズ治療法として普及するにつれ、薬剤耐性の獲得による治療困難症例の増加が大きな問題となっている。このような状況の下、当センターでは、多数の症例に対し、疑問症例及びスクリーニング陽性例の確認試験、薬剤耐性遺伝子検査を行うとともに、新しい検査法の開発と地方レベルへの技術の普及をはかってきた。また生検、剖検例の病理検査を行い臨床現場での診断及び治療に役立てられている。HIV を分子生物学的手法によって解析し、その特性などを解明することにより、エイズワクチン開発などの応用に向けた多角的な基礎研究を展開している。中でも、DNA ワクチンーSeV ベクター、BCG-ワクシニアによるプライムーブーストの系、さらに糖鎖変異を導入した弱毒化 SIV が優れた感染防御効果を持つことを明らかにし、注目されている。またアジアに流行する HIV-1 株に関する研究が進展し、多様で複雑な組換え型ウイルスが出現していることを明らかにした。

このように我が国を含むアジアにおける HIV の危機的な流行状況を考えた場合、疫学的、分子疫学的調査研究、HIV-1 ヴァリアントの構造とそのウイルス学的、免疫学的性質の解明、またそれら基礎研究に基づく、ワクチンを含む感染予防・発症阻止技術の開発、新しい細胞側因子の探索による新規薬剤の開発など、その制圧に向けた重要且つ緊急性の高い課題への取り組みをさらに強力に押し進める必要があると考えられる。これらの業務の遂行と、研究水準の一層の向上をはかっているところである。

当センターはまた、国際協力機構(JICA)のエイズプロジェクト等にも積極的に協力し、「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。また、JICAとの協力によりアジア、アフリカ諸国等からの研修員を対象にHIV 診断技術講習を実施しており、多数の研修員を指導してきた。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、神奈川県衛生研究所、西澤雅子博士が研究員として第2研究グループ研究員に採用（平成 15 年 4 月 1 日付）、狩野宗英研究員が主任研究官に昇任(4 月 1 日付)、5 月 1 日横幕能行研究員（第 2 研究グループ）が千葉大学に出向（5 月 1 日付）、藤野真之博士が第 2 研究グループ研究員に採用（平成 16 年 1 月 1 日付）、有吉紅也主任研究官が復帰（3 月 1 日付）、吉原なみ子第二室長が定年退職した（3 月 31 日付）。さらに、俣野哲朗助教授（東京大学）の併任が認められた(4 月 1 日付)。

当センターの運営に当たっては倉田毅所長、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、小室勝利前血液・安全性研究部長および山口一成血液・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がみられたものの、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。

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)
		H15.7.23	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修
		H15.12.10-14	日米医学協力研究会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議出席
		H16.2.2-4	WHO	HIV-1 予防ワクチンの開発と評価における進展及び関連事項についての WHO-UNAIDS 審議会出席
		H16.3.7-11	日米医学協力研究会	第 16 回日米エイズ会議出席
第一研究グループ	本多	H15.8.1-3	JST	タイエイズワクチン Workshop 出席
		H15.9.9-10	JST	タイエイズワクチン Symposium 出席
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
		H15.12.9-14	日米医学協力研究会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議エイズ部会出席
		H16.3.7-11	日米医学協力研究会	第 16 回日米エイズ会議出席
	仲宗根	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
第二研究グループ	杉浦	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
		H15.11.10-11.15	JICA	タイ NIH 機能向上プロジェクト短期専門家
		H16.3.7-11	日米医学協力研究会	第 16 回日米エイズ会議出席
	有吉	H14.9- H16.2	JICA	タイ国立衛生研究所(JICA 長期専門家派遣)
	西澤	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
第一室	武部	H15. 6.22- 6.27	文部科学省	科研費基盤研究(A-2) 海外学術研究に基づく共同研究 タイ・ミャンマーにおけるエイズ流行に関する分子疫学的調査研究のため(タイ、ミャンマー)
		H15. 9.12- 9.14	厚生労働省	国際医療協力研究委託費「台湾における HIV-1 感染症の分子疫学と薬剤耐性変異のモニタリングと耐性変異解析のための共同研究のため」(台湾)
		H15.10.└2-10.8	文部科学省	科研費基盤研究(A-2) ミャンマーにおけるエイズ流行に関する分子疫学的調査研究のため(ミャンマー)
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
		H15.12.8-12.13	日米医学協力委員会	第8回汎太平洋新興感染症国際会議への参加および研究発表(バングラディシュ)
		H16.2.2-2.14	厚生労働省	エイズ対策研究事業 第 11 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)
		H16.3.7-3.12	日米医学協力委員会 エイズ専門部会	第 16 回日米エイズ会議出席(米国)
		H16.3.27-3.31	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	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	草川	H15.9.12-9.14	文部科学省	特定領域研究2 「新規 HIV-1 組換えウイルスの探索とその病因論の展開」に関する分子疫学的調査研究のため(台湾)
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
第二室	吉原	H15.7.7	JICA	ワクチン予防対策集団研修コース(於:熊本) 講師
		H15.7.23	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修 講師
		H15.10.9-21	JICA	感染症対策技術集団研修コース(於:エジプト)短期専門家
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師

エイズ研究センター

所属	氏名	期間	要請先	要件・目的
		H15.11.7-11.9	JICA	AIDS/ATL 対策集団研修コース(於:熊本) 講師
		H15.11.30-12.12	JICA	カンボジア国結核対策プロジェクト(於:カンボジア) 短期専門家
	阪井	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	鈴木	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
第三室	松田	H15.7.25	JICA	ベトナムエイズ対策技術研修講師「Molecular Biology of HIV-1」
		H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	森	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
	石川	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 講師
		H15.11.10	JICA	南アジア HIV/AIDS 対策モデル(HIV 感染診断検査技術)
	駒野	H15.10.27-12.5	JICA	第1回 HIV 感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術コース 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推進事業・国際研究グラント事業「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・感染と宿主応答「HIV 感染ライフサイクルに必須な細胞因子の同定および新しい抗 HIV 薬の標的探索」研究代表者
第一研究グループ	本多	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)
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業: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推進事業 エイズ医薬品等開発推進事業・国際研究グラント事業「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)
		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:佐多徹太郎 感染病理部)
	仲宗根	HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 エイズ医薬品等開発推進事業・国際研究グラント事業「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	研究情報データベース事業(運用支援)「HIV 感染症統合データベースの構築」代表研究者
		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 遺伝子解析室)
		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

所属	氏名	要請機関	課題

エイズ研究センター

		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 検査体制の構築に関する研究」(主任研究者:今井光信 神奈川県衛生研究所)
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「計算機を活用した HIV の薬剤耐性評価」(主任研究者:星野忠次 千葉大学大学院薬学研究部)
		厚生労働省	エイズ対策研究事業「HIV 感染症の医療体制の整備に関する研究」(主任研究者:木村 哲 国立国際医療センター)
	有 吉	厚生労働省	エイズ対策研究事業「アジア・太平洋地域における 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推進事業 国際研究グラント事業「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「アジア・太平洋地域における HIV 感染症の疫学に関する研究」主任研究者
		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 HIV 感染者に対する多剤併用(HAART)療法の薬剤感受性試験及びモニタリングシステム構築に関する研究」(主任研究者:岡慎一 国立国際医療センター)
		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
		文部科学省	特定領域研究(2)・感染と宿主応答「新規 HIV-1 組換えウイルスの探索とその病因論の展開」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推進事業 国際研究グラント事業「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 検査体制の構築に関する研究班」(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	エイズ対策研究事業「アジア太平洋地域における国際人口移動から見た危機管理としての HIV 感染症対策に関する研究」(主任研究者:石川信克 財団法人結核予防会結核研究所)
	巽	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)
		HS 財団	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 「新規 HIV 感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的薬剤耐性試験法の確立」主任研究者
		厚生労働省	国際医療協力研究事業 「HIV-1 ガーナ株の薬剤感受性試験とモニタリング法の構築」(主任研究者:岡 慎一 国立国際医療センター)
第三室	松 田	厚生労働省	エイズ対策研究事「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)
		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	文部科学省	特定領域研究・感染と宿主応答「感染防御免疫を誘導する糖鎖変異エイズウイルスの初期感染機序の解析」研究代表者
		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:佐多徹太郎 感染病理部)
		厚生労働省	創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 エイズ医薬品等開発研究「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推進事業 エイズ医薬品等開発研究・国際研究グラント事業「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推進事業 国際研究グラント事業「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「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

エイズワクチンの開発はその社会的なプライオリティの高さにも関わらず、現在のところ実用化のメドが全く立たない状態にある。しかし、感染者の解析や、生ワクチン等を用いた動物モデルの解析からワクチン開発は可能であると予測されている。

本年度は最初の Phase III Trial である Vax Gen の Recombinant Envelope タンパクを抗原にしたワクチンの結果が明らかとなり、中和抗体主導型ワクチンの困難さがヒト臨床試行の結果からも明らかになった。従って、ワクチン開発の方向性は細胞性免疫主導型ワクチンの開発に向けられており、世界で約 30 に近い Human Trial が行われている。しかし、絶対的ワクチン評価動物モデルが欠落していることから候補ワクチンのワクチン効果の評価が極めて難しい状態にある。ここでは安全性とワクチン効果を示す日本で独自に開発できるワクチン開発を行い、前臨床から臨床レベルの開発研究に向けて検討中である。

１．プロトタイプ予防ワクチンの開発

プロトタイプワクチンとして HIV-1 CRF01_AE Gag 全領域を組み込んだパイロットプロダクションワクチンを作成した。また、この prime-boost ワクチンの概念に基づいた SIV ワクチン効果は、病原性 SHIV KS-661c を用いたサルエイズモデルを用いて確認され、長期にわたってウイルス血症をコントロールすることが明らかにされている。免疫誘導能に関しては SIV Gag、HIV-1 CRF01_AE Gag さらに、HIV-1 Clade B Gag を用いて感染防御が期待でき、細胞性免疫のレベルを誘導することができることを明らかにした。安全性については昨年度完了したサル及びマウス、モルモットのデータを病理学的、分子生物学的に解析し、安全性、安定性及び環境汚染に関する検討事項について解析し、前臨床レベルでの課題点をクリアした。さらに、タイ国とワクチン臨床開発における共同研究を行うための一連の特許に関して共有することになった。タイ FDA の Seed Lot Approval の申請書類の編集を行い、パイロットプロダクションのデータを加えると終了するところまで来た。

⑴ CRF01__AE 型（Subtype E）HIVgag を発現する組み換えワクチンの評価

当研究室で作成した組み換えワクチンrBCG/HIVgagE及びrDIs/HIVgagEによるprime-boost効果を解析した。3群のカニクイザルに、rBCG/HIVgagE 0.01、0.03 及び 0.1mg を priming として皮内接種後、すべての群に rDIs/HIVgagE 10^7 PFUをboostingとして 2 回皮内接種した。HIVgag特異的な細胞性免疫の誘導効果をIFN-γ ELISPOTにより解析した結果、rBCG 0.1mg接種群では、rDIsによるboost後、10^6 PBMC あたり 200~600 spot forming cell (SFC) が認められたが、0.01 及び 0.03 mg接種群では 100~200 SFCしか認められなかった。よって、接種量をrBCG 0.1mg + rDIs 10^7 PFUとするprime-boost系で有効な細胞性免疫を誘導できることが認められた。

[泉泰之、網康至（動物管理室）、松尾和浩、仲宗根正、山本直樹、本多三男]

⑵ SIV *gag* 全遺伝子を組み込んだ組み換え型 BCG (rBCG-SIVGag) の免疫誘導能の解析

rBCG-SIVGag をモルモットに 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、125 週後における免疫反応について解析した。IFNγ, IL-10, IL-12, TGF-βの抗原特異的な発現亢進を Real-time RT-PCR 法を用いて解析した結果、皮内接種群および経口投与群の PBMC、脾細胞において、PPD および Gag 特異的な IFNγ mRNA の発現亢進が観察された。その詳細を解析するため、PBMC、脾細胞を CD4 陽性細胞群、CD8 陽性細胞群に分離後、Real-time RT-PCR を行なったところ、CD4 陽性細胞群で顕著な PPD および Gag 特異的な IFNγ mRNA の発現亢進が検出された。また、両免疫群で Gag 特異的な血清 IgG 抗体の産生が観察された。その抗体価は非常に高く、免疫後 50, 100, 125 週において同等のレベルに維持されていた。0.1 mg 皮内接種のみで 2 年 6 ヶ月にわたり Gag 特異的免疫反応が維持されていたことは大変興味深い。これらの結果は、rBCG-SIVGag はウイルス抗原特異的な免疫反応を長期にわたり誘導・維持できることを示す。

[川原守、本多三男]

⑶ HIV-1 CRF01_AE 92TH022 株をベースにした候補ワクチン構築

HIV-1 CRF01_AE のコンセンサスに極めて近い配列を持つ 92TH022 株をベースに、gag 及び env 遺伝子を組み込んだ BCG と DIs を構築した。BCG については、gag 及び env それぞれ、DIs については gag 遺伝子発現株が得られた。Env の発現は、シグナルペプチド部分を除いた gp120 が最も顕著であった。gag と env の両方を組み込んだ BCG を構築中である。

[松尾和浩, 浜野隆一, 堀端重男, 本多三男]

⑷ HIV-1 V3 エピトープを分泌発現する組み換え BCG 及び DIs ワクチンの免疫誘導能

BCG と DIs の組み合わせによる抗体産生増強を目指し、HIV-1 CRF01_AE の V3 エピトープ (12mer)-α抗原融合蛋

白質を分泌発現する組み換え BCG と DIs の prime-boost 法を検討した。DIs を２回 boost されたマウスでは、α抗原に対する細胞性免疫の増強が見られたが、V3 ペプチドに対する抗体価は、BCG 単独接種の場合と差がなく、DIs boost による抗体産生増強は認められなかった。
[松尾和浩，浜野隆一，Kruavon Balachandra（NIH･Thai），本多三男]

⑸ 複製欠損型ワクチニアウイルス DIs 株と modified vaccinia virus Ankara (MVA)株のウイルス学的、免疫学特性の比較

HIV 候補ワクチンとして開発が進められている 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 DIs 株（rDIsSIVgag/pol)と MVA 株（MVA239SIVgag/pol)のウイルス学、免疫学的特性の比較を行った。各種の細胞株に対する感受性を比較した場合、MVASIV239gag/pol は鶏胚初代細胞、BHK-21 細胞及び CV-1 細胞での感受性が認められたが、rDIsSIVgag/pol は鶏初代細胞のみでしか感受性が確認できなかった。しかしながら、組み込んだ SIV 抗原は非感受性細胞においても MVASIV239gag/pol と比肩しうるレベル発現していることが確認できた。免疫原性の比較では、rDIsSIVgag/pol、MVASIV239gag/pol の単回投与群マウスに誘導された SIV gag 特異的 IFN-γ 産生細胞数の発現頻度には有意差が認められず、2 回投与群マウスでは単回投与群より高い SIV gag 特異的 IFN-γ 産生細胞数が確認できた。以上の結果から、DIs 株は MVA と比較して安全性が高く、外来抗原の発現レベルと免疫原性のレベルでも比肩できるベクターとして臨床応用できる可能性が示唆できた。
[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

HIV ワクチン開発はその時のサイエンスのニーズに対応することが要求されている。防御免疫誘導能と安全性を兼ね備えたワクチンの開発が HIV ワクチンの実用化には必須となるのでワクチンの発現と免疫誘導の関連を明らかにし、CCR5 ウイルスを防御できるワクチン開発を以下の方法で試みる。

1) R5 ウイルスのサルエイズモデル系の開発とワクチン評価への応用。
2) これまで問題とされてきた組換え BCG ワクチンのコドンの至適化のワクチン開発への応用。
3) コドンの至適化によって得られた免疫誘導の促進が防御免疫の誘導能にどのようにつながるかの解析。
4) prime-boost regimen による免疫誘導能の効果と防御免疫誘導が必ずしも一致しない理由の解析。例えば先天性免疫の活性化を考慮に入れたワクチン開発が R5 ウイルスの感染防御につながるか、否か。
5) 絶対的な HIV 感染動物モデルの開発のメドが世界的レベルでもたてられない現状での対応策として少人数の Human Trial による免疫誘導の特性とそのレベルの解析の必要性の検討。

等について研究を進める。

⑴ HIV-1 subtypeC をターゲットにした候補ワクチン構築

世界的に最も重要と考えられる HIV-1 subtypeC に対する候補ワクチン構築を開始した。ザンビアの HIV-1 感染者由来の subtypeC 分子クローンをベースに、DB26 株の gag 遺伝子を PCR 法で増幅し、BCG での発現ベクターとワクシニア DIs のトランスファーベクターにクローニングした。続いて、Gag 高発現株のスクリーニングを行う。
[松尾和浩，原敬志，堀端重男，巽正志，本多三男]

⑵ rDIsSIVGag の経鼻免疫による粘膜免疫誘導

rDIsSIVGag を経鼻免疫し抗原特異的免疫応答を誘導できるか検討した。経鼻免疫を行なったマウスでは SIVp27 特異抗体が血清、糞抽出液、膣洗浄液中で検出された。p27 特異抗体産生細胞は、脾臓、パイエル板、粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された。細胞性免疫応答は、CD4 陽性 T 細胞に Gag で特異的な刺激を加えることにより Th1/ Th2 サイトカインが産生され、Gag 刺激による IFN-γ産生 CD8 細胞も誘導されていた。この免疫応答は約 1 年後でも維持されていた。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

⑶ rDIs と rMVA との経鼻免疫による免疫能の比較

rDIsSIVGag と rMVASIVGag を経鼻免疫し抗原特異的免疫応答を比較した。粘膜免疫系では rMVA を用いた方が p27 特異的 IgA 抗体産生量が多かったが、全身免疫系では p27 特異的 IgG、脾臓での特異的サイトカイン産生ともに rDIsSIVGag が強く誘導していた。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

⑷ rDIsSIVGag の皮内接種による粘膜免疫誘導

rDIsSIVGag を皮内免疫し抗原特異的免疫応答を粘膜組織で誘導できるか検討した。皮内免疫を行なったマウスでは SIVp27 特異抗体が血清、糞抽出液、膣洗浄液中で検出された。p27 特異抗体産生細胞は、脾臓、パイエル板、粘膜固有層リンパ球でも ELISPOT 法で検出された。細胞性免疫応答は、CD4 陽性 T 細胞に Gag で特異的な刺激を加えることにより Th1/ Th2 サイトカインが産生された。非働化した rDIs では、これらの免疫応答は非常に弱くなっていた。
[吉野直人、兼清優、染谷健二、松尾和浩、山本直樹、本多三男]

⑸ 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 IgG 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。また，血清は in vitro においても中和活性を示すことが期待され，今後予定する SHIV のチャレンジ実験によって，防御免疫についても検討する。

[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]

⑹ コドン改変 SIV gag 遺伝子包含組換え BCG と組換え DIs によるカニクイサルの免疫誘導

前年までの成果から，組換え BCG において導入遺伝子のコドンをマイコバクテリアに最適化することで，外来抗原の発現を著しく上昇させることがわかった。また，小動物においても，外来抗原の免疫誘導能を高める傾向の結果を得た。そこで，この戦略を用いて SIV Gag を標的とした組換え BCG を作製し，カニクイサルにおいて防御免疫を誘導できるか検討した。コドン改変／非改変組換え BCG は，既に有効性が示されている組換え DIs との組み合わせによる prime-boost regimen で免疫し，免疫応答を比較した。コドン改変型 BCG 投与群では，接種 4 週以降から Gag 特異的 IFN-γ産生細胞が多数誘導され，また組換え DIs の接種によって免疫応答は飛躍的に増強された。一方，非改変型 BCG 投与群では，接種 4 週以降で Gag 特異的 IFN-γ産生細胞はみられるものの，組換え DIs による免疫増強は顕著にはみられなかった。これらのことより，コドン改変型 BCG の初回免疫抗原としての適性が明らかとなり，今後予定するチャレンジ実験における防御免疫評価の結果が期待される。

[兼清優、網康至（動物管理室）、松尾和浩、染谷健二、須崎百合子（動物管理室）、山本直樹、本多三男]

⑺ 合成プロモーター（PSFJ）を用いた組み変えワクシニア DIs 株の再構築と評価

本研究の目的は、HIV Gag-pol 遺伝子を発現する rDIs/HIV Gag-pol 株のワクチン効果の増強を図ることである。そこで、強力な発現を行う合成プロモーター:PSFJ を用いて、強力に発現する rDIs/HIV–Gag pol 株を再構築し、小動物を用いて評価検討する。

現在、PSFJ プロモーター下流に HIV および SIV の構造遺伝子 Gag-pol 遺伝子を発現する rDIs/HIV–Gag pol 株を再構築している。今後は，エイズ小動物モデルを用いて免疫応答を検討する。

［岡村智崇、松尾和浩、志田壽利（北海道大学）、本多三男］

⑻ マウスモデル及びサルモデルを用いた DNA プライム・リコンビナント DIs ブーストワクチンレジメンの評価

DNA ワクチンとリコンビナント DIs（rDIs)を用いたプライム・ブーストワクチンレジメンをマウス及びサルモデルを用いて評価した。DNA ワクチンまたは rDIs 単独に比べ、プライム・ブーストで免疫したマウスにはコードする SIV 抗原に特異的な強い Th1 型の細胞性免疫応答が誘導されており、防御免疫応答を評価するために接種した SIV 抗原をコードする致死性強毒ワクチニアウイルスの増殖を抑制することが明らかになった。同ワクチンレジメンを用いたサルモデルによる評価でもマウスモデル同様にプライム・ブーストで免疫した試験群は DNA ワクチン、rDIs 単独試験群に比べて強い Th1 型細胞性免疫応答が誘導されており、防御効果を確認するために接種した強毒性 SHIV の増殖を抑制できることが明らかにできた。以上の結果から、HIV 候補ワクチンを開発する上で、本プライム・ブーストワクチンレジメンが有効であることが示唆された。

[染谷健二、忻克勤（横浜市立大）、松尾和浩、網康至、仲宗根正、泉泰之、奥田研爾（横浜市立大）、山本直樹、本多三男]

⑼ BCG 由来α抗原と SIV 由来 Gag 抗原を発現する組換えワクシニアウイルス DIs 株の構築

本研究室では rBCG-Gag/prime、rDIsGag/boost のワクチンレジメンに従って免疫を行うことにより小動物及びサルにおいて Gag に対する特異的な免疫能を誘導することに成功した。今回、BCG 由来α抗原と SIV 由来 gag 抗原をワクシニア DIs 株で発現させたものを boost に用いることでさらに効果的で特異的な免疫機能を増強し、より高いウイルス感染防御能を得ることを目的とし、二種類の抗原を同時に発現する組換えワクシニアウイルス DIsGag-α株の構築を行った。BCG 由来α抗原と SIV 由来 gag という組合せでその両方の遺伝子を単一の DIs 組換え用ベクターにクローニングし、rDIs-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]

３．rDIs/SIVgag の治療ワクチンとしての効果の解析

幸いエイズ研究センターではHIVの遺伝子を組み込んでも親株の性質としてのほ乳類細胞での増殖欠損能を保持する性質を持つ組換えワクシニアウイルス株DIsHIVを作製し、種々の細胞株で明らかにした。このことはHIV感染症が免疫不全状態を来すことから治療用ワクチンのベクターとして安全性の面で不都合であり、使用可能となることを示唆している。即ちこれまで報告された細菌性及びウイルス性ベクターの中で治療用ワクチンへの応用が安全性の面で最も優れていることが明らかにされた。本年度の研究で感染ザルを用いた治療用ワクチン開発の検討を行い目的とするCD8 反応の完全な回復を得ることができることが可能となり、治療用ワクチン開発の糸口を見つけることができた。当研究室で作成した組み換えワクチンrDIs/SIVgagを、SHIV感染ザルに接種し、治療ワクチンとしての効果を解析する目的として、カニクイザルにSHIV C2/1 KS661cを 2000$TCID_{50}$経直腸接種し、viremia後にrDIs/SIVgag 10^8 PFUを 2 回皮内接種した。SIVgag特異的な細胞性免疫の誘導効果をIFN-γ ELISPOTにより解析した結果、rDIs/SIVgagの初回接種後には、4頭中 2 頭が 10^6 PBMC あたり 200 spot forming cell (SFC) 以上を示し、2 回接種後では、4 頭中 4 頭が 200SFC以上を示し、そのうち 3 頭は、500~700SFCを示し、感染ザルについても高い細胞性免疫が誘導されることが認められた。しかし、同時に測定したCD4 陽性リンパ球数の回復は認められなかった。ウイルス量に関しては、現在解析中である。

[泉泰之、網康至（動物管理室）、松尾和浩、仲宗根正、山本直樹、本多三男]

4．HIV 亜種解析による HIV ワクチンの開発

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た。各サブタイプクローンより vif 発現ベクターを構築して感染効率の違いを検討したところ、予想に反し、検討した全ての Vif クローンにおいて欧米型である標準株（NL4-3；サブタイプ B）と同等以上（ー３倍程度）の感染性増強作用が観察された。この事はワクチン開発において標準株のみでなく種々のサブタイプ株をも視野に入れるべきであるという我々の提唱を異なる側面から支持する貴重な実験データであると考えられた。

[石川晃一、明里宏文（霊長類センター）、徳永研三（感染病理部）]

5．各種のアジュバントを用いたワクチンの開発研究

HIV ワクチン開発において粘膜免疫誘導が可能であれば、HIV の主な侵入門である生殖器粘膜での感染阻止が期待される。そこで、SIVgag 蛋白、SIVgagDNA、HIVenvDNA と各種アジュバントを用いたマウス動物実験を行った。接種経路は経鼻および経膣で行い、免疫後の血清中および膣洗浄液中の特異的 IgG と IgA の検出を行った。その結果、M3- DPPE 被覆リポソームおよび PolyIC を用いた場合が最も抗体反応が良く長期間にわたり抗体が維持されていた。今後さらに中和活性の解析や ELISPOT 法による細胞性免疫能の解析を行うとともにサルを用いた感染防御試験を行いたい。

[石川晃一、明里宏文(霊長類センター)、佐多徹太郎(感染病理部）]

6．Env エイズワクチンデザインにおける糖鎖修飾の重要性

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。この構造はエイズウイルス感染における有効な免疫誘導障害の原因と考えられている。我々はサルエイズモデルの系を利用し病原性の SIVmac239 gp120 に存在する N 結合型糖鎖 5 個を欠失した変異ウイルスΔ5G が宿主応答により感染が制御され、さらに SIVmac239 に対する防御免疫が誘導されることを報告した。SIVmac239 とΔ5G の違いは Env タンパクのみであり、ウイルスの抗原性の違いがこのようなウイルス感染制御の違いの原因となるならば、Env タンパクに対する宿主応答に大きな違いがあることになる。そこで Env タンパクが誘導する免疫について SIVmac239 とΔ5G 感染に対する効果を調べた。アカゲザル８頭を用い、それぞれ４頭に SIVmac239 gp120 またはΔ5G gp120 を発現する DNA ワクチンで免疫し、次 SIVmac239 gp160 またはΔ5G gp160 を発現するワクシニアで Boost した。Boost 後８週に SIVmac239 (wt) Env 免疫群２頭、Δ5G Env 免疫群２頭に SIVmac239 またはΔ5G を静脈内接種した。まず SIVmac239 感染では、初期感染のピーク viral load は wt Env 免疫群に比べΔ5G Env 免疫群がわずかに低かった。初期感染後の viral load の最低値（set point）では wt Env 免疫群がΔ5G Env 免疫群より低値を示した。この結果は前年度の結果と一致した。Δ5G 感染では、同一群内の２頭で、初期感染のピーク viral load が異なったが wt Env 免疫群とΔ5G Env 免疫群の違いはなかったが SIVmac239 感染と比較すると 1/10 から 1/100 であった。viral load は感染後６週には検出限界以下となった。Δ5G 感染に対する Env の感染防御効果には糖鎖欠失の有無は関係しなかったが、Env 免疫は SIVmac239 感染と比較してΔ5G 感染を強く抑制した。

[杉本智恵、森　一泰]

7．組換えセンダイウイルスベクターエイズワクチン開発のための基礎研究

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 分子の細胞表面からの発現抑制や、T リンパ球の活性化などの作用があり、HIV-1 感染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、野生型 Nef と変異 Nef を発現する組換え SeV を作製し、培養細胞実験およびマカクサルモデルにおいて、主に MHC クラス I 分子の発現抑制作用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、俣野哲朗（東大・医・微生物学)]

II. HIV 感染症の治療

1．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が 7 種類、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 3 種類、プロテアーゼ阻害剤 7 種類の合計 17 種類の薬剤がある。これらの薬剤を組み合わせた Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART)の導入により AIDS による死亡率は顕著に低下した。しかしその一方で、治療薬剤に反応しなくなる薬剤耐性ウイルスの出現がいずれの薬剤についても報告され、治療を進めるうえでの大きな障害として問題となっている。薬剤耐性変異ウイルスの有無を判定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 年度より薬剤耐性検査を開始し 7 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 15 年度は 64 施設になり、解析を行った検体は 2003 年 12 月の時点で累積 5561 検体、1156 症例に達している。我々の調査からは薬剤耐性症例数は年々増加の傾を示しており、また耐性を獲得した症例の中では多剤耐性化が進んでいることが明らかになった。最近は治療を受けている症例だけでなく、新規感染者にも耐性変異を獲得している症例が認められるようになってきており、今後更なる疫学調査と症例に追跡調査が必要と思われる。
[杉浦 亙、松田昌和、千葉智子、西澤雅子、柿澤淳子、山田兼雄（聖マリアンナ医）]

2．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

プロテアーゼ阻害剤耐性を獲得した HIV-1 は往々にして増殖能力が低下していることが知られている。我々は、この増殖能力の低下の機序について解析を行ってきた。その結果、プロテアーゼの基質である Gag に集積し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。さらに、HIV-1 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、共焦点顕微鏡による HIV-1 感染細胞の観察から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、Gag が長く細胞内に貯留していることを明らかにした。また電子顕微鏡による観察からは出芽したウイルス粒子の多くが未成熟なことを明らかにした。
[Lay Myint、杉浦 亙、佐藤裕徳（遺伝子解析室）、富田康浩（遺伝子解析室）]

3．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 HIV-1 の性質や薬剤感受性などを把握するためには HIV-1 を回収し in vitro で解析することが不可欠である。採血後数日を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するために、相同組み換えを利用した HIV-1 再構築技術の開発を行った。昨年までに 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。また CRF_01AE の感染性クローンであるＮＨ１株を元に HXB2 同様に HRV3E と HRV5E を作成した。それぞれのベクターによる組み換え効率を評価した結果 HRV3、HRV5、HRV3E そして HRV5E それぞれ遺伝子導入後逆転写酵素活性ピーク達成までの日数は 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。また 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。より効率よく速やかに組み替え体を得ることを目的に組み替えポイントの変更、挿入する患者由来遺伝子の大きさなどの検討を行った。さらに効率よく組み替えウイルスを作成するために宿主細胞の検討を行った。その結果、M8166 細胞を用いることにより組み換え HIV-1 を高い力価で得られることを明らかにした。さらに組み換え HIV-1 ベクター自体も改良を加え、全 gag と全 pol 遺伝子を組み込むことができるようにした。
[松田昌和、千葉智子、三浦秀佳、杉浦 亙]

4．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 MaRBLE cell の樹立と実用化

感染性の HIV-1 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 14 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）および CMV 制御の renila luciferase を組み込み、HIV-1 の発現量を定量する新たな細胞株 MaRBLE cell の樹立に成功した。RFP を発する細胞数および firefly luciferase 活性は p24 抗原量で評価したウイルス量と相関した。CMV 制御の renila luciferase は測定系に投入された細胞数を補正する目的で導入し、実際 renila luciferase 活性は細胞数と高い相関を示し、renila luciferase 活性を測定することにより細胞数の補正と細胞毒性を評価することに成功した。この細胞を用いて再現性の高い薬剤感受性検査を完成させた。
[千葉智子、三浦秀佳、滝沢真理、松田昌和、松田善衛、本多三男、杉浦 亙]

