序

所長　宮村　達男

国立感染症研究所は一貫して変わらぬ設立理念を持つ。即ち、感染症を制圧し、国民の保健医療の向上を図る予防医学の立場から感染症に関する研究を先導的、独創的かつ総合的に行い、科学的根拠に基いて国の保健医療行政に積極的に提言し、支援することにある。具体的には (i) 感染症のレファレンス、サーベイランス業務、(ii) ナショナルコントロールラボラトリーとして生物学的製剤等の品質管理業務を担う。この二つの機能を根本的に支えるには高いレベルの基礎研究が必須である。この基礎研究は感染症の予防、診断、治療に間接的、直接的に深くかかわる応用的な側面が特に強調される。しかも厚生労働省傘下のナショナルセンターが次々に独立法人化してゆくなか、感染研はその使命から国立研究所としての立場を堅持してゆかねばならない。

2009年は感染研が日頃蓄えた力と内外との連携をもってわが国の感染症コントロールに先導的な役割を果たすことが期待され、それに応え、また課題も浮き彫りになった激動の一年であった。4月にメキシコに端を発した（H1N1）2009 インフルエンザパンデミックには発足して間もないインフルエンザウイルス研究センターと感染症情報センターを両輪として全所を挙げて対応した。昨年度から準備された新型インフルエンザ発生に対する所内対応のための検査対応、疫学情報等ワーキンググループが直ちに作動した。US CDCから提供された新型ウイルスの遺伝子情報をもとにセンターで緊急に開発されたウイルス診断システムを利用し、全国の検体について24時間体制をしいて確認診断がなされた。各部、室はそれぞれの持ち場で協力し、バイオリスク委員会、動物委員会等各種所内委員会がこの危機管理、対応に力を発揮した。文字通り所を挙げての対応であった。また各地の地方衛生研究所を核とする国内のネットワークにおける普段からの連携が十分に発揮された。また、新型ワクチンの国家検定が所内の連携のもとにおこなわれ、一方、ワクチンの緊急輸入に関して、承認前試験、安全性・有効性の検証、評価、審査に参画、生物学的製剤規準の策定、国家検定等を行った。

感染研の細菌部、ウイルス部など病原体ごとの部、センターを縦糸とすれば、免疫部、病理部などの研究部門を横糸とする仕組みは感染研のかけがえのない財産である。今回のインフルエンザ対応について、所を横断するプロジェクトチームが形成され、インフルエンザウイルスの遺伝子診断、新たな迅速診断系の開発等に対応したことは感染研の底力を示す。また感染研のもう一つの財産は営々として築き上げた国際連携である。インフルエンザウイルス研究センターはWHOのcollaborative centreとして、世界の最新情報を得、グローバルなウイルス診断に貢献するとともに、WHOの世界対応の戦略確立に寄与した。

一方で、膨大に増加する研究業務量に対する一律の定員削減、諸方面との合意を得ての村山BSL４施設の本格的稼働、本省とのより緊密な連携、リアルタイムに国際対応できるオペレーションルームの建設など数々の課題を残した。

インフルエンザ対応で騒然とすることなく、所全体としては一方で厚生労働科学研究事業「肝炎等克服緊急対策研究事業」「新型インフルエンザ等新興、再興感染症研究事業」を筆頭に文科省等の科学研究費が得られ、国の施策に必要なエビデンスを提供する、地に足をじっくり据えた感染症研究がすすんだ。本年度は500編を超える論文が誌上発表された。各部の中で仕事が完結し、業績としてまとまったケース、感染研の中で部をまたがって横断的な仕事が実を結んだケース、国際協力の結果として結実したケースなど感染研の特徴が目に見える論文が増えた。感染研の積極的な提言が適宜実を結ぶためには、感染研の個々の研究者がそれぞれの学界において、信頼される実績を普段から積み重ねておかねばならない。3月には平成21年度日本細菌学会浅川賞を「病原細菌の病原性遺伝子群の発現調節と病因に関する研究」において副所長（細菌第一部長）渡邉治雄が受賞した。

人事面では4月1日ウイルス第三部長田代眞人がインフルエンザウイルス研究センター長に配置換（インフルエンザウイルス研究センターの新しい人員配置、採用は〔Ⅲ. 調査研究 22.インフルエンザウイルス研究センター〕に詳述）、7月1日竹田誠がウイルス第三部長（九州大学より）に着任した。4月1日森修一（福島県立医科大より）が、7月1日星野仁彦（米国ニューヨーク大より）がそれぞれハンセン病研究センター感染制御部の第七室長、第六室長に採用された。6月1日米国ラホヤアレルギー免疫研究所の金城雄樹が生物活性物質部第三室長に採用された。国際協力室長中嶋建介は8月1日厚労省結核感染症課に転出、同日国立長寿医療センターから谷伸悦が着任した。6月30日ウイルス第三部第四室長田口文広が日本獣医生命科学大へ転出のため、6月30日、免疫部第四室長大原直也が岡山大へ転出のため、7月31日、エイズ研究センター第一研究グループ長梁明秀が横浜市大へ転出のため、3月31日エ

イズ研究センター長山本直樹がシンガポール大学へ転出のため、ウイルス第二部第四室長鈴木哲郎が浜松医大へ転出のため、それぞれ退職した。

　また3月31日、所長宮村達男、病原体ゲノム解析研究センター長神田忠仁、エイズ研究センター第一室長武部豊が定年によりそれぞれ退職した。研究所は「人」で持つ。感染研で働いたことが誇りだ、とそれぞれが自信を持って言える研究所に発展してゆくことを願う。

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 21 年 7 月 1 日付で安藤秀二主任研究官が第五室長に就任した。平成 22 年 1 月 1 日付で金井亨輔が第四室研究員として採用され就任した。平成 22 年 2 月 28 日付で野澤直樹研究員が退職し、平成 22 年 3 月 31 日付で大松勉研究員が退職した。

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、狂犬病ウイルス、ＪＣウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV)、サイトメガロウイルス（CMV)、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、感染症発症機序の解析と診断、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、南米出血熱等新興アレナウイルスによる出血熱検査診断法の開発と改良を行った。新興・再興ウイルスに対する網羅的検出方法を開発し、本法が新興ウイルスの検出に有力な検査法であることを示した。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。さらにサル痘ウイルスの病原性に関する研究を行った。

第二室においては、デングウイルス感染の病態解明にむけてウイルス解析とサルモデルの開発を行なった。日本各地のブタから分離した日本脳炎ウイルスの遺伝子及び病原性解析を行った。また、野性イノシシからも日本脳炎ウイルスを分離し解析した。チクングニヤウイルス検査法を開発し、患者の確定検査を行うとともに分離ウイルスの解析を行った。

第三室においては､進行性多巣性白質脳症診断のため、JC ポリオーマウイルス検査系を開発した。さらに開発した検査法を用いて、多数の疑い患者検体を検査した。またリンパ球脈絡髄膜炎ウイルス感染症の検査法を確立した。

第四室においては、CMV による先天性感染の迅速スクリーニング法を用いて感染児の調査とゲノムタイプによる感染経路解析を行った。モルモット CMV を用いて母児感染の研究を行った。また、レポーター細胞を用いて新規抗 CMV 剤や抗 VZV 剤のスクリーニングにより得た有力な化合物の解析を行った。

第五室においては、リケッチア迅速検査法の開発と国内における実態調査を行なった。また、リケッチア蛋白の網羅的解析を行った。クラミジアに関しては、検査法を改良し、オウム病の早期検査体制を確立した。

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検体に関する行政検査、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、国際協力活動を行った。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。

業　績

調査・研究

Ⅰ．　ウイルス性出血熱及び新興・再興ウイルス感染症に関する研究

1.　南米出血熱の実験室診断法の開発―間接蛍光抗体法による IgG 抗体検出系の開発

南米出血熱（アルゼンチン、ボリビア、ベネズエラ、ブラジル出血熱）は、新たに 1 類感染症に加えられたウイルス性出血熱である。原因ウイルスは、新世界アレナウイルスの B clade に分類されるフニン、マチュポ、ガナリト、サビアウイルス、チャパレウイルスで、BSL4 病原体に分類されるため、現状では日本ではウイルスが取扱えない。これまでに、フニンウイルスの組換え NP を用いた IgG-ELISA、抗原検出 ELISA を開発してきた。本研究では､フニンウイルスの組換え NP を発現する HeLa

細胞塗抹標本を抗原とする間接蛍光抗体法を開発した。精製組換え NP 免疫ウサギ血清を用いて、同様に調整した他の南米アレナウイルス抗原との交差反応性を調べた結果、全ての抗原に交差反応したが、旧世界アレナウイルスのラッサウイルス、LCM ウイルスの NP 抗原とは交差しなかった。アルゼンチン出血熱患者 2 検体の血清から抗体が検出されたが、ラッサ熱回復期患者血清とは交差しなかった。本法は IgG-ELISA と共に血清診断法として有用であると考えられた。[福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂、中内美名（インフルエンザウイルス研究センター）、Agustín E. Ure・Victor Romanowski （アルゼンチンラプラタ国立大学)]

2. 新興アレナウイルス出血熱の抗原性の解析

ザンビア、南アで新興し、患者 5 名（致死率 80%）が発生した新興アレナウイルス性出血熱から、新種の旧世界アレナウイルス、Lujo （ルジョ）ウイルスが同定された。ルジョウイルスは、旧世界アレナウイルスのラッサウイルスや LCM ウイルスとは分子系統学的にかなり距離があると報告された。本研究では、ルジョウイルスの組換え核蛋白(NP)を発現精製してウサギ免疫血清を作製した。組換えルジョウイルス NP を用いた IgG-ELISA 及びルジョウイルス NP 発現 HeLa 細胞塗抹標本を用いた間接蛍光抗体法を開発し、各種アレナウイルスとの交差性に関して解析した。その結果、遺伝的にはかなり異なるラッサウイルスや LCM ウイルスと比較的強く交差したが、新世界アレナウイルスとは交差しなかった。今後、本研究で開発した血清診断法の有用性を患者検体等を用いて評価する必要がある。[森川茂、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、山本貴恵・谷口怜・伊波興一朗・久和茂（東京大学大学院農学生命科学研究科）、酒井宏治・網康至（動物管理室)]

3. 豚のレストンエボラウイルス感染症診断用 IgG-ELISA の確立

フィリピンの養豚場で豚がレストンエボラウイルスに感染していることが分かった。そこで、フィリピン RITM、東北大学-RITM 新興・再興感染症共同研究センターと共同して、豚のレストンエボラウイルス抗体検出系を確立した。

2008 年にフィリピンの 2 ヶ所の豚農場で致死性の急性呼吸器感染症が流行し、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRS)が検出され、一部の豚ではレストンエボラウイルス(RES)も世界で初めて検出された。組換えバキュロウイルスにより発現し精製した RES-N 蛋白(RES-NP)を抗原として用いた IgG-ELISA を豚検体用に調整し、ザイールエボラウイルス（ZAI）及び RES 感染細胞抗原（米国 CDC 作製）を用いた成績と比較した。また、組換え (ZAI)-NP 発現 HeLa 細胞を用いた間接蛍光抗体法(IF)を行った。その結果、精製組換え RES-NP 抗原と RES 感染細胞抗原を用いた IgG-ELISA は同等の感度であったが、ZAI 抗原を用いると抗体検出感度が低くなった。一方、RES 抗原による IgG-ELISA 陽性検体は、IF でも抗体陽性であった。この結果、これらを組み合わせることにより高い感度で豚の RES 抗体が検出できることが明らかとなった。Bulacan 州の農場の豚は RES 感染細胞抗原で約 20%の豚が IgG 抗体陽性であり、一部の検体は精製組換え RES-NP 抗原や IF でも陽性を確認した。Pangasinan 州の農場の豚では全頭屠殺後に新規導入した豚は、検査した検体の全てが抗体陰性であった。RES の豚に対する病原性は不明であるが、Pangasinan 州の農場では豚の処分後に感染が見られないことから感染は終息したと考えられる。今後、フィリピンの他の豚農場での血清疫学調査が、豚での RES 感染の実態を解明するために必要である。[福士秀悦、飯塚愛恵、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂、佐山勇輔・齊藤麻理子・鈴木陽・神垣太郎・玉記雷太・押谷仁（東北大学)、Olveda、 R.（RITM、フィリピン)]

4. フィリピンのコウモリからのレストンエボラウイルス抗体検出

レストンエボラウイルス(RES)は過去３回カニクイサルで致死的な出血熱の流行を起こしており、2008 年には豚でも感染が確認されている。アフリカではエボラ、マールブルグウイルスの遺伝子や抗体がコウモリから検出されており、フィロウイルスの宿主動物はコウモリである可能性が指摘されている。そこで、本研究では、2008 から 2009 年にフィリピンで捕獲した 140 個体のコウモリの RES 抗体保有状況を調査した。組換え RES-NP および RES-GP を用いた IgG-ELISA では、ルーセットオオコウ

モリ属の 16 個体中 7 個体がいずれかに反応した。多くが高 OD 値を示した。このうち、1 検体が間接蛍光抗体法で明瞭に陽性反応を呈した。これらのうち 3 個体は間接蛍光抗体法でも抗体陽性であった。他のコウモリは全て抗体陰性であったこと、アフリカのフィロウイルスがルーセットオオコウモリ属から検出されていることなどから、RES の自然宿主もルーセットオオコウモリ属である事が示唆された。[谷口 怜・渡辺俊平・上田直也・伊波興一朗・藤井ひかる・久和茂・明石博臣・吉川泰弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）、Joseph Masangkay（フィリピン大学獣医）、大松勉、水谷哲也、西條政幸、倉根一郎、森川茂]

5. カニクイザルから分離されたイヌジステンパーウイルスのサルでの病原性の解析

カニクイザルに原因不明の肺炎、消化器症状等を主徴とする致死的感染症が流行し、イヌジステンパーウイルス (CDV) が分離された。本研究では、サルから分離された CDV の性状解析とカニクイザルへの感染実験を行い、その病原性を解明することを目的とした。dog-SLAM 発現 Vero 細胞（dog-Vero）及び human-SLAM 発現 Vero 細胞（human-Vero）を用いて臨床材料から分離された CDV の塩基配列を決定した。また、分離された CDV をカニクイザルに経鼻感染させて、ウイルス増殖及び病理組織学的解析を実施した。その結果、dog-Vero で効率良く CDV が分離され（CDV / dog-Vero）、human-Vero でも稀に分離された（CDV / human-Vero）。CDV / dog-Vero と CDV / human-Vero のほぼ全長の塩基配列は、H タンパク質に 1 箇所のアミノ酸置換を生じる変異のみであった。実験感染後 15 日間の観察期間中、全てのサルは生存したが、CDV / dog-Vero 感染動物では 3 頭中 3 頭が、CDV / human-Vero 感染動物では 3 頭中 1 頭から、PBMC・呼吸器・消化器等の多くの組織・臓器から CDV が分離され、全身性 CDV 感染症が再現できた。CDV 感染流行時のウイルスは、全て dog-SLAM 指向性の野生型 CDV であったことと、感染実験の成績から、CDV はカニクイザルに全身性感染症を起こし得ることが明らかとなった。[酒井宏治・網康至・須崎百合子（動物管理室）、永田典代・岩田奈織子・鈴木忠樹（感染病理部）、長谷川秀樹（インフルエンザウイルス研究センター）、福士秀悦、水谷哲也、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂]

Ⅱ．新興・再興ウイルスの網羅的検出方法（Rapid Determination of Viral RNA Sequence; RDV 法）の開発・改良と応用に関する研究

1. ウイルス感染細胞から未知のウイルスを検出するための RDV 法の改良（RDV-SF）

RDV 法は未知のウイルスを検出する方法であるが、従来の RDV 法ではウイルス感染培養細胞の上清に含まれるウイルスを標的として網羅的な検出をおこなう必要があった。一般にウイルス核酸量は培養液中よりも細胞内の方が多い。また、培養液中にウイルスをほとんど放出しないウイルスも存在する。そこで、感染細胞からも RNA ウイルスを検出できるように RDV 法を改良した。宿主細胞に最も多く含まれる RNA は 18S と 28S リボゾーマル RNA で、それぞれ約 2ｋｂと 5kb である。また、細胞に発現している mRNA の多くは 5kb 以下である。一方、インフルエンザウイルスなど一部の RNA ウイルスを除くと、ほとんどの RNA ウイルスのゲノムの長さは 6kb 以上である。ウイルス感染細胞から抽出した RNA もしくは cDNA をアガロースゲルを用いて電気泳動し、6kb 以上に相当する箇所に含まれる核酸を抽出すると、理論的にウイルス RNA (cDNA)が得られることになる。そこで、カリシウイルスとフラビウイルスを用いてアガロースゲルから抽出した核酸を用いて RDV 法をおこなったところ、それぞれのウイルスゲノムの遺伝子配列が得られた。この方法は、サイズフラクションを利用しているので、RDV-SizeFraction (RDV-SF)と呼んでいる。[水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、飯塚愛恵、倉根一郎、森川茂、渡辺俊平・明石朝臣（東京大学農学部）]

2. RDV 法による Bat betaherpesvirus 2 の発見と疫学的調査

昨年度は RDV 法をより簡便にするために 64 通りで網羅性を保てるように改良した（RDV ver3.1）。この方法により和歌山県のコウモリから新規ベータヘルペスウイルス（bat betaherpesvirus 2: BatBHV-2)を検出し、すでに報告されているコウモリのヘルペスウイルスとの相同性を

解析したところ、Bat betaherpesvirus1 よりも tupaiid herpesvirus 1 に近いことがわかった。和歌山県のコウモリにおける BatBHV-2 の感染率を調べるために、50 匹のコウモリを採取したところ、PCR により 4 匹の脾臓においてウイルスが検出された。[水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、飯塚愛恵、倉根一郎、森川茂、渡辺俊平・明石朝臣（東京大学農学部）、前田健（山口大学農学部）]

3. タイにおける PhaV 保有蚊の疫学的調査

一昨年、タイで採取された蚊の幼虫から RDV 法を用いて新規ブニヤウイルス（PhaV）を検出したことを報告した。PhaV は系統樹上ではブニヤウイルスに属するが、相同性の高いウイルスは無いので新しい属を形成すると考えられる。また、最大 50 匹までプールした蚊の幼虫においては、約半数のグループから PCR で PhaV を検出したので、タイの蚊の成虫にも感染している可能性がある。そこで、タイで採取されたメスの蚊 75 匹を 5 匹ずつプールして RNA を抽出し、PCR をおこなったところ、すべてのグループにおいてウイルスが検出された。[水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、飯塚愛恵、倉根一郎、森川茂、江下優樹（大分大学）、西村美保・山尾卓也・佐藤朝光（福岡大学）、佐山勇輔・押谷学（東北大学）]

Ⅲ．ポックスウイルスに関する研究

1. 高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防効果：サル痘ウイルス鼻腔内接種モデルでの検討

近年、痘そうウイルスがバイオテロ病原体として用いられる危険性が指摘され、我が国では高度弱毒痘そうワクチン LC16m8 の再生産と備蓄対策がなされている。本研究では、LC16m8 のサル痘ウイルス暴露後接種効果を、霊長類を用いたサル痘ウイルス鼻腔内接種感染モデルにおいて検討した。ワクチン非接種群（コントロール群）4 頭、暴露（1,000,000 PFU/頭、鼻腔内接種）15 分後 LC16m8 接種群 4 頭、暴露 1 日後接種群 4 頭を用いた。鼻腔内接種暴露後には、3 週間にわたり臨床症状（体重、発熱、活動性、食欲等）を観察し、ウイルス血症レベル、抗体応答、肉眼的病理所見を解析した。その結果、LC16m8 のサル痘ウイルス暴露後接種の明らかなサル痘発症軽症化または予防効果は認められなかった。[西條政幸、飯塚愛恵、塩田智之、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（感染病理部）]

2. サル痘ウイルス感染症におけるサル痘ウイルスの各種蛋白に対する抗体応答

サル痘ウイルスは、ポックスウイルス科オルソポックスウイルス属に分類される二本鎖 DNA ウイルスで、霊長類において天然痘様の急性発疹性疾患（サル痘、ヒトサル痘）を引き起こす。本研究では、輸入感染症対策として重要な感染症のひとつであるサル痘ウイルスに感染した場合の、サル痘ウイルスの各種蛋白に対する免疫応答を、カニクイザルのサル痘ウイルス感染モデルを用いてプロテオミック解析により明らかにした。全ての EEV 関連蛋白（F13L、 A33R、 A34R、 A36R、 B5R）に対する抗体は感染 10 日目には検出された。IMV 関連蛋白（L1R、 H3L、 D8L、 A13L、 A17L、 L5R）に対する抗体応答は、H3L、 D8L、 A13L、 A17L に認められ、L1R と L5R に対する応答は極めて弱かった。コア蛋白（F17R、 E11L、 I1L、 I3L、 L4R、 J1R、 D2L、 D3R、 A4L、 A10L、 A12L）に対する抗体応答は、F17R、 I1L、および、 A4L に対する応答が強く認められた。病原因子関連蛋白（C23L、 C11R、 C3L、 N1L、 K1L、 E3L、 A40R、 A46R、 B14R、 B16R）の抗体応答では、C23L、C11R、および、E3L に対するものが比較的強く認められた。トランスクリプション関連蛋白および病原性関連蛋白に対する抗体応答についても解析した。サル痘ウイルス感染時には、全身感染に重要な働きを有する EEV 関連抗体を含め、多くの蛋白に対する抗体が誘導されることが明らかにされた。血清学的診断法の開発において、これらの研究成績は重要な知見を与えるものと考えられる。[西條政幸、飯塚愛恵、塩田智之、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（感染病理部）]

3. 細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の増殖温度感受性

責任遺伝子の解析

細胞培養痘そうワクチンの製造承認株である LC16m8 株は、Lister 株から低温馴化により LC16 株、LC16mO 株を経由して樹立された株である。Lister 株では 41℃以上でも初代ウサギ腎細胞でのプラック形成能があるのに対し、LC16mO 株と LC16m8 株は 41℃ではプラークを形成しない（増殖温度感受性）。増殖温度感受性に関与する遺伝子を明らかにするため Lister 株 DNA 断片をクローニングした Bacmid による LC16MO 株の温度感受性相補試験を実施した結果、*B5R* 遺伝子以外にウイルス DNA の *Hind*III-A 断片にある複数の遺伝子が関与することが明らかとなった。さらに LC16mO / 8 株と Lister 株由来クローンのウイルスゲノムの塩基配列の比較解析から、温度感受性に関与する可能性のある遺伝子として、*Hind*III-A 断片に含まれる *A8R*、*A33R*、*A36R*、*A53R*、*A55R*、*A56R* 遺伝子の 6 遺伝子が見出された。このうち、LC16mO / 8 株の *A56R* 遺伝子の 15 塩基欠失は、部分的に温度感受性に関与し、さらに *A56R* 遺伝子の部分欠失以外にも候補遺伝子に見られる変異のいずれかが関与することが明らかとなった。［飯塚愛恵、塩田智之、中内美名、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川茂］

Ⅳ．フラビウイルスに関する研究

1. デングウイルスに関する研究

(1) デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS4A の N 末端側領域の解析

NS4A は 150 アミノ酸から成り、その C 末端側 100 アミノ酸のほとんどが膜結合領域であるが、N 末端側の 50 アミノ酸は膜とは結合せず細胞質側に存在すると考えられている。本研究ではこの N 末端側 50 アミノ酸に注目し、ウイルス増殖における本領域の必要性について考察した。

H20 年度までに、１）デング 1 型ウイルス NS4A の N 末端側がウイルスの増殖に必須であること、２）この部位がウイルス種特異性を示すことを明らかにしてきた。そこで本年度は特異性を示す部位を絞り込むことを試みた。本部位をフラビウイルス間での保存性から 3 領域（11-23 部位、27-34 部位、35-50 部位）に分割し、それぞれを日本脳炎ウイルスの該当部位と置換した変異ウイルスクローンを作製し、ウイルス産生を試みた。すると 27-34 部位を置換するとウイルスが産生されないことが明らかとなった。他の部位については、増殖速度こそ遅いもののウイルス産生は確認された。以上より 27-34 部位が最もウイルス種特異性に関与していることが示唆された。次に PCR-based random mutagenesis 法により 27-34 部位変異体の増殖性を復帰させる変異の導入を試みた。その結果、27-34 部位の変異が維持された復帰変異体を分離することが出来た。ウイルスゲノムの塩基配列を決定したところ、ミスセンス変異が複数見出された。現在どのような変異がウイルス複製の回復に寄与するか、またどのような機序によるものか検討中である。［田島茂、高崎智彦、倉根一郎］

(2) デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS1 と相互作用する細胞側因子の同定

NS1 は酵素活性こそ有さないものの、ウイルス複製に重要な役割を果たしていると考えられている。さらに NS1 は細胞外にも分泌され、病態の重症化にも寄与するとの報告もある。しかし NS1 の作用機序には不明な点が多い。NS1 の機能解析を進めるため、これまでに NS1 と相互作用する細胞側因子を免疫沈降法により分離し、質量分析（ＭＳ）法により同定を試みてきた。その結果数種類のシャペロン蛋白質が同定された。これらのうち、TCP-1beta、HSP60、GRP78 との相互作用をウエスタンブロッティングにより確認することができた。［田島茂、高崎智彦、倉根一郎］

(3) デング熱患者における尿、唾液中のウイルス遺伝子、抗体検出に関する研究

デング熱輸入症例の尿および唾液からウイルス遺伝子および IgM 抗体の検出を継続して検討した。その結果、ウイルス遺伝子を検出する場合があることを確認した。イルス遺伝子が血液中から検出できない場合でも、尿中から検出することがあることが確認され、診断上の意義があることが明らかとなったため、実際の診断に応用し、継続して評価を実施した。［高崎智彦、小滝徹、原田文植、田島茂、倉根一郎、名和優・町田早苗（埼玉医科大学）、水野泰孝・竹下望・工藤宏一郎（国立国際医療センター）］

(4) デング熱サルモデルの開発

デングウイルス感染症の病態解析およびワクチン評価を行う上で最適な霊長類モデルは未だ確立されていない。そこで、我々は新世界ザルに属するマーモセットに着目し、そのデングウイルスに対する感受性について検索を行った。デングウイルス 2 型野外分離株を接種したマーモセットの一部で発熱・活動量低下といった臨床症状の変化が認められた。また、全ての個体で白血球減少が認められると共に、血小板減少・肝酵素の上昇、腎酵素の上昇も認められろ個体も確認した。剖検の結果、これらの個体の一部では腎臓に肉眼的な変化が認められ、病理組織学的には腎臓および肝臓に著変が認められ、ウイルス抗原も検出した。デングウイルスに対して高い感受性を有するマーモセットを用いて、ワクチン防御効果の判定に使用できることを同血清型ウイルス（デングウイルス２型）を用いて確認した。［大松勉、高崎智彦、倉根一郎、濱野正敬・明里宏文（医薬基盤研究所・筑波霊長類センター)、中村紳一朗（滋賀医科大学)、片貝裕子（予防衛生協会)］

(5) デングウイルス再感染患者血清における感染増強抗体に関する研究

再感染時に多発するデング出血熱の要因の一つは初感染時に誘導された中和能を有しないDENV型交差抗体に起因する抗体依存性感染増強(ADE)によると考えられている。希釈しない患者血清における ADE 活性および抗体の役割が明らかにされていない。より生体内に近い条件で測定するため、患者血清中における ADE 活性を調べた。そこで Fcγ受容体の 1 つである FcγRIIA(CD32a)を恒常発現する BHK- FcγRIIA/2 及び BHK- FcγRIIA/4 細胞を用いて ADE アッセイ法により原液の初感染並びに再感染における感染増強抗体を検討した。ADE 現象は再感染の患者血清に検出されたが同様な現象は初感染の患者血清に検出されなかった。また再感染患者血清と同患者から分離された DENV を用いた場合においても ADE 現象が観察された。再感染患者血清中に ADE 活性が検出されたことから、実際に感染増強抗体は再感染時に生体内におけるデング出血熱発症に重要な役割を果たす可能性が示唆された。［モイ メンリン、林昌宏、高崎智彦、小滝徹、田島茂、倉根一郎］

(6) FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗デングウイルス高感度ウイルス分離法の確立

デングウイルス感染者血液からウイルスを分離する際に抗デングウイルス抗体が血中に検出されだすと分離効率が低下する。そこで感染性のある抗原（ウイルス）-抗体複合体が FcγRIIA と結合し FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞に感染することで分離効率を高めることを明らかにした。血中からウイルス分離が困難であった低いウイルス力価の血清にも、少量の抗体を添加することにより分離効率が高まることも見出した。［モイ メンリン、林昌宏、高崎智彦、小滝徹、倉根一郎］

2. 日本脳炎ウイルスに関する研究

(1) 欠失・挿入変異体を用いた日本脳炎ウイルス 3‘非翻訳領域の解析

近年分離される日本脳炎ウイルス（JEV）の 3’非翻訳領域においてしばしば欠失が観察される。この欠失がウイルス性状にどのような変化をもたらすかを探るために、これまでに 4 種類の欠失変異体クローン(d5、d9、d5d9、d27）と 1 種類の挿入変異体クローン(a13)を構築し、in vitro での増殖性を比較してきた。昨年度までに Vero 細胞およびブタ腎由来 PK-15 細胞での増殖能に顕著な差異が観察されないことを明らかにした。本年度は他の株化細胞における増殖能およびマウスに対する病原性を比較した。マウス神経芽細胞腫由来 N18 細胞、ヒト神経芽細胞腫由来 IMR-32 細胞およびウズラ繊維芽細胞由来 QT-6 細胞において d27 変異体のみが野生型に比べ増殖能が低下していた。一方、マウス(ddY および C3H/He)に対する病原性を比較したが、いずれの変異体でも致死性に変化は見られなかった。以上より、近年欠失の観察される領域が神経系およびウズラ由来細胞でのウイルス増殖能に影響する可能性が示唆されたが、致死性については影響する可能性は低いことが示唆された。［加藤文博、田島茂、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎］

(2) E 蛋白質上の 1 アミノ酸置換（S123N）を有する組換え日本脳炎ウイルスの作製

日本脳炎ウイルスE蛋白質の123番目のアミノ酸残基はマウス神経芽細胞腫由来N18細胞における増殖能およびマウス病原性に重要な役割を果たす。国内外で同定されるJEVのほとんどがE蛋白質123番目のアミノ酸がセリン（123S）である。これまでに我々は、この部位がアルギニンであるウイルス（123R）が123Sに比べて有意に病原性が上昇することを見出している。一方、近年この部位がアスパラギン（123N）であるウイルスが、日本だけでなくベトナムや中国でも同定されてきている。しかし123N株の性状解析は全く行なわれていない。この性状解析を進めるため、123Sを123Nに置換した組換えJEVクローンを構築し、組換えウイルスを作製した。今後本ウイルスを使用して解析を進めてゆく。［山口幸恵、田島茂、高崎智彦、倉根一郎］

(3) ブタから分離された日本脳炎1型ウイルスのマウスにおける病原性解析（日本脳炎流行予測調査事業）

全国各地のブタ血清中の日本脳炎ウイルスに対する抗体調査を行った。さらにブタ血清より日本脳炎ウイルスの分離を行い、2株の日本脳炎ウイルスを分離した。遺伝子解析の結果いずれも遺伝子型1型日本脳炎ウイルスであった。したがって今後も日本脳炎対策が必要であることが示唆された。［林　昌宏、高崎智彦、田島　茂、大松勉、小滝徹、モイ メンリン、池田真紀子、倉根一郎］

(4) イノシシにおける日本脳炎ウイルス感染実態の調査研究

ヒトの住環境に出現したイノシシを中心に日本脳炎ウイルス感染状況をウイルス学的および血清学的に検討した。平成20年12月上旬に、兵庫県西宮市で捕獲されたイノシシの血液から日脳ウイルスが分離され、国内のブタから分離されたウイルスと近縁であった。また、約15%のイノシシが抗日本脳炎IgG抗体を保有していたが、IgM抗体が陽性であったのは38頭中1頭であった。［高崎智彦、田島茂、林昌宏、小滝徹、倉根一郎、澤辺京子・小林睦生（昆虫医科学部）］

(5) フォーカス(PAP)法を応用したフォーカス計数法による日本脳炎中和抗体価測定法に関する情報提供

これまでに日本脳炎中和抗体価測定法研修会においてパーオキシダーゼ抗パーオキシダーゼ(PAP)法を応用したフォーカス計数法について感染症流行予測調査・日本脳炎感受性調査に参加する地方衛生研究所の各担当者に対して研修を行ったが、これら担当者に対して最新の実験手技､抗体等の実験材料に対する情報を開発･提供した。現在日本脳炎ウイルスの中和抗体価測定法に用いられているプラーク法には約1週間を要するのに対し、フォーカス法においては3日間で結果が得られるため判定までの時間が短縮され、非特異反応も低く、96穴プレートの使用が可能なため、短時間で大量の検体を処理することが可能である。したがって本法は感染症流行予測調査の速やかな情報収集に寄与する。［林昌宏、高崎智彦、倉根一郎］

(6) 日本脳炎ウイルスの活動と気象の関連についての解析

我が国で1965年以来､実施されているブタにおける日本脳炎感染源調査（抗体調査）のデータをもとに夏季の気温（平均気温、最高気温、真夏日の日数など)、降水量と日本脳炎ウイルスとの相関関係を検討し、気温と正の相関をすることを見出した。さらに県単位の地域における相関の強さの相違を調査した。また、国立環境研究所との共同研究としてさらに詳細な気象データを入力し解析基盤を強化した。［柴崎謙一、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎、肘岡靖明（国立環境研究所)］

3. ウエストナイルウイルスに関する研究

(1) ウエストナイルウイルス脳炎等フラビウイルス脳炎における脳内免疫機構の解析

ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスは脳炎をひき起こすフラビウイルスである。これらのウイルス感染における中枢神経系の免疫病態機構を解明した。これらのウイルスの脳内感染で誘導されるT細胞は各ウイルスに特異的なT細胞であり、これらの現象は、明確な症状が認められなくても感染が成立していれば認められた。［藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、林昌宏、倉根一郎、早坂大輔・小池智（東京都神経科学総合研究所)、鈴木隆二（国立病院機構 相模原病院臨床研究センター)］

Ⅴ. その他のアルボウイルスに関する研究

1. チクングニヤウイルスに関する研究

(1) チクングニヤウイルス迅速診断法の開発

現在チクングニヤウイルスの検出に使用しているRT-PCRおよびリアルタイムRT-PCR法に比較してより迅速なHyper RT-PCR法の開発を行った。Hyper RT-PCRの第一の特徴はその迅速性である。これまでのRT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法を用いた遺伝子検出法では1時間以上の時間を要するが本法においては約15分で終了する。またその後の反応産物のアガロースゲルでの解析およびシークエンスでの遺伝子配列の確認も可能であるため通常シークエンス解析のできないLAMP法と異なりチクングニヤウイルスの遺伝子型の解析も容易である。検討の結果チクングニヤウイルスに対して1コピーRNA/sampleの検出感度を示す検出系を確立した。このときフラビウイルスであるデングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト血液由来核酸に対して非特異反応は観察されなかった。[林　昌宏、高崎智彦、倉根一郎、藤本嗣人・小長谷昌未（感染症情報センター)]

(2) チクングニヤ熱輸入症例のサーベイランス

H21年度は9例の輸入症例を確認した。また、成田空港検疫所ではインドネシアから帰国の輸入症例を1例確認した。本患者からはチクングニヤウイルスが分離された。分離ウイルスは2007年にスリランカからの輸入症例から分離されたチクングニヤウイルス等と遺伝子解析した結果アジア型の遺伝子型であった。また、米国CDCから分与いただいた抗アルファウイルス単クローン抗体を2次抗体として用いてIn house IgM捕捉ELISA法の感度および特異性を向上させた。[高崎智彦、林昌宏、モイメンリン、倉根一郎、関西空港検疫所、成田空港検疫所]

2. フラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法の確立

フラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる膜（E）タンパク領域、非構造タンパクであるNS3、NS5領域にそれぞれPCRプライマーを設計し、フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。その結果蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、デングウイルス1-4型、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、ランガットウイルス、ネギシウイルスさらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作製することに成功した。このとき検出感度は 10^{1}-10^{-1} PFU/mlであった。また本プライマーはヒト血液およびカ由来C6/36細胞において非特異反応を示さなかった。したがって本プライマーはフラビウイルス遺伝子を特異的に検出し、フラビウイルス感染症の迅速診断に応用可能であることが示唆された。[林昌宏、高崎智彦、小滝徹、倉根一郎]

3. ベネズエラウマ脳炎、東部ウマ脳炎、西部ウマ脳炎の診断法の確立

平成19年度より施行されている感染症法改正において新たに4類感染症として追加されたベネズエラウマ脳炎については、これまで国内における迅速診断法は確立されていない。そこで血清診断法としてベネズエラウマ脳炎診断用ELISAの確立を目指し、ELISA用抗原としてベネズエラウマ脳炎ウイルス用中空粒子および抗原陽蛋白の作製を試みている。ベネズエラウマ脳炎構造蛋白質発現プラスミドを3種作成し、その発現を確認したところ細胞外への蛋白質の発現は認められるもののその発現効率は低かった。さらに、発現量の高いプラスミドの作製を今後検討し血清診断法を確立していくと共に、アルファウイルス共通単クローン抗体を用いて実験室診断法の確立を進めた。[大松勉、高崎智彦、倉根一郎]

Ⅵ. 神経系ウイルスに関する研究

1. 脳脊髄液を用いたJCポリオーマウイルス遺伝子のリアルタイムPCR検査体制の整備と進行性多巣性白質脳症(PML)の診断支援

PMLは免疫不全患者等において発生する致死的な中枢神経系の脱髄性疾患であり、持続感染したJCポリオーマウイルス(JCV)によって引き起こされる。感度や特異性、侵襲性において優れたPMLの診断技術を確立することを目的として、脳脊髄液を用いたJCVのリアルタ

イム PCR 検査系を確立した。また、全国の医療機関からの検査依頼に対応し、PML の診断支援および発生状況等のデータ解析を行った。平成 21 年度では、神経学的所見や脳 MRI 等から PML が疑われた症例について 34 都道府県から計 139 件の依頼を受け、24 検体（20 症例）を JCV 陽性と判断した。JCV 陽性患者の基礎疾患は HIV 感染症が 6 例、白血病およびリンパ腫等の血液疾患が 7 例、自己免疫疾患（全身性エリテマトーデス）が 2 例、その他の疾患（サルコイドーシス、間質性肺炎等）が 5 例であった。本検査系を用いた診断支援は、医療機関における PML の診断や治療において有用であることが示された。[中道一生、伊藤睦代、倉根一郎、西條政幸]

2. リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス感染症の検査法

アレナウイルス科のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCM ウイルス）は、ネズミなどのげっ歯類が媒介する人獣共通感染症の一つで、唾液、尿、糞などを介してヒトに感染すると、無菌性髄膜炎や脳炎などを引き起こす。日本では人での感染例は報告されていないが、海外ではペットのハムスター等を介して人に感染した例が報告されている。本研究では、LCM ウイルス感染症の診断法の確立を目的とした。組換えバキュロウイルスにより LCM ウイルス組換え核蛋白（NP）発現・精製し、NP に対する単クローン抗体およびポリクローナル抗体を作製した。抗原を特異的に検出するのに有用な単クローン抗体（3 クローン）を用いた。おのおのの単クローン抗体とポリクローナル抗体をそれぞれ捕捉抗体、検出抗体として用いた LCM ウイルス蛋白を検出する抗原検出 ELISA 法を開発した。また、この単クローン抗体を間接蛍光抗体法でウイルス感染細胞に反応させると、特異的に LCM ウイルスに結合していることが明らかにされた。さらに、これらの抗体のエピトープ領域を同定したところ、LCMV-Armstrong 株、WE 株および M1 株で保存されている領域を認識していることが明らかにされた。これらの結果は、本研究で作製された単クローン抗体は、抗原検出 ELISA 法および病理組織中の LCM ウイルス抗原検出に有用であることを示している。[西條政幸、山口一美、王麗欣、中道一生、伊藤睦代、倉根一郎]

3. DNA ポリメラーゼ変異に基づくアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスに関する研究

臓器移植患者を含む免疫不全患者では、単純ヘルペスウイルス（HSV）感染症は難治性で、ウイルス性チミジンリン酸化酵素（vTK）関連薬アシクロビル（ACV）などに対する薬剤耐性 HSV 感染症が誘導されることがある。ACV 耐性 HSV の 95%は変異や欠損に、残りの 5%は DNA ポリメラーゼ変異による。DNA ポリメラーゼ（DNApol）変異による HSV 感染症対策として、ACV、vTK 非関連薬である S2242、DNApol 阻害薬であるフォスカルネット（PFA）に耐性の単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）の性状（薬剤感受性と DNApol 変異）を解析した。クローニングされた HSV-1 をそれぞれ ACV、PFA、または、S2242 薬剤存在下で増殖させ、耐性 HSV-1（ACV 耐性株 3 クローン、PFA 耐性株 27 クローン、S2242 耐性株 15 クローン）を得た。これらのクローンの ACV、PFA、S2242、vTK 関連薬剤であるガンシクロビル（GCV）、ビリブジン（BVdU）、ブロバビル（BVaraU）に対する感受性と vTK 非関連薬剤であるシドフォビル（CDV）に対する感受性をプラーク減少法により測定した。また、すべてのクローンの DNApol におけるアミノ酸変異を同定した。DNApol 変異による耐性クローンのほとんどは、GCV、BVdU、BVaraU に感受性を示した。高度感受性を示すクローンも認められた。一方、ACV 耐性クローンと PFA 耐性クローンは交差耐性を示す傾向が認められた。約半数の耐性クローンのアミノ酸変異は、保存領域 II と III にクローンで認められた。BVDU は、帯状疱疹に対する薬剤として使用されている。また、GCV や CDV はサイトメガロウイルス感染症に対して用いられている。これらの薬剤は比較的使用しやすい薬剤であることから、vTK 遺伝子に変異がなく、DNApol 変異による ACV または PFA 耐性 HSV-1 感染症が出現した場合には、比較的副作用の少ない BVDU や GCV を用いるのがよいと考えられる。[王麗欣、山口一美、中道一生、伊藤睦代、倉根一郎、西條政幸]

4. 組換え単純ヘルペスウイルスのチミジンリン酸化酵素の発現と迅速な薬剤感受性試験法の開発：HSV-2 および VZV への応用

単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）、2 型（HSV-2）

および水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)による感染症は、アシクロビル（ACV）などのウイルス性チミジンリン酸化酵素（vTK）関連薬剤により治療される。本年度は、293T 細胞に組換え vTK を一過性に発現させ、vTK 欠損 HSV-1 感染時の薬剤の増殖抑制効果を測定することによる薬剤感受性試験成績を迅速に得るシステムの、HSV-2 および VZV の ACV に対する感受性を測定する上での有用性を検討した。ACV 感受性 TAS および TK 欠損 ACV 高度耐性 HSV-1 TAR を本システムのコントロールウイルスとして用いた。ACV 感受性 HSV-2 UW268 株および vTK 遺伝子に変異のある種々の ACV 耐性 HSV-2 の vTK を、発現ベクターを用いて 293T 細胞で一過性に発現させた。各々の HSV-2 の vTK 発現 293T 細胞における ACV の HSV-1 TAR に対する増殖抑制効果を yield reduction assay 法で検討した。ACV と BVDU の各濃度における HSV-1 TAR の vTK 発現 293T 細胞における増殖程度は、プラークアッセイ法で解析した。 ACV 感受性 HSV-2 の vTK が発現された 293T 細胞では、40μg/ml の ACV により HSV-1 TAR の増殖は強く抑制されるのに対し、TK 遺伝子にフレームシフト変異の認められる高度耐性株の vTK 発現細胞では全く抑制されなかった。一方、アミノ酸変異による ACV 耐性株 10 クローンの半数は本システムで ACV 耐性と判定されたが、残りの半数は ACV 感受性と判定された。また、VZV の vTK の発現細胞を用いて、同様の検討を行ったところ、VZV の ACV やビリブジン（BVdU）への感受性を判定することが可能であった。［塩田智之、森川茂、倉根一郎、西條政幸］

Ⅶ. ヘルペスウイルスに関する研究

1. 水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）に関する研究

(1) 新規抗 VZV 化合物の作用機序の解析

レポーター細胞を用いたスクリーニングにより、9600 種類のランダム化合物ライブラリーから同定した VZV に対し高い増殖阻害効果を示した化合物 141B3 及び 35B2 を解析した。プラ―ク減少試験の結果、141B3 及び 35B2 の 50%効果濃度は、それぞれ 0.31μM と 0.40μM であり、VZV に対して有効であるアシクロビルよりも低濃度で効果があることがわかった。リアルタイム PCR を用いた細胞内の VZV の DNA 量の解析から、DNA 複製もしくはそれ以前の過程を両化合物共に阻害していることがわかった。また、ウイルス抗原、mRNA 発現の阻害について検討し、141B3 処理で前初期（IE）発現が見られなくなっているのに対し、35B2 では見られることがわかった。また、35B2 は IE62 の初期遺伝子の転写活性化機能を阻害しないことが明らかになった。以上の結果から、141B3 はウイルス侵入以降前初期 mRNA 発現以前のプロセス、35B2 は初期転写活性化より後 DNA 複製より前のプロセスを阻害する化合物であることがわかった。［東知寿香、福井良子、松下実理、山口十四文(帝京科学大)、倉根一郎、井上直樹］

2. サイトメガロウイルス（CMV）に関する研究

(1) 先天性 CMV 感染スクリーニングのパイロット調査と感染児のフォローアップ

我々が開発した尿濾紙によるマススクリーニング法を用いて新生児 1 万 1 千例について先天性感染を検討した。昨年度までの結果と併せ 17、656 新生児中 57 例が CMV 陽性、即ち、先天性 CMV 感染児であった。尿や乾燥臍帯など追加検体を得て最終的に全例について先天性感染を確認した。このうち、19%（11 例）が明確な臨床症状を出生時に示し、これに加えて 9 例が低体重出生などであったため全体として 35%程度に先天性感染の影響が出ていた。すべての同定した先天性 CMV 感染児について、CT 検査、ABR 聴覚検査、発達検査などのフォローアップを行なっている。［井上直樹、津田美穂子、福井良子、山田壮一、倉根一郎、こども家庭総合研究事業(研究代表者：藤枝憲二)参加医療機関］

(2) CMV ゲノムタイプ解析を利用した感染経路の検討

先天性 CMV 感染児 57 例中 37 例に年長同胞があり、現在までに、そのうちの 18 例について感染児と CMV 遺伝子配列の比較を行うことができた。遺伝子型が多く型間配列も大きく異なる gN や UL144 などの遺伝子の塩基配列を解析したところ、2 例を除きすべてのペアで配列の完全な一致が見られた。従って、外部で感染を受けた年長同胞が尿・唾液などに排泄したウイルスにより、妊婦の感染が発生したものと考察され、ワクチン開発の重要性

が指摘できる。なお、遺伝子型は様々な組合せであることから、特定の遺伝子型株が、先天性感染に関与するわけではないとみられる。[井上直樹、津田美穂子、福井良子、倉根一郎]

(3) モルモット CMV（GPCMV）糖蛋白の抗原性の検討

胎盤構造の違いからマウスやラット CMV はヒト CMV のような経胎盤感染をおこさないため、GPCMV が唯一の小動物先天性感染動物モデルである。これまで、GPCMV ゲノム中に存在する特定の 1.6kb 領域が個体での増殖に必須であることを明らかにし、さらに、この領域にヒト CMV(HCMV)の UL128 および UL130 と相同性をもつ GP129 および GP131 がコードされ、HCMV で内皮や上皮細胞への感染指向性を決定することが明らかにされつつある UL130 などと類似した機能を持つことを示した。UL128 及び UL130 は、中和の標的となることから、サブユニットワクチンの有力な抗原候補となる可能性がある。そこで、GPCMV のホモローグである GP129、GP131 がコードする糖蛋白を用いて、その可能性を個体レベルで検討することにした。そのために、GPCMV の糖蛋白 gB、gH、gL、 gO、 GP129、 GP131 およびガラクトシダーゼを発現する計 7 種の組換えアデノウイルス（Ad）を作製した。GP131 発現 Ad（Ad-GP131）の GP131 蛋白の発現を確認し、GPCMV 感染モルモットの血清を用いた間接蛍光抗体法により、モルモット血清中に GP131 蛋白に対する抗体が存在することを確認した。よって、GP131 蛋白は抗体を誘導するための強い抗原になる可能性があることが示唆された。[加藤みなみ、山田壮一、橋本楓、福井良子、倉根一郎、井上直樹]

(4) GPCMV のゲノム構造の解析

GPCMV の分子生物学的解析を目的として ATCC より購入した 22122 株 GPCMV を 5 回継代したストック（ATCC-P5）のウイルス DNA をクローニングし、これまでに全塩基配列を決定し、その解析を進めていた。最近、UMN グループにより in vitro で長期継代培養された 22122 株 GPCMV から得られた BAC クローンを基にした全塩基配列が報告された。我々のものと UMN が決定した配列とを比較したところ 359 箇所異なっていた。HCMV では、新鮮分離株を長期継代培養した場合に、多くの変異が導入されることが知られている。そこで、ATCC-P5 ストックを感染させたモルモットの唾液腺から分離したウイルスを in vitro で 3 回継代した SG-P3 を用いて、ダイレクトシークエンスにより基準となるべき個体に感染可能な GPCMV 株の配列を決定した。解析が不可能なリピート領域を除き、SG-P3 配列と ATCC－P5 配列は全ゲノム領域で同一であることが確認された。個体で増殖可能な我々のウイルス株の配列と比較すると、UMN 株では 27 個の ORF に構造変化があった。[金井亨輔、山田壮一、福井良子、倉根一郎、井上直樹]

(5) In vivo imaging による抗ヘルペスウイルス薬の個体での迅速評価系の確立

核酸基質アナログである抗ヘルペスウイルス薬は有効な反面、耐性の出現、副作用、投与法の制約などから作用機序の異なる薬剤の開発が求められている。我々は、in vitro において迅速簡便に CMV の力価を測定できるレポーター細胞株を樹立し、この細胞株を用いてランダム化合物 9600 種類よりいくつかの抗 CMV 化合物を同定してきた。こうした新規薬剤を in vivo において評価しようとするためには、多数の動物を用い、病理学的解析や臓器からのウイルス DNA 抽出等、多大な労力および時間を必要とする。そこで、in vivo での抗ウイルス効果の迅速評価法確立を目的として、GFP 発現組換えマウスサイトメガロウイルス(MCMV-GFP)を用いた in vivo imaging による簡便な薬剤評価系の構築を試みた。BALB/c マウスの背中に MCMV-GFP を皮下接種し、接種後 6 日間、Maestro in-vivo イメージングシステムを用いて経時的に蛍光の観察を行った。接種翌日から接種部位及びその周囲に GFP の特異的蛍光が 2 日目頃をピークとして観察された。また、蛍光強度とウイルス接種量との間には相関関係が認められた。MCMV-GFP を皮下接種した後 ganciclovir (GCV) を投与したところ、50mg/kg/日皮下投与および 100mg/kg/日腹腔投与により、非投与群と比較して平均蛍光強度の有意な減少が認められた($p<0.01$)。このことから、この系は個体での評価に値する化合物の初期評価として有用であると考えられた。[山田壮一、矢代恵子、福井良子、福地早紀、片野晴隆(感染病理部)、小杉伊佐夫（浜松医大）、河崎秀陽（浜松医大）、新井義文（浜松医大）、倉根一郎、井上直樹]

Ⅷ. リケッチアに関する研究

1. リケッチアに関する研究

(1) 日本国内のリケッチア症実験室診断に関する状況調査

国内のリケッチア感染症の診断とレファレンス体制構築における課題と改善方法を明確にし、実験室診断体制をより安定したものにすることを目的に、つつが虫病と日本紅斑熱の実験室診断の主体である地方衛生研究所の検査実施状況について調査を行った。全国衛生微生物技術協議会に参加の地方衛生研究所 77 箇所を対象に、リケッチア症(つつが虫病および日本紅斑熱)実験室診断の実施状況をアンケート調査した。血清診断、遺伝子診断、分離までの充実した施設がある一方、つつが虫病は商業検査機関において一部血清診断が実施可能なことから、日常業務から除外している施設もあり、全国的には実施施設が減少している。今回の各調査項目をより多角的に解析すると共に、商業検査機関の情報収集とあわせ、より効率的な検査体制の構築と安定強化のための施策を検討する必要がある。［安藤秀二、坂田明子］

(2) 病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析

つつが虫病の起因菌 *O.tsutsugamushi* の発現タンパク質に注目し、Karp 株と Kuroki 株を 2 次元電気泳動により解析し、その発現パターンを比較した。２つの株間で発現パターンは大きく異なっており、病原性との関連が示唆された。一方で、発現量が多く、株間で共通に発現しているタンパク質が検出された。その中で特に主要なものは、56kDa 型特異的抗原、熱ショックタンパク質、セリンプロテアーゼ、ペプチド伸張因子であることが質量分析により同定された。機能が生存に必須であることから、本菌の偏性細胞内寄生細菌としての生存に重要な役割を担っている可能性が示唆された。［小川基彦、大内史子・萩原健一（細胞化学部）、松谷峰之介（山口大・農学部・生物機能科学）、内山恒夫（徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部）］

(3) リケッチアの重感染に関する研究

種々の細胞に複数種のリケッチアが重感染した場合の増殖について検討した。マダニ由来の DALBE3 細胞の場合、同時感染あるいはチフス群の *Rickettsia typhi* 感染 3 日後に重感染した紅斑熱群の *R. japonica* は増殖したが、*R. typhi* の増殖は抑制を受けた。これとは逆に昆虫由来の AeAl2 細胞では、同時感染あるいは *R. japonica* 感染 3 日後に *R. typhi* を重感染した場合、*R. typhi* は増殖したが、*R. japonica* は増殖抑制を受けた。また、また、哺乳動物由来の Vero 細胞では、いずれの場合も、両リケッチアともに単独で感染した場合と同程度の増殖が見られた。人に複数種のリケッチアが感染した場合、単独で感染した場合よりリケッチア産生量が多くなり、重症化につながる可能性があることが示唆された。［内山恒夫・岸真帆美(徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部)、小川基彦］

(4) リケッチア Sca 外膜蛋白質の細胞への付着侵入能の解析

リケッチアの sca 外膜蛋白質の働きを明らかにする目的で、これらの蛋白質を外膜上に発現する大腸菌を作製し、種々の細胞への接種実験を行った。哺乳動物由来 Vero 細胞には Sca0、Sca5 発現大腸菌は付着侵入したが、細胞内侵入後に不活化され、増殖は認められなかった。Sca3 発現大腸菌は Vero 細胞には付着しなかった。また、マダニ由来 ISE6 細胞にはいずれの大腸菌も付着しなかった。これらの結果からリケッチアの哺乳動物細胞への付着侵入に関与するのは Sca0、Sca5 であり、Sca3 は関与しないと考えられた。一方で、ダニ細胞にはこれらの外膜蛋白質の発現大腸菌は付着せず、付着侵入能は他の分子が担っていることが考えられた。［内山恒夫、岸真帆美 (徳島大院・ヘルスバイオサイエンス研究部)、小川基彦］