5. 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

近年、発展途上国では WHO の"3 by 5" Initiative を受けて特許の制約のない抗 HIV-1 薬剤が用いられるようになっている。代表的な薬剤の組み合わせはｄ４Ｔ＋3TC + nevirapine であり、タイ王国においてもこの組み合わせによる合剤が産生され、多くの HIV-1 感染者に投与されつつある。治療薬剤の普及は同時に薬剤耐性 HIV-1 の出現頻度を高めることになり、今新たな課題として問題となっている。我々は将来この地域において薬剤耐性 HIV-1 症例が増加することを念頭に簡易薬剤耐性 HIV-1 検出系を開発した。まず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 15 年度は同じ手法を用いて新たに３Ｔ Ｃ耐性変異 M184V/I を検出する方法を確立した。この方法では患者血清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・サンアルン（タイ NIH）、パニータ・パチーバニッチ（タイ、ランパン病院）]

6. CRF01_AE（サブタイプ E）HIV-1 ウイルスのプロテアーゼの結晶構造解析

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。我々は昨年、サブタイプＥでは nelfinavir に対する耐性変異が異なっており、サブタイプＥではＤ30Ｎを取る確率は低く、代わりに N88S が獲得されることを明らかにした。平成 15 年度はなぜ CRF01_AE では D30N が獲得されないのかそのメカニズムを構造科学的に明らかにするためにプロテアーゼの精製と結晶化に取り組んでいる。
[柿澤淳子、松田昌和、千葉智子、杉浦 亙、セリア・シッファー（Univ. Massachusetts）]

7. 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）]

8. 新たなインテグラーゼ阻害薬剤の開発

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 15 年度は 12000 個の化合物ライブラリーより複数のインテグラーゼ阻害剤候補物質を見出した。その中で今まで報告されてきた diketo acid とは異なる化合物を見出した。これはカルバゾールを基本骨格にもつ低分子化合物であり、strand transfer 阻害活性を呈した。
[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）]

9．細胞内におけるプロテアーゼ阻害剤の薬物動態解析研究

治療薬剤血中濃度測定は適切な治療を行なうために有用だと考えられ、多くの研究が成されてきた。一方、薬物の直接の作用部位である細胞内における薬物の濃度、代謝などは明らかにされていない。平成 15 年度は細胞種の違いによる細胞内濃度、代謝の相違について検討を加えた。解析した細胞はHIV-1本来の宿主であるCD4陽性T細胞と本来の宿主ではないが頻繁に用いられているHeLa 細胞である。まず 5 種類の PI(NFV、SQV、LPV、RTV、IDV)を各々2.5uM の濃度で培地中に添加してHPB-M(a)に 20 分間取り込ませた後、細胞から PI をメタノールで抽出し、HPLC にて抽出液中の PI 濃度を測定し、細胞内濃度に換算した。その結果 HPB-M(a)細胞内にNFV は約 134.4 倍、SQV は約 92.6 倍、LPV は約 11.9 倍、RTV は約 11.8 倍濃縮された。IDV の細胞内濃度は 3.1uMで、細胞内への濃縮はほとんど認められなかった。また培地中 NFV 濃度を 10uM として HeLa 細胞と HPB-M(a)に各々20 分間取り込ませた場合 HeLa 細胞内の NFV 濃度は約 180uM で、HPB-M(a)の約 880uM に比べ 1/5 程度の細胞内濃度だった。今後他の PI の細胞内濃度についても比較し両細胞における薬剤の取り込みについて検討する。
[西澤雅子、岡野愛子、杉浦 亙、加藤真吾（慶応大学）]

10. CRF01_AE 家族内感染例-NH3-に見出された高度薬剤耐性の獲得機構

HIV-1 の治療に用いられている抗ウイルス剤は逆転写酵素（RT）やプロテアーゼ（PR）の阻害剤であり、投与を続けることにより耐性ウイルス株が生じることが問題となっている。これらの酵素については、すでに個々のアミノ酸残基の置換の耐性への貢献度に関して多くの知見が蓄積しているが、実際の患者では複数のアミノ酸置換が組み合わせで耐性が獲得されている場合が多く、複製中に生じる塩基置換から完成された耐性株へ至る進化過程については必ずしも明確ではない。最近我々は、家族内感染例（NH）の中で HAART 治療歴のある NH3 と呼ばれる患者から、多くの NRTI に高度に耐性を持つ逆転写酵素（RT）領域の配列を得た。この RT の特異な耐性は、活性部位の大きな挿入配列と点突然変異（M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y）によって獲得されている。このように複雑な変異構造を持つ酵素の進化過程を知るため、薬剤投与前後の検体の血漿および PBMC 分画からHIV-1 の RT 領域の配列クローンを多数採取し、その変異を塩基配列と薬剤耐性の両面から観察した。HAART 実施後に得られた検体の血漿分画からは、上記の複数の点突然変異を持つ RT のみが検出された。一方、同じ検体の PBMC 分画からは、L210W, T215Y のみを変異した配列および、M41L, Ins69, T69I のみを持つ配列が発見された。RT 領域の遺伝子配列の進化学的解析から、このウイルスが PBMC 分画から得られた２つの配列に近縁なウイルス同士の組換えで発生したことが示唆された。これらの配列変異を持つウイルスの実際の薬剤感受性を計る目的で変異ウイルス株を作成したところ、部分的に変異したウイルスも若干の耐性を獲得していることが明らかとなった。そこで、部分的に変異のある RT 領域に、さらに遺伝的マーカーとして制限酵素 SacI 切断部位の変異を加えた感染性クローンを作成し、これらのウイルスを用いた in vitro 共感染実験を行うことで、どのような薬剤濃度環境・ウイルス負荷条件で高度耐性変異への進化が生じるかを確かめている。
[椎野禎一郎、佐藤裕徳（遺伝子解析室）]

III. HIV の分子疫学研究

1．HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

2000 年に雲南省において収集した CRF08_BC 分離株 HH040 の 5’ LTR から pbs までの約 800 bp および pbs から 3’ LTR までの約 9000 bp を結合させて得たクローンから、PBMC に感染しウイルスを産生する２種類の感染性分子クローン NX4 と NX22 を得た。いずれのクローンも PBMC への感染性を有するが、NX22 の方がより早い kinetics でより多くのウイルスを産生した。いずれのクローンも CXCR4 は使用せず CCR5 のみを使用した。この性質は、分離株 HH040 と一致していた。また２つのクローンの NP2 への感染性を比較すると、PBMC の場合とは逆に NX4 の方がより強い細胞変性を伴って良く増殖することが分かった。gp160 および gp120 の血清学的交差性をみると、CRF08_BC とサブタイプＣの間では血清学的に交差性があるものの、サブタイプＢとの間では交差性が低いことが示唆された。本研究で得られた感染性分子クローンは、中国における HIV-1 の流行株のウイルス学的研究および将来のワクチン開発のために有用な分子クローンであると考えられる。
[草川　茂、楊　栄閣、武部　豊]

2．HIV-1 サブタイプ B’の感染性分子クローンの樹立

東南アジアにおいて見い出される HIV-1 サブタイプ B は、系統進化学的に欧米において流行しているサブタイプ B と区別され、サブタイプ B’と分類される。サブタイプ B’は、タイにおいては感染者数が減少しているものの、ミャンマーにおいては代表的な流行株であり、また中国内陸部の新興流行はサブタイプ B’によるものと報告されており、アジアにおける HIV-1 流行を考える上で重要な

サブタイプである。PCR を用いた増幅技術を用いて、研究試薬として重要なサブタイプ B'の感染性分子クロー ン（B106.22）を樹立した。B106.22 は PHA 刺激 PBMC において、これまでに当研究室で作製してきたいずれのクロー ンよりもより早くかつより多量のウイルスを産生した。しかしながら、M-CSF で誘導したマクロファージへの感染性は認めなかった。B106.22 は CXCR4、CCR5 のいずれを発現させた細胞でも強い細胞変性を伴ってよく増殖し、両方を coreceptor として使用する X4/R5 ウイルスであることが分かった。この性質は、分離株 B106 と一致する。coreceptor usage に関係があるとされる V3 ループのアミノ酸配列を見たところ、総電荷は６で、6-8 位のアスパラギン結合型糖鎖付加部位（NNT）は保存されていた。本研究で得られたクローン B106.22 は、サブタイプ B'特異的なウイルス学的性質の解析にとって重要なクローンであると考えられる。また、ミャンマーや中国雲南省において見い出されるサブタイプ間組換え体の多くはサブタイプ B'の領域を含んでおり、組換え体の出現機構の解析への応用も期待される。
[草川　茂、今村裕子、武部　豊]

3．HIV-1 サブタイプ C が持つ稀な CXCR4 利用能を決定する V3 ループ内の責任アミノ酸残基の同定

HIV-1 サブタイプ C 株のほとんどは CCR5 を coreceptor として利用し CXCR4 を利用しないが、これまでサブタイプ C の coreceptor 利用の分子メカニズムについては明らかにされていない。本研究では、両方を coreceptor として利用する分離株 96USNG31 を用いて HIV-1 サブタイプ C の coreceptor 利用能を決定する遺伝子領域の特定を試みた。その結果、他のサブタイプ同様、*env* 遺伝子の V3 領域の置換によって coreceptor 利用能の変換が起ることを確認した。96USNG31.4 の V3 領域のアミノ酸配列を CCR5 利用性の IndieC1 と比較したところ、３ケ所に coreceptor 利用能決定に関与する可能性がある塩基性アミノ酸への置換（21Y→H、23T→H、32Q→K）が見い出された。これらのアミノ酸の点変異体を作製し coreceptor 利用能を検討したところ、23T→H、32Q→K 単独の変異体は CCR5 のみを利用できるのに対し、21Y→H、23T→H の２ケ所を同時に置換した変異体は CXCR4 と CCR5 両方の利用能を有していた。HIV-1 サブタイプ C の coreceptor 利用能は *env* 遺伝子の V3 領域のアミノ酸配列によって決定され、CXCR4 利用能の獲得には 21 番目のヒスチジンへの置換、あるいは塩基性アミノ酸数の増加による総電荷の増加が重要であると推定された。
[上原理恵子、草川　茂、加藤佳代子、武部　豊]

4．逆転写遺伝子領域を用いたHIV-1遺伝子組換えの*in vitro* 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。我々はすでに、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において、フィールド株に見出された多数の組換え体を比較し、組換え点のあるものが相互に共有されていること可能性を示唆した。組換えの検出には相互に異なる変異サイトの存在が不可欠であるが、フィールド株には都合の良い変異サイトが少なく HIV-1 の組換えの起きるゲノム上の位置を遺伝学的に解析するには限界がある。ウイルスゲノムの組換えの機構を知るためには、in vitro の感染系で使える遺伝子マーカーを多数持ったウイルスの開発が不可欠である。また、配列レベルでの解析を容易にするためには組換えを観察するゲノム領域は短いほうが良いが、１回の塩基配列解析で解析可能な領域で交叉が起きる確率は、低いことが予測される。そのため、必要に応じて組換えを起こしたウイルスのみを的確に選択できる系が要求される。そこで我々は、疫学的調査で高い組換え頻度が観察されている逆転写酵素領域（RT 領域）に注目し、マーカー遺伝子として制限酵素切断サイトに同義置換変異を導入した。さらに、RT の抗ウイルス剤耐性変異の組み合わせを応用して、400bp 弱の領域に組換えが生じた時のみ次代のウイルスが採取できるような系を構築した。こうした組換え HIV-1 を用いて、さまざまな条件下での組換えのパターンを観察している。
[椎野禎一郎、保科佳美、武部豊]

5．アジアにおける新規組換えウイルス新生地点での HIV-1 共感染の高頻度検出

われわれは先の研究によって、アジアの一部地域（中国雲南省西部− ミャンマー中部地域）に、新しいタイプの組み換えウイルスが新生している極めて特殊な地点の存在することを見い出したが、組み換えウイルス新生の前提として、異なる系統の HIV-1 株の共感染が、この地点では高頻度に起っていることが予測される。そこでわれわれは、共感染例の検索と個体内 HIV-1 準種の解析を行うために、TA クローニング技術を用いて、感染者個体内に存在するウイルスゲノムのクローナル解析を行った。その結果、5-10%以上に共感染が見られること、共感染しているウイルスはさらに多様な組換え構造をもつものも含まれ、HIV-1 組み換えの nascent なプロセスが明らかとなった。これら地域のハイリスク感染者が、多系統の HIV-1 株に多重に感染する機会をもっていること。また生物学的に重要なことであるが、これらの例では重（スーパー）感染を阻害するメカニズムが作動していないことが示唆される。これらの知見は、とりわけ将来のワクチン戦略を考えられる上で重要な意味があると考えられる。HIV-1 組換えの発生とその選択・淘汰・定着の過程は、これまでほとんど解明が進んでいない分野であ

り、現在長期的なフォローアップ研究が進行中である。
[Xiaojie Li, 保科佳美、Yanling Ma, Chaojung Yang, Qianqiu Wang, 椎野禎一郎、草川　茂、Xueshan Xia, Kunlong Ben (中国科学院、昆明動物学研究所), Min Thwe, Tin Aung, Kay Thi Aye, Khin Yi Oo, Hlat Htut Lwin（ミャンマー保健省 AIDS/STD 予防対策プログラム），武部豊]

6. 中国南西部（雲南省）における HIV-1 流行の分子疫学

中国における HIV 流行の第２の波は性的ルートによる HIV 感染の拡大であり、特に今後危惧される一般集団への侵淫の前触れとなると言う意味でその解析の疫学的意義は大きい。われわれは、中国で最初の HIV 流行が起った雲南省における性的ルートによる感染者に関して解析を行った結果、先行する注射薬物乱用者（IDU）の流行に強く影響されていることを明らかにした。1997 年以前は特にサブタイプ B'が、2000 年以降は CRF07_BC および CRF08_BC が優勢なウイルス種となっている。タイの流行に由来するウイルス株（CRF01_AE）が流行の主体となっている他の東南アジア諸国や、上海など中国沿海部とは著しい差異であり、流行形成のメカニズムの違いを示唆するものである。
[Xiaojie Li, Yanling Ma, Chaojung Yang, Qianqiu Wang, 保科佳美、横田侑子、今村裕子、草川　茂、Xueshan Xia, Kunlong Ben（中国科学院、昆明動物学研究所), 武部豊]

IV. HIV-1 感染性クローン樹立法ならびに各種研究技術の確立

1. HIV-1 感染性クローン樹立法の確立

著明な多様性を呈する HIV-1 をその特性を保持したまま迅速に感染性クローンを樹立することを目的に方法論の改良を引き続き試みている。本年は HIV-1 全長ゲノムを安定に保持するクローングベクターの開発と、クローニング戦略の改良により従来の方法論よりも格段に迅速に感染性クローンを樹立することが可能になり、この戦略を感染爆発が現在進行しているアフリカ Zambia および Ghana 由来のウイルスに応用し多数の感染性クローンを樹立することが出来た。
[巽　正志]

⑴ HIV-1 ゲノムクローニングベクターの構築
HIV-1 全長ゲノムは両端に LTR をもつことや宿主大腸菌に Toxic な配列があるなどから、High copy 数のプラスミドでは欠損を起しやすく極めて不安定であることが知られている。そこで HIV-1 ゲノムをより安定に保持するプラスミドベクターの構築が迅速な感染性クローン樹立の前提条件になると考え、copy 数がより少ない pBR322 を基本骨格に様々なクローニングベクターに由来する MCS とそれをより HIV-1 に特化した制限酵素部位をもつ、青白選別可能なクローニングベクターpMT シリーズ５種を構築し、pMT1 ベクターを用いて様々な HIV-1 全長ゲノムを安定に保持することが判った。
[巽　正志]

⑵ Half and Half クローニング戦略による Full-genome クローン樹立の効率化
当初、完全長 DNA クローン作製は、5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、PBS 領域に保存されている Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で一気に増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精製後組み込む方法であった。しかしながら全長クローン取得率は低かった。そこで HIV Database から Vpr および Vif 領域における Rare cutter 制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で Vpr および Vif 下流領域を増幅し pMT1 に組込み、しかる後に Vpr および Vif 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組込む Half & Half 戦略を用いて全長クローンを効率的に得ることができた。この Half & Half Strategy の効率を確認するため、NL4-3 株感染 MAGIC-5A ゲノムを鋳型に Vpr 領域の EcoR I site を用いた Primer で再構築した NL4-3 クローン感染性クローン樹立効率を確かめたところ全長クローン中約 10%となった。
[巽　正志]

⑶ Zambia 由来 HIV-1 subtype C 感染性分子クローンの樹立と解析
UNAIDS によれば 2003 年末までに全世界での HIV 感染者総数は 4,200 万人にも及び、その多くは開発途上国に集積しており、なかでも subtype C 感染者が最も多いとされる。一方 HIV 研究は欧米に流布する subtype B を中心になされ，HIV 解析用各種研究試薬も subtype B 以外はほとんど整備されていない現状にある。しかしながら，subtype B は世界の流行全体からみれば minor な subtype である。そこで subtype non-B に対する解析用研究試薬整備を目的に，その開発基盤となる感染性分子クローンの樹立を目指して研究を進めている。我々は先の 1998 年にインド人患者由来ウイルスより subtype C の感染性クローン pIndie-C1 の世界に先駆けての樹立を報告したが、subtype C でもインド大陸で流行する株はアフリカでのそれの１亜株とされている。そこで感染爆発が進行しているサブサハラアフリカで流行しているウイルスの感染性分子クローン樹立を試みた。2002 年に Zambia で分離されたウイルスを「HIV Trapping System」で Long PCR Amplicon 組込みを Half & Half Strategy に改良することにより８名の患者から効率的に９クローンの感染性ク

ローンを樹立し得た。その全塩基配列を決定し、近隣結合法によって分子系統樹を作成しその帰属を決定し、その感染性を検討したところ 1) 全てのクローンは全長にわたりアフリカ型 subtype C にクラスターされ 2) 全てのクローンは MAGIC5A や NP2 細胞など不死化細胞のみならず，PBMC でも増殖した。感染者総数が最も多いサブサハラアフリカで流行する subtype C の純粋な感染性分子クローンの複数分離に世界に先駆けて成功した。これらのクローンはワクチン開発等ウイルス学的解析に資するものと期待される。
[原　敬志、市山浩二(Zambia 大学教育病院)、Francis Kasolo(Zambia 大学教育病院)，照沼　裕(日本バイオセラピー研究所)、本多三男、山本直樹、巽正志]

⑷ Ghana で流行する HIV-1 の感染性クローンの樹立

Ghana 国に多剤併用療法を導入するにあたり、現地で現在流行している HIV-1 subtype の特性を把握し、より現地のウイルスに則した薬剤感受性試験法開発のための分子基盤としての感染性クローンの樹立を試みた。Ghana 25 検体からの樹立概要を述べる。本年 7 月 28 日から 29 日にかけ首都 Accura 近郊で採取した患者 EDTA 附加血液はおよそ 2 日間の空輸ののち搬入され直ちにリンパ球分離の上 Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離を試みた。その分離効率は Donor PBMC との Coculture で 12/25、MAGIC-5A 細胞との Coculture で 16/25 であった。分離ウイルス株感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に簡易 subtyping 法である gag 領域を標的とした Heteroduplex Mobility Analysis によりその subtype を推測したところ、subtype A 7/18，AG Recombinant 6/18，subtype G 2/18，判定不能 3/18 であった。MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」で HIV-1 genome の Vpr および Vif 領域に多くの HIV-1 で保存されている部位を Primer に用いて構築する Half and Half Strategy をとることにより、Ghana 由来 subtype A 6 クローン、AG Recombinants 7 クローンおよび世界に先駆けて subtype G 2 クローンの樹立に成功した。現在その特性付けをしている。
[木ノ本正信、徳永研ニ、N. Nii-Trebi (野口記念医学研究所、ガーナ）、佐多徹太郎（感染病理部）、巽　正志]

2. HIV-1 感染価迅速測定細胞 MAGIC-5/SEAP の樹立と薬剤耐性試験法への応用

新規HIV感染価測定細胞株MAGIC-5/SEAP細胞を樹立し薬剤耐性試験法に応用した。この新規細胞株は、HIV-1 感染により誘導される培養上澄中の SEAP 酵素活性を、化学発光基質を添加するだけで HIV 感染を検出可能であり、各種抗 HIV 薬に対する薬剤耐性度を迅速簡便高感度にて測定できた。より臨床像に則した３剤併用薬剤耐性試験「All-in-One Assay」を開発し多検体処理が可能となる標準化を達成した。またこの迅速測定法に用いる細胞株の管理の標準化を行い、JST 委託事業により薬剤耐性 Phenotype 試験法の実用化にむけ体制を整えつつある。さらに HIV-1Full-Genome 感染性クローンの効率的な樹立法を確立し、より進化した GenoPhenotyping 法への道筋を開拓し、今後の薬剤耐性試験の臨床検査実用化が視野に入ってきた。
[橋本　修（三菱化学 BCL）、石子博昭（三菱化学 BCL）、蜂谷敦子（国立国際医療センター）、岡　慎一（国立国際医療センター）、巽　正志]

3. アンプリコア HIV-1 モニターv1.5 のコントロールサーベイ

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 1 年に 1 回コントロールサーベイを実施した。参加施設は 38 施設（標準法が 30 施設、高感度法が 29 施設）であった。ルーチンで HIV ウイルス量を測定している施設のほぼ全施設が参加したことになる。82%の施設に何らかの問題が認められた。2000 年から毎年精度管理調査を実施しているが新しく参加した施設および過去に参加した施設でも新人が検査を担当するなど施設間の条件も毎年異なり、機器の保守・点検と共に取扱説明書の再チェックなど、常識と思われることが忘れられていることがわかった。
[吉原なみ子、坂本優子、今井光信（神奈川県衛生研究所]

4. 血液凝固因子製剤中の PCR による HIV-1 遺伝子検出

1979 年から 1994 年までに製造された凝固因子製剤で、入手可能であったについて HIV-1gag 領域を nested PCR で増幅し、電気泳動で HIV-1 遺伝子の検出を行った。入手出来た第Ⅷ因子製剤、15 製品、304 ロットのうち、HIV-1 が検出されたのは 1984 年以前に製造された4製品、43 ロットであり、すべて海外で製造された製品であった。1985 年以降の製品には見つからなかった。なお、50 ロット中 37 ロット(74%)に HIV-1 遺伝子が高率に検出された製品があった。また、第Ⅸ因子製剤、12 製品、76 ロットのうち、2製品、6ロットに HIV-1 遺伝子が検出された。これらはすべて 1985 年以前に海外で製造された製品であった。
[吉原なみ子、福嶋浩一]

5. コラー ゲンスポンジ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

コラー ゲンスポンジと正常ヒト皮膚繊維芽細胞から作成したバイオヒト皮膚モデルを用いて、バイオヒト皮膚モデル製品のHIV汚染時のHIV-1 検出を検討した。皮膚モデルにOM10.1 を 10^{1-5}個接種後HIV-1p24 抗原検出及びRT-PCRによるHIV-1 検出を行った。細胞増殖率は 10^5個

接種では3日目から、10^{1-4}個接種では6日目より急速に低下した。HIV-1 p24 抗原は 10^{3}個接種以下では検出できなかったが、RT-PCRは3日目には全例でHIV-1を検出できた。以上よりこのヒト皮膚モデルはHIV-1 検出に応用できるが、少量の感染細胞汚染時はRT-PCRなど高度のウイルス検出法を採用すべきであろう。
[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]

6．逆転写酵素活性（RT）高感度測定法を用いた薬剤耐性 HIV-RT 定量法の開発

1) 米国疾病予防制御センター（CDC）の山本・Heneineらが開発した逆転写酵素(RT)活性高感度測定系（Amp-RT)を改良し、より簡便な測定系を完成させる。2) さらに同系にて薬剤耐性 HIV-RT を測定モニター可能なシステムを開発する。3) しかるのちに実際にHIV-1感染者血漿中のRTあるいは薬剤耐性RTを測定モニターし、治療効果や病態進行の新たな指標としての意義を明らかにする。4) また、同システムの薬剤感受性テストとしての可能性も明らかにする。以上を目的として昨年度までに、Amp-RT/TaqMan 測定系を確立し、測定限界値は 0.8 copy/□l であることを確認した。しかしながら培養上清は正確に測定可能であるにも係わらず、血漿サンプルがうまく測定できない問題が生じていた。本年度はその問題点を解決した。すなわち抗凝固剤としてヘパリンが使用されている場合に測定感度が低下し、ヘパリン以外の抗凝固剤では測定に影響がないことを確認した。HIV/AIDS の動物モデル・SHIV/サルの系で血漿中 RT 活性を測定したところ、セットポイント期ではウイルス RNA 量と相関するものの、感染初期ではウイルス RNA 量に比し RT 活性が低いことが確認された。さらに同じサルにおいて髄液中のウイルスについて同様の低下が確認された。以上より、RT 活性/ウイルスコピー数はウイルスの defectiveness の指標である可能性が推測されることから、病態進行の新たな指標となることが示唆された。
[仲宗根正、本多三男、Walid Heneine（米国 CDC）]

7．HIV 感染症統合データベースの開発と運用

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、運用している。

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 16 年 3 月末現在、DDBJ の HIV 遺伝子 DB（100,017 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 361(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、科学技術振興機構]

V. HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1．ヒト免疫不全ウイルス（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HIV-1 の感染に際しての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おらず、膜貫通部分の寄与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（G：グリシン）配列が存在するが、グリシンに変異を導入しても膜融合能の低下はみられない。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、gp41 膜貫通部分の変異に対する可塑性が無限ではないことがわかった。異種膜貫通部分置換体において解析を進めた結果、タンパク質の発現、輸送、CD4結合能に著変は認められずCD4受容体結合後の過程における障害が示唆された。膜融合過程の解析はあらたなHIV-1 複製阻害剤の開発につながる可能性をもっている。
[宮内浩典、駒野淳、松田善衛]

2．プロテオーム解析（プロテオミクス）によるヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）感染およびAIDS 発症に関与する宿主因子の解析

近年 HIV-1 感染、AIDS 発症への抵抗因子の形で宿主因子の関与が注目されている。われわれは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を用いてHIV-1 複製に影響を与える宿主タンパク質の同定を試みている。いくつかのタグを付加したHIV-1 ウイルスタンパク質を発現するT細胞株を確立し、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HIV-1遺伝子産物の機能解明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。
[松田善衛、駒野淳、宮内浩典、清水佐紀、山本直樹]

3．霊長類レンチウイルス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 のみならず、SIV 感染の効率が低下することを見い出した。さらにワクシニアウイルスも感染に Arp2/3 複合体の機能が重要であることが判明した。一方、HSV-1、MLV、Adenovirus などの感染には Arp2/3 複合体非依存的であることが示唆された。以上より、霊長類レンチウイルスが効率良く細胞に感染を成立させるためには、Arp2/3複合体の機能依存的な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が示唆された。
[駒野淳、宮内浩典、松田善衛]

VI. HIV感染動物モデルの開発に関する研究

1．サルモデル

⑴ Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル・エイズモデル開発

HIV感染症における感染源としてCell-associated virusの重要性はいくつか報告されているにも係らず、既存のサル/エイズモデルを始め、全ての動物モデルはCell free virus のみを用いている。感染源としての Cell-associated virus の重要性を確認すると共に、Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル・エイズモデルを確立し、ワクチン評価やHIV粘膜感染機序解明に資することを目的として今年度は次の実験を行った。HIV 感染症の動物モデル・SHIV/カニクイサルエイズモデルを用いた。SHIV感染細胞を培養液中に浮遊させ経直腸的に接種する方法では感染しないことが判明している。そこで、培養液の替わりにサル自己血液を用い、血液そのもの、あるいは血漿に SHIV 感染細胞を浮遊させ、より精液環境に近い感染源を作成し、それを経直腸的にカニクイサルに接種した。接種後、ウイルスの感染を血中ウイルス量でモニターし、病原性について血中CD4細胞数の推移で判定した。その結果、２頭のサルとも SHIV 感染細胞の経直腸的接種により感染が成立し、感染後の血中ウイルス動態とCD4細胞数動態は、Cell Free SHIV 経直腸感染後の動態と同様であった。すなわち、これまでの報告と異なり、Cell-associated virus 経粘膜感染は成立し得る系である事が判明した。Cell-associated virus 経粘膜感染によるサル/エイズモデルは、既存のモデルに比べてよりヒトに近い動物モデルであると考えられることから、感染機序や病態の解明が進み効果的なワクチン開発に貢献すると考えられる。次年度は、至適投与量を決定し、本モデルを確立する予定である。
[仲宗根正、兼清優、吉野直人、山本直樹、本多三男、網康至（動物管理室）]

⑵ 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 KS661（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、C2/1との間で5’側・3’側の半分ずつを組換えたウイルスを作製してアカゲザルに接種、病態を観察した。その結果、5’半分 Clone64＋3’半分 C2/1 型組換ウイルス接種ザルは４頭中３頭が発症したのに対し、逆の組合せの組換ウイルスの場合４頭中２頭が発症した。後者発症ザル中のウイルスの部分シーケンスにより、Env gp41 の２ヵ所のアミノ酸がClone64型からC2/1型に変異していることが確認された。サル接種試験の結果を総合すると、Env gp41内の特定部位が病原性発現に関与している可能性が考えられる。
[阪井弘治、篠原克明（バイオセーフティ管理室）、Iouri 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）]

⑶ 糖鎖欠失 SIVmac239 変異株のアカゲザル感染における感染防御免疫の解析」

SIVmac239 のエンベロープタンパク gp120 に付加されている 22 個の N-結合型糖鎖のうち 5 個を欠失したΔ5Gを作製し、アカゲザルへの感染実験を行い、ウイルス感染の状態と宿主免疫応答の解析を行った。Δ5G は感染初期には SIVmac239 と同等のウイルス増殖をするが、感染後 8 週目までに血中ウイルス量は検出限界以下に速やかに低下し、そのレベルを維持している。このようなΔ5Gの感染制御の原因を解明するため、Δ5G 感染ザルに誘導された感染防御に関する免疫応答を解析した。中和抗体価を測定した結果、Δ5G に対する中和抗体価は 2 頭のサルで高く、別の 2 頭では中ー低、残りの 1 頭では全く検出できなかった。SIVmac239 に対する中和抗体はどのサルでも検出できなかった。さらに細胞性免疫誘導を調べ

るため、IFN-γ ELISPOT assay によりウイルス特異的 CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞を測定した結果、中和抗体が高かった 2 頭は両ウイルス特異的 T 細胞誘導が低く、中和抗体が中ー低のサルではウイルス特異的 T 細胞誘導は中ー高、中和抗体が全く検出されなかったサルは非常に高いウイルス特異的 T 細胞誘導が検出された。これらの結果から 5 頭のΔ5G 感染ザルにおける中和抗体とウイルス特異的 T 細胞誘導の強さは有意に逆相関することが示された(r=0.97、p<0.01)。すなわちΔ5G の感染防御において、中和抗体とウイルス特異的 T 細胞どちらの免疫誘導が主体となるかは個体ごとにことなり、さらに個体の中で両免疫誘導のバランスがとれていることが明らかになった。これらの結果から、Env の糖鎖欠失は免疫原性を上昇させる作用があるというよりはむしろウイルスの感染様式の変化などウイルス学的性質の変化を引き起こし、これが弱毒化に関与すると考えられた。
[杉本智恵、森　一泰]

⑷ 糖鎖欠失 Env と中和抗体感受性、細胞指向性および CD4 非依存性との関連

糖鎖欠失 SIVmac239 変異株、Δ5G はアカゲザル感染で弱毒ウイルスの性質を示すことを明らかにした。これまでの研究では Env の糖鎖欠失は中和抗体感受性と関与しており、糖鎖欠失ウイルスの弱毒化は宿主における中和抗体誘導の結果であると考えられている。しかし、Δ5G 感染ザルに誘導された免疫応答の解析では糖鎖欠失に特異的な免疫誘導は検出されなかったことから、Δ5G の感染制御には糖鎖欠失によるウイルス学的性質の変化が関与しているのではないかと考えた。そこで、Δ5G のウイルス学的性質を明らかにするため、細胞指向性、中和抗体感受性、CD4 非依存的細胞融合能を解析した。これまでの研究において、T 細胞指向性である SIVmac239 はほとんど中和されず、マクロファージではほとんど増殖しないことが明らかである。また SIVmac239 Env の細胞融合には CD4 との結合が不可欠である。それに対して、Δ5G はΔ5G 感染ザル血漿で中和されたこと、T 細胞では SIVmac239 と同等に増殖し、さらにマクロファージでの増殖性も獲得したこと、部分的ではあるが CD4 が存在しなくても CCR5 のみで細胞融合が起こることが示された（CD4 非依存性）。このような性質の変化はΔ5G の 5 つの糖鎖欠失のどれが関与しているのかを調べるため、Δ5G 関連の 1ー4 個の糖鎖欠失を持つ SIV を用い、中和抗体感受性とマクロファージ指向性を調べた。その結果、V1/V2 領域の 1 つの糖鎖欠失がΔ5G の性状変化に最も重要であることが示された。これらの結果から、Δ5G は SIVmac239 とは異なる組織または細胞に感染する可能性が示唆された。
[杉本智恵、森　一泰]