(5) リケッチア迅速検出法の開発

薬剤に対する感受性が共通の様々なリケッチア属は、属を迅速に決定できれば、治療方針の決定等を含め様々な対応を迅速に進めることができる。各種検体からの迅速かつ特異的なリケッチア属迅速ＤＮＡ検出・同定法の開発を目指した。ゲノム解析の終了しているリケッチアゲノム配列情報から、リケッチア属間で共通に高度に保存され、かつ他の生物の遺伝子に比して特異性の高い遺伝子群（リケッチア特異的オーソロググループ）に着目

し、リケッチア属特異的なオルソログループが全 10 種類存在することを明らかにし、Real-time PCR、へ適応させた。これまで開発したプライマー、プローブを組み合わせ、試行全リケッチアを検出できるもの、Typhus 群のみを検出するもの、Typhus 群以外すべてを検出するもの等を開発した。プローブセットの検出感度は、試行全リケッチアを特異的かつ高感度に検出し、一時間以内に 1 コピーの合成 DNA を検出できた。[花岡希、坂田明子、安藤秀二、松谷峰之介・東慶直・白井睦訓(山口大学)、岸本寿男(岡山県環境保健センター)]

(6) LAMP 法によるリケッチア簡易迅速診断系の開発

これまで開発してきた Real-time PCR 系の迅速診断法は、蛍光プローブ系は高コストで、専用機器等が必要であり、環境の整っていない場では活用できないというデメリットから、安価かつ簡易的な検出法として、一定温度条件で濁度により検出可能なLAMP法の開発を行った。リケッチア属特異的保存 ORF を標的とし、数十種類のプライマーセットをスクリーニングした結果、１種類のプライマーセットが供試したすべてのリケッチア菌種の DNA を検出できた。また、Loop-primer を適応させ、60 分以内に 100 コピーの DNA を検出可能であった。蛍光試薬（Loopamp 蛍光目視検出試薬[栄研化学]）を用いた検出結果に差は確認できなかった。検出感度が、100 コピーまでと、Real-time PCR と比較すると若干低感度であるが、屋外環境等フィールドへの応用や簡便さの利点から非常に有用な検出系である。[花岡希、坂田明子、安藤秀二、松谷峰之介・東慶直・白井睦訓(山口大学)、岸本寿男(岡山県環境保健センター)]

(7) リケッチア症ならびに関連リケッチアに関する野外調査

所内外の研究者の協力の下、リケッチア症の新規感染者が確認された地域や調査をより行う必要のあった地域を中心に、沖縄県、鹿児島県、鳥取県、岡山県、北海道等において野外調査を実施し、採取した各種材料を用いて多様なリケッチアに関する解析を行った。[安藤秀二、坂田明子、花岡希]

Ⅸ. クラミジアに関する研究

1. クラミジアに関する研究

(1) オウム病の発生リスクに関する研究

オウム病は、 *Chlamydophila psittaci(C. ps)*を保有する鳥類が、繁殖期などのストレスがかかった時期に、高率に *C. ps* を含む排泄物を出すことにより、人への感染リスクが高まると考えられている。感染源として注意を要する鳥類の個体群に関して、経時的に糞便を採取、*C. ps* を検出することにより、季節的な変動を把握し、その対処法について考察した。今回、埼玉県で見つかった *C. ps* 保有群の排泄状況を通年で追い、夏から秋にかけて排出率のピークを認めた。従来より鳥の繁殖季節と重なる春から夏にかけて実際の患者発生状況がパラレルである。今回の対象は一群、一年間だけであり、個体群、単年度、地域特性などのバイアスの可能性もある。また、愛玩鳥のように閉鎖空間で人と密接に接するものと、野外に生息する鳥類の人との接触密度は明らかに異なる。今後、同群の経過を数年にわたって観察するとともに、既存の数少ない調査データなどとも共に比較検討する必要がある。その上で個体群の管理を含め、オウム病感染リスクを減ずるための鳥類との接触の仕方について科学的情報の提供を考慮する必要がある。[近真理奈・山本徳栄（埼玉県衛生研究所)、安藤秀二]

Ⅹ. その他の研究

1. バイオセーフティに関する研究

(1) 緊急対応事例にみる輸送の実地研修と情報の更新の必要性の検証

2009 年 5 月に始まった新型インフルエンザ(以下、新型フル)対応の検査実施に関連し、全国からの検体搬送において、現場の混乱を招いた。その原因を記録として残すとともに、混乱の改善までの流れを追い、感染性物質の輸送に関する教育と情報更新の必要について考察した。研究班で全ての衛研を対象とした輸送に関するワークショップが実施され、その後、地域に即した伝達講習、情報の共有の状況によって混乱の差が大きくなったと推測される。輸送というバイオリスク管理における一つの項

目だけでも、情報発信の繰り返し、整理・更新、情報発信の一元化または内容の整合性の確認などバイオリスク管理にかかわる情報の継続的発信・更新方法を検討することが必要である。［安藤 秀二］

(2) バイオリスク管理研修の実践に関する研究

世界保健機関は Train-the-Trainer の研修を開催したが、これに参加するには時間と費用の負担が生じる。また、定期開催もされておらず、受け入れ人数も少ないことから、地域、施設ごとの認定プログラムの立ち上げが期待されている。日本には、国家認定の仕組みが無いことから､外部評価を受けた教育プログラムは存在していない。海外のプログラムを参考に、国際基準に従って国内独自の研修プログラムの検討を行った。本年度は、検査技師や危機管理担当者を養成する学部の学部生や、研究を開始した大学院生などを対象に、昨年実施した英国のプログラムを改良して運用し、受講者による評価を受けた。［安藤 秀二､重松 美加 (感染症情報センター)､藤本 秀士 (九州大学大学院医学研究院保健学部門)］

2. 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

染色体の解析は種・亜種の同定に際し遺伝学的手段として必須のみならず、先天性染色体異常症の診断など医学的にも重要な手段である。また染色体は後天的に放射線や環境変異原物質などにより損傷を受け、これら傷害による発癌や晩発傷害の解決も医学的に大きな課題であり、染色体の解析は遺伝子の損傷を評価するための必須の手段である。しかしながら遺伝子の損傷の程度が大きくなると、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染色体解析そのものが不可能となっていた。未成熟染色体凝縮法はこの限界を克服する技術であり、オカダ酸あるいはカリクリンＡなどの蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤により極めて簡便で効率的に 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り、放射線生物学、環境変異原学、あるいは出生前診断などの広い分野に応用されている。［後藤英介］

3. 染色体凝縮機構を制御する遺伝子・蛋白質の系統的検索

真核細胞の遺伝子は分裂中期に凝縮し娘細胞に正確に分配されることにより遺伝情報が次世代細胞へと引き継がれる。染色体が凝縮することは遺伝子の正確な分配のために必須の機構であり、その制御に異常を来たすと、致死､先天性奇形､発癌などの様々な問題を引き起こす。従ってその制御に関連する遺伝子・蛋白質群を系統的に検索することは発癌などのメカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。上記化学薬剤による PCC 法と siRNA を組み合わせることにより染色体凝縮に影響を与える遺伝子・蛋白質群の系統的検索を行い、制御に関わる責任遺伝子を特定することを研究目的とする。［後藤英介］

レファレンス業務

1. フラビウイルスに関する行政検査

デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスに関する病原体診断、血清診断を行政検査依頼に基づき、デング熱４件、ウエストナイルウイルス１件について実施した。［田島茂､大松勉､林昌宏､高崎智彦､倉根一郎］

2. 地方衛生研究所への日本脳炎流行予測調査用日本脳炎標準中和抗体の配布

日本脳炎流行予測調査で使用する日本脳炎標準中和抗体を日本脳炎流行予測調査に参加している10機関の地方衛生研究所に配布した。［林昌宏、高崎智彦、倉根一郎］

3. クラミジアならびにリケッチア性関連疾患（輸入例含む）の検査

肺炎クラミジア、オウム病クラミジア、性器クラミジア、つつが虫病、日本紅斑熱、輸入リケッチア症、Q 熱について検査(血清学的、分子生物学的、生物学的検査・実験室診断)を実施している。平成 21 年の行政検査においては、オウム病 1 例 3 検体、リケッチア症 10 例 22 検体を実施した。また、その他の検査依頼としてクラミジア 8 例 18 検体、リケッチア 21 例 51 検体、Q 熱 1 例 1 検体を実施している。さらに、不明疾患ならびにマダニのヒト刺咬症例のリケッチア症との関連を多数検査検討

した。［安藤秀二、坂田明子］

品質管理に関する業務

1. 乾燥細胞培養痘そうワクチンの国家検定

平成 21 年度は、1 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、合格と判定した。［緒方もも子、水谷哲也、森川茂、倉根一郎］

2. 日本脳炎不活化ワクチンの国家検定

平成 21 年度は 37 ロットの日本脳炎ワクチンの国家検定を実施し、37 ロットすべてを合格と判定した。［田島茂、林昌宏、大松勉、小滝徹、池田真紀子、高崎智彦、倉根一郎］

3. 黄熱ワクチンの依頼検査

平成21年度は2ロットの黄熱ワクチンの依頼検査を実施し、いずれも適と判定した。［林昌宏、小滝　徹、田島茂、大松勉、高崎智彦、倉根一郎］

4. 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの国家検定

平成 21 年度は、1 ロット（RB11）の乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチンの国家検定（不活化試験および力価試験）を実施し、合格と判定した。［伊藤睦代、中道一生、大松勉、福士秀悦、高崎智彦、林昌宏、西條政幸、倉根一郎］

5. 水痘ワクチンの検定

水痘抗原国家検定 1 ロット、乾燥弱毒生水痘ワクチン国家検定 7 ロット、輸出用ワクチン依頼検査 15 ロットを実施し、全ロットとも合格であった。［井上直樹、山田壮一、福井良子、倉根一郎］

6. クラミジア体外診断薬の承認前試験

Chlamydia trachomatis の抗原検出ならびに核酸増幅キットの各 1 件について承認前試験の申請にもとづく書類審査を行った。［安藤秀二］

国際協力関係業務

1. 日本脳炎世界特別ラボラトリー

世界保健機関（WHO）日本脳炎世界特別ラボラトリーとして、血清診断のためのパネル血清およびパネル髄液候補検体を評価した。フォーカス(PAP)法を応用したフォーカス計数法による日本脳炎中和抗体価測定法に関して作成した研修用テキスト（英語版）を用いて WHO 西太平洋域内の日本脳炎実験室診断レファレンス実験室に普及を図った。また、WHO によりソウルで開催された第 1 回日本脳炎実験室診断実習コースにおいて講演、指導を行った。［高崎智彦、池田真紀子、林昌宏、小滝　徹、田島茂、大松勉、倉根一郎］

2. ベトナム国立衛生研究所強化プロジェクト

国際協力機構のベトナム国立衛生研究所強化プロジェクトの一環として、BSL3 実験室での作業を考慮したリケッチア実験室診断の技術指導のため、SOP 作成を含む現地での指導を 6 月及び 3 月におこなった。［安藤秀二］

発　表　業　績　一　覧

Ⅰ．誌　上　発　表

1．欧文発表

1) Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa, Y., Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, Sata T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. Pathology International 59:555-566, 2009.

2) Sah OP, Subedi S, Morita K, Inoue S, Kurane I, Pandey BD. Serological study of dengue virus infection in Terai region, Nepal. Nepal Medical College Journal 11:104-106, 2009.

3) Kurane I. BSL4 facilities in anti-infectious disease measures. Journal of Disaster Research 4:352-355, 2009.

4) Kurane I: The emerging and forecasted effect of climate change on human health. Journal of Health Science 55:865-869, 2009.

5) Kurosawa Y, Kurane I, Yamamoto A. Observation of

Japanese encephalitis virus particles on ceramic hydroxyapatite by scanning electric microscopy. Medicine and Biology 153:607-610, 2009.

6) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizitani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. Journal of General Virology 90:2266-2271, 2009.

7) Satoh T, Dieng H, Mizutani T, Eshita Y, Miyata T, Talukder P, Kashige N, Ahmad AH, Miake F. Fluorescence can be used to trace the fate of exogenous micro-organisms inside the alimentary tract of mosquitoes. Journal of Parasitology and Vector Biology 1:13-18, 2009.

8) Watanabe S, Ueda N, Iha K, Joseph SM, Fujii H, Phillip A, Mizutani T, Maeda K, Yamane D, Azab W, Kato K, Kyuwa S, Tohya Y, Yoshikawa Y, Akashi H. Detection of a new bat gammaherpesvirus in the Philippines. Virus Genes 39:90-93, 2009.

9) Sunohara M, Morikawa S, Murata H, Fuse A, Sato I. Modulation mechanism of c-Mpl promoter activity in megakaryoblastic cells. Okajimas Folia Anatomica Japonica 86:89-91, 2009.

10) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. Journal of Medical Virology 81:1102-1108, 2009.

11) Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Archives of Virology 154:153-158, 2009.

12) Nakamura S, Yang CS, Sakon N, Ueda M, Tougan T, Yamashita A, Goto N, Takahashi K, Yasunaga T, Ikuta K, Mizutani T, Okamoto Y, Tagami M, Morita R, Maeda N, Kawai J, Hayashizaki Y, Nagai Y, Horii T, Iida T, Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach. PLoS ONE 4:e4219, 2009.

13) Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S, Mizutani T. Novel reovirus isolation from an Ostrich (Struthio camelus) in Japan. Veternary Microbiology 134:227-232, 2009.

14) Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. Clinical and Vaccine Immunology 16:1132-1138, 2009.

15) Mizutani T. Characterization of signaling pathways in cells infected with SARS-CoV. *in* Host Gene Responses to RNA Viral Infection. Edited by Yang D. World Scientific Publishing, pp321-344, 2009.

16) Shirato K, Mizutani T. Replication, transcription, and translation of coronaviruses. *in* Viral Genomes. Edited by Freng Z and Long M) Nova Publishers, pp.159-167, 2009.

17) Eshita Y, Higashihara J, Onishi M, Mizuno M, Yoshida J, Takasaki T, Kubota N, Onishi Y. Mechanism of introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-dextran-MMA graft copolymer as non-viral gene

carrier. Molecules 14:2669-83, 2009.

18) Takahashi H, Ohtaki N, Maeda-Sato M, Tanaka M, Tanaka K, Sawa H, Ishikawa T, Takamizawa A, Takasaki T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Kurata T, Kojima A. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. Microbes and Infections 11:1019-28, 2009.

19) Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the Fcγ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody enhancement of dengue virus infection. Journal of General Virology 91:103-111, 2010.

20) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. Journal of Virological Methods 163:205-209, 2010.

21) Lim CK, Nishibori T, Watanabe K, Ito M, Kotaki A, Tanaka K, Kurane I, Takasaki T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: isolation of two sub-strains with different characteristics. American Journal of Tropical Medicine and Hygine 81:865-868, 2009.

22) Takasaki T, Kotaki A, Lim CK, Tajima S, Omatsu T, Meng Ling Moi , Kurane I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. Journal of Disaster Research, 4 : 322-328, 2009.

23)Aoyama I, Uno K, Yumisashi T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Kase T, Takahashi K. A case of Chikungunya fever imported from India to Japan, follow-up of specific IgM and IgG Antibodies over a 6-month period. Japanese Journal of Infectious Diseases 63:65-66, 2010.

24) Hoi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in Dengue virus neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests with Fcγ receptor (FcγR)-negative and FcγR-expressing BHK-21 cells. Clinical and Vaccine Immunology 17:402-407, 2010.

25) Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. Internal Medicine 49:501-5, 2010.

26) Tajima S, Nerome R, Nukui Y, Kato F, Takasaki T, Kurane I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. Virology 396:298-304, 2010.

27) Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Omatsu T, Kurane I. Dengue importations into Japan from Bali. ProMed, March 29, 2010, available from [http://www.promedmail.org], archive no.20100329.09. 2010.

28) Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Sakamoto M, Kobayashi K, Kurane I. Dengue importations into Japan from Tanzania. ProMed, March 23, 2010, available from [http://www.promedmail.org], archive no. 20100323.0922. 2010.

29) Nukuzuma S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Takegami T. Inhibitory effect of serotonin antagonists on JC virus propagation in a carrier culture of human neuroblastoma cells. Microbiology and Immunology 53: 496-501, 2009.

30) Nukuzuma S, Kameoka M, Sugiura S, Nakamichi K, Nukuzuma C, Miyoshi I, Takegami T. Archetype JC virus efficiently propagates in kidney-derived cells stably expressing HIV-1 Tat. Microbiology and Immunology 53: 621-628, 2009.

31) Yagi T, Hattori H, Ohira M, Nakamichi K, Takayama-Ito M, Saijo M, Shimizu T, Ito D, Takahashi K, Suzuki N. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome , a rare

manifestation of sarcoidosis , without steroid therapy responding to cidofovir. Clinical Neurology and Neurosurgery 112:153-156, 2010.

32)Morimoto K , Saijo M. Imported rabies cases and preparedness for rabies in Japan. Journal of Disaster Research 4:346-357, 2009.

33) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Diagnostic systems for viral hemorrhagic fevers and emerging viral infections prepared in the National Insititute of Infectious Diseases. Journal of Disaster Research 4:315-321, 2009.

34) Saijo M. Emerging and re-emerging infection threats to society. Journal of Disaster Research 4:291-297, 2009.

35) Yamada S, Nozawa N, Katano H, Fukui Y, Tsuda M, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N. Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes , UL128, and UL130. Virology 391:99-106, 2009.

36) Kurashina Y, Liu X, Kato C, Inoue N, Saneyoshi M, Yamaguchi T. Influence of 3'-azido-2', 3'- dideoxyguanosine tretmenton telomere length in human telomerase-immortalized human fibroblast cells. Nucleic Acids Symposium Series 53:249-250, 2009.

37) Otsuka T, Gomi Y, Inoue N, Uchiyama M. Varicella transmitted from a healthy vaccinee with herpes zoster, Japan. Emerg Infec Dis 15:1702-1703, 2009.

38) Nozawa N, Fang-Hoover J, Tabata T, Maidji E, Pereira L. Cytomegalovirus-specific, high-avidity IgG with neutralizing activity in maternal circulation enriched in the fetal bloodstream. Journal of Clinical Virology Suppl 4:S58-63, 2009.

39) Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T, Tsujimura K, Madbouly H, Yamaguchi T, Ohya K, Fukushi H. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of Equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. Virology 400:259-270, 2010.

40) Okuno K, Takashima K, Kanai K, Ohashi M, Hyuga R, Sugihara H, Kuwamoto S, Kato M, Sano H, Sairenji T, Kanzaki S, Hayashi K. Epstein-Barr virus can infect rabbits by the intranasal or perioral route: An animal model for natural primary EBV infection in humans. Journal of Medical Virology 82:977-986, 2010.

41) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata A, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, Ando S. Diagnostic assay for *Rickettsia japonica.* Emerging Infectious Diseases 15:1994-1997, 2009.

42) Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H. Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. Emerging Infectious Diseases 15:1528-1530, 2009.

43) Matsui T, Kobayashi J, Satoh H, Fujimoto T, Okabe N, Ando S, Kishimoto T, Yamamoto S. Surveillance recognition, and reporting of Tsutsugamushi disease (Scrub typhus) and Japanese spotted fever by general practice clinics in Miyazaki Prefecture, 2007. Journal of Infection and Chemoterapy 15:269-272, 2009.

44) Kishimoto T, Ando S, Numazaki K, Ouchi K, Yamazaki T, Nakahama C. Assay of *Chlamydia pneumoniae*-specific IgM antibodies by ELISA method―reduction of non-specific reaction and resetting of serological criteria by measuring IgM antibodies. Japanese Journal Infectious Diseases 62:260-264, 2009.

45) Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S. Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive

control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. Microbiology and Immunology 53: 305-308, 2009.

46) Ogawa M, Shinkai-Ouchi F, Matsutani M, Uchiyama T, Hagiwara K, Hanada K, Kurane I, Kishimoto T. Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. Clinical Microbiology and Infection Suppl 2:239-240, 2009

47) Uchiyama T, Ogawa M, Kishi M, Yamashita T, Kishimoto T and Kurane I. Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. Clinical Microbiology and Infection Suppl 2:332-3, 2009

2．和文発表

1)倉根一郎．感染症への地球温暖化影響．地球環境 14:279-298，2009.

2)森川茂.フィリピンにおけるレストンエボラウイルスのブタ等に与える影響．LABIO 21:36-38，2009.

3)西條政幸.アレナウイルス.臨床と微生物 37:113-116，2010.

4)西條政幸．目に見えない敵と闘った者たち．ミルシル 2:7-10，2009.

5)西條政幸．エボラ出血熱とマールブルグ出血熱に関する最近の研究．小児科臨床 62:1931-1935，2009.

6)水谷哲也．新興ウイルス感染症の網羅的検出方法（RDV法）の確立と畜産分野への応用の可能性．獣医畜産新報（文永堂出版）62:821-822，2009.

7）水谷哲也．網羅的ウイルスゲノム検査［新しいウイルス］．臨床と微生物 36:239-244，2009.

8）水谷哲也．川崎病ウイルス病因説．アクチュアル小児科診療 -Actual Series of Clinical Pediatrics. 「川崎病のすべて」(総編集:五十嵐隆,専門編集:石井正浩):pp30-31，2009.

9)田島茂,高崎智彦.日本脳炎.診断と診療 97:2097-2100,2009.

10）モイメンリン，高崎智彦．アジア渡航米国人における日本脳炎の３症例．2003～2007 年－米国．Infectious Agents Surveillance Report 30:244-245，2009.

11)江下優樹，東原絢子，大西政康，水野正明，吉田純，住吉秀明，吉岡秀克，高崎智彦，石川雄一，久保田直治，大西靖彦.DEAE-デキストラン共重合体を非ウイルス性遺伝子導入キャリアーとして用いた，培養細胞への外来遺伝子導入.大分大学工学部研究報告 57:1-8，2010.

12)高崎智彦．フラビウイルス脳炎．Brain and Nerve 61:145-151，2009.

13)高崎智彦.感染症ごとにみたウイルス感染症の診断と対策「日本脳炎・ウエストナイル熱」.臨床検査 53:77-81，2009.

14)高崎智彦．ウエストナイル熱・脳炎．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス pp28-29，2009.

15)大松勉，高崎智彦．カリフォルニア脳炎．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス社 pp38-39,2009.

16)林昌宏，高崎智彦．セントルイス脳炎．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス社 pp52-53，2009.

17)安藤秀二．ロッキー山紅斑熱．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス社 pp201-203，2009.

18)安藤秀二，高橋聡．Q 熱．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス社

pp193-194，2009.

19)馬原文彦，安藤秀二．日本紅斑熱．ズーノーシスハンドブック(岸本寿男，山田章雄 編)，メディカルサイエンス社 pp198-200，2009.

20)安藤秀二．リケッチア性紅斑熱．化学療法の領域 26:240-248，2010.

21)飯島義雄，秋吉京子，田中忍，貫名正文，伊藤正寛，春田恒和，井上明，安藤秀二，岸本寿男．とり展示施設におけるオウム病集団発生事例．感染症学雑誌 83:500-505，2009.

22)中橋伸江, 山本貴子, 馬場俊一, 川端寛樹, 安藤秀二, 照井正. Ixodes holocyclus によるマダニ刺咬症の 1 例. 臨床皮膚科 63:159-161，2009.

Ⅱ．学 会 発 表

1. 国際学会

1) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N，Hasegawa H，Ogata M，Iizuka I，Shiota T，Fukushi S，Mizutani T，Sata T，Kurata T，Kurane I，Morikawa S. Pathology of monkeypox in nonhuman primates leading to the difference in virulence between Gongo Basin and West African strains. 43rd Annual Meeting f the US-Japan Cooperative Medical Science Program and Special Minisymposium on Enterovirus 71，Philadelphia，PA，July 2009.

2) Bukbuk DN，Saijo M，Georges-Courbot MC，Marianneau P，George A，Shuetsu F，Mizutani T，Kurata T，Kurane I，Morkawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based diagnosis of and seroepidemiological study on Lassa fever. The 109th ASM General Meeting，Philadelphia，PA，May 2009.

3) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Kato K, Tohya Y, Mizutani T, Morikawa S, Akashi H. Identification of a novel herpesvirus in bat using improved RDV method. 8th International Congress of Veterinary Virology, Budapest, August, 2009.

4) Moi, M. L., Lim C. K., Kotaki A., Takasaki T., & Kurane, I. Development of antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing Fc□RIIA. 58th Annual Meeting. American Society of Tropical and Medicine and Hygiene. Washington，November 18-22，2009.

5) Inoue N. Newborn CMV screening and genotyping of congenital cases. (Invited lecture) 12th International CMV & Betaherpesvirus Workshop，Boston，USA，May 2009.

6) Yamada S，Nozawa N，Katano H，Fukui Y，Tsuda M，Tsutsui Y，Kurane I，Inoue N. Characterization of the guinea pig CMV genome locus that encode homologs of human CMV major immediate-early genes, UL128, and UL130. 34th International Herpesvirus Workshop，Ithaca NY，USA，July 2009.

7) Yamada S，Kosugi I，Shindo K，Fukui Y，Katano H，Yashiro K，Higashi C，Tsuda M，Kurane I，Inoue N. Screening and characterization of chemical compounds that inhibit early phase of CMV and VZV infections. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe，October 2009.

8) Yamada S，Kato M，Katano H，Fukui Y，Tsuda M，Tsutsui Y，Nozawa N，Kurane I，Inoue N. Characterization of guinea pig CMV GP129 and GP131，orthologs of HCMV UL128 and UL130，which are essential for efficient viral growth in vivo but not in vitro. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe，October 2009.

2. 国内学会

1)佐藤朝光，山尾卓也，江下優樹，木原悠希，西村美保，Rongsriyam Y，Komalamisra N，Srisawat R，鹿志毛 信広，見明史雄，森川茂，水谷哲也．Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネッタイシマカ

幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出．第 61 回日本衛生動物学，2009 年 4 月．

2)西村美保，佐藤朝光，木原悠希，山尾卓也，江優樹，Rongsriyam Y，Komalamisra N，Srisawat R，鹿志毛信広，見明史雄，水谷哲也．Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネッタイシマカ幼虫からのウイルスの検出．第 61 回日本衛生動物学，2009 年 4 月．

3)伊澤晴彦，鍬田龍星，星野啓太，酒井宏治，渡辺俊平，津田良夫，矢野和彦，佐藤朝光，佐々木年則，斉藤一三，小林睦生，水谷哲也，澤邉京子．蚊から分離されたウイルスの RDV 法による同定．第 61 回日本衛生動物学，2009 年 4 月．

4)酒井宏治，永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，松井珠乃，網康至，平井明香，須崎百合子，水谷哲也，福士秀悦，緒方もも子，西條政幸，藤本嗣人，山田靖子，岡部信彦，佐多徹太郎，倉根一郎，森川茂． 水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析.第 57 回日本ウイルス学会学術集会,東京，2009 年 10 月．

5)森川茂，福士秀悦，酒井宏治，永田典代，長谷川秀樹，松井珠乃，水谷哲也，平井明香，網康至，西條政幸，山田靖子，岡部信彦，佐多徹太郎，倉根一郎．カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析．第 57 回日本ウイルス学会学術集会,東京,2009 年 10 月．

6)永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，西條政幸，森川茂，佐藤由子，佐多徹太郎．SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連．第 57 回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月．

7)岩田奈織子，永田典代，辻隆裕，長谷川秀樹，佐藤由子，横田恭子，水谷哲也，西條政幸，森川茂，佐多徹太郎.SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SRAS-CoV の免疫効果と副反応について.第57回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月．

8)佐山勇輔，福士秀悦，齊藤麻理子，飯塚愛恵，水谷哲也，緒方もも子，西條政幸，鈴木陽，神垣太郎，玉記雷太，倉根一郎，押谷仁，森川茂．フィリピンのレストンエボラウイルス感染症のウイルス遺伝子解析と感染状況の実態調査．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

9)西村美保，早川洋一，遠藤大二，渡辺俊平，佐藤朝光，中島幸彦，鹿志毛信広，見明史雄，緒方もも子，森川 茂，水谷哲也．ミツバチに感染するウイルスの網羅的検出方法の確立．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

10)塩田智之，飯塚愛恵，森川茂，倉根一郎，水口雅，西條政幸．293T 細胞を用いた単純ヘルペスウイルスならびに水痘帯状疱疹ウイルス組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

11)水谷哲也，前田健，渡辺俊平，久和茂，吉川泰弘，明石博臣，中内美名，酒井宏治，福士秀悦，緒方もも子，西條政幸，倉根一郎，森川茂．ウイルスの網羅的検出法（RDV 法 ver3.1）を用いたコウモリ由来新規βヘルペスウイルスの同定．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

12)中内美名，福士秀悦，水谷哲也，緒方もも子，西條政幸，倉根一郎， Ure A，Victor Romanowski V，森川茂．南米出血熱の実験室診断法の開発．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

13)飯塚愛恵，塩田智之，西條政幸，福士秀悦，水谷哲也，緒方もも子，倉根一郎，水口雅，森川茂．痘そうワクチン LC16m8 株の温度感受性に関する解析．第 57 回日本ウイルス学会，2009 年 10 月．

14)西條政幸，網康至，須崎百合子，塩田智之，飯塚愛恵，永田典代，岩田奈織子，長谷川秀樹，緒方もも子，福士秀悦，水谷哲也，倉根一郎，佐多徹太郎，倉田毅，森川茂．コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性.第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009 年 10 月．

15)西條政幸，網至康，須崎百合子，永田典代，長谷川秀樹，新村靖彦．横手公幸，飯塚愛恵，塩田智之，佐多徹太郎，倉田毅，倉根一郎，森川茂．痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果．第 13 回日本ワクチン学会学術総会，札幌，2009 年 9 月．

16)塩田智之，森川茂，飯塚愛恵，倉根一郎，西條政幸．293T 細胞を用いた HSV-1 組換えチミジンリン酸化酵素の発現と薬剤感受性試験への応用．第 19 回日本抗ウイルス療法研究会，東京，2009 年 6 月．

17)渡辺俊平，前田　健，水谷哲也，鈴木和男，藤井ひかる，上田直也，伊波興一朗，谷口怜，加藤健太郎，遠矢幸伸，久和　茂，吉川泰弘，明石博臣．改良 RDV 法を用いたコウモリ由来新規βヘルペスウイルスの同定．第 148 回日本獣医学会，鳥取，2009 年 9 月．

18)谷口 怜，Masangkay Joseph，渡辺俊平，大松勉，上田直也，伊波興一朗，　藤井ひかる，水谷哲也，久和茂，明石博臣，吉川泰弘，森川茂．フィリピンのコウモリからのレストンエボラウイルス抗体検出．第 148 回日本獣医学会，鳥取，2009 年 9 月．

19)水谷哲也，伊澤晴彦，澤辺京子，星野啓太，鍬田龍星，小林睦生，渡辺俊平，明石博臣，佐藤朝光，酒井宏治，緒方もも子，倉根一郎，森川茂．ウイルスの網羅的検出法(RDV 法)の改良と新規ウイルスの検出．第 148 回日本獣医学会，鳥取，2009 年 9 月．

20)酒井宏治，網康至，水谷哲也，岩切章，山本正悟，平井明香，須崎百合子，福士秀悦，西條政幸，永田典代，長谷川秀樹，山田靖子，倉根一郎，森川 茂．急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製．第 148 回日本獣医学会，鳥取，2009 年 9 月．

21) Vuong BN，水谷哲也，苅部一司，Nguyen TH，山本佑，中村菊保，小川晴子，今井邦俊．Attempt to identify viruses isolated from fecal samples of migratory wild birds by the Rapid Determination system of Viral nucleic acid sequences (RDV)．第 148 回日本獣医学会，鳥取，2009 年 9 月．

22)水谷哲也，黒田誠，関塚剛史，大場　邦弘，緒方昌平，石井正浩，森雅亮，横田俊平．川崎病の原因究明　－I. ウイルスの網羅的解析－．第 29 回日本川崎病学会，名古屋，2009 年 10 月．

23)黒田誠，関塚剛史，佐藤誠一，大場邦弘，浜田洋通，寺井勝，緒方昌平，石井正浩，森雅亮，横田俊平，水谷哲也．川崎病の原因究明　－II. 次世代シークエンサーによる網羅的解析－．第 29 回日本川崎病学会，名古屋，2009 年 10 月．

24)森雅亮，黒田誠，関塚剛史，大場邦弘，水谷哲也，横田俊平．川崎病の原因究明　－III. プロテオーム解析法を用いた患者血清の網羅的解析－．第 29 回日本川崎病学会，名古屋，2009 年 10 月．

25)伊澤晴彦，鍬田龍星，星野啓太，酒井宏治，渡辺俊平，津田良夫，矢野和彦，佐藤朝光，佐々木年則，斉藤一三，小林睦生，水谷哲也，澤邉京子．蚊から分離されたウイルスの RDV 法による同定．第 61 回日本衛生動物学会，香川県高松市，2009 年 4 月．

26)佐藤朝光，山尾卓也，江下優樹，木原悠希，西村美保，Rongsriyam Y，Komalamisra N，Srisawat R，鹿志毛信広，見明史雄，森川茂，水谷哲也．Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出．第 61 回日本衛生動物学会，香川県高松市，2009 年 4 月

27)渡辺俊平，前田健，水谷哲也，鈴木和男，加藤健太郎，吉川泰弘，明石博臣．網羅的ウイルスゲノム検出法を用いたコウモリ由来新規βヘルペスウイルスの同定．第 15 回日本野生動物医学会，富山，2009 年 9 月．

28)前田健，本道栄一，佐藤宏，鈴木和男，浜夏樹，横山真弓，渡辺俊平，明石博臣，水谷哲也 ．各種動物由来培

養細胞の樹立とその際に分離された新規ウイルス．第 24 回ヘルペスウイルス研究会，静岡，2009 年 7 月．

29)水谷哲也．新興ウイルス感染症の網羅的検出方法（RDV 法）の確立と応用．第 147 回日本獣医学会シンポジウム，2009 年 4 月．

30)水谷哲也．ウイルスの網羅的検出法（RDV 法）を使って，未知のウイルスを発見する．岐阜大学連合獣医学際領域特別講義，2009 年 6 月．

31)水谷哲也．未知・既知のウイルスの網羅的検出法．第 9 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム,2009 年 6 月．

32)水谷哲也．未知のウイルスを発見する喜び．近畿大学・インターフェイス分野別専門家特別講義，2009 年 7 月．

33)水谷哲也．蜂群崩壊症候群の原因ウイルス解明のための網羅的ウイルス検出方法の確立．山田養蜂場みつばち研究助成金・優秀賞受賞者講演，2009 年 11 月．

34)加藤文博，田島茂，小滝徹，司馬肇，細野邦昭，高崎智彦，倉根一郎．3’NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析．第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，北海道（千歳），2009 年 6 月．

35)林昌宏，小滝徹，高崎智彦，倉根一郎．フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発．第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会,北海道,2009 年 6 月．

36)田島茂，高崎智彦，倉根一郎．デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS4A の N 末端側領域の解析．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009 年 10 月．

37)田島茂，加藤文博，高崎智彦，倉根一郎．ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009 年 10 月．

38)加藤文博，田島茂，小滝徹，司馬肇，細野邦昭，高崎智彦，倉根一郎．3’NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009 年 10 月．

39)モイメンリン，林昌宏，小滝徹，高崎智彦，倉根一郎．Discrepancy in viremic titers in dengue serum samples between BHK cells andFcγR-expressing BHK cells．第 16 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会，東京，2009 年 10 月．

40)モイメンリン，林昌宏，小滝徹，高崎智彦，倉根一郎．FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗デングウイルス抗体依存性感染増強(ADE)アッセイの開発．第 57 回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月．

41)林昌宏，高崎智彦，モイメンリン，大松勉，小滝　徹，倉根一郎．東南アジアにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析．第 57 回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月．

42)青山幾子，弓指孝博，高崎智彦，林昌宏，加瀬哲男，高橋和郎．日本脳炎患者およびワクチン接種者血清のウエストナイルウイルスに対する中和抗体の交差反応性．第 56 回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月．

43)佐藤弘，多屋馨子，高崎智彦，倉根一郎，岡部信彦，感染症流行事業予測調査事業担当者グループ．わが国におけるヒトおよびブタの日本脳炎抗体保有状況（2008 年度感染症流行予測調査より）．第 13 回日本ワクチン学会，札幌，2009 年 9 月．

44)高崎智彦．輸入人畜共通感染症－新たに追加された 4 類感染症に注目する－．第 68 回日本公衆衛生学会総会，奈良，2009 年 10 月．

45)高崎智彦．日本脳炎ウイルスの生態学－越冬の謎は解明されたか－，大谷明先生記念セッション．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京 2009 年 10 月．

46)水野泰孝，氏家無限，竹下望，加藤康幸，金川修三，

工藤宏一郎，林昌宏，高崎智彦．遷延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の３例.第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会，東京，2009年10月．

47)柴田紳一朗,小平彩里,林昌宏,高崎智彦,倉根一郎．デングウイルス診断検出法の検討.第57回日本ウイルス学会，東京，2009年10月．

48)Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Takasaki T, Ogata M, Suzuki S, Itoh T, Kurane I, Suzuki R. Global analysis and characterization of the T-cell receptor α chain(TRA) and β chain(TRB) seguences in the common marmoset(Callithrix jacchus)．第39回日本免疫学会総会・学術集会，大阪，2009年12月．

49)中道一生，伊藤睦代，奴久妻聡一，森本金次郎，倉根一郎，西條政幸．脳脊髄液中のJCポリオーマウイルスを検出するためのリアルタイム PCR 検査系の確立と進行性多巣性白質脳症（PML）の診断支援．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009年10月．

50)中道一生，伊藤睦代，奴久妻聡一，森本金次郎，倉根一郎，西條政幸．定位微量投与系を用いたマウスポリオーマウイルスの脳における持続感染様式の解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009年10月．

51)奴久妻聡一，亀岡正典，杉浦重樹，中道一生，奴久妻智代子，三好勇夫，竹上勉．HIV-1 Tatによる Archetype JC ウイルスの増殖促進.第57回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009年10月．

52)中道一生，伊藤睦代，奴久妻聡一，森本金次郎，倉根一郎，西條政幸．脳脊髄液を用いたJCポリオーマウイルス遺伝子のリアルタイム PCR 検査体制の整備と進行性多巣性白質脳症（PML）の診断支援．第 14 回日本神経感染症学会総会学術集会，宇都宮， 2009年10月．

53)井上直樹,神道慶子,福井良子,永野瑛子,倉根一郎,山口十四文．水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスの前初期蛋白による転写活性化機能を阻害する抗ウイルス化合物の解析．第 19 回抗ウイルス療法研究会，東京，2009年5月．

54)山田壮一，野沢直樹，片野晴隆，福井良子，津田美穂子，筒井祥博，倉根一郎，井上直樹．ヒトサイトメガロウイルス(CMV)の弱毒化に関与する遺伝子群に相同性を有する,モルモットCMV 1.6kbゲノム領域遺伝子群の解析．ヘルペスウイルス研究会，静岡，2009年6月．

55)井上直樹,古谷野伸,山田壮一,錫谷達夫,倉根一郎．ゲノムタイプ解析から予想されるヒトサイトメガロウイルス株間での高頻度な相同組換え．第57回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009年11月．

56)山田壮一，小杉伊三夫，片野晴隆，倉根一郎，井上直樹．GFP 組換えマウスサイトメガロウイルスを用いた in vivo imaging による抗ヘルペスウイルス薬 in vivo 評価系の確立.第57回日本ウイルス学会学術集会,東京,2009年11月．

57)井上直樹．出生直後の自動ABRで発見された先天性サイトメガロウイルス感染症の１例（演者：中島準也先生）に対する指定発言．第 570 回日本小児科学会東京都地方会講話会，東京，2009年12月．

58)安藤秀二,黒澤昌啓,坂田明子,藤田博己,矢野泰弘,高野愛，川端寛樹，花岡希，斉藤若奈，岸本寿男．仙台市で確認された新しい紅斑熱群リケッチア症.第83日本感染症学会総会，東京，2009年4月．

59)竹下望，柳沢邦雄，加藤康幸，金川修造，坂田明子，安藤秀二，岸本寿男，照屋勝治，菊池嘉，岡慎一，工藤宏一郎．インドネシアからの輸入症例と考えられる急性腎不全を伴った発疹熱の一例.第83日本感染症学会総会，東京，2009年4月．

60)井本一也，大路剛，山本舜悟，細川直登，岸本寿男，安藤秀二，坂田明子．当院で経験した発疹熱（Murine Typhus）の症例．第83日本感染症学会総会，東京，2009年4月．

61)大橋典男，千屋誠造，船戸豊彦，塩尻正明，高野愛，川端寛樹，安藤秀二，岸本寿男．国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2 症例について．第 83 日本感染症学会総会，東京，2009 年 4 月

62)山本徳栄，近真理奈，山口正則，大山龍也，藤田博己，安藤秀二，小川基彦，岸本寿男．埼玉県の野生化アライグマにおけるリケッチア類の保有状況調査-第一報．第 83 日本感染症学会総会，東京，2009 年 4 月

63)高田伸弘，藤田博己，安藤秀二，川端寛樹，矢野泰弘，高野愛，岸本壽男．仙台市内河川敷にみるネズミ分布相の特性－広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡み．第 61 回日本衛生動物学会大会，香川，2009 年 4 月

64)矢野泰弘，高田伸弘，岩崎博道，藤田博己，角坂照貴，及川陽三郎，田原研司，山本正悟，本田俊郎，平良勝也，岡野祥，安藤秀二，川端寛樹，岸本壽男．環東シナ海の島嶼に分布するツツガムシ，疫学的な連関は？．第 61 回日本衛生動物学会大会，香川，2009 年 4 月

65)山内健生，小原真弓，渡辺護，安藤秀二，品川保弘，長谷川澄代，中村一哉，滝澤剛則．富山県産哺乳類に寄生していたマダニ類．第 61 回日本衛生動物学会大会，香川，2009 年 4 月

66)藤田博己，大竹秀男，矢野泰弘，安藤秀二，川端寛樹，岸本壽男，坂田明子，高田伸弘．宮城県で確認できたマダニとマダニ保有リケッチア．第 61 回日本衛生動物学会大会，香川，2009 年 4 月

67)藤田博己，高田伸弘，矢野泰弘，馬原文彦，川端寛樹，安藤秀二，岸本壽男，坂田明子．四国のマダニ類における紅斑熱群リケッチアの分離状況．第 61 回日本衛生動物学会大会，香川，2009 年 4 月

68)藤田博己，安藤秀二．北日本にみる新型都市型紅斑熱のベクター．第 17 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー．福井県大野市，2009 年 6 月

69)安藤秀二．マダニ媒介感染症の野外調査について．衛生微生物技術協議会第３０回研究会，大阪府堺市，2009 年 7 月

70)中野敏明，衛藤光，横田恭子，古川恵一，安藤秀二，坂田明子．*R. africae* によるマダニ刺症の 2 例．日本皮膚科学会関東支部会，東京，2009 年 7 月

71)安藤秀二，藤田博己，坂田明子，矢野泰弘，大竹秀男，及川陽三郎，角坂照貴，黒澤昌啓，川端寛樹，高田信弘．仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発見と保有マダニ調査．第 55 回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会，帯広，2009 年 10 月

72)伊東拓也，高田伸弘，及川陽三郎，藤田博己，坂田明子，安藤秀二，川端寛樹，高野愛．日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査．第 55 回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会，帯広，2009 年 10 月

73)藤田博己，高田伸弘，及川陽三郎，安藤秀二，川端寛樹，高野愛，坂田明子．青森県における紅斑熱ベクター調査．第 55 回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会，帯広，2009 年 10 月

74)内山恒夫，岸真帆美，小川基彦．リケッチア Sca 外膜蛋白質発現大腸菌の種々の細胞への付着侵入能．第 57 回日本ウイルス学会，東京，2009 年 10 月

75)岸本寿男，吉林台，猪熊壽，花岡希，坂田明子，小川基彦，安藤秀二，福士秀人，大屋賢司，野村彩朱，矢野竹男．Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

76)小川基彦，大内史子，萩原健一，松谷峰之介，内山恒夫．病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析ー第一報ー．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

77)近真理奈，山本徳栄，安藤秀二．埼玉県の野鳥におけるオウム病病原体の保有状況.第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

78)松谷峰之介，東慶直，小川基彦，花岡希，川端寛樹，倉根一郎，安藤秀二，岸本寿男，白井睦訓．日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

79) 山本正悟，安藤秀二，岸本壽男．つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口（痂皮）の有用性．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

80)花岡希，松谷峰之介，川端寛樹，山本正悟，藤田博己，坂田明子，東 慶直，小川基彦，岸本寿男，白井睦訓，倉根一郎，安藤秀二．病原性 *Rickettsia japonica* グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用．第 27 回日本クラミジア研究会･第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

81)藤田博己，高田伸弘，矢野泰弘，及川陽三郎，川端寛樹，安藤秀二，坂田明子，高野 愛．国内のキチマダニから分離された *Rickettsia canadensis* について．第 27 回日本クラミジア研究会･第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

82)小原真弓，山内健生，渡辺　護，安藤秀二，石倉康宏，品川保弘，長谷川澄代，中村一哉，堀元栄詞，岩井雅恵，倉田　毅，滝澤剛則．富山県におけるマダニ類と保有リケッチア．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

83)松本一俊，松尾繁，八尋俊輔，原田誠也，山本正悟，安藤秀二．熊本県における日本紅斑熱の発生状況とベクター．第 27 回日本クラミジア研究会・第 16 回リケッチア研究会合同研究発表会，東京，2009 年 11 月

84)平良勝也，近藤章之，岡野祥，藤田博巳，角坂照貴，高田信弘，安藤秀二，下地 崇，下地久代， 平良セツ子．沖縄県宮古島で初めて確認されたつつが虫病.第 41 回沖縄県公衆衛生学会，沖縄，2009 年 11 月

85)山本正悟，安藤秀二，岸本寿男．つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性．第 79 回日本感染症学会西日本地方会学術集会，福岡，2009 年 11 月

86)安藤秀二.衛生行政における感染研の役割―ウイルス第一部第五室の事例より－．人獣共通感染症とダニ関連感染症 in 奄美 2009 セミナー，鹿児島県奄美市，2009 年 12 月

87)平良勝也，近藤章之，藤田博己，角坂照貴，高田伸弘，安藤秀二，他．沖縄県宮古島で初めて確認されたつつが虫病.平成 21 年度日本獣医師会学会年次大会日本獣医公衆衛生学会，宮崎，2010 年 1 月

88)小川基彦，大内史子，萩原健一，松谷峰之介，内山恒夫．病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析．第 83 回日本細菌学会総会，横浜，2010 年 3 月

89)内山恒夫,岸真帆美,小川基彦.リケッチアの重感染.第 83 回日本細菌学会総会，横浜，2010 年 3 月

90)東　慶直,松谷峰之介,花岡希,小川基彦,岸本寿男,安藤秀二，白井睦訓．日本紅斑熱病原因菌 R. japonica のゲノム解析．第 83 回日本細菌学会総会，横浜，2010 年 3 月

91)大屋賢司，黒田誠，関塚剛史， Meyers G，岸本寿男，安藤秀二，福士秀人．オウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* 日本分離株の全ゲノム配列決定．第 83 回日本細菌学会総会，横浜，2010 年 3 月

２．ウイルス第二部

部 長　脇 田 隆 字

概　要

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，Ａ，Ｂ型肝炎ワクチン，経口生ポリオワクチンを検定，検査対象としている．

第１室の最重要課題は経口生ポリオワクチンの検定，検査並びに，ワクチン株であるセービン株由来不活化ポリオワクチン（sIPV）の開発推進および検定法の開発である．本年は経口生ポリオワクチンの中間バルク１件，小分製品１件の検定をおこなった．ＷＨＯ世界ポリオ根絶計画が進展し，国産不活化ポリオワクチンの早期臨床導入のために DTP-sIPV の混合ワクチンとして開発が進んでいる．本ワクチンの開発推進にかかる業務として，国内参照品の開発及び安定性試験，検定方法の開発を引き続きおこなった．しかし当面の間，生ポリオワクチン検定も続くため，従来の生ポリオ検定法の改良に努めている．さらに，小児の下痢症予防のためのロタウイルスワクチン導入への対応が求められており，ロタウイルスの研究基盤の構築を開始する．

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に関しては，全国地研との連携が確立し，感染研は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．ノロウイルスの爆発的な流行は観察されていないが，引き続き警戒が必要である．カリシウイルスに関する基礎研究が進展している．従来から進めている中空粒子を用いた研究に加え，マウスノロウイルスやネコカリシウイルスによる感染増殖モデルを導入し，カリシウイルスの複製増殖に関する理解が進むことが期待される．

第２室は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続けた．今年度も西太平洋地域におけるポリオフリーの維持を確認した．JICAとの共催で実施した第19回ポリオ実験室診断技術研修会ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した．また，国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動，依頼検査をおこなった．

エンテロウイルス 71 は手足口病の原因ウイルスであり，脳炎を併発することがある．このエンテロウイルス 71 の感染受容体としてヒト PSGL-1 を同定している．PSGL-1 に関する解析が進み，ウイルスの病原性に関する研究が今後大いに進展することが期待できる．

第３室及び第４室ではＢ型およびＣ型肝炎ウイルスの研究をおこなった．Ｃ型肝炎ウイルス研究ではウイルスの感染複製増殖に関与する宿主因子およびウイルス因子の両面からの研究が進んだ．新たなモデル系の構築も進んでいる．新規ワクチン開発も進行している．Ｂ型肝炎ウイルスの研究の重要性から，新規抗ウイルス薬のスクリーニングを開始した．また，今後重要性が増す抗ウイルス薬に対する薬剤耐性ウイルスへ迅速な対応が必要である．肝炎研究７ヶ年戦略に基づく肝炎ウイルス研究の方向性を定め，研究成果の情報収集・解析，研究者育成のために，肝炎研究基盤整備事業が開始した．今年度は７回の研修会を実施し，肝炎ウイルス研究データベースの構築をおこなった．

第５室の最重要課題はＡ型及びＢ型肝炎ワクチンの検定，検査である．本年度はＡ型肝炎ワクチン２件，Ｂ型肝炎ワクチン４件の検定をおこなった．Ｂ型肝炎ワクチン接種のユニバーサル化に関する議論が研究班や学会を中心にして進んでいる．本格的な議論を進めるために，基盤となるデータの集積が必要である．

Ａ型肝炎報告数は 2010 年 3 月以降増加の傾向があ

り，警戒が必要である．我が国における抗体陽性者の高齢化，数年前からの韓国におけるＡ型肝炎の流行などの要因に注目している．E 型肝炎研究はウイルス培養が可能となり，感染性クローンも樹立できた．ウイルス学的な研究が進展している．

以下のような国際的技術協力をおこなった．

Park YoungBin（大韓民国、ソウル大学）＜平成21年度食品の安心・安全確保推進研究推進事業　外国人研究者招へい事業による研究協力＞ 平成22年2月3日ー平成22年2月16日，平成18年度から21年度にかけて韓国で流行したノロウイルスの分子疫学的解析と，ノロウイルス流行株の抗原性変化の研究のためのウイルス様中空粒子の作出．

方　苓（中国、広東省疾病予防控制センター）〈笹川フェロー〉平成21年9月10日～平成22年8月26日、E型肝炎ウイルスの分子ウイルス学とワクチン研究。

宋　士利（中国，杭州市余杭区疾病対策センター）平成21年7月20日ー平成21年10月20日，E型肝炎ウイルスの検査技術の習得．

王　澤鋆（中国，武漢生物製品研究所）平成21年7月20日ー平成21年10月20日，E型肝炎ウイルス様粒子の作製技術習得．

今年度末までのウイルス第二部に人事異動について記載する．平成 20 年 10 月に政木隆博主任研究官が就任，平成 21 年 3 月末に村上恭子主任研究官が退官，平成 21 年 4 月に片山和彦第一室長が就任した．平成 21 年 12 月に渡士幸一主任研究員が就任，平成 22 年 3 月末に宇田川悦子主任研究官と鈴木哲朗室長が退官された．退官された村上氏，宇田川氏，鈴木氏のこれまでの感染研に対する貢献にウイルス第二部一同深謝したい．また，新職員の皆さんの活躍に大いに期待する．

ハンスマン・グラント研究員は，2008 年 8 月より，ウイルスゲノムの組換え，および粒子構造の解析のため米国国立癌研究所，NIH に長期出張中であり，2010 年中に帰国予定．

業　績

調査・研究

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）ノロウイルスリバースジェネティックスシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバースジェネティックスシステムは，pKS-U201F を導入するとウイルスの複製が始まり，24 時間後には強い細胞毒性を示す．ウイルスの複製を制御するため，protease に含まれる GDCG モチーフを GDGG に変換し，protease の活性を失わせた cDNA クローン pKS-U201FproM，活性のある protease 領域のみを組み込んだ pKS-Pro を構築した．細胞内に pKS-U201FproM を単独で導入すると細胞毒性を示さないが，その後， pKS-Pro 導入すると，protease がトランスに作用し，ウイルス粒子を産生すると共に強い細胞毒性を示すことが明らかとなった．本システムは，トランスで供給するノロウイルス protease により，細胞毒性の発現，ウイルス複製をコントロールできる可能性がある．今後，本システムは，ウイルス複製機構，細胞毒性発現機構，病原性発現機構の解析や，rotease 活性阻害剤のスクリーニングなどに利用可能である．

[片山和彦，岡智一郎，脇田隆字]

（２）ノロウイルスを利用した蛍光ワクチン用ベクター作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を行った．pKS-U201F の ORF2 領域を EGFP 遺伝子と交換した pKSF-U201F-EGFP，ORF2/3 領域を CAG promoter で強制発現する pCAG-ORF2/3 を COS1 細胞に導入して，EGFP 遺伝子を含む粒子の作製を試みた．細胞より CsCl 浮上密度勾配遠心により，細胞内に存在する新生粒子の分離精製を行ったところ，感染性粒子と同様の密度 1.38 g/cm^3 にノロウイルス様の粒子が存在する事，粒子は U201F-EGFP RNA を内包している事が明らかになった．これらの粒子は，分化誘導依存的に Caco2 細胞に結合することも明らかになった．これらの結果は，DNA 導入をベースにした方法により，ノロウイルスベクター粒子を

作出可能であることを示している.

[中西 章(国立長寿医療研究センター), 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆字]

（３）ノロウイルス(NoV)のゲノム解析

2006 年 5 月～2010 年 3 月の間に全国 20 カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い, 計 276 の NoV 遺伝子型 GII/4 のゲノム全長の塩基配列を得た. 少なくとも 7 種の GII/4 の単系統亜株(2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b,2008a, 2008b と命名）が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた. 4 種は, 進化起源の異なる配列が組み合わさって生じたモザイクゲノムをもっていた. 4 種に共通するゲノム組換え点として, ORF1/ORF2 境界の高度保存領域を見いだした. この領域での組換により, 別個に進化した近縁のノロウイルスの間で, 複製関連遺伝子とカプシド遺伝子の変異セットを効率よく交換できる. これにより, 複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させたウイルスが迅速に発生し, ウイルスの適応変化能力を高めている可能性がある. 得られた情報は, ノロウイルスサーベランスに還元した.

[本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 神田忠仁, 佐藤裕徳（病原体ゲノム解析研究センター）, 岡智一郎, 片山和彦]

（４）NoV と血液型抗原との結合：Lewis 抗原への結合の解析

血液型抗原は末端の構造によって ABO 型, Lewis 型に区別され, さらに内部の linkage によってタイプ 1, 2 に区別される. 腸管上皮には主にタイプ 1 抗原が, 赤血球上には主にタイプ 2 抗原が発現しているとされる. 昨年度までに, VLPs を用いた In vitro-binding assay(ELISA, Biacore) によって NoV が ABO 抗原だけでなく Lewis 抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別を行っていることを明らかにした. 平成 21 年度は糖鎖遺伝子改変細胞を用いた解析により, 細胞上の血液型抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別が行われていることを確認した. NoV は血液型抗原のタイプ 1, 2 構造を識別することによって自らの組織特異性を決定している可能性がある.

[白土東子, 熊谷安希子, 栂谷内晶（産総研）, 伊藤浩美（産総研）, 成松 久（産総研）, 武田直和, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字]

（５）NoV と血液型抗原との結合：X 線結晶構造解析による結合解析

プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI/1) 株 はα1,2 フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立するが, 不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから, NoV と血液型抗原との結合にはα1,2 Fuc が不可欠と言われている. 一方, α1,2 Fuc を含まずα1,4 Fuc を含むルイス a 抗原 (Le-a) のみを腸管上皮に発現する非分泌型個体にも感染する NoV 株が存在することが知られているが, 詳細は明らかではない. NoV の Le-a 認識機構を明らかにするため, Le-a 結合能を有する GI/2 株のキャプシド P ドメインと Le-a 複合体の X 線結晶構造解析を昨年度までに行った. 今年度は, Le-a との比較のため, Le-b, Le-x, tetra-A (type 1), tetra-B (type 1), tri-H (type 1)の導入を行い, tetra-B (type 1)を除いて, 糖鎖との複合体の構造モデルを得ることに成功した.

[熊谷安希子, 久保田智巳（産総研）, 伊藤浩美（産総研）, 古川早苗（産総研）, 成松 久（産総研）, 武田直和, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 白土東子]

（６）ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの変異導入解析

これまでノロウイルス Chiba407 株 (GI/4) の 3C 様プロテアーゼに種々の変異を導入し, 酵素活性に重要なアミノ酸残基の検索を行ってきた. Ala 置換で活性が消失したり, タンパク質発現量が低下したりする Trp6, Trp19, Thr27, Leu86, Leu95, Leu97, Met101, Gln117, Leu121, Thr134, Tyr143, Val144, Val167 の 14 残基についてさらにいくつかの変異を導入して機能への影響を見た. 既報の立体構造を考慮すると, Thr134 と Tyr143 が基質認識に重要であると考えられた. また, これら 14 残基の多くは互いに相互作用していることが示唆された.

[染谷雄一]

（７）ノロウイルス様中空粒子の昆虫細胞での自己集合

ノロウイルス Chiba407 株（GI/4）のキャプシド（VP1）タンパク質を Tn5 細胞で発現させると，通常の 38 nm のウイルス様中空粒子（VLP）の他に，23 nm の小粒子を形成する．VLP を SDS-PAGE で分離すると，58 kDa と 52 kDa の 2 種のバンドが得られる．アミノ酸配列を解析したところ，58k タンパク質の N 末端は Ala4 残基，52 k タンパク質は Thr45 残基であり，昆虫細胞内で切断を受けていることが示唆された．Leu43-Ala44-Thr45 を Ala-Pro-Val に置換したところ，58 kDa の単一のタンパク質が生成し，VLP のサイズも 38 nm に均一化された．

[染谷雄一，白土東子]

（８）ノロウイルス様中空粒子の立体構造解析

これまで遺伝子型 GI/1 に属する Norwalk 株の VLP の三次元立体構造が明らかにされている．ノロウイルスは多様な遺伝子型があり，組織血液型抗原結合パターンも多様である．これはウイルス粒子表層の構造が多様であることを示唆する．これを明らかにするために，昆虫細胞で発現させた Chiba407 株（GI/4）の triple mutant VLP を精製し，結晶化を試みている．

[染谷雄一，長谷川和也（(財)高輝度光科学研究センター），熊坂　崇（(財)高輝度光科学研究センター）]

２．サポウイルス（SaV）に関する研究

（１）サポウイルス遺伝子型タイピング法確立を目的としたサブゲノム遺伝子塩基配列の解析

サポウイルスは遺伝的に極めて多様であるため，系統樹解析や遺伝子型タイピング法の基盤となるレファレンス株の塩基配列の蓄積が急務である．そこでタイピングに有用な構造蛋白質全長領域の塩基配列情報の蓄積を目的として，地方衛生研究所との共同研究によって検出されたサポウイルスのうち，新たな遺伝子型に属する可能性のある 14 株について，開始コドンからゲノム末端までの遺伝子領域（約 2.3kb）を PCR で増幅し，塩基配列を決定した．

[岡智一郎，原田誠也（熊本県保健環境科学研），飯塚節子（島根県保健環境科学研），山下育孝（愛媛県衛生環境研），入谷展弘（大阪市立環境科学研），片山和彦]

（２）環境水からのサポウイルス検出を目的とした新規プライマーの設計

環境水中のサポウイルス核酸検出を行うため，新たに設計したプライマーと既報のプライマーを組み合わせた nested RT-PCR 系を構築した．河川水６０検体を対象にした結果，従来法のサポウイルス検出率が 2%（1/60）であったのに対し，今回新たに構築した方法は，17%（10/60）とサポウイルスの検出率が大幅に改善された．本法は従来法と比較して環境水からのサポウイルス検出に有用である．今後，本検出系を食用貝からのサポウイルス検出に応用する．

[北島正章（東大院工学），岡智一郎，原本英司（山梨大工学），片山浩之（東大院工学），片山和彦]

（３）河川中のサポウイルスを指標にした地域流行株の把握

糞便中に排泄されたサポウイルスは下水を通じ，一部が河川水中に流入していると考えられている．下水処理水を受容する河川水を解析することで，流域における流行株を検出することができる．2003 年４月ー2004 年３月の間に，関東平野を流れる多摩川の上流から下流５地点において河川水を毎月１回採水し，濃縮後，real-time RT-PCR および新規に構築した nested RT-PCR 法によりサポウイルス RNA を検出した．河川水中の最大濃度は 1.0×10^3 copies/L であった．nested RT-PCR 法で検出された株は GI/1, GI/2, GI/3, GI/5, GI/unclassified, GII/1, GII/2, GII/3, GV/1 と多様であった．本研究で対象とした多摩川では上流域に比べて中流域および下流域で SaV 遺伝子濃度および陽性率が高かったことから，河川流量に占める下水処理水の割合が高い中流域および下流域では，下水処理水の影響を受けて河川水が SaV に汚染されていると考えられた．また，河川水中の SaV 遺伝子濃度は冬期に上昇する傾向が認められたことから，この流域の SaV 感染者が冬期に増加していた可能性が示された．河川水中の SaV 遺伝子を解析することにより，流域における SaV の流行状況および流行株を網羅的に把握するこ

とが可能になる.

[北島正章（東大院工学），岡智一郎，原本英司（山梨大工学），片山浩之（東大院工学），片山和彦]

３．マウスノロウイルスに関する研究

（１）マウスノロウイルスの複製機構の解析

マウスノロウイルス（MuNoV）感染細胞におけるウイルス複製と，複製した MuNoV 粒子の解析を行い，ヒトノロウイルス（HuNoV）のモデルとしての有用性を探った．MuNoV S7-PP3 株を，RAW264.7(ATCC TIB-71)細胞に感染させ，感染後 30 時間までの細胞における MuNoV 蛋白質の細胞内局在を抗 MuNoV 非構造蛋白質領域抗体，構造蛋白質領域抗体を用いた免疫蛍光抗体法にて観察した．MuNoV 感染細胞は，感染後 12 時間から非構造蛋白質及び構造蛋白質が細胞質に観察された．非構造蛋白質の一部と構造蛋白質の細胞内局在は一致していた．感染細胞内における非構造蛋白質の一部（VPg）と構造蛋白質（VP1，VP2）の局在は，HuNoV のリバースジェネティックスシステムから得られた知見と類似しており，MuNoV の複製機構は HuNoV のモデルとして有用である.

[片山和彦，岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），遠矢幸伸（日本大学），脇田隆字]

（２）マウスノロウイルス感染性粒子の解析

MuNoV の感染性粒子のエクステリアおよびインテリアの構造を明らかにするため，S7-PP3 株を RAW264.7(ATCC TIB-71)細胞を用いて増殖させると同時に RNA 又は蛋白質にアイソトープラベルを行った．培養上清に含まれる MuNoV 粒子を CsCl 浮上密度勾配遠心法にて分離精製し，Western Blotting，Northern Blotting にて解析を施行した.

CsCl 浮上密度勾配遠心法の密度 1.36g/cm^3 のフラクションに含まれるウイルス粒子を各種 MuNoV 抗体で免疫沈降を行った所，抗 VP1 抗体でのみ免疫沈降可能であった．免疫沈降した粒子は，VP1，VP2 と VPg，約 7.5 kb の RNA を含んでいることが明らかとなった．粒子内容物の RNase 処理を行わない場合，VPg は複数のバンドとして検出されたが，RNase 処理後は 60 kDa，20 kDa の 2 本のバンドとして検出された．MuNoV の感染性粒子は，その内部に VP2，VPg，RNA を内包しており，RNA と VPg は強固に結合していることが示唆された.

[片山和彦，岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），遠矢幸伸（日本大学），脇田隆字]

（３）マウスノロウイルスのエタノール感受性と粒子，遺伝子への影響について

マウスノロウイルス（MuNoV）は，ネコカリシウイルス(FCV)と異なりエタノールに対し感受性を示すことが報告されている．しかし，MuNoV の詳細なエタノール感受性は調べられていない．そこで，MuNoV のエタノールに対する感受性を詳細に検討した．MuNoV S7-PP3 株を RAW264.7(ATCC TIB-71)細胞で増殖させてストックしエタノール感受性試験に用いた．エタノール 70 及び 80%では 15 秒以内に 4log10TCID$_{50}$ 以上の感染価減少が認められた．60%では 60 秒以内に，50%では 120 秒以内にそれぞれ 4log10TCID$_{50}$ 以上の感染価減少が認められた．FCV と MuNoV には，エタノール感受性に大きな違いがあることが明らかとなった．どの様なメカニズムでエタノール処理により，MuNoV が感染性を失うのかは明らかではないが，エタノール処理が実験動物における MuNoV 汚染除去，感染防御役立つ可能性がある.

[高木弘隆（バイオセーフティ管理室），遠矢幸伸（日本大学），片山和彦，岡智一郎，杉山和良]

（４）マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性

マウスノロウイルス(MuNoV)とヒトノロウイルス HuNoV)の基盤情報収集を目的として，両者のプロテアーゼおよびポリメラーゼの類似性をコンピュータ解析により調べた．HuNoV には U201 株を，MuNoV には S7-PP3 株を用いた．In silico 分子モデル間の RMSD 値は，プロテアーゼで約 1.0Å，ポリメラーゼで約 1.3Åであった．プロテアーゼの切断活性に必須のアミノ酸（H,D/E,C,H），ポリメラーゼの RNA 合成活性に必須の YGDD モチーフと近傍の保存モチーフ A の立体配置は，U201 株と S7-PP3 株でほぼ一致していた．HuNoV のプロテアーゼ，ポリメラーゼの Shannon エントロピー値分布パターンは，全長に渡り，

MuNoV のそれとほぼ一致していた．プロテアーゼとポリメラーゼの主鎖の折り畳みと活性部位アミノ酸の立体配置，保存部位と可変部位の位置，前駆体の切断反応，および RNA 合成反応に直接，間接に関わるアミノ酸の配置は，HuNoV と MuNoV 間でよく保存されていた．以上から，プロテアーゼ，ポリメラーゼの研究を推進する際，MuNoV は HuNoV のモデルとなり得る．

[横山 勝（病原体ゲノム解析研究センター），岡智一郎，片山和彦，遠矢幸伸（日本大学），神田忠仁，佐藤裕徳]

（５）マウスノロウイルス検出のための nested RT-PCR 系の構築

公的データベースに登録されている４０株以上のマウスノロウイルスのフルゲノム塩基配列中，高度に保存された領域を検索し，ポリメラーゼから構造タンパク質コード領域をターゲットとする nested RT-PCR 系を構築した．さらに国内の実験用マウスからマウスノロウイルス核酸を検出し，その遺伝子解析を行った．

[北島正章（東大院工学），岡智一郎，遠矢幸伸（日大獣医），片山和彦]

（６）マウスノロウイルス検出のためのリアルタイム RT-PCR 系の構築

マウスノロウイルス核酸定量系を構築する目的で，ポリメラーゼと構造タンパク質の境界領域をターゲットとするリアルタイム RT-PCR 系を新たに構築した．nested RT-PCR でマウスノロウイルス陽性のサンプルについて糞便中核酸量を定量した．

[北島正章（東大院工学），岡智一郎，遠矢幸伸（日大獣医），片山和彦]

（７）大腸菌で発現させたマウスノロウイルス非構造，構造タンパク質に対する抗体の反応性評価

マウスノロウイルスのゲノム全長を含むクローンを鋳型に各機能蛋白質（Nterm, NTPase, VPg, Polymerase），構造蛋白質（VP1, VP2）に対応する遺伝子領域をそれぞれ大腸菌で発現させ，ウサギおよびモルモットに免疫して作成した部位特異抗体の反応性をウェスタンブロット法および免疫染色法によって検討した．作成した抗体はいずれも良好な反応性を示した．また，構造タンパク質（VP1）に対して作成した抗体はウイルス粒子の免疫沈降に使用可能であることも明らかになった．

[岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），片山和彦]

（８）マウスノロウイルス感受性細胞の検討

マウスノロウイルス増殖は一般的にマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 で検討されている．マウスノロウイルスの増殖指向性を検討する目的で，他のマウスマクロファージ細胞株（J774-A1），その他のマウス由来細胞（WEHI-3b, P3U1, 3T3-L1, HS-22），ハムスター由来細胞（CHO-K1）におけるマウスノロウイルスの感染，増殖を細胞壊死の観察，および免疫染色で検討した．その結果，マウスマクロファージ系細胞でのみウイルス感染が起きていることを確認した．今後，増殖の認められたマウスマクロファージ細胞２種類について，ウイルス増殖をリアルタイム RT-PCR 法で検討する．

[岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），片山和彦]

４．ネコカリシウイルスに関する研究

（１）大腸菌で発現させたネコカリシウイルス非構造タンパク質に対する抗体の反応性評価

ネコカリシウイルスのゲノム全長を含むクローンを鋳型に非構造蛋白質（NTpase, VPg, Protease, Polymerase）に対応する遺伝子領域をそれぞれ大腸菌で発現させ，ウサギに免疫して作成した特異抗体を，ウイルス感染 CRFK 細胞の免疫染色およびウェスタンブロットに使用し，いずれも検出に使えることを確認した．

[岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），片山和彦]

（２）BRET を用いたネコカリシウイルス感染増殖検出系の構築

カリシウイルスの多くは培養細胞で増殖させることが出来ないが，ネコカリシウイルス（FCV）はネコ腎臓由来

細胞(CRFK 細胞)で増殖可能である．カリシウイルスの感染，増殖阻害物質のスクリーニングを行うため，ウイルスプロテアーゼによる切断部位を含む FCV 構造蛋白質前駆体コード領域の一部を Green Fluorescence Protein (GFP)と Renilla luciferase (rLuc)間にクローニングし，Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)を利用した FCV プロテアーゼ活性検出系の構築を行った．この系では BRET センサーがウイルスプロテアーゼによって切断されることで rLuc から GFP へのエネルギー転移が起こらなくなるという原理を利用する．BRET センサーを安定発現する細胞株を確立した細胞に FCV を感染させたところ，添加ウイルス量に依存して BRET シグナルの変動 (GFP/rLuc ratio の減少) が起こることを確認した．本検出系はウイルス感染増殖に伴う，ウイルスプロテアーゼの活性を検出することから，ウイルスプロテアーゼ阻害物質だけでなく，ウイルス感染増殖を阻止する物質の検索に有用である．

[岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），遠矢幸伸（日大獣医），片山和彦]

（3）改変ルシフェラーゼを用いた in vitro でのネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築

in vitro でのハイスループットなネコカリシウイルスプロテアーゼ阻害物質スクリーニングを行うため，最近開発された改変ルシフェラーゼ（GloSensor™：Promega）を用いたウイルスプロテアーゼ活性検出系を構築した．この系ではウイルスプロテアーゼによる切断部位を含む FCV 構造蛋白質前駆体コード領域の一部を GloSensor™ 中にクローニングし，このタンパク質がウイルスプロテアーゼによって切断されることで非切断時に比べて発光が大幅に増加するという原理を利用する．In vitro translation によって発現した基質（改変ルシフェラーゼ）を，in vitro translation で発現させた FCV プロテアーゼと反応させることで，容量依存的にルシフェラーゼシグナルの増加が認められることを確認した．

[岡智一郎，片山和彦]

（4）改変ルシフェラーゼを用いたネコカリシウイルス感染増殖検出系の構築

ネコカリシウイルス感染，増殖阻害物質のスクリーニング系構築のため，上記のネコカリシウイルスプロテアーゼ認識配列を組み込んだ改変ルシフェラーゼを安定発現する CRFK 細胞を確立した．この細胞に FCV を感染させたところ，添加ウイルス量に依存してルシフェラーゼシグナルの増加を認めた．本検出系は BRET と比較して高感度に FCV 感染を検出可能であった．本検出系も BRET の系と同様，ウイルス感染増殖に伴う，ウイルスプロテアーゼの活性を検出することから，ウイルスプロテアーゼ阻害物質だけでなく，ウイルス感染増殖を阻止する物質の検索に有用である．

[岡智一郎，高木弘隆（バイオセーフティ管理室），遠矢幸伸（日大獣医），片山和彦]

５．カリシウイルスに関する研究

（1）カリシウイルスプロテアーゼ間で保存されている残基の同定，およびポリプロテイン切断活性への影響の解析

カリシウイルスは主に４つの属（サポウイルス，ノロウイルス，ベジウイルス，ラゴウイルス）に分類される．カリシウイルスの複製，増殖には open reading frame 1 にコードされているウイルス自身のプロテアーゼが必須である．カリシウイルスプロテアーゼアミノ酸相同性は異なる属間では 30%以下と低いが，全体構造は類似する．今回はシャノンエントロピー解析，構造モデルによって，カリシウイルスプロテアーゼ間でアミノ酸レベルあるいは立体配置的に共通して保存されている残基を同定した．現在，これらの残基に変異を導入し，ポリプロテイン切断活性への影響を検討している．

[岡智一郎，横山 勝，本村和嗣，守 宏美，中村浩美，佐藤裕徳（病原体ゲノム解析研究センター），片山和彦]

II．エンテロウイルスに関する研究

１．実験室診断およびレファレンス活動

（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，要望に応じて地方衛生研究所等に配付した．2009 年度は，エンテロウイルス同定用パネル血清 EP95 を 22 セット，エンテロウイルス単味抗血清 30 種類，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株 3 株，ポリオ標準血清 3 種類を配布した．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実施した．検査したポリオウイルスすべてがワクチン株であった．

（２）ポリオ実験室診断技術研修会(JICA 共催)の開催

第 19 回ポリオ実験室診断技術研修会を実施した．研修期間は 2010 年 1 月 18 日ー2 月 5 日，研修参加者は，エチオピア，ナイジェリア，パキスタンから各 1 名，計 3 名の他，個別研修として中華人民共和国からの参加者 3 名の計 6 名であった．WHO ポリオ実験室ネットワークにおける国家ポリオ実験室に必要とされる急性弛緩性麻痺サーベイランスにより得られた糞便検体からのポリオウイルス分離・同定に必要な技術習得のための講義及び実習を実施した．また，ポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った．麻疹を中心とした他のワクチン予防可能疾患に関する講義・実習を実施した．

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

ア）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．本年度はカンボジア 122 検体およびラオス 86 検体の 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．

イ）WHO GSL として，おもにカンボジア・ベトナム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．ポリオウイルス分離株は，すべてワクチン株であり，西太平洋地域におけるポリオフリーの維持を確認した．

ウ）2009 年 6 月 23－25 日に，WHO 本部(ジュネーブ)で行われた The 15th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network に参加し，世界ポリオ根絶計画の現状およびポリオ実験室診断技術開発に関する情報交換を行った．

［清水博之］

エ）2010 年 2 月 22 日－2 月 23 日に，WHO 西太平洋事務局(マニラ)で行われた The 2nd meeting on vaccine preventable diseases laboratory network in the WPRO に参加し WHO 西太平洋地域におけるポリオ実験室ネットワークにおける技術情報の交換を行った．

［清水博之］

オ）2010 年 3 月 9 日－3 月 13 日に，クアラルンプールで行われた WHO Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease に参加し WHO 西太平洋地域における手足口病ガイドラインの作成作業を行った．

［清水博之］

カ）2010 年 3 月 23－3 月 25 日に，イギリス NIBSC で行われた *Ad hoc* Small Working Group discussion on development and evaluation of new diagnostic reagents and approaches to testing に参加し，ポリオ実験室診断技術開発に関する情報交換を行った．

［清水博之］

キ）2006 年 12 月より開始したＶＰＤｓプロジェクトの後方支援（協力計画策定，研修受け入れ）に関与すると共に，中国ＣＤＣ：2 名，甘粛 CDC：1 名に対し 2 週間の研修を行った

［吉田弘，有田峰太郎，西村順裕，清水博之］

ク）2009 年 10 月 21－10 月 22 日に行われた中国省級ポリオ実験室レビュー(重慶市)に JICA 専門家として参加し，実験室査察の結果を WHO および JICA に報告した．

［清水博之］

２．西太平洋地域の 2009 年のポリオウイルス分離状況

2009 年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の 208 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．カ

ンボジア，ベトナム，モンゴルにおいて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．野生株ポリオウイルスおよびVDPVは検出されなかった．
[清水博之，吉田弘，有田峰太郎，西村順裕，和田純子，脇田隆字]

３．世界ポリオ根絶計画に関わる研究

（１）新規ポリオウイルス・エンテロウイルス検査法の開発

世界ポリオ実験室ネットワークによるウイルス学的診断では，培養細胞を用いたウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査を基本としているが，検査の迅速化には限界がある．そのため，糞便等の臨床検体から，直接ポリオウイルス・エンテロウイルスを検出同定する新たな検査手法が検討されているが，検体からのポリオウイルス直接検出には，検査感度・精度に関する技術的課題が多く残されている．高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法を用いることなく，技術レベルの異なる多くの実験室への導入が可能な簡便なウイルス検出法(RT-LAMP 法，ポリオウイルス特異的PA法等)に関する技術開発を試みている．
[有田峰太郎，清水博之]

（２）便検体中のエンテロウイルスを含む便検体を同定するためのRT-LAMP法の開発

全世界的なポリオウイルス（PV）根絶計画の中で，小児麻痺症例を確定診断するために急性弛緩性麻痺症例の便検体からのPV分離･同定が必須とされている．PVが含まれる便検体を迅速かつ簡便に同定するために，エンテロウイルスの 5’NTR 部分を検出するためのRT-LAMP 法を開発した．開発した方法の検出限界は400コピー以下であり，PVを含むC群のエンテロウイルスを効率よく検出することができた（PV陽性の便検体：15/16，PV以外のC群エンテロウイルス：13/14）．そのため，本方法は，多数の便検体から，PVを含むエンテロウイルス陽性の便検体を選別する方法として有用であることが示唆された．
[有田峰太郎，Hua Ling（重慶市CDC），Donmei Yan（中国CDC），西村頼裕，吉田 弘，脇田隆字，清水博之]

（３）ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から 5,000 人の 3 歳児を無作為に抽出し，居住する市区町村に麻疹，風疹，ポリオ生ワクチンを接種した月齢の調査を依頼し，回収された調査票をもとに全国累積接種率を推計した．ポリオ生ワクチンの累積接種率は1回目の接種も2回目の接種も良好であった．前年度(2007年度)は累積接種率が若干低い傾向が認められたが，2008年度には，累積接種率は，ほぼ回復した．不活化ポリオワクチン導入に向けて，複数の異なる調査手法によるワクチン接種率調査を継続する必要がある．
[髙山直秀（都立駒込病院），清水博之，宮村達男]

（４）中国広東省における環境ウイルスサーベイランスによるポリオ/エンテロウイルス分離

中国広東省は流動人口を抱え疾患サーベイランスによる感染症流行像の把握は困難な状況である．広州市をパイロットエリアとして，環境サーベイランスによるポリオ/エンテロウイルスの地域流行像を把握することを目的とする研究を継続している．2008年4月から2010年2月までの流入下水，河川水調査を行ったところ，ほぼ毎月ワクチン由来株が下水から分離されることから，生ワクチン接種が定期的に実施されているアセスメントツールとしての有用性を示唆した．
[吉田　弘，帖佐　徹（九州産業衛生協会）]

（５）中国山東省における環境ウイルスサーベイランスの導入研究

山東省CDCとの共同研究にて2008年2月より継続して主として下水を材料としてエンテロウイルスの分離を行っている．下水由来の HEV-B に属するエンテロウイルスと同時期に分離された無菌性髄膜炎患者由来株について，VP1 領域の塩基配列を比較したところ，同一のクラスターに属することが確認され，環境ウイルスサーベイランスの有用性が認められた．また2009年5

月には 3 型と 2 型のワクチン由来組み替えポリオウイルスが下水から検出された．同時期の AFP サーベイランスからは検出されなかったことから，環境サーベイランスは高感度にヒト集団中に存在するウイルスを検出する手法として有用であることを示唆している．
［吉田　弘，帖佐　徹（九州産業衛生協会）］

（６）ポリオワクチン接種後に発症した小児の急性弛緩性麻痺症例

患児（6 ヶ月，男児）は 2007 年 12 月 3 日より発熱，同 6 日に両下肢急性弛緩性麻痺が出現し，活気の低下，哺乳力の低下がみられた．11 月中旬に 1 回目のポリオワクチン接種を受けていたため，12 月 12 日～15 日に複数回採取した糞便からウイルス分離を試みた．細胞変性効果のみられた培養上清をさらに L20B 細胞に接種しウイルス増殖を確認すると共に中和法によって同定を行った．その結果，複数の糞便からポリオウイルス 2 型及び 3 型が分離された．分離されたポリオウイルスの VP1 コード領域における遺伝子解析を行った結果，各型に対応する Sabin 株との変異率はそれぞれ 1.0%未満であり，ポリオウイルスワクチン株と判定した．患児の弛緩性麻痺は，ある程度の回復がみられたもの残存麻痺が認められ，VAPP の可能性が高いと考えられた．疫学調査の結果，患児の家族を含む接触者に新たな発症者はなく，二次感染も認めなかった．VAPP の発生リスクを抑えるため，不活化ポリオワクチンの早期導入が必要である．
［三好正浩，岡野素彦（道立衛生研），西村順裕，清水博之］

４．エンテロウイルスおよび他の腸管ウイルスに関する研究

（１）エンテロウイルス７１結合受容体の探索

エンテロウイルス７１結合受容体の同定を試みた．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）抗エンテロウイルス７１抗体を介して，エンテロウイルス７１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．様々な cDNA ライブラリーを用いてクローニングを試みたところ，Jurkat 細胞 cDNA ライブラリーから EV71 受容体候補分子が同定された．
［西村順裕，下島昌幸（東大医科研），脇田隆字，清水博之］

（２）エンテロウイルス 71 とヒト PSGL-1 との結合の解析

パンニングを用いた発現クローニングにより，エンテロウイルス 71 に結合する宿主蛋白質として，P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)を同定した．PSGL-1 をほとんど発現していない 293T 細胞に PSGL-1 を一過性に発現させると，293T 細胞にエンテロウイルス 71 が結合するようになった．また，この結合は抗 PSGL-1 抗体で阻害された．したがって，PSGL-1 とエンテロウイルス 71 が特異的に結合することが示唆された．
［西村順裕，脇田隆字，清水博之］

（３）ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞の樹立

ヒト PSGL-1 がエンテロウイルス 71 の細胞侵入に関わる受容体かどうかを解析するために，ヒト PSGL-1 を安定的に発現するマウス L929 細胞株(L-PSGL-1.1 細胞)を樹立した．エンテロウイルス 71-1095 株を L-PSGL-1.1 細胞に感染させたところ，感染後４日後に L-PSGL-1.1 細胞は細胞変性効果を示した．また，感染した L-PSGL-1.1 細胞質内にはエンテロウイルス 71 キャプシド抗原が検出された．さらにこれらの現象は，抗 PSGL-1 抗体で阻害された．したがって，ヒト PSGL-1 はエンテロウイルス 71-1095 株の侵入にも関わる受容体であることが示された．
［西村順裕，脇田隆字，清水博之］

（４）白血球細胞株，非白血球細胞株におけるエンテロウイルス 71 増殖の解析

各種細胞株を用いて，エンテロウイルス 71 受容体

である PSGL-1 の発現と，エンテロウイルス 71 増殖の関連を解析した．PSGL-1 は Jurkat 細胞等の白血球細胞株に発現していたが，RD 細胞，Vero 細胞など非白血球細胞株にはほとんど発現していなかった．また，抗 PSGL-1 抗体は，エンテロウイルス 71 の Jurkat 細胞での増殖を阻害したが，RD 細胞や Vero 細胞での増殖を阻害しなかった．したがって，RD 細胞，Vero 細胞は PSGL-1 以外の受容体を用いたメカニズムにより EV71 に感染することが示唆され，RD 細胞や Vero 細胞に発現する cavenge receptor B2 (SCARB2)が EV71 の機能的受容体であるとする小池らの報告を支持する結果といえる．

[西村順裕，脇田隆字，清水博之]

（５）Jurkat 細胞における，エンテロウイルス 71 分離株の増殖性の解析

エンテロウイルス 71 受容体である PSGL-1 を発現している Jurkat 細胞を用いて，エンテロウイルス 71 分離株(8 株)の増殖を解析した．8 株のうち 5 株の増殖は抗 PSGL-1 抗体で阻害され，PSGL-1 依存的増殖が示された．さらにこれら 5 株は，可溶性 PSGL-1 とも結合した．しかし，他の 3 株は可溶性 PSGL-1 に結合せず，Jurkat 細胞においても PSGL-1 依存的増殖を示さなかった．したがって，エンテロウイルス 71 は PSGL-1 に結合する株と結合しない株に分類されることが明らかとなった．

[西村順裕，脇田隆字，清水博之]

（６）ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖に必要な EV71 ゲノム変異の解析

EV71 分離株 5 株を L-PSGL-1.1 細胞に感染させたところ，RD 細胞等で継代した EV71 分離株(EV71-org)では EV71-1095 株のみ PSGL-1 依存的増殖を示したが，他の 4 株は顕著な増殖を示さなかった．一方，L-PSGL-1.1 細胞にて一度複製させた EV71(EV71-LPS1)ではどの分離株も PSGL-1 依存的に増殖した．EV71-org と EV71-LPS1 の全長のアミノ酸配列を比較したところ，4 株の EV71-LPS1 は VP2-K149 に共通のアミノ酸置換を有していた．したがって，VP2-149 におけるアミノ酸置換が L-PSGL-1.1 細胞における EV71 の効率的増殖に関与していることが示唆された．

[宮村紘平，西村順裕，脇田隆字，清水博之]

（７）ヒト中枢神経組織におけるエンテロウイルス 71 受容体発現の解析

PSGL-1 等エンテロウイルス 71 受容体分子の局在・分布と神経病変との関連性を解析することにより，アジア太平洋地域で発生しているエンテロウイルス 71 脳炎を含む手足口病流行における神経病原性発現の分子機構を明らかにすることを目的として，急性エンテロウイルス 71 脳髄膜炎患者の中枢神経組織における，特異的エンテロウイルス 71 受容体分子の組織分布を解析する．現在，エンテロウイルス 71 脳炎患者および対照例に由来する中枢神経組織を用いて，エンテロウイルス 71 抗原，組織病変と PSGL-1 および SCARB2 受容体分子の分布・局在および病理学的特徴の解析を行っている．

[Ong Kien Chai , Wong Kum Thong (マラヤ大学)，西村順裕，清水博之]

（８）エンテロウイルス 71 受容体 SCARB2 の同定

エンテロウイルス 71 感受性である RD-A 細胞のゲノム DNA を非感受性であるマウス由来 L929 細胞に導入することで，EV71 感受性を持つ L929 細胞(L051 細胞)を樹立した．L929 細胞および L051 細胞から Total RNA をそれぞれ精製し，マイクロアレイの結果から，L051 細胞における mRNA 発現が L929 細胞よりも多いとされたヒトの遺伝子 523 個の中から上位５つの膜蛋白質を選んだ．それらの遺伝子に対応するヒト由来ゲノムが L051 細胞のゲノムに存在するかを PCR で確認した．5 つの候補遺伝子のうち 1 つの遺伝子の全長ゲノムが L051 細胞のゲノム中に導入され L051 細胞にエンテロウイルス 71 感受性をもたらすことを確認し，その遺伝子産物である scavenge receptor B2 (SCARB2) が，EV71 の機能的受容体であることを明らかにした．

SCARB2 は，多くのヒト細胞・組織に発現しており，EV71 だけでなくコクサッキーA16 の受容体としても機能することが示された．

［山吉誠也，小池　智（都臨床研），清水博之］

（９）新規抗エンテロウイルス活性を示す化合物の同定

ワクチンが開発されていないエンテロウイルス 71（EV71）および生ワクチンの副作用が問題となっているポリオウイルス（PV）については，抗ウイルス薬は感染の予防および治療の有効な手段となることが期待される．天然物誘導体から成る化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより，EV71 および PV に対して阻害活性を示す化合物を同定した．この化合物は，PV および EV71 の複製を阻害し，かつ EV71 の感染初期を阻害する新規の抗エンテロウイルス活性を示した．

[有田峰太郎，武部　豊（エイズ研究センター），脇田隆字，清水博之]

（１０）エンテロウイルス 71 マウス感染モデルの解析

エンテロウイルス 71 マウス感染モデルを樹立するため，2 週齢のマウスに病原性を示すマウスアダプト株 2 株を分離した．マウスアダプトエンテロウイルス 71 株の遺伝子変異および培養細胞でのウイルス学的性状を解析したところ，1 株については温度感受性変異を有することが示された．現在，遺伝子解析および感染性クローンの作製により，in vivo および in vitro におけるウイルス学的性状を規定するウイルスゲノム部位の同定を行っている．

[Ong Kien Chai , Wong Kum Thong（マラヤ大学），西村順裕，有田峰太郎，清水博之]

（１１）上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討

ヘルパンギーナおよび手足口病と診断された患者由来咽頭ぬぐい液から原因となる HEV-A の多くは，HEp-2，RD-18S，Caco-2，Vero 細胞では分離できなかった．これに対し，エンテロウイルス間で多様性のある VP1 領域を増幅する CODEHOP VP1 RT-snPCR 法では，ヘルパンギーナ患者の 9 検体のうち 7 検体からコクサッキーウイルス A3（CV-A3）1 株，CV-A5 が 4 株および 2 株の CV-A6 が同定され，手足口病患者由来検体からは，55 検体中 51 検体から CV-A16 が 50 株，CV-A3 が 1 株同定された．HEV-A に感受性の高い RD-A 細胞を用いて，ヘルパンギーナおよび手足口病患者由来咽頭ぬぐい液 64 検体からウイルスの再分離を試みたところ，ヘルパンギーナ患者由来検体から CV-A5 が分離され，手足口病患者由来 55 検体のうち，６検体から CV-A16 が分離され，1 検体からは CV-A16 と CV-A5，2 種類のウイルスが分離同定された．さらに，冬期普通感冒の主要な原因ウイルスであり 100 以上の血清型が存在するヒトライノウイルス(HRV)のうち 48 血清型について，CODEHOP VP1 RT-snPCR 法の検出同定率を検討したところ，供試した全ての血清型において同定可能であった．

[吾郷昌信(長崎県環境保健研究センター)，Rifqiyah Nur Umami，西村順裕，清水博之]

（１２）セレン欠乏マウスモデルによるエンテロウイルス 71 病原性の解析

必須微量元素の一つであるセレンの欠乏条件下でのウイルス遺伝子変異誘導による病原性発現の可能性を検証するため，セレン欠乏マウスモデルおけるエンテロウイルス 71 感染モデルの樹立を試みた．妊娠マウスの妊娠初期よりセレン充足あるいは欠乏餌（特注市販品）を与えて飼育し，仔の出生後，通常に離乳し，離乳後も親と同じ餌で給餌を続ける．中枢神経組織を含めた各種臓器におけるセレン濃度およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性，等を測定してマウスモデルにおける欠乏状態を評価する．現在までに，脳，及び肝臓のグルタチオンペルオキシダーゼ活性について，セレン充足餌を与えた 25 日齢マウスに対して，セレン欠乏餌を与えた 25 日齢マウスは，有意に低いことを明らかにした（脳：$p<0.05$，肝臓：$p<0.0005$）．これより，交配開始から胎児期を経て，授乳期までの間，

母親マウスがセレン欠乏餌を食べ続けた場合，その仔マウスの肝臓，及び脳中セレン濃度がセレン充足餌を食べ続けた場合よりも低くなることが確認された．現在，EV71 感染実験を行い，セレン欠乏および充足条件下での病原性発現およびウイルス増殖について比較解析を行っている．

[小林紗弥加，渡辺知保(東大医学系研究科)，清水博之]

（１３）カプシド領域塩基配列を用いたエンテロウイルス同定法の比較

ヒトエンテロウイルス同定法として，カプシド領域の遺伝子解析に基づく塩基配列データを用いた手法が，現在広く用いられている．VP1 領域の配列に基づく解析が，血清型同定の精度の上からはもっとも妥当性があると考えられているが，比較的簡便に解析可能な VP4 領域解析を用いた同定の妥当性については評価が分かれる．今回，アジアの広範な地域で分離されたエンテロウイルス分離株を用いて，VP4，VP2 および VP1 領域の塩基配列を用いた同定法の妥当性を比較評価した．その結果，HEV-B および HEV-C については，VP1 領域を用いた同定の妥当性が高いが，HEV-A 分離株に関しては，どの遺伝子領域を用いてもエンテロウイルスの同定が可能であることが明らかになった．

[David Perera, Mary Cardosa (Universiti Malaysia Sarawak)，石古博明(三菱化学メディエンス)，吉田 弘，清水博之]

（１４）カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルスの解析

ヒトパレコウイルスは，急性胃腸炎，呼吸器症状患者等，多様な臨床症状を有する患者から分離されるが，臨床症状との関連性は，ほとんど明らかにされていない．カンボジアの AFP 患者由来糞便 256 検体から RNA を抽出し，Benschop らの方法に基づいた 5’NTR 領域の primer，probe を用いた Real Time-PCR により，HPeV1~6 型の検出を行った．Real-Time PCR 陽性サンプルは，VP1 領域の PCR 法を施行し血清型の同定を行い，その塩基配列を決定した．Real Time-PCR 法での HPeV 陽性検体は 256 検体中 17 検体であった．陽性の 17 検体中 9 検体では，EV11，EV14，EV71，EV88，CA2 などのエンテロウイルスが同一糞便検体から検出された．

[町田早苗（埼玉医大)，Rifqiyah Nur Umami，西村順裕，清水博之]

（１５）環境水中からのヒトパレコウイルス検出と地域流行との関連

ヒトパレコウイルス(HPeV)は，これまで1型ー6型の遺伝子型が知られているが，最近，新たに7型，8型が報告された．血清疫学的解析や病原微生物検出情報等から，我が国では1型，3型，6型の不顕性感染が多いことが予想されている．下水流入水中のHPeVを検出し，地域流行との関連性を調べた．下水流入水2Lを毎月1回採取し，フィルター吸着溶出法で濃縮した．濃縮液からRNAを抽出し，HPeV1ー6を検出するReal-time PCR法を施行した．濃縮液をRD-18s細胞，MA104細胞，Vero細胞およびHEp-2細胞に接種し，細胞変性効果を指標にウイルス分離を試みた．下水流入水中から，平成18年は8月ー11月までの4試料，平成19年は9月ー12月までの4試料，平成20年は6月ー12月までの6試料と平成21年1月の1試料からHPeV遺伝子が検出された．培養細胞によるウイルス分離は陰性であった．病原微生物検出情報でのHPeV検出は，主に5月ー11月に報告されているが，今回，下水流入水から検出された期間もほぼ一致しており，この時期，HPeVが顕性・不顕性に伝播していることが示唆された．

[町田早苗（埼玉医大)，岩井雅恵，滝澤剛則（富山県衛生研究所)，西村順裕，清水博之]

（１６）CA16 による手足口病に合併した菱脳炎症例の解析

手足口病の原因は，大部分が EV71 と CA16 である．EV71 は中枢神経合併症，特に菱脳炎を起こしやすいことが知られている一方，CA16 による中枢神経合併症の報告はまれである．発熱および発疹により手足口病と

診断された女児は，嘔吐・体幹の震え・眼の揺れ・立位不能等が出現し，神経学的所見として，異常眼球運動(オプソクローヌス)，頭部・体幹・上肢のミオクローヌス，筋力・筋トーヌスの減弱，体幹・四肢の失調を認め，オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群の症状を呈していた．便からのウイルス分離で CA16 が検出され，血清抗体価は，EV71 は感度以下であったのに対し CA16 は 64 倍と上昇していた．髄液のウイルス分離･エンテロウイルス PCR はいずれも陰性であった．本症例は，CA16 による手足口病に菱脳炎を合併した最初の報告である．CA16 による手足口病の流行の際にも，菱脳炎等の中枢神経合併症に留意する必要がある．

[實藤雅文，楠原浩一(九大)，西村順裕，清水博之]

（１７）ヒトカルジオウイルス国内分離株の遺伝子解析

近年，カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている．日本でも，この新たなヒトカルジオウイルスの検出が，最近報告されているが，我が国における伝播実態と特定疾患への関与は明らかでない．高知県で，無菌性髄膜炎および手足口病患者より分離された不明ウイルス 2 株について，RDV 法による非特異的遺伝子検出により，Saffold virus 様遺伝子が同定された．そこで，いままで報告されている Saffold virus 遺伝子をもとにプライマーを作製し，分離株の遺伝子解析を行った．カプシド領域の遺伝子解析により，分離ウイルス 2 株は，Saffold virus 3 型に近縁であることが示唆された．Saffold virus 分離株は，LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞において CPE の発現を伴ない増殖したが，他のヒト細胞で顕著なウイルス増殖は認められなかった．

[細見卓司(高知県衛生研究所)，水谷哲也(ウイルス一部)，Naeem Asif，西村順裕，清水博之]

（１８）パキスタンの糞便検体からのヒトカルジオウイルスの検出と遺伝子解析

近年，カルジオウイルス属に分類される新たな腸管ウイルス(Saffold virus)の検出が世界各地で報告されている．パキスタンにおける AFP サーベイランスにより採取された糞便検体のうち，パキスタン NIH にてポリオウイルスおよびエンテロウイルスを検出した糞便検体以外の検体から，Saffold virus 遺伝子検出およびウイルス分離を試みた．Saffold virus 特異的 RT-PCR およびリアルタイム PCR システムにより，Saffold virus 遺伝子が高頻度に検出された．LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ，多数の CPE 因子が検出されたが，解析の結果，ほとんどが非ポリオエンテロウイルスによる CPE であることが示された．糞便中の Saffold virus は，LLC-MK2 細胞および HeLa 細胞における増殖効率が低く，通常の手法ではウイルス分離は困難であることが明らかとなった．糞便中から直接 Saffold virus 遺伝子を増幅し，遺伝子解析を行ったところ，これまでに報告されている以上に多様な遺伝子型の Saffold virus の存在が明らかとなった．Saffold virus は，ヒト腸管ウイルスとして広範に伝播していることが示唆された．今後，より詳細なウイルス学的解析が必要とされる．

[Naeem Asif，西村順裕，清水博之，Syed Sohail Zahoor Zaidi (パキスタン NIH)]

５．ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリィティシステムに関する調査研究

（１）日本におけるポリオウイルス野生株保有状況調査

世界的ポリオ根絶達成およびその後の OPV 接種停止を視野に入れ，WHO は「野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する世界的行動計画」を策定し，全世界で統一された基準の下，ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを，すべての加盟国に求めている．我が国では，西太平洋地域における野生株ポリオウイルス伝播の終息を受け，2000-2002 年にかけて大規模かつ広範な野生株ポリオウイルス保有施設調査が行われたが，調査票の全体的な回収率が低く，調査精度とその後のフォローアップに関する多くの問題

点が指摘されていた．2000-2008 年における各種の野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を，厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し，野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する可能性のある施設をリストアップしたうえで，所管省庁の了解のもと各施設に対し保有状況調査を実施し，野生株ポリオウイルス感染性材料保有施設を特定した．保有施設リストを含む野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書を作成し，WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会に提出した．その結果，2008 年 12 月，WHO 西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了が宣言された．世界ポリオ根絶計画が進展な伴い，保有施設リストのアップデートを今後も継続する必要がある．

[小林一司，大坪寛子(厚生労働省)，小松俊彦，ルナール純子，斎藤真紀（バイオメディカルサイエンス研究会)，宮村達男，清水博之]

６．その他

平成 21 年度は 6 件の行政検査依頼があり，ウイルス分離同定，塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した．型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは，すべてワクチン株と同定された．

III．肝炎ウイルスに関する研究

１．A 型肝炎ウイルス(HAV)に関する研究

（１）スリランカのＡ型肝炎流行における疫学調査

2009 年 5 月から発生したスリランカに於けるＡ型肝炎流行の疫学調査を行っている．この大流行の要因としてスリランカ内戦終結に伴う捕虜の解放，難民キャンプの形成，軍隊内の抗体保有率の低下と感染予防措置の不備が挙げられる．同じく抗体保有率が低下しつつある一般住民や国際平和協力などで先進国から派遣される人達への影響を最小限にとどめるため，このようなケースの調査は重要である．

[清原知子，Dahanayaka N（スリランカ・Rajarata 大学），吉崎佐矢香，佐藤知子，石井孝司，脇田隆字]

（２）自己溶解性マイクロニードルアレイ（MNA）による抗 HAV 抗体の誘導

不活化Ａ型肝炎ウイルスを主剤とする MNA の作成法の検討，マウス免疫及び血清中の抗 HAV 抗体測定を行った．MNA 接種群の抗体陽転率（100%）は対象とした皮下接種群（60%）より高く，効果的なワクチン投与法と考えられた．

[清原知子，*内藤誠之郎，*落合雅樹，*片岡紀代，佐藤知子，石井孝司，脇田隆字（*検定検査品質保証室）]

（３）2010 年春季に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析

日本での A 型肝炎患者数は 2007 年以降非常に低いレベル（150 人/年程度）で推移していたが，2010 年は３月から全国各地で A 型肝炎が多発している．全国の地方衛生研究所と共同で，A 型肝炎患者の糞便または血清から A 型肝炎ウイルス(HAV)ゲノムの配列を決定し，流行状況を分子疫学的に解析したところ，流行株は genotype 1A の２つのクラスターと 3A の１つのクラスターに大部分が分類されることが判明した．本年に A 型肝炎が多発した理由は，従来日本に土着していた株（genotype 1A）に加え，別の新たな 1A 株が日本に侵入し，また韓国で大流行した株（3A）も一部日本に侵淫してきたためであると考えられた．

[石井孝司，清原知子，吉崎佐矢香，佐藤知子，*島田智恵，*中村奈緒美，*多田有希，**野田 衛，脇田隆字（*感染症情報センター，**国立衛研食品衛生管理部），他 23 地方衛生研究所との共同研究]

２．B 型肝炎ウイルス（HBV）に関する研究

（１）HBV 放出を評価する定量系の樹立

HBV 産生培養細胞株を用いて，培養液中 HBV DNA をリアルタイム PCR 法により定量した．本法によって HBV DNA が 100 コピー以上のサンプルに関しては再現よく HBV DNA を定量できることがわかった．

[渡士幸一，脇田隆字]

（２）HBV 産生細胞のリクローニング

HBV 増殖阻害剤のスクリーニングに使っている2.2.15細胞(HepG2由来)のリクローニングを試みた．各クローンのHBs抗原産生量を測定したところ，産生能が異なる複数のクローンを得た．最もHBs抗原産生能が高いクローンは安定した抗原産生能を示し，薬剤スクリーニングにも使用可能であった．

[清原知子，渡士幸一，石井孝司，脇田隆字]

３．C型肝炎ウイルス（HCV）に関する研究

（１）NS5Aと相互作用するヒトプロテインキナーゼの探索

NS5Aのリン酸化はウイルスゲノム複製だけでなく，感染性ウイルス粒子の形成にも重要である．そこで，NS5Aと相互作用するヒトプロテインキナーゼを網羅的手法により探索した．その結果，408種類のヒトプロテインキナーゼのうち，89種類（うち79種類がセリン/スレオニンプロテインキナーゼ）においてNS5Aとの強固な相互作用が認められた．

[政木隆博，澤崎達也（愛媛大），遠藤弥重太（愛媛大），鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（２）NS5Aのリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索

NS5Aと強く相互作用するヒトプロテインキナーゼを，それぞれ[-^{32}P]ATP存在化で精製NS5Aと混和し，SDS-PAGE後オートラジオグラフィーによりNS5Aのリン酸化を解析した．その結果，9種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼがNS5Aをリン酸化する活性を有していた．うち1種類はNS5Aのリン酸化に関与することが既に報告されているカゼインキナーゼ2であった．

[政木隆博，澤崎達也（愛媛大），遠藤弥重太（愛媛大），鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（３）HCVの生活環に関与するセリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定

AlphaScreen解析，in vitroリン酸化アッセイによりスクリーニングされた9種類のキナーゼについて，それらの細胞内発現をsiRNAを用いてノックダウンしたところ，4種類（CK11，CK12，CK1，CK22）においてHCVゲノム複製の有意な低下が認められた（サブゲノミックレプリコン細胞を用いた検討）．HCV感染細胞を用いた検討では，感染性ウイルス粒子の産生量がCK1及びCK1のノックダウンにより著明に減少し，CK22のノックダウンにより中等度減少した．

[政木隆博，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（４）NS5Aとの相互作用により活性調節を受ける新規プロテインキナーゼの探索

HCV蛋白がプロテインキナーゼと相互作用することでキナーゼ活性を調節し，ウイルス性肝炎の病態形成に関与することが知られている．今回，AlphaScreen解析においてNS5Aとの相互作用が強固であったプロテインキナーゼを対象に，NS5Aとの相互作用により活性調節を受ける新規キナーゼの探索を試みた．キナーゼ基質のリン酸化をリン酸化抗体を用いて解析し，NS5A発現細胞において負に活性調節を受けるプロテインキナーゼを同定した．

[政木隆博，加藤孝宣，脇田隆字]

（５）NS5Aとの結合に必要なコア蛋白領域の同定

NS5Aとコア蛋白の相互作用は感染性HCV粒子の形成に重要である．しかし，その結合様式や結合領域は明らかになっていない．そこで，NS5Aとの結合に必要なコア蛋白領域を同定するために，種々のコア蛋白欠損体を用いて解析を行った．精製蛋白を用いたpull-down解析により，コア蛋白のaa 117-173領域がNS5Aとの相互作用に重要であることが分かった．現在，細胞内での結合領域の解析を免疫沈降法により行っている．

[政木隆博，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（６）コア蛋白との結合に必要なNS5A領域の同定

コア蛋白との相互作用に重要なNS5A領域は，NS5AのC末端側であることが示唆されている．コア蛋白との結合に必要なNS5A領域をさらに詳細に解析するた

めに，種々のNS5A欠損体を用いて解析を行っている．精製蛋白を用いたpull-down解析により，NS5Aのdomain 3（JFH-1 NS5Aにおけるaa 352-466)がコア蛋白と相互作用することを確認した．現在，細胞内での結合領域の解析を免疫沈降法により行っている．
[政木隆博，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（７）NS5Aとコア蛋白の相互作用に関与する宿主因子の解析

HCVの生活環はウイルス蛋白が様々な宿主因子と相互作用することによって維持されており，NS5Aとコア蛋白間の相互作用にも宿主蛋白等の介在因子が関わっている可能性が考えられる．そこで，野生型JFH-1複製細胞と変異型JFH-1複製細胞におけるNS5A結合蛋白をSDS-PAGE後の銀染色で確認したところ，両細胞間の泳動プロファイルに差が認められた．現在，宿主因子の同定に向け解析を進めている．
[政木隆博，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（８）NS5A-コア蛋白間相互作用の生細胞イメージング

CoraHue®Fluo-chase Kitは，タンパク質断片コンプリメンテーション法を基にした，タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出するキットである．このシステムを用い，生細胞におけるNS5A-コア蛋白間相互作用をリアルタイムに解析した．蛍光タンパク質断片を融合した形でNS5A及びコア蛋白をHuh-7細胞に発現させ，蛍光顕微鏡でシグナルを解析した．その結果，野生型NS5A導入細胞において中等度の蛍光シグナルが観察されたのに対して，変異型JFH-1導入細胞では蛍光シグナルが減弱していた．
[政木隆博，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（９）HCVの複製に重要な領域の解析

培養細胞で効率よく増殖できるHCV JFH-1株と増殖できないJ6CF株を比較し，効率の良い複製に重要な領域および変異を同定した．その結果，NS3ヘリカーゼをJFH-1型にした場合，NS5B領域の3つのアミノ酸変異と，3’UTR内の可変領域の変異，およびJFH-1型の短いポリU領域が効率の良いウイルス複製に重要であることが明らかとなった．
[村山麻子，伊達朋子，加藤孝宣，鈴木哲朗，豊田哲也（上海パスツール研)，脇田隆字]

（１０）培養細胞で非増殖型のウイルス株を増殖型にする変異の同定

培養細胞での増殖がみられないHCV J6CF株を増殖可能なウイルスに改変するために必要な点変異の同定を試みた．ウイルスRNAを導入した細胞を長期に培養すると，ウイルスゲノムに適応変異が導入された．それらの変異の効果を調べた結果，新たにNS4A領域の点変異がウイルスゲノム複製，粒子形成の効率を上昇させることが明らかとなった．
[村山麻子，伊達朋子，加藤孝宣，鈴木哲朗，脇田隆字]

（１１）HCV の遺伝子型 2b/2a 間でのキメラウイルスの作製と解析

HCV の遺伝子型 2b/2a 間で作製したキメラ遺伝子を培養細胞に導入し，長期培養した結果，得られた変異を解析した．コア領域の適応変異により，ウイルスゲノムの複製能は変化しなかったが，培養上清中への感染性ウイルス粒子産生が増加した．詳細な検討の結果，この変異により細胞内でのウイルス粒子の形成効率が上昇していることが明らかとなった．この変異を導入することにより，感染性ウイルスが効率よく作られた結果，ウイルス感染が素早く広がり，2b/2a キメラウイルスを効率的に得られるようになった．
[村山麻子，伊達朋子，鈴木哲朗，加藤孝宣，脇田隆字]

（１２）新規細胞株を用いた効率の良いHCV培養系の作製

ウイルスの感染予防ワクチンの開発には効率の良いウイルス大量培養系が不可欠である．現在の標準的に使われている細胞株では増殖可能なウイルス株が限

られており，またその増殖効率も十分ではないため，新たな細胞株を用いたより効率の良いHCV培養増殖系の構築を試みた．この細胞株を利用すると従来使われているHuh7.5.1細胞と比較して約10倍のウイルスが得られた．詳細なメカニズムは現在解析中であるが，少なくともこの細胞株では，細胞内でウイルス粒子がより効率的にできており，感染の広がるスピードが早くなっていることが明らかとなった．
[村山麻子，金ソルイ，加藤孝宣]