⑸ 感染後早期治療ザルに誘導された gag 特異的 CD4+T 細胞のエピトープと MHC II allele の決定

同一の MHC haplotype を持つ 2 頭の SIV/SHIV-RT 感染ザルから gag 特異的 CD4+T 細胞を分離した。それぞれの細胞は共通する gag peptide による抗原刺激により分離されたがその epitope は異なっていた。アカゲザル Mm9703 から分離された細胞のエピトープは gag262-271 :YRRWIQLGLQ (10 アミノ酸)で,アカゲザル Mm9429 から分離された細胞のエピトープは gag261-272:IYRRWIQLGLQK (12 アミノ酸)であった。同一 MHC haplotype に共通して存在する 2 種の DR alleles (DRB*w2002, DRB*w2501)を 293T 細胞に発現し gag peptide の抗原提示能を上記 CD4+T 細胞の活性化を指標に調べた。DRB*w2501 は Mm9703 から分離された CD4+T 細胞を gag ペプチド特異的に活性化したが、Mm9429 から分離された細胞は活性化されなかった。もう一方の allele DRB*w2002 はいずれの CD4+T 細胞を活性化しなかった。Mm9703 から分離された CD4+T 細胞は DRB*w2501 に提示される gag262-271 により抗原刺激を受けることが明らかとなった。Mm9429 から分離された CD4+T 細胞は R90-120 MHC haplotype B を持つすべての BLCL により gag ペプチド特異的に抗原刺激を受けることから、DRB*w2501 を発現する 293T 細胞が抗原提示できない理由としてふたつの可能性が推測される。R90-120 MHC haplotype B に存在する別の MHC II allele が抗原提示する。DRB*w2501 が抗原提示に働くが BLCL には存在し 293T 細胞には存在しない細胞因子を必要とする。また、この 2 種の CD4+T 細胞は抗原刺激後の安定性が異なることから分化等の違いがあることも推測された。
[杉本智恵、森　一泰]

2. マウス・モルモットモデル

⑴ hu-PBL-NOD scid マウスを用いた R5 ウイルス感染モデルの構築と検討

本研究室では NOD scid マウスを用い、腹腔内にヒト PBL を移植する hu-PBL-NOD scid マウスモデルについて HIV-1 感染系の構築を行ってきた。現在に至るまで HIV-1 野生株 MNp を用いた X4-tropic ウイルスの感染系をすでに確立しており、今回は R5 ウイルスである JRCSF を用いた感染系の構築を行った。結果、ヒト細胞を移植後 R5 ウイルスを腹腔内摂取したマウスの組織からウイルスが分離され、ヒト同様に CD4 陽性細胞の減少、さらには血漿中ウイルス RNA 量の増加といった現象が見られた。さらには血漿中ウイルス RNA 量を指標とした HIV に対する中和能の評価が可能となる摂取時の至適ウイルス力価を検討中である。
[堀端重男、網康至（動物管理室）、本多三男]

⑵ HIV ワクチン開発の為のモルモットの解析

モルモットの Kurloff cell を含む細胞集団は NK 活性を

有しさらに BCG 投与群ではその機能が増加した事を昨年報告した。ヒト、マウスのNK細胞は高濃度IL-2でNK活性が増加する。しかしモルモットにおいてその報告はない。そこで我々は、モルモット脾臓細胞にhuman-r-IL2 1000Uを添加しNK活性を測定した。その結果、コントロール群と比較し r-IL2 添加群では有意に増加した。またこのアシアロ GM1 も陽性の事からモルモットNK細胞と考えられる。
[滝澤万里、千葉丈（東京理科大）、芳賀伸治（細菌部）、本多三男]

⑶ マウス HIV 感染モデルを用いた HIV 感染症治療法の開発

1996 年の多剤併用療法の導入は HIV-1 感染者の QOL の改善を達成したが、薬剤の副作用、薬剤耐性ウイルスの出現等のために薬剤治療から脱落する症例も多く報告され問題となっている。このような症例を救済するために宿主の免疫機能を賦活化する免疫療法の開発が期待されている。本研究は NOD-SCID commonγ 鎖ノックアウト SCID マウスの脾臓にヒト末梢血リンパ球（PBL）を移植した hu-PBL-SCID マウス/HIV 感染モデルを構築し、抗原曝露樹状細胞による抗原特異的免疫誘導方法の探索と、その抗 HIV-1 感染症免疫療法としての応用を目的とした。樹状細胞(DC)を効率よく得るためにヒト PBMC からのＣＤ14 陽性細胞の精製や培養方法の検討を行い、最終的に純度の高い DC を得ることに成功した。現在 DC の抗原提示能について解析を行っており、今後予め抗原に曝露させた DC を hu-PBL SCID マウスに接種し標的ウイルスに対する強い特異的免疫応答の誘導を試みる。
[濱武牧子、西澤雅子、本多三男、松田昌和、厳馬華、杉浦 亙、木村廣光（成育医療センター）]

⑷ マウス HIV 感染モデルを用いた HIV-1 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研究

多剤併用療法(HAART)導入により、HIV-1 感染患者の予後は大幅に改善され大きな成果を上げてきたが、その一方で既存の薬剤に対する薬剤耐性ウイルスの出現が新たな問題となっている。このため、既存の薬剤とは作用機所の異なる抗 HIV-1 薬剤の開発は HIV-1 感染症治療の幅を広げ、既存の薬物でコントロールができなかった難治症例に福音となるだけでなく、新薬の作用機序を解明することにより今まで知られていなかった HIV-1 病態の新たな側面が明らかにされる可能性が期待される。また創薬研究に刺激を与えて更なる新薬の開発に結びついていくことも期待される。本研究では新規 HIV-1 治療薬剤の候補化合物についてマウス HIV-1 感染モデルを用いて in vitro での HIV-1 増殖抑制効果を評価しヒトへの応用の可能性を探る。マウス HIV-1 感染モデルの構築を目的として HIV-1 JR-CSF 株を hu-PBL SCID マウス腹腔内にチャレンジし、感染をマウス血中 HIV-1RNA コピー数測定とマウス脾臓から採取した PBMC の共培養により確認した。さらにこのマウス HIV-1 感染実験モデルに既存の抗 HIV-1 薬を経口投与しマウス血中 HIV-1RNA コピー数測定を行いコピー数低下を確認した。今後この系を用いて新規抗 HIV-1 薬剤の評価を行っていく予定である。
[西澤雅子、濱武牧子、厳馬華、三浦秀佳、千葉智子、杉浦 亙、野村伸彦（富山化学工業株式会社総合研究所）]

VII. 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

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、平成 15 年度の検体数は 155 検体（hemophilia：125 検体・その他の感染：30 検体、陽性検体：21）あった。2004 年 6 月時点で 4049 検体（hemophilia：2875 検体・その他の感染：1174 検体、陽性検体：852）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、川原守、原敬志、吉野直人、浜野隆一、本多三男]

2. タイ北部およびバンコクにおける HIV 陽性検体の gag p17 sequence 解析

CTL 活性を持つ HIV 陰性麻薬常習者から発見した特異的な Gag p17 配列を持つ遺伝子がタイで実際に circulating しているかを検討する為にタイ北部における HIV 陽性麻薬常習者および性感染患者、バンコクにおける母子感染検体、74 名を用いて sequence 解析を行った。タイ北部で 1 名、バンコクで 2 名の合計 3 名（4.05%）を発見し、この type の virus が実際に circulating している事が証明された。これらの遺伝子を持ちながらも seroconvert しない患者は、この type に感染し何らかの機構により seroconversion を免れ、CTL 活性を獲得したと考えられる。
[浜野隆一、野内英樹（結核研究所）、Pathom Sawanpanyalert（NIH･Thai）、Paijit Warachit（NIH･Thai）、Tawee Chotpitayasunondh（Queen Sirikit National Institute of Child Health）、Warunee Punpanich（Rajavithi Hospital）、松尾和浩、原敬志、本多三男]

3. 垂直感染 HIV 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、58 組の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。更に *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。今後、児由来の HIV においても、同様の assay にて、IL-16 のウイルス増殖への関与を検討し、母子感染機構を明らかにしたいと考えている。

[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（Ministry of Public Health）、本多三男]

4. 母子感染 HIV の分子生物学的表現型の解析

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、60 ペアの感染妊婦／胎児・臍帯血の解析を行った結果、臍帯静脈血中のウイルス検出率は垂直感染率より有意に高く、またいずれのペアにおいても、母親個体内 HIV は polyclonal な傾向であるのに対し、臍帯血内 HIV はほぼ monoclone か oligoclone であった。このことから母親体内の polyclonal HIV から選択的に monoclonal HIV が児体内へ移行したか、もしくは母親個体内の virus が polyclonal に感染した後、児体内で M-tropic virus のみ選択的に polyclonal に増殖していることが示唆された。

[服部真一朗、原敬志、浜野隆一、松尾和浩、本多三男]

5. 北タイにおける HIV コホート研究

国際協力事業団の協力、タイ国立衛生研究所・ランパン病院との共同で、平成 12 年 7 月よりタイ北部に位置するランパン病院にて HIV 感染者および配偶者を対象にしたコホート研究を運営している。コホートに参加した感染者 765 名の平成 15 年 10 月 1 日時点の生存調査を行ったところ、728 名（96.3%）について追跡データが得られ、252 名が死亡し死亡率は 20.2/person-year-observation であった。死亡リスク因子解析によるとコホート参加時の臨床症状・CD4 値・ウイルス量との間に独立した関連が見られた。同コホートは、宿主遺伝子・宿主免疫・ウイルス学等の基礎研究や日和見感染などの臨床研究の基盤として役立っている。また、日・タイ共同研究を促進し、数多くのタイ人研究者育成に貢献している。

[パニータ・パチバニッチ（ランパン県病院）、有吉紅也、アーチャウィン・ロジャナビバット（タイ国立衛生研究所）、パトム・サワンパンヤラート（タイ国立衛生研究所）]

6. 北タイにおける宿主遺伝子多型とエイズ進行に関する研究

欧米より宿主遺伝子多型とエイズ進行に関連した数多くの研究が報告されているが、アジア人を対象にした研究は数少ない。我々は、北タイランパン県病院 HIV 外来を受診した女性未治療感染者 222 名を対象に、宿主遺伝子多型｛IL4 － C589T, CCR2 64I, CCR5-P1, RANTES-G403A, RANTES-C28G, RANTES － Int1.1, RANTES-3'UTR｝を PCR－RFLP 法にて調べ、コホート参加時のウイルス量・CD4＋細胞値および生存率と比較検討した。その結果、IL-4-589T を有する患者群が有意に低いウイルス量と高い CD4+細胞値を持つこと、また、RANTES-28G を有する患者群が有意により長く生存していることが判明した。異なる遺伝子背景を有する宿主集団で過去の報告と同様の結果が確認されたことは意義深い。

[ヌアンジャン・ウイチュクチンダ（タイ国立衛生研究所）、有吉紅也、中山恵美（大阪大学微生物学研究所）、塩田達雄（大阪大学微生物学研究所）]

7. 北タイに流行する HIV-1 株の分子疫学的研究

タイにおける HIV 流行は CRF01_AE（サブタイプ E）が主で流行初期に存在したサブタイプ B の頻度は減少したと考えられている。本研究では北タイランパン病院を受診する感染者の gag/pol 領域クローニング・シーケンス解析を進める中で、CRF01_AE Gag の中に 100 から 550bp のサブタイプ B フラグメントが組み込まれた 2 種類の新型組み換えウイルスが見つかった。さらに 1 症例については、その配偶者にも同一の組み換えパターンが認められ、このウイルスが性的接触により伝播したことが示唆された。この研究結果は、サブタイプ B が短いフラグメントとしてタイに存続していることを示し、今後のワクチン開発を進めてゆくにあたって重要な意義を持つ。

[ヌアンジャン・ウイチュクチンダ（タイ国立衛生研究所）、ワタナ・アウワニット（タイ国立衛生研究所）、有吉紅也、椎野禎一郎]

8. 北タイにおける HLA と HIV 感染との研究

細胞障害性 T 細胞（CTL）によるウイルス認識を拘束する HLA（クラス I）は、感染した宿主個人・集団に増殖・拡大する HIV の進化の方向を決定するのに非常に大

きな影響を与えている。我々は、北タイランパン病院コホートに参加した 451 名の感染者、103 名の暴露されたが抗 HIV 抗体陰性の配偶者（ESN）および 100 名の輸血ドナーの HLA アリールを決定し、HIV 伝播・エイズ進行との関連を検討した。その結果、ESN に特有な HLA アリールは認められなかったが、HLA クラス IA と B 双方の遺伝子座がホモ接合体の感染者は、それ以外の感染者に比べ有意に高いウイルス量であること、欧米の研究結果同様に B*57 を有する感染者は有意に低いウイルス量であること、さらに夫と HLA_B 遺伝子座が同一である妻においてウイルス量が非常に高いことが判明した。以上の結果は、北タイにおいても HLA が HIV の進化に重要な影響を与えていることを示す。
[ヌアンジャン・ウイチュクチンダ（タイ国立衛生研究所）、松見達也（湧永製薬）、有吉紅也]

9. 北タイ HIV 感染者および HIV 抗体陰性配偶者における HIV 特異的細胞性免疫の研究

HIV-1 特異的細胞障害性 T 細胞（CTL）は、感染者のウイルス体内増殖を抑制する主要な宿主免疫のひとつと考えられている。HIV 感染およびエイズ進行抑制に有効に作用する CTL 活性を分子レベルで解明するためには、それぞれの宿主が有する CTL が認識するウイルス部位（エピトープ）を分子レベルで同定することが必須である。そこで、我々はランパン病院コホートに参加する長期生存者と暴露されたが抗 HIV 抗体陰性配偶者を対象に、ペプチドを用いて CTL エピトープマッピングを行っている。その結果、これまでに報告されていない新たな CTL エピトープが複数見つかると共に、感染者が認識する CTL エピトープと抗体陰性者が認識する CTL エピトープとの間に差があることが判明してきた。
[ブサラワン・シーワンタナ（タイ国立衛生研究所）、田中真理、有吉紅也]

10. 北タイエイズ患者における中枢神経系ウイルス感染症に関する研究

先進国におけるエイズ患者の間で中枢神経系のウイルス感染症は脳内の悪性リンパ腫・進行性多巣性白質脳症・CMV 脳炎を起こし問題となっているが、発展途上国におけるそれらの現状はよくわかっていない。我々は北タイランパン病院でクリプトコッカス髄膜炎疑いにより髄液検査を行った患者 140 名の髄液を調べ、EBV, CMV, JCV ウイルスを PCR 法によって検出した。その結果 EBV, CMV, JCV ウイルス DNA がそれぞれ 22.1%, 11.4%, 0.1%の頻度で見つかった。タイ国内に CT スキャンが普及しているにもかかわらず中枢神経悪性リンパ腫の患者の頻度は稀である。我々の研究結果は、抗エイズ薬が普及し患者の生存率が改善されると悪性リンパ腫の症例が増える可能性があることを示唆しており、今後も続けて調査を行う必要がある。
[アーチャウィン・ロジャナビバット（タイ国立衛生研究所）、パニータ・パチッバニッチ（ランパン病院）、有吉紅也、三浦聡之（東大医科学研究所）、岩本愛吉（東大医科学研究所）]

11. タイ流行株 HIV-1（CRF01_AE）の抗エイズ薬耐性変異に関する研究

タイ政府が生産開始したジェネリック薬 GPOvir (d4T/3TC/nevirapine 合剤)の普及に伴い、耐性 HIV-1 株の流行が憂慮されるが、タイ流行株 CRF01_AE における薬剤耐性変異はまだよくわかっていない。我々は、北タイランパン病院にてウイルス量から判断して GPOvir 耐性を獲得したと思われる症例の血漿中 RNA の pol 遺伝子シーケンス解析を行い耐性変異の頻度を調べた。これまで 44 症例について調べた結果、最も頻度の高い耐性変異は M184I/V、続いて Y181C であった。サブタイプ B に多い K103N 変異の頻度は少なかった。これらの結果をもとに、変異分離型 PCR（MS-PCR）の原理を応用した GPOvir 耐性ウイルス簡便・敏速検出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。
[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）、パニータ・パチバニッチ（ランパン病院）、レイ・ミント、有吉紅也、松田昌和、杉浦亙]

12. カンボジアの新規結核患者における輸血関連ウイルスの陽性率

2003 年 1 月中にカンボジア全 24 州で発生したすべての新規結核患者（2244 例）について、輸血関連ウイルス 5 項目(HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体）の感染状況を調査、また HIV-1 に関して分子系統樹解析を行いその感染ルートを検討した
各項目の陽性率の全国平均は HBsAg：10.2%、TP：20.4%、HCV：9.8%、 HIV：11.8%、 HTLV-1：0.0%、全ての項目が陰性だったものは 56.6%となった。州別ではタイとの国境ゲートがある Pailin が 33.3%ともっとも高く、他に 20%以上の高値を示した地域は首都 Phnom Penh が 33.4%、タイ側の国際港・Sihanoukville Port 周辺地域の Kompong Som で 32.4%、Krong Kep で 25.0%、またタイ国境ゲートの港がある Koh Kong の 22.7%が順にあげられ、カンボジアにおける HIV-1 の感染ルートはタイからの影響が強いことが示唆された。また HIV 陽性検体 239 例の gag および env 領域のシークエンスの結果より、CRF01_AE が 228

例、サブタイプＢが９例、CRF02_AG が１例、gag 領域でサブタイプ Ｂ 、env 領域で CRF01AE とサブタイプが一致せず重感染等が疑われる例が１例あった。今回サブタイプＢに分類されたグループは、env 領域で全例ベトナムのＢのグループとクレイドを形成しており、タイＢのクレイドとは離れて分類された。
[坂本優子、吉原なみ子]

13. カンボジアのプノンペンにおける結核患者における輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年 12 月にカンボジアの首都プノンペンの結核患者 500 例において輸血関連ウイルス５項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体)の感染状況を調査した。各項目の陽性率は HBsAg：12.6%、TP：12.0%、HCV：10.2%、 HIV：33.6%、 HTLV-1：0.0%、全ての項目が陰性だったものは 46.4%となり、同年 1 月に実施した全国調査におけるプノンペンの結果と同様の傾向を示す結果となった。首都プノンペンはタイ国境付近と並び HIV が全国的に最も高い地域であるため、カンボジアの HIV の流行の鍵を握る地域として今後も継続的な調査観察が必要である。
[坂本優子、吉原なみ子]

14. ベニンにおける輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年にベニンの血液センターに集められた初回献血者 500 人の血漿において、輸血関連ウイルス５項目（HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体）の感染状況を調査した。それぞれの陽性率は HIV-1/2：1.2%、HBsAg：4.8%、HTLV-1：0.0%、HCV：6.6%、TP：1.0%であった。同検体は事前に現地でも検査が行われていたが、現地での検査においては偽陰性や偽陽性が非常に多く、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。また HIV-1 陽性検体４例中、RT-PCR によりバンドが検出された１例について gag 及び env 領域の塩基配列を決定、分子系統樹解析を行った結果、CRF02_AG に分類された。
[坂本優子、吉原なみ子]

15. マダガスカルにおける輸血関連ウイルスに関する疫学的調査

2003 年にマダガスカルの血液センターに集められた初回献血者 500 人の血漿において、輸血関連ウイルス５項目 (HIV-1/2 抗体、HBs 抗原、TP 抗体、HCV 抗体、HTLV-1 抗体）の感染状況を調査した。それぞれの陽性率は HIV-1/2：0.2%、HBsAg：3.8%、HTLV-1：0.0%、HCV：6.0%、TP：12.6%であった。マダガスカルについては 1999 年にも同調査を行っているが、HIV の陽性率は前回同様に他のアフリカ諸国と比べて低く保たれており、海に囲まれた島国という環境が HIV の侵入を抑えている事がうかがえた。同検体は事前に現地でも検査が行われていたが、現地での検査においては偽陰性や偽陽性が多く、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]

16. ガーナにおけるＢ型肝炎に関する研究

ガーナとの HIV 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。現在ゲノタイプＥが多数検出され、少数であるがゲノタイプＡも検出されている。１部に関しては全遺伝子配列を決定した。
[石川晃一、ガーナ野口研究所、阿部賢治（感染病理部）]

VIII. 検査業務

1. 依頼検査

(1)診断薬（キット）実施状況	２キット
(2)HIV 感染確認	２検体

2. WHO Reference Panel による精度管理

WHO の collaborating center である National Reference Laboratory (NRL) の Anti-HIV Quality Assessment Program による精度管理が実施された。

NRL から２回、各 10 検体のパネル血清が配布され、Genedia HIV-1/2 MIXT PA（PA）、Genscreen HIV1/2（ELISA）、DAINASCREEN HIV-1/2 (ICA)、LAV BLOT 1(WesternBlot) kit を用いて検討した結果、１回目は HIV-1 陽性８検体、陰性２検体、２回目は HIV-1 陽性５検体、陰性５検体であった。

これらの結果は全て NRL の結果と一致した。
[鈴木寿子、福嶋浩一、吉原なみ子]

発 表 業 績 一 覧

I. 誌上発表

1．欧文発表

1) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M: Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. Virology 313: 8-12, 2003.

2) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M: Fractionation of guinea pig leukocyte by flow cytometry using a novel MIL4/SSC parameter. Cytometry Research 13: 25-32, 2003.

3) Izumi Y, Ami Y, Matsuo K, Someya K, Sata T, Yamamoto N, Honda M: Intravenous inoculation of replication-deficient recombinant vaccinia virus DIs expressing Simian Immunodeficiency virus gag controls highly pathogenic Simian-human immunodeficiency virus in monkeys. J Virol 77: 13248-13256, 2003.

4) Assawawitoontip S, Puthavathana P, Pattanapanyasat K, Sukpanichnant S, Thammataksin S, Honda M, Warachit P: Lymphocyte and NK cell subpopulations in HIV seronegative Thais. Asian Pac J Allergy Immunol 21: 95-103, 2003.

5) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Derdelinckx I, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirvichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM: Evaluation of five interpretation algorithms for the prediction of drug susceptibility in non-B subtype. Antiviral Ther 8: S111, 2003.

6) Sugiura W, Shimada K, Matsuda M, Chiba T, Myint L, Okano A, Yamada K: Novel genotyping assay for human immunodeficiency virus type-1 drug resisitance using enzyme linked mini- sequuence assay. J Clin Microbiol 41: 4971-4979, 2003.

7) Ariyoshi K, Berry N, Cham F, Jaffar S, Schim van der Loeff M, Jobe O, N'Gom PT, Larsen O, Andersson S, Aaby P, Whittle H: Quantification of Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load in a rural West African population: no enhancement of human immunodeficiency virus type 2 pathogenesis, but HTLV-I provirus load relates to mortality. J Infect Dis 188: 1648-1651, 2003.

8) Schim van der Loeff MF, Hansmann A, Awasana AA, Ota MO, O'Donovan D, Sarge-Njie R, Ariyoshi K, Milligan P, Whittle H: Survival of HIV-1 and HIV-2 perinatally infected children in The Gambia. AIDS 17: 2389-2394, 2003.

9) Ariyoshi K, Matsuda M, Miura H, Tateishi S, Yamada K, Sugiura W: Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01_AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. J Acquir Immune Defic Syndr 33: 336-342, 2003.

10) Alabi AS, Jaffar S, Ariyoshi K, Blanchard T, Schim van der Loeff M, Awasana AA, Corrah T, Sabally S, Sarge-Njie R, Cham-Jallow F, Jaye A, Berry N, Whittle H: Plasma viral load, CD4 cell percentage, HLA and survival of HIV-1, HIV-2, and dually infected Gambian patients. AIDS 17: 1513-1520, 2003.

11) Takeda A, Igarashi H, Nakamura H, Kano M, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T. Protective efficacy of an AIDS vaccine, a single DNA-prime followed by a single booster with a recombinant replication-defective Sendai virus vector in a macaque AIDS model. J Virology 77: 9710-9715, 2003.

12) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Gatanaga H, 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 (1): 318-327, 2003.

13) Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y: Identification and characterization of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. J Virol 77 (1): 685-695, 2003.

14) Motomura K, Kusagawa S, Lwin HH, Thwe M, Kato K, Ohishi K, Yamamoto N, Zaw M, Nagatake T, Takebe Y: Different subtype distribution in the two cities in Myanmar: evidence for independent clusters of HIV-1 transmission. AIDS 17 (4): 14-17, 2003.

15) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Isumi Y, Nakasone T, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M: Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelope carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Arch Virol 148 (5): 973-988, 2003.

16) Takebe Y, Motomura K, Tatsumi M, Lwin HH, Zaw M, Kusagawa K: High prevalence of diverse forms of intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. AIDS 17: 2077-2087, 2003.

17) Kusagawa S, Imamura Y, Yasuoka A, Hoshino H, Oka S, Takebe Y: Identification of HIV-2 subtype B transmission in East Asia. AIDS Res Hum Retroviruses 19 (11): 1045-1049, 2003.

18) Suzuki S, Sugauchi F, Orito E, Kato H, Usuda S, Siransy L, Arita I, Sakamoto Y, Yoshihara N, El-Gohary A, Ueda R, Mizokami M: Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in the Cote d'Ivoire: complete genome sequence and phylogenetic relatedness of HBV genotype E. J Med Virol 69: 459-465, 2003.

19) Sugauchi F, Orito E, Kato H, Suzuki S, Kawakita S, Sakamoto Y, Fukushima K, Akiba T, Yoshihara N, Ueda R, Mizokami M: Genotype, 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.

20) Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Müller WEG: Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and reporter gene. J Virol Methods 114: 159-166, 2003.

21) Hachiya A, Matsuoka-Aizawa S, Tsuchiya K, Gatanaga H, Kimura S, Tatsumi M Oka S: ″All-in-One Assay″, a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. J Virol Methods 111:43-53, 2003,

22) 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.

23) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Tadakuma K, Sugimoto C, Ono F, Hayakawa H, Izumo S: Simian immunodeficiency virus encephalitis in the white matter and degeneration of the cerebral cortex occur independently in simian immunodeficiency virus-infected monkey. J Neurovirol 9:508-518, 2003.

24) 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.

25) Kennedy G, Komano J, Sugden B: Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A 100(24): 14269-14274, 2003.

26) Fukushi M, Higuchi M, Oie M, Tetsuka T, Kasolo F, Ichiyama K, Yamamoto N, Katano H, Sata T, Fujii M: Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with human myeloid cell nuclear differentiation antigen induced by interferon alpha. Virus Genes 27: 237-247, 2003.

27) Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N: Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. J Virol 77:5286-5294, 2003.

28) Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Yamamoto N: Helicobacter pylori induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. Gastroenterology 124: 983-992, 2003.

29) Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Yamashita A, Deng X, Mulundu G, Ichiyama K, Munkanta M, Yokota T, Wakasugi N, Tezuka F, Yamamoto N, Ito M: Prevalence of drug-resistance-associated mutations in antiretroviral drug-naive Zambians infected with subtype C HIV-1. AIDS Res Hum Retroviruses 19:151-160, 2003.

30) Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N: A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. Proc Natl Acad Sci USA 100: 4185-4190, 2003.

31) Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. Proc Natl Acad Sci USA 100: 2777-2782, 2003.

32) Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka Y: Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. J Virol 77: 8719-8728, 2003.

33) Mori N, Krensky AM, Geleziunas R, Wada A, Hirayama T, Sasakawa C, Yamamoto N: Helicobacter pylori induces RANTES through activation of NF-kappa B. Infect Immun 71: 3748-3756, 2003.

34) Mori N, Morishita M, Tsukazaki T, Yamamoto N: Repression of Smad-dependent transforming growth factor-beta signaling by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. Int J Cancer 105: 661-668, 2003.

35) Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T,

Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M: Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. J Hepatol 38: 605-614, 2003.

36) Nitta T, Chiba A, Yamashita A, Rowe M, Israel A, Reth M, Yamamoto N, Yamaoka S: NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. Cell Signal 15: 423-433, 2003.

37) Suzuki Y, Misawa N, Sato C, Ebina H, Masuda T, Yamamoto N, Koyanagi Y: Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. Virus Genes 27: 177-188, 2003.

38) Saito N, Courtois G, Chiba A, Yamamoto N, Nitta T, Hironaka N, Rowe M, Yamaoka S: Two C-terminus activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. J Biol Chem 278: 46565-46575, 2003.

39) Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, Williams AS, Jones SA: Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. J Immunol 171: 3202-3209, 2003.

40) Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, Otaka A, Fujii N: T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. FEBS Lett, 550: 79-83, 2003.

41) Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S: TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. J Biol Chem 278:36005-36012, 2003.

42) Baba S, Takahashi K, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Gorelick RJ, Kawai G: Role of the zinc fingers of HIV-1 nucleocapsid protein in maturation of genomic RNA. J Biochem (Tokyo) 134: 637-639, 2003.

43) Gzyl J, Bolesta E, Wierzbicki A, Kmieciak D, Naito T, Kaneko Y, Honda M, Komuro K, Kozbor D: Effect of partial and complete variable loop deletions of the Human Immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and the breadth of gp160-specific immune responses. Virology 318: 493-506, 2004.

44) Nakasone T, Hara T, Yoshino N, Honda M: Update on HIV/AIDS in Japan, 2003, (Lu Y, Essex M eds), AIDS in ASIA, Kluwer, p73-p81, 2004.

45) Matsuo K, Puthavathana P, Promkhatkaew D, Balachandra K, Ruxrungtham K, Hamano T, Sutthent R, Sittisombut N, Butraporn R, Sriwanthana B, Boonlong J, Izumi Y, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M: Japan's Collaboration with Thailand in the Development of HIV/AIDS Vaccine, (Lu Y, Essex M eds), AIDS in ASIA, Kluwer, p561-p569, 2004.

46) Hamano T, Sawanpanyalert P, Yanai H, Piyaworawong S, Hara T, Sapsutthipas S, Phromjai J, Yamazaki S, Yamamoto N, Warachit P, Honda M. Matsuo K: Determination of HIV-1 CRF01_AE gag p17 and env-V3 consensus sequences for HIV/AIDS vaccine design. AIDS Res Hum Retroviruses 20: 337-340, 2004.

47) Takizawa M, Chiba J, Haga S, Asano T, Yamamoto N, Honda M: The normalization of guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphoid tissues using a flow cytometric procedure. Experimental Animals 53: 321-329, 2004.

48) Someya K, Xin K Q, Matsuo K, Okuda K, Yamamoto N, Honda M: A consecutive prime-boost vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. J Virol 78: 9842-9853, 2004.

49) Takeda S, Shiosaki K, Kaneda Y, Nakasatomi T, Yoshizaki H, Someya K, Konno Y, Eda Y, Kino Y, Yamamoto N, Honda M: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) protein is efficient for induction of $CD4^+$ T-cell response by a hepatitis B core particle-based HIV vaccine. Clin Immunol 112: 92-105, 2004.

50) Dewan Z, Watanabe M, Terashima K, Aoki M, Sata T, Honda M, Ito M, Yamaoka S, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N: Prompt tumor formation and maintenance of constitutive NF-kB activity of multiple myeloma cells in NOD/SCID γ^{cnull} mice. Cancer Sci 95: 564-568, 2004.

51) Yamakami K, Honda M, Takei M, Nakasone T, Ami Y, Kitamura N, Nishinarita S, Sawada S, Horie T: Early bone marrow hematopoietic defect in SHIV C2/1-infected macaques and relevance to advance of disease. J Virol 78: 10906-10910, 2004.

52) Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Yamada K, Sugiura W: Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor- resistant human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother 48: 444-452, 2004.

53) Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, Kawana-Tachikawa A, Takiguchi M, Kojima A, Nagai Y, Iwamoto A, Matsuda Z, Ariyoshi K: Impaired processing

and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 78: 1324-1332, 2004.

54) Saeng-Aroon S, Wichukchinda N, Myint L, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Rojanawiwat A, Matsuda M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. Study of antiretroviral drug-resistant HIV-1 genotypes in northern Thailand: role of mutagenically separated polymerase chain reaction as a tool for monitoring zidovudine-resistant HIV-1 in resource-limited settings. J Acquir Immune Defic Syndr 36: 1051-1056, 2004.

55) Takamura S, Niikura M, Li T-C, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. Gene Ther 11: 628-635, 2004.

56) Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K: Moleucular epidemiology of HIV: Tracking AIDS Pandemic. Pediatr Int 46: 236-244, 2004.

57) Arita I, Nakane M, Kojima K, Yoshihara N, El-Gohary A: Role of a sentinel surveillance system in the context of global surveillance of infectious diseases. Lancet Infect Dis 5: 172-177, 2004.

58) Harada T, Tatsumi M, Takahashi H, Sata T, Kurata T, Kojima A: Specific reactions between purifyied HIV-1 particles and CD4+ cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. Microbes Infection 6: 421 - 428, 2004.

59) Suzuki J, Ikeda T, Kuroyama H, Seki S, Kasai M, Utsuyama M, Tatsumi M, Uematsu H, Hirokawa K: Regulation of oseteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. Biochem Biophsic Res Commun 314: 1021-1027, 2004.

60) Kuroyama H, Ikeda T, Kasai M, Yamasaki S, Tatsumi M, Utsuyama M, Saito T, Hirokawa K: Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. Biochem Biophis Res Commun 315: 935- 941, 2004.

61) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y: Cytotoxic T lymphocyte based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. J Exp Med 199: 1709-1718, 2004.

62) Lun W-H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Mori K, Sata T, Nagai Y, Matano T: Loss of virus-specific CD4+ T cells with increases in viral loads in the chronic phase after vaccine-based partial control of primary simian immunodeficiency virus replication in macaques. J Gen Virol 85: 1955-1963, 2004.

63) Ansari AA, Mayne AE, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Mori K, Villinger F: Use of recombinant cytokines for optimized induction of antiviral immunity against SIV in the nonhuman primate model of human AIDS. Immunol Res 29: 1-18, 2004.

64) Barnor JS, Kurosaki N, Yamaguchi K, Sakamoto A, Ishikawa K, Inagaki Y, Yamamoto N, Osei-Kwasi M, Ofori-Adjei D, Takaku H: Intracellular expression of anti sense RNA tanscripts complementary to the human immunodeficiency virus type-1 vif gene inhibits viral replication in infected T-lymphoblastoid cells. BBRC 320: 544-550, 2004.

2. 和文発表

1) 松尾和浩：エイズワクチン研究の新展開．化学と生物．41: 731-737, 2003.

2) 杉浦　亙：HIV の薬剤耐性研究の現状と今後の課題．現代医療．35 (6): 113-118,2003.

3) 杉浦　亙：日本における薬剤耐性 HIV-1 の現状．臨床とウィルス．31 (4): 272-282, 2003.

4) 金田次弘，加藤真吾，山元泰之，千葉智子，杉浦亙：抗 HIV 療法のモニタリング．日本エイズ学会誌．5: 109-112,2003.

5) 有吉紅也：タイにおける取り組みと日本の協力．日本エイズ学会誌．3: 194-196, 2003.

6) 有吉紅也：東南アジアにおける HIV・エイズ対策の取り組み -タイは HIV・エイズ対策に成功したのか-．臨床とウイルス．31: 283-291, 2003.

7) 武部　豊（分担執筆）：エイズの話「感染症の事典」朝倉書店，東京，2003，in press.

8) 武部　豊（分担執筆）：HIV-1 の組換え型流行株 (CRF)．＜特集＞内科キーワード 2003．内科 91(6), 2003.

9) 武部　豊：「第 10 回国際レトロウイルス・日和見感染症会議」学会印象記　「臨床と微生物」 30 (4): 407 (071)．近代出版，東京，2003.

10) 武部　豊：HIV-1 感染症への分子疫学的アプローチ．総説．特集「エイズ」．臨床とウイルス 31 (4): 251-263．日本臨床ウイルス学会，東京，2003.

11) 武部　豊：後天性免疫不全症候群（エイズ）の分子予防医学．「分子予防環境医学- 生命科学研究の予防・環境医学への統合」（松島綱治　編集）各論２）感染症．（分担）pp. 170-186．医学書院，東京，2003.

12) 武部　豊，馬　艶玲，楊　朝軍：中国におけるエイズ流行：迫り来る巨大危機とその分子疫学　特集・

中国におけるエイズ対策の現状．日中医学 18 (4): 14-20 （財）日中医学協会，東京，2003.
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.
14) 仲宗根正，原敬志，染谷健二，池尾一穂，五條堀孝，山本直樹，本多三男：HIV 感染症統合データベースの開発．日本エイズ学会誌．6: 42-49, 2004.
15) 武部　豊：ケモカインと HIV 感染をめぐる研究の最前線．「サイトカイン・ケモカインのすべて- 基礎から最新情報まで- 」（笠松新平・松島綱治編集）第２章．日本医学館，東京，2004，in press.
16) 吉原なみ子：輸血感染症に関する検査法、輸血学 遠山博編　中外医学社，2004.
17) 吉原なみ子（監修）：流行感染症の脅威　最新情報とその対策―エイズ，肝炎，ATL，梅毒，クラミジア，SARS,インフルエンザ，結核―　臨床病理レビュー，特集 129 号，2004.

II. 学会発表

1．国際学会

1) Nakasone T, Yamamoto N, 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 Oppotunistic Infections, Feb 10-14, 2003, Boston, USA.
2) 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, 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. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel, Mar. 5-7, 2003, Okinawa.
3) Kozyrev IL, Miura T, Sakai K, Takahashi E, Shinohara K, Suzuki H, Ibuki K, Hayami M: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 15th Joint Meeting of AIDS Panel, Mar. 4-7, 2003, Ginowan, Japan.
4) Miyauchi K, Komano J, Yokomaku Y, Matsuda Z: The role of the membrane spanning domain of HIV-1 TM in membrane fusion. Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory, May 20-25, 2003, Cold Spring Harbor NY, USA.
5) Myint L, Matsuda M, Chiba T, Yan H, Kakizawa J, Okano A, Hamatake M, Nishizawa M, Sugiura W: Analysis of virion morphology and assembly pricess in protease inhibitor resistant HIV-1. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
6) Kantor R, Shafer RW, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Snoeck J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Vandamme A-M, Weber J, Pillay D, Tan A, Katzenstein D: Nucleic acid differences between HIV-1 non-B and reverse transcriptase and protease sequences at drug resistance positions. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
7) Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Derdelinckx I, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirvichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Grossman Z, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM: Evaluation of five interpretation algorithms for the prediction of drug susceptibility in non-B subtype. 12th International HIV Drug Resistance Workshop. Jun.10-14, 2003, Cabo SanLucas, Mexico.
8) Totani R, Hayashi K, Hasuo S, Kita T, Takahashi S, Yoshino N, Wada Y, Togawa M, Tsukahara Y: HIV mother-to-child vertical infection in Japan: A national co-operative study report. 23th Annual Meeting of the Society for Reproductive Immunology, Jun. 18-22, 2003, New Haven, USA.
9) Hayashi K, Kita T, Hasuo Y, Totani R, Yoshino N, Wada Y, Hayakawa S, Tukahara Y, Takano M, Taniguchi H, Minoura S, Inaba N: The clinical assessment of maternal HIV testing in early pregnancy to prevent mother to child transmission in Japan. 23th Annual Meeting of the Society for Reproductive Immunology, Jun. 18-22, 2003, New Haven, USA.
10) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Suzuki H, Takahashi M, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Honda M, Takahashi H, Miura T, Hayami M: Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.
11) Suzuki H, Suzuki M, Ibuki K, Masuda K, Minato N,

Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T: The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.

12) Kozyrev IL, Miura T, Sakai K, Takahashi E, Shinohara K, Suzuki H, Ibuki K, Hayami M: Comparative analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones. 21st Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA.

13) Sugimoto C, Shioda T, Yasutomi Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K: Properties of a quintuple deglycosylated SIVmac239 mutant as a novel attenuated SIV. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 2003, Seattle, USA.

14) Sugimoto C, Ohgimoto S, Kusakawa S, Takebe Y, Shioda T, Nagai Y, Mori K: Influence of deglycosylation on efficacy of Env based vaccine. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Oct. 2003, Seattle, USA.

15) Yan H, Chiba T, Nomura N, Kitamura Y, Nishizawa M, Matsuda M, Yamamoto N, Sugiura W: Discovery of novel small- molecule HIV-1 integrase inhibitory compounds. 4th HIV DRP Symposium Antiviral Drug Resistance, Dec.7-10, 2003, Virginia, USA.

16) Kantor R, Shafer RW, Efron B, Carvalho AP, WynhoveB n, Soares MA, Cane P, Clarke J, Snoeck J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Pillay C, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Morris L, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Vandamme AM Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D: HIV-1 subtype-related differences in genotypic evolution: Analysis of subtypes B and C reverse transcripase and protease sequences. 11th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Feb.8-11, 2004, Sanfrancisco, USA.

17) Takebe Y, Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K: Identification of new class of HIV-1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07_BC and CRF08_BC, in China. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 10-14, 2004, Boston, USA.

18) Someya K, Matsuo M, Sata T, Yamamoto N, Honda M: Abortive virus production of vaccinia DIs-Gag recombinant in mammalian cells results in efficient immune induction as a safe immunodeficiency virus vaccine candidate. 15th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, US-Japan CMSP, Mar. 8-10, 2004, Nashville, USA.

19) Honda M, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Matsuo K, Kawahara M, Someya K, Takizawa M, Hara T, Horibata S, Kanekiyo M, Yamamoto N: A prime-boost vaccine with recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin and a non-replicating vaccinia virus recombinant: elicitation of long-lasting and positive immunity and safety study. 15th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, US-Japan CMSP, Mar. 8-10, 2004, Nashville, USA.

20) Takebe Y, Yokota Y, Kusagawa S, Imamura Y, Uehara R, Ma Y, Yang C, Li X, Li X, Yamamuro M, Thwe M, Aung T, Oo KY, Lwin HH: Precise mapping of recombination breakpoints of HIV-1 unique recombinant forms circulating in Myanmar: *in vivo* sequence preference for recombination and the biological implications. 16th Joint Scientific Meeting of the AIDS Panels, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Mar. 8-11, 2004, Nashville, USA.

2. 国内学会

1) 三浦智行，阪井弘治，篠原克明，高橋栄治，ユーリ・コズレフ，鈴木元，伊吹謙太郎，速水正憲：感染性分子クローンウイルスによるヒト/サル免疫不全ウイルスの比較病態解析．第 135 回日本獣医学会学術集会，2003 年 3 月 30-4 月 1 日，東京．

2) 武部豊，草川茂，安岡彰，岡慎一：HIV-2 感染国内症例の同定とその解析．第 77 回日本感染症学会，2003 年 4 月 17-18 日，福岡．

3) 武部豊，楊栄閣，今村裕子，本村和嗣，草川茂，Kunlong Ben：中国における HIV 流行はいかにして形成されたか：流行のエピセンターとしての中国南西部（雲南省）．第 77 回日本感染症学会，2003 年 4 月 17-18 日，福岡．

4) 永井慎也，坂本優子，吉原なみ子，高浜洋一，浜口行雄：マダガスカル及びタンザニアにおける輸血関連ウイルスの感染状況及び現地の検査精度．第 51 回日本輸血学会学術総会，2003 年 5 月，福岡．

5) 林　公一，喜多恒和，和田裕一，外川正生，北村勝彦，谷口晴紀，塚原優己，箕浦茂樹，阿部史朗，佐久本薫，高野政志，蓮尾泰之，早川　智，井村総一，大場　悟，葛西健郎，高山直秀，宮澤廣文，吉野直人，稲葉憲之，戸谷良造：4 年間（1999-2002）における妊婦 HIV 抗体検査実施率の経時的変化とその地域差について．第 21 回日本産婦人科感染症研究会，2003 年 6 月 14 日，宇都宮．

6) 外川正生，井村総一，大場　悟，葛西健郎，高山直秀，宮澤廣文，喜多恒和，和田裕一，塚原優己，北村勝彦，谷口晴紀，林公一，箕浦茂樹，阿部史朗，

佐久本薫，高野政志，蓮尾泰之，早川　智，吉野直人，稲葉憲之，戸谷良造：わが国における HIV 母子感染の実態− 小児科領域の全国調査から− ．第 21 回日本産婦人科感染症研究会，2003 年 6 月 14 日，宇都宮.

7) 駒野淳：Cytoskeletal Support of Viral Life Cycle，日本レトロウィルス研究会夏期セミナー，2003 年 6 月 27−29 日，菅平.

8) 武部豊：アジアにおける HIV 流行の分子疫学− 新たなHIV−1組換えウイルスについて．平成15年度　微生物生物技術協議会第 24 回研究会　シンポジウム「HIV」，2003 年 7 月 11 日，福岡.

9) 杉浦 亙，駒野 淳，Lay Myint：HIV−1 複製サイクル初期あるいは後期過程における宿主細胞因子の機能的，形態学的解析．第 6 回 白馬シンポジウム，2003 年 8 月 1 日，長野県北安曇郡白馬村.

10) 駒野淳：New Host Factor Involved in the Early Phase of HIV−1's Life Cycle,HIV．白馬シンポジウム，2003 年 8 月 1 日、白馬.

11) 伊吹謙太郎，榎瀬良美，三宅在子，鈴木元，高橋めぐみ，堀内励生，斉藤尚紀，仲宗根正，本多三男，高橋秀美，速水正憲，三浦智行：強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態．第 136 回日本獣医学会，2003 年 10 月 3−5 日，青森.

12) 鈴木元，鈴木麻貴子，三宅在子，伊吹謙太郎，増田恭子，伊川友活，河本宏，仲宗根正，本多三男，速水正憲，三浦智行：強毒サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析．第 136 回日本獣医学会，2003 年 10 月 3−5 日，青森.

13) 伊吹謙太郎，榎瀬良美，三宅在子，鈴木元，高橋めぐみ，堀内励生，斉藤尚紀，仲宗根正，本多三男，高橋秀美，速水正憲，三浦智行：強毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜免疫細胞の動態．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

14) 鈴木元，鈴木麻貴子，三宅在子，伊吹謙太郎，増田恭子，伊川友活，河本宏，仲宗根正，本多三男，速水正憲，三浦智行：強毒サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期における胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

15) 杉浦 亙，Lay Myint，駒野 淳，松田昌和，松田善衛，西澤雅子：薬剤耐性 HIV−1 における粒子形成過程の形態学的解析．第 51 回日本ウイルス学会学術集会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

16) 横幕能行，ジラワン・シーサワット，ブサラワン・シーワンタナ，松田善衛，有吉紅也：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．第 51 回日本ウイルス学会学術集会，2003 年 10 月，京都.

17) 武部豊，横田侑子，上原理恵子，今村裕子，草川茂：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．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

18) 武部豊，今村裕子，草川茂：HIV−1 サブタイプ B'の起源に関する進化学的解析．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

19) 草川茂，楊栄閣，武部豊：HIV−1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

20) 三浦智行，ユーリ・コズレフ，阪井弘治，篠原克明，高橋栄治，鈴木元，伊吹謙太郎，速水正憲：サル／ヒト免疫不全キメラウイルス感染性クローンにおける塩基置換と病原性との関連．第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

21) 駒野淳，宮内浩典，松田善衛，山本直樹：ヒト免疫不全ウイルス感染の初期過程における Arp2/3 複合体の重要性．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

22) 宮内浩典，駒野淳，松田善衛：膜融合に対する HIV−1gp41 膜貫通領域の寄与ー融合後期過程への寄与．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

23) 清水佐紀，吉仲由之，木村竜一郎，宮内浩典，駒野淳，松田善衛，山本直樹：HIV−1 慢性感染細胞におけるプロテオーム解析．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

24) 石川晃一：Inhibition of HIV−1 replication using a single−transcriptional unit that expresses decoy and SiRNAs in cells．第 51 回日本ウイルス学会，2003 年 10 月 27−29 日，京都.

25) 武部豊：アジアにおけるエイズ危機− 流行形成のメカニズムを探る− ．合同学術集会ワークショップ「基礎と臨床の調和と融合」− 「日本の AIDS,世界の AIDS」，2003 年 10 月 30 日，横浜.

26) 吉原なみ子：世界のエイズ，日本のエイズ　HIV 感染診断技術の進歩．第 52 回日本感染症学会東日本地方会，2003 年 10 月 30 日，横浜.

27) 吉野直人，兼清優，染谷健二，松尾和浩，網康至，佐藤成大，山本直樹，本多三男：リコンビナント DIs ワクチンの経粘膜接種への応用．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27−29 日，神戸.

28) 外川正生，大場悟，葛西健郎，井村総一，塚原優己，喜多恒和，稲葉淳一，北村勝彦，高野政志，谷口晴紀，長縄聰，林公一，蓮尾泰之，箕浦茂樹，和田裕一，吉野直人，戸谷良造，稲葉憲之：わが国における HIV 母子感染の現状(1)　全国小児科施設への調査結果．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27−29 日，神戸.

29) 和田裕一，喜多恒和，稲葉淳一，井村総一，大場悟，葛西健郎，北村勝彦，高野政志，谷口晴紀，塚原優己，外川正生，長縄聰，林公一，早川智，蓮尾泰之，箕浦茂樹，吉野直人，戸谷良造，稲葉憲之：わが国における HIV 母子感染の現状(2)　全国産婦人科施設への調査結果．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

30) 塚原優己，喜多恒和，稲葉淳一，井村総一，大場悟，葛西健郎，北村勝彦，高野政志，谷口晴紀，外川正生，長縄聰，林公一，蓮尾泰之，早川智，箕浦茂樹，和田裕一，吉野直人，戸谷良造，稲葉憲之：わが国における HIV 母子感染の現状(3)　HIV 感染妊婦の動向と将来予測．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

31) 林公一，喜多恒和，稲葉淳一，井村総一，大場悟，葛西健郎，北村勝彦，高野政志，谷口晴紀，外川正生，長縄聰，塚原優己，蓮尾泰之，箕浦茂樹，和田裕一，吉野直人，戸谷良造，稲葉憲之：わが国における HIV 母子感染の現状(4)　妊婦 HIV 抗体検査実施率の推移．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

32) 浜野隆一，岡本尚，野内英樹，日比悠里名，高橋なを子，原敬志，山本直樹，山崎修道，本多三男，松尾和浩：Gag p17 遺伝子変異による HIV-1 CRF01_AE 複製の制御．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

33) 松尾和浩：タイにおけるエイズワクチンの臨床開発に向けた取り組み．第 17 回日本エイズ学会学術集会シンポジウム，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

34) 滝澤万里，村上利夫，江田康幸，前田敏宏，本多三男：ヒトモノクローナル抗体 KD-247 における中和メカニズム．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

35) 村上利夫，前田敏宏，本多三男，松下修三：ヒト化抗 HIV-1 モノクローナル抗体（KD-247）治療対象症例選択法の開発．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

36) 横幕能行，松田善衛，千葉智子，厳 馬華，松田昌和，杉浦 亙：抗 HIV-1 新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築．第 17 回日本エイズ学会学術集会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

37) 古賀一郎，小田原 隆，細谷紀章，後藤美江子，中村哲也，松田昌和，杉浦 亙，岩本愛吉：HAART 下で良好な経過中，梅毒発症とともに抗 HIV 血症を呈した症例．第 17 回日本エイズ学会学術集会 2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

38) 松田昌和，千葉智子，佐藤裕徳，厳 馬華，Lay Myint，柿澤淳子，浜武牧子，植田知幸，西澤雅子，杉浦 亙：相同組み換えを用いた CRF01_AE 薬剤感受性の解析．第 17 回日本エイズ学会学術集会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

39) 植田知幸，有吉紅也，三浦秀佳，松田昌和，千葉智子，厳 馬華，Lay Myint，柿澤淳子，浜武牧子，西澤雅子，杉浦 亙：CRF01_AE 感染症例に見出された新たな薬剤耐性獲得機序．第 17 回日本エイズ学会学術集会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

40) 大出裕高，星野忠次，杉浦 亙：HIV-1protease 阻害剤耐性の分子動力学的解析．第 17 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

41) 杉浦 亙：HIV-1 治療における薬剤耐性の影響とその対策．第 17 回日本エイズ学会学術集会・シンポジウム，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

42) 武部豊，今村裕子，草川茂：HIV-1 サブタイプ B'の起源とアジアにおける流行拡大に果たす役割．第 17 回日本エイズ学会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

43) 武部豊，Ma Yanling, Yang Chaojun，今村裕子，横田侑子，上原理恵子，草川茂，Yang Rongge，Ben Kunlong：中国におけるエイズ流行の巨大危機とその形成のメカニズム．第 17 回日本エイズ学会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

44) 吉原なみ子，坂本優子，福嶋浩一，今井光信，林邦彦，井戸深雪：全施設を対象にした HIVRNA 定量のコントロールサーベイおよびアンケート調査の検討．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

45) 鈴木寿子，土屋利江，吉原なみ子：コラーゲンスポンジ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 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

46) 坂本優子，宮地峰輝，香川孝司，高浜洋一，浜口行雄，野内英樹，田村深雪，小野崎郁史，吉原なみ子：カンボディアの新規結核患者における輸血関連ウイルスの陽性率．第 17 回日本エイズ学会総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

47) Kozyrev IL，阪井弘治，高橋栄治，篠原克明，鈴木元，伊吹謙太郎，速水正憲，三浦智行：Genetic analysis of acute pathogenic and less pathogenic SHIV molecular clones to determine the responsive site for in vivo pathogenicity．第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

48) 杉本智恵，保富康宏，塩田達雄，山本直樹，永井美之，森　一泰：糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuated virus としての性質．第 17 回日本エイズ学会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

49) 森　一泰，杉本智恵，中山英美，塩田達雄，草川茂，武部豊，保富康宏，永井美之：Env エイズワクチンにおける糖鎖の重要性．第 17 回日本エイズ学会，2003 年 11 月 27-29 日，神戸．

50) Hagiwara Y, Dohi T, Yoshino N, McGhee JR, Fujihashi K: Nontoxic CT (E112K) Mutated In The COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Elicits Mucosal Adjuvant Activity Without Intracellular Trafficking. 第33回日本免疫学会，2003年12月8-10日，福岡.
51) 駒野淳，宮内浩典，松田善衛，山本直樹：ウイルス感染初期過程における Arp2/3 複合体の重要性．第26回日本分子生物学会年会，2003年12月10-13日，神戸.
52) 宮内浩典，駒野淳，松田善衛：HIV-1 エンベロープタンパク質膜貫通領域（membrane spanning domain, MSD）の膜融合後期過程への寄与．第26回日本分子生物学会年会，2003年12月10-13日，神戸.
53) 吉野直人：HIV/AIDS ワクチンの開発．第82回もりおか生物科学の集い，2004年1月31日，盛岡.
54) 松井良輔，菅井隆弘，千葉晴美，塩見和朗，山口裕一，増間碌郎，供田 洋，千葉智子，杉浦 亙，大村智，田中晴雄：糸菌状の生産する HIV-1 インテグラーゼ阻害物質の単離と生物活性．第124回日本薬学会，2004年3月

22. 附属図書館

館長(併任)　宮村　達男
編集委員長　渡邉　治雄

概　要

図書の業務は、文献相互貸借、購入や寄贈・交換による洋雑誌や和雑誌並びに単行本の受理管理、職員に対する図書類の貸し出し管理、洋雑誌や和雑誌の利用状況の把握、そして財産としての図書類の管理である。更に近年は印刷体にオンラインタイプが加わり多様化して来ている。

感染研ではオンライン・ジャーナルを感染研全所すなわち戸山庁舎、村山分室、筑波霊長類センター、ハンセン病研究センターで利用することを前提とし、220 誌前後が別契約や、印刷体との一体契約で全所員が利用出来る体勢となっている。

洋・和雑誌の購入に際しては、既存誌の利用状況や利用者の希望、感染研全体として購入中止を含む適正購入が必然であり、近年のオンライン・ジャーナルも加わり、また、年々の雑誌等単価アップに伴う予算面からも、全員の希望に全面的に沿うことは厳しい。今後も各誌の単価アップやオンライン・ジャーナルの契約増等予算に絡む問題が離れないものと思う。あるいは、雑誌によっては印刷体にするか、オンラインのみにするか、具体的な個々の検討も必要になるものと思われる。

来年度から国立大学が独立法人化されるのに伴い、全国統一料金だった文献相互貸借における複写料金や徴収方法も含め各大学が独自に設定出来るようになるため、感染研としても支払い方法等や感染研全体として、複写料金徴収の是非を議論する時期だと考える。

○　戸山庁舎図書委員会通常委員会兼感染研全体委員会が分室及び支所の図書委員会代表委員の出席のもと、平成15 年 7 月 24 日(木)に戸山庁舎第二会議室において開催された。

戸山図書館の決算及び予算の報告や新年度予算が了承可決された。

○　上記委員会において次のことも決議された。

1　新規購入は、各部より希望のあった9誌中次の3誌を選定した。

1)　Current Biology

2) Veterinary Record

3) Nature Reviews: Microbiology

2　購入中止は Pub. Med 等で内容が検索可能なため Current Contents: Life Science とする。

3　和雑誌は継続購入する。

4　オンライン・ジャーナルについては、印刷体と同時購入する雑誌は引き続き継続する。

新規契約は Nature Reviews の全 7 誌を追加する。

5　ASM 社は引き続き全 11 誌パックオンライン契約する。

6　Cell Press.社分はエルゼビア社のサイエンス・ダイレクトに含めて契約する。含まれるのは Cell、Immunity. Molecular Cell. Cancer Cell. Neuron であり、しかし、契約は他のサイエンス・ダイレクトと契約書は別となる。両方でサイエンス・ダイレクトは 78 誌である。なお、このサイエンス・ダイレクトはサーバーの性格上独立行政法人:国立健康栄養研究所との共同契約となる。

○　長年、図書係長を勤めた劔　節夫は平成16年3月31日をもって定年退職した。

附属図書館

雑誌、単行本受け入れ状況

		戸山		村山		筑波		ハンセン	
		洋	和	洋	和	洋	和	洋	和
雑誌	購入	221	21	101	18	27	8	25	8
	交換	18	9	0	0	0	0	0	0
	寄贈	13	13	8	11	0	6	2	23
	合計	252	43	109	29	27	14	27	31
単行本	購入	85	4	84	25	0	6	2	0
	寄贈	42	21	46	55	4	21	0	0
	合計	127	25	130	80	4	27	2	0

附属図書館

文献相互貸借実績表

機関名	戸山		村山		筑波		ハンセン	
	供与	依頼	供与	依頼	供与	供与	依頼	供与
戸山			62	326	0	15	0	89
村山	326	62			0	4	0	1
筑波	15	0	4	0			0	0
ハンセン	89	0	1	0	0	0		
(計)	430	62	67	326	0	19	0	90
国立保健医療科学院	15	41	8	31	0	0		
国立医薬品食品衛生研究所	219	21	104	53	0	0		
国立国際医療センター	512	76	2	0	0	0		
国立成育医療センター	100	0	0	0	0	0		
(独) 国立健康・栄養研究所	0	0	16	0	0	0		
(独) 動物衛生研究所	185	69	125	38	0	1		
(独)畜産草研究所	18	4	7	16	0	0		
国・県の機関(独・含)	108	9	7	3	0	0		
地方衛生研究所	46	2	5	0	0	0		
国公立病院	19	1	1	0	0	0		
国公立大学図書館	4	335	7	353	0	28		
国際医学情報センター	11	48	0	0	0	0		
私立病院	8	0	0	0	0	0		
私立大学図書館	11	230	4	17	0	6		
企業	3	0	1	0	0	0		
その他	6	16	4	13	22	0		
(計)	1265	852	291	524	22	35		
合計	1695	914	358	850	22	54	0	90

附属図書館

文献複写の利用実績(順位)

雑誌			オンライン	
	Journal Name	Total	Journal Name	Total
1	J. Virology	948	J. Virology	11779
2	J. Biological Chemistry	354	J. Biological Chemistry	9833
3	Nature	332	PNAS	5744
4	J. Immunology	297	Science	4944
5	Proceeding National Academy Science USA	292	J. Immunology	4857
6	Science	278	Infection & Immunity	4218
7	Lancet	224	J. Clinical Microbiology	3396
8	J. Am. Med. Assoc.	181	Nature	2982
9	Virology	179	Lancet	2272
10	Cell Differentiation	157	J. Bacteriology	2257
11	J. Experimental Medicine	154	Molecular Cellular Biology	2156
12	J. Clinical Microbiology	141	Vaccine	1973
13	Biochem. Biophys. Res .Commun	140	Nature Medicine	1937
14	Infection & Immunity	138	J. General Virology	1792
15	New England J. Medicine	135	Cell	1713
16	J. Infect. Dis.	132	Virology	1670
17	Cancer Research	124	J. Experimental Medicine	1535
18	Am. J. Epidemiology	124	Blood	1501
19	J. General Virology	119	Biochem. Biophys. Res .Commun	1182
20	EMBO J.	117	J. Cell Biology	1150
21	J. Clinical Investigation	115	Antimicrobial Agents Chemotherapy	1040
22	Nature Medicine	110	FEMS Microbiology　5title	942
23	Molecular Cellular Biology	100	Nature Biotechnology	933
24	Blood	94	Molecular Microbiology	888
25	Cell	91	Applied Environmental Microbiology	883
26	European J. Immunology	85	FEBS Letters	813
27	Nucleic Acids Research	74	Nature Cell Biology	805
28	J. Bacteriology	74	Cancer Research	775
29	Molecular Microbiology	68	Genes & Developments	745
30	J. Medical Virology	60	Molecular Cell	734

附属図書館

感染研 full text 利用可能雑誌

Acta Neuropathologica
Acta Virologica
AIDS
AIDS Research and Human Retroviruses
American Journal of Pathology
American Journal of Physiology – Endocrinology & Metabolism
American Journal of Physiology – Gastrointestinal & Liver Physiology
American Journal of Epidemiology
American Journal of Clinical Pathology
American Journal of Human Genetics
American Journal of Veterinary Research
Analytical Biochemistry
Annals Internal Medicine
Annals Tropical Medicine Parasitology
Antimicrobial Agents Chemotherapy
Antiviral Research
Applied Environmental Microbiology
Archives Biochemistry & Biophysics
Archives Microbiology
Archives Virology
Biochemical Biophys. Res. Communications
Biochemical Journal
Biochemical Pharmacology
Biochemical Society Transaction
Biochimica et Biophysica Acta [full 10 title]
Biologicals
Blood
British Medical Journal
British Journal of Hematology
British Journal of Cancer
Cancer Cell
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention
Cancer Research
Carcinogenesis
Cell
Cell Growth & Differentiation
Cellular Immunology
Cellular Microbiology
Cellular Signalling
Chromosoma
Clinical Cancer Research
Clinical Diagnostic Laboratory Immunology
Clinical Experimental Immunology
Clinical Immunology
Clinical Infectious Diseases
Clinical Microbiology Infection
Clinical Microbiology Reviews
Current Biology
Current Microbiology
Current Opinion in Genetics & Development
Current Opinion in Immunology
Current Opinion in Microbiology
Cytokine
Developmental Biology
Drug Resistance Updates
Electrophoresis
EMBO Journal
EMBO Reports
Entomologica Experimentalis Applica
Epidemiologic Reviews
Eukaryotic Cell
European Journal of Biochemistry
European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases
European Journal of Immunology
European Journal of Pediatrics
Experimental Biology & Medicine
Experimental Cell Research
Experimental Hematology
Experimental Parasitology
FASEB Journal
FEBS Letters

附属図書館

FEMS Microbiology [full 5title]
Gastroenterology
Gene
Gene Therapy
General and Comparative Endocrinology
Genes & Development
Genetics
Genomics
Hepatology
Hepatology Research
Immunity
Immunogenetics
Immunological Reviews
Immunology
Immunology Letters
Infection
Infection & Immunity
Insect Biochemistry and Molecular Biology
International Immunology
International Journal of Experimental Pathology
International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology
Journal of Aquired Immune Diffency Syndromes
Journal of American Medical Assocciation
Journal of Allergy & Clinical Immunology
Journal of American Veterinary Medical Association
Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Journal of Applied Microbiology
Journal of Bacteriology
Journal of Biological Chemistry
Journal of Cell Biology
Journal of Chromatography B
Journal of Clinical Invesitigation
Journal of Clinical Microbiology
Journal of Clinical Virology
Journal of Endotoxin Research
Journal of Experimental Medicine
Journal of General Microbiology
Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Journal of Hospital Infection
Journal of Immunological Methods <incorporating Immunotechnology>
Journal of Immunology
Journal of Infection
Journal of Infectious Diseases
Journal of Laboratory & Clinical Medicine
Journal of Leukocyte Biology
Journal of Lipid Research
Journal of Medical Microbiology
Journal of Medical Primatology
Journal of Medical Virology
Journal of Molecular Biology
Journal of National Cancer Institute
Journal of Neurochemistry
Journal of Neuroscience
Journal of Neurovirology
Journal of Pediatrics
Journal of Periodontal Research
Journal of Thrombosis Haemostasis
Journal of Viral Hepatitis
Journal of Virological Methods
Journal of Virology
Laboratory Animals
Letters in Applied Microbiology
Leukemia
Medical Microbiology Immunology
Microbes Infection
Microbial Pathogenesis
Microbiology
Microbiology Molecular Biology Reviews
Molecular and Biochemical Parasitology
Molecular Biology and Evolution
Molecular Biology of the Cell
Molecular Cancer Research
Molecular Cancer Therapeutics
Molecular Cell
Molecular Cellular Biology
Molecular General Genetics

附属図書館

Molecular Genetics Genomics
Molecular Immunology
Molecular Microbiology
Molecular Therapy
Nature
Nature Biotechnology
Nature Cell Biology
Nature Genetics
Nature Immunology
Nature Medicine
Nature Neuroscience
Nature Reviews Cancer
Nature Reviews Drug Discovery
Nature Reviews Genetics
Nature Reviews Immunology
Nature Reviews Microbiology
Nature Reviews Molecular Cell Biology
Nature Reviews Neuroscience
Nature Structural Molecular Biology
Neuron
New England Journal of Medicine
Nucleic Acids Research
Oncogene
Oral Microbiology Immunology
Parasite Immunology
Parasitology Research
Pediatrics
Pediatrics Infectious Diseases Journal
Pesticide Biochemistry Physiology
Phrmacological Reviews
Plasmid
Proceeding National Academy of Sciences USA
Proteomics
Reproduction
Research in Microbiology
RNA
Scandinavian J. Immunology
Scandinavian J. Infectious Diseases
Science
The LANCET
The LANCET Infectious Diseases
Toxicon
Transfusion
Trends in Biochemical Sciences
Trends in Cell Biology
Trends in Genetics
Trends in Immunology
Trends in Microbiology
Trends in Molecular Medicine
Trends in Neurosciences
Trends in Parasitology
Tuberculosis
Vaccine
Veterinary Pathology
Virology
Virus Research
Vox Sanguinis
Yeast

附属図書館

[J.J.I.D. について]

平成１５年４月に編集委員長が宮村達男から渡辺治雄に交代し、新しく編集委員として牧野正彦、遠藤卓郎、佐多徹太郎、小林睦生が加わった。編集方針は昨年度と同様である。

発行月とジャーナルに表示している月を一致させるため、５－６号は合併号とした。

７月には"Annual Report on Findings of Infectious Agents in Japan 1999"を volume 53, Supplement として発行した。

今年度の概略は以下の通りである。

投稿数、特に海外からの投稿が増加し、昨年度比 1.6 倍となった。

発行部数　各 950 部

発送先　国内－大学, 衛研等　300 機関

海外－大学, 研究所等　500 機関

（約 75 ヶ国）

投稿論文数　感染研内　24 編

他国内　46 編

海外　74 編

採択率　51.4 %

JapaneseJournalofInfectiousDiseases

Volume56,2003Contents

February, No. 1

Original Articles

A Two-Year Analysis of Risk Factors and Outcome in Patients with BloodstreamInfection: Andrea Endimiani, Antonio Tamborini, Francesco Luzzaro, Gianluigi Lombardi and Antonio Toniolo 1-7

Prevalence of Antibody against Hepatitis E Virus in Various Species ofNon-HumanPrimates: Evidence of Widespread Infection in Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*): Makoto Hirano, Xin Ding, Huy Thien-Tuan Tran, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Tetsutaro Sata, Shin Nakamura and Kenji Abe 8-11

Geographic CharacterizationofHepatitisVirus Infections, Genotyping of Hepatitis B Virus, and p53MutationinHepatocellularCarcinoma Analyzed by In Situ Detection of Viral Genomes from Carcinoma Tissues: Comparison among Six Different Countries: Xin Ding, Young Nyun Park, Teresa Casanovas Taltavull, Swan N. Thung, Xiaoming Jin, Yi Jin, Nguyen Sao Trung, Yoshihiro Edamoto, Tetsutaro Sata and Kenji Abe 12-18

Molecular EpidemiologyofHepatitisVirusesand GenotypicDistributionofHepatitisBandC Viruses inHarbin,China:XinDing,HongxiGu, Zhao-HuaZhong,XuZilong,HuyThien-Tuan Tran, Yohko Iwaki, Tian-Cheng Li, Tetsutaro Sata and Kenji Abe 19-22

ShortCommunications

Age Specific Rubella Seroprevalence of an Unvaccinated PopulationofAdolescentsinAnkara,Turkey: NurayOksuzKanbur,OrhanDerman,TezerKutluk andErolKinik.....23-25

DetectionofAntibodiesagainstSpottedFeverGroup *Rickettsia* (SFGR), TyphusGroup *Rickettsia* (TGR), and *Coxiellaburnetii* inHumanFebrile PatinentsinthePhilippines:GerryAmorCamer, MarissaAlejandria,MiguelAmor,Hiroshi Satoh, YasukazauMuramatsu,HiroshiUenoandChiharu Morita 26-28

Guillain-Barre Syndrome inaPediatricPatient FollowingInfectiondueto *Leptospira*: AbhijitM.Bal,RenuS.Bharadwaj,Nadimpalli Gita,SuvarnaA.JoshiandJyotsnaP.Thakare 29-31

LaboratoryandEpidemiology Communications

NalidixicAcid-Resistant *Salmonellaenterica* Serovar

TyphiwithDecreasedSusceptibilityto Ciprofloxacin Casued Treatment Failure: A Report fromBangladesh:S.M.ZahurulHaqueAsna,J. Ashraful HaqandMd.MushfequeRahman 32-33

Multiresistant *Shigella* SpeciesIsolatedfrom ChildhoodDiarrhaeCasesinKolkata,India: SwapanKumarNiyogiandGururajaPerumal Pazhani 33-34

RecombinationofGenotypesBandCinHepatitisB VirusIsolatedfromaVietnamesePatientwith FulminantHepatitis:HuyThien-TuanTran, Hiroshi Ushijima,TrinhThiNgoc,LeDangHa, ShigekiHayashi,TetsutaroSataandKenij Abe 35-37

CompleteNucleotideSequenceofHepatitisBViruse Isolated from Two Infants with Fulminat Hepatitis KenjiAbe,TetsuyaKiuchi,NaotoAbiba,Huy Thien-Tuan Tran,XinDing,MariYamaguchi, TetsutaroSataandKoichiTanaka.....38-39

SerotypingofHumanGroupARotavirusesinNara Prefecture, Japan:YoshiteruKitahori,Yumiko Inoue,HisakatsuTakebeandShunsuke Imai 39-41

April, N o . 2

Original Articles

A Seasonal Model to Simulate Influenza Oscillation in Tokyo: Mitsuyoshi Urashima, Nahoko Shindo and Nobuhiko Okabe 43-47

Seasonal Models of Herpangina and Hand-Foot-Mouth Disease to Simulate Annual Fluctuations in Urban Warming in Tokyo: Mitsuyoshi Urashima, Nahoko Shindo and Nobuhiko Okabe 48-53

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* PrevalenceinCommunityintheEast DelhiArea: SonalSaxena,KavitaSinghandVibhaTalwar 54-56

ShortCommunications

Human T-LymphotropicType-1Virus Specific Antibody Detected in Sera of HIV/AIDS Patients inGhana:AndrewAnthonyAdjei,Theophilus Korku Adiku, Patrick Ferdinand Ayeh-Kumi and Akosua Benefah Domfeh 57-59

Listeriosis inSecondTrimesterofPregnancy:Case Report from India: Varsha Gupta, Vikas Gautam, NeeraMehta,IbhaKumariandR.M.Joshi 60-61

CharacterizationoftheFirstKoreanIsolateofa *Chlamydiapneumoniae* Strain:Seung-JoonLee, Eui-Cheol Nam, Jun Yeon Won, Weon-Seo Park, WooJinKim,Seon-SukHanandDae-HeeChoi 62-64

R-Factorin *Salmonellaenterica* SerovarTyphi: Transfer to and Acquisition from *Escherichia coli*: Shyamapada Mandal, Manisha Deb Mandal and Nishith Kumar Pal 65-67

Congenital Rubella Syndrome due to Infection after Maternal Antibody Conversion with Vaccine: Miyuki Ushida,ShigetakaKatowandSeikyo Furukawa 68-69

Heat StabilityoftheLyophilizedSabinPoliovaccine: HiroshiShiomi,TomokoUrasawaandShozo Urasawa 70-72

A BotulismCase ofa12-Year-OldGirlCausedby IntestinalColonizationof *Clostridiumbotulinum* TypeAb:Hiroshi Kobayashi, KohjiFujisawa, Yoshihiro Saito, Makoto Kamijo, Sakiko Oshima, MasakatsuKubo,YoshikatsuEto,Chie Monma and Masaru Kitamura 73-74

LaboratoryandEpidemiology Communications

AnEpidemicofAseptic Meningitisdue to Coxsackievirus B5 inNaraPrefecture,Japan: AnEpidemiologicalAnalysis byPCR-RFLP: YoshiteruKitahori,YumikoInoue,Yoshiyuki Maruhashi,OsamuAdachi andShunsukeImai

.....75-76

ANewClonalLineof *Salmonella* SaintpaulHaving Emerged and Prevailed since 1999 in Aichi, Japan: MamiHata,MasahiroSuzuki,Masakado Matsumoto,MasaoTakahashi,MitsuguYamazaki, ReijiHiramatsu,HironoriMatsui,KenjiSakae, Yasumoto Suzuki and Yutaka Miyazaki 77-79

June, N o . 3

Review

Rubella and Cengenital Rubella Syndrome in Japan: Epidemiological Problems: Kihei Terada 81-87

Original Articles

Evaluation of Diagnostic Efficacy of PCR Methods for *Chlamydiatrachomatis* InfectioninGenitaland UrineSpecimens of SymptomaticMenand Women in India: Joyee A. George, Thyagarajan S. Panchatcharam, Rajendran Paramasivam, Sowmya Balasubramanian, Venkatesan Chakrapaniand Ganapathy Murugan 88-92

A Cell Line AssaySystem for Predicting the Response of Human Blood toEndotoxin:Akihiko Yamamoto, Takeo Sakai, Masaki Ochiai, Kazunari Kamachi,MichiyoKataoka,Hiromi Toyoizumi and Yoshinobu Horiuchi 93-100

ShortCommunications

A CaseofNosocomial *Legionellapneumophila* Pneumonia:KeizoTorii,YoshitsuguIinuma, Motoshi Ichikawa, Keisuke Kato, Michio Koide, Hisashi Baba, Ryujiro Suzuki and Michio Ohta 101-102

The Incidence of *Escherichia coli* Having Pathogenic Genes for Diarrhea:AStudyinthePeople's Democratic Republic ofLao:Bounnanh Phantouamath,NoikaseumsySithivong,Sithat Insisiengmay,NaomiHiga,ClaudiaToma, Noboru Nakasone and Masaaki Iwanaga 103-106

High *Toxoplasma* Antibody Prevalenceamong Inhabitants in Jakarta, Indonesia: Aya Terazawa, Rusli Muljono, Lisawati Susanto, Sri S. Margono and Eiji Konishi 107-109

IsolationofInfluenzaAH1N2Virusesfroman Outbreak in Yokohama City during the 2001-2002 InfluenzaSeasoninJapan:ChiharuKawakami, Takehiko Saito, Yoko Nakaya, Setsuko Nakajima, TetsuyaMunemura,MiwakoSaikaku,Yuzo Noguchi, Kikushige Fujii, Mikio Takaoka, Reiko Ito,ToshinoriSaito,TakatoOdagiriandMasato Tashiro 110-113

EpidemiologicalReport

AnEpidemiological StudyonJapaneseAutism concerning Routine Childhood Immunization History: Hiroshi Takahashi, Syunsuke Suzumura, FumikoShirakizawa,Noriyuki Wada,Keiko Tanaka-Taya,SatoruArai,NobuhikoOkabe, Hironobu Ichikawa and Taizo Sato 114-117

LaboratoryandEpidemiology Communications

Detectionof *Echinococcus multilocularis* Eggsby CentrifugalFlotationTechnique: Preliminary Survey of Soil Left in the Ferryboats Commuting between Hokkaido Island, Where *E. multilocularis* isEndemic,andMainlandJapan:Kayoko Matsudo,TakashiInabaandHaruoKamiya 118-119

PolioandOtherEnterovirusIsolationbyRegionin Ethiopia,2000-2002:Berhane BeyeneMentaye, MebratuZelalem,AngeloAsha,YosefTiruneh, AklogAfework,MenberuTedela,TsionBezuneh, AlmazG/senbet,FemiOyewole,AlmazAbebe, TilahunWoldemichaelandOyewale Tomori 119-121

ANoteonIncidenceofTyphoid Fever in Diverse Age Groups in Kolkata,India:MalayRanjanSaha, Phalguni Dutta, Anup Palit, Dharitri Dutta, Mihir KumarBhattacharya,UtpalaMitraandSujit Kumar Bhattacharya 121-122

DrugResistanceGenesEndocedinIntegronsandin Extra-Integrons:TheirDistributionandLateral TransferamongPathogenic *Enterobacteriaceae* including Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonellaenterica* SerovarsTyphimurium and Infantis: KokichiHamada,KahoriOshimaand Hidetaka Tsuji 123-126

Clinical Study of Pediatric Cases of Acute Respiratory Diseases AssociatedwithHuman Metapneumovirus inJapan:ShinichiTakao, HiroyukiShimozono,HiroshiKashiwa,Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Masaru Kuwayama and Kazuo Miyazaki 127-129

MolecularEpidemiologyofMethicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto Hospital in 2002:FumioKawano,Hisayoshi Miyazaki, Jun-ichiTakami,TomokoFujino,Jun-ichiro Sekiguchi, Katsutoshi Saruta, Tadatoshi Kuratsuji and Teruo Kirikae 129-132

Molecular Epidemiology of Intra-Familial Tuberculosis Transmission:MakotoTakahara,Yoshiharu Yajima,SumioMiyazaki,MichiyoAiyoshi, TomokoFujino,Yayoi Otsuka,Jun-ichiro Sekiguchi, Katsutoshi Saruta, Tadatoshi Kuratsuji and Teruo Kirikae 132-133

SpreadofErythromycin-,Tetracycline-,and Aminoglycoside-Resistant Genesin Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates in a Kumamoto Hospital: Fumio Kawano,HisayoshiMiyazaki,Jun-ichiTakami, Tomoko Fujino, Jun-ichiro Sekiguchi, Katsutoshi Saruta,TadatoshiKuratsuji and TeruoKirikae 133-137

An Outbreak of Food-Borne Gastroenteritis Caused by *Clostridium perfringens* Carrying the *cpe* Geneon aPlasmid:DaisukeTanaka,JunkoIsobe,Shiho Hosorogi, Keiko Kimata, Miwako Shimizu, Koji Katori, Yotaku Gyobu, Yoshiyuki Nagai, Takyoshi Yamagishi, Tadahiro Kawasawa and Shinichi Nakamura.....137-139

SARS Coronavirus-Infected Cells in Lung Detected by New InSituHybridizationTechnique:Noriko Nakajima,YasukoAsahi-Ozaki,NoriyoNagata, YukoSato,FlorencioDizon,FemJ.Paladin, RemigioM.Olveda,TakatoOdagiri,Masato Tashiro and Tetsutaro Sata 139-141

August,No.4

OriginalArticles

In Vitro Inhibitory Effects of Tea Polyphenols onthe Proliferationof *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydiapneumoniae*: TsutomuYamazaki, Miyuki Inoue, Nozomu Sasaki, Toshikatsu Hagiwara,ToshioKishimoto,SadashiShiga, Motohiko Ogawa, Yukihiko Hara and Takaaki Matsumoto 143-145

Chlamydophilapneumoniae Infection amongYoung ChildrenwithRespiratoryDiseasesinThailand: Piyada Wangroongsarb, Kanonkporn Geenkajorn, Wimol Pektkanchanapong, ApiramVedjapoom, Mayura KusumandToshikatsuHagiwara 146-150

MultiplexPolymeraseChainReactionAssayfor Selective Detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium:Young-HeeLim,KenjiHirose, HidemasaIzumiya,EijiArakawa,Hideyuki Takahashi,JunTerajima,Ken-ichiroItoh, KazumichiTamura,Sung-Il KimandHaruo Watanabe 151-155

ShortCommunications

CombinationEffectofCiprofloxacinandGentamicin againstClinicalIsolatesof *Salmonellaenterica* SerovarTyphiwithReducedSusceptibilityto Ciprofloxacin: Shyamapada Mandal, Manisha Deb Mandal and Nishith Kumar Pal 156-157

Safe and Easy Monitoring of Anti-Rabies Antibody in

DogsUsingHis-TaggedRecombinantN-Protein: Satoshi Inoue, Yurie Motoi, Tomoko Kashimura, Kenichiro Ono and Akio Yamada 158-160

Evaluation of a Rapid Serological Chromatographic ImmunoassayfortheDiagnosisofPulmonary TuberculosisinAccra,Ghana: AndrewAnthony Adjei,HenryArmah,OwusuAchawDuah, Theophilus AdikuandIanFiifiAdukweiHesse 161-164

PrevalenceofAntibodiestoSyphilisamongBlood Donors inAccra,Ghana:AndrewAnthonyAdjei, WilliamKudzi,HenryArmah,TheophiluAdiku, AlbertGeorgeBaidoeAmoahandJustina Ansah 165-167

EpidemiologicalReport

EpidemiologicalInvestigationon *Clonorchis sinensis* inHumanPopulationinanAreaofSouthChina: YuSen-Hai,Masanori Kawanaka, LiXue-Ming, XuLong-Qi,LanChun-GengandLinRui 168-171

LaboratoryandEpidemiologyCommunications

EvaluationofSimianImmunodeficiency Virus-SpecificImmuneResponses Induced b y a DefectiveProviral DNA Vaccine in Macaques: AkikoTakeda,HiromiNakamuraandTetsuro Matano 172-173

ArithmeticEstimationoftheHIV-InfectedinJapan: Hiroshi Yoshikura 173-174

VaccinationCoverageofPoliomyelitisamongLess than 5-Year-Old Children in the Markets of Niger: MidoriKobayashi,KeikoHirakawa,Michihisa Sawada, ChiemiSuzuki,SyuheiSaikawa,Hiroko Ando,MiyukiNakaneamdTakashiNakano 175-177

AnUnusualOutbreakofInfusion-RelatedBacteremia inaGastrointestinalDiseaseWard:KeizoTorii, Yasunobu Noda, Yutaka MiyazakiandMichio Ota 177-178

P GenotypeIdentificationofHumanGroupA Rotaviruses:YumikoInoue,YoshiteruKitahori, Osamu Adachi and Shunsuke Imai 179-180

A Red Fox, *Vulpes vulpesshrencki*,Infectedwith *Echinococcus multilocularis* was Introduced from Hokkaidoisland,Where *E.multilocularis* is Endemic,toAomori,NorthernPartofthe MainlandJapan: HaruoKamiya,TakashiInaba, Hiroshi Sato and Arihiro Osanai 180-181

Molecular EpidemiologyofType2Vaccine-AssociatedParalyticPoliomyelitis in China: YasuoChiba,MakotoKobayashi,ToruChosa, TeijiYamamoto,KazuhiroEndo,Hiroyuki Shimizu,LiLi,XuWen-BoandZhangLi-Bi 181-183

CollaborativeStudy:StandardizationofJapanese ReferenceDiphtheriaandTetanusToxoids, (Adsorbed, Lot 2), for Potency Determination of Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis Combined Vaccine:MasaakiIwaki,TakakoKomiya,Tadashi Fukuda,Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi 183-185

October-December,Nos.5-6

OriginalArticles

AIDS-RelatedOpportunisticInfectionsinHospital Kuala Lumpur: Veeranoot Nissapatorn, Christopher Lee,QuekKiaFatandKhairulAnuarAbdullah 187-192

Encephalitis inTaiwan:AProspective Hospital-Based Study: Tzu-ChiLee,Ching-PiaoTsai,Chih-Lun Yuan,Cheng-YuWei,Wen-LongTsao,Rung-Jan Lee,Su-YiCheih,I-TsongHuangandKow-Tong Chen.....193-199

EvaluationofAutomatedRibotypingSystemfor CharacterizationandIdentificationof Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Isolated inJapan:YujiIto,YoshitsuguIinuma,Hisashi

Baba,YasuteruSugino,YoshinoriHawagawa, KaoruShimokata,SatoshiIchiyama,Tadao Hasegawa and Michio Ohta 200-204

EvaluationofRT-PCRasaToolforDiagnosisof SecondaryDengueVirusInfection:Areerat Sa-ngasang, Sasitorn Wibulwattanakij,Sumalee Chanama,AnantchaiO-rapinpatipat,Atchareeya A-nuegoonpipat,SurapeeAnantapreecha,Pathom Sawanpanyalert and Ichiro Kurane 205-209

ShortCommunications

Ofloxacin Minimum Inhibitory Concentration versus DiskDiffusionZone Diameterfor *Salmonella enterica* Serovar TyphiIsolates:Problemsinthe DetectionofOfloxacinResistance:Shyamapada Mandal,ManishaDebMandalandNishithKumar Pal 210-212

Age-SpecificMumps Seroprevalenceofan UnvaccinatedPopulationofAdolescentsin Ankara, Turkey: NurayOksuzKambur,Orhan Derman and Tezer Kutluk 213-215

LaboratoryandEpidemiologyCommunications

ChromosomalTransferableMultidrugResistance Genes of *Salmonellaenterica* SerovarInfantis: KokichiHamada,KahoriOshimaandHidetaka Tsuji 216-218

SurveillanceofPoliovirus-IsolatedinJapan,2002: HiroyukiShimizu,HiromuYoshida,AndiUtama, Takashi Nakayama, Takayuki Saito,Kanako Watanabe,SetsukoIizuka,Shinji Noda,Tetsuo Yoneyama and Tatsuo Miyamura 218-219

EmergingandReemergingInfectionsinChina 2002-2003:AComment:Hiroshi Yoshikura 219-220

Atypical ProteinaseK-Resistant PrionProtein (PrPres) ObservedinanApparentlyHealthy 23-Month-Old Holstein Steer: Yoshio Yamakawa, Ken'ichiHagiwara,KyokoNohtomi,Yuko Nakamura, Masahiro Nishijima, Yoshimi Higuchi, YukoSato,TetsutaroSata and theExpert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan 221-222

ACKNOWLEDGMENTS

The Editorial Board is grateful to the following scientists for reviewing articles submitted to Japanese JournalofInfectiousDiseasesduring2003.

Shuji Ando, TakayukiEzaki,Shuhei Fujimoto, Toshikatsu Hagiwara, Toshio Hattori, Katsunari Hirai, Seitaro Hiruma, Yoshitsugu Iinuma, Noriyuki Inaba, Yoshikazu Ishii, Akemi Kai, Tamotsu Kanazawa, Hiroki Kawabata, Kinya Kawano, Fumiaki Kura,Kenji Hirose,Shinji Kasai, Ken Kikuchi, Akinori Kimura, Kazuo Kobayashi, Hiromi Kumon, Hisao Kurazono, Soichi Makino, Toshihiko Matsukura, Hiroyuki Matsuoka, Yoshiharu Matsuura, Hiroyuki Miyazawa, Masashi Mizokami, Koichi Morita, Morihiro Morita, Soumei Murayama, Takashi Nakano, Shu-ichi Nakayama, Yukifumi Nawa, Akira Nishizono, Masayoshi Noguchi, Motohiko Ogawa, Toyoko Oguri, Ryoichi Okamoto, Yoshinobu Okuno, Shoichi Onodera, Ken Osaka, Katsunori Osuga, Kazunobu Ouchi, Takao Ozaki, Yoshiyuki Ozawa, Masahiro Sakaguchi, Ayako Sano, Yuko Sasaki, Makoto Shoji, Tomimasa Sunagawa, Isamu Sugawara, Hiroshi Suzuki, Mitsuyoshi Takahashi, Hiroshi Takaku, Yoshifumi Takeda,Hidetaka Tsuji, Kouji Ueda, Yukiko Umino, Akira Watanabe, Naohiro Watanabe, Tetsuya Yagi, Tsutomu Yamazaki, Akihiko Yano

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

今年度で創設から 25 年を経過した霊長類センターは、年産 250 頭の生産能力を有する繁殖コロニーに感染実験施設と共同利用施設の二つの特殊実験施設を併設する我が国有数の霊長類医科学研究施設となった。ケージサイズの拡大を目的とした飼育棟および P3 施設の改修工事と新棟建設が現在進行中であり、平成 16 年度末には動物福祉に配慮した施設・設備の整備がほぼ完了する。感染研支所としてワクチン国家検定と感染症研究への育成ザル供給を目的として設立されたセンターは、平成 8 年の共同利用施設の開設にともない、サル類を用いた遺伝子治療、再生医療、移植医療、脳科学、長寿科学などの先端医療研究を支援する業務を拡大付加してきた。整備された霊長類センターを広く国内の研究者に開放し、感染症研究のみならず創薬研究や医療技術の開発研究に資するため、平成 17 年 4 月に発足する独立行政法人・医薬基盤研究所に移行させることとなった。医薬基盤研究所においては、引き続き国の支援を受けて、従来進めてきた実験用霊長類のリソース整備、モデル開発、基盤技術開発などのセンターが独自に取り組む基礎研究を発展させるとともに、所内外の研究者と共同で新規医薬品、医療技術の開発および実用化に関わる研究体制が整備される予定である。

今年度も実験用霊長類の繁殖・供給、品質管理、疾患モデル開発に関わる業務が順調に進展した。繁殖・供給業務では 232 頭のカニクイザル新生仔を得るとともに、ワクチン検定を含め感染研に 137 頭、共同利用施設に 75 頭、所外 14 頭の計 226 頭の育成カニクイザルを供給した。検査健康管理室においては、感染症および免疫研究において重要な情報となるカニクイザルの MHC クラス I のタイピング法が確立された。ウイルスを中心とした繁殖育成コロニーの SPF 化に関わる定期的調査が実施され、早期隔離により確立した。SRV/D 陰性コロニーでは、SRV/D 以外のウイルスの感染率も低いことが明らかになった。繁殖育成室においては、ここ数年問題となっている育成ザルの保育率を改善するための要因分析をおこなうとともに、交配の効率化を目的とした早期妊娠診断法が検討された。モデル開発では、感染研研究部と共同で、SIV、BSE、らい菌などの感染症モデルの開発を継続するとともに、あらたに C 型肝炎のモデルとして HCV に近縁な GBV-B を用いたタマリンでの感染・発症モデルの開発が開始された。繁殖コロニーで見いだされた若年性家族性黄斑変性症家系の維持に対して、今年度から厚生労働科研費の支援が得られることになりサル類では貴重な遺伝性疾患モデルの維持が可能となった。自然発症モデルとしてカニクイザルとミドリザルで循環器疾患の総合的スクリーニングを開始し、心筋症に類似した疾患を抽出した。これらはいずれも付加価値の高い疾患モデルとなり得る。免疫学的特性解析および胚・配偶子レベルでの遺伝子保存や遺伝子改変ザル作出を目的とした発生工学技術の開発研究が継続された。これらの研究は基盤的研究費の他に、厚生労働科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス財団、文部科学省科学研究費等の支援を受けて実施された。共同利用施設では、遺伝子治療、再生医療、長寿科学、脳科学研究、移植医療、新規医療技術開発など運営委員会で承認された計 27 件の実験が予防衛生協会の技術支援を受けて展開された。

人事面では、平成 15 年 4 月 1 日付けで下澤律浩が繁殖育成室研究員として採用され就任した。平成 16 年 3 月 31 日に榊原一兵主任研究官が定年退官された。センター創設以来四半世紀にわたり千例を超える斃死例の病理診断により繁殖コロニーの健康管理に貢献された努力に敬意を表し、今後のご活躍をお祈りする。

研　究　業　績

Ⅰ．実験用サル類の病原学的研究

１．サル EBV、CMV、SFV の感染状況に関する調査

TPC 繁殖コロニー内の、サル EBV、CMV、SFV（フォーミーウイルス）の感染状況を調査し、SPF 化の検討を行った。調査の結果、コロニー内では、CMV の感染は低率であるが、EBV、SFV については高率に感染していることが確認された。一方、従来から進めてきた SRV/D SPF 群内の人工哺育由来サルでは、EBV、CMV、SFV のいずれも感染率が著しく低い事が明らかとなった。今後、人工哺育サルを活用して、当該 3 ウイルスについても SPF 群を維持し、特殊実験にこれを供することが可能となった。

［成田豊子*、高野淳一朗*、藤本浩二*、寺尾恵治（*社

・予防衛生協会)〕

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-Ｔと仮称)であることを明らかにした。本ウイルス感染のない SPF サルコロニー作成のため、全血からの直接 SRV/D プロウイルス DNA の検出系、および 血漿、唾液から RT-PCR 法を用いた SRV/D の RNA ゲノム 検出系を確立した。全血からの SRV/D プロウイルス DNA の検出系の開発により１日で確定診断が可能となり、SPF サルコロニー作成と維持のためのモニタリングシステムを構築した。

〔原　正幸、菊池俊彦、小野文子*、佐多徹太郎**、成田豊子*、高野淳一朗*、藤本浩二*、寺尾恵治、向井鏡三郎（*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理)〕

（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（CM1,CM5）を樹立し、２株の産生する SIVcm1 と SIVcm5 を用い CM 細胞の由来を検討した。SIVcm を血液由来分化モノサイト、肺胞マクロファージおよび骨髄細胞に moi0.1 で感染させ、CM 様細胞の出現をみた。サル骨髄細胞のみに、CM 様細胞のコロニーが形成され、分裂増殖した。培養上清中には SIVcm の産生が確認されたので、脳炎発症脳血管周囲に形成される CM 様細胞の集族巣の由来は骨髄細胞である可能性が示唆された。

〔向井鏡三郎、佐多徹太郎**、菊池俊彦、原　正幸、小野文子*、中山満　（*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理)〕

（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７種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、そのうち４種の単クローン抗体は non-clade B HIV-1 や SIV 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免疫したサル坑血清を４倍希釈し宿主細胞（MAGIC-5 細胞）を前処理することにより、その坑 HIV-1 感染防止効果を検討した。その結果、X4,clade A と X4,clade E および R5,clade A と R5,cladeE の HIV-1 臨床分離株の感染を濃度依存的に阻害した。

〔向井鏡三郎、原　正幸、菊池俊彦、庄司省三*（*熊本大薬)〕

（４）HIV-1Vif の分子機構に関する研究

HIV-1　Vif は抗 apobec-3G 作用と独立して、ウイルス粒子内においてウイルスプロテアーゼによる GagP2/NC 切断のみを特異的に阻害する。本年度は上記 Vif 作用に係る機序についてより詳細な解析を行った結果、P2/NC processing 阻害活性は Vif N 末端側 40 アミノ残基を含む領域により規定されており、一方 Vif のウイルス取り込みは中央領域により規定されていた。さらに Vif のウイルス取り込みは、processing 阻害活性に必要であるが十分ではなかった。以上より、Vif はその Gag 結合領域と processing 阻害に関わる機能領域が独立して存在していると考えられた。

〔李永仲、明里宏文〕

（５）糖鎖欠失 SIVmac239 変異株のアカゲザル感染における感染防御免疫の解析

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森　一泰〕

（６）糖鎖欠失 Env と中和抗体感受性、細胞指向性および CD4 非依存性との関連

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森　一泰〕

（７）Env エイズワクチンデザインにおける糖鎖修飾の重要性

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森　一泰〕

（８）感染後早期治療ザルに誘導された gag 特異的 CD4+T 細胞のエピトープと MHCIIallele の決定

(内容はエイズ研究センターを参照)

〔杉本智恵、森　一泰〕

３．C 型肝炎のサル病態モデル開発

HCV はヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。このことが個体レベルでの抗ウイルス薬やワクチンの有効性試験を行なう上での障害となっている。この点を克服すべく、HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた C 型肝炎のサロゲート（代用）モデルの開発を試みた。GBV-B の感染性分子クローンより作成したウイルス RNA を、タマリンの肝臓に直接接種したところ、血中ウイルス RNA 量が接種２週後以降有意に上昇し、接種４ゟ６週にピーク値を示した。また接種後約２週～４週で GPT 等肝炎を示す血清生化学値が顕著に上昇した。以上よりタマリン/GBV-B 感染系は C 型肝炎のサロゲートモデルとして有用である可能性が示された。