（１３）JFH-1 coreと種々の株のNS5Aとの相互作用の解析

CoreとNS5Aの相互作用はHCV感染性粒子産生の初期段階に重要である事が知られている．JFH-1株及び，野生型では培養細胞内で増殖しないH77，Con1，J6CF，MA株のNS5AとJFH-1のcoreを293T細胞に強制発現させ，coreによる免疫沈降法により相互作用を比較した．その結果，H77，Con1，MA株のNS5Aにおいてcoreとの相互作用の増強を認めた．一方J6株ではJFH-1株と同等であった．
[岡本有加，政木隆博，村山麻子，加藤孝宣，脇田隆字]

（１４）JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に与える影響

JFH-1株のNS5A全体を1a型H77c株，1b型Con1株，2a型J6CF株，2b型MA株にそれぞれ置き換えた全長キメラ株を作製し，これらの増殖を検討した．H77c株に置き換えたキメラ株では複製能及び粒子産生ともに変化せず，Con1株に置き換えたキメラ株では，複製，感染性粒子産生に低下が見られた．一方，J6及びMA株に置き換えたキメラ株では，複製能に変化は無く感染性粒子産生のみ上昇した．
[岡本有加，政木隆博，村山麻子，加藤孝宣，脇田隆字]

（１５）JFH-1株におけるNS5AのC末端領域の置換がウイルス増殖に与える影響

J6CF株及びMA株は野生型では培養細胞内で増殖出来ないが，JFH-1株のNS5Aをこれらの株に置換すると感染性粒子産生能が上昇する．この原因としてNS5A-5B間の切断効率の変化が考えられた．これを確認するため，JFH-1株のNS5AのC末10アミノ酸をJ6型，或はMA型にした変異体を作製し，増殖能を検討した結果，この領域の置換のみで感染性粒子産生の上昇を認めた．
[岡本有加，政木隆博，村山麻子，加藤孝宣，脇田隆字]

（１６）JFH-1株のNS5Aの置換がNS5A-5B切断効率に与える影響の解析

JFH-1株のNS5Aを他の株に置換した際の感染性粒子形成効率の上昇が，NS5A-5B間の切断効率の差に因るかを検証するため，パルスチェイス法により切断効率の比較を行っている．Huh7FVC細胞にT7RNAポリメラーゼ組み替えワクシニアウイルスを感染させ，JFH-1のサブゲノミックレプリコンをDNAトランスフェクションした系で条件の至適化を行った．今後は決定した条件で，野生型と変異体を用いて検討を行う．
[岡本有加，政木隆博，村山麻子，加藤孝宣，脇田隆字]

（１７）急性肝炎患者血清から分離したHCV株の解析と全長コンストラクとの構築

急性肝炎患者血清からHCV RNAを抽出し，その塩基配列を見たところ，このHCV株はgenotype 2bに属することがわかった．そこでHCV全長を含むようにPCRを行い，そのフラグメントを5クローンずつシーケンスし，そのHCV株のコンセンサス配列を決定した．PCRで得られたフラグメントをつなぎ合わせ全長のcDNAを作製した．
[金ソルイ，藤原圭（名古屋第二赤十字病院），加藤孝宣，脇田隆字]

（１８）細胞内の活性酸素種を検出する系の確立

培養細胞内の活性酸素種を直接検出できる系を検討した．細胞内の活性酸素種と非特異的に反応し，蛍光

を発するプローブとしてCM-H_2DCFDAを用いた．まず，ポジティブコントロールとして過酸化水素処理を行い，活性酸素種の産生量の変化を調べた．その結果，過酸化水素により活性酸素種の産生量が2倍程度上昇する結果が得られた．そこで，HCV JFH-1ウイルスの感染による影響を検討した．その結果，HCV感染により活性酸素種の産生量の上昇がみられた．

[金ソルイ，加藤孝宣，脇田隆字]

（１９）Genotype 1b株のサブジェノミックレプリコンを用いた適応変異の影響の検討

Genotype 1b株のSGRにルシフェラーゼ遺伝子を導入し，ルシフェラーゼレポーターシステムで複製活性を測定した．Genotype 1b株はwild typeでは増殖能が認められなかったため，ネオマイシン耐性遺伝子を持ったサブジェノミックレプリコンの長期培養で得られた適応変異を導入し，複製活性に及ぼす影響を検討した．その結果，NS3とNS5A領域の適応変異を導入することにより，wild typeに比べ複製活性が著しく上昇することが確認できた．

[金ソルイ，伊達朋子，加賀美奈子，加藤孝宣，脇田隆字]

（２０）Genotype 1b株のcore領域のアミノ酸変異がHCVの複製に及ぼす影響の検討

coreの70番，91番目のアミノ酸の変異によってインターフェロン治療に対する感受性の違いが報告されている.そこで，それらのcoreのアミノ酸変異がHCVの複製に及ぼす影響を検討した.ルシフェラーゼレポーター遺伝子を持つgenotype 1b株の全長レプリコンにcore領域の変異を導入し,複製活性を細胞内のルシフェラーゼ活性を測定することで検討した.その結果,コア領域のアミノ酸変異の有無により，その複製に違いは認めず，core領域の変異の影響はこの方法では検出できなかった．

[金ソルイ，加藤孝宣，脇田隆字]

（２１）Genotype 1b株，genotype 2a株のサブジェノミックレプリコンを用いたインターフェロン感受性の比較

適応変異を導入したgenotype 1b株とgenotype 2a株のサブジェノミックレプリコンを用いて，IFN-αとIFN-λによる複製活性の抑制効果を検討した．その結果，IFN-αはgenotype 1b株，genotype 2a株共に複製活性を抑制した．それと同じく，IFN-λも両株の複製活性を抑制した．また，IFN-αとIFN-λを同時処理することにより相加的な抑制効果がみられた．

[金ソルイ，政木隆博，加藤孝宣，脇田隆字]

（２２）JFH-1患者血清感染チンパンジーで認めた変異がJFH-1の培養細胞での増殖能に与える影響の検討

JFH-1株が分離された患者血清のチンパンジーへの接種実験によりいくつかの適応変異が同定された．それらの変異をJHF-1株に導入し,培養細胞での感染増殖に与える影響を検討した．その結果，これらの変異によりJFH-1株の培養細胞内での増殖は低下するが,ウイルス粒子の生成効率は亢進していた．これらの変異のJFH-1株に与える影響は，HCVのチンパンジーでの感染に関与していると考えられた．

[Mohsan Saeed，加藤孝宣，渡邉治雄，脇田隆字]

（２３）小胞体関連蛋白分解（ERAD）因子がHCVの粒子生成に与える影響の検討

HCV感染に伴って，小胞体ストレス応答に関与するXBP-1のスプライシングが誘発され，その下流に位置する小胞体関連蛋白分解（ERAD）因子であるEDEM１の発現が誘導された．このEDEM1 の発現を押さえることにより，細胞内のHCVエンベロープ蛋白の発現レベルが上昇し，その結果感染性ウイルス粒子が多く生成されることがわかった．従ってHCV粒子産生過程にERAD経路が関与していることが示唆された．

[Saeed Mohsan，加藤孝宣，鈴木哲朗，脇田隆字]

（２４）分泌型レポーターを用いたサブジェノミックレプリコンシステムの構築

HCVの複製を抑制する薬剤のハイスループットスクリーニングに向けて，分泌型レポーターを持ったHCV JFH-１株のサブジェノミックレプリコンを作製した．分泌型ルシフェラーゼを組み込んだJFH-1レプリコンと分泌型アルカリフォスファターゼを組み込んだJFH-1増殖不能変異導入レプリコンのRNAを培養細胞内に導入し，培養上清中のルシフェラーゼおよびアルカリフォスファターゼを測定した．時間経過とともにルシフェラーゼ活性のみが上昇し，レプリコンの増殖をモニターが可能であった．

[金ソルイ，加藤孝宣，脇田隆字]

（２５）ISDR変異がHCV JFH-1株の感染増殖とインターフェロン感受性に与える影響の検討

インターフェロン(IFN)治療に対する感受性への関与が報告されているISDRの変異がHCV JFH-1株の培養細胞内での感染増殖に与える影響を検討した．JFH-1株のISDR部分を遺伝子型1bのワイルドタイプ(WT)，WTの配列に比べ７つの変異を持ったもの，J6タイプのものそれぞれに置換した株を作成し，培養細胞での増殖能を検討した．その結果，ISDRの置換によりJFH-1株の増殖能には変化を認めず，またインターフェロンの感受性に与える影響も確認できなかった．

[杉山奈央，加藤孝宣，脇田隆字]

（２６）コア領域のアミノ酸変異がHCV JFH-1株の感染増殖とインターフェロン感受性に与える影響の検討

HCV JFH-1株の感染増殖系を用い，インターフェロン(IFN)治療に対する感受性への関与が報告されているコア領域のアミノ酸変異がHCVの増殖およびIFN感受性に与える影響を検討した．JFH-1株のコア領域aa70，aa91それぞれのアミノ酸をミュータントタイプに置換した株を作成し，培養細胞での増殖能を検討した．その結果，コア領域のアミノ酸変異の導入によりJFH-1株の増殖能に変化を認めず，またインターフェロンの感受性にも影響を与えなかった．

[杉山奈央，加藤孝宣，脇田隆字]

（２７）JFH-1患者血清感染チンパンジーで認めた変異がヒト肝細胞移植マウスでの増殖能に与える影響の検討

JFH-1株が分離された患者血清のチンパンジーへの接種実験によりいくつかの適応変異が同定された．それらの変異をJHF-1株に導入し，ヒト肝細胞移植マウスでの感染増殖に与える影響を検討した．チンパンジー内で誘導された生体内適応変異株は，ヒト肝細胞移植マウスで通常のJFH-1株と同程度の複製増殖能を示した．従って，生体内で誘導された適応変異では，生体内での増殖複製能は維持されていると考えられた．

[Mohsan Saeed，今村道雄（広島大学），茶山一彰（広島大学），加藤孝宣，渡邉治雄，脇田隆字]

（２８）HCV感染細胞のアポトーシス検出法の確立

HCV感染がアポトーシスに与える影響を検討するため，感染細胞と非感染細胞それぞれでアポトーシス細胞を個別に検出する方法を確立した．HCV JFH-1株およびその生体内変異株をHuh7.5.1株に遺伝子導入し，その後TNF-αやFAS ligandにアクチノマイシンDを加えアポトーシスを誘導した．その後アポトーシス細胞をTUNEL染色で，HCV感染をNS5a染色で検出しFACSで解析を行った．その結果，生体内での適応変異を得た株では，感染細胞でアポトーシスの誘導が抑制されていた．

[椎名正明（東北大学），Mohsan Saeed，杉山奈央，加藤孝宣，脇田隆字]

（２９）JFH-1株培養細胞適応変異株の分離

JFH-1株を培養細胞に導入し長期培養を行うことにより適応変異株を誘導した．しかし，この適応変異のダイレクトシーケンスにより同定された変異のみでは，その適応ウイルスの増殖能を再現できなかった．そこで，適応ウイルスを96ウエルプレートに播いた細胞に再感染させることで，強い増殖能を持った適応ウイルスを分離した．この分離したウイルスの変

異を同定し，JFH-1株に導入することにより適応ウイルスと同レベルの感染増殖能を持つウイルスが得られた．従って限界希釈再感染法による適応変異ウイルスの分離は,適応変異の同定に有用と考えられた．
[杉山奈央，加藤孝宣，脇田隆字]

（３０）HuH-７細胞株を用いたJFH-1株の複製と感染性の検討

HuH-７細胞の様々な株でHCV JFH-1株の複製と感染性について検討した．それぞれの細胞株にJFH-1全長RNAを導入したところ，多くの細胞株でHuh7.5.1細胞よりも強い複製が観察された．また感染感受性について検討したところ，主要なレセプターであるCD81の発現はHuh7.5.1細胞ほど高くなく，等量のウイルスを感染させた時に観察されるフォーカスの数も少なかった．現在，これらの細胞の特徴について解析中である．
［菅野美津子（東芝RDC），吉村斉湖（東芝RDC），杉山奈央，村山麻子，金ソルイ，加藤孝宣，脇田隆字]

（３１）インターフェロン（IFN）治療反応性患者中のHCV株の変異が培養細胞内での増殖複製に与える影響

IFN治療に反応性の患者と非感受性の患者において，感染しているHCV株の違いを比較したところ，E1とNS2領域の変異が検出された．そこでJFH-1株を用い，培養細胞内でこれらの変異の増殖複製に与える影響を検討した．その結果，E1の変異の導入により複製能は上昇したが感染性ウイルス粒子の産生は低下した．またNS2の変異導入により，複製能と感染性ウイルス粒子生成能の両方が上昇していた．これらの変化がIFN治療感受性に関与している可能性が示唆された．
[中本晋吾（千葉大学），杉山奈央，加藤孝宣，脇田隆字]

（３２）HCV コア蛋白質とゲノム RNA との相互作用

HCV ゲノム RNA 内のパッケージングシグナルを明らかにするため，精製HCV C 末端欠失コア蛋白質(1-82aa)，及びその変異体（３カ所のクラスター内の正に荷電したアミノ酸残基のアラニン置換変異体（m1，m2，m3））と，高次構造を取る精製 5’UTR，及び 3’UTR RNA を用いた．その結果，コア蛋白質は 5’UTR の IIIacd 領域，また 3’UTR の stem loop Ⅰ領域と効率良く結合した．ゲノム RNA との結合にはコア蛋白質の m2，及び m3 領域が重要であることを示唆する結果を得た．
[松田麻未,下池貴志,安東友美，鈴木亮介，鈴木哲朗]

（３３）HCV 産生を抑制する抗コアイントラボディの作製

HCV の構造蛋白質であるコアに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから，抗体の可変部の遺伝子をクローニングし，シングルドメインまたは scFv を発現するプラスミドを作製した．これらの抗体分子とコア蛋白質との相互作用を免疫沈降法によって確認した．また抗体分子を発現させる事により，感染細胞からの感染性 HCV 産生量の減少が認められた．この事から，コア蛋白質を認識するイントラボディは培養細胞における HCV の増殖を抑制出来る事が示唆された．
[斎藤憲司，鈴木亮介，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３４）HCV コア蛋白質および hnRNPH1，F の結合部位の同定

hnRNPH1，F による HCV コア蛋白質の認識機構を明らかにするためにコア蛋白質および hnRNPH1,F の各種変異欠損体をバキュロウイルス発現系および大腸菌発現系で発現させた．これらの発現蛋白を用いて GST-pull down 法，免疫沈降法などで結合部位を解析した．hnRNP H1 結合領域は Core 蛋白質の aa 1-43，aa 92-111，hnRNP F 結合領域は Core 蛋白質の aa 1-43，aa 66-91 であった．
[村上恭子，勝二郁夫（神戸大微生物），小池和彦（東大消化器内科），石井孝司，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３５）HCV コア蛋白質および hnRNPH1,F の結合を阻害する RNA の配列特異性の検討

hnRNPH1, F に結合する RNA motif については既に報告があり，同様の配列が HCV コア蛋白質の結合部位である HCV-IRES (internal ribosomal entry site) 内 IIId 領域に存在する．Flag-tag を付加した各蛋白を強発現した細胞の crude S10 を作製し，IIId-RNA との結合について検討した．その結果，hnRNP F と hnRNP H は HCV IRES IIId 領域に結合することが明らかになった．

[村上恭子，阿部克俊，勝二郁夫（神戸大微生物），小池和彦（東大消化器内科），石井孝司，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３６）HCV 感染性粒子産生への HnRNPH1/F の影響の解析

HCV JFH1 産生系において hnRNPH/F それぞれを強制発現した場合と siRNA で内在性 hnRNPH1/F をノックダウンしウイルス産生への影響を解析した．hnRNP H は HCV 感染性粒子産生に促進性に機能し，hnRNP F は HCV 感染性粒子産生に抑制性に機能することが示唆された．

[村上恭子，阿部克俊，勝二郁夫（神戸大微生物），小池和彦（東大消化器内科），石井孝司，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３７）HCV E2 タンパク質の結晶化

293GnTI(-)細胞で作製，精製したマンノース型の E2dTM（膜欠失型）を用いて結晶化のスクリーニングを行った．用いた E2dTM は多量体を形成したこと，ウイルスに対して感染阻害活性を示さないことから，立体構造が正常ではないと考えられる．そこで異なる細胞発現系についても同時にタンパクの作製，精製を試みた．ハエ S2 細胞で作製，精製した E2dTM は単量体の割合が非常に高く，感染阻害活性を示した．S2 細胞で作製した E2dTM をゲルろ過にて分画しその性状解析を行い，結晶化を試みる予定である．

[渡邉則幸，村山麻子，赤澤大輔，朝長充則，伊達朋子，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３８）HCV 感染，粒子形成における E1，E2 の糖鎖の役割

HCVpp システムを用いて複合型またはマンノース型の糖鎖を持つ HCVpp を作製し細胞への侵入を比較し両 HCVpp は同様に細胞に侵入することが分かった．次に個々の N 型糖鎖（E1：4 ヶ所，E2：11 ヶ所）に注目し，それぞれの糖鎖修飾部位のアミノ酸を置換した NQ 変異型（アスパラギンをグルタミンに置換）の HCVcc を作製して，その性状を比較した．その結果，E1 で 2 ヶ所，E2 で 2 ヶ所の NQ 変異型で粒子産生が減少した．

[渡邉則幸，村山麻子，赤澤大輔，朝長充則，伊達朋子，鈴木哲朗，脇田隆字]

（３９）HCV 生活環における小胞体関連蛋白分解機構の役割

遺伝子ノックダウン，強制発現実験より，小胞体関連蛋白分解因子である EDEM1，EDEM2，EDEM3 のうち EDEM1，EDEM3 が HCV 産生の調節に関与することを見出した．３種類の EDEM とも HCV E2 及び E2 と相互作用するが，ERAD の下流分子である SEL1 は EDEM1，EDEM3 と結合しうることが示され，ユビキチンリガーゼ複合体への結合性が EDEM 間で異なることが初めて明らかとなった．

[Saeed Mohsan，加藤孝宣，鈴木哲朗，脇田隆字，渡邉治雄]

（４０）HCV NS2 と結合する宿主因子のウイルス粒子形成への関与

分割ユビキチン法を利用した酵母 two hybrid システムにより，HCV NS2 と結合する宿主因子を，ヒト肝臓ライブラリーよりスクリーニングを行い，同定した．これらの宿主因子について，さらに siRNA を用いてその発現をノックダウンさせ，ウイルスの産生に影響する宿主因子を選別した．その結果，ノックダウンにより HCV の増殖が顕著に抑制される宿主因子を見いだした．

[鈴木亮介，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４１）HCV NS3 ヘリカーゼと結合する宿主因子の探索と機能解析

HCV NS3 ヘリカーゼに結合する宿主因子を分離し，質量分析法で同定した．HCV NS3 ヘリカーゼ結合因子として新規結合因子を８つ同定した．このうち，ERGIC53 について詳細な検討を行った．これらの蛋白のノックダウンにより HCV-RNA 複製効率が低下した．また，細胞染色によりこれらの蛋白は細胞内でＮＳ３およびと共局在することから，HCV 複製複合体の ER から Golgi の輸送に関与する可能性が示された．

[浜本いつき（感染症情報センター），多屋馨子（感染症情報センター)，岡部信彦(感染症情報センター)，勝二郁夫（神戸大微生物），村上恭子，石井孝司，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４２）HCV プロテアーゼ阻害剤に対する耐性 HCV の解析

HCV JFH-1 株の持続感染 Huh7 細胞を作製し，HCV プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 100nM を HCV 持続感染細胞に添加し３ヶ月間継代培養したところ，BILN2061 耐性の HCV が出現した．HCV 遺伝子配列を解析した結果，NS3 領域に２カ所のアミノ酸置換変異（V71A, K122R）が見出された．変異ウイルスを用いた解析から，BILN2061 に対する抵抗性獲得には V71A，K122R とも重要であり，両変異が存在する場合最も強い抵抗性を示すことが明らかとなった．

[Su Su Hmwe，伊達朋子，朝長充則，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４３）HCV-NS5A 蛋白に結合し HCV 産生に関与する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞から pull-down 法により NS5A に結合する膜蛋白を精製し，プロテオーム解析を施行した．同定された約 25 種のヒト蛋白について HCV レプリコン細胞および HCV 感染細胞を用いて siRNA screening を行い，HCV の翻訳・複製あるいは粒子形成に関与する NS5A 結合蛋白を同定・解析中である．

[後藤耕司，相崎英樹，山越 智（生物活性物質部），小池和彦（東大消化器内科），鈴木哲朗，脇田隆字]

（４４）HCV NS5A 蛋白と Prohibitin 2 の相互作用及び HCV 複製に及ぼす影響の解析

NS5A に結合する宿主蛋白質である Prohibitin 2 は，siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより，遺伝子型 1b 及び 2a の HCV において RNA レベルまたウイルス産生が，有意に抑制されることを見出した．Prohibitin 2 は，HCV 複製複合体分画に存在し，NS5A との相互作用には NS5A の N 末端側領域が重要であることが示された．

[木村敬郎，鈴木亮介，勝二郁夫，山越 智(生物活性物質部），鈴木哲朗，脇田隆字]

（４５）HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析を行い，45 種類の蛋白を同定し，siRNA によるスクリーニングで，HCV 粒子形成に関与する生体膜蛋白として HSD11 を見出した．野生型 HSD11 の発現に伴い培養上清のウイルス量は増加し，脂肪滴局在シグナル欠損型 HSD11 発現ではウイルス量は減少した．得られた宿主因子に関する詳細な機能解析は，HCV の粒子形成，細胞内移行の分子メカニズムの解明につながるものと期待される．

[相崎英樹，松本喜弘，後藤耕司，山本真民，深澤征義（細胞化学部），花田賢太郎（細胞化学部），脇田隆字，鈴木哲朗]

（４６）HCV 感染が宿主細胞の脂質代謝に与える影響

生体での脂質輸送の中心を担い，HCV 粒子形成，細胞内輸送にも関与することが知られるリポ蛋白の産生，分泌レベルが HCV の感染増殖によって変動するかを解析した．JFH-1，J6/JFH-1 ウイルスを Huh7 細胞に感染させると，いずれの場合にもウイルス増殖に伴い，培養上清中のリポ蛋白は，超低比重リポ蛋白 VLDL が増加し，低比重リポ蛋白 LDL，高比重リポ蛋白 HDL が低下することを見出した．今後，リポ蛋白に影響を与えるウイルス因子の同定およびその変化のメカニズム

を解析する.
[相崎英樹，松本喜弘，後藤耕司，山本真民，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４７）HCV 感染における HCV 粒子表面脂質の役割

HCV 粒子表面のコレステロールはウイルス感染に重要である．そこで，HCV 粒子形成，感染性に重要なコレステロール構造を明らかにするため，コレステロール類縁体を用いて構造ー感染性相関を解析した．３位の OH 基とアシル側鎖構造が感染性，粒子密度の維持に重要であること，コレステロールの環状構造の柔軟性が感染性を変化させることを確認した．ステロール環状骨格の柔軟性を低下させることによって，細胞表面への HCV 吸着は影響を受けないが，細胞内への侵入効率が低下することが見出された.
[山本真民，相崎英樹，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４８）HCV trans-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析

core-NS2 発現プラスミドおよびルシフェラーゼ発現レプリコンプラスミドを Huh-7 細胞へ導入する事により，trans-packaging 型 HCV 感染性粒子(HCVtcp)を産生させた．これらの粒子およびレトロウイルスによる HCV エンベロープ蛋白を被ったシュードウイルス(HCVpp)を用い，薬剤および抗体による感染阻害効果について解析した．HCVtcp と HCVpp では，抗体による感染中和において感受性が異なる事から，粒子構造や感染機構が異なる可能性が示唆された.
[鈴木亮介，赤澤大輔，石井孝司，鈴木哲朗，脇田隆字]

（４９）Radial-flow bioreactor(RFB)を用いた，3 次元高密度培養法による HCV 感染機構の解析

RFB はヒト肝癌細胞株を 3 次元高密度培養できる装置である．このシステムを用いてヒト肝癌由来細胞株（FLC-4）に HCV-2a 株（JFH-１株）の感染実験を行った．JFH-1 を MOI 0.1 で感染させ，上清中の HCV-RNA を RT-PCR で測定したところ，感染後 20 目より上清中 HCVRNA の増加を認めた．宿主因子とウイルス因子どちらか，または双方の変化が増加の要因と考えられ，現在解析を進めている.
[松本喜弘,相崎英樹,松浦知和（慈恵医大病院中央検査部），脇田隆字]

（５０）血液製剤における HCV の不活化の検討

血液製剤の 60℃液状加熱，8 或いは 20%エタノール処理による HCV の不活化を評価するため，HCV(JFH-1)をアルブミン製剤に加え，各処理による各反応時間の感染価を調べた結果，１時間の液状加熱，或いはエタノール処理で HCV は少なくとも 10^3 感染価が低下した．HCV のモデルウイルス BVDV では，液状加熱では HCV と同様の感染価の低下だったが，エタノール処理では反応 2 時間でも殆ど感染価は低下しなかった．より安全な血液製剤を確保するため不活化法に対するモデルウイルスとの違いを明らかにして行く.
[下池貴志，野島清子（血液･安全性研究部），脇田隆字，岡田義昭（血液･安全性研究部）]

（５１）HCV 放出を変化させる低分子化合物スクリーニング

培養液中に放出される感染性 HCV 粒子を測定することにより，これを変化させる低分子化合物のスクリーニングをおこなった．現在さらに大規模な低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングをおこなっている.
[渡士幸一，内田奈々子，脇田隆字]

（５２）miRNA による HCV 複製制御の解析

miR-122 を過剰発現することにより見られる HCV 複製レベルの上昇は argonaute 2 (AGO2)のノックダウンにより減少した．また，これまでに同定した miRNA 経路阻害剤は，miR-122 と argonaute 2 (AGO2)との相互作用を低下させ，これに伴って HCV 複製を減弱させた．以上より，AGO2 が HCV 複製に関与していること，またこの関与を阻害することで HCV 複製を抑制できることが示唆された.

[渡士幸一，下遠野邦忠(千葉工業大)，Kuan-Teh Jeang（National Institutes of Health, USA），脇田隆字]

（５３）HCV RNA を複製する肝星細胞株の樹立とその性状解析

肝臓組織中で細胞外マトリクス産生を調節する肝星細胞を用いてレプリコン細胞を樹立した．複数のクローンについて細胞外マトリクス調節に関連する遺伝子の発現量を TaqMan PCR で解析した．その結果，レプリコン細胞ではcollagen遺伝子が減少し，MMP遺伝子は増加していた．また，肝がん細胞株 Huh-7 を用いて同様の解析を行ったところ，collagen 遺伝子，MMP 遺伝子，TIMP1 遺伝子とも増加していた．宿主細胞腫によって，HCV RNA 複製に伴う細胞外マトリクス調節関連遺伝子の発現変動が異なる可能性が示された．

[渡邉則幸，相崎英樹，鈴木哲朗，脇田隆字]

（５４）糖鎖固定化セファロースを用いた HCV と糖鎖の相互作用の解析

HCV は硫酸多糖類と結合することが知られているが，他の糖鎖との相互作用については十分に解析されていない．NHS-activated Sepharose に各種シアル酸を含む合成糖鎖(LacNAc，Sia2-3LacNAc，Sia2-6LacNAc，Sia2-6(Sia2-3)LacNAc，Sia2-3Lex，Sia2-6Lex）またはHeparin を固定化し，HCV との結合性を解析した．その結果，Heparin では約 80%の HCV が吸着され，その他の糖鎖はそれぞれ 20-50%程度の HCV を吸着した．

[松田麻未，清水弘樹（産総研北海道），鈴木哲朗，脇田隆字]

（５５）血液中 HCV と硫酸多糖類との結合様式の解析

HCV の宿主肝臓細胞への感染は，細胞表面に存在する硫酸化多糖への接着から開始されると考えられる．ヘパリン固定化ビーズを使って種々の HCV 陽性血漿検体の吸着効率を解析したところ，80%以上吸着する検体が存在する半面，血漿中 HCV の 50%以下しか吸着されないものも存在した．硫酸化多糖との結合にウイルス粒子と共存する抗体，脂質成分などが影響する可能性が考えられた．

[高橋由佳，一色綾子，鈴木哲朗，脇田隆字]

（５６）HCV 複製細胞における ATP レベルの解析

生細胞内の ATP レベルを，FRET 技術を利用し可視化するプローブ(ATeam)を用い，HCV 複製細胞における ATP ダイナミクスを解析した．肝癌由来細胞株 Huh7 細胞と比較して，HCV レプリコン細胞では genotype1b,2a 共に細胞質における ATP レベルが低下していた．一方，NS5A の C 末側に ATeam を融合した JFH-1 サブゲノミックレプリコン発現系を構築し，複製複合体における ATP レベルを解析したところ，複製複合体における ATP レベルが亢進していた．

[安東友美，今村博臣(大阪大)，鈴木亮介，相崎英樹，鈴木哲朗，脇田隆字]

（５７）HCV ゲノム RNA パッケージングシグナル候補部位の同定

HCV 粒子内に含まれる RNA の大規模網羅的シークエンス解析を行ったところ，全長のゲノム RNA が高率に存在することが示唆された．一方，HCV ゲノム RNA にマッピングされない RNA 群を解析したところ，3’UTR の末端周辺と同一の配列を含む RNA が高率に検出された．そこで，3’UTR 配列に対してランダムな変異を導入し感染性ウイルス産生高率に及ぼす影響を解析したところ，二次構造予測で 3’UTR の構造を大きく変化させうる 1 塩基の変異を同定した．

[安東友美，鈴木亮介，鈴木哲朗，脇田隆字]

（５８）肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防，肝炎ウイルスキャリア対策，肝癌死亡の減少に貢献することを目的として，肝炎診療に関する情報収集，および情報提供システムの構築を行い，情報の発信を目指している．国は新しい「肝炎対策基本法案」において，地域に関わらない予防策の推進，適切な医療が受けられるように目指して

いる．そのためには，これらをすばやく正確に伝え，その理解に必要なＣ型肝炎という病気についての情報をわかり易く発信する重要性が更に高まってきている．我々は急性肝炎，慢性肝炎の疫学，基礎研究の情報を中心に，情報を発信している．

[相崎英樹，田中純子（広島大），脇田隆字]

（５９）JFH-2.1 株を用いた培養細胞適合 HCV 培養系の構築

J6/JFH-2.1 株を培養細胞に適合させたウイルス株を樹立し，感染とウイルス分離を繰り返した．最終的に得られたウイルス株のウイルスゲノム配列を決定し，適合変異を同定した．

[伊達朋子，高橋　仁（インフルエンザウイルス研究センター），赤澤大輔（東レ医薬研），加賀美奈子，鈴木哲朗，　加藤孝宣，脇田隆字]

（６０）HCV 粒子ワクチンの感染中和活性の誘導

Huh7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV を限外濾過およびショ糖密度勾配超遠心で精製した．UV で不活化した HCV 粒子を，BALB/c マウスに MPL をアジュバントして隔週 4 回腹腔内投与し，血清を採取して抗体価および in vitro 中和活性を調べた．HCV 粒子免疫マウスでは抗 E1 および E2 抗体の惹起が認められ，その血清は遺伝子型 2a だけではなく，1a および 1b の HCV 感染を in vitro で阻害した．

[森山正樹，赤澤大輔，中村紀子（東レ医薬研），望月英典（東レ医薬研），鈴木哲朗，石井孝司，脇田隆字]

（６１）HCV 粒子免疫マウスからの感染中和抗体の作製

Huh7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV を不活化し，5 週齢雌性 BALB/c マウスに MPL をアジュバントして隔週 4 回腹腔内投与した．抗体価が上昇したマウスにおいて，免疫 4 ヶ月後または 6 ヶ月後に脾臓を摘出して脾細胞をミエローマ細胞と融合させた．現在，Ｅ２蛋白質に特異的に反応するモノクローナル抗体を樹立した．

[赤澤大輔，渋谷悠子（東レ医薬研），中村紀子（東レ医薬研），望月英典（東レ医薬研），鈴木哲朗，石井孝司，脇田隆字]

（６２）HCV J6/JFH-1 株感染増殖系に対する低分子阻害剤のスクリーニング

Huh-7.5.1 細胞に HCV J6/JFH-1 株を感染させ，培養上清中に放出されたウイルス由来の core タンパク量を測定する方法により，低分子化合物ライブラリーを用いた抗 HCV 剤スクリーニングを実施し，抗ウイルス効果を有する化合物を同定した．今後化合物の標的を探索していく．

[朝長充則，伊達朋子，鈴木哲朗，脇田隆字]

（６３）肝炎ウイルス研究データベースの構築

肝炎研究基盤整備事業において肝炎研究を推進するための研究データベースを構築した．　文献情報を PnbMed から取り込み，薬剤耐性変異情報などを集積する．

[加藤孝宣，新井 理（BITS 三島研究所），鈴木哲朗，脇田隆字]

４．E 型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

（１）イムノクロマト法による抗 HEV 抗体の簡易測定

組換えバキュロウイルスを用いて作製した E 型肝炎ウイルス様中空粒子を用いて，より簡便なイムノクロマトによる抗 HEV-IgG，IgM ヒト抗体の測定法を構築し，有用性を ELISA と比較した．抗ヒト HEV-IgG 抗体の測定では，ELISA 陽性 20 件のうち 9 件はイムノクロマト法で陽性となり，11 件は陰性となった．ELISA 陰性 30 件はイムノクロマト法でも全て陰性となった．抗ヒト HEV-IgM 抗体の測定では，ELISA 陽性 3 件は全てイムノクロマト法で陽性となり，ELISA 陰性 30 件はイムノクロマト法でも全て陰性となった．E 型肝炎ウイルス様中空粒子を用いたイムノクロマト法で抗 HEV-IgG，IgM ヒト抗体の簡易測定が可能となった．

[*落合　晋，*石古博昭，李　天成，武田直和（*三菱化学メディエンス）]

（２）培養細胞における HEV の増殖

G3 HEV を PLC/PRF/5 細胞に接種した後，細胞を継代せず，３日ごとに培地の更新によって細胞を維持したところ，HEV を接種した直後から細胞培養上清中に RNA が検出され経時的に増加した．接種４週後の培養上清中からウイルス構造蛋白が検出され，６週間後にピークに到達し，その後高いレベルを維持した．間接蛍光免疫染色法により構造蛋白は細胞質に分布することが判明した．濃縮した培養上清中には電子顕微鏡で直径 35nm のウイルス粒子が観察された．PLC/PRF/5 細胞で増幅したウイルスをカニクイザルに静脈接種するとウイルスがサル体内で増幅することが確認され，増幅したウイルスが感染性も持つことも明らかになった．

[李　天成，恒光　裕（動物衛生研究所），宮村達男，脇田隆字，武田直和]

（３）HEV の感染性 cDNA の構築

上記の G3 HEV（83-2 株）の配列に基づき全長 cDNA を構築し，T7 プロモーターを用いて全長 RNA を合成して PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし，構築したクローンが感染性かどうかの検討を行った．合成した全長 RNA をトランスフェクションした細胞の培養上清中に多量の HEV 抗原が分泌された．また，この培養上清をさらに naive な PLC/PRF/5 細胞に接種すると HEV 抗原の分泌が観察されたことから，培養上清中に感染性の HEV が存在することが確認でき，構築した cDNA が感染性クローンであることが証明された．

[石井孝司，吉崎佐矢香，杉山奈央，加藤孝宣，李 天成，武田直和，脇田隆字]

（４）培養細胞を用いた HEV の安定性の検討

PLC/PRF/5 細胞で増殖した HEV を種々の条件で処理した後，PLC/PRF/5 細胞に接種した．経時的に培養上清中のウイルス抗原を ELISA 法で測定し，HEV の増殖の有無によりウイルスを失活させる温度を見いだした．65℃，5 分間加熱処理によって HEV は失活した．ウイルスを失活させる塩素（NaClO）の有効濃度は 125ppm であった．また，紫外線強度 50μW，30 分間照射によってもウイルスは完全に失活した．HEV はアルコール，クロロホルムに抵抗性を示した．本研究から得られた HEV 安定性の情報は HEV による感染症や食中毒の防止に有用である．

[李　天成，吉崎佐矢香　石井孝司，武田直和，宮村達男，脇田隆字]

（５）HEV の感染性を規定する宿主側因子の探索

PLC/PRF/5 の single cell cloning を行い，感染増殖が可能な細胞株と不可能な細胞株を取得してそれぞれについて性状解析を行い，HEV の感染を規定する宿主側因子の探索を試みた．PLC/PRF/5 の single cell cloning を行い，約 100 株の細胞株を取得した．それぞれの株に 83-2 を接種し，約２ヶ月程度の長期培養を行い，培養上清中の HEV 抗原量を測定したところ，一部の細胞株は２ヶ月後にも HEV 抗原の分泌が観察されず，HEV が感染増殖できないことが示唆された．しかしながらこれらの細胞株も，感染性の HEV RNA をトランスフェクションすると HEV 抗原が分泌されることから，細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された．感染性を規定する宿主側の因子について現在探索を行っている．

[石井孝司，吉崎佐矢香，李　天成，武田直和，脇田隆字]

（６）HEV 蛋白がインターフェロンシグナル応答に及ぼす作用の解析

HAV や HCV ではインターフェロン（IFN）シグナル応答を阻害するメカニズムが存在することが明らかにされている．HEV にも阻害メカニズムがあるかどうかを検討するため，IFN-βプロモーターの下流にレポーター遺伝子を挿入したプラスミドを作成し，HAV や HEV を PLC/PRF/5 に感染させ，二本鎖 RNA で刺激して IFN 応答を誘導した．HAV 感染細胞では既報の通りレポーター遺伝子の活性の上昇はほぼ完全に抑制されたが，HEV 感染細胞ではレポーター遺伝子の活性の上昇は抑

制されず，IFN-βのシグナル応答にはHEVは影響を及ぼしていないことが明らかとなった．
[石井孝司，加藤　篤（ウイルス第三部），脇田隆字]

（７）不活化Ｅ型肝炎ワクチンの検討

培養細胞で増殖した遺伝子型 G1，G3，G4 のHEVを65℃，10分間熱処理した後，それぞれをウサギとラットに３回ずつ大腿筋に接種した．接種後，経時的に採血してELISA法でHEVに対する抗体を測定し，さらに免疫血清の中和活性を測定した．熱処理によって不活化した各遺伝子型のHEVをウサギ，ラットに接種すると血中に抗 HEV IgG 抗体が誘導された．抗体価は1:1,600～25,600であり，遺伝子型間に抗体価の差が多少見られた．これらの抗体はHEVのPLC/PRF/5細胞への感染を阻止した．この結果は，不活化HEVによって誘導された抗体が中和活性を持つことを示唆する．
[李　天成，方　苓，*網　康至，*須崎百合子，武田直和，脇田隆字（*動物管理室）]

（８）サルにおけるHEVの感染

動物実験モデルとしてよく使われるサルにおけるHEVの感染状況を把握するため，定期検査のため採集したサル血清を用いてHEV抗体を検査し，サルにおける感染状況を調べた．マカク属サルの９コロニー群のサルの血清を2004年から2008年に採集し，血清のHEV特異抗体及びHEV遺伝子をELISA法及びNested PCR法で検討した．2004年に採集した９群のサル血清からはHEV特異抗体はほとんど検出されなかったのに対して，2005年に採集したサンプルでは一部のコロニーからIgG抗体が検出され，2006年に採集したサンプルでは全体の抗体保有率は79%に達した．以上の結果から，HEVは自然環境でもサルに感染することが示唆された．
[*山本 博，**松田淳志，李 天成，***鈴木樹理，**石田貴文，武田直和（*富山大学生命科学先端研究センター，**東京大学理学系大学院，***京都大学霊長類研究所）]

（９）Ｅ型肝炎ウイルスに対するウサギの感受性

最近，ウサギ飼育場からHEVが分離され，HEVがウサギに感染することが示唆された．実験レベルでHEVがウサギに感染するかどうかを確認し，新しい動物モデルを見いだすため，G1，G3，G4 HEVをウサギ静脈内に接種し，経時的に採血と採便を行なった．血液中のウイルス抗原，特異抗体，ウイルス遺伝子，ALT/ASTを測定し，便中のウイルス抗原，抗体，およびウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無を評価した．いずれの genotype の HEV もウサギに感染しないことは明らかになった．
[李　天成，*網　康至，*須崎百合子，脇田隆字（*動物管理室）]

IV．腫瘍ウイルスに関する研究

１．新規ヒトポリオーマウイルスに関する研究

（１）新規ヒトポリオーマウイルスMCVと糖脂質との相互作用

皮膚がんの一種メルケル細胞癌から発見された新規ヒトポリオーマウイルスMCVについては感染過程の分子機構は全く不明である．MCV-LPと糖脂質との結合をSPR法及びsucrose floatation assayで解析した結果，MCV-LPは多くのガングリオシドで相互作用を示さず，GM3，GD3と結合することが示された．昨年，　米国のグループからMCV抗原とGT1bとの結合が報告されたが，粒子構造をとるMCV-LPでは同結合は認められなかった．
[松田麻未，李 天成，片野晴隆（感染病理部），中村智之（感染病理部），　鈴木哲朗，脇田隆字]

（２）糖鎖固定化セファロースを用いたヒトポリオーマウイルスと糖鎖の相互作用の解析

BKV，JCV，SV40などでは，シアル酸を含むガングリオシドを感染レセプターとすることが示されている．ガングリオシド以外の糖鎖への相互作用を解析する為に，各種シアル酸を含む合成糖鎖を固定化したセファロースを作製し，JC-VLP，MC-VLPとの相互作用を解析した．JC-VLPはSia2-6Lexを除くシアル酸含糖鎖全てに結合したが，MC-VLPはSia2-3LacNAc，Sia2-3Lex

のみに結合した．これはSPR法による解析と同様の傾向であり大変興味深い．

[松田麻未，清水弘樹（産総研北海道），鈴木哲朗，脇田隆字]

（３）メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCV）様粒子の作製

MCVは昨年メルケル細胞癌（MCC）からクローン化された新しいヒトポリオーマウイルスであるが，MCC以外の疾患との関連は不明な点が多く，また，増殖細胞系は確立されておらず，MCVの生活環，粒子構造などは明らかにされていない．われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてMCVのウイルス様粒子（VLP）の作製，精製を試みた．組換えバキュロウイルス感染細胞では予想される分子量（47 kDa）のMCV VP1蛋白が産生され，培養上清に放出された．培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し，電子顕微鏡観察したところ，比重1.29～1.32 g/cm^{3}分画に直径約20nmまた50nmの二種類の球形粒子構造が認められた．

[李　天成，*片野晴隆，*片岡紀代，*中村智之，*永田典代，宮村達男，*佐多徹太郎，脇田隆字，鈴木哲朗（*感染病理部）]

（４）日本におけるMCV抗体保有状況の血清疫学的解析

上記のMCV VLPを用いてMCV抗体保有率を調査し，血清疫学解析を行った．精製VLPをラットに接種し抗MCV抗血清を作製し，抗原性をヒトポリオーマウイルスBKV，JCVと比較した結果，MCV抗体はBKV，JCVと交差反応しないことが示された．このVLPを用いてMCV抗体検出ELISAを開発し我が国の健常人における抗体保有率を解析したところ，男女ともに若年層では加齢とともに保有率は上昇し1~5歳：13%，6~10歳：23%，11~15歳：38%，16~20歳：44%であった．また，61~65歳の保有率は51%であった．地域差は認められなかった．

[李　天成，*片野晴隆，*片岡紀代，*中村智之，*永田典代，宮村達男，*佐多徹太郎，脇田隆字，鈴木哲朗（*感染病理部）]

V．その他の研究

（１）ヒトボカウイルス様粒子の作製およびその応用

ヒトボカウイルス（Human Bocavirus；HBoV）はパルボウイルス科の一種で，小児下気道感染症から検出された新しい直鎖一本鎖DNAウイルスである．さらに最近，二種類の近縁ウイルス（HBoV2，HBoV3）が腸管感染症から発見された．しかしながら，これらのボカウイルスがどのようなヒト疾患に関連するか，原因となるかについて未だ十分に解析されていない．今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトボカウイルスのウイルス様粒子（VLP）を作製し，ヒトボカウイルスの血清疫学解析を行った．組換えバキュロウイルス感染細胞では予想される分子量のVP2蛋白が産生され，培養上清に放出された．培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し，電子顕微鏡観察したところ，比重1.30 g/cm^{3}分画に直径約22nmの球形中空粒子構造が認められた．精製VLPをウサギに接種し抗HBoV-VP2，HBoV2-VP2，HBoV3-VP2抗血清を作製し，三種類のボカウイルスの抗原性を比較した結果，異なる抗原性を示すものの，交叉反応も示された．これらのVLPを用いて抗体検出ELISAを開発し我が国の健常人におけるヒトボカウイルス抗体保有率を解析した．

[李　天成，方　苓，王　澤鋆，宋　士利，片岡紀代（感染病理部），鈴木哲朗，脇田隆字]

（２）日本のブタから分離したブタエンテロウイルス８型の解析

我々は培養細胞系を用いてブタの糞便からE型肝炎ウイルスを分離した際，このウイルスとは全く異なるウイルスを分離した．精製ウイルス粒子の構造蛋白のN末端アミノ酸配列，全遺伝子配列からブタエンテロウイルス８型(PEV8)であることが明らかになった．PEV8はPLC/PRF/5細胞のみならずVero，PGMK細胞でも複製したが，PMK，HeLaおよびHuh7細胞では感染が成立しなかった．PEV8は60℃での10分加熱，75%エタノールでの30分処理，塩素（濃度が62ppm以上）処理などによって失活したが，紫外線に対しては抵抗

性を示した.

[李　天成, 方　苓, 片岡紀代（感染病理部）, 宮村達男, 脇田隆字]

＜別＞　検査業務

第１室：

検定業務

経口生ポリオウイルスワクチン中間段階

F316 検定

経口生ポリオウイルスワクチン小分け品

Lot50 検定

第２室：

平成 21 年度は 6 件の行政検査依頼があり, ウイルス分離同定, 塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した. 型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは, すべてワクチン株と同定された.

第５室：

検定業務

乾燥組織培養不活化Ａ型肝炎ワクチン　　２件

組換沈降Ｂ型肝炎ワクチン（酵母由来）　　４件

行政検査

E 型肝炎確認検査　４件, ４検体

発 表 業 績 一 覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, Uchiyama Y, Satsumabayashi K, Shiraishi T, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. J Clin Virol. 45(1):67-71. 2009.

2) Ootsuka Y, Yamashita Y, Ichikawa T, Kondo R, Oseto M, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 62(3):246-8. 2009.

3) Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. Arch Virol. 154(4):689-93. 2009.

4) Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. J Med Virol. 81(6):1117-27. 2009.

5) Eiji Haramoto, Hiroyuki Katayama, Etsuko Utagawa, Shinichiro Ohgaki. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. J Virol Methods, 2009;160;206-209.

6) Oka T, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. Microbiol Immunol. 53(7):417-20, 2009.

7) Kitajima M, Oka T, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan. Microbiol Immunol. 53(9):531-4. 2009

8) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato

H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. Virology. 394(1):119-29. 2009.

9) Someya Y, Takeda N: Insights into the Enzyme-Substrate Interaction in the Norovirus 3C-like Protease. J Biochem 146: 509-521, 2009.

10) Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 74(3): 541-547.2010.

11) Zhang Y, Wang H, Zhu S, Li Y, Song L, Liu Y, Liu G, Nishimura Y, Chen L, Yan D, Wang D, An H, Shimizu H, Xu A Xu W. Characterization of a rare natural intertypic type 2/type 3 penta-recombinant vaccine-derived poliovirus isolated from a child with acute flaccid paralysis. J Gen Virol 91: 421-429, 2010.

12) Thorley B, Kelly H, Nishimura Y, Yoon YK, Brussen KA, Roberts J Shimizu H. Oral poliovirus vaccine type 3 from a patient with transverse myelitis is neurovirulent in a transgenic mouse model. J Clin Virol 44: 268-271, 2009.

13) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. Nat Med 15: 794-797, 2009.

14) Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. Vaccine 27: 3153-3158, 2009.

15) Goto K, Sanefuji M, Kusuhara K, Nishimura Y, Shimizu H, Kira R, Torisu H Hara T. Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. Emerg Infect Dis 15: 1689-1691, 2009.

16) Arita M, Wakita T Shimizu H. Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime. J Gen Virol 90: 1869-1879, 2009.

17) Arita M, Ling H, Yan D, Nishimura Y, Yoshida H, Wakita T Shimizu H. Development of a reverse transcription- loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis cases. BMC Infect Dis 9: 208, 2009.

18) Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of Hepatitis C Virus Core Antigen Assays in Detecting Recombinant Viral Antigens of Various Genotypes. J Clin Microb 47: 4141-4143, 2009.

19) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J Virol 83: 5137-47, 2009.

20) Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I: Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated

ubiquitylation. J Cellular Biochemistry, 106: 1123-1135, 2009.

21) Hmwe S, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T and Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. Antiviral Res 85: 520-524, 2010.

22) Kiyohara T, Totsuka A, Ishii K, Ito T, and Wakita T: Characterization of anti-idiotypic antibodies mimicking the antibody-binding site and the receptor-binding site on hepatitis A virus. Arch Virol 154:1263-1269, 2009.

23) Kiyohara T, Ouchi Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, Ito T, and Wakita T: Evaluation of an in-house anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay kit and its practical use for analysis of an HAV outbreak. J Med Virol 81:1513-6, 2009.

24) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura M, Wakita T, and Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. J Virol 84: 5824-5835, 2009.

25) Zhang YY, Zhang BH. Ishii K and Liang TJ. A novel function of CD81 in controlling hepatitis C virus replication. J Virol, 84: 3396-3407, 2009.

26) Ishii K. Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, and Tsunetsugu-Yokota Y: Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. Microbiol Immunol 53: 75-82, 2009.

27) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Miyamura T. Matsuura M, Suzuki T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin independent but PA28g-dependent. J Virol 83: 2389-2392, 2009.

28) Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y: Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 12986-91, 2009.

29) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M: Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. J Gastroenterol Hepatol 24: 599-604, 2009.

30) Sugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M: Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. Ann Trop Med Parasitol 103: 343-50, 2009.

31) Hazari S, Chandra PK, Poat B, Datta S, Garry RF, Foster TP, Kousoulas G, Wakita T, Dash S. Impaired antiviral activity of interferon alpha against hepatitis C virus 2a in Huh-7 cells with a defective Jak-Stat pathway. Virol J. 7(1): 36, 2010.

32) Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2',5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral

replication in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 392(3): 397-402, 2010.

33) Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. Virology. 398(1): 57-67, 2010.

34) Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. Requirement of cellular DDX3 for hepatitis C virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. J Gen Virol. 91(1): 122-32, 2010.

35) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD+. J Biol Chem. 285(2): 845-54, 2010.

36) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. Arch Virol. 154 (10): 1671-7, 2009.

37) Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, ChayamaK. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. J Hepatol. 51(6): 1046-54, 2009.

38) Kato N, Mori K, Abe KI, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. Virus Res. 146(1-2): 41-50, 2009.

39) Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. Autophagy. 5(7): 937-45, 2009.

40) Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. Antiviral Res. 83(2): 112-7, 2009.

41) Kang JI, Kim JP, Wakita T, Ahn BY. Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. Virus Res. 144(1-2): 107-16, 2009.

42) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. Arch Virol. 154(5): 801-10, 2009.

43) Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. Arch Virol. 154(5): 765-73, 2009.

44) Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. J Biol Chem. 3;284(14): 9237-46, 2009.

2. 和文発表

1) 岡智一郎. ノロウイルス, サポウイルス感染症. 「臨床検査」, 53 (6), 665-72, 2009.

2) Hara M., Yano K., E. Tajiri-Utagawa. Comparison of Norovirus Genotypes by Real Time PCR (genogroup II) (Real Time PCR 法を用いた Norovirus の GII 遺伝子型別比較). 感染症学雑誌. 83:564-565,2009.
3) 片山和彦, 岡智一郎, 高木弘隆. ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルス研究の有用性. 日本実験動物協会誌「LABIO21」, No. 39, 20-26, 2010.
4) 片山和彦. ノロウイルス対策. 「高校保健ニュース」, 2009 年 11 月 18 日号. 株式会社少年写真新聞社.
5) 片山和彦. ノロウイルスについて. 「健康教室」, 2010 年 1 月号　通巻 894 号　東山書房 p 74-79.
6) 片山和彦. ノロウイルス, ロタウイルス. ザ特集最新学校保健安全ハンドブック（書籍）p77-80.
7) 高山直秀, 崎山弘, 清水博之, 宮村達男, 岡部信彦 梅本哲. 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポリオ生ワクチン全国累積接種率 - 2008 年度調査結果-. 小児科臨床 63: 1127-1134, 2010.
8) 清水博之: 不活化ポリオワクチン開発の現状. 臨床と微生物 36:35-40, 2009.
9) 西村順裕 清水博之. エンテロウイルス 71 受容体としての P-selectin glycoprotein ligand-1 の同定. ウイルス 2009.
10) 清水博之. WHO Enterovirus Collaborating Center の役割と機能. ウイルス 59: 43-52, 2009.
11) 清水博之. ポリオ（急性灰白髄炎). 診断と治療 97: 83-85, 2009.
12) 清水博之 小林一司. 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め. 病原微生物検出情報 30: 181-182, 2009.
13) 清水博之. ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. 病原微生物検出情報 30: 174-176, 2009.
14) 清水博之. 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 型感染症の流行. 病原微生物検出情報 30: 9-10, 2009.
15) 岩井雅恵, 中村一哉, 小原真弓, 堀元栄詞, 長谷川澄代, 倉田毅, 滝澤剛則 吉田弘. 環境水サーベイランスによるポリオウイルス伝播の監視-富山県. 病原微生物検出情報 30: 180-181, 2009.
16) 多屋馨子, 佐藤　弘, 岡部信彦 清水博之. ポリオ中和抗体保有状況ならびにポリオワクチン接種状況. 病原微生物検出情報 30: 178-180, 2009.
17) 吉田 弘, 和田純子, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之, 佐藤 弘, 北本理恵, 山本久美, 新井 智, 多屋馨子. 感染源調査によるポリオサーベイランス. 病原微生物検出情報 30: 176-178, 2009.
18) 政木隆博, 鈴木哲朗: HCVの分子生物学. 肝癌. 日本臨床67(3): 134-137, 2009.
19) 清原知子, 石井孝司. 新時代のワクチン戦略について考える『任意接種のワクチン ７．A型肝炎』医学書院. 印刷中
20) 清原知子, 石井孝司. A型肝炎　基礎. 臨床とウイルス 37: 283-290, 2009.
21) 李 天成, 武田直和, 石井孝司. E型肝炎 基礎. 臨床とウイルス　37: 337-344, 2009.
22) 清原知子, 石井孝司. ファクトシート（案）1. A型肝炎. 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書:社団法人　畜産技術協会: 255-259, 2010.
23) 脇田隆字. ＨＣＶ培養系. Medical Practice. 27(1): 111-112, 2010.