〔李永仲、柳澤真紀、明里宏文〕

４．サル由来赤痢アメーバのヒト由来株との比較

2000 年～ 2003 年で、2,211 件のサルの糞便を検査し、1 検体で赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）、319 検体で *E.dispar* を検出した。1 検体から分離した *E.histolytica*

について、DNA 配列を決定し、既知のヒト由来 *E. histolytica* 株との比較を行った。SREHP 領域ではアミノ酸レベルでは相同性が認められたが、DNA レベルで大きな差があった。16S-like ribosomal RNA 領域で系統樹を作成し、他の 12 種の Entamoeba 属との比較をした結果、ヒト由来の *E. histolytica* と *E. dispar* との中間に位置することが確認された。
〔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．カニクイザルを用いたハンセン病モデルの開発

幼若カニクイザルにらい菌を接種し、らい菌由来ペプチド（MMP-II、LpK、FAP）に対する末梢リンパ球の幼若化反応と主要リンパ球サブセットレベルの継時的変化を調査した。静脈内接種 2 頭と鼻腔内接種 1 頭で LpK、FAP に対する幼若化反応が誘導された。接種した 6 頭すべてで CD4+/T 細胞の増加と CD16+/NK 減少が認められた。鼻尖端に接種した 2 頭で接種部位の腫脹と活性化リンパ球の有意な増加が認められた。
〔柴田宏昭、向井　徹*、寺尾恵治（*ハンセン病センター)〕

６．カニクイザルを用いた BSE プリオン感染モデルの開発

BSE 発症ウシ脳乳剤を経口および脳内接種したカニクイザルについて継時的に行動解析、記憶能解析、脳波測定を実施した。アップルテストによる両椀の運動機能と指迷路試験による記憶能には経口投与群、脳内接種群のいずれも BSE-P 接種後 5 ヶ月では顕著な変化は見られなかった。一方、経口投与した 1 頭において投与後 3 および 5 ヶ月目に突発性律動波（PSD 様脳波）が観察されたが、BSE-P 感染との関係については不明である
〔小野文子*、寺尾直美、寺尾恵治（*社・予防衛生協会)〕

７．カニクイザルにおける循環器疾患

カニクイザル繁殖コロニーにおける循環器疾患のスクリーニング調査として、超音波診断、レントゲン撮影、心電図検査、心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む血液検査を行ったところ筋性部心室中隔欠損症、三尖弁閉鎖不全、右心拡大、右室二腔症などの疾患が疑われる個体が存在することが確認された。それら疾患の詳細な解析を行うと同時に、異常の認められなかった個体のデータを用いて各種検査の正常値の検索を試みている。
〔揚山直英*、鯉江　洋、小野文子*、山海　直（*社・予防衛生協会)〕

８．アフリカミドリザルにおける循環器疾患

アフリカミドリザルにおける循環器検査として超音波による画像解析、レントゲン撮影、心電図検査、心房性ナトリウム利尿ペプチドを含む血液検査を行い、各種検査値の解析を行った。当センターのアフリカミドリザルコロニーにおいて高率に心筋症の疑い症例を確認したがその詳細な原因については不明である。現在、病理学的検索、MRI・造影検査を含めた多角的な病態の解析を実施している。
〔揚山直英*、鯉江　洋、小野文子*、山海　直（*社・予防衛生協会)〕

９．サル類の高磁場 MRI 検査

サル類における高磁場 MRI 検査方法の樹立を試みた。脳固定装置開発、麻酔法、バイタルサインモニタリング法を樹立する事によって撮像を可能とした。サル種、年齢、体重別に各種撮像を行い、撮像条件の適正化を行うと共に、各種疾患の診断も行った。今後繁殖コロニーの特性を生かし、多様な撮像例数を重ねることにより、年齢別、種別、雌雄別、疾患別の画像データベース構築、サル類の brainmap 樹立を試みる。また、サル類のトレーニング法も含めた機能的 MRI の構築も目指す。
〔揚山直英*、成田勇人*、小野文子*、寺尾恵治（*社・予防衛生協会)〕

10．若年性家族性黄斑変性カニクイザル家系の確立と維持

網膜黄斑変性カニクイザル家系の子孫について黄斑部の眼底検査を実施した結果、第二世代の 14 頭と第三世代の 10 頭に軽度から重度の黄斑変性が認められ、新たに 24 頭（雄 10 頭、雌 14 頭）の発症個体が確認された。第二世代の雌ザルはすべて繁殖能力を有しており、年齢も 10 歳から 13 歳と繁殖適齢期にある。一方で、第三世代の雄ザルは 5 歳未満の個体が大半であり、今後繁殖能力を確認してコロニー維持の核となる雄個体を選抜する予定である。
〔鈴木通弘*、岩田　岳**、寺尾恵治（*社・予防衛生協会、**国立病院東京医療センター)〕

Ⅱ．実験用サル類の臨床病理学的研究

１．顔面、四肢に水疱、痂皮が認められたカニクイザルへの対応

離乳後１ヶ月（６ヶ月齢）のカニクイザルの体重測定時に顔面、四肢に水疱、痂皮が認められ、体重減少、下痢を伴った個体を認めた。白血球減少、CRP 上昇がみられ、水胞の直接塗沫で球菌を認めたので、本個体の隔離と繁殖棟サルの移動禁止を指示した。当該サルの全身状態悪化を認め、伝染性の強いウイルス性疾患の可能性を疑い、本個体の安楽殺を行った。感染病理部による脾臓、肝臓、心臓、肺、腸、腎、皮膚の検査の結果、皮膚の潰瘍性病変に球菌を認めたが、ウイルス性封入体様所見は認められず、常在細菌による日和見感染症と考えられ、サルの移動禁止解除を行った。
〔小野文子*、佐多徹太郎**、冷岡昭雄*、向井鏡三郎、寺尾恵治（*社・予防衛生協会、**感染研・感染病理)〕

Ⅲ. 実験用サル類の免疫学的特性に関する研究

１．カニクイザル MHC クラス I 遺伝子の解析

カニクイザルのクラス I 主要組織適合抗原（MHC クラス I）のタイピング法の確立を目的とし、29 頭の個体から 34 個の独立したクラス IA (Mafa-A)遺伝子座の対立遺伝子塩基配列を決定した。 その結果、14 種の対立遺伝子が明らかになった。また、１～ 3 個の対立遺伝子配列が１個体から得られたので、カニクイザルクラス IA 主要組織適合抗原 Mafa-A 遺伝子座は、アカゲザルと同様に２個あることが推測された。

〔宇田晶彦、棚林　清*、山田靖子、明里宏文、向井鐐三郎、山田章雄*、寺尾恵治（*感染研・獣医科学、**動物管理)〕**

２．カニクイザル ES 細胞から血液系細胞への分化誘導

OP9 細胞をフィーダーとしてカニクイザル ES 細胞を種々のサイトカイン存在下で 6 日間培養した結果、約半数に造血前駆細胞マーカーである CD34 の発現が認められた。一方、正常カニクイザル末梢単核球を反応細胞とした MLR では、未分化 ES 細胞に対する反応は見られなかったが、分化誘導した細胞に対しては幼若化反応が認められた。未分化マーカー SSEA4 を指標とした FACS ソーティングにより 95 %の純度で分化細胞が回収された。

〔柴田宏昭、寺尾恵治〕

３．カニクイザルの末梢 CD4+/CD8+(DP)T 細胞と腸管上皮 DP T 細胞との性状比較

老化に伴い末梢中に出現する DP T 細胞（pDP）の由来を検討するために、代表的な胸腺外分化 DP T 細胞である腸管上皮 T 細胞（IEL/DP）と表現型および TCR レパトリーを比較した。IEL/DP が粘膜組織特異的ホーミングレセプターを発現しているのに対し、pDPは非粘膜特異的ホーミングレセプターを発現していた。さらに、両者のTCRレパトリーが異なっていることから、pDP細胞がIEL/DP細胞に由来する可能性は低いと判断した。

〔李　元雨、柴田宏昭、寺尾恵治〕

Ⅳ. 生殖生理および発生工学的研究

１．室内繁殖コロニーで育成されたカニクイザルの哺育態度に関する統計学的解析

繁殖育成ザルの哺育態度の実際とこれに影響する因子を明らかにするために、メスカニクイザルの哺育データを解析した。その結果、一度良好な哺育態度を示した個体はその後も安定して子を哺育すること、各個体の哺育態度は２産目までに概ね決定することが明らかとなった。また、初産年齢、子の性別、その母ザルの哺育態度がある個体の哺育態度に影響しているという統計学的根拠は見出せなかった。すなわち当センターの個体の哺育態度に最も影響する要因は自身の出産経験であることが示唆された。

〔土田順子、吉田高志、小野孝浩*、山海　直（*社・予防衛生協会)〕

２．カニクザルの早期妊娠診断

当センターのカニクイザルの妊娠診断は交配初日を第 1 日として第 35 日に超音波診断法で実施している。今回、交配の効率化を目的として早期妊娠診断について解析した。第 21 日で 16 妊娠例のうち 12 例（75 %）において胎嚢が確認され妊娠と判定した。第 28 日では 23 妊娠例中 11 例で胎嚢のみ、11 例で胎嚢と胎仔心拍を共に確認し計 22 例（96 %）を妊娠と判定した。確定妊娠診断は第 35 日に実施した。第 28 日で妊娠診断を実施することにより、非妊娠ザルについては 2 月連続で交配することが可能となった。

〔前島正雄*、冷岡昭雄*、小野孝浩*、羽成光二*、山海　直、吉田高志（*社・予防衛生協会)〕

３．アフリカミドリザル精子の凍結保存

アフリカミドリザルにおける発生工学的な基礎研究はほとんどなされていない。サル類精子凍結保存法において TTE を用いた方法がマカク属サル類の定法となっているが、属の異なるアフリカミドリザルでは本法を適用しても融解後に良好な運動性を示す精子が得られない。今回、凍結前処理について検討したところ短時間で実施することにより融解直後に良好な運動性を示す精子を認めた。また、前処理を氷上で行うことで融解後の精子の運動性をより長く維持できることが明らかとなった。

〔岡田浩典、山海　直〕

４．アフリカミドリザルの ES 細胞樹立の試み

アフリカミドリザル ES 細胞株は、新たな付加価値を持つ貴重なリソースとなり得るものと考えられる。３個の拡張胚盤胞から物理的に単離した内部細胞塊部分を FBS あるいは KSR を添加した DMEM を用いて STO 細胞との共培養して ES 細胞株の樹立を試みた。培養 3 日目に伸張したコロニー 1 個が出現した。培養 7 日目に継代して他のサル類 ES 細胞に類似した扁平なコロニーが確認できた。しかし、その後の継代で ES 様細胞は消失した。今回、ES 様細胞を確認できたことにより、ES 細胞の樹立が可能であることが示唆された。

〔下澤律浩、岡田浩典、山海　直〕

５．アフリカミドリザルおよびカニクイザルにおけるグリセリン溶媒を用いた FSH による卵胞発育誘起

サル類の卵胞発育誘起の新規な方法を検討した。オナガザル属アフリカミドリザルおよびマカカ属カニクイザルのメスに FSH を投与した。FSH は徐放性に作用させるために 50 %グリセリンを溶媒に用いた。その後 hCG 投与を経て卵を採取した。カニクイザルにおいてはグリセリンを溶媒に用いることで良好な成熟卵の採取成績を

得た。しかし、アフリカミドリザルでは通常の方法を用いた場合と顕著な差は認められなかった。投与するホルモンに対する反応性が二つの属間で異なることが示唆された。
〔下澤律浩・岡田浩典・吉田高志・山海　直〕

６．アフリカミドリザルにおける顕微授精

医学研究や野生サル類の維持増殖にも期待ができることからアフリカミドリザルにおける顕微授精について検討した。ピエゾパルスを利用して、直腸電気刺激法により採取した精子あるいは尾部を切断した精子頭部のみを成熟卵の細胞質に注入した。精子あるいは精子頭部のみの注入で受精成績に差はなく高率に受精が確認され精子頭部が卵活性化能を有していることが示された。また、作出した 33 個の受精卵は、6 個（18.2%）の拡張胚盤胞に発生した。アフリカミドリザルにおける顕微授精による受精卵の作出および体外培養に初めて成功した。
〔下澤律浩・岡田浩典・吉田高志・山海　直〕

７．Percoll を用いた多数のマウス受精卵の収集法

研究を遂行する過程で卵以外の細胞をすべて除去しつつ多数の卵を同時期に準備する必要があった。従来の手作業で卵のみを多数収集することは操作に長時間を要してしまい、卵の性状が変わることが懸念される。そこで、迅速かつ簡便に多数の卵を収集する方法を検討した。卵細胞、透明帯、他の体細胞等の比重を考慮して検討した結果、透明帯の比重が小さいことが明らかとなり、この性質を利用して卵を他の細胞と明確に分離することができ、同時に速やかに多数の卵を回収することが可能になった。
〔岡田浩典・山海　直〕

８．交流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。今年度は 20 分間の交流磁場暴露が精子に及ぼす影響について検討した。実験にはモルモット精子を用い、磁場暴露は交流磁場発生装置内で実施した。その結果、通常の培養のみでは先体反応が誘起されない条件下の精子を交流磁場に暴露することで先体反応が誘起された精子を確認することができた。交流磁場という刺激が精子内のカルシウムの動きに影響をあたえ先体反応が誘起された可能性が考えられた。
〔山海　直・下澤律浩・岡田浩典・羽鳥真功・岡田詔子*（*東邦大）〕

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

１．欧文発表

1）TanabayashiK,MukaiR,YamadaA,TakasakiT, KuraneI,YamaokaM,TerazawaA,KonishiE,: Immunogenicity of a Japanese Encephalitis DNA vaccine candidate incynomolgus monkeys. accine, 21:2338-4,2003.

2）Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K,Yamada A,: Identificationofanaminoacidresponsibleforthe CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). JMedPrimatol,32(2): 105-10,2003.

3）Uda A, Tanabayashi K, Mukai R, Terao K,Yamada A,: Detection of CD3epsilon polymorphism in cynomolgus monkeys by a method based on RFLP.J Med Primatol, 33: 34-7,2004.

4）FujitaM,YoshidaA,SakuraiA,TatsukiJ,UenoF, AkariH,AdachiA:SusceptibilityofHVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells tovariousstrainsandmutantsof HIV/SIV. IntntlJMolMed11:641-644,2003.

5）BourSP,AkariH,MiyagiE,StrebelK:Naturally-occurringaminoacidsubstitutionsintheHIV-2ROD envelopeglycoproteinregulateitsabilitytoaugment viral particle release. Virol309:85-98,2003.

6）Ueno F, Shiota H, Miyaura M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J,Koyama AH, Akari H, Adachi A, Fujita M: Vpx andVprproteinsofhumanimmunodeficiencyvirustype2 up-regulatetheviralinfectivitybyadistinctmechanismin lymphocytic cells. Microb. andInf.5:387-395,2003.

7）Villinger,F.,MayneA.F.,BostikP.,MoriK.,JensenP. E.,AhmedR.andAnsari,A:Evidenceforantibody mediatedenhancementofSIVgagantigenprocessingand crosspresentationinSIVinfectedrhesusmacaques. JVirol.77:10-24.2003.

8）XingH.Q,Moritoyo.T,Mori.K,Tadakuma.K,Sugimoto.C, Ono.F,Hayakawa.H,Izumo.S:Simianimmunodeficiency virus encephalitis inthewhitematteranddegenerationofthe cerebralcortexoccurindependentlyinsimian immunodeficiencyvirus-infectedmonkey.J.Neurovirol. 9:508-518.2003.

9）Sugimoto.C,Tadakuma.K,Otani.I,MoritoyoT,Akari.H, Ono.F,Yoshikawa.Y,Sata.T,Izumo.S, andMori.K : *Nef* geneisrequiredforrobustproductiveinfectionof Simian Immunodeficiency Virus In T-cell-rich paracortex in lymphnodes.JVirol.77:4169-4180.2003.

10）Ansari.AA, Mayne.AE,Onlamoon.N,Pattanapanyasat.K Mori.K, and Villinger.F : Use of recombinant cytokines for optimized inductionofantiviral immunity against SIV inthe nonhumanprimatemodelofhumanAIDS.Immunol.

Res.29:1-18.2004.
11) Lun.W-H, Takeda.A,Nakamura.H,Kano.M,Mori.K, Sata.T,Nagai.Y andMatano.T:Lossofvirus-specific CD4+Tcellswithincreases in viral loads in the chronic phase aftervaccine-basedpartialcontrolofprimarysimian immunodeficiencyvirusreplicationinmacaques. JGenVirol.85:1955-1963.2004.
12) Matano.T,Kobayashi.M,garashi.H,Takeda.A, Nakamura.H,Kano.M,Sugimoto.C,Mori.K,Iida.A, Hirata.T, Hasegawa.M,Yuasa.T,Miyazawa.M, Takahashi.Y,Yasunami.M,Kimura.A,O'Connor.D.H , Watkins.D.I, and Nagai.Y : Cytotoxic T Lymphocyte based Control of Simian Immunodeficiency Virus Replication in a PreclinicalAIDS VaccineTrial. J.Exp.Med.199: 1709-1718.2004.
13) ShimizuY,SuzukiJ,TeraoK,IshidaT. In vitroaging ofmacaqueadherentcells: similar patternofcellularaging between human and macaque. Mech Ageing Dev. 124(2) :237-44.2003.
14) Nagashima T, Ueda Y, HanazonoY, Kume A, Shibata H,AgeyamaN,TeraoK,OzawaK,HasegawaM: New selective amplifier genescontaining c-Mplfor hematopoietic cellexpansion. BiochemBiophysResCommun.28;303(1) :170-176.2003.
15) Ageyama N,KimikawaM,EguchiK,OnoF,ShibataH, Yoshikawa Y, Terao K: Modification of the leukapheresis procedureforuseinrhesusmonkeys (*Macacamulata*). JClinApheresis.18(1):26-31.2003.
16) Lee WW,NamKH.,TeraoK.andYoshikawaY.: Age-related increaseofperipheral CD4+/CD8+ double positive (DP) Tlymphocytesinthecynomolgusmonkey: longitudinal studyinrelationtothymicinvolution. Immunology,109(2):217-225.2003
17) Suzuki MT,Terao K,andYoshikawaY: Familial early onset macular degenerationincynomolgusmonkeys (*Macaca fascicularis*). Primates.44(3):291-294.2003.
18) KiriiY,InoueT,YoshinoK,KayagakiN,YagitaH, Okumura K, Shibata H, Yoshikawa Y, Terao K.: Molecular cloning,functionalcharacterization,andenzyme-linked immunosorbentassay of cynomolgus monkey Fas ligand. JImmunolMethods.1;278(1-2):201-209.2003.
19) Lee WW,NamKH,TeraoK.andYoshikawaY: Possible role of genetic factor(s) on age-related increase of peripheralCD4+CD8+ double positiveT cells in cynomolgusmonkeys. Exp Anim.,52(4): 309-316.2003.
20) Shibata H,HanazonoY,AgeyamaN,NagashimaT, UedaY,Hasegawa M,OzawaK,YoshikawaY,TeraoK: Collection and analysisofhematopoieticprogenitorcells fromcynomolgusmacaques (*Macacafascicularis*): Assessmentofcross-reactingmonoclonalantibodies. AmJPrimatol.61(1):3-12.2003.
21) Watanabe K,WatanabeR,ShiodaA,MizoguchiK, Sugimoto T and Terao K: Investigation of the mechanism of drug-inducedautoimmune hemolyticanemiain cynomolgusmonkeys elicitedbyarepeated-doseofa humanizedmonoclonalantibodydrug. JToxicologicalSci.,28:123-138,2003.
22) AsanoT,Ageyama N,TakeuchiK,MomoedaM, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y,Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, HasegawaM,Ookawara S,HariiK,TeraoK,OzawaK, HanazonoY:Engraftmentandtumorformationafter allogeneicinuterotransplantationofprimate embryonic stemcells.Transplantation.15;76(7):1061-1067.2003.
23) OmatsuT,IshiY,KyuwaS,MilandaEG,TeraoK.and Yoshikawa Y: Molecular evolution inferredfrom immunologicalcross-reactivity of immunoglobulinGamong chiropteraandcloselyrelatedspecies. ExpAnim.,52(5): 425-428.2003.
24) OgonukiN,Tsuchiya H,HiroseY,OkadaH, OguraA, SankaiT:Pregnancybythetubaltransferofembryos developed after injectionofroundspermatidsintooocyte cytoplasmofthe cynomolgus monkey (*Macacafascicularis*) Human Reproduction18,1273-1280,2003.
25) OkadaH,HiroseY,ItoMasao,SankaiT: Aspiration method to collectepithelialcellsfrom mouse,rat,and monkeyoviducts. ComparativeTopics in Laboratory Animal Science42,46-51,2003.
26) TutidaJ,KawasakiK,SankaiT,KuboN,TeraoK, KoyamaT,MakinoJ.andYoshikawaY: Newtype of puzzle-task finger maze learning in *Macaca fascicularis*. Int Primatol.,24:261-270.2003.
27) Shimozawa N, Tajima S, Azuma N, Hioki K, Kono T, Ito M: Histological study of the hypertrophic placentas and open eyelids observed in cloned fetuses. J. Reprod. Dev., 49:221-226.2003.
28) OgawaH,OnoY,ShimozawaN,SotomaruY, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M, Kono T: Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. Reproduction.126:549-557.2003.
29) OkadaH,Hirose Y,PeriyasamyM,MasaoItoM, SankaiT:Zona-froatmethodforseparatingmouseeggsfrom othercells.Exp.Anim.,inpress
30) Miyamoto S, Chen Y, Nakamura S, SankaiT,Machida T,YoshidaT: Synthesis andreleaseofsteroidsin intestines revealedbydetectionofandrostenedione, testosterone, 5á-dihydrotestosterone,andanunidentified substance in intestinal tissuesandcontentsfromcynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). oological Science, in press

２．和文発表

なし

Ⅱ．学会発表

１．国際学会

1）FujitaM,SakuraiA,YoshidaA,AkariH,AdachiA: Proteasome-degradation of HIV-1 Vif: Mutational analysis. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA.May20-25, 2003.

2）Sugimoto.C,Shioda.T,Yasutomi.Y,Yamamoto.N, Nagai.Y, andMori.K:Propertiesofaquintuple deglycosylatedSIVmac239mutantasanovelattenuated SIV.21th annualsymposium onnonhumanprimatemodels forAIDS,October,2003,Seattle,USA.

3）Sugimoto.C,Ohgimoto.S,Kusakawa.S,Takebe.Y, Shioda.T, Nagai.Y,andMori.K:InfluenceofDeglycosylation onefficacyof Env based vaccine.21th annual symposium on nonhuman primate models forAIDS, October, 2003,Seattle, USA.

4）Sankai T,: Reproductive physiology of female monkeys WorkshopII「Genitals」8thInternationalWorkshopof PrimateDiseases（Tsukuba）December,2003.

5）Tsuchida J,KawasakiK,SankaiT,KuboN,TeraoK, Koyama T, Makino J,Yoshikawa Y:inger maze learning in long-tailedmacaques 8th International Workshop of Primate Diseases（Tsukuba）December,2003.

6）HanazonoY,AsanoT,AgeyamaN,TakeuchiK, MomoedaM,KitanoK,Suzuki Y,ToriiR,TeraoK,and Ozawa K.,,Engraftmentandteratoma formation after allogeneic inuterotransplantationofnonhumanprimate embryonic stemcells. The 1st International SocietyforStem Cell Research(ISSCR).June8 to11,2003,WashingtonDC.

２．国内学会

1）李永伸、吉川泰弘、明里宏文：HIV-1Vif 蛋白の機能ドメイン解析. 第51回日本ウイルス学会（京都）2003年10月

2）原　正幸、明里宏文、棚林　清、山田章雄、佐多徹太郎、向井鎌三郎： 新型 SRV/D の分離同定とウイルス検出法の確立　第51回日本ウイルス学会（京都）2003年10月

3）中山大介、三隅将吾、高宗暢暁、向井鎌三郎、橘園臣、梅田衛、本田徹朗、庄司省三： CCR5-CXCR4 キメラ環状抗原免疫カニクイザルより得られた抗血清の clade の異なる種々ウイルス感染に対する効果　第51回日本ウイルス学会（京都）2003年10月

4）杉本智恵、保富康宏、塩田達雄、山本直樹、永井美之、森　一泰： 糖鎖欠損変異 SIV の新規 attenuatedvirus としての性質　第17回日本エイズ学会(神戸)2003年11月

5）森　一泰、杉本智恵、中山英美、塩田達雄、草川茂、武部豊、保富康宏、永井美之： Envエイズワクチンにおける糖鎖の重要性　第17回日本エイズ学会(神戸)2003年11月

6）吉岡徹、揚山直英、柴田宏昭、安隆則、上田享司、竹内公一、松井圭司、山本啓二、田畑寿晃、上田泰次、長谷川護、大河原重雄、寺尾恵治、島田和幸、池田宇一、小澤敬也、花園豊: 自己 $CD34^{+}$細胞移植による血管新生療法：霊長類心筋梗塞モデルを用いた遺伝子標識研究 第65回日本血液学会(大阪)8月25日～31日　2003年.

7）上田享司、花園　豊、柴田宏昭、揚山直英、長島建之、田畑寿晃、上田泰次、久米晃啓、池原　進、長谷川護、寺尾恵治、小澤敬也、霊長類を用いた造血幹細胞遺伝子治療法の開発：選択的増幅遺伝子と骨髄内移植法よる移植前処置の回避。第65回日本血液学会(大阪)8月25日～31日　2003年.

8）Yoshioka T, Matsui K, Yasu T, Yamamoto K,Ageyama N,ShibataH,Suzuki C,MurakamiY,TakahashiM, Misawa Y, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y, Shimada K, IkedaU. Few Transplanted BoneMarrowCD34+Cells Become EndothelialandMyocardialCellsinIschemic Myocardium in Nonhuman Primates 第68回日本循環器学会総会 2004年3月

9）HanazonoY,AsanoT,AgeyamaN,TakeuchiK, MomoedaM,KitanoY,SasakiK,UedaY,SuzukiY, Kondo Y,ToriiR,OokawaraS, Hasegawa M,Terao K, and OzawaK.Engraftmentandteratoma formation after allogeneic in utero transplantation of gene-modified primate embryonicstem cells.The8thAnnual Meetingofthe Japanese Societyof Gene Therapy,July 18-20,2003, Tokyo

10）Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Ueda K, TakeuchiK,MatsuiK,YamamotoK,TabataT,UedaY, HasegawaM,OokawaraS,TeraoK,ShimadaK,IkedaU, OzawaK,andHanazonoY: Transplantation and invivo follow upoflentivirallytransducedCD34+cellsina nonhumanprimate myocardialinfarctionmodel.The8th AnnualMeetingoftheJapaneseSocietyofGeneTherapy, July18-20,2003,Tokyo

11）UedaK,HanazonoY,ShibataH,AgeyamaN, Nagashima N,TabataT,UedaY,KumeA,IkeharaS, Hasegawa M, Terao K, and Ozawa K. A novel method of hematopoietic stem cell gene therapy without conditioning: theintra-bone marrow transplantationwiththeselective amplifier gene in primates. The 8th Annual Meeting ofthe Japanese Societyof Gene Therapy,July 18-20,2003, Tokyo

12）YonemitsuY,TeraoK,OnoF,KuwaharaT,IidaA, HaraH,Iwasaki H,Hasegawa M andSueishi1K. Preclinicalsafetystudy(acute toxicityandbiodistribution)

forintramuscularadministrationofF-defective, non-transmissible recombinant Sendaivirusvector expressinghuman FGF-2using non-human Primate. The 8th AnnualMeetingoftheJapaneseSocietyofGeneTherapy, July18-20,2003,Tokyo

13）UedaY,NagashimaT,HanazonoY,AgeyamaN, Kume A, Terao K,OzawaK and Hasegawa M.Expansion ofgene-modifiedhematopoietic cellsbysecondgeneration selectiveamplifiergenes **(SAGs)** intheSecondary Transplanted Mice. The 8th AnnualMeeting oftheJapanese SocietyofGeneTherapy,July18-20,2003,Tokyo

14）MizukamiH,MimuroJ, Ogura T,OnoF,KobayashiE, MuramatsuS,MadoiwaS,MatsushitaT,OkadaT, HanazonoY,KumeA,TeraoK, SakataYandOzawaK., Serotypes of AAV vectors: muscle-derected expressionof humancoagulationfactorIXincynomolgusmonkeys.The 8thAnnualMeetingoftheJapaneseSocietyofGene Therapy,July18-20,2003,Tokyo

15）山海　直： サル類における発生工学的基盤技術の開発とその展望 発生工学用マニピュレーション技術研究会（岡崎国立共同研究機構・生理学研究所）2003年4月

16）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4月

17）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： マウスおよびウサギの体細胞核移植由来胚からの ES **様細胞の樹立 シンポジウム/フィールドトピックス** II「ES **細胞の樹立と利用」第50回日本実験動物学会（大宮）2003年5月**

18）岡田浩典、広瀬良宏、宇田晶彦、伊藤雅夫、山海　直： カニクイザル卵管上皮細胞の不死化細胞株の樹立とその特性　シンポジウム/フィールドトピックス IX **「サル類の繁殖と発生工学」第50回日本実験動物学会（大宮）2003年5月**

19）山海　直：　サル類における発生工学の展開　シンポジウム発生工学の進歩と生殖医療の今後 第44回哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月

20）岡田浩典、広瀬良宏、伊藤雅夫、山海　直： Percoll **を用いた多数のマウス受精卵の収集法　第44回日本哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月**

21）広瀬良宏、岡田浩典、山海　直：　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株の樹立とその有用性　第44回日本哺乳動物卵子学会（東京）2003年5月

22）川崎勝義、神谷　誠、山海　直、小山高正、寺尾恵治、吉川泰弘、黒田洋一郎：　画像差分を応用したオープンフィールド行動の自動解析法　第9回画像センシンクシンポジウム（横浜）2003年6月

23）越後貫成美、井上貴美子、三木洋美、広瀬良宏、岡田浩典、竹入修二、山海　直、小倉淳郎：　ウサギ精子および精子細胞の卵子活性化能についての再検討 第96回日本繁殖生物学会（帯広）2003年9月

24）YoshiokaT,MatsuiK,YasuT,YamamotoK,Ageyama N,ShibataH,Suzuki C,MurakamiY,TakahashiM, Misawa Y, Terao K, Ozawa K, Hanazono Y, Shimada K, IkedaU. Few Transplanted BoneMarrowCD34+Cells Become EndothelialandMyocardialCellsinIschemic Myocardium in Nonhuman Primates **第68回日本循環器学会総会 2004年3月**

２４．ハンセン病研究センター

センター長　松尾英一

概要

ハンセン病だけについて見れば現代特に 20 世紀半ばから現在まではプロミンの有効性実証から多剤療法完成により、それまで数千年間、人類がなしえなかった本疾患の化学療法が可能となった偉大な時代である事は論を待たない。では、人類はさらに偉大な時代を期待出来るだろうか？ちなみに本疾患に残された大問題が後遺症克服と新患抑制である事は少なくとも本疾患医療関係者の多くから諒解されるであろう。よってそれらはまさに本研究センターの存在意義の中核をなすのである。

ハンセン病の化学療法の歴史を振りかえってみるとその成功にはそれを可能にした文化圏、国家、民族などに成功への道筋が準備されていた事がわかる。現在、多菌型の本疾患に対して用いられる多剤療法を構成する３剤のうち２剤はスルフォン剤である。それらは羊毛染色剤から発した化学工業の歴史と無関係ではない。また、化学療法剤として最初に用いられたスルフォン剤である赤色プロントジルは合成後 30 年近く放置された後にその抗菌作用がわかったものである。よってこの成功の背景は中世以後のヨーロッパの歴史、文化圏の共通習慣、同地の、特に近代ドイツ連邦の国家政策であったことが分かる。

翻って我が国にそれらに匹敵する背景があるだろうか？ 世界的な本疾患の権威の所感は明白に肯定的なものである。それは近代科学技術と知識の普及が本疾患流行期と時を同じくしたのはむしろわが国であり、近世ヨーロッパは上記知識普及の時代、すでに本疾患流行が終わっていたというのがその理由である。米国でスルフォン剤からの誘導体としてプロミンが合成された当時、米国で若干の州ではわが国とは比較にならないにしてもまだ本疾患流行期を脱していなかったことも上記の裏付けとの解釈である。