3.その他

1) Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status, Japan: WHO report, 2009.

II. 学 会 発 表

国際学会

1) Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago Y., Miura T., Omura T., Oka T., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.: Prevalence and

genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan. 15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, 2009.5.

2) Kitajima M, Oka T, Katayama K, Takeda N, Haramoto E, Katayama H, and Ohgaki S: Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan. ibid.

3) Kitajima M, Oka T, Katayama K, Takeda N, Haramoto E, Katayama H, and Ohgaki S: Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. Q-403. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2009.5.

4) Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. Gordon Research Conference on Viruses & Cells, イタリア, 2009.6.7-12.

5) Arita M Shimizu H: Evaluation of real-time PCR assays for ITD and VDPV screening at NIID. The 15th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network, スイス, 2009.6.23-25.

6) Shimizu H: Identification of Specific Cellular Receptors for Enterovirus 71. in APEC Conference for Surveillance, Treatment, Laboratory Diagnosis and Vaccine Development of Enteroviruses, 台湾, 2009.8.13-14.

7) Akari H, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshida T, Yoshizaki S, Suzuki T, and Miyamura T. Characterization of chronic GBV-B infection in marmosets: selective and frequent nonsynonymous mutations of the viral genome. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 2009.9.8-11.

8) Oka T: Molecular Epidemiology of Sapovirus in Japan. The Sixth Japan-Taiwan Symposium on 2009 Influenza Pandemicand Enteric Virus Infection and New development for Rapid Diagnosis. 東京, 2009.9.10-11

9) Shimizu H: Identification of distinct cellular receptors for enterovirus 71. ibid.

10) Nishimura Y: Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. ibid.

11) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Miyamura T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T: Identification of novel serine/threonine protein kinases responsible for HCV NS5A phosphorylation. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Nice, France, 2009.10.3-7.

12) Asako Murayama, Leiyun Weng, Tomoko Date, Daisuke Akazawa, Tetsuro Suzuki, Takanobu Kato, Tetsuya Toyoda and Takaji Wakita: Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in cultured cells. ibid.

13) Mohsan Saeed, Takanobu Kato, Youkyung Choi, Krzyaztof Krawczynski, Jake Liang, Takaji Wakita: In vitro behavior of hepatitis C virus JFH-1 strains with mutations emerged after passage in chimpanzees. ibid.

14) Youkyung Choi, Takanobu Kato, Takaji Wakita, Jake Liang, Krzyaztof Krawczynski: Dynamic profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFH1 infection in chimpanzees. ibid.

15) Moriishi K, Shoji I, Suzuki R, Suzuki T, Matsuura Y: Involvement of PA28gamma and E6AP

in the dagradation of HCV core protein and the viral production. ibid.

16) Shoji I, Abe K, Murakami K, Ishii K, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T, Koike K, Hotta H: The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein. ibid.

17) Suzuki R, Saito K, Ando T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of trans-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. ibid.

18) Yamamoto M, Aizaki H, Goto K, Hamano K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T : Structural requirement of virion-associated cholesterol for HCV morphogenesis and infectivity. ibid.

19) Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Wakita T, Suzuki T: HCV subgenomic replicon replication in human hepatic stellate cell lines. ibid.

20) Yoshida T, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshizaki S, Katakai Y, Suzuki T, Miyamura T, and Akari H. Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets. ibid.

21) Moriyama M, Akazawa D, Omi N, Shibuya Y, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Suzuki T, Ishii K, and Wakita T. Vaccination of infectious HCV praticles with several adjuvants and induction of neutralization immunoglobulin in mice. ibid.

22) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Oansako H, Wakita T, Kato N: the escrt pathway is required for HCV production. ibid.

23) Carpentier A, Podevin P, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, Meritet JF, Scatton O, Dreux M, Cosset F, Bartenschlager R, Wakita T, Conti F, Calmus Y, Rosenberg AR: HCV grown in primary human hepatocytes has higher specific infectivity and lower buoyant density than HCV grown in huh-7 cell line. 16th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. ibid.

24) Machida K, Llu L, Duan L, Kondo Y, Foung S, Wakita T, Ou JH, Lai M: Lymphotropism of hepatitis C virus is genetically determined with identification of immune cell-specific binding factor. ibid.

25) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: The PML tumor suppressor protein is required for HCV production. ibid.

26) Saulnier A, Groult G, Ghibaudo D, Wakita T, Cohen L, Marnata C, Martin A: Analysis of particle assembly from chimeric HCV JFH-l genomes expressing El-E2- p13 of GB virus B. ibid.

27) Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Garcin D, Gatignol A, Wakita T, Meurs E: HCV induces IFN at the early steps of infection. ibid.

28) Choi Y, Kato T, Wakita T, Liang TJ, Krawczynski K: Dynamic profile of gene expression in the liver during hepatitis C virus (HCV) JFHl lnfection in chimpanzees. ibid.

29) Kawai Y, Ikeda M, Yano M, Abe KI, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N: Anti-ulcer agent, teprenone, enhanced statin's anti·HCV activity by augmenting the inhibition of geranylgeranylation. ibid.

30) Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, Mcgivern D, Adair R, Owsianka AM, Targett-Adam P, Wakita T, Mclauchlan J, Lemon SM, Patel AH: The requirement of DDX3 for HCV replication is

unrelated to its interaction with the viral core protein. ibid.

31) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J: Ethanol enhances hepatitis C virus replication through acetaldehyde, NADH/NAD+, and host lipid metabolism. ibid.

32) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Wakita T: Specific RNA structures and mutations implicated for HCV RNA replication and virus particle formation in cultured cells. The Liver Meeting 2009, AASLD's 60th Annual Meeting, Boston, MA, 2009.10.30-11.3.

33) Shimizu H: Genetic and Phenotypic Diversities of Enterovirus 71 in the Asia-Pacific Region, The Third Japan-China-Korea Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Tokyo, 2009.11.24.

34) Shimoike T, McKenna SA, Lindhout DA, Wakita T, Puglisi JD: The HCV IRES is a potent activator of PKR but resistant to eIF2 phosphorylation, 第49回アメリカ細胞生物学会年会, アメリカ, 2009.12.5-9.

35) Shimizu H: Laboratory Diagnosis of Enterovirus 71 Infection, Informal Consultation Meeting for Hand Foot Mouth Disease, マレーシア. 2010.3.10-12.

36) Li TC: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The 3rd China-Japan Science Forum, Wuhan, China, 2010.3.15-16.

37) Li TC and Miyamura T: Vaccines for hepatitis E. The 20th conference of the APASL. Beijing, China, 2010.3.25-28.

38) Wakita T: HCV cell culture system. Asian Pacific Digestive Week (APDW2009) Taipei, Taiwan, 2009.9.29.

39) Wakita T: HCV cell culture system and antiviral development. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan, 2010.2.19.

40) Wakita T: HCV replication and virus particle formation in cell culture. International Symposium for Information Exchange in Bio Industry, Inflamation and Cancer: International Symposium on Current Insight into Prevalent Diseases, POSTECH Biotech Center, Pohang, Korea, 2010.2.22.

2. 国内学会

1) 片山和彦: 今, 問題の食中毒. 日本獣医公衆衛生学会シンポジウム, 宮崎市, 2009.1.

2) 片山和彦: ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性. 第147回日本日本獣医学会学術集会, 日本実験動物医学会シンポジウム, 宇都宮, 2009.4.2.

3) 岩崎優紀, 森 健一, 槇 昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 吉崎佐矢香, 片貝祐子, 鈴木哲朗, 神奈木真理, 宮村達男, 明里宏文: マーモセットを用いたC型肝炎サロゲートモデルの開発. 第56回実験動物学会総会, 大宮, 2009.5.

4) 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 脇田隆字: 培養細胞におけるE型肝炎ウイルス(HEV)の増殖. 第16回肝細胞研究会, 高知, 2009.6.

5) 鈴木亮介, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: プラスミドトランスフェクションによるC型肝炎ウイルスのtrans-packagingシステムの確立: フラビウイルスとの相違点について. 第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 北海道, 2009.6.

6) 加藤孝宣, 伊達朋子, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの生体内での感染様式と培養細胞での増殖能. 第45回日本肝臓学会総会, 神戸, 2009.6.4-5.

7) 村山麻子, 加藤孝宣, 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの複製増殖に関与するウイルス遺伝子領域の検討. 同上.

8) 岩崎優紀, 森 健一, 槇 昇, 石井孝司, 飯島

沙幸，吉田友教，吉崎佐矢香，片貝祐子，鈴木哲朗，宮村達男，明里宏文：C 型肝炎サロゲート霊長類モデル:GBV-B 長期持続感染サルのウイルスゲノム解析．同上.

9) 三島果子，坂本直哉，筱島裕子，中川美奈，田坂めぐみ，櫻井　幸，須田剛生，小貫優子，山本満千，渡辺貴子，船岡祐介，井津井康浩，陳正新，脇田隆字，渡辺 守：細胞障害性 HCV-JFH1 subclone の単離と機能解析．ワークショップ３「C 型肝炎の基礎と臨床」，同上.

10) 脇田隆字：肝炎ウイルス基礎研究．ハイライトレクチャー，同上.

11) 李　天成，落合　晋，石古博昭，脇田隆字：輸入感染 E 型肝炎ウイルスの解析．同上.

12) 落合　晋，石古博昭，李　天成：イムノクロマト法による抗 Hepatitis E Virus (HEV) の抗体簡易測定．同上.

13) 野田絵理，甘利昭一郎，生田陽二，小田新，石川涼子，野田雅裕，内山健太郎，滝有希子，大場邦弘，成井研治，住田朋子，石井ちぐさ，河野寿夫，水谷哲也，清水博之 片野晴隆：パレコウイルス 3 型感染による新生児脳症の 1 例．第 45 回日本周産期・新生児医学会学術集，名古屋，2009.7.12-14.

14) 熊谷安希子，久保田智巳，伊藤浩美，成松 久，脇田隆字，石井孝司，染谷雄一，白土東子：X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析.第29回日本糖質学会,高山,2009.9.

15) 有田峰太郎：Characterization of cellular kinase inhibitors that suppress poliovirus and enterovirus 71 replication. 第 25 回内藤コンファレンス “Chemical Biology [II]”，札幌 2009.9.9.

16) 内藤誠之郎，片岡紀代，清原知子，落合雅樹，前山順一，倉永雅彦，千北一興，高田寛治：溶解生マイクロニードルアレイを利用した経皮ワクチンの試み．第13回日本ワクチン学会，札幌，2009.9.

17) 本村和嗣，横山　勝，大出裕高，中村浩美，守宏美，岡智一郎，片山和彦，神田忠仁，田中智之，武田直和，佐藤裕徳：ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，2009.10.

18) 中西　章，Benoit Chapellier，片山和彦，岡智一郎，武田直和：ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作成の試み．同上.

19) 片山和彦，岡智一郎，脇田隆字：ノロウイルスリバースジェネティックスシステムのノロウイルスプロテアーゼを利用した制御．同上.

20) 岡智一郎，高木弘隆，遠矢幸伸，武田直和，脇田隆字，片山和彦：カリシウイルス増殖阻害物質スクリーニング系の構築．同上.

21) 北島正章，岡智一郎，原本英司，片山浩之，大垣眞一郎，武田直和，片山和彦：多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析．同上.

22) 片山和彦，岡智一郎，高木弘隆，遠矢幸伸，脇田隆字：マウスノロウイルスの複製機構の解析．同上.

23) 横山　勝，岡智一郎，片山和彦，遠矢幸伸，神田忠仁，武田直和，佐藤裕徳：マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性．同上.

24) 高木弘隆，遠矢幸伸，片山和彦，岡智一郎，杉山和良：マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子，遺伝子への影響について検討．同上.

25) 原 正幸，高橋邦明，柴田伸一郎，小平彩里，矢野一好，宇田川悦子：HRM 分析を用いたノロウイルス診断法の開発 (Genogroup II)．同上.

26) 熊谷安希子，久保田智巳，伊藤浩美，成松 久，石井孝司，染谷雄一，脇田隆字，白土東子：X 線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析．同上.

27) 染谷雄一，白土東子，武田直和，脇田隆字：ノロウイルス様中空粒子の大きさに影響を及ぼす

アミノ酸残基置換. 同上.

28) 斎藤博之, 東方美保, 白土東子, 田中智之, 野田　衛: パンソルビン・トラップ法により汚染食品から濃縮回収したノロウイルスの遺伝子検出条件の検討. 同上.

29) 東方美保, 斎藤博之, 白土東子, 田中智之, 野田　衛: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討. 同上.

30) 李　天成, 宮村達男, 武田直和, 脇田隆字: 培養細胞を用いた E 型肝炎ウイルスの安定性の検討. 同上.

31) 李　天成, 片野晴隆, 片岡紀代, 中村智之, 永田典代, 宮村達男, 佐多徹太郎, 脇田隆字, 鈴木哲朗: メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)様粒子の作製およびその応用. 同上.

32) 落合　晋, 石古博昭, 李　天成: イムノクロマト法による抗 Hpatitis E virus 抗体の測定. 同上.

33) 山本　博, 松田淳志, 李 天成, 鈴木樹理, 石田貴文, 武田直和: サルにおけるＥ型肝炎ウイルスの感染. 同上.

34) 三好龍也, 内野清子, 李 天成, 武田直和, 北本憲利, 田中智之: 野生イノシシの E 型肝炎ウイルス保有状況調査. 同上.

35) 赤澤大輔, 森山正樹, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字: 培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型 HCV 感染阻害活性の誘導. 同上.

36) 森山正樹, 赤澤大輔, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字: 培養細胞由来 HCV 粒子を用いたワクチンの免疫誘導能および最適アジュバントの検討. 同上.

37) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博: C 型肝炎ウイルス増殖における宿主因子 hnRNP H1/H2/F の役割. 同上.

38) 鈴木亮介, 斎藤憲司, 安東友美, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析. 同上.

39) 大西和夫, 清原知子, 石井孝司, 小林和夫: HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系の最適化と HAV 抗体産生 B 細胞動態解析法の検討. 同上.

40) 西村順裕,宮村達男,脇田隆字,清水博之: エンテロウイルス 71 と PSGL-1 受容体との結合には PSGL-1 アミノ末端領域のチロシン硫酸化が重要である. 同上.

41) 有田峰太郎, 脇田隆字, 清水博之: 細胞のキナーゼ阻害剤の持つエンテロウイルス複製阻害機構に関する解析. 同上.

42) 有田峰太郎, 脇田隆字, 清水博之: RT-LAMP 法による便検体からのエンテロウイルスの直接検出. 同上.

43) 宮村紘平, 西村順裕, 安保雅博, 脇田隆字, 清水博之: ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエンテロウイルス 71 増殖とウイルス遺伝子変異の解析. 同上.

44) 吾郷昌信, 平野 学, 山口顕徳, 吉川 亮, Umami Rifqiyar Nur 西村順裕,清水博之: 上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出同定法. 同上.

45) 町田早苗, 岩井雅恵, 西村順裕, 滝澤剛則, 清水博之: 環境水中からのヒトパレコウイルス(HPeV)検出と地域流行の関連. 同上.

46) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオウイルス研究. 同上.

47) 政木隆博, 松永智子, 高橋宏隆, 加藤孝宣, 宮村達男, 遠藤弥重太, 澤崎達也, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HCV NS5A蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 同上.

48) 村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 豊田哲也, 脇田隆字: C型肝炎ウイルス

の複製増殖に関与するウイルス遺伝子変異および遺伝子構造の解析. 同上.

49) 渡邉則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV E2 タンパク質の糖鎖機能の解析. 同上.

50) 森石恆司, 勝二郁夫, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御. 同上.

51) 木村敬郎, 鈴木亮介, 山越　智, 鈴木健裕, 堂前直, 勝二郁夫, 松浦善治, 千葉丈, 脇田隆字, 鈴木哲朗: Prohibitin2 は C 型肝炎ウイルス(HCV)NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製調節に働く. 同上.

52) Su Su Hmwe, 伊達朋子, 朝長充則, 脇田隆字, 鈴木哲朗: Generation of Hepatitis C virus NS3 mutations conferring resistance to the viral protease inhibitor by serial virus passage. 同上.

53) 鈴木亮介, 斎藤憲司, 安東友美, 石井孝司, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの trans-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析. 同上.

54) 山本真民, 相崎英樹, 宮村達男, 濱野国勝, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス粒子形成, 感染性に重要なコレステロール構造の解析. 同上.

55) 松田麻未, 李　天成, 清水　弘樹, 西村紳一郎, 片野晴隆, 中村智之, 畑中研一, 脇田隆字, 鈴木哲朗: ヒトポリオーマウイルス BKV, JCV 及び MCV の糖脂質結合の比較解析. 同上.

56) 渡邉則幸, 相崎英樹, 松浦知和, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルス subgenomic replicon RNA を複製するヒト肝星細胞株の樹立. 同上.

57) 渡邉則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV E2 タンパク質の糖鎖機能の解析. 同上.

58) 久島透嘉, 脇田隆字, 土方　誠: core の変異体を用いた C 型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析. 同上.

59) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 圃迫浩方, 脇田隆字, 加藤宜之: 癌抑制遺伝子 PML は HCV 粒子産生に必要である. 同上.

60) 有海康雄, 黒木美沙緒, 牧正 敏, 池田正徳, 圃迫浩方, 脇田隆字, 加藤宜之: ESCRT 小胞輸送系の HCV 産生への関与. 同上.

61) 赤澤大輔, 森山正樹, 尾見法昭, 中村紀子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字: 培養細胞由来HCV粒子ワクチンの免疫による異なる遺伝子型HCV感染阻害活性の誘導. 同上.

62) 河合良成, 池田正徳, 矢野雅彦, 阿部健一, 西村剛, 圃迫浩方, 有海康雄, 脇田隆字, 山本和秀, 加藤宜之: 抗潰瘍剤による C 型慢性肝炎の新たな治療戦略-Teprenone は Statin のゲラニルゲラニル化阻害を増強し HCV 複製抑制効果を増強する. 同上.

63) 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 武田直和, 脇田隆字, 片山和彦: バイオセンサー発現細胞を用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.12.9-12.

64) 勝二郁夫, 阿部克俊, 村上恭子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 宮村達男, 小池和彦, 堀田博: The hnRNP H1 modulates production of HCV particles through interaction with HCV core protein and HCV IRES RNA. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.

65) 清水博之, 斉藤真紀, 小松俊彦, 杉山和良, 小林一司 大坪寛子: 野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの現状と今後の課題. 第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会, 仙台, 2009.12.10-11.

66) 岡智一郎, 高木弘隆, 脇田隆字, 片山和彦: ルシフェラーゼセンサーテクノロジーを用いたネコカリシウイルス感染検出系の構築. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010.3.28～30.

67) 染谷雄一, 白土東子, 脇田隆字: ノロウイルス

中空粒子の昆虫細胞での発現. 同上.

III. その他

1) 岡智一郎: ノロウイルスの迅速な検出に向けた取り組み. 第50回日本臨床ウイルス学会 ランチョンセミナー, 高知, 2009.6.
2) 政木隆博: C型肝炎ウイルスの粒子形成機構の解析（非構造蛋白NS5Aをリン酸化するプロテインキナーゼの探索）. 第6回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 熱海, 2009.6.29-30.
3) 安東友美, 今村博臣, 鈴木亮介, 脇田隆字, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルス複製複合体におけるATP制御の可視化と機能解析. 第8回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2010.2.11-13.
4) 岡本有加, 政木隆博, 村山麻子, 加藤孝宣, 野本明男, 脇田隆字: HCV遺伝子型2b MA株を用いた感染増殖系開発の試み. 同上.
5) 金ソルイ, 岡本有加, 政木隆博, 渡邉治雄, 脇田隆字, 加藤孝宣: C型肝炎ウイルスgenotype 2bの感染増殖系作成の試み. 同上.
6) 岡智一郎: サポウイルスの分子疫学. 衛生微生物技術協議会第 30 回研究会, 2009.7.10.
7) 東方美保, 斎藤博之, 白土東子, 田中智之, 野田衛: 食品検体のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の開発. 同上.
8) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス 71 感染症の流行. 同上.
9) 岡智一郎: カリシウイルスの新知見. ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会, 東京, 2009.10.
10) 本村和嗣, 横山勝, 大出裕高, 中村浩美, 守宏美, 岡智一郎, 片山和彦, 神田忠仁, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳: Norovirus Surveillance Group: ノロウイルス GII/4 の変異. 同上.
11) 加藤孝宣: HCV培養細胞適応変異株の同定と解析. HCV キャンプ in Yamanashi, 山梨, 2009.12.13-14.
12) 政木隆博: HCV NS5A蛋白のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの網羅的探索. 同上.
13) 清水博之: 腸管ウイルス感染症の現状と実験室診断, 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010.2.25.
14) 片山和彦, 岡智一郎: 下痢症ウイルスの検出法アップデート(ノロウイルス, サポウイルスについて). 同上.
15) 加藤孝宣: HCV培養細胞感染増殖系を用いた薬剤耐性変異株の解析. Liver Forum in Kyoto 第12回学術集会, 京都, 2010.3.20.

3．ウイルス第三部

部長　竹田　誠

概　要

当部は、村山庁舎に配置されている。昨年度までは、第１室(インフルエンザ)、第２室(風疹)、第３室(麻疹)、第４室(ムンプス)、第５室(インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症およびサイトカイン)、第６室(インフルエンザワクチン)で構成されていたが、平成21年４月にインフルエンザウイルスに特化した試験研究業務を行う部署としてインフルエンザウイルス研究センターが設置され、ウイルス第三部の所掌事務からインフルエンザウイルスにかかる業務が移管された。これに伴いウイルス第三部は、第１室(麻疹)、第２室(風疹)、第３室（ムンプス)、第４室(インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症およびサイトカイン)の４室体制に再編された。業務は、ワクチン製剤の品質管理及び関連する研究、当該疾患の病原・病因・予防・診断・治療法等に関する研究、レファランス業務及び国際協力である。

人事異動では、平成21年４月１日付で、田代眞人部長がインフルエンザウイルス研究センター長に異動し、倉根一郎部長がウイルス第三部長に就任（ウイルス第一部長と併任）した。平成21年７月１日付で、倉根一郎部長に代わり、竹田誠部長が着任した。平成21年８月１日付で、田原舞乃研究員(麻疹室）と中津祐一郎研究員（麻疹室）が採用された。また、平成21年９月１日付で、駒瀬勝啓室長（第２室「風疹室」）が、第１室（麻疹）室長に配置換えされた（引き続き第２室長を併任)。平成22年２月１日に第２室に森嘉生室長が採用された（駒瀬室長の併任が解除された)。一方、平成21年３月31日付で菅井敏行主任研究員（麻疹室）と岡田晴恵研究員（麻疹室）が、平成21年６月30日付で田口文広室長（インフルエンザ以外の呼吸器ウイルス感染症およびサイトカイン室）が退職した。

当部は、麻疹、風疹、おたふくかぜの各ワクチン、γ-グロブリン製剤に関する国家検定、検査、研究業務、インターフェロン製剤については収去検査を担当している。品質管理体制に関しては、ワクチン国家検定のSOP等の改定、標準品の整備等を進め、GMPを中心とする新たな品質管理体制と国際的に通用する近代的な品質管理への転換を図るために必要な対策に取り組んでいる。感染症対策やワクチン政策に対する社会的要求が高まる中で、ワクチン製剤の安全性と有効性の確保とNational Control Laboratoryとしての責任を果たすために、限られた人員や予算の中で、国民や社会の要望に応えるべく努力を続けている。

研究活動では、麻疹に関しては、全国的な検査診断ネットワーク体制の構築に向けた研究を進めるとともに、ワクチン効果の維持にとって重要な知見となる麻疹ウイルスの抗原性決定基盤に関する研究を進めている。また、麻疹に伴う致死的持続性中枢感染症である亜急性硬化性全脳炎に関する研究、新たなワクチン開発に関する研究、先端技術を用いた麻疹の病態理解に関する研究を行っている。風疹に関しては、風疹の病原診断に関する基幹技術の開発、流行株の変遷に関する研究、ワクチンの安全性や有効性の分子基盤を明らかにするための研究を行っている。ムンプスウイルス（おたふく風邪）に関しては、神経病原性に関する研究、流行株の解析などを行っている。インターフェロン・サイトカインに関しては、宿主側の新たな制御機構を研究するとともに、ウイルス側による阻害機構を明らかにするための研究を行い、感染症の包括的な理解を目指している。急性呼吸器ウイルスに関しては、重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスならびにその他のコロナウイルスの病態解明に関する研究を行い、その知見をもとにした抗ウイルス剤開発を目指している。

国際協力では、WHO 世界麻疹風疹実験室ネットワーク（Global Measles and Rubella Laboratory Network）のGlobal Specialized Laboratory（GSL)、ならびにWHO西太平洋地域のRegional Reference Laboratory（RRL)として、麻疹風疹の診断や流行調査に資するための研究を遂行し、また、周辺諸国(中国ならびにモンゴル)への麻疹風疹診断技術の研修、

指導、診断精度管理試験等を実施している。また、JICA の依頼に応じてアジア、アフリカ、中国等からの研修生に麻疹診断に関する実習や講義、研修等を実施している。

業　績

調査・研究

I. 麻疹ウイルスに関する研究

1. 麻疹検査診断ネットワークの構築に関する研究

2012 年までの麻疹排除にむけて、WHO では実験室診断による全数報告に基づいた麻疹サーベイランス体制の確立を求めている。2008 年から全数報告性は導入されたが、未だ約 60%の検査診断率であり、実験室診断に基づいた全数報告制度の体制の確立は急務である。地方衛生研究所の中から 10 ヵ所を麻疹・風疹レファレンスセンターとして選び、感染研-地方衛生研究所-保健所を結ぶ麻疹診断ネットワークを構築し、遺伝子診断に基づく検査診断体制を確立したが、検体搬送の環境が整わず検査診断ネットワークは十分には機能していない事が明らかになった。[駒瀬勝啓、染谷健二、關文緒、中津祐一郎、田原舞乃、藤井薫、竹田誠]

2. 亜急性硬化性全脳炎分離株の麻疹ウイルス受容体に関する研究

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、麻疹ウイルスの持続感染により生じる。SSPE 由来株のウイルスゲノム上には麻疹ウイルス野外株と比較して多くの変異が認められる。その中で、細胞膜上のウイルス受容体と結合する機能を持つ H タンパク質の変異について評価する為、発現プラスミドおよび組換えウイルスを作製し、麻疹ウイルスで報告されている３種類のウイルス受容体の利用能力について解析を行った。その結果、麻疹ウイルス野外株が効率よく利用できる２種類の受容体に対して、SSPE 由来株 H タンパク質では利用能力が低下していることが明らかになった。[關文緒、染谷健二、田原舞乃、中津祐一郎、駒瀬勝啓、竹田誠]

3. 麻疹ウイルス H タンパク質の抗原性変化に関する研究

麻疹排除計画は、麻疹ウイルスの抗原性に変化が生じないということを前提としており、麻疹ウイルスの抗原性に変化が生じる可能性についての検討は麻疹排除計画の根幹に関わる研究課題である。本研究ではHタンパク質のアミノ酸変化による抗原性の変化を系統的に解析し、今後の対策について検討した。麻疹ウイルスHタンパク質上には異なる５種の antigenic siteがあることが報告されている。最も抗原性が高いと考えられるantigenic site Iはよく保存されていた。この部位は受容体結合に最も重要な領域であると考えられ、今後も完全なエスケープ変異が生じることはないと予想された。一方、antigenic site I以外のエピトープは、一部の株で、すでに抗原性が大きく変化していると考えられた。これらの結果から、麻疹ウイルスは、今後も単一血清型でありつづけるであろうが、約半世紀前に分離された現在のワクチン株だけに依存していると、いずれ、ワクチン効果が低下する可能性があると考えられた。[田原舞乃、中津祐一郎、關文緒、染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠]

4. 麻疹ウイルスポリメラーゼの細胞内動態の解析

麻疹ウイルスは宿主細胞表面から侵入した後、細胞質内でウイルス RNA 合成を行う。その結果、新規に合成されたウイルスゲノムとウイルスタンパク質が細胞膜付近で集合することで、子孫ウイルス粒子を形成する。しかしながら、その詳細は明らかになっていない。より詳細な細胞内動態を解析するために、リバースジェネティクス法を用いて、蛍光タンパク質融合 L タンパク質発現組換え麻疹ウイルスの作製を試みた。感染後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行い、感染細胞内での L タンパク質の動的な変化を解析した。[中津祐一郎、田原舞乃、關文緒、染谷健二、駒瀬勝啓、竹田誠]

5. 麻疹ウイルスワクチン株 AIK-C 株をベクターとして用いた新規ワクチンの開発に関する研究

乳幼児期において肺炎や細気管支炎などの重篤な症状を引き起こす起因ウイルスとして、RS ウイルス(RSV)が挙げられる。すでに安全性が確立されている麻疹ワクチン AIK-C 株をワクチンベクターとして用い、RSV の感染防御に関わる抗原タンパク質を発現する組換え AIK-C 株を作製した。コットンラットに接種したところ RSV に対する抗体が産生される事が確認された。[駒瀬勝啓、中山哲夫*：*北里大学]

Ⅱ. 風疹ウイルスに関する研究

1. 風疹抗体測定のための国内標準血清、国内パネル血清の作製と評価 （継続）

標準血清およびパネル血清は診断キットの評価や検査会社

の精度管理のために必要である。これまでに日本国内で使用できる風疹国内標準血清とパネル血清を整備する目的で、インフォームドコンセントを得て採取したプール血清の国内標準血清候補および各パネル血清を準備した。今年度は国内標準血清候補と各パネル血清の国際単位(IU 値)の値付けを行うため、検査会社に依頼したWHO国際標準血清と国内標準血清候補、パネル血清のHI法およびELISA法による測定結果の平行線定量法による統計処理を行った。その結果、国内標準血清JPN'03の相対力価は100 IU/mLと決めることができた。パネル血清については、統計上定量範囲を超えるものがあったので再測定を依頼することとした。[岡本貴世子、大槻紀之、藤井薫、駒瀬勝啓]

2. 風疹ウイルス遺伝子検出TaqManリアルタイムPCR法の検討

現在、風疹ウイルスの遺伝子検出には主にNested PCRが用いられているが、Nested PCRは複数試料を扱う際の煩雑さ、所要時間の長さ、クロスコンタミネーション、および陽性検体を測定した際の診断実験室の汚染等が問題となることがある。今年度は、より短時間で結果が得られ、一度に多数の検体が測定でき、またコンタミネーションの可能性も低いTaqManリアルタイムPCRを用いた風疹ウイルス遺伝子検出法を作製し、検討を行った。風疹ウイルス遺伝子の非構造蛋白質領域に特異的なTaqManreal time PCRプライマーおよびプローブを設計した。ワクチン株(TO-336)の親株であるTO-336 wt株の非構造蛋白質領域をコードする標準RNAを用いて検出限界および検量線の評価を行った。さらに国内ワクチン株TO-336とその親株(genotype 1A)、94ー07年に当室で分離されたウイルス株(genotype 1D, 1j, 2B)由来のウイルスRNAの10倍希釈列を測定し、感度および特異性を検討したところ、10コピー程度の風疹ウイルスRNAを検出可能であり、$10-10^6$コピーの範囲において良好な直線性が得られた。また、当室で保有している風疹ウイルス株ほぼ全てに対して1 PFU程度の検出感度が得られ、特に病原体検出マニュアルに記載されている従来のRT-PCR法では検出が困難なgenotype 2Bの株においても良好な感度が得られた。[岡本貴世子、大槻紀之、阿保均、藤井薫、駒瀬勝啓]

3. 風疹ワクチンウイルスTO-336株の温度感受性機構の解明

現在日本で承認・製造されている生風しんワクチンの製造に使用されているウイルスは全て温度感受性を有している(高温で増殖しない)。このことは一般にワクチン株のマーカーとされている。しかしながら、温度感受性を規定する分子生物学的基盤は十分に解明されていない。一方TO-336ワクチン株及び温度感受性を有さない親株の塩基配列情報より、風疹ウイルスの非構造タンパクが温度感受性の決定に重要であると推測されている。そこでTO-336ワクチン株及びその親株の非構造タンパク 994-1548 アミノ酸領域をエピトープタグ融合タンパクとしてRK-13細胞で発現させ、解析した。この結果ワクチン株の非構造タンパクは高温での発現が大きく低下することが判明した。このことよりTO-336ワクチン株の温度感受性獲得にはウイルスの非構造タンパクの熱安定性が関与していることが示唆された。[大槻紀之、阿保均、森嘉生、岡本貴世子、駒瀬勝啓]

4. 日本における風疹ウイルスの経年的変遷(継続)

昨年度年までに分離された風疹ウイルスのE1領域、あるいは構造蛋白質(C,E1,E2)領域の塩基配列を決定し、過去に報告されていた遺伝子の情報も加えて系統樹解析を行い、現在にいたるまでの日本で流行した風疹ウイルスの経年的変異を解析している。本年は風疹の報告は少なく、ウイルス遺伝子が検出された例はなかった。風疹ウイルスのgenotype解析はWHOが次期の目標としている風疹・先天性風疹症候群(CRS)の排除計画にも重要であり今後も継続していく。[大槻紀之、岡本貴世子、阿保均、藤井薫、駒瀬勝啓]

III. ムンプスウイルスに関する研究

1. おたふくかぜ生ワクチン接種後のムンプス発症例ならびにムンプスウイルス感染が疑われる脳炎例

おたふくかぜ生ワクチン接種後にムンプスを発症した1例について調査をおこなった。ワクチン接種15日後に不明熱、全身痙攣、髄膜炎を発症し、髄液からムンプスウイルスが分離された。分離ウイルスの遺伝子型は接種したおたふくかぜワクチン株と同じであった。そのため、ワクチンによる副反応である可能性が高いと判断した。流行性耳下腺炎に伴い劇症型急性散在性脳髄膜炎を発症したとされる患児の脳髄膜炎の原因がムンプスウイルスであるのかと確かめるため、咽頭

ぬぐい液、鼻汁、髄液をVero細胞で3継代したがムンプスウイルスのCPEを検出するには至らなかった。そのため、ムンプスウイルスと脳髄膜炎の因果関係は立証できなかった。一方、便中のロタウイルス抗原が陽性になっており、ロタウイルス髄膜炎が疑われた。[加藤篤、木所稔、高柳勝*、大山宣孝**、田代眞人：*仙台市衛生研究所、**横浜市立大学付属市民総合医療センター小児科]

2. リバースジェネティクスによって作製したムンプスウイルスの病原性復帰と遺伝的多様性との関連性に関する解析

平成20年度に、コンセンサスシーケンスに基づいて作製された組換えムンプスウイルスは原株の性状を反映せず、高度に弱毒化していることを報告した。ポリオウイルスでは遺伝的多様性が中枢神経系への侵襲性に大きく関わることが報告されていることから、組換えムンプスウイルスの弱毒化にも遺伝的多様性の低下が関与している可能性がある。そこで我々は、組換えウイルスを変異原存在下で培養することによってその遺伝的多様性を人為的に上昇させ、それによって中枢神経病原性が回復するか否かを新生ラットの感染モデル系によって評価し、遺伝的多様性と中枢神経病原性との関連を調べた。リバースジェネティクスによって作製された組換えウイルスrY213株(rY213ori)を0.4mMリバビリン存在下にて2代継代培養した(rY213Rib)。rY213oriとrY213RibのcDNAをTAクローニングし、クローンごとの塩基配列を調べ、コンセンサスシーケンスに対する変異の頻度を測定した。同時にrY213Ribを新生ラットに脳内接種し、4週間後の脳室拡張をMRIによって測定した。その結果、コンセンサスシーケンスに対する変異の頻度はリバビリン処理の前後でそれぞれ0.006%と0.16%で、リバビリン処理によって変異率が25倍に上昇していた。また新生ラットの感染モデル系においてrY213oriは全く病原性を示さず、脳室の拡張がほとんど観察されなかったのに対し、rY213Ribの拡張の程度は原株Y213と同程度に強いものであった。これらの結果から、cDNAから回収された組換えウイルスの性状が高度に弱毒化している原因として、遺伝的多様性の低下が関与していることが示唆された。また、ムンプスウイルスの中枢神経病原性と遺伝的多様性が相関することが示唆された。[木所稔、加藤篤、齋加志津子*、田代眞人：*千葉県衛生研究所]

3. モンゴル国内で分離された新規genotypeムンプスウイルスの性状について

近隣諸国においてどのようなウイルスが流行しているかをモニターすることは、国内における流行動態を理解する上にも重要である。また、感染症サーベランスが未整備の地域にとってはそうした調査は国際協力の側面からも意義がある。そこで我々は特にユーラシア大陸北東部において、どのようなムンプスウイルスが流行しているか調べるため、モンゴル国内で採取されたムンプス患者由来咽頭ぬぐい液よりウイルス分離とRT-PCRによるcDNAの検出を行った。モンゴル国内で採取された32例のムンプス患者由来咽頭ぬぐい液中21例からcDNAが検出され、1例からはウイルスが分離された。それらの塩基配列を解析したところ、7種類の塩基配列が検出され、大きく2つの系統に分類されたが、いずれも既知のgenotypeには属さず、同一の新規のgenotypeに類別されることが示唆された。今回得られた配列はいずれも同一の新しいgenotypeに属することから、国外に持ち出されること無く、地域内に維持されてきた固有のgenotypeなのかもしれない。モンゴル国内ではムンプスワクチンは導入されておらず、毎年流行が繰り返されていることから、今後さらに未知のgenotypeが検出される可能性が有る。[木所稔、駒瀬勝啓、TuulRenchin*、*National Centre for Communicable Diseases of Mongolia]

VI. インターフェロン、サイトカインに関する研究

1. 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のひとつであるV蛋白質のC末端側にはウイルス間で最も保存された領域がありその機能が注目されている。しかし、その配列は細胞培養レベルで非必須でないなど存在意義の詳細は依然不明な蛋白質である。センダイウイルス(SeV)親株とV蛋白質を欠損した変異株を比較し、インターフェロン(IFN)β等の発現に関わる転写因子IRF3がV蛋白質の標的と推定された。欠損株感染マウスの肺内にはIFNβに加え、IFNλの量が多かったが、IRF3欠損マウスではそのような差は観察されなかった。IFNβあるいはλであらかじめ処理した細胞あるいはマウスのどちらも、その後のSeV感染に対して抵抗性になった。ところが、抗IFN-β、あるいは抗IFN-λの中和抗体をマウスに多量投与しても、V欠損SeVのマウス肺内の増殖は1日目以降抑制され、IFNβとλの産生抑制だけで説明するのは困難であった。[加藤

篤、久保田耐、田代眞人、清谷克寛*、坂口剛政*、吉田哲也*：*広島大学医歯薬大学院]

2. Ⅰ型インターフェロン産生制御に関わる翻訳後修飾機構

ムンプスウイルスを含む、マイナス鎖 RNA をゲノムにもつウイルスの感染は、Toll 様受容体ファミリーあるいは、RIG-I/MDA5 などの RNA ヘリカーゼモチーフを持つ分子によって、宿主細胞に認識され、Ⅰ型インターフェロンを含む種々のサイトカイン産生を誘導する。このようなサイトカイン産生を制御する宿主転写因子及び情報伝達因子のタンパク質翻訳後修飾系について検討を行った。この結果、ユビキチン様修飾因子 SUMO による修飾がⅠ型インターフェロン産生制御に関与することが明らかとなった。[久保田耐、加藤篤、田代眞人、久保田眞由美*、張賢聡**、尾里啓子**：*細菌第 2 部、**米国 NIH]

V. 急性呼吸器ウイルス感染症に関する研究

1. 膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS2 による SARS コロナウイルスの細胞侵入メカニズムについて

SARS コロナウイルス（SARS-CoV）は細胞に感染する時、宿主細胞のプロテアーゼを利用することが知られている。今回我々は、肺に特異的に発現している細胞膜貫通型プロテアーゼ「TMPRSS2」がＳ蛋白を活性化し、ウイルスの細胞侵入を促進させることを見出した。さらに TMPRSS2 は細胞に侵入するウイルスのＳ蛋白を活性化することは出来るが、この細胞で作られて出て行くウイルスのＳ蛋白には影響を及ぼさないことを見出した。この結果は、SARS-CoV の肺での強い病原性に TMPRSS2 が関与する可能性を示唆している。[松山州徳、永田典代*、白戸憲也、川瀬みゆき、田口文広：*感染病理部]

2. ヒトコロナウイルス NL63 の細胞侵入機構

小児に急性呼吸器障害を引き起こすヒトコロナウイルス（NL63）の細胞侵入メカニズムを解析するために、プロテアーゼ感受性を調べた。NL63 のＳ蛋白を VSV シュードタイプに導入し、トリプシン存在下及び TMPRSS2 発現細胞への細胞侵入を調べた結果、①NL63 はウイルス粒子が細胞に吸着した状態でのみ、トリプシン感受性をもつこと②SARS-CoV と比較して TMPRSS2 発現細胞への侵入効率が高いことがわかった。このプロテアーゼ感受性の違いがそれぞれのウイルスの病原性の違いを説明するものと仮定し、現在解析を継続している。[白戸憲也、川瀬みゆき、松山州徳]

３．マウスコロナウイルスのスパイク（S）蛋白の二段階構造変化

SARS-CoV にＳ蛋白構造と細胞侵入メカニズムが酷似したマウスコロナウイルス MHV-2(マウス肝炎ウイルス-2 株)を用い、プロテアーゼによるウイルス活性化の分子メカニズムを解析した。ウイルス表面のＳ蛋白は細胞表面のレセプターに結合し、続いてプロテアーゼに切断されることにより構造変化を起こす「二段階構造変化」を必要とすることを論文報告した。これは新規のＳ蛋白活性化のメカニズムであり、他のコロナウイルスやエボラウイルスへの応用が期待できる知見である。[松山州徳、田口文広]

4. 膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 によるブタ流行性下痢症ウイルス(PEDV)の細胞融合活性の誘導

ブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)はブタの下痢症を引き起こすコロナウイルス(CoV)である。PEDV はトリプシン群のプロテアーゼを利用してＳ蛋白の解裂を誘導し、ウイルスと細胞膜との膜融合を誘導していると考えられている。今回我々は、TMPRSS2 が PEDV のウイルス複製に与える影響について検討を行った。PEDV を Vero 細胞に感染させてトリプシンを添加して培養すると細胞融合が見られるが、非添加では認められず、Vero/TMPRSS2 細胞ではトリプシン非添加で細胞融合形成が見られた。さらに Vero/TMPRSS2 細胞ではトリプシン非存在下でも非存在下と同様に効率よく感染が進むことが明らかとなった。以上より TMPRSS2 はトリプシンと同様に PEDV の感染を促進することが示された。[白戸憲也、松山州徳、川瀬みゆき、田口文広]

5. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)のマウス馴化株の分離と性状解析

ブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)はブタの下痢症を引き起こすコロナウイルス（CoV）である。一般に CoV は種特異性が高く、固有宿主にしか感染しないが、ニワトリやヒトの CoV の乳飲みマウス脳内での継代によりマウス馴化株が得られる。そこで本研究では、乳飲みマウス脳内継代により PEDV のでマウス馴化株を得た。得られた 10 代経代株は親株と比較して、

乳のみマウスへの抗病原性と高い細胞融合活性を示した。両株のS蛋白アミノ酸配列を比較したところ4か所の変異が見られ、本変異によりER-ゴルジ中間コンパートメントへのS蛋白質保持に関与する「KXHXX」モチーフが消失していることが判明し、細胞表面へのS蛋白質発現量が増加するため、膜融合活性が増強されていることが示唆された。［白戸憲也、前嶋円、松山州徳、川瀬みゆき、田口文広］

サーベイランス業務

1. 感染症流行予測調査における風疹感受性調査のため、標準血清（HI抗体陽性血清並びに陰性血清）を用意し、感染症情報センターを通じて12都県に配布した。［大槻紀之、感染症情報センター、駒瀬勝啓］

品質管理に関する業務

1. 麻しんワクチン中間段階6ロット、乾燥弱毒生麻しんワクチン小分け製品6ロット、風しんワクチン中間段階2ロット、乾燥弱毒生風しんワクチン小分け製品2ロット、弱毒乾燥生麻しん風しん混合ワクチン54ロット、おたふくかぜワクチン中間段階1ロット、乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン最終製品9ロットの検定を行った［染谷健二、關文緒、中津祐一郎、田原舞乃、駒瀬勝啓、大槻紀之、岡本貴世子、久保田耐、木所稔、加藤篤、白戸憲也、野田雅博、荻野利夫、竹田誠］

2. 乾燥弱毒生麻疹風疹混合生ワクチンの承認前審査を行った。［岡本貴世子、關文緒、關文緒、駒瀬勝啓、竹田誠］

3. インターフェロン製剤13ロット(α-2b 3ロット、pegα-2b 3ロット、aLys 3ロット、recβ-1b 1ロット、天然型β3ロット)の収去検査を行った。［白戸憲也、松山州徳］

4. 人免疫グロブリン製剤中の麻疹ウイルスのHI抗体価測定の検定を167ロット行った。［荻野利夫、松山州徳］

レファレンス業務

1. 9件の風疹の依頼検査を実施した。［大槻紀之、岡本貴世子、阿保均、藤井薫、駒瀬勝啓］

2. 1件の麻疹の依頼検査を実施した。［染谷健二、關文緒、藤井薫、駒瀬勝啓］

3. 4ヵ所の地方衛生研究所にVero/hSLAM細胞を配布した。［關文緒、藤井薫、駒瀬勝啓］

4. 10ヵ所の麻疹、風疹レファレンスセンターに麻疹IgM ELISA kitを配布し、習熟度試験を実施した。［染谷健二、關文緒、藤井薫、駒瀬勝啓］

5. 新型[A(H1N1)pdm virus, H1N1pdm]インフルエンザ様患者のARIウイルス検索を実施した結果，H1N1pdm陰性患者の18.8%からRSV，HRV，hMPVおよびPIVが検出された。HRVの*VP4/VP2*領域の系統樹解析の結果，検出HRVはspecies A（HRV-A），BおよびCに分類された［中村正治*，糸数清正*，平良勝也*，仁平稔*，木村博一**，野田雅博：*沖縄県衛生環境研究所，**感染症情報センター］

6. 小児下気道疾患患者170例のARIウイルス検索を実施した。その結果，RSV；83株，HRV；64株，hMPV；2株，PIV；2株およびHBoV；3株が検出された。36株のRSVの*G*遺伝子系統樹解析の結果，23株がSubgroup A（genotypeGA）および13株がSubgroup B（genotypeBA）に分類された。53株のHRVの*VP4/VP2*領域系統樹解析の結果，22株がspecies A，5株がspecies Bおよび26株がspecies Cに分類された［荒川美果*，平田明日美*，菅井和子**，藤塚麻子**，木村博一***，野田雅博：*栃木県保健環境センター、**国立病院機構横浜医療センター、***感染症情報センター］

7. 2002～08年に山形県で分離されたPIV3型（PIV3）計91株の*HN*遺伝子の分子系統樹解析を実施した結果，大きく3つのクラスター（Cluster 1；24株，Cluster 2；8株およびCluster 3；59株）に分類された。また，Cluster 1に属する14702株とCluster 2およびCluster 3に属する山形由来株間では，それぞれ6および2カ所でアミノ酸置換がみられた［平田明日美*，水田克巳**，青木洋子**，須藤明日香**，塚越博之***，荒川美果*，木村博一****，野田雅博：*栃木県保健環境センター、**山形県衛生研究所、***群馬県衛生環境研究所、****感染症情報センター］

8. 病因が特定されなかったARI患者のHBoV検索を昨年度に引き続き実施した結果，新たに8株検出された。詳細，解析中である。［水田克巳*，荒川美果**，平田明日美**，松田俊二***，田中千香子****，中村正治*****，木村博一******，野田雅博：*山形県衛生研究所、**栃木県保健環境センター、***国立病院機構愛媛病院、****滋賀県衛生科学センター，*****沖縄県衛生環境研究所、******感染症情報センター］

9. 2003ー07年に山形県で分離された76株のHRV-Aの*VP4/VP2*遺伝子領域の分子疫学解析を行った。分離株解析部位の塩基

およびアミノ酸配列の相同性は，それぞれ 66.6ー100%および84.7ー100%，系統解析ではそれぞれ11あるいは8クラスターに分類された［木村博一*，水田克巳**，平田明日美***，塚越博之，野田雅博：*感染症情報センター、**山形県衛生研究所、***栃木県保健環境センター、****群馬県衛生環境研究所］

10. 病原体検出マニュアル「ライノウイルス編，パラインフルエンザウイルス編およびボカウイルス編」を感染症研究所HP 上に公開した［野田雅博、木村博一*、水田克巳**、塚越博之***、平田明日美****、五十嵐郁美*****、中村正治******、大内好美*******感染症情報センター、**山形県衛生研究所、***群馬県衛生環境研究所、****栃木県保健環境センター、*****五十嵐郁美、******沖縄県衛生環境研究所、*******滋賀県衛生科学センター］

国際協力業務

1. 7th Global measles and Rubella Laboratory network meeting（スイス、ジュネーブ市）に参加し、日本の麻疹ウイルス、風疹ウイルスの分子疫学についての発表を行うとともに、開発途上国における診断法、検体輸送法、精度管理等に関して議論した。［駒瀬勝啓、竹田誠］

2. Hands on training on the Laboratory diagnosis of measles and rubella （中国、香港）に参加し、WHO 西太平洋地域諸国からの参加者へ麻疹検査診断技術の技術指導を行った［駒瀬勝啓］

3. The second meeting on vaccine preventable diseases laboratory networks in the Western Pacific Region（フィリピン、マニラ市）に参加し、日本の麻疹、風疹の検査診断体制を報告するとともに今後の検査診断体制について議論した。［駒瀬勝啓、竹田誠］

4. Technical consultation on verification of measles elimination in the Western Pacific Region（フィリピン、マニラ市）に参加し、今後の麻疹排除計画案について協議した。［竹田誠］

5. JICA 中国予防可能な疾患対策プロジェクトの麻疹実験室ネットワーク会議（中国、北京市）に参加して、中国、日本の麻疹対策について議論した。［竹田誠］

6. WHO 西太平洋地域諸国における麻疹サーベイランスへの協力：WHO、WPRO の Regional Reference Laboratory としてベトナム等より送られてきた臨床検体からのウイルスの遺伝子型解析を行った。また、モンゴルの検査精度管理試験を行った。［染谷健二、關文緒、藤井薫、駒瀬勝啓］

研修業務

1. 国立感染症研究所・医師卒後臨床研修プログラムにおいて、「麻疹・風疹」の講義を行った。［竹田誠］

2. JICA 中国ワクチン予防可能感染症サーベイランスおよびコントロール(VPD)プロジェクト研修において 1 名の中国人研修生を１年間の研修コースを実施している［中津祐一郎、染谷健二、關文緒、田原舞乃、駒瀬勝啓］

3. JICA「世界ポリオ根絶のための実験室診断技術」コースにおいて、アジア、アフリカ、中国等に研修生 6 名に麻疹抗体測定法の実習を行った。［染谷健二、關文緒、中津祐一郎、田原舞乃、藤井薫、駒瀬勝啓］

4. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会において麻疹・風疹診断法に関する講義を行った。［岡本貴世子、駒瀬勝啓］

5. 平成 21 年度新興再興感染症ウイルスコースにおいて，麻疹ウイルス（実習）の技術援助を担当した。［野田雅博］

6. 平成 21 年度短期研修新興再興感染症技術研修において，麻疹ウイルス（総論）の講義を行った。［竹田誠］

7. 平成 21 年度地域保健医療カリキュラム医師卒後臨床研修プログラムにおいて麻疹、風疹の講義を担当した。［竹田誠］

発 表 業 績 一 覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1. Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, and Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. Virus Genes. 39: 330-4 (2009)
2. Ninomiya K, Katayama T, Fujieda N, Nakayama T, Komase K, Nagata K, and Takeuchi K. Amino Acid substitution at position 464 in the haemagglutinin-neuraminidase protein of a mumps virus Urabe strain enhanced the virus growth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Vaccine. 27: 6160-5 (2009)
3. Kato S, Ohgimoto S, Sharma LB, Kurazono S, Ayata M,

Komase K, Takeda M, Takeuchi K, Ihara T, and Ogura T. Reduced ability of hemagglutinin of the CAM-70 measles vaccine strain to use receptors CD46 and SLAM. Vaccine. 27: 3838-48 (2009)

4. Nakatsu Y, Takeda M, Iwasaki M, and Yanagi Y. A highly attenuated measles virus vaccine strain encodes a fully functional C protein. J Virol. 83:11996-2001 (2009).

5. Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, and Yanagi Y. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. J Virol. 83:10374-83 (2009)

6. Itoh Y, Ozaki H, Ishigaki H, Sakoda Y, Nagata T, Soda K, Isoda N, Miyake T, Ishida H, Okamoto K, Nakayama M, Tsuchiya H, Torii R, Kida H, and Ogasawara K. Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. Vaccine. 28:780-9 (2009)

7. Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, and Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS. 23: 1485-94 (2009)

8. Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, Kawabata S, and Koshiba T.Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. Sci Signal. 2. ra47 (2009)

9. Yanagi Y, Takeda M,Ohno S, and Hashiguchi T. Measles virus receptors. Griffin DE and Oldstone MBA ed. Current Topics in Microbiology and Immunology 329. Measles history and basic biology. 13-30(2009)

10. Ikegame S, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y, and Yanagi Y. RIG-I and MDA5 RNA helicases both contribute to the induction of interferon-{alpha}/{beta} in measles virus-infected human cells. J Virol. 84:372-9 (2010)

11. Meng X, Nakamura T, Okazaki T, Inoue, H Takahashi A, Miyamoto S, Sakaguchi G, Eto M, Naito S, Takeda M, Yanagi Y, and Tani K. Enhanced antitumor effects of an engineered measles virus Edmonston strain expressing the wild-type N, P, L genes on human renal cell carcinoma. Mol Ther. 18:544-51 (2010)

12. Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, and Yanagi Y. Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. J Biol Chem. 285:20882-90 (2010)

13. Chang TH, Kubota T, Matsuoka M, Bray M, Jones S, and Ozato K. Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. PLoS Pathog. 5:e1000493 (2009)

14. Masumi A, Ito M, Mochida K, Hamaguchi I, Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Tsuruhara M, Takizawa K, Kato A, and Yamaguchi K. Enhanced RIG-I expression is mediated by interferon regulatory factor-2 in peripheral blood B cells from hepatitis C virus-infected patients.Biochem Biophys Res Commun. 391:1623-8 (2010)

15. Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, and Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein.Vaccine. 27:966-71 (2009)

16. Kubota T, Matsuoka M, Chang TH, Bray M, Jones S, Tashiro M, Kato A, and Ozato K. Ebolavirus VP35 interacts with the cytoplasmicdynein light chain 8. J Virol. 83:6952-6 (2009)

17. Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, Gohda J, Akiyama T, Semba K, Goto H, Kato A, Yujiri T, Imai T, Kawaguchi Y, Su B, Takeuchi O, Akira S, Tsunetsugu-Yokota Y, and Inoue J. TRAF6 Establishes Innate Immune Responses by Activating NF-kappaB and IRF7 upon Sensing Cytosolic Viral RNA and DNA. PLoS ONE. 4:e5674 (2009).

18. Matsuyama S, and Taguchi F. Two step comformational changes mediated by receptor binding and proteolysis of a coronavirus envelope glycoprotein. J Virol. 83: 11133-41 (2009)

19. Shirato K, and Mizutani T. ZhiFeng and Ming Long (ed.). Replication, Transcription, and Translation of Coronaviruses. Viral Genomes: Diversity, Properties and Parameters. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA. p159-67 (2009)

20. Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T, Noriko, Katsushima H Oshitani K, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, and Ahiko T. Stability of the seven hexonhypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. Virus Res. 140: 32- 40 (2009)

21. Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Koja Y, Tamanaha K, Kimura H, and Noda M. Genotypic and phylogenetic analysis of the G gene of respiratory syncytial virus isolates in Okinawa, Japan, 2008. Jpn. J Infect Dis. 82:326-7 (2009)

22. Hishinuma-Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akiyama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, Tashiro M, and Kimura H: Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. J Infect. 58:311-3 (2009).

23. Mizuta K, Hirata A, Suto A, Aoki Y, Ahiko T, Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M, Akiyama M, Okabe N, Noda M, Tashiro M, and Kimura H. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. Virus Res. 147:265-74 (2010).

24. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, and Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. JpnJ Infect Dis. 63:139-40 (2010)

25. Chaipan C, Kobasa D, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Tsegaye TS, Takeda M, Bugge TH, Kim S, Park Y, Marzi A, and Pöhlmann S. Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. J Virol. 83:3200-11. (2009)

2. 和文発表

1. 駒瀬勝啓　日本の麻疹・風疹の現状と問題点　総合臨床 永井書店　59:435-440 (2010)
2. 加藤 篤、清谷克寛 インターフェロンがセンダイウイルスの病原性発現に及ぼす影響　実験医学　27:186-193 (2009)
3. 加藤 篤　ワクチンで防御可能なウイルス性疾患：麻疹、風疹、おたふくかぜ　生体の科学 60:138-144 (2009)
4. 田口文広、松山州徳.　コロナウイルスの細胞侵入機構. ウイルス 59:215-22 (2009)
5. 竹田誠、柳雄介　麻疹ウイルス感染　麻疹ウイルスの受容体と病態について　小児内科、41:976-980 (2009)
6. 竹田誠、柳雄介　パラミクソウイルス科　医科ウイルス学高田賢蔵 (編) (改訂3版) 南江堂　342-352 (2009)
7. 竹田誠、柳雄介　麻疹ウイルスの受容体とトロピズム 感染症-ウイルス・細菌・寄生虫の感染戦略、光山正雄、北潔、野本明男 (編) 実験医学　27:128-134 (2009)
8. 竹田誠、柳雄介　麻疹ウイルスの増殖戦略　感染現象その理解の深化から疾患制御への展望　木下タロウ、熊之郷淳、竹田潔、松浦善治、川端重忠 (編)　蛋白質核酸酵素　54:908-912 (2009)
9. 竹田誠、駒瀬勝啓　世界麻疹排除計画と世界麻疹風疹実験室ネットワーク　病原微生物検出情報、31:35-36(2010)

Ⅱ. 学 会 発 表

1. 国際学会

1. Takeda M. Measles virus infection of epithelial cells. Negative strand RNA viruses. Belfast, Northern Ireland. 26-27 March 2010.
2. Shirato K, Matsuyama S, Kawase M, and Taguchi F. Serine protease TMPRSS2 induces syncytia formation in cells

infected with porcine epidemic diarrhea virus. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 8-11 September 2009.

3. Matsuyama S, and Taguchi F. Conformational changes mediated by receptor binding and proteolysis of a murinecoronavirus spike protein. 28th ASV Meeting. The University of British Columbia, Vancouver, Canada 11-15 July 2009 .
4. Fujitsuka A, Sugai K, Kobayashi Y, Kimura H, Noda M, and Kaburagi Y. Risk factors for bronchial asthma in infants after respiratory syncytial virus infection. Europian Respiratory Society Annual Congress. Vienna, Austria. 12-16 September 2009.

2. 国内学会

1. 中津祐一郎、竹田誠、岩崎正治、柳雄介　新規「C 遺伝子」をもつ組換え麻疹ウイルス　C タンパ ク質の変異は Edmonston 株の弱毒化に関与しない：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
2. 關文緒、染谷健二、山田健太郎、竹田誠、駒瀬勝啓　亜急性硬化性全脳炎患者に由来する組換え麻疹ウイルス SI 株の H タンパク質機能および感染性の変化：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
3. 駒瀬勝啓、大槻紀之　フックス虹彩萎縮性虹彩毛様体炎患者から検出された風疹ウイルスゲノムの解析：第 50 回日本臨床ウイルス学会　高知　2009 年 6 月
4. 駒瀬勝啓　地衛研フォーラム、麻疹排除計画に向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割　麻疹排除の現状と麻疹サーベイランス体制について：第 68 回日本公衆衛生学会総会　奈良　2009 年 10 月
5. 駒瀬勝啓　シンポジューム I　麻疹　麻疹排除にむけた WHO の取り組みと日本の麻疹サーベイランス体制について：衛生微生物協議会第 30 回研究会　堺市　2009 年 7 月
6. 池亀聡、竹田誠、大野真治、中津祐一郎、柳雄介　麻疹ウイルス感染認識における MDA5 の果たす役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
7. 岩崎正治、竹田誠、白銀勇太、中津祐一郎、中村崇規、柳雄介　麻疹ウイルス M タンパク質と N タンパク質の相互作用が粒子形成に果たす役割：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
8. Jian-bao Dong JB, 齋藤暁、駒瀬勝啓、中山哲夫、宮田博規、芳賀猛　Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to the fitness：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
9. 竹田誠、柳雄介　麻疹ウイルス：病原性発現の分子基盤：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
10. 白銀勇太、竹田誠、橋口隆生、田原舞乃、中村崇規、柳雄介　上皮間葉転換の誘導によって極性上皮細胞の麻疹ウイルスに対する感受性がなくなる：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
11. 橋口隆生、尾瀬農之、上敷領淳、竹田誠、前仲勝実、柳雄介　麻疹ウイルス H タンパク質と受容体 SLAM の複合体の結晶構造と麻疹ウイルスの細胞侵入機構：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
12. 光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺沢和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田（常次）恭子　HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互に及ぼす影響およびその機構の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
13. 酒匂幸、橋口隆生、竹田誠、柳雄介、前仲勝実　イヌジステンパーウイルス H タンパク質と受容体 SLAM との分子認識：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京 2009 年 10 月
14. 竹田誠、岡村晃資、白銀勇太、池亀聡、柳雄介　ワクシニアウイルスフリーの高効率麻疹ウイルス回収系：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月
15. 綾田稔、竹内薫、竹田誠、扇本真治、加藤誠、Luna Bhatta Sharma、石田博、田中美有、桑村充、小倉壽　SSPE 大阪 2 株の M、F、H 遺伝子をもつ麻疹ウイルスの作成とその性状：第 62 回日本細菌学会関西支部総会　大阪 2009 年 11 月
16. 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫　風疹ウイルス、野生株が温度感受性を獲得する必要条件：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009 年 10 月

17. 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓　風疹ウイルス遺伝子検出Real time PCR法の作製：第57回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
18. 加藤篤、永田志保、清谷克寛、久保田耐、坂口剛正　アクセサリー蛋白質VとCのセンダイウイルス増殖に及ぼす影響：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
19. 木所稔、駒瀬勝啓、TuulRenchin　モンゴル国内で分離された新規 genotype ムンプスウイルスの性状について：第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
20. 木所稔、齋加志津子、加藤　篤　リバースジェネティクスによって作製したムンプスウイルスの病原性復帰と遺伝的多様性との関連性に関する解析：第57回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
21. 久保田耐、松岡眞由美、張聡賢、加藤篤、尾里啓子　SUMO化修飾による宿主自然免疫応答の制御：第57回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
22. 松山州徳、田口文広　コロナウイルス感染過程における膜融合について：第61回日本細胞生物学会大会　名古屋　2009年6月
23. 白戸憲也、前嶋円、平井明香、松山州徳、網康至、川瀬みゆき、田口文広　ブタ流行性下痢ウイルス(PEDV)のマウス馴化株の分離と性状解析：第 148 回日本獣医学会学術集会　鳥取　2009年9月
24. 白戸憲也、松山州徳、川瀬みゆき、田口文広　膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 によるブタ流行性下痢ウイルス（PEDV）の細胞融合活性の誘導　第57回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
25. 平田明日美、水田克巳、五十嵐郁美、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代眞人　東北地域で分離されたライノウイルスの分子疫学：第50回日本臨床ウイルス学会　高知　2009年6月
26. 五十嵐郁美、水田克巳、大内好美、田中千香子、齋藤義弘、秋山美穂、木村博一、岡部信彦、野田雅博、田代眞人　最近検出されたヒトボカウイルス（HBoV）の分子疫学：第50回日本臨床ウイルス学会　高知　2009年6月
27. 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子　H5N1亜型トリインフルエンザウイルスHAに対する中和抗体エピトープ解析とその一本鎖抗体の作製：第57回日本ウイルス学会学術集会　東京　2009年10月
28. 安川開、押海裕之、竹田誠、石原直忠、柳雄介、瀬谷司、川畑俊一郎、小柴琢己　Mitofusin 2はミトコンドリアにおける抗ウイルス応答の調節因子として機能する：第32回日本分子生物学会　横浜　2009年12月

３．その他

1. 竹田誠　麻しん風しんなどの小児の発疹性感染症：第17回感染研市民セミナー　国立感染症研究所村山庁舎　2010年1月
2. Takeda M. Current progress in Japan toward elimination of measles. Measles laboratory diagnosis for the project of JICA Japan-China vaccine preventable diseases control project. Beijing, China. September 2009.
3. Takeda M. Virological and technical aspects in our battle against measles virus. Measles laboratory diagnosis for the project of JICA Japan-China vaccine preventable diseases control project. Beijing, China. September 2009.
4. Takeda M. Current progress towards measles elimination in Japan. The Third Japan-China-Korea Forum on Communicable Disease Control and Prevention. Tokyo, Japan. November 2009.

4．細菌第一部

部　長　渡邉　治雄

概　要：

平成21年度は、突然の新型インフルエンザH1N1pdmの発生に伴い、感染研が全所的に厚生労働省とともにその対策に携わることとなった。科学的側面からの対応として、検査体制や情報収集・分析体制等の強化が図られたが、その中で細菌第一部としては、従来の業務に加えて新型インフルエンザ H1N1pdm に関する全所的活動に対して積極的に支援を行った。検査対応チーム、疫学情報チーム等での一員としての活動に参加し、感染症対策強化の責務を担う国立研究機関としての立場を部員一同が再認識することとなる意義深い一年でもあった。

7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの任意接種が国内において平成 22 年２月より開始された。本ワクチンの検定検査業務の製剤担当部として、また肺炎球菌の病原体サーベイランスにおいても、より一層感染症制御のために果たすべき役割が高まった。

その他研究面においては、従来に引き続き細菌第一部の各室が担当する細菌(腸管出血性大腸菌、サルモネラ、赤痢菌、腸チフス菌、ビブリオ等の腸内細菌、レジオネラ、レンサ球菌、肺炎球菌、レプトスピラ、ボレリア、髄膜炎菌、淋菌、セラチア、梅毒スピロヘータ、口腔細菌等）の検査法の開発、分子疫学的手法の確立とその応用、薬剤耐性の疫学・耐性機序の解明、病原性因子の発現制御、菌と宿主との相互作用および感染過程の分子機構の解明を目指した研究を行った.

研究費としては、厚生労働省科学研究費として、新興・再興研究事業費、食品安全確保研究事業費、レギュラトリーサイエンス研究費、健康安全・危機管理対策総合研究事業、国際医療協力事業費、広域食中毒対策事業費を、加えて文部科学省科学研究費を含め、広範にわたり獲得し、それぞれの研究プロジェクトで貢献を果たした。

人材育成の面において、東京大学大学院および岐阜大学連合大学院との連携活動の一環として、本田尚子および高野愛の両名が博士号の取得をすることとなった。平成 20 年 4 月より、スウェーデン留学のため休職中の中尾龍馬は引き続き休職した。また、研究職員（任期付）であった、石原朋子（平成 21 年 6 月）および河原井武人（平成 22 年 3 月）が任期を終えた。石原は流動研究員として細菌第一部において研究活動を継続し、河原井は日本歯科大助教に就任した。

平成 21 年度日本細菌学会浅川賞を、細菌第一部の主な研究テーマである「病原細菌の病原性遺伝子群の発現調節と病因に関する研究」において渡邉治雄が受賞した。病原細菌が環境要因を感知し病原遺伝子の発現を巧妙に制御しそれが病原性の発現へと連なる過程の分子機構を解明したこと、およびその実際の臨床事例として劇症型レンサ球菌感染症の発症機序に菌の転写調節の破綻による病原性因子の強発現が関与している可能性を示唆した結果が認められてのことであった。これらの成果は多くの部員らおよび感染研内外の研究者らとの共同研究の集大成であった。3 月 31 日付で渡邉治雄は、22 年間［1988.4.1~2010.3.31;(2004.4.1~2010.3.31 は副所長兼任)］の部長職を退任し、4 月 1 日から所長に就任した。

業　績

調査・研究

I. 腸管感染症に関する研究

1. 腸管出血性大腸菌：EHEC（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）に関する研究

(1) 腸管出血性大腸菌の DNA 型別

ア PFGE による DNA 型別

2009 年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 0157 のうち 1606 株および 026, 0111 等を含むその他の血清型 616 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。2009 年分離の 0157 については、*Xba*I 消化により 829 種類の PFGE パターンが観察され、多様なクローンの存在が継続していることが示唆された。一方、多くの都府県（6～16 ヶ所）から分離されたパターンとして、Type No.(TN) c293, c47, c57, d654, d92, e241, e99 の 7 種類があった。これらの 7 種類のパターンを示す株は、*Bln*I 消化によってもそれぞれ大部分が同一パターンを示した。分離株の示す PFGE パターンが異なっているものの、例年に引き続いて広域に及ぶ同一

PFGE タイプの O157 による事例が発生していることが明らかになった。広域事例発生を早期に探知してその拡大を阻止し得る監視網の充実とともに原因究明に向けた対策が重要である。
［寺嶋　淳、斉藤康憲、吉田　愛、今泉綾子、鈴木麻子、高井信子、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、石原朋子、渡邉治雄］

イ　Multiple-Locus VNTR Analysis による解析

PFGE により TN c293, c47, c57, d654, d92, e241, e99 を示す腸管出血性大腸菌 O157 のうち、*BlnI* パターンが一致している株を Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法により 9 種類の遺伝子座について調べた。PFGE で同一パターンを示す株のなかでも、MLVA により複数の遺伝子座でリピート数が異なる株があったことから、遺伝学的に異なる株が存在することが示唆された。一方、PFGE に加え MLVA においてもすべての遺伝子座でリピート数が一致する株については、その遺伝子構成が極めて類似していることが示唆された。特にステーキチェーン A における広域発生事例では、TN e241 を示す株 39 株のうち、同一 MLVA タイプが 29 株あり、1 遺伝子座についてのみリピート数が異なる変異株が 10 株あった。ステーキチェーン A 関連株については、2 種類の制限酵素による PFGE パターンで 7 種類、MLVA で 9 種類に型別されたものの、大部分の株が同一の PFGE 及び MLVA タイプとなったことから、これらの株は、遺伝子構成が極めて類似し、関連性が高いことが示唆された。
［寺嶋　淳、斉藤康憲、吉田　愛、今泉綾子、鈴木麻子、高井信子、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、石原朋子、渡邉治雄］

ウ　PFGE によるデータベース構築とその解析結果利用のネットワーク化に関する研究

全国の地方衛生研究所等（地研）から送付された分離株について、PFGE 解析と解析結果のデータベース構築を継続した。腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE パターンのサブタイピングは、PFGE 解析ソフト（BioNumerics）によるデンドログラムに基づいて行った。菌株送付機関に対する解析結果の返信をメールで行うとともに、解析結果の一部は、ユーザ名とパスワード管理下で感染症研究所のサーバーを利用して「PulseNet Japan」(http://www0.nih.go.jp/~terajima/opn/index.html)で公開し、ほぼ１ヶ月おきにデータを更新した。また、全国 6 ブロックの代表となる地研に対して細菌第一部内に設置したサーバー(jpulsenet)へのアクセス権を設定し、サーバー内データベースへのアクセスによりデータ解析を行うシステムの構築を開始した。
［寺嶋　淳、鈴木麻子、今泉綾子、斉藤康憲、菱谷　愛、高井信子、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、石原朋子、渡邉治雄］

(2)血清型別

平成 21 年に送付されたヒト由来の STEC は 2,538 株で、分離頻度の高い順に O157（約 74%: H7 または H-），O26（約 15%: H11, H-など），O121（約 2.9%: H19, H-など），O103（約 1.9%：H2 など），O111（約 1.4%: H-など），O91（約 1.1%: H51, H-, H14, H21 など），O145（約 0.6%: H-など），O165（約 0.4%: H-）となっており、その他（約 2.7%）は少なくとも 20 の O 血清群（37 の血清型）に分類された。O121 と O165 は重症患者からの分離頻度が高い［伊豫田淳、高井信子、佐藤人美、寺嶋淳、泉谷秀昌、渡邉治雄］。

(3)病原性遺伝子群 LEE の発現制御に関する研究

腸管出血性大腸菌の多くが保有する病原性遺伝子領域 LEE は 3 型蛋白質輸送装置やこれを介して宿主細胞へ局在する作用因子などをコードしており、これらの機能は宿主細胞への強固な接着に必須である。LEE の発現は LEE 内部にコードされる Ler によって正に制御される。*ler* の転写は LEE 領域外に散在的にコードされる PchA, PchB, PchC によって正の制御を受ける。Pch は外部環境変化に応答して LEE の発現制御を行うマスターレギュレータとして機能していると考えられ、LEE の発現に特に重要な *pchA* と *pchB* の転写は LrhA による正の制御を受ける。

ア Ler によるエンテロヘモリシンの転写活性化機構の解析

LEE 内部にコードされる発現制御因子 GrlA は LEE だけでなく、エンテロヘモリシン（Ehx）遺伝子の転写活性化因子としても機能する。GrlA による LEE の活性化は Ler に依存する一方で、Ehx の活性化は Ler 非存在下でも起こる。Ehx の発現制御における Ler の役割について遺伝学的な解析を行ったところ、Ler も *ehx* の転写活性化因子として機能することが明らかとなり、この制御は GrlA 非存在下でも起こることが明らかとなった。すなわち、GrlA と Ler は独立に *ehx* の転写活性化因子として機能する［伊豫田淳、志牟田健、寺嶋淳、渡邉治雄］。

イ　LrhA による *pchA* の転写制御に必要な塩基配列の同定

LrhAに制御される*pchA*と制御されない*pchC*との転写調節領域の比較と、それぞれの点突然変異体を用いた解析から、*pchA*の転写開始点上流-49から-56塩基までのT-tract、および-58のAがLrhAによる制御に重要であることを明らかにした。このT-tractを構成するTの数は株間で7つまたは8つであるが、7つの*pchA*のみを保有する株の一つではLrhAによる発現制御が見られなかったことから、この配列がLEEの発現レベルを決定する要因の一つであることが示唆された［本田尚子（東大・院医・博士課程)、伊豫田淳、寺嶋淳、渡邉治雄]。

ウ　LrhAによるLEEとEhxの協調的発現制御機構

EHEC O157 Sakai株の*lrhA*欠損株では、野生株と比較してLEE全体の発現が低下するが、同時にEhxの活性も著しく低下していることを見出した。LrhAによるEhx発現の活性化は転写レベルで行われており、*grlA ler*の二重欠損株においても同様に起こることが明らかとなった。ゲルシフトアッセイから、LrhAとLerは*ehx*の転写調節領域に直接結合することが示された。以上の結果から、Ler, GrlAおよびLrhAはそれぞれ独立に*ehx*の転写を制御しているものと考えられる［伊豫田淳、本田尚子、佐藤人美、志牟田健、寺嶋淳、渡邉治雄]。

(4) 腸管出血性大腸菌のエフェクタータンパク質 Esp01の機能解析

Esp01(Esp01-1およびEsp01-2)は、下痢症細菌のエフェクタータンパク質と相同性を持ち、類似した機能を持つことが予想されるが、その役割については不明な点が残っている。機能解析を行った結果、Esp01はソンネ赤痢菌OspE2と同様に、感染上皮細胞の形態維持に働くことが明らかになった。また、Esp01は上皮細胞の細胞接着斑を増加させる能力や、宿主因子integrin-linked kinaseと結合する能力を持つことが明らかになった。しかしながら、Esp01-1とEsp01-2は感染細胞内における局在性や細胞接着斑の形成能力に相違が認められた。[石原朋子、伊豫田淳、寺嶋淳、泉谷秀昌、大西真、渡邉治雄]

2. サルモネラ属菌に関する研究

(1) ファージ型別

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

2009年に当研究所にファージ型別のために送付された*Salmonella*Enteritidisは、296株であった。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。解析された集団事例48件のファージ型(PT)の内訳としては、PT14bが12件（25%)、PT1が10件（23%)、RDNCが6件（13%)、PT6aおよび47が各5件（10%)、PT4および1が各4件（8%)、その他2件であった。[泉谷秀昌、寺嶋淳、李志英、高井信子、渡邉治雄]

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

2009年に当研究所にファージ型別のために送付された*Salmonella*Typhimuriumは、100株であった。多剤耐性菌としてはDT104が多く見られた。集団事例株が1件あり、これはRDNCであったが、患者由来8株および食材由来1株のファージ感受性パターンは一致した。[泉谷秀昌、寺嶋淳、李志英、高井信子、渡邉治雄]

スズメあるいはそれに付随する環境由来 *S.* Typhimuriumのファージ型別を行った。45株中35株がDT40であった。[泉谷秀昌、宇根有美（麻布大学)、加藤行男（麻布大学)、福井大祐（旭川市動物園)、李志英、高井信子、渡邉治雄]

ウ　チフス菌・パラチフスA菌のファージ型別

2009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・パラチフスA菌についてファージ型別試験を行った。送付された菌株数はチフス菌24株、パラチフスA菌16株であり、例年と比べてチフス菌が減少した。チフス菌では、ファージ型E1が多く、その他にはA、B1、D2、E9、M1等が検出された。パラチフスA菌ではファージ型1が多数を占めた。[森田昌知、泉谷秀昌、高井信子、渡邉治雄]

(2)　サルモネラ属菌の血清型別

2009年に依頼、送付された13株について血清型別をおこなった。検出された血清型は、Poona 11株, Cotham 1株, I Rough:z4,z23:- 1株であった。なお、Poona11株中１０株は保育園における集団事例由来であった。[泉谷秀昌、李志英、高井信子、渡邉治雄]

(3) 各種抗菌薬に対する感受性試験

ア　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

2009年に国内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系及び第3世代セフェム系抗菌薬等に対する感受性を検討した。ニューキノロン系薬剤3薬剤、第3世代セフェム系薬剤2剤、その他に従来の治療薬等合計16剤を用いた。感受性試験の結果、チフス菌で70.8%、

パラチフス A 菌で 75.0%がニューキノロン低感受性であった。また、ニューキノロン系薬剤に耐性を示すチフス菌が 1 株検出された。[森田昌知、泉谷秀昌、高井信子、渡邉治雄]

(4) サルモネラ属細菌の病原性に関する研究

ア　サルモネラ SPI-2 の *ssrAB* 非依存的な発現制御機構の解析

サルモネラの細胞内増殖に必須な SPI-2 遺伝子群の発現には global regulator *ssrAB* が必須とされてきたが、最近の報告では最小培地、低 pH 条件での SPI-2 遺伝子の 1 つ *ssaB* の発現誘導が *ssrAB* 欠損下でも起こるなど別の発現制御もあることが報告されている。そこで、*ssrAB* 欠損下で *ssaB* 発現が増大または減少する変異株をトランスポゾンによる random mutagenesis でスクリーニングした。既知のもの以外に *fre* 及び *nuo* の欠損株をいずれも *ssaB* 発現が増大する変異株として同定した。*fre*、*nuo* とも酸化還元酵素であり、いかなるメカニズムで *ssaB* 発現を抑制するのか、の解明が今後の課題である。[中山周一、渡邉治雄]

3. 赤痢菌に関する研究

(1) 赤痢菌の DNA 型別

2009 年に依頼、送付された赤痢菌 110 株についてパルスフィールドゲル電気泳動法および multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)による遺伝子型別を行った。PFGE で使用した制限酵素は *Xba*I であった。多くは海外渡航歴のある患者由来株であったが、MLVA では、ツアー集団、家族内感染など、ほぼ事例ごとに異なるタイプが得られた。中には渡航歴の無い散発事例で遺伝子型がほぼ一致するものも数株あったが、原因究明には至らなかった。*Shigella sonnei* については MLVA による遺伝子型別を実際の分離菌株に適用することが妥当であろうと考えられた。[泉谷秀昌、寺嶋淳、李志英、高井信子、石原朋子、渡邉治雄]

(2) 赤痢菌の病原因子の発現制御に関する研究

ア　赤痢菌の Type III 分泌装置発現の転写後調節機構の解析

赤痢菌の細胞侵入に必須な Type III 分泌装置は、温度と塩濃度によって発現が厳密に制御される。一連の研究はアクチベーターである InvE 蛋白が、細菌の主要な RNA 結合蛋白である Hfq 蛋白を介して発現調節される機構を明らかにした。また、Type III 分泌装置発現に関わる因子として遺伝的に同定された YfgA の欠損株を作製したところ、Hfq 欠損株と同様に、翻訳レベルで InvE 発現が増加し、温度による制御が消失していることが示された。mRNA の分解を比較したところ、*yfgA* 変異体では *invE*-mRNA が安定化していることが示され、精製した YfgA 蛋白は invE-RNA と強く結合した。YfgA は近年、細胞骨格蛋白 RodZ として同定されており、以上の解析は RodZ の細胞骨格以外の機能としての RNA 結合能を明らかにした。[三戸部治郎、渡邉治雄]

４．ビブリオ属およびアエロモナス属細菌に関する研究

(1) *Vibrionaceae* および *Aeromonadaceae* 菌株の同定ならびに血清型別

平成 21 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 26 株で *Vibrio cholerae*、*V. mimicus*、*V. parahaemolyticus* および *Aeromonas* spp. が含まれ、26.9%(7)は国外（タイ-7）から依頼された。タイからの依頼株は、タイにおける細菌同定の精度管理のための確認同定であった。国内株 19 株は 15 株が *V. parahaemolyticus* で、市販貝類や沿岸海水から分離されたものであった。2 株の *V. cholerae* non-01, non-0139 は海水から分離されたものであった。また、国内株 2 株の *V. mimicus* については、胃腸炎患者の血液および腹水から分離されたものであった。該菌は *V. parahaemolyticus* の主要な病原因子である耐熱性溶血毒(TDH)をコードする遺伝子が PCR によって検出された。*V. mimicus* による胃腸炎症状はこの TDH によるものと示唆された。[荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌]

(2) ビブリオ属菌の環境調査

熊本県沿岸部から海水を採取し、*Vibrio vulnificus, V. parahaemolyticus, V. cholerae* の分布状況を調べた。いずれの菌種も、水温、塩分濃度などの環境要因によって、それぞれ異なる程度で、海水中に含まれる菌量が変化した。また、分離菌株の *atpA* 遺伝子を解析し、これらを鑑別する PCR を開発、検討中である。[泉谷秀昌、森田昌知、八尋俊輔（熊本県保健環境科学研究所)、松本一俊（熊本県保健環境科学研究所)、渡邉治雄]

(3) 新規検査系および疫学マーカーの開発

ア　変異エルトール型コレラ菌の新規疫学マーカーの開発

菌株間に遺伝的多様性のある変異エルトール型コレラ菌の新規疫学マーカーを開発するため、変異エルトール型コレラ菌のゲノムシーケンスを行った。その結果、典

型的なエルトール型コレラ菌には存在しない約28kbからなる特異配列を同定した。この配列を標的とすることで、特定地域由来のコレラ菌について、変異エルトール型と典型的なエルトール型を区別することができた。［森田昌知、泉谷秀昌、荒川英二、山本章治、大西 真、黒田 誠（病原体ゲノム解析研究センター）、関塚剛史（病原体ゲノム解析研究センター）渡邉治雄］

イ　*V. parahaemolyticus* の食品からの迅速検査法に関する研究

腸炎ビブリオの食品からの検査法について、現行の標準試験法では成績が出るまでに 3-4 日かかり、消費するまでの時間からすると、生食用魚介類では実用的とは言い難い。*Vibrio* 属菌はその生化学的性状が非常に類似しており、分離、同定に複数の試験が必要であり、そのために検査に時間がかかる。(株)日本ハムとの共同研究で、腸炎ビブリオを特異的に検出するイムノクロマトキットの開発を行っている。参照菌株や類縁菌を材料として、増菌培養液を少量キットと反応させることで、複雑な操作や機器を用いなくても、極めて短時間に腸炎ビブリオを検出することが可能であった。異なる血清型菌においても良好な成績が得られた。[荒川英二；米北太郎、藤村達也、松本貴之、森松文毅(日本ハム)、磯部順子(富山県衛生研究所)、緒方喜久代(大分県衛生環境研究センター)、宮原美知子(国立衛研)]

ウ　*V. cholerae* の LPS 合成遺伝子領域の解析および比較

V. cholerae の O 血清群は現在 210 種類ある。その中にはコレラの原因菌である O1、O139 も含まれており、世界的に疫学解析に利用されている。いわゆる NAG と呼ばれる non-O1、non-O139 の一部にはコレラ毒素を産生するものがあり、近年我が国や米国で分離された O141 では、コレラ様の激しい下痢症状も認められる。また、O141 は O75 や O53 と交差反応が認められる。これらを遺伝子レベルで解析、比較することで、その近似性や差異を求め、遺伝子による検出系へと応用が可能になるものと考えられる。
［荒川英二］

(4) 菌種内多様性形成機構の解析

ア　コレラ菌における *tfoX* 遺伝子の活性化機構

コレラ菌は，キチン（$(GlcNAc)_n$）存在下で形質転換能を示すことが知られており、その誘導にはアクティベーター遺伝子 *tfoX* が必要とされる。キチンが存在すると *tfoX* の発現が上昇し、産生された蛋白質が DNA 取り込み装置の構造遺伝子群を活性化する。本研究は、コレラ菌におけるキチン依存性の *tfoX* 活性化機構を明らかにする目的で行われた。その結果、1) キチン二量体$(GlcNAc)_2$が形質転換を誘導するための最小単位であること、2) $(GlcNAc)_2$による形質転換の誘導は、*tfoX* の転写・翻訳両方の活性化を介していること、が明らかになった。現在、$(GlcNAc)_2$による *tfoX* の転写・翻訳制御機構について解析中である［山本章治、森田昌知、泉谷秀昌、渡邉治雄］。

(5) 旅行者下痢症の微生物学的検討

海外渡航者の下痢症の原因を探索するため、糞便を対象に微生物検索を行った。2009 年度に検査した 5 件中 4 件において何らかの病原性を疑う微生物が検出された。検出された微生物は、*Shigella sonnei*, ETEC (*lt*+), EPEC (*eae*+), EAEC (*aggR*+)であった。［泉谷秀昌、高井信子、加藤康幸（国立国際医療センター）、渡邉治雄］

II. レンサ球菌感染症に関する研究

1. 肺炎球菌に関する研究

(1) 肺炎球菌の型別および薬剤感受性試験

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（ワクチン有用性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究）の協力研究者として 9 県の小児の無菌検体より分離された肺炎球菌の血清型別、薬剤感受性試験、シークエンスタイピングを行った。[常彬、和田昭仁、神谷斉(国立病院機構三重病院)、荒川宜親(細菌第二部)、宮村達男（所長)]

(2) 薬剤耐性機構に関する研究

テリスロマイシン低感受性肺炎球菌の耐性機構の解析を行った。[山本友子（千葉大学大学院)、和田昭仁]

(3) 非ムコイドとムコイド型肺炎球菌の比較研究

同一患者より分離された同じ血清型と遺伝子型を持つ非ムコイドとムコイド型肺炎球菌の比較を行った。本年度、肺炎球菌の莢膜をコードする遺伝子群の塩基配列を決定した［常彬、和田昭仁］。

2. *Streptococcus gallolyticus* に関する研究

Streptococcus gallolyticus subsp. *pasteurianus* による新生児髄膜炎の症例報告を行った。[小野山さがの（福岡赤十字病院，現 九州大学病院)、岡田賢司（福岡

病院)、和田昭仁]

3. A群レンサ球菌関する研究

(1) A群レンサ球菌の型別解析

ア 非侵襲性A群レンサ球菌感染症患者分離株のT型別

2008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、1383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、T12 (562/1383, 40.6%)、T4 (174/1383, 12.6%)、T1 (153/1383, 11.1%)、T25 (124/1383, 9.0%)、T28 (95/1383, 6.9%)であった。T12、T4、T1型は1992年以降、毎年、高い分離頻度を示している。T25型の分離比率は、2007年と比較して急激に上昇した(2007年, 2.7%、2008年, 9.0%)。T28型は、2000年以降、6.5-8.5%の比率で分離されている。[池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、小黒祐子(福島衛研)、大屋日登美(神奈川衛研)、奥野ルミ(東京都健康安全研究センター)、嶋智子(富山衛研)、勝川千尋(大阪公衛研)、富永潔(山口環境保健センター)、緒方喜久代(大分衛生環境研究センター)、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan]

イ 劇症型A群レンサ球菌感染症患者分離株のT型と非侵襲性患者分離株とのT型の比較

2008年、34症例報告があり、そのうち32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。TSLSの確定診断例ではT1型は32例中14例(43.8%)で、咽頭炎由来株の分離比率(11.1%)に比べ、依然高い分離比率を示している。一方、T12およびT4型は32例中それぞれ0および2例で、咽頭炎由来株の分離比率(T12, 40.6%; T4, 12.6%)に比べ、低い分離比率を示している。[池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、小黒祐子(福島衛研)、大屋日登美(神奈川衛研)、奥野ルミ(東京都健康安全研究センター)、嶋智子(富山衛研)、勝川千尋(大阪公衛研)、富永潔(山口環境保健センター)、緒方喜久代(大分衛生環境研究センター)、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan]

ウ 劇症型A群レンサ球菌感染症患者分離株の*emm*遺伝子型とT型の比較

T1分離株14例の*emm*遺伝子は、すべて*emm1*型であり、M血清型別でもすべてM1型であった。T28分離株6例は、*emm28*型が5例(M28型1例、型別不能4例)、*emm58*型が1例(M型別不能)であった。T3分離株3例の*emm*遺伝子は、すべて*emm3*型で、M血清型別でもすべてM3型であった。T4分離株2例は、すべて*emm4*(M4)型であった。2例で分離されたT11型の*emm*遺伝子は、それぞれ*emm89*型, *emm112*型(ともにM血清型別は型別不能)であった。TB3264分離株2例の*emm*遺伝子型は、1例が*emm41*型、もう1例が*emm89*型であった。1例ずつ分離されたT6, T25型株の*emm*型は、それぞれ*emm6*(M型別不能), *emm75*(M型別不能)であった。T型別不能株1株の*emm*型は、*emm49*(M型別不能)であった。[池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、小黒祐子(福島衛研)、大屋日登美(神奈川衛研)、奥野ルミ(東京都健康安全研究センター)、嶋智子(富山衛研)、勝川千尋(大阪公衛研)、富永潔(山口環境保健センター)、緒方喜久代(大分衛生環境研究センター)、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan]

(2) 日本における劇症型/重症A群レンサ球菌感染症の薬剤感受性試験

2008年に発症した劇症型/重症A群レンサ球菌感染症を引き起こした46株について薬剤感受性試験を行った。エリスロマイシンに対し、39.1%の株が、耐性を示し、昨年より比率が上昇していた。また、クリンダマイシン、に対し、6.5%の株が、耐性を示した。シプロフロキサシンに対し、4.3%が低感受性、2.2%が耐性を示した。一方、ペニシリンG、アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、イミペネム、パニペネムに対して感受性を示した。[池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、小黒祐子(福島衛研)、大屋日登美(神奈川衛研)、奥野ルミ(東京都健康安全研究センター)、嶋智子(富山衛研)、勝川千尋(大阪公衛研)、富永潔(山口環境保健センター)、緒方喜久代(大分衛生環境研究センター)、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan]

(3) 劇症型A群レンサ球菌感染症の分子機構の解析

劇症型A群レンサ球菌感染症患者分離株において、*csrS, csrR*遺伝子に高頻度に変異がみられることを見出した。そのほかに*rgg*遺伝子に変異を持つ株があることを比較ゲノムシークエンスにより見出した。マウスを用いた動物実験において、*rgg*変異株は、変異のない株と比較して致死性が高いことが判明した。また、好中球への殺傷能も高いことを示した。*csrS/csrR, rgg*が病原性に強く関与していること、また*csrS/csrR, rgg*変異が劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株で有意に多く分離されていることから、本因子が劇症型発症に関与している可能性が強く示唆された。[池辺忠義、渡邉治雄;阿戸学、松村隆之、小林和夫(免疫部)、長谷川秀樹、佐多徹太郎(感染病理部)]

4. G 群レンサ球菌に関する研究

(1) 劇症型 G 群レンサ球菌感染症のサーベイランスと起因株の遺伝子型別

2008 年、7 症例報告があり、すべて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。これら劇症型感染症患者分離株の *emm* 遺伝子型を行った結果、*stg245* 型が 2 例、*stg485, stg2078, stg4974, stg5420, stg6792* 型がそれぞれ 1 例であった。[池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、小黒祐子（福島衛研)、大屋日登美（神奈川衛研)、奥野ルミ（東京都健康安全研究センター)、嶋智子（富山衛研)、勝川千尋（大阪公衛研)、富永潔（山口環境保健センター)、緒方喜久代（大分衛生環境研究センター)、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan]

III. 院内感染症に関する研究

プロスタグランジン製剤による肺高血圧症治療中の患者さんに見られた *Micrococcus luteus* による菌血症が、特定の感染源によるものであるかどうかの解析を行った。[平田義徳（国立循環器病センター)、和田昭仁、森兼啓太（感染症情報センター, 現 東北大学医学形研究科)、岡部信彦（感染症情報センター)]

IV. レジオネラ症に関する研究

1. *Legionella pneumophila* の型別

(1) SBT (sequence-based typing) 法による解析

ア　環境分離株の解析

L. pneumophila 血清群 1 の土壌分離株 35 株について型別を行ったところ、12 種類の遺伝子型 (ST) に分かれた。昨年度行った浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株については、各々28 種類、6 種類に分かれたので、浴槽水、土壌、冷却塔水分離株の順に多様性が高いことが分かった。共通の ST は各々の間で 1 種類ずつしかなく、生息域により ST の分布が異なることが示された。[前川純子、菊川紀世己(埼玉県立大学、健康開発学科)、倉　文明、常　彬、村井美代（埼玉県立大学、健康開発学科)、古畑勝則（麻布大学、環境保健学部)、渡邉治雄]

イ　臨床分離株の解析

レジオネラ・レファレンスセンターで新たに収集した *L. pneumophila* 63 株（分離年は 2004 年から 2009 年）について型別を行った。以前の結果もあわせて臨床分離株 149 株は 96 種類の遺伝子型 (ST) に分けられ、本法の有用性が確認できた。臨床分離株と共通の ST は浴槽水分離株で 6 種類だったが、冷却塔水分離株で 1 種類、土壌分離株では 2 種類だった。欧米では給湯水や、冷却塔水からのレジオネラ感染が多いが、日本では入浴施設が主要な感染源となっている。日本では欧米に比べて臨床分離株の ST の多様性が高いことがわかったが、それは、欧米とは異なる感染源である浴槽水からの分離株の多様性を反映している可能性がある。[前川純子、倉　文明、常　彬、渡邉治雄、金子紀子（山形衛研)、渡辺祐子（神奈川衛研)、磯部順子（富山衛研)、貫名正文（神戸市環境保健研)、中嶋　洋（岡山県環境保健センター)、河野喜美子(宮崎県衛生環境研)、多田有希(感染症情報センター)]

(2)モノクローナル抗体 (MAb) 型の解析

ア　環境分離株の解析

L. pneumophila 血清群 1 の土壌分離株 35 株について 6 種の MAb による型別を行った。本型別により血清群 1 の菌は 9 種類のサブグループに分けられる。土壌分離株 35 株は 6 種類の MAb 型に型別された。このうち OLDA が 18 株(51.4%)で、Bellingham が 11 株(31.4%)を占めた。昨年度行った浴槽水分離株 40 株、冷却塔水分離株 48 株については、浴槽水分離株は 9 種類すべての MAb 型に分かれ、最も多かったのは Bellingham (42%) だった。冷却塔水分離株は 4 つの型のみで Oxford が 73%を占めた。由来により MAb 型の分布は全て異なることがわかった。[前川純子、Jürgen H. Helbig (ドレスデン工科大学)、倉　文明、常　彬、古畑勝則（麻布大学、環境保健学部)、渡邉治雄]

イ　臨床分離株の解析

遺伝子型別を行った臨床分離株 149 株の血清群の内訳は、血清群 1 が 123 株、2 が 4 株、3 が 7 株、4 が 3 株、5 が 7 株、6 が 3 株、9 が 2 株であった。血清群 1 の 123 株について MAb 型別を行った。7 種類の MAb 型に分かれ、最も多かったのは Benidorm (48%) で、環境分離株とは MAb 型の分布が異なっており、環境分離株の一部が感染すると考えられた。[前川純子、Jürgen H. Helbig（ドレスデン工科大学)、倉　文明、常　彬、渡邉治雄、金子紀子（山形衛研)、渡辺祐子（神奈川衛研)、磯部順子（富山衛研)、貫名正文（神戸市環境保健研)、中嶋　洋（岡山県環境保健センター)、河野喜美子(宮崎県衛生環境研)、多田有希（感染症情報センター）]

2.　レジオネラ属細菌の検査法の開発に関する研究

(1)　単離／菌数定量化法の開発

ア　浴槽水からのレジオネラの単離および定量化におけ

る免疫磁気分離法の評価

感染源が確定あるいは推測される日本のレジオネラ症のほとんどは、浴槽水が原因であると考えられている。浴槽水の濃縮は、レジオネラ症防止指針に記載されているろ過法で通常行われているが、レジオネラ以外の環境微生物が多い検体の場合には分離、計数が困難な場合がある。そこで、種々の泉質の温泉由来の浴槽水等 191 検体について、従来法（ろ過法）と、新規の免疫磁気分離法（immunomagnetic separation：IMS、Dynabeads MAX Legionella Kit）の濃縮方法について比較検討した。浴槽水 45mL に 10X 緩衝液 5mL とビーズ 0.15mL を加え、ミキサーで 1 時間混合した。磁石でビーズを回収後、1 回洗浄して GVPC 寒天培地に接種した。IMS 法はろ過法に比べ、感度は 78.3%、特異性は 94.7%となった。7 検体が免疫磁気分離法で検出、ろ過法非検出となったが、逆に 13 検体がろ過法で検出、免疫磁気分離法で非検出となった。IMS 法による雑菌除去の効果をみるために、従属栄養細菌を添加した *L. pneumophila* SG1 菌液を免疫磁気分離法で濃縮した場合、従属栄養細菌は追加洗浄無しで 92 cfu/plate のところ、追加洗浄 2 回で非検出になった。IMS 法は、ろ過法とほぼ同等の検出結果であったが、レジオネラ属菌以外の微生物の多い検体ではより有効であると考えられる。[荒井桂子（横浜市衛研）、磯部順子（富山衛研）、中嶋 洋（岡山県環境保健センター）、渡辺祐子（神奈川衛研）、佐々木美江（宮城県仙南・ 仙塩広域水道事務所）森本 洋（北海道立衛研）、緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）；常 彬、前川 純子、渡邉 治雄、倉 文明]

イ　液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR を用いたレジオネラ属菌迅速検査法の検討

簡便、迅速で定量性に優れたレジオネラ属菌の生菌検出法、液体培養（Liquid Culture）定量 RT-PCR 法（LC qRT-PCR）を開発した。濃縮試料を液体培地で培養し生菌の rRNA を増幅させ、これまでに開発したレジオネラのリボソーム RNA を鋳型として検出する高感度な定量 RT-PCR 法（qRT-PCR）と組み合わせた。通常の培養法に用いる酸処理検体をレジオネラ液体培地に加えて 1 夜培養すると、rRNA 量は 100 倍に増加した。培養液の一部を酵素溶解して精製操作なしに希釈するだけの簡便な操作で、鋳型調製を行うことが可能であった。本法で得られた定量値は、50～10^5 CFU/100ml の範囲で培養法と極めて高い相関（R^2=0.866）を示した。培養法に代わる生菌迅速検査法として活用が期待された。[烏谷竜哉、浅野由紀子（愛媛県立衛生環境研）、泉山信司（寄生動物部）、遠藤卓郎、倉　文明]

ウ　Ethidium monoazide または propidium monoazide 処理と Real-time PCR のコンビネーションによって環境水からレジオネラ生菌のみの定量解析

レジオネラ属菌は人工的水利用設備に生息する細菌捕食性原虫の中で増殖してヒトに感染する。レジオネラ感染を予防するため、これらの水利用設備は定期的に清掃、消毒、培養検査が行われている。環境や患者由来検体よりレジオネラを検出するには 4-7 日がかかるため、迅速検出法の開発が求められている。Ethidium monoazide（EMA）と propidium monoazide（PMA）は特異的に死菌の損傷した細胞膜を透過し、その菌の染色体 DNA に結合し、PCR 増幅を抑制できる。我々はこの特性を利用し、EMA 処理と 16S rDNA をターゲットとする real-time PCR により環境水からレジオネラの生菌のみを迅速に検出できることを報告した。しかし、一部の検体では EMA が生菌の DNA に結合し、PCR 増幅を抑制することが見られた。PMA はリステリア菌の検出では、生菌の PCR 増幅への抑制作用が少ないと報告された。我々は PMA 処理と real-time PCR のコンビネーションによって環境水からレジオネラ生菌のみの定量解析を行い、EMA 処理の結果と比較した。その結果、PMA は EMA と同様に、環境水中のレジオネラ死菌由来 DNA の PCR 増幅を抑制できたが、必要な量は EMA の約 4 倍であり、高価であった。また、生菌の DNA に結合し、PCR 増幅を抑制することが改善されなかった。以上の結果から、環境水からレジオネラ生菌のみを定量するには、EMA 処理は PMA に比べて、経済的、実用的であった。[常彬、前川純子、倉文明]

エ　迅速検査用阻害回避試薬の変更対応

レジオネラ属菌の遺伝子迅速検査法は培養試験法に比べて短時間に結果が得られることから期待が寄せられているが、環境試料の遺伝子検査は阻害物質による偽陰性が問題となる。これまでに阻害回避試薬とアルカリ熱抽出による簡易抽出法の感度等向上を報告したが、昨年度に使用した阻害回避試薬が変更され、同じ試薬が将来的に入手できなくなることが予定された。当該研究では新しい試薬が昨年度と同等の性能を発揮するものか比較検討を行い、併せて阻害回避試薬の機能を改めて検証した。依頼検体として持ち込まれた不特定多数の浴槽水からアルカリ熱抽出法のみの場合と、新旧の反応阻害回避試薬を用いての鋳型調製を行い、LAMP 反応の結果を比較した。アルカリ熱抽出法を基準として阻害回避試薬使用で反応が陽転、感度向上を意味する Tt 値の短縮が複数認められ

たが、新旧に差はなかった。このことはTt値の平均値からも理解でき、アルカリ熱抽出のみでは1603秒、旧版では1448秒、新版では1371秒と、阻害回避試薬の効果によるTt値の短縮（感度向上）が認められた。環境試料における迅速検査において、阻害が予想される試料に対して反応阻害回避試薬の利用が推奨された。[泉山信司（寄生動物部）、猪又明子（東京都健康安全研究センター）、安中敏光（栄研化学（株））、遠藤卓郎、倉　文明]

(2)　レジオネラ属細菌同定法の開発

ア　市販のDDHキットと自家製プレートの組み合わせによるレジオネラ属菌の同定試験

L. busanensis、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana*の6菌種6株を固相させた自家製プレートと市販DDHキット内の25菌種同定可能プレートとの組み合わせによるDDH試験をおこなった。いずれの菌種も基準株が固着されている箇所の発色がもっとも強く２番目に発色した箇所との相対類似度が70%以下という判定基準を満たし、肉眼的にみても菌種同定が可能であった。[山崎利雄・前川純子・倉文明]

イ　自家製プレートを用いたDDH法によるレジオネラ属菌種の同定

市販のDDHキットと塩基配列決定法でも同定不能であった環境分離菌11株の自家製プレートを用いたDDH法の結果は、*L. busanensis*　6株、*L. gresilensis*　1株、*L. quinlivanii*　1株、同定不能3株であった。塩基配列決定法で複数菌種名に一致率が高く、同定不能とされた株であってもDDH法では明確に同定された。一致率が比較的低かった3株は、DDH法でも同定できなかった。また、市販のDDHキットでは同定不能で、16S rRNA遺伝子のDNA塩基配列決定法では、同定可能であった環境分離菌13株について、自家製プレートを用いてDDH法を行った結果は、*L. londiniensis* 11株、*L. nautarum* 2株と同定された。[山崎利雄・前川純子・倉文明]

(3) 外部精度管理方法の確立

ア　ゼラチン・ディスク配付による菌数測定の外部精度管理

レジオネラ属菌の検査における精度管理方法を確立するため、平成19年度から21年度の3年間にわたり、19年度は地研5機関、20年度は同様に8機関、21年度は地研に民間検査機関を加えた30機関の協力のもと、ゼラチン・ディスク法による試料の配付方法を評価するとともに、濃度の異なる2種類の試料を用い、外部精度管理の試行を行った。回収率等の調査結果からは、ゼラチン・ディスク法の実用性についての問題は認められなかった。また、濃縮法と酸･加熱処理法の各検査工程の比較検討結果によれば、濃縮法についてはろ過法と冷却遠心法で、回収率に大きな差は認められなかったが、処理工程については加熱処理法に比べ酸処理法が高い回収率を示した。なお、測定結果の集計に当たっては、HPAに準じて中央値と6%～94%の範囲を良好範囲として評価したところ、2種類の濃度のうち、低い濃度の場合65.9%、高い濃度の場合81.8%の測定結果が良好範囲となった。[渡辺祐子（神奈川衛研）、緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）、杉山寛治（静岡県環境衛生科学研）、田栗利紹（長崎県環境保健研究センター）、中嶋　洋（岡山県環境保健センター）、森本　洋（北海道立衛生研）、磯部順子（富山衛研）、猪又明子（東京都健康安全研究センター）、烏谷竜哉（愛媛県立衛生環境研）、矢崎知子（宮城県保健環境センター）；倉　文明]

3. レジオネラ属細菌の消毒に関する研究

(1)　モノクロラミンの不活化作用

結合塩素として作用する消毒薬であるモノクロラミンについて、レジオネラ属菌に対する殺菌作用を検索した。pH7.7およびpH8.8の緩衝液にレジオネラ属菌17種21株をそれぞれ浮遊させ、約3 mg/Lのモノクロラミンで40℃ 15分間処理して採取したところ、BCYEα培地上のコロニーは非検出となった（菌種により対数2.40-5.46の減少）。15分間の実験期間中、全残留塩素の減少は10.3%以下であった。[倉　文明、前川純子、遠藤卓郎、渡邉治雄；泉山信司（寄生動物部）]

4. 浴槽水関連レジオネラ症と菌濃度

76の地衛研にアンケートを送付して、レジオネラ症の発症と浴槽水の菌濃度との関係を調査した。35の地衛研の96症例を評価した。年齢の中央値は67歳で、基礎疾患としては糖尿病が一番多く次いで高血圧だった。菌数は100mLあたり10ー160,000 CFUで、その内10例は患者及び環境からの分離株のPFGEにより感染源が特定され、菌濃度は90ー140,000 CFU/100mLだった。浴槽水の管理基準、不検出（検出感度10 CFU/100mL）は妥当であった。国内事例の文献学的考察も行った。[黒木俊郎、石原ともえ、伊東久美子（神奈川衛研）；倉　文明]

5. 稀なレジオネラ感染事例

L. feeleii SG1、*L. longbeachae* SG2、*L. pneumophila*

(Lp) SG15 の培養陽性レジオネラ症の症例が、今年度に異なる県で発症した。こられの症例は、それぞれこれまで日本で報告されていない。*L. feeleii* SG1、*L. longbeachae* SG2 はレジオネラ・レファレンスセンターでデンカ生研に委託して作製した免疫血清により血清群が特定された。Lp SG15 の菌株は、デンカ生研のレジオネラ免疫血清ニューモフィラ 15 群に弱く反応し、Lp SG15に特異的なMAbで確定された世界的にも稀な事例であった。[倉　文明、前川純子、渡邉治雄；Helbig JH（ドレスデン工科大学)]

V. 節足動物媒介細菌感染症に関する研究

1. ボレリア属細菌に関する研究

(1) ボレリアのマダニ体内動態に関する分子生物学的研究

ボレリア属細菌はマダニ媒介性のスピロヘータである。ボレリアは吸血によってマダニ中腸へ取り込まれるが、その後、マダニ中腸に生着、マダニ体腔内循環を経て唾液腺に侵入することでその伝播サイクルを成立させている。とくに経ステージ感染に必須と考えられる、マダニ中腸上皮細胞への接着と、宿主へのエントリーの直前段階である吸血時のマダニ唾液腺へのボレリア侵入はその伝播サイクルを成立させる上で極めて重要なステップであるが、その現象を説明するための分子生物学的解析はほとんど行われていない。本研究ではそれぞれのステップに必須なボレリア因子の同定とその機能解析を最終目的として、以下研究成果を得た。

(i)シュルツェマダニ唾液腺へのボレリア接着因子として、国内分離のライム病病原体であるボレリア・ガリニゲノムから機能未同定の遺伝子を複数検出した。表層抗原であるBB0616ホモログは､マダニ唾液腺への接着に関与していると思われる。一方、その機能ドメイン、接着リガンドなどは未同定である。

(ii)国内分離ボレリアのマダニ中腸への接着性についても検討を行った。ボレリアの中腸組織への接着は、未吸血マダニ中腸組織で見出された。また、接着阻害実験に用いた細胞間マトリックスの一部は、その接着を阻害したことから、これら宿主分子に対する接着性がボレリアの中腸生着に関与している可能性が示された。現在、これらボレリアの接着因子の同定を試みている。川端寛樹、高野愛、渡邉治雄、岡村麻生（西表野生生物保護センター)､藤田博己(大原研究所)､角坂照貴(愛知医科大学)、今内覚（北海道大)、田島朋子（大阪府大）

(2) 国内生態系内で新たに見出された回帰熱群ボレリアに関する調査研究

平成21年度までの３年度に渡って，国内生態系，特に野生鳥類生態系による病原体拡散に関するリスク評価のための基礎データ収集を全国規模で行った．この調査研究の過程で，新規に回帰熱病原体類縁のボレリアを見出したのでその生体リスクに関する評価を行った．本ボレリアは，(i)housekeeping 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果から，北米で回帰熱病原体として見出される *Borrelia turicatae, B. parkeri* と類縁であること，(ii)国内棲息の鳥類寄生マダニであるサワイカズキダニが媒介ベクターである可能性が高いことを明らかとした．回帰熱群ボレリアの国内侵入が初めて明らかになったことで，今後そのリスク評価とサーベイランスの強化が重要であると思われる．[川端寛樹、武藤麻紀、高野愛、小笠原由美子、渡邉治雄（細菌第一部)、阿戸学、渡辺恵理（免疫部)、藤田博己（大原研究所)、大橋典男（静岡県立大学)、坂田明子、安藤秀二、花岡希、倉根一郎（ウイルス１部)、鶴見みや古、仲間昇、佐藤文男、尾崎清明(山階鳥類研究所)]