以上を勘案するとわが国の近、現代並びに将来の本疾患関連の科学、技術、医療とその政策に関する科学的で核心をついた研究結果は、わが国が国是とする国際貢献のあり方にも重要な方向性を与える可能性を秘めているといえよう。 しかしそれは上記の如くわが国の歴史的経験を無駄にせず、さらに発展させる事が前提となる。その意味では平成 8 年らい予防法廃止の際、参議院厚生委員会における「らい予防法の廃止に関する法律案に対する附帯決議」で、ハンセン病治療に関して医療関係者への専門知識の普及を図ることと並び「一般市民に対して、また学校教育の中でハンセン病に関する正しい知識の普及啓発に努め、ハンセン病に対する差別や偏見の解消についてさらに一層の努力をすること」が盛込まれた事は重要な意義があるし、その後の本疾患啓発活動に大きな影響を与えている。本研究センターの事業もまたその決議によって裏打ちされたものであり、当センター職員にその責任が課せられていることは明白である。

以上を踏まえた当センターでの事業、人事、交流の概況を以下本項で紹介するが当センターで調査、研究並びにレファレンス業務を担当する病原微生物並びに生体防御両研究部の業績概要は本報告書において個別に紹介のとおりである。

なお平成１６年３月３１日をもって、松尾英一は退職し、後任としてウイルス第２部長宮村達男が就任する。

国内関係事業

1. 第 26 回ハンセン病医学夏期大学講座を医療関係者に対して開講（8 月 18－22 日）。参加者数は、５４名（うち医学部学生・研修医が１２名）、医学コースに実験を取り入れ基礎から臨床を網羅的かつ統括的に講義・実習を行い、看護コースも設けた。実行委員はセンター、多磨全生園、全療協、入所者自治会で構成。スタッフは約５０名。
2. 国立療養所多磨全生園の看護師に講義、研修（5 月 9 日、11 月 10 日、1 月 19 日）
3. 国際ハンセン病対策実行委員会出席（松尾センター長、6 月 26 日、2 月 9 日）
4. 国際保健協力フィールドワークフェローシップ企画委員会に出席（松尾センター長、6 月 13 日、2 月 23 日）、並びに講義（同、於多磨全生園、8 月 8 日）。
5. 全国国立ハンセン病療養所施設長協議会に出席（松尾センター長、4 月 24 日、6 月 17 日、10 月 29 日、2 月 4 日）
6. 財団法人日弁連法務研究財団が実施する「ハンセン病問題に関する事実検証調査事業」のハンセン病問題検証会議による胎児剖検例に関して調査協力（12 月 8 日）。
7. 行政検査とらい菌の供給は後記
8. ハンセン病研究センター運営委員会
（於厚生労働省、８月４日）

国際協力事業

１．ハンセン病の治療及び予防の実践研修（JICA 研修）
平成 15 年 4～12 月までの 9 ヶ月間インドネシア、 マレーシア、ミャンマー、タイ、ヴェトナムからの研修生を受入れた。帰国後、上記各国の行政機関並びに医療機関等で活躍している。

２．国際共同研究と職員の海外派遣状況
ヴェトナム　　血液診断の技術的技法及び薬剤耐用性菌の発生状況等についての共同研究のため職員 4 名派遣。

３．国外からの主な視察受け入れ
平成 15 年 11 月 3 日 ハンセン病専門医、研究者、支援団体役員として中国広東省広州市 漢達康福協会（ハンダリハビリテーション協会）のメンバーのうち、 名誉会長楊理合教授 （Dr. Yang Lihe)、同事務局長　陳志強

医師 （Dr. Micheal Chen） 、同湖北省支部長 馬鉄喜氏 (Mr. Ma Tiexi)が来所、視察並びに当方との意見交換を行った。

行政検査実績

（石井則久）

平成９年７月からハンセン病検査要項が施行され、ハンセン病研究センターで行政検査が実施されている。検査項目は、病理学的検査、血清抗体価(抗 PGL-I 抗体)検査、PCR 検査、薬剤耐性遺伝子検査である。

平成 15 年度（平成 15 年４月ー平成 16 月３月）の検査件数は表のごとく 27 症例、54 検査件数であった。１症例で複数回依頼（経過観察や異なる検査内容など）されるものもあった。また１回（１症例）の検査で複数の検査項目の依頼もあった。ハンセン病診断には複数の検査が推奨されており、各医療機関で実施できない検査が当センターに依頼されるため、依頼検査項目に差異が生じている。今年度は薬剤耐性遺伝子の検査依頼はなかった。最終的に新規にハンセン病と診断されたものは６例であった。

検査件数は増加傾向{平成９年度：47 件、平成 10 年度：32 件、平成 11 年度：34 件、平成 12 年度：50 件、平成 13 年度：739 件(国療ハンセン病療養所から 630 件の血清検査の依頼があった)、平成 14 年度：261 件(国療ハンセン病療養所から 105 件の血清検査の依頼があった)}にあったが、平成 15 年度は減少した。平成 15 年度の減少の理由は、ハンセン病新規患者数の減少と、ハンセン病療養所内で病状把握のため血清抗体価測定検査が減少した事による。ハンセン病新規患者数は毎年 14 名程度あるが、平成 15 年では８名であった。

ハンセン病の発生動向と検査件数を対比すると、検査の需要があるにも関わらず、行政検査がまだ十分に利用されていない可能性もある。

今後の課題として、行政検査の各医療機関への周知徹底、検査依頼の簡素化、検体送付の迅速化、検査結果の迅速通知、臨床症状を把握したうえでの検査の指導、皮膚スメア検査の指導、知覚検査の指導、治療効果判定への検査利用、検査結果を基にしたコンサルテーション、追跡検査などがあり、患者・主治医に一層有益な検査のあり方が求められている。

平成 15 年度（2003 年度）行政検査実績

年度	2003
年度	平成15
登録検査番号	27
総検査件数	54
病理学的検査件数	13
血清抗体価検査件数	21
PCR検査件数	20
薬剤耐性遺伝子検査件数	0
実症例数	23

らい菌の供給

（松岡正典・天内肇）

平成 15 年４月より同 16 年３月までの間において、表に示すように、のべ 34 回、85 匹、 6 施設、11 名の研究者に対し、らい菌感染ヌードマウス足蹠の供給を行った。

らい菌感染ヌードマウス足蹠の分与
（平成 15 年４月より平成１６年３月）

Ｎｏ.	年月日	分与先		マウス匹数
	平成 15 年			
１）	4.2	儀同	ハンセン研	2
２）	4.21	天児	九州大	3
３）	4.23	天児	九州大	2
４）	5.1	福富	ハンセン研	5
５）	5.14	山崎	ハンセン研	2
６）	5.14	福富	ハンセン研	1
７）	5.16	牧野	ハンセン研	1
８）	6.10	山崎	ハンセン研	3
９）	6.10	福富	ハンセン研	1
１０）	6.16	天児	九州大	1
１１）	6.25	儀同	ハンセン研	1
１２）	7.14	牧野	ハンセン研	1
１３）	7.31	儀同	ハンセン研	2
１３）	8.1	牧野	ハンセン研	1
１４）	8.4	天児	九州大	2
１５）	8.14	与儀	ハンセン研	2
１６）	8.15	与儀	ハンセン研	2
１７）	9.2	与儀	ハンセン研	1
１８）	9.8	天児	九州大	1
１９）	9.10	牧野	ハンセン研	3
２０）	9.16	Ranjit C.	Ananban leprosy Hospital (ネパール)	5 (DNA)
２１）	9.22	Chae G.-T.	Catholic Uni. (韓国)	10 (DNA)
２２）	10.6	向井	ハンセン研	6
２３）	10.15	向井	ハンセン研	2

Ｎｏ.	年月日	分与先		マウス匹数
	平成15年			
２４）	10.20	向井	ハンセン研	2
２５）	10.20	天児	(九州大)	2
２６）	10.22	鈴木	ハンセン研	3
２７）	10.22	儀同	ハンセン研	2
２８）	10.27	Azlan N.	National Health Lab. (マレーシア)	5 (DNA)
２８）	11.9	牧野	ハンセン研	2
２９）	11.9	藤村	北里大	2
３０）	12.2	牧野	ハンセン研	2
３１）	12.15	牧野	ハンセン研	1
	平成15年			
３２）	1.6	牧野	ハンセン研	1
３３）	1.19	天児	(九州大)	2
３４）	3.13	牧野	ハンセン研	1

２４．ハンセン病研究センター
（ｉ）病原微生物部

部　長　　牧　野　正　彦

概　要

WHO の多剤併用療法の導入により、ハンセン病登録患者数は激減した。しかし、今尚毎年数十万人の新患患者が発症し、かつハンセン病に係る基本的科学的解明は未解決のまま取り残されている。主な問題点は、①ワクチンが存在しないこと、②感染経路が同定されていないこと、③末梢神経障害の発症機構が確立されていないこと、④薬剤耐性菌の簡便かつ網羅的同定法が確立されていないこと等が挙げられる。当部では、昨年に引き続きこれらの問題の解明に努めた。

少菌型ハンセン病患者では、宿主免疫担当細胞がらい菌抗原を認識し、強い細胞性免疫を誘導し病変を軽症化させる。少菌型患者 T 細胞が認識する抗原は新しいワクチンとなり得ると想定し、Major Membrane Protein-II (MMP-II)を見出した。今後ワクチンとしての有効性の検討が待たれる。当部において発見したらい菌由来リポタンパク（LpK）の免疫学的解析も発展させ、LpK を構成する脂質とタンパクは、細胞上の異なるレセプターに結合し、協調的に作用し強い自然免疫および獲得免疫反応を惹起することを明らかにした。今後ワクチンの開発を遂行する上で重要な知見である。

ハンセン病の感染経路の解明には、分子疫学的技法を駆使する必要があり、そのためにはそれぞれの菌を分子生物学的に識別しなければならない。従来、らい菌は多様性に乏しく、各臨床分離株間の相違を見出すことは難しいとされてきた。しかし、らい菌ゲノム DNA のタンデムリピートに着目すると、分離株間でリピートのコピー数に差が存在することを明らかにした。これらを利用すると、感染経路の解明・ハンセン病の発症機構の解明が容易になると期待される。らい菌の全ゲノム解析が行われ、らい菌の分子生物学的分野は急速に発展すると期待されている。しかし、機能が不明な遺伝子が多数存在し、これらの解析が急がれるところである。そこで、発育の速い非病原性抗酸菌を利用し、らい菌遺伝子の機能解析を試みている。その第一のステップとして、非病原性菌の特定の遺伝子を破壊することで、それぞれの遺伝子の役割を検討している。将来的には遺伝子破壊株にらい菌の対応遺伝子を挿入することで、らい菌遺伝子の機能が明らかになると予想される。

末梢神経障害の発症機構の解明のため、離乳時カニクイザルにらい菌を種々のルートから接種し、ハンセン病の発症の有無を検討するとともに、新生仔サルよりシュワン細胞を分離・株化して、らい菌感受性を検討している。シュワン細胞は、らい菌抗原を細胞表面に発現したが、未だアポトーシスの誘導にまでは至っておらず今後の研究が急がれる。

非結核性抗酸菌症の研究は、診断に主眼を置いて展開している。これまでに有用性を確認した新たなターゲット遺伝子 *dna*A を用い、また抗酸菌感染症は発展途上国に多いことなどを鑑み、より短時間に、かつ高価な機械を用いず遺伝子診断する方法を開発している。特に、LAMP 法に着目し、臨床上問題になりやすい非結核性抗酸菌を中心に取り組んでいる。

施設整備に関しては、平成 14 年度に獲得した補正予算により、二次元電気泳動システム、画像解析装置、ゲルスポット採取装置、質量分析装置、定量 PCR 装置、タンパク分取装置を導入した。本装置により、感染の場で発現変化する抗酸菌タンパク質をプロテオーム解析手法により網羅的、経時的に分析することが可能となった。さらに、質量分析装置を用い抗酸菌菌壁に特徴的に存在する糖脂質等の成分分析も可能となった。病態解明あるいは新しい治療法および予防法の開発に繋がるものと期待される。

最後に人事関係であるが、4 月 1 日よりヒューマンサイエンス財団より、稲垣勝也が流動研究員として入所し、3 月 31 日には第一研究室研究員武下文彦が退職した。

研 究 業 績

Ⅰ．抗酸菌の病原性因子と病変発症機構に関する研究

1. 抗酸菌 Fibronectin-attachment protein (FAP)の生理学的解析

抗酸菌における FAP の生理学的機能を明らかにするため、*M. smegmatis* の FAP 遺伝子破壊株の作製及びその解析を行った。相同組み換え法により取得した破壊株は増殖過程において野生株に比べ強く凝集する形態を示し、さらに脂質の構成、構造に変化を生じないまま表層の疎

水性が増加していた。これらのことから FAP は抗酸菌が持つ脂質と同様に、その表層構造に影響を与える因子の一つであることが示唆された。

[宮本友司、向井　徹、武下文彦、中田　登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦]

2. 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs)糖転移酵素遺伝子の解析

M. smegmatis の GPLs 糖転移酵素をコードすると予測される遺伝子の破壊株の作製及びその解析を行った。温度感受性ファージシステムにより染色体上の 4 種の GPLs 糖転移酵素候補遺伝子の破壊株を取得した。各破壊株より抽出した GPLs を TLC、MALDI-TOF/MS 及び GC/MS により解析した結果、4 種の内 3 種の遺伝子破壊株由来 GPLs の構造変化が認められ、これらの遺伝子が GPLs 生合成における糖転移に関与することが判明した。

[宮本友司、向井　徹、中田　登、甲斐雅規、中　崇(BCG 中央研究所)、矢野郁也(BCG 中央研究所)、牧野正彦]

3. らい菌２成分情報伝達系の解析

らい菌２成分情報伝達系 SenX3-RegX3 の機能解析を試み、これまでに第２成分 RegX3 が機能していないことがわかり、原因として RegX3 遺伝子上流部分の欠失のためであることを示した。今回第１成分 SenX3 のプロモーター活性を調べるためらい菌及び結核菌よりプロモーター領域をクローニングし lacZ 遺伝子と結合し発色で比較した結果、両者でほぼ同等の活性が観察された。さらにらい菌 SenX3-RegX3 領域を上記プロモーター活性測定用プラスミドにクローニングし同様に測定したところ活性が上昇したことかららい菌 SenX3-RegX3 はオートレギュレーションする可能性が示された。

[甲斐雅規、P. J. Brennan (コロラド州立大学)、牧野正彦]

4. らい菌に発現する遺伝子の網羅的解析に関する研究

らい菌ゲノムの塩基配列が明らかになったが、実際に発現する遺伝子の詳細については不明な点が多い。そこで、マクロファージ感染前後のらい菌からmRNAを調整し、^{33}P標識cDNAプローブとして、らい菌ゲノム全域をカバーするライブラリーから調整したDNAをスポットしたナイロン膜とハイブリダイズすることにより、発現遺伝子の網羅的解析を試みた。その結果、遺伝子とされているものでも、mRNAとして発現が確認され、何らかの機能を担っている可能性が示唆された。

[鈴木幸一、中田　登、牧野正彦]

5. らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討

らい菌ゲノム DNA の株間における差異についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、らい菌 Thai53 株ゲノム DNA のタンデムリピート 37 箇所についてコピー数を決定し既報の TN 株のゲノム DNA 配列と比較した結果、19 箇所で相違が見られた。このうち 4 箇所について世界各地から得られた臨床分離株 31 株で比較したところ、従来の方法では分類不可能な分離株も分類可能であった。これらゲノム間の差異はハンセン病疫学調査のための型別分類に有用であるとともに、遺伝子機能を探る上でも重要であると考えられる。

[中田　登、松岡正典(生体防御部)、甲斐雅規、鈴木幸一、牧野正彦]

6. 抗酸菌の排除と細胞内寄生に関わる因子に関する研究

抗酸菌感染マクロファージにおいては、菌の排除を行おうとする自然免疫能が活性化されると同時に、菌のファゴゾーム内潜伏を許容するような細胞反応も惹起される。これらの相反する細胞反応のバランスが、持続感染と治癒という予後決定に重要である可能性を想定し、抗酸菌感染後の自然免疫反応に重要な因子である TLR 2 と菌の細胞内寄生に重要な因子である TACO の相互関係について検討を行った。その結果、TACO の存在は TLR2 シグナルに抑制的に働き、TLR2 刺激は TACO 発現量を抑制するという、相反する作用があることが明らかとなった。

[鈴木幸一、武下文彦、牧野正彦]

7. カニクイザルシュワン細胞を用いた神経障害機構解明

これまでに、サル由来シュワン細胞株を樹立し、シュワン細胞はらい菌感受性を有することを報告した。そこで、末梢神経障害の誘導機構を探るため、らい菌及びその菌体成分のシュワン細胞アポトーシス誘導能を検討した。Annexin-V、Mebstain を用いる限り、いずれも陰性であった。そこで、らい菌感染シュワン細胞の T 細胞強化化能を IFN-γを示標に検討したところ、らい菌感染より、有意に強い IFN-γ産生観察された。

[前田百美、遠藤真澄(生体防御部)、寺尾恵治(つくば霊長類センター)、牧野正彦]

8. らい菌感染モデルサルの樹立

ハンセン病ワクチン開発において、候補抗原の効果判定、安全性確認が必要とされる。そのため系統的ならい菌感染モデルサルの樹立を目的とした。鼻腔内、鼻尖皮下、静脈内の 3 経路各 2 頭の幼若サルヘヌードマウスより精製されたらい菌 5x10^{9}/頭を投与した。静脈投与群にPGL－１抗体価の上昇をみとめた。また、鼻尖投与群では、投与域に投与 6 月後にらい菌の存在をPCR法により確認した。

[向井　徹、松岡正典 (生体防御部)、鈴木幸一、前田百美、寺尾恵治(つくば霊長類センター)、小野文子(予防衛生協会)、牧野正彦)

ハンセン病研究センター

II. 生体防御機構とワクチン開発に関する研究

1. 新しいハンセン病ワクチン候補分子の同定

ハンセン病に対する有効なワクチンの開発は切望されている。少菌型ハンセン病患者 T 細胞は、らい菌のある種の抗原を認識し病変の限局化をもたらす。本抗原の同定が新たなワクチンに直接的に結びつくと想定し同定を試みた。らい菌中最も抗原性に富む菌膜をターゲットとし、菌膜をゲル濾過法で分画した後、少菌型ハンセン病患者血清を用いスクリーニングしたところ、抗原性に富む、菌膜分画に共通して存在する抗原がウエスタンブロットで確認された。この分画を抽出し、その N 末端アミノ酸を解析したところ、MMP-II が同定された。

[前田百美、山下康子、牧野正彦]

2. 新しいワクチン候補分子 MMP-II の抗原性の評価

新たに同定されたタンパク MMP-II を Native gel を用い精製した後、その抗原性を自然免疫および獲得免疫の観点より検討した。MMP-II は、TLR-2 依存性にヒト末梢単球由来樹状細胞を刺激して IL-12 p70 を産生誘導し、マクロファージを刺激して IL-10 を産生した。また、MMP-II を樹状細胞にパルスすると自己 T 細胞を刺激し、IFN-γ産生性タイプ 1 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。少菌型ハンセン病患者では、この T 細胞反応は正常健常者に比し著しく亢進していた。従って、MMP-II は生体内で認識され得る抗原性に富んだらい菌由来抗原であることが判明した。

[前田百美、向井　徹、武下文彦、
石井則久(生体防御部)、牧野正彦]

3. DC-SIGN 分子によるらい菌由来蛋白 MMP-II の認識機構

ハンセン病ワクチン開発のため、有効な抗原同定及びその宿主側の認識機構の解明は重要である。樹状細胞表面に発現する C 型レクチンの DC-SIGN は、病原体の糖脂質を認識することが知られている。しかし、蛋白であるらい菌由来 MMP-II が DC-SIGN と結合することを FACS により明らかにした。その認識機構の解明は、効果的な抗原認識誘導に有効と考えられた。

[宮本友司、向井　徹、前田百美、牧野正彦]

4. 分泌型 MMP-II 発現 BCG 菌株の作製

抗酸菌は、抗原提示細胞に呑食されるとファゴゾームを形成し、宿主細胞内プロセッシング機構から回避するすべを獲得している。このことは、BCG 菌を抗酸菌症に対するワクチンとして用いる場合、必要かつ十分な抗原特異的免疫反応を妨げていると考えられる。そこで、らい菌由来 MMP-II の抗原性をより有効に発揮させるため、MMP-II に Ag85A 由来分泌シグナルを付加したプラスミドを作製し、BCG 菌に導入した。得られたリコンビナント BCG 菌は MMP-II を分泌発現することを確認した。

[稲垣勝也、前田百美、牧野正彦]

5. らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生誘導機構

らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生誘導には、脂質附加 N 末端蛋白（Lpk-a）が重要な役割を果たしている。IL-12 産生誘導における TLR-2 の関与を検討した結果、LpK、LpK-a 及び合成リポペプチド（LP）は TLR-2 を介した NF-kB の活性化を誘導した。しかし、脂質を欠く LpK 蛋白(LpK-b,-d)は関与しなかった。また、LP、LpK-b,-d は単独では充分な IL-12 産生誘導が認められず、LP は LpK-b,-d の IL-12 産生誘導を増強した。IL-12 産生誘導には脂質と N 末端蛋白の双方が必要であることが明らかとなった。

[山下康子、前田百美、牧野正彦]

6. 経鼻粘膜ワクチンの開発

らい菌の感染経路の一つとして、経鼻腔感染が考えられている。鼻腔粘膜に効率的な免疫誘導を行うため、粘膜面抗原捕捉細胞である M 細胞を標的とした抗原投与法の開発を行った。M 細胞と特異的に結合するレオウイルスの構造蛋白σ因子をらい菌 MMP II 蛋白もしくは Fibronectin attachment protein との融合蛋白として調整を行い、マウス鼻腔内に投与した。その結果、σ因子依存的に唾液中の抗 MMP　II 及び FAP 抗体価の上昇を認め、粘膜面に効率的な免疫誘導を示した。

[向井　徹、宮本友司、牧野正彦]

III. ハンセン病の診断および治療に関する研究

1. らい菌由来糖脂質の解析

抗酸菌菌体成分糖脂質の 1 つである Trehalose Dimycolate (TDM)が結核菌などの抗酸菌ではある種の病原性因子であること、また各種生物活性を示すことなどが報告されている。そこで、らい菌由来糖脂質の存在の有無及び抽出・精製を試みた。らい菌感染アルマジロの組織を溶媒抽出法で分画し薄層クロマトグラフィーを結核菌と比較したところ、結核菌の糖脂質 TDM, TMM と同等のバンドが得られた。これらのバンドを薄層プレートから切り出し粗精製した後、質量分析装置にて解析したところ、結核菌の TDM および TMM と同様の物質が存在することを明らかにした。

[甲斐雅規、藤田由希子(BCG 中央研究所)、
矢野郁也(BCG 中央研究所)、牧野正彦]

2. ハンセン病の新しい血清診断の開発

従来、ハンセン病の血清診断には、らい菌菌壁に存在する特異的抗原 PGL-I が用いられてきた。しかし、感度の点において多くの問題が存在し、特に少菌型ハンセン病の診断が極めて難しいという難点が指摘されていた。そこで血清診断用の新たな抗原を検索したところ、Major Membrane Protein-II (MMP-II)が極めて良好な成績を示した。多菌型ハンセン病患者は約 80%、少菌型ハンセン病患者では約 45%が陽性であった。新しい血清診断法の確立が期待される。

[前田百美、甲斐雅規、福富康夫、向井　徹、石井則久(生体防御部)、牧野正彦]

3. クロファジミン(B663)によるマクロファージのサイトカイン産生調節

B663 にはらい反応を抑制する等免疫調節作用があることが指摘されている。*in vitro* にてらい菌刺激マウスマクロファージから産生される TNF が B663 により増強され IL-10 は抑制されることが分かった。また、PGE2 産生も抑制された。IL-10 産生は PGE2 の受容体への結合とアデニレートシクラーゼ活性化を必要とすることから、PGE2 抑制が IL-10 抑制の一因であることが示唆された。また、PGE2 は炎症因子であることから B663 の抗炎症活性は PGE2 産生抑制作用に原因があると思われた。さらに、B663 は TNF 増強を通じて宿主の抗菌活性を高める作用をも持ち合わせていることが示唆された。

[福富康夫、武下文彦、松岡正典(生体防御部)、牧野正彦]

4. らい菌感染マクロファージを用いた抗らい菌剤感受性試験法の確立

らい菌の薬剤感受性試験を行なうために、ヌードマウスから回収したらい菌を *in vitro* にてマウスマクロファージに感染させて、リファンピシン存在下で 33 度にて数日間培養した。そして、らい菌を回収しラジオレスピロメトリー法にて代謝活性を測定したところ、リファンピシン添加により著明な代謝抑制作用がみられた。人工培養できないらい菌を抗酸菌培地で培養し薬剤を添加して放射性同位元素の代謝減少をみて評価するというラジオレスピロメトリー法よりも、より生体内に近い状態での薬剤評価方法になりうると考えられた。

[福富康夫、松岡正典(生体防御部)、牧野正彦]

Ⅳ. 薬剤耐性らい菌に関する研究

1. *M. smegmatis* トランスポゾン挿入 *kat* G 変異株解析

トランスポゾンの挿入変異株ライブラリーの中から *kat* G にトランスポゾンが挿入した変異株について解析を行った。Kat G はカタラーゼ活性とペルオキシダーゼ活性を持ち、さらに抗酸菌治療薬イソニアジドを活性型にすることが知られているが、親株と変異株の溶菌液を作成し活性染色を行った結果、変異株がカタラーゼ活性及びペルオキシダーゼ活性を失っていることが確認できた。また、イソニアジド含有培地での増殖の有無を調べた結果、変異株はイソニアジドに耐性を示すことがわかった。このことから変異株では *kat* G 遺伝子が働かないことからイソニアジドを活性型にすることはできないこと、すなわち *kat* G が完全に機能していないことが証明された。

[甲斐雅規、中田　登、牧野正彦]

2. らい菌の薬剤感受性に関するモデル菌の開発

らい菌の薬剤感受性試験を容易にするため、我々は薬剤感受性に関するモデル菌の開発を行っている。ハンセン病治療薬ダプソンの標的をコードする遺伝子が *folP* 遺伝子であることから、らい菌の *folP* 遺伝子を持つプラスミドを迅速発育性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に導入した後、温度感受性ファージを利用した遺伝子破壊システムにより *M. smegmatis* の *folP* 遺伝子を破壊することにより遺伝子を置換した。この系を用いて現在ダプソン耐性変異の解析を行っている。

[中田　登、甲斐雅規、松岡正典(生体防御部)、鈴木幸一、牧野正彦]

Ⅴ. 結核菌と非結核性抗酸菌に関する研究

1. 結核菌の迅速薬剤感受性試験法に関する研究

(1) 多剤併用療法に則した薬剤感受性試験法の検討

昨年度に続き、RFP0.010 μ g/ml、INH0.10 μ g/ml、SM1.0 μ g/ml (あるいは EB1.0 μ g/ml)の混合薬剤に対する併用効果を、結核菌参照菌 6 株と臨床分離菌 20 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、多剤併用療法による実際の治療結果と一致していた。また、ATP 測定法では、5 日間で判定が可能であり、新しい迅速薬剤感受性試験法 (ATP 法) の確立ができた。さらにマイクロプレートを用いた検討により、ミクロ化も可能になった。

[山崎利雄 ; 佐藤直樹、山下研也、岡沢　豊(極東製薬工業)]

(2) 二次抗結核薬を用いた場合の ATP 法の有用性の検討

二次抗結核薬である Capreomycin (CPM)、Cycloserine (CS)、Ethionamide (TH)、para-Aminosalicylic acid (PAS)、Emviomycin (EVM)について ATP 法の有用性を検討した。結核菌 H37Rv 株を用いて ATP 法による結果の再現性を確認した。臨床分離菌 49 株を用いた ATP 法と寒天比率法との一致率は、各薬剤とも 92%以上であり、ビットスペクトル法との一致率は、88%以上と比較参照法との一致率は高く、二次抗結核薬についても、結核菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法は有用であると考え

られた。
[山崎利雄；佐藤直樹、山下研也、岡沢　豊(極東製薬工業)]

2. ATP 測定法によるらい菌の薬剤感受性試験法の検討

現行の *in vitro* の薬剤感受性試験法である Buddemeyer 法に代わる、非放射性のらい菌の薬剤感受性試験法の確立をするために ATP 測定による検討を行った。抑制率が 50％以上を示す場合に薬剤効果ありと判定する場合、ATP 法に用いる薬剤濃度は、RFP 0.5、CLF 2.0、CAM 0.5、MINO 2.0 μg/ml が適当であると思われたが、OFLX8.0 μg/ml の濃度は、更なる検討が必要であった。ATP 法 10 日目と Buddemeyer 法 7 日目の判定結果は、同一薬剤濃度での抑制傾向は、良く一致した。
[山崎利雄；儀同政一、松岡正典(生体防御部)]

3. 飼いイヌの臓器からの抗酸菌の分離

飼い主が結核患者であり、イヌの咽頭部ぬぐい液より、結核菌が分離されたため、安楽死させたイヌの肺、肺門リンパ節、肝臓より抗酸菌を分離した。脾臓からは分離できなかった。各臓器由来の分離菌の同定試験の結果は、*M. tuberculosis* であった。分離菌は、主要抗結核薬すべてに感受性菌であった。イヌの結核症は非常に稀であり、RFLP 分析の結果、飼い主から感染したものであろうと推察された。
[山崎利雄；芳賀伸治、渡邊治雄（細菌第一部)、
神山恒夫(獣医科学部)、高橋光良(結核研究所)
宇根有美(麻布獣医科大)]

4. 非結核性抗酸菌症迅速診断法の開発

非結核性抗酸菌の同定法開発のため *dna* A 遺伝子配列内に抗酸菌種特異領域を同定した。本領域を用い簡便な同定法の確立のため、等温遺伝子増幅法である Loop-mediated amplification method(LAMP 法)への応用を行った。鑑別困難である *M. kansasii* と *M.gastri* を用い検討したところ、非結核性抗酸菌 20 種のゲノム DNA とは交差せず各菌特異的に増幅する系を開発した。
[向井　徹、宮本友司、山崎利雄、牧野正彦]

Ⅵ. 国際共同研究

1. ベトナム国におけるフィールド調査

これまでパキスタン国のハンセン病流行地域において種々の基盤的検査技術を供与するとともに、らい菌の PGL-I 抗原に対する抗体検査および薬剤耐性菌の疫学調査をおこなってきたが、今回さらにベトナム国で同様の技術供与および疫学調査を行うため北部ハノイのバックマイ病院並びに中部クイニョンのクイホーハンセン病病院において現地調査を行った。
[甲斐雅規、福富康夫、前田百美、向井　徹、武下文彦、
中田　登、山崎利雄、鈴木幸一、牧野正彦]

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Maeda Y., Gidoh M., Ishii N., Mukai C. and Makino M.: Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell. Immunol., 222:69-77, 2003.

2) Maeda Y., Brennan P. J. and Makino M.: Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73: 209-215, 2004.

3) Kondo T., Nakamura N., Suzuki K., Murata S., Muramatsu A., Kawaoi A. and Katoh R.: Expression of human pendrin in diseased thyroids. J. Histochem. Cytochem., 51:167-73, 2003.

4) Toda S., Aoki S., Suzuki K., Watanabe K., Koike K., Koike N. and Sugihara H.: Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. Cell Tissue. Res., 312:281-289, 2003.

5) Yamaguchi H., Osaki T., Taguchi H., Sato N., Toyoda A., Takahashi M., Kai M., Nakata N., Komatsu A., Atomi Y. and Kamiya S.: Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with Helicobacter pylori heat shock protein 60. Clin Diagn Lab Immunol., 10:808-812, 2003.

6) Krutzik S.R., Ochoa M.T., Sieling P.A., Uematsu S., Ng Y.W., Legaspi A., Liu P.T., Cole S.T., Godowski P.J., Maeda Y., Sarno E.N., Norgard M.V., Brennan P.J., Akira S., Rea T.H. and Modlin R.L.: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat. Med. 9: 525-532, 2003.

7) Nakayama K., Maeda Y. and Jigami Y.: Interaction of GDP-4-keto-6-deoxymannose-3, 5-epimerase-4-reductase with GDP-mannose-4, 6-dehydratase stabilizes the enzyme activity for formation of GDP-fucose from GDP-mannose. Glycobiol. 13:

673-680, 2003.