2. ペスト菌に関する研究

(1) ペスト菌 F1 antigen 及び V antigen に対するポリクローナル抗体を用いた間接抗体法によるペスト菌の迅速検出法の開発

昨年に引き続きペスト菌の主要抗原である F1 antigen さらにV antigenをターゲットとした抗原抗体反応を利用したペスト菌の迅速検出法の開発を試みた。本年度はF1 antigen の合成ペプチドそして精製F1 antigenを抗原としたウサギ血清を作製し、さらにその血清をさらに吸収した血清も作製して間接抗体法（Indirect Fluorescent Antibody、以下IFA)によりペスト菌を検出する方法を検討した。ペスト菌に対してよく反応したが、ペスト菌の類縁菌である *Y. pseudotuberuculosis* への交差反応も強く、ペスト菌を特異的に検出する抗体として使用不可能であると判断された。一方で、ペスト菌をウサギで免疫した抗ペスト菌ウサギ血清、それを F1 antigen を発現しないペスト菌で吸収した吸収抗ペスト菌ウサギ血清、さらに精製 F1 antigen を免疫した抗精製F1ウサギ血清を用いたIFAも検討し､吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗精製 F1 ウサギ血清は *Y. pseudotuberuculosis* 及び *Y. enterocolitica* への非常に弱い交差反応が認められたもののペスト菌に対して非常に強い蛍光像が得られ、ペスト菌を特異的に検出する抗体として直接抗体法への適用が期待された。[高橋英之]

VI. 髄膜炎菌感染症に関する研究

1. 髄膜炎菌の病原機構に関する研究

(1) GltT-GltM グルタミン酸トランスポーターを介したグルタミン酸の取込みと髄膜炎菌の宿主細胞侵入機構の解析

昨年度実施した signature tag mutagenesis により得られた変異体ライブラリーの中で低ナトリウム駆動グルタミン酸トランスポーターオペロン(NMB1965{*gltT*}-NMB1964)に挿入変異を持つ株が複数単離されたのでそれらの変異株に関してさらに解析を進めた。その結果、それらの挿入変異株及び完全欠失株はヒト培養細胞への接着能は野生株の 1/10 程度に低下していたが、その侵入能は 1/100 にまで低下しており、*gltT-NMB1964* 変異株は *gltT* もしくは *NMB1964* 遺伝子の単独ではその細胞侵入能の低下は相補されず、また *gltT* 及び *NMB1964* の両遺伝子のアンバー変異株でも同様の結果が認められたことからヒト培養細胞への侵入には上記 2 遺伝子が両方機能することが必要であることが示唆された。さらに、*gltT* アンバー変異によって mRNA の発現に影響がないにもかかわらず NMB1964 タンパク産物の発現欠損が認められることから *gltT* と *NMB1964* 遺伝子の発現は翻訳レベルで共役していることが示唆された。また、グルタミン酸を欠如させた培地を用いた感染実験においては野生株でも宿主細胞への侵入効率が著しく低下することが観察され、*gltT-NMB1964* 完全破壊株ではアクチンの集積やそれに付随するエズリンの集積等の宿主細胞の反応が著しく低下していた。 以上のことから、細胞侵入の際に GltT を介した髄膜炎菌のグルタミン酸の一過的な取り込みが髄膜炎菌及び宿主細胞へのシグナルとなって髄膜炎菌の細胞侵入が起こる機構が示唆された。また従来より宿主細胞への侵入は宿主細胞への接着後に一義的に進行する現象であると推測されていたが *gltT-NMB1964* 変異株が細胞侵入能をより大きく欠損していることから細胞接着と細胞侵入は異なる因子が働く独立した事象であることが強く推測された。［高橋英之、Kwang Sik Kim（Johns Hopkins Univ)、渡邉治雄］

VII. レプトスピラ症に関する研究

1. レプトスピラ症実験室診断に関する研究

(1) レプトスピラ属共通抗原の同定

レプトスピラ症患者血清との反応する新規レプトスピラ糖脂質抗原を同定した。この抗原は非病原性も含めて多くのレプトスピラ株に存在すること，またさまざまな血清型のレプトスピラに感染した患者でこの抗原に対する抗体が産生されていることが明らかとなった。さらにレプトスピラ感染マウスの尿中からのこの抗原の検出系を開発した。[小泉信夫，渡邉治雄（国立感染症研究所・細菌第一部)，福井貴史，増澤俊幸（千葉科学大学)]

2. レプトスピラ症の実態調査

(1) スリランカの熱発患者におけるレプトスピラ感染の実態調査

スリランカではレプトスピラ症の診断は臨床診断によって行われているため，流行レプトスピラ遺伝種や血清群は明らかになっていない。そこでペラデニヤ大学病院でレプトスピラ症と臨床診断された熱発患者からレプトスピラ抗体および DNA 検出を行った。その結果，熱発患者血清 107 検体中 26 検体(24.3%)からレプトスピラ抗体が検出された（血清群 Sejroe (9/26, 34.6%)，Icterohaemorrhagiae (5/26, 19.2%)。また 3 検体から PCR によりレプトスピラ DNA が検出され，レプトスピラ遺伝種は *interrogans* および *kirschneri* と推定された。［小泉信夫，武藤麻紀，渡邉治雄（国立感染症研究所・細菌第一部)，Gamage CD，玉城英彦(北海道大学大学院)，Kularatne SAM，Budagoda SBDS，Rajapakse JRPV（ペラデニヤ大学)］

(2)イヌのレプトスピラ症強化サーベイランス

イヌのレプトスピラ症の発生実態を明らかにするため，千葉，三重，愛媛，福岡，佐賀，熊本，宮崎および沖縄県で，検査定点サーベイランスを行った。その結果，千葉，三重，愛媛，福岡，佐賀，宮崎の各県でイヌのレプトスピラ感染が明らかとなった。レプトスピラは，千葉，愛媛および宮崎県のイヌの血液から分離され，*flaB* 遺伝子の部分塩基配列から分離株はすべて *L. interrogans* と推定された。また血清群は Australis，Autumnalis，Canicola，Hebdomadis，Icterohaemorrhagiae であった。［小泉信夫，武藤麻紀，渡邉治雄（国立感染症研究所・細菌第一部)，赤地重宏（三重県保健環境研究所)，濱﨑光宏，堀川和美（福岡県保健環境研究所)，松本一俊，八尋俊輔,原田誠也(熊本県保健環境科学研究所),岡野祥，平良勝也，中村正治（沖縄県衛生環境研究所)，山本正悟（宮崎県衛生環境研究所),相馬宏敏(宮崎県健康増進課)，樋坂光明,川上和夫(共立製薬・先端技術開発センター)］

(3) 各種動物におけるレプトスピラ保有状況調査

全国各地で捕獲されたネズミからレプトスピラの分離を試みた結果，北海道のアカネズミ 3 匹，ヤチネズミ 1

匹およびミカドネズミ２匹，秋田県のアカネズミ３匹および鹿児島県のアカネズミ１匹からレプトスピラが分離された．*flaB* 遺伝子の部分塩基配列および標準抗血清との反応性から，分離株は *L. interrogans* serogroup Autumnalis（北海道および秋田県のアカネズミ分離株），*L. interrogans* serogroup Hebdomadis（鹿児島県のアカネズミ分離株）および *L. borgpetersenii* serogroup Hebdomadis あるいは Sejroe（北海道ミカドネズミおよびヤチネズミ分離株）であると推定された．東京都で引き取りあるいは収容されたネコのレプトスピラ保有を調査したが，レプトスピラの分離あるいはレプトスピラ DNA は検出されなかった．［小泉信夫，武藤麻紀，渡邉治雄（国立感染症研究所・細菌第一部），角坂照貴（愛知医科大学医学部），本田俊郎（鹿児島県環境保健センター），谷川力，春成常仁（イカリ消毒技術研究所），小松謙之（シー・アイ・シー），宗村佳子（東京都動物愛護相談センター城南島出張所）］

VIII. 性感染症に関する研究

1. 梅毒トレポネーマに関する研究

(1) 梅毒トレポネーマの多型解析

梅毒トレポネーマは培養不能菌で多型やその解析法に関する研究は大きく立ち遅れているが、近年、CDC が提案した臨床検体からの PCR 産物を使った解析法による結果が数例報告されている。*arp* 遺伝子中の繰り返し配列の繰り返し回数と *tpr* 遺伝子の *Mse*I 切断パターンによる多型解析であるが、いずれも臨床検体からの両遺伝子の PCR 増幅が成功することが前提となる。この際の PCR 条件を当所保存の梅毒トレポネーマ株 DNA を用いて検討した結果、Mighty Polymerase や Phusion polemerase といった Fidelity と伸張力の高い酵素を用い、かつ、アニールとエクステンションを 72□で兼ねておこなう 2 ステップ法による PCR 反応条件が増幅効率とマイナーバンド不生成との両面で優れていることが分かった。今後の臨床検体からの多型解析に生かしたい。［中山周一、大西　真］

2. 淋菌に関する研究

(1)　菌種内遺伝子伝播に関する研究

ア　セフィキシム耐性遺伝子の細胞間伝播

染色体性のペニシリン結合タンパク質２の遺伝子である *penA* 遺伝子のモザイク型変異により、セフィキシム耐性となることが知られている。モザイク型変異遺伝子が淋菌菌株間で伝播することで、耐性淋菌が国内で拡散している可能性を形質転換実験から示唆した。［大西真、志牟田健、中山周一、渡邉治雄（感染研）、渡辺祐子、高橋智恵子、大屋日登美、黒木俊郎、岡崎則男　（神奈川県衛研）］

イ キノロン剤耐性遺伝子の水平伝播

キノロン剤耐性は、染色の異なる場所にコードされる２つの遺伝子、*gyrA* および *parC* それぞれに独立した点変異が導入されることが付与される。臨床分離淋菌の MLST 法による系統解析と、各菌の *gyrA* および *parC* 塩基配列比較から、異なる系統のキノロン耐性淋菌が完全に同一の *gyrA* および *parC* 塩基配列を保持していることが示された。アミノ酸置換を伴わない変異に関しても完全に一致することから、異なる２つの遺伝子が連関して水辺伝播している可能性を示唆した。［大西真、志牟田健、中山周一、渡邉治雄（感染研）、渡辺祐子、黒木俊郎、岡崎則男　（神奈川県衛研）］

(2) 淋菌の培養細胞における接着に関する研究

淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)は性感染症の原因菌の一つで、ヒト-ヒト感染が感染経路であり、男性は尿道、女性は子宮頸管に主に感染する。近年 CSW(commercial sex worker)らの咽頭より淋菌が検出されるケースが多数報告されており、男性の淋菌感染における感染源の一つあることが指摘されている。しかし、淋菌の咽頭感染における感染様式は現在のところ未解明なところが多く、これらの解明は淋菌の感染予防の面で有益な情報を得られると考えられる。そこで本研究では、咽頭感染における感染メカニズムの解明をめざした。始めに、淋菌の培養細胞に対する接着を検討した。Detroit 562 細胞(咽頭由来)及び HeLa 細胞(子宮由来)を用いた感染実験(MOI=10)を行った。　系統の異なる 8 株の淋菌を用いた感染実験において、HeLa 細胞では菌株間による接着率の有意差がみられたが、Detroit 562 細胞では菌株間の接着率に有意差は見られなかった。また、淋菌の接着因子として知られている線毛遺伝子である *pilE* 遺伝子欠失株 4 株を用いた同様の感染実験では、 両細胞共に野生型と比較して接着率に有意差が認められなかった。このことは、Detroit 562 細胞と HeLa 細胞では淋菌の接着様式に違いがある事を示唆する事と同時に、その原因因子が線毛遺伝子以外である可能性を示した。［志牟田健、渡邉　治雄、大西　真］

IX. 口腔細菌感染症に関する研究

1. 口腔細菌のバイオフィルム形成に関する研究

(1) *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成に関す

る研究

ア　非水溶性グルカン非依存のバイオフィルム形成機序

う蝕原性細菌である *S. mutans* は、高い酸耐性とショ糖からの非水溶性グルカン合成を介した強固なバイオフィルム形成能を持つ。我々は初期培養環境の酸性化によって生じる *S. mutans* の非水溶性グルカン非依存的なバイオフィルム形成現象を見出し、興味ある結果を得たので報告する。*S. mutans* を中性培地で培養した時と比較し酸性培地において明らかな生育の低下を示したが、酸性培地においても中性培地と同等の顕著なバイオフィルムを形成した。しかし、非水溶性グルカン産生は酸性培地において著しく低下していた。一方、バイオフィルム中の菌体外 DNA 量は酸性培地のバイオフィルムにおいて明らかな上昇が認められた。以上の結果から、酸性下における *S. mutans* のバイオフィルム形成には非水溶性グルカン非依存の経路が関与しており、本経路として、酸性環境下での菌体外への DNA の放出が関わっているものと推察された。[河原井 武人、成澤 直規、米田 早織、落合 邦康（日本大学歯学部)、渡邉 治雄、泉福 英信]

イ　*S. mutans* バイオフィルムの病原性調節遺伝子の解明

S. mutans のバイオフィルム形成時の病原性発現には多くの遺伝子が関わっているが、詳細は明確になっていない。臨床分離株は実験室株よりも厳しい環境下で生存しているため、バイオフィルム形成能および調節遺伝子を多く有している。そこで、臨床分離株を用いて、実験室株では見られないバイオフィルム形成調節遺伝子の検討を行った。浮遊状態に比べバイオフィルム形成時に発現が強く認められた 3 遺伝子の欠損株(*sunL*：ORF482, *hp*:ORF1507, *pqq*: ORF1508) を実験室株 (*S. mutans* UA159,GS5)と臨床分離株 2 株で作成し、各野生株(WT)と欠損株で生育、バイオフィルム形成量について比較検討した。臨床分離株バイオフィルム形成量において、WT に比べ *sunL* 欠損株で形成初期から後期まで *hp* 欠損株で初期のみ有意に減少していた。実験室株では、このような減少は認められなかった。生育には、大きな差が認められなかった。よって、*sunL* 欠損株と *hp* 欠損株は、バイオフィルム形成の調節遺伝子である可能性が考えられた。[泉福英信、米田早織、成沢直規、河原井武人、渡邉治雄]

ウ　*S. mutans* バイオフィルム形成を抑制する *S. salivarius* 分子の同定

S. salivarius は、う蝕原因菌である *S. mutans* のバイオフィルムを阻害する分子を産生することが明らかとなった。この抑制分子を精製するためにゲル濾過クロマトグラフィーおよび DEAE イオン交換クロマトグラフィーを行った。抑制活性のあるフラクションに SDS-PAGE 後のシルバー染色にていくつかのバンドが認められた。それぞれのバンドを切り出し、処理後、TOF Mass 解析を行うため理化学研究所の小園先生へサンプルを送り解析した。TOF Mass 解析の結果を分析すると３つの候補タンパク質が認められた。Fructosyltransferase、Fructanase、Glucan binding protein などが明らかとなった。この中で、Fructanase に強い *S. mutans* バイオフィルム形成阻害活性が認められた。Fructanase は、う蝕予防成分として有用となる可能性が考えられる。[泉福英信、小川綾子、三戸部治郎、古園　さおり（理化学研究所）、黒田　誠（病原体ゲノムセンター)、渡邉治雄]

エ　アッサム茶葉抽出成分によるバイオフィルム形成阻害に関する研究

う蝕予防剤開発のため、アッサム茶抽出成分のう蝕原性細菌 *S. mutans* バイオフィルム形成に対する阻害効果について検討を行った。対照として用いた中国産緑茶に比較し、アッサム茶葉は非常に強いバイオフィルム形成阻害効果を示した。そこで、アッサム茶の持つ強いバイオフィルム阻害活性に関わる因子を探索した結果、アッサム茶中には緑茶に比較してバイオフィルム形成阻害活性の高いガレート型カテキンが多く含まれること、及び緑茶中にのみカテキンの持つバイオフィルム阻害活性を阻害する物質が含まれることが明らかとなった。本研究により、アッサム茶は緑茶に比較し、う蝕予防剤としてより有用であることが示唆された。[河原井武人、米田早織、成澤直規、泉福英信]

(2) *Actinomyces naeslundii* のバイオフィルム形成に関する研究

ア　酪酸による *Actinomyces naeslundii* バイオフィルムへの効果に関する研究

*Porphyromonas gingivalis*などの歯周病関連菌は、最終代謝産物として各菌種特有の短鎖脂肪酸(SCFA)を作り分泌している。このSCFAは、ある一定の濃度において、口腔常在菌である*A. neaslundii*のバイオフィルム形成を上昇させることが明らかとなった。このバイオフィルム形成の上昇を解析するために、*A. naeslundii* X600の酪酸刺激後のPolysaccharide形成量の検討を行うと、酪酸添加により有意にPolysaccharide形成量の上昇が認められた。さらに、死菌数の上昇も認められた。これらの現象が、酪酸添加による*A. naeslundii*バイオフィルム形

成を促進する可能性が明らかになった。[泉福英信、米田早織、河原井武人、落合邦康（日本大学歯学部)、渡邉治雄]

2. 口腔細菌に対する抗菌物質に関する研究

(1) *Streptococcus gordonii* SspB リジン置換ペプチドの抗菌性の検討

S. gordonii の菌体表層蛋白質(SspB)の SspB(390-T400K-402)と SspB(390-T400K-401)ペプチドは、唾液成分がコートされたハイドロキシアパタイトに対する *S. mutans* の結合を阻害する。そのペプチドは、*S. mutans* の歯表面に付着する際、唾液由来獲得ペリクルに存在するアグルチニン（gp-340/DMBT1）ペプチド（SRCRP2）と強く結合して、*S. mutans* の結合を阻害すると考えられる。この結合阻害には、リジン置換による陽電荷表出が影響していると考えられている。しかし、陽電荷表出およびこのペプチドのようなαヘリックス構造を有するものは、抗菌ペプチドを似た構造であり、*S. mutans* の付着阻害効果が抗菌効果による可能性も否定できない。そこで、このペプチドの抗菌性を検討した。その結果、有意な抗菌活性をこのペプチドは有していないことが明らかとなった。よって、このペプチドによる阻害効果を付着阻害によるものと考えられた。 [泉福英信、奥田健太郎、木庭秀彦、渡邉治雄]

3. 口腔細菌の菌種内多様性出現機構に関する研究

(1) う蝕原性菌 *Streptococcus mutans* 多様性出現機構の解明

う触原性*Streptococcus mutans*は他のバクテリアと同様、株もしくは種レベルで多様性を有することが報告されており、これは口腔内環境への適応との関連が示唆されている。本研究において*S. mutans* UA159, MT8148, GS5などの実験室株6株とヒト口腔内から分離された臨床株17株の計23株のSCVの出現について確認したところ、実験室株では10^{-3}から10^{-4}程度の出現頻度であったのに対し、臨床株では10^{-2}程度と高頻度に出現するものが存在した。これら得られたS型コロニーは継代培養後もその特徴を維持しており、non-phase variationであることが確認された。この多様性の出現には、recA依存性と非依存性の２つの遺伝的組み換え機構が関与していることが明らかとなった。さらに、recA遺伝的組み換え機構には、ComEに依存したQuorum Sensingが関わることも明らかにした。[成澤直規、河原井武人、米田早織、渡邉治雄、泉福英信]

4. 口腔粘膜ケアに関する研究

口腔粘膜ケアの口腔内微生物に対する除去効果

要介護高齢者は、自立高齢者に比べ口腔内に *Candida* などの日和見菌が多く検出され、誤嚥により肺に侵入する機会が増えている。その結果、肺炎を発症する可能性が高まっている。誤嚥性肺炎の予防効果があるとして口腔ケアが注目されているが、口腔ケアがどのような効果で予防効果があるのか明らかにされていない。特に通常行われているスポンジブラシを用いた口腔粘膜ケアの効果については、その詳細が明らかにされていない。そこで、歯科衛生士が行う専門的口腔ケアに粘膜ケアのある場合とない場合に分け、それらの口腔微生物に対する効果を、口腔ケア後１、２、３、６、１２か月の口腔から唾液、歯垢、舌上サンプルを採取し、それらサンプル中の微生物量を測定し評価を行った。その結果、粘膜ケアを含む口腔ケア後 12 か月で、唾液、歯垢中のカンジダ量が有意に粘膜ケアを行わない口腔ケアと比較し減少した。口腔粘膜ケアの口腔微生物に対する効果が示された。[泉福英信、稲葉英理佳、植松宏（東京医科歯科大学）]

5. 口腔感染症のモデル動物の作成

(1) NOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスを用いた齲蝕高感受性モデル動物の確立

唾液分泌能の低下した患者の口腔内は様々な菌が定着し易く、齲蝕細菌をはじめとした多くの微生物に易感染性である。これらの特徴を持つNOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスを作製し、このマウスを用いて*Streptococcus mutans*の定着性を検証し、齲蝕高感受性モデル動物として確立する検討を行った。NOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスは、NOD/SCID.*E2f1*$^{+/+}$：Wild Type、NOD/SCID.*E2f1*$^{-/+}$：ヘテロ欠損型、NOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$:ホモ欠損型に分類した。前準備として、実験の前日から1 %sucrose水をマウスに給水した。菌接種後60分において、*E2f1*欠損マウスから得られた*S.mutans*のCFUは、Wild Typeと比較して有意に高かった。唾液コート実験においては、*S.mutans*の歯面付着性の増加が予想された為、菌接種から120分後のデータを検討した。ヒト唾液コートにより*S.mutans*の歯面への定着が促進することが明らかとなった。これらの結果から、ヒト唾液を事前に歯表面にコートしたNOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスは、齲蝕高感受性モデル動物として有用であることが示唆された。[泉福英信、伊藤龍朗、猪原光、河原井武人、渡邉治雄]

(2) NOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスを用いた口腔常在菌：*A. naeslundii* 感染モデル動物の確立

NOD/SCID.*E2f1*$^{-/-}$マウスを用いて*A. naeslundii*の歯表

面定着性を検証し、口腔常在菌感染モデル動物の確立を検討した。その結果、前準備として、実験の前日から１％ sucrose 水をマウスに給水した場合、給水しない場合に比べ有意に *A. naeslundii* の歯表面定着性が上昇していた。Sucrose 水給水における口腔内環境の変化が *A. naeslundii* の歯表面定着に影響したことが考えられた。[泉福英信、Zhang Xi、伊藤龍朗、成沢直規、河原井武人、渡邉治雄]

6. 口腔における疫学的な調査

(1) 歯科医療における院内感染対策の評価指標の開発と有効性の検証

唾液や血液が飛び散る可能性の高い歯科医療において、全身感染症を有する患者が来院した場合に対応ができるような院内感染対策を導入するための新たな評価指標を確立することを目的とし検討を行った。某A県(HIV. AIDS 患者多い地区) および某B県(HIV. AIDS 患者の少ない地区)の歯科医師会会員おいて、歯科医療における院内感染対策の意識、知識、行動に関わるアンケート調査を行った。平成19～20年度に行った厚生労働科学研究班の検討から院内感染対策の評価基準11項目を挙げ、その有効性の検証も行った。その結果、院内感染対策に地域差が生まれる原因は、HIV, AIDS 患者の多いことによる意識の高まり、歯科医師会などの研修会開催とその参加率の上昇などが強く影響していた。評価基準11項目から達成難易度の違いにより３つのステップを分け、より難易度の高い項目を目標に達成させることが重要であることが明らかとなった。[泉福英信、米田早織、小森康雄（東京医科大学）]

レファレンス業務

Ⅰ．劇症型/重症レンサ球菌感染症レファレンス業務

地方衛生研究所および病院から送られた劇症型/重症レンサ球菌感染症患者分離菌株の血清型別、*emm* 遺伝子の塩基配列による型別、*spe* 遺伝子の保有状況等の検査及び結果および流行状況の報告、および、患者分離株の血清型別の流行に関する全国集計を行っている。それらをもとに、レファレンスセンター会議の資料を作成するとともに、その一部をインターネット上で公開している。

［池辺忠義、和田昭仁、松永聡子、渡邉治雄、The Working Group for β-hemolytic Streptococci in Japan］

II. レジオネラ症に関するレファレンス業務

1. 平成21年度は、臨床分離株26株（2株は集団感染が疑われた症例)、環境分離株32株合計58株を受け入れた。臨床分離株は *L. pneumophila* (Lp) SG1の22株の他、Lp SG6、Lp SG15、*L. feeleii* SG1、*L. longbeachae* SG2が1株ずつであった。Lp 24株のSBTやMAb型を検索し、Lp以外の 2 株の血清群を同定した。環境分離株は、*L. londiniensis* 13 株（3 県の 3 施設由来）、*L. maceachernii* 5株（2施設由来)、L. spp. 5株（4施設由来)、Lp 3株（SG4が2株、SG5が1株)、Lp Sg1の3株、*L. cherii* 2株、*L. feeleii* SG1が1株で、同定の依頼のあったもの（27 株)、珍しいレジオネラ属菌（2株)、症例調査に関連した株(3株) であった。なお、収集された株は、必ずしも平成21年度に分離された株ではない。[倉　文明、前川純子、渡邉治雄]

2. レジオネラ免疫血清の配布

全国6カ所のレジオネラ・レファレンス支部センターに、市販されていないレジオネラ免疫血清であるロングビーチ1群、ロングビーチ2群、ロングビーチ2253、ハッケリー1群の配布を開始した。[倉　文明、前川純子、渡邉治雄]

品質管理に関する業務

Ⅰ．肺炎球菌ワクチンの検定

製剤担当室として肺炎球菌ワクチンの検定を、試験担当室および製剤担当室として沈降7価肺炎球菌結合型ワクチンの検定を行った。[前川純子、常彬、和田昭仁]

国際協力関係業務

Ⅰ．JICA主催の中南米医療従事者向け講習会

例年通り、今年度もJICA主催の中南米医療従事者向け血液スクリーニング講習に協力し、平成22年2月3日に当所で梅毒に関する講義を行った。

［中山周一］

II. アジア太平洋地域における新興感染症に対する戦略(APSED)支援

WPROの依頼により、ラオス人民共和国の新興感染症対策の一環として実験室診断の機能強化プログラムを策定した。平成21年度は、2回にわたり現地での技術指導を行った。[泉谷秀昌、大西真]

研修業務

Ⅰ．溶血性レンサ球菌およびその感染症に関する研修

国立保健医療科学院等で開催された都道府県及び政令指定中核市における地方衛生研究所・保健所等で病原細菌に関する検査業務に従事する方を対象とした「平成 21

年度短期研修細菌研修」において、溶血性レンサ球菌およびその感染症に関する講義を１時間行った。[池辺忠義]

II. レジオネラ症に関する研修

1. 平成 21 年度専門研修「検査技術」(特別区)

レジオネラ症防止指針の改訂と最新の検査法について、特別区保健所の検査担当職員35名に対して3時間半にわたり講義を行った。9 月 25 日、東京都。(倉　文明)

2.　平成 21 年度短期研修　細菌研修 (国立保健医療科学院)

レジオネラの基礎、感染事例、検査法について、地衛研及び保健所の担当職員32名に対して2時間の講義を行った。11 月 5 日、和光市。(倉　文明、前川純子〕

3.　平成 21 年度生活衛生関係技術担当者研修会 (厚生労働省健康局生活衛生課)

レジオネラ症の感染対策について、都道府県、政令市及び特別区の公衆浴場等生活衛生関係技術担当職員(主として保健所職員)373 名に講義を行った。3 月 9 日、東京。[倉　文明、遠藤卓郎；泉山信司 (寄生動物部)]

その他

I. 梅毒血清検査標準化委員会

本年度も引き続き日本性感染症学会の梅毒血清検査標準化委員会 (委員長：本田まりこ、慈恵医大、敬称略) の委員としてガイドライン改訂等に関する討議、検討に参加した。これらを経た今次改訂は平成 22 年の下半期になされる予定である。

[中山周一]

発　表　業　績　一　覧

Ｉ．誌　上　発　表

1. 欧文発表

1) Arakawa T, Fujimaru T, Ishizaki T, Takeuchi H, Kageyama M, Ikemi T, Hanada N, Watanabe H, Senpuku H: Unique functions of hydroxyapatite to adherence of mutans streptococci. Quint Int 2010, 41:e11-9.

2) Bhuiyan NA, Bhuiyan NA, Nusrin S, Alam M, Morita M, Watanabe H, Ramamurthy T, Cravioto A, Nair GB: Changing genotypes of cholera toxin (CT) of *Vibrio cholerae* O139 in Bangladesh and description of three new CT genotypes. FEMS Immunol Med Microbiol 2009, 57: 136-141.

3) Nusrin S, Alam M, Morita M, Watanabe H, Ramamurthy T, Cravioto A, Nair GB: Changing genotypes of cholera toxin (CT) of *Vibrio cholerae* O139 in Bangladesh and description of three new CT genotypes.

4) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. Jpn J Infect Dis 2010, 63: 119-123.

5) Chiou CS, Watanabe H, Wang YW, Wang WL, Terajima J, Thong KL, Phung DC, Tung SK: Utility of multilocus variable-number tandem-repeat analysis as a molecular tool for phylogenetic analysis of *Shigella sonnei*. Journal of Clinical Microbiology 2009, 47:1149-54.

6) Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Narisawa N, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H: Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. adherence and biofilm formation. Jpn J Infect Dis 2009, 62: 337-342.

7) Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Okuda T, Manome Y, Yamamoto K: Combination of real-value smell and metaphor expression aids yeast detection. PLoS One. 2009 Nov 20;4(11):e7939.

8) Hanaoka N, Matsutani M, Kawabata H, Yamamoto S, Fujita H, Sakata A, Azuma Y, Ogawa M, Takano A, Watanabe H, Kishimoto T, Shirai M, Kurane I, Ando S: Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*. Emerg Infect Dis 2009, 15: 1994-1997.

9) Hanaoka N, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Watanabe H, Kurane I, Kishimoto T, Ando S: Development of a pUC19-based recombinant plasmid to serve as a positive control in PCR for *Orientia tsutsugamushi*. Microbiol Immunol 2009, 53: 305-308.

10) Helbig JH, Amemura-Maekawa J: Serotyping of *Legionella pneumophila* and epidemiological investigations. Nowa Medycyna 2009, 16:69-75.

11) Hirata Y, Sata M, Makiuchi Y, Morikane K, Wada A, Okab Ne, Tomoike H: Comparative analysis of *Micrococcus luteus* isolates from blood culture of patients with pulmonary hypertension receiving epoprostenol continuous infusion. J. Infect. Chemother. 2009, 15:424-425.

12) Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe

H: LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. Mol Microbiol 2009, 74:1393-1411.

13) Ikebe T, Ato M, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H: Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. PLoS Pathog 2010,6:e1000832.

14) Inaba E, Uematsu H, Nishiyama Y, Watanabe H, Senpuku H: The role of anti-PAc (361-386) peptide SIgA antibody in professional oral hygiene of the elderly. Gerodontol 2009, 26:259-267.

15) Izumiya H, Tada Y, Ito K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. J Med Microbiol 2009, 58: 1486-1491.

16) Koba H, Okuda K, Watanabe H, Tagami J, Senpuku H: Role of lysine in interaction between surface protein peptides of *Streptococcus gordonii* and agglutinin peptide. Oral Microbiol Immunol 2009, 24:162-169.

17) Kobayashi H, Kanazaki M, Ogawa T, Iyoda S, Hara-Kudo Y: Changing prevalence of O-serogroups and antimicrobial susceptibility among STEC strains isolated from healthy dairy cows over a decade in Japan between 1998 and 2007. J Vet Med Sci 2009, 71: 363-366.

18) Koizumi N, Gamage CD, Muto M, Kularatne SAM, Budagoda SBDS, Rajapakse JRPV, Tamashiro H, Watanabe H: Serological and genetic analysis of leptospirosis in patients with acute febrile illness in Kandy, Sri Lanka. Jpn J Infect Dis 2009, 62:474-475.

19) Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H: Human leptospirosis cases and prevalence of rats harboring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. J Med Microbiol 2009, 58: 1227-1230.

20) Koizumi N, Muto M, Yamada A, Watanabe H: Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. J Vet Med Sci 2009, 71: 797-799.

21) Koizumi N, Uchida M, Makino T, Taguri T, Kuroki T, Muto M, Kato Y, Watanabe H: Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. J Vet Med Sci 2009, 71:425-429.

22) Koizumi N, Watanabe H: Leptospirosis. In: Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases 2009, 1291-1308. Elsevier, UK.

23) Kumada M, Motegi M, Nakao R, Yonezawa H, Yamamura H, Tagami J, Senpuku H: Inhibiting effects of *Enterococcus faecium* non-biofilm strain on *Streptococcus mutans* biofilm formation. J Microbiol Immunol Infect 2009, 42: 188-196.

24) Kuroki T, Ishihara T, Ito K, Kura F: Bathwater-associated cases of legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water. Jpn J Infect Dis 2009, 62: 201- 205.

25) Matsui-Inohara H, Uematsu H, Narita T, Satoh K, Yonezawa H, Kuroda K, Ito T, Yoneda S, Kawarai T, Sugiya H, Watanabe H, Senpuku H: E2F-1-deficient NOD/SCID mice developed showing decreased saliva production. Exp Biol Med 2009, 234:1525-1536.

26) Matsumoto M, Yamaguchi I, Sasano M, Hori M, Ikezaki K, Shimizu S, Nishiyama Y, Sato N, TsuchiyaH, Suzuki M, Minagawa H, Working Group for Beta-Haemolytic Streptococci in Japan: T serotyping of *Streptococcus pyogenes* in Aichi Prefecture, Japan isolated between 2003 and 2007. Jpn J Infect Dis 2009, 62:168-169.

27) Matsuura M, Takahashi H, Watanabe H, Kawahara K: Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaaccharides on human macrophages. Clinical Vaccine Immunol 2010, 17:49-55

28) Morita-Ishihara T, Terajima J, Watanabe H, Izumiya H: Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells. Jpn J Infect Dis 2009, 62: 351-355.

29) Nakamura M, Fujibayashi T, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Shinozuka O, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H: Hinokitiol inhibits *Candida albicans* adherence to oral epithelial cells, J Oral Biosci 2010, 52: 42-50.

30) Niwa H, Anzai T, Izumiya H, Morita-Ishihara T,

Watanabe H, Uchida I, Tozaki T, Hobo S: Antimicrobial resistance and genetic characteristics of *Salmonella typhimiruim* isolated from horses in Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci 2009, 71: 1115-1119.

31) Ohnishi M, Watanabe Y, Ono E, Takahashi C, Oya H, Kuroki, T, Shimuta K, Okazaki N, Nakayama S, Watanabe H: Spread of a chromosomal cefixime-resistant *penA* gene among different *Neisseria gonorrhoeae* lineages. Amtimicrobial Agents Chemothera. 2010, 54 1060-1067.

32) Onoyama S, Ogata R, Wada A, Saito M, Okada K, HaradaT: Neonatal bacterial meningitis caused by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. J. Med. Microbiol. 2009, 58:1252-1254.

33) Ooka T, Ogura Y, Asadulghani M, Ohnishi M, Nakayama K, Terajima J, Watanabe H, Hayashi T: Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. Genome Research 2009, 19:1809-16.

34) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. Journal of Clinical Microbiology 2009, 47:2888-94.

35) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K: *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. Emerg Infect Dis 2009, 15: 1295 -1297.

36) Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Koyama Y, Kura F, Noami M, Kusaka K, Funato T, Takeda M, Okumiya K, Kato N, Yamaguchi K: Is driving a car a risk for Legionnaires disease? Epidemiol Infect 2009, 137: 1615-1622.

37) Sato H, Takano A, Kawabata H, Une Y, Watanabe H, Mukhtar MM: *Trypanosoma* cf. *varani* in an imported ball pythone (*Python regnus*) from Ghana. J Parasitol 2009, 95: 1029-1033.

38) Shimuta K, Ohnishi M, Iyoda S, Goto N, Koizumi N, Watanabe H: The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. BMC Microbiology 2009, 9:261.

39) Suzuki T, Mochizuki S, Yamamoto S, Arakawa H, Kinashi H: Regulation of lankamycin biosynthesis in Streptomyces rochei by two SARP genes, *srrY* and *srrZ*. Biosci Biotechnol Biochem 2010, 74:819-827.

40) Takada N, Fujita H, Kawabata H, Ando S, Sakata A, Takano A: Chaithong U. Spotted fever group Rickttsia sp. closely related to *Rickettsia japonica*, Thailand. Emerg Infect Dis 2009, 15: 610-611.

41) Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H, Watanabe H: Novel *Ehrlichia* sp. found in Ixodes granulatus infested to rodents in Okinawa, Japan. Microbiol Immunol 2009, 53: 101-106.

42) Takano A, Muto M, Sakata A, Ogasawara Y, Ando S, Hanaoka N, Tsurumi M, Sato F, Nakamura N, Fujita H, Watanabe H, Kawabata H: Relapsing fever spirochete in seabird tick, Japan. Emerg Infect Dis 2009, 15: 1528-1530.

43) Takaya A, Kitagawa N, Kuroe Y, Endo K, Okazaki M, Yokoyama E, Wada A, Yamamoto T: Mutational analysis of reduced telithromycin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. FEMS Microbiol. Lett. 2010, 307:87-93.

44) Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H: Inhibiting effects of *S. salivarius* on CSP-dependent biofilm formation bu mutans streotococci. Oral Microbiol Immunol 2009, 24:152-161.

45) Toh H, Oshima K, Toyoda A, Ogura Y, Ooka T, Sasamoto H, Park SH, Iyoda S,Kurokawa K, Morita H, Itoh K, Taylor TD, Hayashi T, Hattori M : Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia col*i strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. J Bacteriol 2010, 192: 1165-1166.

46) Yamamoto S, Morita M, Izumiya H, Watanabe H: Chitin disaccharide (GlcNAc)2 induces natural competence in *Vibrio cholerae* through transcriptional and translational activation of a positive regulatory gene *tfoXVC*. Gene 2010, 457:42-49.

47) Yamauchi T, Tabara K, Kanamori H, Kawabata H, Arai S, Katayama T, Fujita H, Yano Y, Takada N, Itagaki A: Tick fauna associated with sika deer density in the Shimane Peninsula, Honshu, Japan. Med Entomol Zool 2009, 60: 297-304.

48) Mohsan S, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T.Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting the recombinant viral antigens of various genotypes.J Clin Microbiol. 2009, 47:4141-4143.

49) Hasegawa M, Inamo Y, Fuchigami T, Hashimoto K, Morozumi M, Ubukata K, Watanabe H, Takahashi T. Bronchial casts and pandemic (H1N1) 2009 virus infection.Emerg Infect Dis. 2010,16(2):344-346.

50) Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sugawara A, Ujike M, Obuchi M,Kishida N, Hong Xu, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, and Watanabe H. Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May-September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan.2010, PloS One.10: 5, e11057.

51) Niaz Rahim, D. J. Gomes, H. Watanabe, Sabita R. Rahman, Alejandro Cravioto, Hubert Ph. Endtz, and Munirul Alam. Antibacterial activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multi-drug resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. Jpn.J. Inf.Dis.2010, 63: 271-274.

52) Benacer D, Thong KL, Watanabe H, Puthucheary SD. Characterization of drug resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. Journal of Microbiology and Biotechnology.2010, 20: 1042-1052.

2. 和文発表

1) 阿戸　学、池辺忠義：劇症型A群レンサ球菌感染症における好中球傷害の機序、臨床免疫・アレルギー科、2009, 51: 406-413.

2) 池辺忠義、常彬：豚レンサ球菌感染症、ズーノシスハンドブック、2009, 154-155.

3) 池辺忠義、阿戸学、小林和夫、渡邉治雄：劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序―菌の免疫回避機構と菌の特性―、感染症学雑誌、2009, 83: 485-489.

4) 池辺忠義:劇症型溶血性レンサ球菌感染症、公衆衛生、2010, 74: 34-38.

5) 泉谷秀昌：非チフス性サルモネラ症。ズーノーシスハンドブック。メディカルサイエンス社、2009年4月。

6) 泉谷秀昌、渡邉治雄：*Enterobacter sakazakii* の再分類について。IASR、2009, 30: 135-136

7) 泉谷秀昌：サルモネラ食中毒について。鶏卵肉情報、2010, 40: 129-132

8) 泉谷秀昌：サルモネラ食中毒について。月間 HACCP、2010, 16: 100-103

9) 伊豫田淳、寺嶋淳、泉谷秀昌、渡邊治雄：日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現状と分離株の性状、獣医畜産新報、62: 801-806, 2009.

10) 伊豫田淳、寺嶋淳：II 1. 2. 5. 腸管出血性大腸菌食中毒、食品安全の事典、日本食品衛生学会編、朝倉書店、2009.

11) 小泉信夫、武藤麻紀、山本正悟、下村高司、相馬宏敏、渡邉治雄：宮崎県におけるイヌのレプトスピラ症の発生状況及び分離株の性状解析、獣医畜産新報、2009, 62:79-481.

12) 小泉信夫、渡邉治雄：レプトスピラ症、ズーノーシスハンドブック、2009, 178－179.

13) 鈴木智之、高橋亮太、塩山陽子、山本正悟、岩切章、三浦美穂、石川幸治、相馬宏敏、小泉信夫、武藤麻紀、中島一敏、岡部信彦：宮崎県におけるレプトスピラ症の実地疫学調査、獣医畜産新報、2009, 62: 477-478

14) 泉福英信、河原井武人、唾液 IgA と常在細菌叢、臨床検査、2009, 53: 829-833.

15) 田口真澄、泉谷秀昌：*Salmonella*。食品由来感染症と食品微生物。中央法規出版、2009年10月。

16) 寺嶋　淳：疫学マーカー、食品由来感染症と食品微生物、2009、36-44、中央法規出版

17) 中橋伸江、山本貴子、馬場俊一、川端寛樹、安藤秀二、照井 正：*Ixodes holocyclus* によるマダニ刺咬症の１例、臨床皮膚科、2009, 63:159-161.

18) 矢崎晴識、山口禎夫、佐藤志律江、柳澤隆司、河尻公樹、菅原恵子、長田祐次、猪原玉冨、佐藤利香、大竹恵子、金隆根、植田恵介、塚本絵美、杉森光子、石井徹、谷口洋子、東出正人、泉谷秀昌、花木秀明、砂川慶介：腸炎患児から分離された *Yersinia enterocolitica* gourp の同定に苦慮した1例。臨床と微生物、2009, 36: 379-383.

Ⅱ. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, Isobe J, Nukina M, Kawano K, Nakajima H, Tada Y, Watanabe H: Distribution of serogroups, sequence types, and monoclonal antibody subgroups among *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris, France. Oct. 2009.

2) Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Detection and quantification of viable *Legionella* cells from environmental water samples by combined use of ethidium monoazide and real-time PCR. The 7th International Conference, Legionella 2009, Paris, France. Oct. 2009.

3) Ito T, Matsui H, Maeda T, Watanabe H, Senpuku H: Establishment of new mouse model using NOD/SCID.e2f-1-/- mouse for initial adhesion and biofilm formation of Streptococcus mutans, 5th ASM Conference on Biofilms, Nov. Cancun, Mexico. 2009.

4) Iyoda S, Honda N, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H: LysR-type regulator A (LrhA) controls expression of LEE and non-LEE encoded virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 7th International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, Argentina. May. 2009.

5) Izumiya H, Terajima J, Ohinishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H: Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of STEC serogroups O26 and O111. 7th International symposium on Shiga toxin (verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, Buenos Aires, Argentina, May 2009.

6) Kawarai T, Yoneda S, Saeki Y, Tsugane T, Ochiai K, Watanabe H, Senpuku H: Water-insoluble glucan-independent biofilm formation by *Streptococcus mutans* under acidic condition. Eurobiofilms 2009, Rome, Italy, Sep. 2009.

7) Koizumi N, Ohnishi M, Muto M, Watanabe H: Global identification of Leptospira strain-specific genes by microbeads-based genome screening. 6th Annual Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, Cochin, India. Sep. 2009.

8) Kura F, Amemura-Maekawa J, Chang B, Suzuki-Hashimoto A, Ichinose M, Endo T, Watanabe H: Two groups of *Legionella anisa* isolates of environmental origin in Japan. LEGIONELLA 2009. Paris, France. Oct. 2009.

9) Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M: Involvement of IFN-γ and IL-6 in severe invasive group A streptococcus infection. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage, Ishikawa, Japan. Jul. 2009.

10) Mitobe J, Ishihama A, Watanabe H: Bacterial cytoskeltal protein RodZ (YfgA) involves expression of Type III secretion system in *Shigella sonnei* through the post-transcriptional processing. The 44th US-Japan Cholera and other bacterial enteric infections Joint Panel Meeting 2009. Oct 2009, San Diego CA, USA

11) Nakao R, Wai SN, Uhlin BE: Effect of altered phosphorylation of LPS core oligosaccharide on production of outer membrane vesicles and activity of OMV-associated ClyA. Symposium on Bacterial Cell Biology and Pathogenesis, Umeå, Sweden. Jun, 2009.

12) Nakao R, Wai SN, Uhlin BE: Biofilm formation of *Escherichia coli* LPS mutants. The first European congress on microbial biofilms: EUROBIOFILMS 2009, Rome, Italy, Sep. 2009.

13) Narisawa N, Kawarai T, Yoneda S, Watanabe H, Senpuku H: The effects of naturally-derived variants in virulence expression of *Streptococcus mutans*. Eurobiofilms 2009, Rome, Italy, Sep. 2009.

14) Ogawa A, Mitobe J, Fujita S, Kuroda M, Watanabe H, Uematsu H, Senpuku H: Study of inhibiting substances from *Streptococcus salivarius* to Streptococcus mutans biofilm formation. Eurobiofilms 2009, Rome, Italy, Sep. 2009.

15) Ohnishi M, Watanabe Y, Shimuta K, Watanabe H. Horizontal transfer of *penA* allele between two different lineages of *Neisseria gonorrhoeae*. 18th ISSTDR London Jul 2009.

16) Senpuku H: Role of salivary IgA antibody against surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in diagnosis and preventive treatment. 4th Medical Biotech Forum, Dailian, China, Aug. 2009.

17) Tagri T, Oda Y, Sugiyama K, Izumiyama S, Kura F: Using flow cytometry to monitor the risk of legionellosis in bath water. LEGIONELLA 2009. Paris, France. Oct. 2009.

18) Terajima J, Iyoda S, Mitobe J, Izumiya H, Arakawa E, Morita M, Ishihara T, Watanabe H: Japanese PulseNet, 6th Annual International Collaboration of Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies Meeting, Tokyo, 2009

19) Terajima J, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Izumiya H, Watanabe H: Molecular Epidemiological investigation of enterohemorrhagic *E. coli* isolates in Japan 2006-2007: 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, 2009

20) Wada A, Chang B, Arakawa Y: Serotype and sequence-type distribution among invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from children in Japan prior to 7-valent conjugate vaccine introduction. US-Japan Cooperative Medical Science Program. San Francisco, CA, USA. Jan. 2010.

21) Yamamoto S, Izumiya H, Morita M, Arakawa E, Watanabe H: Chitin activates transcription and translation of tfoXVC, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. United States-Japan Cooperative Medical Science Program 44nd Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections. San Diego. USA. Oct. 2009

22) Yoneda S, Narisawa N, Kawarai T, Watanabe H, Senpuku H: Identification of new genes regulated aggregation and biofilm formation of *Streptococcus mutans* clinical isolates. Eurobiofilms 2009, Rome, Italy, Sep. 2009.

2. 国内学会

1) Gamage CD, Nwafor-Okoli C, Kurukurusuriya S, Rajapakse JRPV, Budagoda SBDS, Kularatne SAM, Muto M, Koizumi N, Watanabe H, Tamashiro H: Serosurveillance of leptospisosis in humans, cattle and rodents in Kandy, Sri Lanka、第 47 回レプトスピラ・シンポジウム、東京、2010 年 3 月

2) 阿戸　学、松村隆之、池辺忠義、渡邉治雄、小林和夫：劇症型溶血性レンサ球菌感染症における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害. 第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010 年 2 月

3) 安藤秀二、黒澤昌啓、坂田明子、藤田博己、矢野泰弘、高野愛、川端寛樹、花岡希、斉藤若奈、岸本壽男：仙台市で確認された新しい紅斑熱リケッチア症、第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月

4) 安藤秀二、藤田博己、坂田明子、矢野泰弘、大竹秀男、及川陽三郎、角坂照貴、黒澤昌啓、川端寛樹、高田伸弘：仙台市での *Rickettsia heilongjiangensis* 感染症例の発見と保有マダニ調査、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

5) 池辺忠義、緒方喜久代、奥野ルミ、嶋智子、大屋日登美、渡邉治雄：日本における劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の emm 遺伝子型と csrS 遺伝子の変異頻度、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

6) 池辺忠義：劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる病原因子の解明、第 21 回日本臨床微生物学会総会、東京、2010 年 1 月

7) 石原朋子、寺嶋淳、渡邉治雄、泉谷秀昌：Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells、第９２回日本細菌学会関東支部総会、東京都、2009 年 11 月

8) 石原朋子、泉谷秀昌、寺嶋淳、渡邉治雄：Membrane remodeling in epithelial cells induced by interaction between EHEC EspFu and IRSp53、第８３回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月

9) 泉谷秀昌：サルモネラ食中毒について。家畜衛生フォーラム 2009、東京都、2009 年 11 月

10) 泉谷秀昌：細菌性下痢症。JICA 平成 21 年度感染症対策研修、東京都、2010 年 2 月

11) 泉谷秀昌：食中毒の実態と対策。感染症対策啓発セミナー-シリーズ III、東京都、2010 年 3 月

12) 泉谷秀昌：分子生物学総論。国立保健医療科学院平成 21 年度特別課程、埼玉県和光市、2009 年 11 月

13) 泉山信司、倉　文明、遠藤卓郎：遺伝子検査による *Legionella* 属菌の定量、第 60 回全国水道研究発表会、大宮市、2009 年 5 月

14) 泉山信司、八木田健司、倉　文明、遠藤卓郎：モノクロラミンによる *Naegleria* アメーバの消毒、第 9 回環境技術学会研究発表大会、大阪市、2009 年 9 月

15) 磯部 順子、中嶋 洋、渡辺 祐子、森本 洋、緒方 喜久代、常 彬、前川 純子、渡邉 治雄、倉 文明: 浴槽水からのレジオネラの単離および定量化における免疫磁気分離法の評価、第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月

16) 伊東拓也、高田伸弘、藤田博己、坂田明子、安藤秀二、川端寛樹、高野愛：日本北端地域におけるマダニ媒介性病原体の調査、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

17) 今内覚、村瀬優介、山田慎二、肥田野新、伊東拓也、川端寛樹、小沼操、大橋和彦：シュルツェマダニにおけるライム病ボレリア伝播関連遺伝子の同定、第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取、2009 年 9 月

18) 伊豫田淳、寺嶋 淳、泉谷秀昌、大西真、渡邉治雄、腸管出血性大腸菌ワーキンググループ：Virulence traits of EHEC O157:H7 clade 8, a possible high virulent lineage、第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月

19) 伊豫田淳、寺嶋淳、泉谷秀昌、大西真、渡邉治雄：クレード解析による DNA 型別から明らかとなった高病原性と推定される腸管出血性大腸菌 O157:H7 株の解析、第 92 回日本細菌学会関東支部総会、東京都、2009 年 11 月

20) 伊豫田淳：クレード解析による腸管出血性大腸菌の DNA 型別、第 13 回腸管出血性大腸菌シンポジウム、泉佐野市、2009 年 10 月

21) 伊豫田淳：腸管出血性大腸菌の分離状況と分離菌の特性について、平成 21 年度希少感染症診断技術研修会、東京都新宿区、2010 年 2 月

22) 大西　真、渡辺祐子、志牟田健、黒木俊郎、岡崎則男、渡邉治雄：染色体性セフェキシム耐性遺伝子 *penA* 遺伝子の淋菌株間での水平伝播、日本細菌学会関東支部総会，東京，2009

23) 大橋典男、千屋誠造、船戸豊彦、塩尻正明、高野愛、川端寛樹、安藤秀二、岸本壽男：国内初の新興感染症「ヒトアナプラズマ症」2 症例について、第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月

24) 加藤康幸、泉谷秀昌、水野泰孝、竹下望、金川修造：旅行者下痢症の微生物学的検討。第 49 回感染性腸炎研究会総会、東京都、2010 年 3 月

25) 川端寛樹、高野 愛、藤田博己、武藤麻紀、渡邉治雄：MLST 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

26) 川端寛樹、武藤麻紀、高野 愛、小笠原由美子、藤田博己、鶴見みや古、増沢俊幸、宮本健司、渡邉治雄：Multi-locus sequence typing 法による国内野生鳥類由来ボレリアと北海道患者由来ボレリアの遺伝子型別解析、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

27) 川谷慶太、増澤俊幸、岡本能弘、福井貴史、小泉信夫、宇根有美、吉田真一、Villanueva SYAM：簡便なレプトスピラ症診断薬開発のための基礎研究、第 47 回レプトスピラ・シンポジウム、東京、2010 年 3 月.