8) Kai M., Maeda Y., Maeda S., Fukutomi Y., Kobayashi K., Kashiwabara Y., Makino M., Abbasi M.A., Khan M.Z. and Shah P.A.: Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. Intl. J. Lepr. Other Mycobact. Dis., in press, 2004.

9) Miyamoto Y., Mukai T., Takeshita F., Nakata N., Kai M. and Makino M.: Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. FEMS Microbiol. Letters, in press, 2004.

10) Kimura H., Maeda Y., Takeshita F., Takaoka L.E., Matsuoka M. and Makino M.: Up-Regulation of T cell stimulating activity of mycobacteria infected macrophages. Scan. J. Immunol., in press, 2004.

11) Yamashita Y., Maeda Y., Takeshita F., Brennan P.J. and Makino M.: Role of the polypeptide region of a 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. Cell. Immunol., in press, 2004.

2. 和文発表

1) 牧野正彦：らい菌と樹状細胞の相互作用．臨床免疫、39:109-115, 2003.

2) 鈴木幸一：甲状腺濾胞形成機構研究の新しい展開．ホルモンと臨床、51: 3-10, 2003.

3) 鈴木幸一：サイログロブリンによる甲状腺濾胞機能の自己調節機構．内分泌・糖尿病科、16: 172-183, 2003.

4) 鈴木幸一：ペンドレッド症候群と PDS 遺伝子異常症．内分泌・糖尿病科、17: 410-416, 2003.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Makino M., Maeda Y., Kimura H., and Takeshita F.: Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage. 38th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Newark, USA, July, 2003.

2. 国内学会

1) 牧野正彦、前田百美：タイプ 1 細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索． 第 76 回日本細菌学会総会、熊本、2003 年 4 月．

2) 中田　登、甲斐雅規、鈴木幸一、前田伸司、松岡正典、牧野正彦：大腸菌 - 抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析. 第 76 回日本細菌学会総会、熊本、2003 年 4 月．

3) 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：生物発光を用いた結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討． 第 78 回日本結核病学会総会、倉敷、2003 年 4 月．

4) 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：結核菌の多剤併用薬剤感受性試験法の検討. 第 73 回実験結核研究会、倉敷、2003 年 4 月．

5) 福富康夫、松岡正典：ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生機構. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年 5 月．

6) 戸田修二、鈴木幸一、杉原　甫：甲状腺濾胞上皮細胞は、上皮―間葉相互作用を介して骨髄由来間質細胞の血管内皮細胞への分化転換を促進する. 第 76 回日本内分泌学会学術総会、横浜、2003 年 6 月．

7) 前田百美：らい菌のリポ蛋白に関する研究. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月．

8) 宮本友司、武下文彦、中田　登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井　徹：抗酸菌 Fibronectin–attachment protein の機能解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月．

9) 福富康夫・虎谷聡・松岡正典：らい菌貪食マクロファージにおいて誘導される PGE2 とらい菌の細胞内生存との関係. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月．

10) 武下文彦、向井　徹、宮本友司、牧野正彦：らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP)を標的にした DNA ワクチンの検討. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、神戸、2003 年 7 月．

11) 山崎利雄、松岡正典、儀同政一：らい菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討. 第 76 回日本ハンセン病学会、神戸、2003 年 7 月．

12) 前田百美、遠藤真澄、寺尾恵治、牧野正彦：シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、神戸、2003 年 7 月.

13) 福富康夫：ハンセン病研究の最近のトピックス、県民参加のハンセン病講座、神戸、2003 年 7 月.

14) 甲斐雅規、藤田由希子、矢野郁也、牧野正彦：らい菌由来糖脂質の解析. 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会、神戸、2003 年 7 月.

15) 甲斐雅規、中田　登、牧野正彦：速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析. 第 86 回日本細菌学会関東支部総会、横浜、2003 年 10 月.

16) 鈴木幸一：サイログロブリンの新しい作用－濾胞機能の negative feedback 調節因子として－. 第 46 回日本甲状腺学会シンポジウム「甲状腺研究の update」、名古屋、2003 年 11 月.

17) 戸田修二、小池英介、広松雄治、鈴木幸一、杉原　甫：Air-Liquid Interface は甲状腺濾胞上皮細胞の増殖・分化と maf 転写因子の発現を促進する. 第 46 回日本甲状腺学会、名古屋、2003 年 11 月.

18) 宮本友司、武下文彦、中田　登、前田百美、甲斐雅規、牧野正彦、向井　徹：Fibronectin-attachment protein 遺伝子破壊株による抗酸菌表層疎水性の検討. 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸、2003 年 12 月.

19) 牧野正彦、前田百美、木村博昭、武下文彦、稲垣勝也：らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強 第 33 回日本免疫学会総会、福岡、2003 年 12 月.

20) 福富康夫、牧野正彦：マクロファージ内におけるらい菌増殖機構. 第 33 回日本免疫学会総会、福岡、2003 年 12 月.

21) 輿儀ヤス子、鈴木幸一：らい菌は IL-10 が増強された宿主でよく増殖する. 第 33 回日本免疫学会総会、福岡、2003 年 12 月.

22) 赤川清子、金澤祐子、山崎利雄、岸文雄、芳賀伸治：ヒトマクロファージの結核菌の増殖抑制機構およびそれに関連したシグナル伝達機構の解析. 平成 15 年度日米医学協力結核ハンセン病専門部会議、京都、2004 年 3 月.

23) 稲垣勝也、前田百美、牧野正彦：らい菌由来抗原 MMP-II 分泌型 BCG 株の作製とその免疫学的性状解析. 第 48 回日本農芸化学会大会、広島、2004 年 3 月.

２４．ハンセン病研究センター
（ii）生体防御部

生体防御部長　　石　井　則　久

概　　要

ハンセン病はらい菌による慢性感染症で、皮膚と末梢神経が主に侵される疾患である。世界の新規患者数はほぼピークに達し、今後は減少に向かうと考えられる。2002年の世界の新規患者数は約62万人であった。患者数減少に関わらず、ハンセン病の病態解明は今だ研究途上である。

ハンセン病の研究推進には実験動物の開発は重要であり、モデル動物として高血圧ヌードラットを開発し、IL-10 や IL-12 等の免疫応答に重要なサイトカインの発現解析を行ったところ、らい菌に高感受性ラットではIL-10の産生が認められ、1型サイトカインの産生亢進が病態に関与していることが判明した。

らい菌の多型性のひとつである TTC 繰返し数の多型性を比較し、同一家族内の複数の患者間で異なる遺伝子型のらい菌による感染が存在し、感染様式は単純でないことが考えられ、今後も感染源の同定、感染経路について検討が必要である。

ハンセン病の治療は化学療法が主流である。現在の問題点は治療期間が長期（６ヶ月間、１年間、等）に亘ること、らい反応が起こること、耐性菌が出現すること、などである。今年度は治療期間短縮と耐性菌対策として新たな殺菌力の強い抗菌剤の検討を行った。新規フルオロキノロン MFLX の *in vitro* 活性は RFP＞MFLX＞SPFX＞GFLX＞LVFX＞TFLX の順で *in vivo* でも MFLX は SPFX と同等の活性を示した。

国内でのハンセン病患者の多くは戦後のプロミンとダプソンの単剤治療、あるいはその後リファンピシンなどの治療が行われた。そのような元患者から少数ながら再発や再燃がみられる。これらの患者の薬剤耐性の検査を進めている。OFLX 耐性らい菌に対する同じフルオロキノロンの SPFX の抗らい菌活性を検討すると、交差耐性があるものの高濃度で優れた抗らい菌活性を認め、治療薬選択に幅が出ることが示唆された。

現在の日本のハンセン病で解決すべき問題の一つは後遺症である。この後遺症は末梢神経のシュワン細胞へのらい菌の浸潤によることが判明している。らい菌感染シュワン細胞が CCR5 発現後根神経節神経細胞に apoptosis を誘導することを確認し、さらにらい菌感染シュワン細胞由来因子についてプロテオーム解析を行っている。

ハンセン病に対するワクチン開発にはいくつかの問題点がある。研究開発費の問題、ワクチン接種によるらい反応の誘発の問題、接種方法（注射か、複数回か、など）、MDT との費用対効果の問題、等である。そのため、単にハンセン病のみでなく多くの抗酸菌や他の細胞内寄生病原体に応用出来るワクチンを開発することも考慮すべきである。今回は、外来遺伝子を強力に発現するベクターの開発に取り組み、抗原遺伝子を直列に連結した multiple antigen expression system の有用性が判明した。

厚生行政の一環として日本のハンセン病の患者動向を明らかにすることも重要である。ハンセン病の行政、医療などの向上、偏見の解消に向けての基礎資料作成によって日本のハンセン病、しいては WHO が主導している世界のハンセン病の制圧に貢献できる。日本における新規患者は日本人患者の減少（毎年数人）、外国人患者の減少（毎年約８人）と終焉になっている。今後は療養所外にいる元患者の治療及び後遺症を一般医療で偏見無く実施できる体制を構築する努力が必要で、その手引きの素案を作成した。また JICA のハンセン病制圧計画をサポートするため、ミャンマー連邦における過去のハンセン病政策を検証し、将来の指針作成の立ち上げを行った。

今年度も引き続き、ブルーリ潰瘍の研究を行った。らい菌類似の *M. ulcerans* による皮膚感染症で、WHO も撲滅に乗り出している。ブルーリ潰瘍の研究はハンセン病の病態解明にも大いに役立つものと期待されている。今年度は薬剤感受性の検討が行われ、リファマイシン系のリファラジルが有効であることを *in vitro* 及び *in vivo* の系で証明した。

病原性のある抗酸菌の分離・同定を迅速に行うための、培養、生化学的性状検査、遺伝子シークエンス等の方法を確立した。

以上、生体防御部は主に生体側の立場からハンセン病及び抗酸菌症制圧のための基礎的及び臨床的研究を遂行している。

研　究　業　績

Ⅰ．らい菌の動態に関する研究

１．らい菌は IL-10 が増強された宿主で良く増殖する

らい菌に高い感受性を示すSHR/NCrj-*rnu*と抵抗性を示すF344/NJcl-*rnu*の腹腔マクロファージを培養してサイトカイン産生能について検討したところ、らい菌に高

感受性 SHR/NCrj-*rnu* の常在性およびらい菌感染腹腔マクロファージからは IL-10 を主にした炎症性サイトカインの産生が見られたのに対して、らい菌低感受性の F344/NJcl-*rnu* からは高い TNFα産生能が見られたが、IL-10 産生能は認めなかった。
〔輿儀ヤス子・遠藤真澄・鈴木幸一・藤村響男(北里大)・佐藤直哉(北里大)・小林正徳(ソフトロン)・野間口博子〕

II. 抗ハンセン病薬に関する研究

１．Moxifloxacin, Tosufloxacin の抗らい菌活性

8 位にメトキシ基を導入し光毒性を軽減した新規ニューキノロン Moxifloxacin(MFLX)と 1 位にジフルオロフェニル基を導入し抗菌力を増強した Tosufloxacin(TFLX)の抗らい菌活性を検討した。Buddemeyer 法では RFP＞MFLX＞SPFX＞GFLX＞LVFX＞TFLX の順で、MFLX に SPFX を凌ぐ強い抗らい菌活性を認めたが、TFLX の抗らい菌活性は LVFX より弱かった。ヌードマウス足蹠法では、MFLX の最小抑制濃度は、10 mg/kg で SPFX に匹敵する強い抗らい菌活性を持つことを認めた。

［儀同政一］

２．OFLX 耐性らい菌に対する SPFX の抗らい菌活性

OFLX 耐性らい菌（Zensho-4 株）に対する SPFX の抗らい菌活性をヌードマウス足蹠法で調べた。SPFX は OFLX 耐性らい菌に対し 20 mg/kg で不完全抑制、40 mg/kg で完全抑制を示し、交差耐性があるものの優れた抗らい菌活性を認めた。現在、強い抗らい菌活性を持つ新規ニューキノロン Moxifloxacin(MFLX), SPFX, GFLX, STFX の OFLX 耐性らい菌(Zensho-4 株) に対する抗らい菌活性を Buddemeyer 法で検討している。

［儀同政一、松岡正典］

III. ハンセン病の神経障害に関する研究

1. ハンセン病による末梢神経炎の発症および制御機構の解析

らい菌感染による末梢神経障害機構を解明する目的で、感染シュワン細胞由来生理活性物質の発現調節機構を解析の過程で、ラット Schwann 細胞株がβ-chemokine MIP-1α をらい菌感染時特異的に発現することを明らかにした。そして感染 Schwann 細胞が chemokine receptor CCR5 発現後根神経節神経細胞に apoptosis を誘導することを確認した。MIP-1α以外の神経障害に係わる因子を探索する目的で、らい菌感染 Schwann 細胞由来因子についてプロテオーム解析を行った。2D-DIGE で検出した約 2600 の spot のうち、らい菌感染により 420spot の減少、181spot の増加を認め、各々について MS 分析を含む詳細解析に移行した。

［遠藤真澄、中田　登、山下康子、松岡正典］

IV. ハンセン病の免疫応答に関する研究

１．DNA ワクチン用ベクターの開発

外来遺伝子を強力に発現するベクターの開発に取り組んだ。抗原遺伝子を直列に連結した multiple antigen expression system の有用性が示された。また、transgenic mouse を利用した抗原提示細胞の genetic tagging を Emory 大学の研究者らと共同で行い、成果を挙げた。現在は過給式転写増幅システムの作成、評価を行っている。

［佐々木　津、石井則久、武下文彦(横浜市大)、Joshy Jacob(Emory Univ.)、Sanjay Garg (CDC)］

V. ハンセン病の疫学に関する研究

１．遺伝子型別に基づくハンセン病の感染源解析

インドネシア北マルク地方及び北スラベシ地域をフィールドとして、患者及び同居家族の鼻粘膜上に分布するらい菌の TTC 繰返し数の多型性を比較した。患者と同居する家族には異なる遺伝子型のらい菌が存在していた。また、同一家族内の複数の患者間で異なる遺伝子型のらい菌による感染が存在し、従来言われているような患者との住居内濃厚接触が唯一の感染様式ではなく、患者以外の感染源の存在が示された。

[松岡正典、張良芬]

２．ハンセン病発症状況の把握に関する研究

日本におけるハンセン病の新患数の把握と、統計学的解析を行った。新患について学会発表や論文等から検索を行い解析した。ハンセン病の新患は、最近 5 年間(1999-2003 年)の平均では年間約 14.0 名で、日本人は 5.4 名で、その 66.7%は 60 歳以上であり、沖縄県出身者は 51.9%を占めていた。一方在日外国人は 8.6 名で、ブラジル人は 46.5%を占め、男性の若者が多かった。なお、平成 15 年（2003 年）については、日本人 1 名（沖縄県出身者）、在日外国人 7 名（うちブラジル人 3 名）であった。それぞれの平均年齢は 72 歳、36.6 歳（39.3 歳）であった。

［石井則久］

3. 開発途上国におけるハンセン病対策の適正技術の開発に関する文献的研究

ハンセン病対策の将来的戦略および開発途上国一般に必要とされるハンセン病対策への適性技術の未来像を文献的に検討した。ミャンマー連邦は 1952 年から WHO のハンセン病制圧プログラムを順次遂行し、ハンセン病発生率の劇的低下を成功させると共に、ハンセン病医療プログラムの一般医療政策への統合が順調に進行していた。これらは多剤併用療法(MDT)の成功とミャンマー連邦政府と WHO の連携に依ると考察された。また国民へのハンセン病の啓発も進行していた。さらに JICA の協

力がハンセン病対策に貢献できるかが問われている。
［石井則久、森　修一（福島医大）］

4. 一般医療機関でのハンセン病医療の現状に関する研究

一般医療機関(医師会員、大学診療科)におけるハンセン病回復者及び患者のハンセン病及びその後遺症、一般医療等の実態把握のためアンケート調査を実施した。開業医はハンセン病及び回復者の診療経験はほとんど無く、ハンセン病に対する知識も不十分なので、生涯教育としてハンセン病を繰り返し取り上げていき、知識の向上を図る必要があった。一方、大学病院では各診療科とも診療の対応は可能であるが、ハンセン病に関する知識が不十分であるため、ハンセン病に関する情報の入手が必要であった。

［石井則久］

5. 一般医療機関での医療提供体制に関する研究

ハンセン病回復者が安心して一般医療機関を受診できるように「一般医療機関（病院）受診の手引き」、また医療関係者が他の患者と同じように回復者を診療できるように「医療従事者向け手引き」を作成した。さらにハンセン病に造詣の深い医師を「ハンセン病診療協力ネットワーク」として一覧にした。これらの「手引き」を早期に作成完成し、使用・配布することで、回復者が他の患者と同様の医療を享受出来ることが可能になる。
［石井則久、中嶋　弘（横浜市アレルギーセンター）、尾崎元昭（長島愛生園）、後藤正道（鹿児島大）、熊野公子（兵庫県立成人病）］

VI. 抗酸菌感染症に関する研究

1. *Mycobacterium ulcerans* 感染症に関する研究

抗酸菌感染症のひとつであるブルーリ潰瘍の有効な化学療法は確立されていない。我々は、ブルーリ潰瘍に有効な治療薬・ワクチン等の開発を目的として、***M. ulcerans*** のマウス実験感染モデル系を確立した。これまでに同モデル系を用いて、Rifalazil の有効性を見出し、現在他の薬剤との併用効果、間欠的投与効果等について検討中である。
［中永和枝、石井則久、齋藤肇(広島県環境保健協会)］

2. 病原性抗酸菌の分離・同定に関する研究

病巣から培養不能の、あるいは培養されても同定不能の抗酸菌の検体について、1.各種培養条件による培養、2.培養菌の生化学的性状、3.16SrRNA 遺伝子シークエンス等によりこれら病原性抗酸菌の同定を試みた。これまでに、日本では例数の少ない ***M.lentiflavum, M.intermedium*** および ***M.haemophilum*** の分離・同定に成功した。今後は治療法の改善を目的として、さらに薬剤感受性の検討もあわせて行う予定である。
［中永和枝、石井則久、齋藤肇(広島県環境保健協会)］

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1)Takeda A., Umeda A., Matsuoka M., Yoshida S., Nakamura M. and Amako K.: Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. Microbiol. Immunol. 47: 265-270, 2003.

2)Amako K., Takede A., Umeda A., Matsuoka M., Yoshida S. and Nakamura M. :Degradation process of *Mycobacterium leprae* cells in infected tissue examined by the freeze-substitution method in electron microscopy. Microbiol. Immunol. 47: 387-394, 2003.

3)Matsuoka M., Kashiwabara Y., Zhang L., Gotoh M. and Kitajima S.: A second case of multidrug resistant *Mycobacterium leprae* isolated from a Japanese patient with relapsed lepromatous leprosy. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 71: 240-243, 2003.

4)Sasaki S., Takeshita F., Xin K-Q., Ishii N. and Okuda K: Ajuvant formulation and delivery systems for DNA vaccines. Methods 31: 243-254, 2003.

5)Maeda Y., Gidoh M., Ishii N., Mukai C. and Makino M:Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell. Immunol. 222: 69-77, 2003.

6)Ishii N: Recent advances in the treatment of leprosy. Dermatol Online J 9, 2003.

7)Garg S., Oran A., Wajchman J., Sasaki S., Kapp J. and Jacob J.:Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin-derived dendritic cells *in vivo*. Nature Immunol. 4:907-912. 2003.

2. 和文発表

1)石井則久：ミャンマーで考えたこと．日本ハンセン病学会雑誌 72: 45-47, 2003.

2)石井則久、向井秀樹、菅原　信、原　紀道、岡村理栄子、大路昌孝、山本　泉：東京都皮膚科医会及び

神奈川県皮膚科医会の疥癬に関するアンケート調査結果. 日皮会誌 113: 281-288, 2003.

3)石井則久：Hansen 病. 皮膚疾患最新の治療 2003-2004（新村眞人、瀧川雅浩編集), p137, 南江堂(東京), 2003.

4)石井則久:ハンセン病. 新世紀の感染症学, p531-535, 日本臨床社（大阪）, 2003.

5)石井則久、佐々木　津:皮膚結核（症）.最新皮膚科学大系第 14 巻（玉置邦彦総編集）, p130-142, 中山書店（東京）, 2003.

6)石井則久、佐々木　津:皮膚知覚異常.最新皮膚科学大系第 18 巻（玉置邦彦総編集）, p298-300, 中山書店

7)石井則久:抗抗酸菌薬.最新皮膚科学大系第 2 巻（玉置邦彦総編集）, p100-102, 中山書店（東京）, 2003.

8)石井則久：皮膚結核による潰瘍を治す. 皮膚科診療プラクテイス　15　難治性皮膚潰瘍を治すスキル（橋本公二、宮地良樹、瀧川雅浩編集）, p225-229, 文光堂（東京）, 2003.

9)石井則久、小茂田昌代：疥癬に対するイベルメクチンの効果.臨床皮膚科 57(suppl): 135-138, 2003.

10)石井則久：抗酸菌感染症. p1-12,日本皮膚科学会研修委員会（東京）,2003.

11)石井則久：結核、梅毒、ハンセン病. 皮膚科専門医試験問題解説集（小野友道、溝口昌子編集）, p174-179, 金原出版（東京）, 2003.

12)石井則久：皮膚感染症の検査と診断.今日の治療 11: 873-875, 2003.

13)石井則久、佐々木　津：抗結核薬の使い方. MB デルマ 76: 61-66,2003.

14)前田　学、山崎隆治、荒木麻里、遠渡　舞、佐々木　津、石井則久：環状紅斑を主訴としたハンセン病（B 群）のブラジル人女性例. 西日本皮膚科 65: 351-354,2003.

15)中山聡子、上坂義和、國本雅也、三方崇嗣、清水　潤、石井則久：急性発症の疼痛をともなった上肢多発性単神経炎型ハンセン病ニューロパチーの 1 例. 臨床神経学 43: 265-269, 2003.

16)石井則久:抗酸菌感染症（皮膚結核とハンセン病）の診断と治療. p1-10,日本皮膚科学会研修委員会（東京）,2003.

17)石井則久、佐々木　津:熱帯医学の動向と輸入感染症. MB デルマ 78: 17-23,2003.

18)市川栄子、大塚藤男、堀井のり子、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫：ハンセン病患者の 2 例. 日本ハンセン病学会誌 72: 271-273, 2003.

19)杉田泰之、吉仲　真、武川るみ、大沼すみ、石井則久、中嶋　弘：多菌型ハンセン病の 1 例. 日本ハンセン病学会誌 72: 279-281, 2003.

20)鈴木陽子、瀧川雅浩、石井則久：多菌型ハンセン病として治療したが最終診断未定の症例. 日本ハンセン病学会誌 72: 287-290, 2003.

21)雄山瑞栄、清島真理子、石井則久：少菌型 Hansen 病. 皮膚病診療 25: 1223-1226, 2003.

22)石井則久:ハンセン病. 医学のあゆみ 207: 1020-1021, 2003.

23)山田知加、瀧川雅浩、戸倉新樹、三田　均、小関正倫、石井則久:インドネシア人に発症した少菌型ハンセン病. 皮膚臨床 45: 1276-1277, 2003.

24)石井則久：ハンセン病. 日本皮膚科白書（日本皮膚科学会編集）, 264-267, 金原出版（東京）, 2003.

25)石井則久：「ＳＡＲＳ」最新情報. 神奈川救急医療感染症懇話会誌 1: 30-38, 2003.

26) 石井則久：ハンセン病. ヴィジュアル　ダーマトロジー 2: 1060-1061, 2003.

II. 学会発表

１．国際学会

1)Suzuki K., Yajima M., Etuaful S., Mwanatambwe M., Asiedu K., Yamada N., Ishii N. and Asano G: In the absence of AFB(*Mycobacterium ulcerans*), immunoreactivity of phenolic glycolipid-1(PGL-1) like material in BU typical histopathological specimens. 6th WHO Advisory Group Meeting on Buruli Ulcer, Geneva, Switzerland, March 2003.

2)Sato N., Fujimura T., Masuzawa M., Katsuoka K., Kanou M., Yogi Y. and Matsuoka M.: Recombinant expression and functional analysis of the protein encoded by mce1A region of *Mycobacterium leprae*. 64th Congress of International Investigative Dermatology. Florida, USA, May 2003.

3)Saito H., Nakanaga K., Goto M.and Ishii N.: Therapeutic efficacy of Rifalazil (KRM-1648) against Experimental Buruli ulcer induced in mice. 103rd General Meeting, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, May 2003.

4)Matsuoka M., Zhang L. and Budiawan T.: Analysis of leprosy transmission based on genotyping. 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Newark, USA, July 2003.

5)Goto M., Saito H., Nakanaga K., Ishii N. and Yonezawa S.:Pathological findings of mouse inoculated with *Mycobacterium ulcerans*. 38th US-Japan Tuberculosis-Leprosy Research Conference. Newark, USA, July 2003.

6)Sasaki S, and Takeshita F.: Enhancement of DNA vaccine immunogenicity by dual antigen expression system. Awajishima International Forum on Infection and Immunity, Hyogo Japan, August 2003.

7)Arakaki H., Uezato H., Hosokawa A., Matsuoka M. and Nonakai S.: Why the leprosy recurred after 34 years of DDS therapy. 13th Japan-Korea Conference of Dermatology, Dejeon, Korea, October 2003.

２，国内学会

1)山中克二、戸倉新樹、石井則久：右頸部の紅斑. 第 3 回浜名湖皮膚病理研究会、 浜松、 2003 年 1 月.

2)中居賢司、大西誉光、渡辺晋一、石井則久：在日外国人にみられたハンセン病の１例. 第 66 回日本皮膚科学会東京支部学術大会総会、 東京、 2003 年 2 月.

3)斎藤肇、中永和枝、石井則久： 慢性皮膚病巣より分離された *Mycobacterium haemophilum* - 主としてその細菌学について. 第 53 回日本結核病学会中国四国支部学会、岡山、2003 年 2 月.

4)斎藤肇、中永和枝、石井則久： 実験的 Buruli 潰瘍に対する Rifalazil(KRM-1648)の効果. 第 53 回日本結核病学会中国四国支部学会、岡山、2003 年 2 月.

5)後藤正道、中永和枝、石井則久、北島信一、斎藤肇：実験的マウス Buruli 潰瘍(*M. ulcerans* 感染症)の病理学的特徴. 日米医学協力研究会結核・ハンセン病専門部会国内会議、京都、2003 年 3 月.

6)斎藤肇、石井則久、中永和枝： *Mycobacterium haemophilum* 皮膚感染症の一例 - 主としてその細菌学的方面について-. 第 77 回日本感染症学会総会、福岡、2003 年 4 月.

7)齋藤肇、石井則久、中永和枝：Mycobacterium haemophilum 皮膚感染症の一例- 主としてその細菌学的方面について. 第７８回日本結核病学会総会、倉敷、2003 年４月.

8)中永和枝、石井則久、齋藤 肇：Rifalazil(KRM-1648)の実験的マウス Buruli 潰瘍に対する治療効果. 第７８回日本結核病学会総会、倉敷、2003 年４月.

9)中田 登、甲斐雅規、鈴木幸一、前田伸司、松岡正典、牧野正彦：大腸菌-抗酸菌シャトルコスミドを用いたらい菌 Thai53 株整列クローンライブラリの作製と解析. 第 76 回日本細菌学会総会、熊本、2003 年 4 月.

10)松岡正典、柏原嘉子、尾崎元昭：国内再燃、再発および国外新患における薬剤耐性らい菌の伝播. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年 5 月.

11)和泉眞蔵、佐伯圭介、松岡正典：ハンセン病濃厚流行地におけるらい菌感染源に関する疫学的考察. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年 5 月.

12)松本和彦、酒井咲子、飯島みわ子、斎田俊明、石井則久：日系ブラジル人に発症した lepromatouos leprosy の 1 例. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年５月.

13)堤 祐子、川上民裕、上西香子、山前恵美子、保坂恵理、芳賀恒夫、木村聡子、相馬良直、溝口昌子、石井則久：サリドマイドを併用したハンセン病の 1 例. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年５月.

14)福富康夫、松岡正典：ハンセン病におけるマクロファージのサイトカイン産生機構. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年 5 月.

15)佐伯圭介、和泉眞蔵、長尾栄治、松岡正典、テキ ブディアワン： 生活環境中に存在するらい菌の疫学的意義. 第 102 回日本皮膚科学会総会、浦安、2003 年 5 月.

16)加藤正俊、冨高晶子、松永佳世子、早川 敏、石井則久：インドネシア人に発症した多菌型 Hansen 病の 1 例. 第 224 回日本皮膚科学会東海地方会、名古屋、2003 年 6 月.

17)柳田美子、與儀ヤス子. インドネシア(スラヴェシ島)におけるハンセン病患者と家族の栄養状態. 第 12 回日本健康教育学会、沖縄、2003 年 6 月.

18)太田桂子、新倉冬子、小金平容子、久保仁美、羽生田久美子、斎田俊明、石井則久：ハンセン病の 1 例. 日本皮膚科学会第 152 回信州地方会, 松本, 2003 年 6 月.

19)石井則久、小原安喜子、熊野公子、佐々木 津、杉田泰之、並里まさ子、野上玲子、細川 篤、牧野正直：2002 年のハンセン病新患発生状況. 第７６回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

20)加藤知子、柳田敦美、松本義也、杉田泰之、石井則久、富田 靖：日本で発症した在日外国人の多菌型ハンセン病の一例. 第７６回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

21)市川栄子、大塚藤男、堀井のり子、田中未知、石井則久、杉田泰之、小関正倫：ハンセン病の 2 例.
第７６回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

22)杉田泰之、吉仲　真、石井則久、中嶋　弘：高齢発症の多菌型ハンセン病の 1 例. 第７６回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

23)鈴木陽子、瀧川雅浩、石井則久：多菌型ハンセン病と診断したが誤診とされた症例. 第７６回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

24)吉仲　真、小関正倫、矢島幹久、成田　稔、石井則久：手関節神経病性関節症を生じたＬＬ型ハンセン病の 1 例. 第76回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

25)天児和暢、高出明美、梅田昭子、吉田真一：急速凍結置換法により明らかになったらい菌の変性過程. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

26)松岡正典、張良芬、佐伯圭介、和泉眞蔵、Teky Budiawan：らい菌の遺伝子多型と感染経路解明への応用. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

27)清水利明、富岡治明、佐野千晶、松岡正典：*Mycobacteiurm leprae* および *M. avium* complex 感染マクロァファージにおけるサイトカイン mRNA 発現プロフィルの検討. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

28)山崎利雄、松岡正典、儀同政一：らい菌の ATP 測定による薬剤感受性試験法の検討. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

29)儀同政一：WQ-3345,WQ-3402,HMR-3647 の抗らい菌活性. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、神戸、2003 年 7 月.

30)與儀ヤス子、佐藤直哉、藤村響男、S.V.Muchtar, A.S.Junaedai, F.S.Ilyas, H.R.Abdullah and M.D.Amiruddin. らい菌感染組織における CD68 陽性細胞の動態. 第 76 回日本ハンセン病学会総会、兵庫、2003 年 7 月

31)石井則久：免疫機能低下患者における性感染症の混合感染. パネルデイスカッション「性器ヘルペスを中心とした性感染症の混合感染」. 第 10 回ヘルペス感染症フォーラム、東京、2003 年 8 月.

32)石井則久：抗酸菌感染症. 日本皮膚科学会前実績研修講習会、東京、2003 年 8 月.

33)笹木慶子、下江敬生、石井則久：１型反応を生じた BL 型ハンセン病の１例. 第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、松山、2003 年 10 月.

34)與儀ヤス子. ハンセン病患者皮膚組織におけるスカベンジャー リセプターの発現とらい菌の局在. 第 44 回日本組織細胞化学会・学術集会、東京、2003 年 10 月.

35)石井則久：抗酸菌感染症（皮膚結核とハンセン病）の診断と治療. 日本皮膚科学会前実績研修講習会、大阪、2003 年 11 月.

36)與儀ヤス子、鈴木幸一. らい菌は IL-10 が増強された宿主で良く増殖する. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003 年 12 月.

37)藤村響男、佐藤直哉、與儀ヤス子、狩野真帆、増澤幹男、勝岡憲生. m ce1A 蛋白によるらい菌の上皮細胞への侵入とアポトーシスの誘導. 第 33 回日本免疫学会・学術集会、福岡、2003 年 12 月.