28) 河原井武人、成澤直規、米田早織、佐伯洋二、津金貴則、落合邦康、渡邉治雄、泉福英信：*Streptococcus mutans* の非水溶性グルカン非依存のバイオフィルム形成機序、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月

29) 神田隆、高橋奈緒美、杉山寛治、泉山信司、倉文明、遠藤卓郎：市販 DNA 抽出キットを用いたレジオネラ核酸検出法の検討、日本防菌防黴学会第 36 回年次大会、豊中市、2009 年 9 月

30) 倉　文明：レジオネラの基礎、国立保健医療科学院平成 21 年度短期研修細菌研修、和光市、2009 年 11 月

31) 倉　文明：レジオネラ症防止指針の改訂と最新の検査方法について、特別区職員研修平成 21 年度専門研修検査技術、東京、2009 年 9 月

32) 小泉信夫、谷川力、林栄治、赤尾信明、川端寛樹、渡辺治雄：東京都で発生したレプトスピラ症とドブネズミのレプトスピラ保有状況、第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月

33) 小泉信夫：アジアにおけるレプトスピラ症の現状、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

34) 小泉信夫：レプトスピラ症、第４０回沖縄県獣医学会、沖縄、2009 年 7 月

35) 小泉信夫：レプトスピラ症、平成 21 年度日本獣医師会学会年次大会、宮崎、2010 年 1 月

36) 肥田野新、今内覚、村瀬優介、山田慎二、伊東拓也、川端寛樹、小沼操、大橋和彦：シュルツェマダニ（*Ixodes persulcatus*）由来 Salp16 様遺伝子の同定と発現解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取、2009 年 9 月

37) 佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤了悦、斎藤博之、安部真理子、齊藤志保子、高橋守、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、川端寛樹、高野 愛：秋田県において 15 年ぶりに確認されたアカツツガムシ媒介性つつが虫病と感染推定地におけるツツガムシの生息状況調査、第 16 回リケッチア研究会、東京、2009 年 11 月

38) 佐藤寛子、柴田ちひろ、佐藤了悦、斉藤博之、安部真理子、斉藤志保子、高橋守、藤田博己、角坂照貴、高田伸弘、川端寛樹、高野 愛：秋田県における古典的つつがむ虫病患者の症例とツツガムシの生息状況調査の経過報告、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

39) 杉山寛治、神田 隆、高橋奈緒美、泉山信司、八木田健司、遠藤卓郎：循環ろ過式浴槽モデルにおけるクロラミン B の消毒効果、第 36 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪府豊中市、2009 年 9 月

40) 勢戸和子、田口真澄、寺嶋　淳：Molecular typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 by using the IS-printing System. IS-printing System による志賀毒素産生性大腸菌 O157 遺伝子型別の有用性、第 83 回日本細菌学会総、横浜市、2010 年 3 月

41) 泉福英信：オートインデューサー制御を利用した複合微生物の バイオフィルム形成について 、第 82 回日本生化学会シンポジウム、オーガナイザー、神戸、2009 年 10 月

42) 泉福英信、河原井武人、田村宗明、落合邦康：カテキン含有ジェルを用いた口腔ケアの口腔微生物に対する抗菌効果、第５７回日本化学療法学会、要望演題、東京、2009 年 6 月

43) 泉福英信：口の中のバイオフィルム、文部科学省科学技術振興調整費女性研究者支援モデル育成「キャリアウエイ・ユニバーサル化日大モデル」事業、オープンシンポジウム、東京、2010 年 3 月

44) 泉福英信：高齢者における体力と免疫力；活性化 NK 細胞との関係、第 64 回日本体力医学会シンポジウム、新潟、2009 年 9 月

45) 泉福英信、米田早織：歯科医療における院内感染対策の導入 における評価指標の確立、第 58 回日本口腔衛生学会・総会、岐阜、2009 年 10 月

46) 高田伸弘、藤田博己、安藤秀二、川端寛樹、矢野泰弘、高野　愛、岸本壽男：仙台市内河川敷にみるネズミ分布相の特性－広東住血線虫や紅斑熱感染環との絡みー、第 61 回日本衛生動物学会大会、香川、2009 年 4 月

47) 高野 愛、川端寛樹、武藤麻紀、小笠原由美子、藤田博己、鶴見みや古、渡邉治雄：国内で初めて見いだされた回帰熱ボレリアの感染性に関する研究、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

48) 高野 愛、川端寛樹、武藤麻紀、藤田博己、渡邉治雄：国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

49) 高野 愛、藤田博己、角坂照貴、今内覚、田島朋子、五箇公一、宇根有美、川端寛樹、渡邉治雄：爬虫類および爬虫類寄生マダニより発見された新群のボレリアとその性状解析、第 149 回日本獣医学会学術集会、東京、2010 年 3 月

50) 高野 愛、藤田博己、角坂照貴、今内覚、田島朋子、武藤麻紀、小笠原由美子、川端寛樹、渡邉治雄：国内産爬虫類寄生性マダニから見いだされたボレリアとそのマダニ体内での動態、第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取、2009 年 9 月

51) 高橋淳子、久保田佳子、畔上二郎、大島赴夫、小島幸一、香川（田中）聡子、神野透人、泉山信司、遠藤卓郎：モノクロラミン（塩素代替消毒剤）の皮膚一次刺激性に関する研究、第 36 回日本防菌防黴学会年次大会、大阪府豊中市、2009 年 9 月

52) 高橋淳子、香川（田中）聡子、久保田佳子、大島赴夫、小島幸一、泉山信司、神野透人、遠藤卓郎：公衆浴場における消毒副生成物の暴露評価、フォーラム２００９：衛生薬学・環境トキシコロジー、沖縄県宜野湾市、平成 21 年 11 月

53) 高橋英之、渡邉治雄：細胞感染時の髄膜炎菌の一過的なグルタミン酸の取込みが宿主細胞への侵入に必須である、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2009 年 3 月

54) 高橋英之：病原性ナイセリア属菌に関して、平成 21 年度希少感染症・細菌・初級コース（国立保健医療科学院主催）、東京、2008 年 11 月

55) Chang B, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H: Specific detection of viable Legionella cells from environmental samples by real-time PCR. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

56) 寺嶋　淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邉治雄：Molecular epidemiological investigation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan; Perspectives and problems. 腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学研究の現状と課題、第 83 回日本細菌学会総、横浜市、2010 年 3 月

57) 常盤俊大、赤尾信明、谷川力、小泉信夫、春成常仁、熊谷貴、太田伸生：千葉市のドブネズミから検出した広東住血線虫 *Angiostrongylus cantonensis* について、第 69 回日本寄生虫学会東日本支部大会、東京、2009 年 10 月

58) 常盤俊大、谷川力、小泉信夫、春成常仁、鈴木淳、角坂照貴、高田伸弘、Chalit Komalamisra、Urusa Thaenkham、小松謙之、熊谷貴、赤尾信明、太田伸生：国内で検出された広東住血線虫の分子系統解析、第 3 回蠕虫研究会、宮崎、2009 年 11 月

59) 土橋酉紀、田中好太郎、島田智、砂川富正、小泉信夫、谷口清州、岡部信彦：2008 年沖縄県本島におけるレプトスピラ症の実地疫学調査、第 9 回人と動物の共通感染症感染症研究会学術集会、東京、2009 年 11 月

60) 長野則之、池辺忠義、和田昭仁、長野由紀子、諏訪直生、外山雅美、荒川宜親：*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* による初めてのヒ

ト侵襲性感染症例.第 83 回日本感染症学会総会、東京、2009 年 4 月

61) 成澤直規、河原井武人、米田早織、渡邉治雄、泉福英信：*Streptococcus mutans* 自然変異株出現に影響する環境ファクターの探索、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月

62) 花岡希、松谷峰之介、川端寛樹、山本正悟、藤田博己、坂田明子、東 慶直、小川基彦、岸本寿男、白井睦訓、倉根一郎、安藤秀二：病原性 Rickettsia japonica グループにおける特異的 ORF の同定と検出系への応用、第 16 回リケッチア研究会、東京、2009 年 11 月

63) 藤田博己、高田伸弘、安藤秀二、川端寛樹、高野 愛、坂田明子：青森県における紅斑熱のベクター調査、第 55 回日本衛生動物学会北日本支部大会、帯広、2009 年 10 月

64) 藤田博己、高田伸弘、矢野泰弘、及川陽三郎、川端寛樹、安藤秀二、坂田明子、高野 愛：国内のキチマダニから分離された Rickettsia canadensis について、第 16 回リケッチア研究会、東京、2009 年 11 月

65) 藤田博己、高田伸弘、矢野泰弘、馬原文彦、川端寛樹、安藤秀二、岸本壽男、坂田明子：四国のマダニ類における紅斑熱群リケッチアの分離状況、第 61 回日本衛生動物学会大会、香川、2009 年 4 月

66) 藤田博己、大竹秀男、矢野泰弘、安藤秀二、川端寛樹、岸本壽男、坂田明子、高田伸弘：宮城県で確認できたマダニとマダニ保有リケッチア、第 61 回日本衛生動物学会大会、香川、2009 年 4 月

67) 本田尚子、伊豫田淳、渡邉治雄:LrhA differentially regulates Pch paralogues, master regulators for the LEE gene expression in EHEC、第 83 回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月

68) 前川純子、倉　文明、常　彬、菊川紀世己、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋　洋、河野喜美子、村井美代、渡邉治雄：*Legionella pneumophila* の遺伝子型別による菌株解析、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

69) 前川純子、倉　文明、常　彬、多田有希、金子紀子、渡辺祐子、磯部順子、貫名正文、中嶋　洋、河野喜美子、渡辺治雄：レジオネラ・ワーキンググループ：わが国のレジオネラ症患者由来株の血清群、遺伝子型、モノクローナル抗体型の分布、第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、2009 年 10 月

70) 松村隆之、池辺忠義、渡邉治雄、小林和夫、阿戸学：劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロンγ産生細胞の解析、第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010 年 2 月

71) 松谷峰之介、東慶直、小川基彦、花岡希、川端寛樹、倉根一郎、安藤秀二、岸本寿男、白井睦訓：日本紅斑熱の原因菌 *Rickettsia japonica* の全ゲノム配列解析、第 16 回リケッチア研究会、東京、2009 年 11 月

72) 三戸部治郎、柳原格、大西紀陽久、石浜明、渡辺治雄：桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ の RNA 結合活性を介した赤痢菌病原因子発現への関与。平成２２年３月第８３回日本細菌学会総会、横浜市、2010 年 3 月

73) 宮原美知子、森亮平、荒川英二：東京で市販されているアサリとハマグリの腸炎ビブリオ数と病原性因子（*tdh, trh*）変動の検討(H21.4-10)、第 43 回腸炎ビブリオシンポジウム、2009 年、岡山

74) 武藤麻紀、小泉信夫、山本正悟、相馬宏敏、渡辺治雄：宮崎県におけるイヌレプトスピラ症の発生とレプトスピラ分離株の性状解析、第 47 回レプトスピラ・シンポジウム、東京、2010 年 3 月

75) 武藤麻紀、小泉信夫、渡邉治雄：宮崎県におけるイヌのレプトスピラ症の発生とレプトスピラ分離株の性状解析、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

76) 村井美代、前川純子、渡邉治雄：Multiplex-PCR による黄色ブドウ球菌ファイブロネクチン結合タンパク A 領域の 17 の配列タイプの特定、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

77) 森田昌知、泉谷秀昌、渡邉治雄：2009 年に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の各種薬剤感受性の検討、第 49 回感染性腸炎研究会総会、東京、2010 年 3 月

78) 矢野泰弘、高田伸弘、岩崎博道、藤田博己、角坂照貴、及川陽三郎、田原研司、山本正悟、本田俊郎、平良勝也、安藤秀二、川端寛樹、岸本壽男：環東シナ海の島嶼に分布するツツガムシ、疫学的な連関は？、第 61 回日本衛生動物学会大会、香川、2009 年 4 月

79) 山内健生、 田原研司、 金森弘樹、 川端寛樹、 新井 智、 片山 丘、 藤田博己、 矢野泰弘、 高田伸弘、板垣朝夫：島根県の日本紅斑熱汚染地域におけるマダニ相、日本昆虫学会第 69 回大会、三重、2009 年 10 月

80) 山口博史、井口純、森田昌知、勢戸和子、渡邉治雄、大澤　朗：コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

81) 山崎利雄：結核菌のバイオセーフティ管理、サル疾

病ワークショップ、麻布大学、相模原、2009 年 7 月

82) 山崎利雄、山本三郎：結核菌の ATP 法による迅速薬剤感受性試験法の検討、第 79 回実験結核研究会、札幌、2009 年 7 月

83) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明：DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌の同定、第 58 回日本感染症学会東日本地方学術集会、東京、2009 年 10 月

84) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明：市販 DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) 法キットで同定できないレジオネラ属菌の同定、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

85) 山本章治、森田昌知、泉谷秀昌、渡邉治雄:Activation mechanisms of *tfoX* gene, encoding a competence regulator in *Vibrio cholerae*、第 83 回日本細菌学会総会、横浜、2010 年 3 月

86) 山本章治、森田昌知、泉谷秀昌、渡邉治雄：*Vibrio cholerae*におけるキチン誘導型形質転換能の制御機構、第 92 回日本細菌学会関東支部総会、東京、2009 年 11 月

87) 米田早織、成沢直規、河原井武人、泉福英信：*Streptococcus mutans* バイオフィルムの病原性調節遺伝子の解明、第 51 回歯科基礎医学会、新潟、2009 年 9 月

88) 米田早織、成澤直規、河原井武人、渡邉治雄、泉福英信：臨床分離株 *Streptococcus mutans* の新規バイオフィルム形成遺伝子とその働きについて、第 83 回日本細菌学会総会、神奈川、2010 年 3 月

89) 渡辺祐子、佐々木美江、磯部順子、田栗利紹、緒方喜久代、倉文明: レジオネラの外部精度管理に関する基礎的検討、第 22 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会、前橋市、2010 年 2 月

5．細 菌 第 二 部

部 長　荒 川 宜 親

概　要

細菌第二部は、第一室（抗生物質製剤の日局標準品の作製や一斉監視指導収去検査などの品質管理業務および各種の薬剤耐性菌やそれらによる感染症の調査や対策等に関する研究)、第二室（ヘモフィルスｂ型菌（Hib）ワクチンの品質管理と生物学的製剤の無菌試験、およびマイコプラズマ、インフルエンザ菌などに関する研究)、第三室（破傷風、ジフテリアの予防のためのトキソイドワクチンや各種の抗血清の品質管理業務および破傷風菌、ジフテリア毒素産生菌等に関する研究)、第四室（BCG製剤と精製ツベルクリンの品質管理業務と結核菌を含むヒト病原性抗酸菌（らい菌を除く）に関する研究)、第五室（百日咳ワクチンの品質管理業務、エンドトキシン試験、特殊毒性試験、生物統計および百日咳菌に関する研究）の５つの室で構成されている。担当する病原体や感染症としては、上記のように、主として呼吸器系感染症の原因となる病原細菌とともに全身感染症、日和見感染症、持続性慢性感染症などの起因菌、毒素産生偏性嫌気性菌などであり、それらについて、細菌学、感染症学などの観点から細菌の病原性（薬剤耐性を含む)、細菌感染症の病態などについて研究を進めている。さらに、薬剤耐性菌等による医療関連感染症の発生要因等に関して、分子疫学的側面からの解析研究、調査等を行なった。さらに、細菌ワクチンなどの生物学的製剤の品質管理業務に不可欠な各種の標準品等の製造と検定・検査に従事するとともに、部の基盤的研究として、病原体の検査や血清診断、ワクチン等の品質管理技術の向上を目指し、試験・検査法の改良等種々の検討や研究を行なった。

所掌事務に明記されている以外の病原細菌としては、現状および将来における細菌感染症対策を見据え、多剤耐性アシネトバクター、クロストリジウム・ディフィシル､バルトネラ属菌､ペニシリン低感受性Ｂ群連鎖球菌、コリネバクテリウム・ウルセランス、ヘリコバクター・ピロリ、類鼻疽菌などについて、病原性の解明、診断技術の向上、臨床分離菌の遺伝子型別、薬剤耐性機構の解明などの研究を実施した。

品質管理業務及び研究実績の詳細については担当室毎に後述するが、本年度に部として取り組んだ代表的な課題を以下に示す。

１．WHO（WPRO)、JICA などの各種海外支援（研究）プロジェクト、国際協力事業等に協力

２．WHO の“Collaborating Center for Research and Reference Services for Immunological and Biological Products”としての活動

３．厚生労働省の院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業の運用と改善に関する研究および運用支援

４．薬剤耐性菌研究事業費等に基づき、国内医療機関等からの解析依頼への対応と共同研究

５．Hib ワクチンの安全性に関する研究事業費による、ワクチンの品質等に関する研究

６．地方衛生研究所の細菌検査担当者に対する薬剤耐性菌の解析技術講習会

７．ジフテリア、百日咳、ボツリヌス症などの検査解析技術の向上と普及のため、地方衛生研究所の細菌検査担当者等を組織してのレファレンス活動

研究については、厚生労働科学研究費補助金による新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業、医薬安全総合研究事業、国際医学協力研究事業、難治性疾患克服研究事業、および、文部科学研究費補助金など様々な競争的研究費により実施された。

常勤職員の移動としては、平成21年4月1日付で松井真理が研究員（第一室）として採用された。平成21年7月1日付で齋藤良一が研究員（第五室）として採用され、平成22年3月31日付で東京医科歯科大学へ転出した。臨時職員（JANIS事業担当職員）として筒井敦子、臨時職員（事務補助、研究補助）として瀬川晶子、甲斐久美子、瀧世志江、小川(宮永)由弥子、南條友子、粕谷裕子、吉村由美子、増田まり子、久保田(松岡)眞由美、長岡芳昭、岡宮洋子、本郷有美子、鯵坂裕美が在籍した。客員研究員として新谷三春、協力研究員として黒川博史、川村久美子、長野則之、長野由起子、土井洋平、八木哲也、赤羽貴行、岩島康仁、坂本 崇、鈴木弘倫、玉井清子、鄭 波、中嶋知子、長沢光章、畑中公基、吹貝姿子、本間 操、前側恒男、村端真由美、森本泰隆、山下美穂子、山田幸司、流動研究員として大塚菜緒、石和玲子、加地千春、研究生として中村幸嗣、実習生として梅根安代、Risa Wong が在籍し、病原細菌等に関する様々な研究を行った。

業　績

調査・研究

Ⅰ．薬剤耐性菌に関する研究

１．薬剤耐性菌及び抗菌薬関連下痢症等に関する菌株・検体等の解析依頼の概要

医療機関等から依頼を受けた菌株・検体について、薬剤耐性遺伝子検査、毒素遺伝子検査、菌株タイピング解析、菌種同定、*Clostridium difficile* 分離同定、*C. difficile* 毒素検出等の解析を実施し、それらの結果を依頼施設に報告した。依頼菌株の菌種については、*Enterococcus* spp.（49 株）、*Staphylococcus* spp.（19 株）、*Streptococcus* spp.（172 株）、*Clostridium* spp.（233 株）、*Pseudomonas aeruginosa*（73 株）、*Escherichia coli*（310 株）、*Enterobacter cloacae*（5 株）、*Citrobacter* spp.（45 株）、*Proteus mirabilis*（1 株）、*Klebsiella* spp.（29 株）、*Acinetobacter* spp.（24 株）、*Morganella morganii*（1 株）、*Haemophilus influenzae*（71 株）、*Aeromonas hydrophila*（2 株）、*Photobacterium damsela*（1 株）、*Pasteurella multocida*（1 株）、*Listeria monocytogenes*（6 株）、*Neisseria meningitidis*（1 株）であった。なお、菌株等は感染研細菌第二部の管理番号（MRY 番号）を付与して保存した。［山根一和、松井真理、加藤はる、鈴木里和、甲斐久美子、吉村由美子、瀧世志江、筒井敦子、木村幸司、和知野純一、近田俊文、荒川宜親］

２．アシネトバクター属細菌の分子疫学的解析

2000 年から 2008 年にかけて、医療機関から分離されたアシネトバクター属細菌 106 株について遺伝子学的手法を用いて再同定を行った。医療機関で主に用いられる生化学的性状による同定法で *Acinetobacter baumannii* と報告された菌株には、実際は他の *Acinetobacter* spp.が多く含まれており *A. baumannii* と再同定された株の割合は約 35%であった。*A. baumannii* 21 株については、耐性遺伝子の解析及び multilocus sequence typing（MLST）による遺伝子型別を行った。日本独自と思われる新たな遺伝子型の株を同定した一方で、海外流行株と同一の遺伝子型を持つ株があることも明らかとなり、今後さらなる警戒が必要であることが示唆された。［松井真理、鈴木里和、山根一和、荒川宜親］

３．プラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子 *qepA* の LAMP 法による検出

薬剤耐性の表現型ではスクリーニングが難しいプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子のうち、*qepA* について LAMP 法による検出法を開発した。［山根一和、堀野敦子］

４．多剤耐性大腸菌の分子疫学研究

2000 年頃より基質拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌の分離が我が国も含め、世界各地で増加しており、世界的流行株の大腸菌 O25-ST131 の関与が示唆されている。これまでの報告のほとんどは ESBL 産生大腸菌 O25-ST131 に関する報告であったため、今回、いずれも ESBL 非産生の臨床検体由来大腸菌を収集し、MLST などのタイピング解析を行い ST131 クローンの頻度およびフルオロキノロン系抗菌薬耐性との関連について検討を行った。結果、ESBL 非産生の大腸菌、特に血清型 O25 の大腸菌においても ST131 が高い割合を占めていた。さらに、大腸菌 O25-ST131 は ESBL 非産生であってもフルオロキノロン耐性であるものがほとんどであることから、フルオロキノロン耐性大腸菌 O25-ST131 がまず先行して蔓延し、その後耐性遺伝子を獲得したことが示唆された。［鈴木里和、山根一和、松井真理］

５．バンコマイシン耐性腸球菌保菌にかかわるリスク要因のメタアナリシス

平成 21 年度に実施したバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）保菌の危険因子にかかわる症例対照研究より、胃酸分泌抑制剤（H2 ブロッカー、プロトンポンプ阻害剤）が危険因子であることが示唆された。そこで、これまでに報告されている同様の研究の論文を検索し、メタアナリシスによりこの知見を検討した。これまで胃酸分泌抑制剤と VRE との関連について調べた研究は乏しく、4 件の報告のみであったが、メタアナリシスの結果これらの二つの要因には統計学的に有意な関連が認められた。［鈴木里和、山根一和］

６．16S rRNA メチルトランスフェラーゼの X 線結晶構造解析

16S rRNA メチルトランスフェラーゼ NpmA の基質結合部位に S-adenosyl-L-homocysteine を導入し、共結晶を作製した。回折データの収集は放射光科学研究施設にて行い、高次構造を決定した。［和知野純一］

Ⅱ．抗菌薬関連下痢症／*Clostridium* spp.等に関する研究

１．*Clostridium difficile* BI/NAP1/027 株の loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法による検出

Clostridium difficile の BI/NAP1/027 株に特異的な *slpA* 遺伝子配列からプライマーを設計し、BI/NAP1/027 株の LAMP 法による迅速・簡便な同定法を開発した。［加藤はる］

２．*Clostridium difficile* の院内伝播に関する検討

３医療施設において *C. difficile* 感染症（CDI）症例から分離された 176 菌株において PCR ribotyping 解析を行った。病院 A では、3 タイプが時期や病棟に偏りなく優勢であった。病院 B では同一タイプが 70%を占め、本菌株が多くの症例に伝播したと考えられた。医療施設 C では、あるタイプ菌株による症例のクラスターは認めるものの、多数の症例に伝播している優勢株はなかった。病院 A および C で、欧米で流行株として問題となっている PCR ribotype 027 株（BI/NAP1/027）が分離された症例を各々の病院において 1 例ずつ認めた。［加藤はる、加地千春、吉村由美子、甲斐久美子、瀧世志江］［中村 敦、加藤秀章、岩島康仁、脇本幸夫、柴山順子、矢野久子、近藤優子（名古屋市立大学)］［赤羽貴行、床尾万寿雄、高橋一豊、小林厚幸、山田揚子、高橋郁美（安曇野赤十字病院)］［酒井 力、辻村秀樹、里村秀行、前田佐知子（千葉県がんセンター)］

３．解析を依頼された検体あるいは *Clostridium difficile* 菌株の検討

重症例からの検体や菌株、binary toxin 遺伝子陽性菌株について、特に、北米流行株 NAP1/027 株かどうかを含めて検討を行った。［加藤はる、吉村由美子、甲斐久美子、瀧世志江］

４．*Clostridium difficile* 感染症アウトブレイク疑い事例における菌株解析

山形県の医療施設において *C. difficile* 感染症アウトブレイク疑い事例があり、菌株解析が依頼された。糞便検体より *C. difficile* 分離培養を行い、タイピング解析を行ったところ、同時に 2 タイプの菌株が院内伝播していることがわかった。［加藤はる、加地千春、吉村由美子、甲斐久美子、瀧世志江、荒川宜親］［鈴木 聡、若松由起子、中嶋知子、庄司知摩（鶴岡市立荘内病院)］

５．*Clostridium difficile* 以外の *Clostridium* spp.の依頼解析

消化管穿孔症例から分離された *Clostridium perfringens* の解析を依頼され、major toxin および enterotoxin 遺伝子の検出解析を行った。［加藤はる、加地千春、吉村由美子、甲斐久美子、瀧世志江］

Ⅲ．マイコプラズマに関する研究

１．マイコプラズマ感染における肺外発症、特に関節炎の新規診断法の検討ならびに病態解析

マイコプラズマ感染による肺外発症については、症例、疫学報告は多いが、診断可能例は一部にとどまると考えられる。リウマチ性関節炎患者の関節液からの *Mycoplasma fermentans* 検出率が有意に高いという疫学報告に着目し、我々は、膝関節腔への生菌投与による関節炎動物モデルを作成している。この動物モデルを用いて、*M. fermentans* 新規診断系の評価ならびに *M. fermentans* 菌体成分による前処理の効果について検討した。結果として、新規診断法の *in vivo* での有用性が示され、また、前処理によりリンパ濾胞形成等の病態の変化が示唆された。［佐々木裕子、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)、松田和洋（産業技術総合研究所)、荒川宜親］

２．百日咳が疑われる患者における *Mycoplasma pneumoniae* 感染者が占める割合の検討

百日咳が疑われる患者に *M. pneumoniae* 感染者が占める割合について、LAMP 法を用いて 6 カ所の地方衛生研究所と協力して検討している。また、*M. pneumoniae* 陽性のサンプルについては、*p1* 領域における RFLP 法で型別を行い、*M. pneumoniae* の型の移行状況を観察中である。［堀野敦子、見理 剛、蒲地一成、鯵坂裕美］

Ⅳ．インフルエンザ菌／細菌性髄膜炎起因菌に関する研究

１．小児侵襲性感染症由来 *Haemophilus influenzae* の疫学的解析

平成 20 年度に引き続き 9 県で小児侵襲性感染症から分離された *H. influenzae* 39 株について、生物型別、血清型別、薬剤感受性試験等により解析を行った。また、平成 19 年ー20 年における分離株 107 株について、Multilocus sequence typing（MLST）解析を行った。血清型については全株がｂ型で、生物型については 1 型が優勢であった。β-ラクタマーゼ産生株は 39 株中 5 株（13%）であった。MLST 解析では、sequence type (ST) 54, ST190 が大多数を占め、ヨーロッパで多く分離される ST6 は少数であった。［加地千春、木村幸司、久保田（松岡）眞由美、佐々木裕子、加藤はる、荒川宜親］

２．小児細菌性髄膜炎培養陰性症例の起因菌推定

細菌性髄膜炎疑い症例において、培養陰性であった髄液検体について PCR により起因菌推定を行った。8 検体の培養陰性髄液検体のうち、1 検体において *Streptococcus pneumoniae* に特異的な遺伝子が検出され、残りの 7 検体

では陰性であった。［久保田（松岡）眞由美、佐々木裕子、木村幸司、加藤はる、荒川宜親］

Ⅴ．ジフテリア菌等に関する研究

１．ジフテリア菌ワクチン株 PW8 の接着因子遺伝子の解析

ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）PW8 株は、極めて病原性が低いと考えられているが、PAI のほとんどを持っていることを昨年報告した。*spaABC* 遺伝子の産物である線毛はジフテリア菌の宿主細胞への付着に重要であるが、PW8 株におけるそれらの遺伝子の配列を決定したところ、*spaA* と *spaB* には小規模な in-frame deletion が認められ、*spaC* においては 470bp の欠失による frameshift 変異が観察された。PW8 株においてはこの線毛が機能していないと考えられる。［岩城正昭、石和玲子、小宮貴子、高橋元秀］

２．ジフテリア菌の血球凝集活性における糖鎖の役割

ジフテリア菌の病原性メカニズムを考える上で、その血球凝集能は良い指標であるが、その機構はまだわかっていない。ジフテリア菌 ATCC700971（NCTC13129）株によるヒト赤血球凝集において、糖鎖の果たす役割を解析した。赤血球をあらかじめトリプシンまたはノイラミニダーゼそれぞれ単独で処理すると、未処理赤血球に比べて強い凝集が観察された。両方で処理された赤血球はさらに強い凝集を示した。血球表面の蛋白質が消化されることで糖脂質が露出し、糖鎖の末端シアル酸が除去されることで、菌の凝集因子による認識が促進される可能性が示された。［石和玲子、岩城正昭、髙橋元秀］

３．ジフテリア菌の溶血活性における糖鎖の役割

ジフテリア菌 C7(-)株は赤血球凝集活性を示さないが、溶血活性を有する。ジフテリア菌 ATCC27010（C7(-)）株によるヒト赤血球溶血において、糖鎖の果たす役割を解析した。C7(-)株の溶血活性は、ATCC700971（NCTC13129）株による赤血球凝集活性と異なり、トリプシンまたはノイラミニダーゼおよびその両方による赤血球の前処理によって影響を受けることはなかった。C7(-)株の溶血活性には、糖鎖が関与しないことが示唆された。［石和玲子、岩城正昭、髙橋元秀］

４．国内で分離された *Corynebacterium ulcerans* において見出された新規リボタイプ

rRNA 遺伝子の配列の相違に基づくリボタイピングは、ジフテリア菌の標準タイピング法である。ジフテリア類似の疾患の原因となる *C. ulcerans* についてもリボタイピングが標準法となりつつあり、現在までに 9 種のリボタイプが報告されている。昨年度、国内で最初に分離された *C. ulcerans* の 2 菌株が互いに異なることを見出したが、英国 Health Protection Agency と共同でデータベースとの照合を行なったところ、1 菌株は既知の U4 タイプ、もう１菌株は新規のリボタイプであることが判明した。［小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀］

５．ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア様患者の確認

平成 21 年 1 月にジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* による国内 6 例目のジフテリア様患者が確認された。平成 21 年 7 月 22 日、各都道府県衛生主管部長宛の結核感染症課長の通知で本症に対する周知と情報提供があった。その後の調査において一般家庭で飼育する猫から、また各地で当該菌が分離されている。我が国における本菌の分布および本菌による愛玩動物、人の潜在的な患者の発生把握が必要である。［小宮貴子、山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀（感染研）、地方衛生研究所及びジフテリアレファレンスセンター、日本小動物獣医会、東京医科歯科大学、大阪府立大学］

６．犬猫等における *Corynebacterium ulcerans* の調査及び解析

平成 21 年 11 月 14 日～平成 22 年 3 月 23 日までに、香川県及びその他の県の全国獣医師会理事会関係動物病院合計 18 施設から、イヌ、ネコのスワブ及び血清 199 検体と、大阪府と兵庫県の動物病院合計 3 施設で、ウルセランス調査を行った結果、ジフテリア毒素原性陽性の *C. ulcerans* 29 株が検出された。血中ジフテリア抗毒素は、25 検体から検出された。PFGE の結果、22 株はヒト由来岡山 2005 年株と同じタイプで、7 株はネコ由来静岡 2009 年株と同じタイプであった。［小宮貴子、高橋元秀］

７．ジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の PFGE タイプ検討

平成21年度までに国内で収集した合計103株のジフテリア毒素原性 *C. ulcerans*（ヒト、イヌ、ネコ、シャチ由来株）について、PFGE を行った結果、8 タイプに分類された。2005 年に岡山でヒト患者より分離された株と同じタイプが最も多く、74 株であった。［小宮貴子、高橋元秀］

Ⅵ．破傷風菌及びボツリヌス菌等に関する研究

１．日本国内の土壌での破傷風菌分離

破傷風は、*Clostridium tetani* が産生する神経毒素により、強直性痙攣をひき起こす疾患である。その芽胞が土壌中に広く常在し、創傷部から体内に侵入・感染が起こる。破傷風菌の土壌中の国内分布については、最近の全国的な調査は無い。そこで、今回 35 都道府県から 600 検体の土壌を採取し、その三分の二について菌の分布状況を調べた。土壌 300 検体について、30 カ所から破傷風菌が分離された。［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀］

２．黄砂からの嫌気性菌の分離

乳児ボツリヌス症は、日本国内の土壌ではほとんど分離されない A 型ボツリヌス菌の感染によって起こり、乳児に特異的に発生し長期の入院を強いる重篤な疾患である。1986 年より本邦において発生があり、これまでに 26 例を数える。このうち半数は、蜂蜜の摂食による事が明らかであるが残りの原因は明らかではない。そこで、毎年 3 月から 5 月に A 型ボツリヌス菌が土壌に多く存在する中国より飛来する黄砂を 6 箇所の環境衛生研究所の協力を得て採集し、嫌気性菌の分離を試みた。現在までに破傷風菌が 7 株分離された。［山本明彦、岩城正昭、見理剛、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀］

３．食品からのボツリヌス菌検出法における統一法の検討

食品からのボツリヌス菌検出法の統一法を作成することを目的に検討をしている。細菌試験法の基本である培養法に比べて、PCR 法などによる遺伝学的手法には新しい知見が報告される頻度が高い。このため原案として「ボツリヌス菌試験法（案）」と、新規の技術に対応して改正する頻度が高いと考えられる「分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（案）」の二部に分割して標準法検討委員会と協議中である。［高橋元秀、浅尾 努（日本食品分析センター）：厚生労働科学研究費補助金・食品の安心安全確保推進研究事業］

４．糖鎖を用いたボツリヌス毒素除去法

糖鎖を用いたボツリヌス毒素除去法を開発するため、前年精製した B 型ボツリヌス 16S 毒素のラクトース結合中空糸（DIC 株式会社との共同研究で供与）への吸着を試みた。中空糸 5cm^2 に、約 300000 マウス LD50 の精製毒素（Okra 株由来）を含む水溶液 1ml を加え一晩 4℃で震盪し、上清中の毒素量を Western blotting 法およびマウスを用いたバイオアッセイ法で調べたところ、90％以上の毒素が溶液中から除かれていることが確認された。この中空糸はボツリヌス 16S 毒素除去器具のための良い材料となりうることが示唆された。［石和玲子、岩城正昭、高橋元秀、荒川宜親］

Ⅶ．結核等抗酸菌に関する研究

１．結核菌のピラジナミド作用メカニズムの解析

結核の治療薬であるピラジナミドの作用機構の解析をおこなった。ピラジナミドの代謝に関わると予想される酵素に対する作用を解析するとともに、BCG でこの酵素の欠損株を作成した。［森茂太郎、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親］

２．非結核性抗酸菌の薬剤耐性メカニズムの解析

Mycobacterium avium の抗菌薬耐性に関与する因子として *kasB* 遺伝子を特定した。*kasB* 遺伝子は細胞壁構成成分であるミコール酸の生合成に関与していると予測された。*kasB* 遺伝子の変異体は、クラリスロマイシン、リファンピシン、ストレプトマイシンに対する感受性が野生株に比べ著しく増加していた。［和知野純一］

３．結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の機能構造相関解析

結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造を決定した。本酵素は α/β 構造をもつ C ドメインと N-tail ドメインから構成されていた。一次構造上で相同性を示すヌクレオチド加水分解酵素の立体構造と比較した結果、基質結合部位の近傍にあるアミノ酸残基の種類が異なっていた。変異株を用いた実験結果より、これらのアミノ酸残基は活性に重要な役割を担っていることが示された。［森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親］

４．新規抗酸菌鑑別法の開発

昨年度までに開発した新規抗酸菌鑑別法について、臨床現場での有用性を明らかにすることを目的として、臨床検体からの鑑別が可能か検討を進めた。［森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親、松本智成、阿野裕美（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター）］

Ⅷ．百日咳菌に関する研究

１．成人と小児における百日咳保菌量の解析

成人と小児における百日咳感染の実態を明らかにすることを目的に、リアルタイム PCR 法を用いて成人と小児患者における百日咳保菌量を解析した。その結果、患者鼻腔から採取される百日咳菌量は、乳児で平均 1.1×10^6

個、小児で 2.1×10^4 個、成人で 320 個と算出され、成人患者は小児に比較して有意に保菌量が低いことが判明した。なお、成人患者は病週に関わらず低い菌量を示し、病期による有意差を認めなかった。成人患者の百日咳保菌量は小児の 250 分の 1 程度であり、この低い保菌量が成人百日咳の非典型的な臨床像ならびに低い診断率の原因になっているものと考察された。[中村幸嗣、蒲地一成、鰺坂裕美、齋藤良一、鶴岡純一郎、勝田友博、立山悟志、徳竹忠臣、中島夏樹（聖マリアンナ医科大）、岡田賢司（福岡病院）、加藤達夫（国立生育医療研セ）、荒川宜親]

２．百日咳凝集素価法における凝集反応用抗原の改良

百日咳の血清診断に用いられる菌凝集素価法について、診断精度の向上を目的に凝集反応用抗原の改良を行った。凝集抗原である東浜株と山口株に共通する凝集因子 1 を解析した結果、凝集因子 1 は virulence associated gene にコードされる Vag8 と同定された。そこで、相同組み換えにより東浜株と山口株の Vag8 欠損株を作製し、両株における Vag8 欠損をイムノブロット法により確認した。現在、これら Vag8 欠損株の凝集反応用抗原としての有用性を評価している。[齋藤良一、岡田賢司（福岡病院）、権平文夫（デンカ生研）、渡辺峰雄（北里大）、蒲地一成]

３．百日咳流行株における定着因子 Prn の欠損とその欠損機構に関する研究

わが国で臨床分離された百日咳菌について、定着因子 Prn 欠損株の流行状況ならびに Prn 欠損機構の検討を行った。その結果、Prn 欠損株はワクチン型（*ptxA2/prn1*）の流行株に特徴的に認められ、さらに近年ではワクチン型の約 7 割を占めることが判明した。また、Prn 欠損機構の解析では、１）Prn シグナル配列の欠失、２）IS*481* の *prn1* 構造遺伝子への挿入、という 2 種類の機構が見出された。近年、Prn 欠損株の分離率が上昇傾向にあり、Prn 欠損は百日咳菌の生存に有利に働いているものと考察された。[大塚菜緒、蒲地一成、鰺坂裕美、中村幸嗣、齋藤良一、荒川宜親]

４．遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランスシステムの構築と評価に関する研究

百日咳流行の早期探知を目的に、遺伝子検査に基づく百日咳サーベイランスシステムの構築を行った。地方衛生研究所 6 機関（秋田、東京、神奈川、大阪、愛媛、高知）の協力を得て、2009 年 9 月より百日咳疑い患者を対象に百日咳 LAMP 検査を開始した。2010 年 3 月までの検査実績は 125 件であり、そのうち 10 件（8.0%）が検査陽性を示した。高知県では陽性例 8 件を示したが、県内での集団感染や地域流行は確認されなかった。[蒲地一成、鰺坂裕美、八柳潤（秋田衛研）、奥野ルミ（都健安研セ）、高橋智恵子（神奈川衛研）、勝川千尋（大阪公衛研）、烏谷竜哉（愛媛衛研）、松本一繁、藤戸亜紀（高知衛研）]

Ⅸ．*Helicobacter pylori* に関する研究

１．*Helicobacter pylori*のasparaginaseの解析

*H. pylori*のasparaginaseを精製して、病原性への関与を調べた。感染局所で、宿主の正常な代謝をかく乱することが病原性発揮のメカニズムと考えられた。[柴山恵吾、森茂太郎、和知野純一、荒川宜親]

２．*Helicobacter pylori*のGGTの発現様式の解析

H. pylori の GGT の遺伝子のプロモーターを同定し、遺伝子の発現様式を mRNA と蛋白レベルで解析した。GGT は恒常的に発現されていることが分かった。[和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親]

Ⅹ．類鼻疽菌に関する研究

１．類鼻疽菌の同定

類鼻疽菌感染が疑われた患者由来の菌の同定検査 1 件を行政依頼検査として受け付けた。培養法、LAMP 法、生化学試験ならびに補助的にモノクローナル抗体凝集反応を行った結果、この菌株は類鼻疽菌であると同定された。[堀野敦子、山根一和]

２．国内で分離された類鼻疽菌のタイピング

国内で分離された類鼻疽菌 6 株についてパルスフィールドゲル電気泳動法を用いたタイピングを行った。6 株のうち 4 株は異なるバンドパターンを示したが、2 株は同様の PFGE のバンドパターンで、この 2 株は同一の患者の初感染株と再燃時に採取された株であった。[山根一和、堀野敦子]

Ⅺ．生物学的製剤に関する研究

１．ヘモフィルス b 型ワクチン（破傷風トキソイド結合体）の免疫原性試験の品質管理への応用についての検討

ヘモフィルス b 型（Hib）ワクチン（破傷風トキソイド結合体）の品質管理、特に、ワクチン効果評価系として Hib 莢膜多糖抗原であるポリリボシルリビトール三リン酸（PRP）含有量については、リン総量からの計算値を用いた多糖含量試験がある。しかしながら、Hib ワクチンの抗原性は、PRP 含有量のみならず、PRP-キャリア蛋白結合体量や、アジュバントを含む抗原性干渉物質によ

る影響を受けることから、ワクチンの免疫原性試験の品質管理への応用について検討を開始した。昨年度までに作成したラットを用いた免疫原性試験を用いて、市販Hibワクチン5ロットについて､その免疫原性を調べた。抗PRP抗体価測定には、ヒト用抗 *Haemophilus influenzae* Enzyme Immunoassay kit （BINDAZYME^{TM}, The Binding site社）内のPRPプレートを用い、二次抗体にはビオチン標識抗ラットIgG抗体を用いた。検討の結果、標準血清の選定の必要性、動物におけるHibワクチン免疫原性の容量反応性といった問題点が明らかになった｡[佐々木裕子、木村幸司、久保田(松岡)眞由美、増田まり子、長岡芳昭、加藤はる、荒川宜親]

２.ラットによる市販乾燥ヘモフィルスb型ワクチン(破傷風トキソイド結合体）の破傷風トキソイドの力価

Hibは、キャリア蛋白として破傷風トキソイドを含み、また、DPTと接種時期が重複している。そのために、短期間にこれらのワクチンを接種される事による乳児へは、これらのワクチンの双方から破傷風トキソイド抗原を受け取ることになる。そこで、各種動物を使用して、国内市販のHibとDPTを用い、(1) DPT単独で、(2) Hib単独で、(3) DPTとHibを混合し、(4) DPTとHibをそれぞれ異なる部位に、接種し、力価を測定した。その結果、ラットでは、それぞれ(1) 159 U/mL、(2) 193 U/mL、(3) 2986 U/mL、(4) 603 U/mLの力価を示した。[福田 靖、岩城正昭、見理 剛、山本明彦、小宮貴子、高橋元秀]

３．インフルエンザワクチンのマウス白血球数減少試験の再評価に関する研究

マウス白血球数減少試験の精度向上を目的に、マウス系統および週齢が試験精度に与える影響について検討した。ddY、C57BL/6、BALB/cマウスの4、6、8週齢を比較した結果、全粒子ワクチン投与群と生理食塩水投与群の白血球数はすべての系統・週齢で有意差を示し、特にddY 4週齢マウスおよびBALB/c 6週齢マウスで大きな有意差が認められた。次に、高濃度（600 μg/mL）ならびに小分け製品相当のワクチン液（200 μg/mL）をddY 4週齢マウスに接種し、白血球数減少活性の用量依存性を検討した。その結果、用量に依存したマウス白血球数減少活性は認められず、現行のHAワクチンには白血球数減少を引き起こす生理活性物質はほとんど存在しないものと推察された。本試験の精度を考慮した場合、高濃度ワクチン液で試験を実施するとともに、それに併せた基準値見直しの必要性が指摘された。[持田恵子、福田 靖、齋藤良一、鰺坂裕美、蒲地一成]

４．沈降精製百日せきワクチンの力価試験における観察期間の短縮に関する検討

百日せきワクチンの力価試験は免疫マウスを百日咳菌で攻撃し､その症状及び生死を14日間観察する｡そこで、この観察期間が短縮可能であるか否かを検討したところ、観察14日後の力価と観察12、10、7日後の力価の相関係数はそれぞれ0.967、0.935、0.778を示した。一方、攻撃菌のLD_{50}測定ではその発症が遅れるため、観察10日以内では安定した結果が得られなかった｡以上の結果から、現行の生物学的製剤基準のもとでは､観察期間14日から12日への短縮が可能と考えられた｡[福田 靖､齋藤良一、持田恵子、鰺坂裕美、蒲地一成]

Ⅻ．抗生物質製剤に関する研究

１．日本薬局方抗生物質標準品と海外抗生物質標準品の表示力価の比較検討に関する研究

抗生物質標準品の表示力価について、日本（JP)、米国（USP)、ヨーロッパ（EDQM）の３局の標準品ロットを用いて日本薬局方「抗生物質の微生物学的力価試験法」で比較検討を行っている。今年度は、ペニシリン系抗生物質を中心に実施し､データを解析中である｡[近田俊文、南條友子、鈴木里和、山根一和、松井真理、森茂太郎、粕谷裕子]

レファレンス業務

Ⅰ．薬剤耐性菌関係

１．バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）検査のためのコントロール菌株及び標準作業手順書（SOP）の提供

地方衛生研究所等の遺伝子検査等に協力するために、VREの耐性遺伝子検出のコントロール菌株（DNA抽出物を含む）及びSOPを、地方衛生研究所等に提供した。[近田俊文、鈴木里和、山根一和、加藤はる、松井真理、甲斐久美子、吉村由美子、瀧世志江、筒井敦子、荒川宜親]

２．薬剤耐性菌の耐性遺伝子検査のためのコントロール菌株及び検査データ資料の提供

地方衛生研究所及び医療機関等の基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の遺伝子検査等に協力するために、それらのコントロール菌株（DNA抽出物を含む）を検査データ資料とともに提供した。[近田俊文、山根一和、鈴木里和、松井真理、甲斐久美子、吉村由美子、瀧世志江、筒井敦子、荒川宜親]

Ⅱ．百日咳関係

１．百日咳 LAMP 診断キットの供与

百日咳実験室診断の強化・拡充を目的に、地方衛生研究所 7 施設に百日咳 LAMP 診断キット（20 キット）の供与を行った。また遺伝子検査用陽性コントロール DNA を 2 施設に供与した。［齋藤良一、鯵坂裕美、蒲地一成］

Ⅲ．ボツリヌス関係

１．ボツリヌス毒素の高感度検出系キット試作及び抗毒素抗体作製と提供

マウス接種法に代わるボツリヌス毒素の高感度検出系としてサンドイッチイムノ PCR 法の開発を目出し、A 型神経毒素の検出系を作製し、試験法マニュアル、試験に必要な抗体および試験キットの調整・準備を整えた。また、予備試験として利便性の高いボツリヌス A 型毒素検出用のイムノクロマトキットを作製し 18 ヶ所の地方衛生研究所に配布した。さらに、クロストリディアが産生する毒素を中和する抗毒素抗体を作製して、地研に配布した。［高橋元秀、見理 剛（感染研）、向本雅郁、幸田幸子（大阪府立大）、高山勝好、小林行治（(株)アドテック）、大隈邦夫、千北一興（(財)化血研）：厚生労働科学研究費補助金・新興・再興感染症研究事業］

サーベイランス業務

Ⅰ．院内感染対策関係

１．厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）の運営

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）は検査部門、全入院患者部門、手術部位感染（SSI）部門、集中治療室（ICU）部門、新生児集中治療室（NICU）部門の 5 部門より構成されており、平成 22 年 2 月現在、全国の 867 医療機関が参加している。院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況、薬剤耐性菌による感染症の発生状況などに関する情報を参加医療機関に還元するほか、一般への情報公開も行っている。倍増した問い合わせ（平成 21 年度 1260 件）への対応のほか、ホームページの全面更新や仕様確認書の作成などを行った。［筒井敦子、鈴木里和、山根一和、小川（宮永）由弥子、瀧世志江、荒川宜親］

２．院内感染対策サーベイランス事業におけるデータ解析手法に関する検討

厚生労働省事業・院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）の全入院患者部門で収集された現行のデータ解析手法に関する検討を行った。院内感染の発生率を算出する方法には分母として「入院患者あたり」と「患者日あたり」のいずれかを使用するのが一般的であり、JANIS 全入院患者部門では各薬剤耐性菌感染症の罹患率を「入院患者あたり」で算出している。今回、実際のサーベイランスデータを用いて「患者日あたり」の罹患率も併せて算出したところ、平均在院日数の長い一部の病院では、施設間比較を行う際に二つの罹患率が乖離した結果を示すことが明らかになった。次回のシステム更新の際は平均在院日数を中心に、施設特性別の解析が必要と思われた。［鈴木里和、山根一和］

Ⅱ．B 群連鎖球菌関係

１．膣由来 B 群連鎖球菌におけるペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌サーベイランス

2007ー2008 年に国内の妊婦膣から分離された B 群連鎖球菌 144 株について、ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌の有無をディスク拡散法で検討した結果、ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌は検出されなかった。［木村幸司、松原康策（西神戸医療センター）、山本 剛（西神戸医療センター）、荒川宜親］

Ⅲ．百日咳関係

１．百日咳の病原体診断

医療機関（23 施設）からの依頼を受けて、百日咳患者の病原体診断を 71 件実施した。［鯵坂裕美、齋藤良一、蒲地一成］

品質管理に関する業務

Ⅰ．生物学的製剤の品質管理に関する業務研究

１．医薬品を巡る環境の変化等に対応した生物学的製剤基準の改正のための研究

厚生労働科学研究班（標記研究）の分担研究者として、DPT 関連の細菌ワクチンおよび抗毒素について、生物学的製剤基準の見直しが必要か、また必要であればどのような見直しかについて検討を行っている。初年度である本年度は、DPT ワクチンのアルミニウム含量および力価基準値、ジフテリア（D）および破傷風（T）トキソイドの無毒化試験法、Hib ワクチンのキャリアとして用いられる T トキソイドの破傷風力価について、および抗破傷風人免疫グロブリン力価試験法について検討した。これらの事項については、今後検討を継続する。［岩城正昭、山本明彦、見理 剛、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀］

２．乾燥 BCG 膀胱内用（コンノート株）の生物学的製剤基準の改定に関する研究

厚労省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医薬品を巡る環境の変化等に対応した生物学的製剤基準の改定のための研究」の研究協力者として、乾燥 BCG 膀胱内用（コンノート株）の生物学的製剤基準に関してメーカーより提案された改定案の検討を行い、特に問題ないと結論づけた。[柴山恵吾]

３. 蛇ウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制の WHO ガイドライン案への対応

蛇ウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制の WHO ガイドライン案（GL）が 2008 年に示され、その国内対応として規制当局が参考に資することができるよう、WHO-GL を踏まえた上述の規制を見直す。国内製剤に関するハードの充実・改善点を具体化し、不足の部分においてはソフトで対応することを検討中である。わが国で製造・品質管理するウマ抗毒素製剤は 5 種類 6 製剤があり、将来的にはこれらすべてのウマ抗毒素製剤の GL 適応を視野に研究をおこなう。[高橋元秀、見理 剛、山本明彦、岩城正昭（感染研）、大隈邦夫、銀永明弘（化血研）、玉那覇康二（沖縄県衛生環境研究所）、一二三亨（(独)災害医療センター）、小崎俊司（大阪府立大）、櫻井信豪（(独)総合機構）、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]

４．国内の品質保証制度における WHO 指摘事項・ガイドライン等への対応

国内の品質保証制度にあっては WHO が求める指摘事項・ガイドライン等への対応は、SLP の導入が指摘されている。過去に感染研で実施した EPI ワクチンの SLP 対応モデルについて整理して、今後の SLP 導入のあり方を考察した。ロットリリースにおける SLP 評価と GMP 査察の連携に関して日本版の対応策を提言することにより、国際標準基準に基づいて品質管理されたワクチンの受給体制が確保される。[高橋元秀、柴山恵吾、荒川宜親、渡辺治雄、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]

５．乾燥 BCG ワクチン（最終製品）の国家検定

乾燥 BCG ワクチン（最終製品）の 1 ロットで、検定項目の試験は全て合格したが、溶解不良のアンプルが見つかった。監視指導麻薬対策課に報告し、最終的にメーカーが自主的に当該ロットの出荷を取りやめることとなった。[柴山恵吾、堀野敦子、和知野純一]

６．BCG ワクチンの国家検定項目の削減

乾燥 BCG ワクチン、乾燥 BCG 膀胱内用（日本株）、乾燥 BCG 膀胱内用（コンノート株）の有毒結核菌否定試験について、国家検定の実施の必要性を検討し、廃止した。乾燥 BCG 膀胱内用（コンノート株）の菌量測定試験について、国家検定の実施の必要性を検討し、廃止した。[柴山恵吾、浜口 功・大隈 和（血液安全性研究部）、森川 茂・西條政幸（ウイルス第一部）、加藤 篤（ウイルス第三部）、網 康至（動物管理室）、落合雅樹（品質保証室）、和田昭仁（細菌第一部）]

７．BCG ワクチンの依頼検査項目の削減

ユニセフ向け乾燥 BCG ワクチンのロットリリースにあたって依頼試験で実施している皮膚反応試験について、感染研での試験の実施の必要性を検討し、廃止した。[柴山恵吾、浜口 功・大隈 和（血液安全性研究部）、森川 茂・西條政幸（ウイルス第一部）、加藤 篤（ウイルス第三部）、網 康至（動物管理室）、落合雅樹（品質保証室）、和田昭仁（細菌第一部）]

Ⅱ．抗生物質製剤の品質管理に関する業務研究

１．収去検査による抗生物質医薬品の品質管理研究

今年度の医薬品等一斉監視指導での収去検査は、抗生物質医薬品の注射剤（注射用セフタジジム：14 ロット）について力価試験（HPLC 定量法）、確認試験（IR 及び NMR 解析）、エンドトキシン試験を、経口剤（セフポドキシムプロキセチル錠:4 ロット／シロップ用:2 ロット）ついて力価試験（HPLC 定量法）、確認試験（IR 及び NMR 解析）を行い、検査結果を報告した。なお、注射剤の後発品 1 ロットの力価試験において、含量不足につき「不適合」と判定され、厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課薬事監視第二係に 3 月 5 日付で緊急に中間報告を行った。その他の収去ロットは全ての試験で「適合」と判定された。[近田俊文・松井真理・森茂太郎・山根一和・鈴木里和・南條友子・粕谷裕子（細菌第二部第一室）、荒川宜親（細菌第二部）、宮崎義継・村上裕子・石野敬子・石川 淳・金子幸弘（生物活性物質部）、細菌第二部第五室、血液・安全性研究部第三室]

Ⅲ．標準品の整備並びに品質管理に関する業務研究

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法での品質評価に関する業務研究

日本薬局方抗生物質標準品について、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法

（Bioassay）に準拠した定量法による品質評価試験を行った。サブロット更新を含め 5 品目（新規 2 品目、サブ 3 品目）の評価、再評価が完了し、新規・更新ロット標準品の交付を行った。なお、1 品目では純度試験（紫外可視吸光度測定法）による品質評価試験も行った。［鈴木里和、松井真理、森茂太郎、山根一和、南條友子、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フィー法での品質評価に関する業務研究

日本薬局方抗生物質標準品について、日局各条（原薬）収載の液体クロマトグラフィー法（HPLC）に準拠した定量法による品質評価試験を行った。サブロット更新を含め 10 品目（新規 4 品目、サブ 6 品目）の評価が完了し、新規・更新ロット標準品の交付を行った。更に、2001ー2003 年度に品質評価した新規日局標準品（12 品目）について、HPLC 法による定量法で再評価試験を行い、品質上に問題ないことを確認した。［松井真理、森茂太郎、山根一和、粕谷裕子、鈴木里和、南條友子、近田俊文］

Ⅳ．国家検定、国家検査、収去検査、承認前検査、依頼試験等の実績

１．国家検定の実績

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン（最終段階）：24 ロット

沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド：5 ロット

沈降破傷風トキソイド：10 ロット

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに使用するジフテリアトキソイド原液：10 ロット

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに使用する破傷風トキソイド原液：6 ロット

乾燥まむしウマ抗毒素：1 ロット

乾燥ジフテリアウマ抗毒素：1 ロット

抗破傷風人免疫グロブリン：7 ロット

乾燥ヘモフィルス b 型ワクチン（破傷風トキソイド結合体）：13 ロット

インフルエンザ HA ワクチン（季節型）：70 ロット

インフルエンザ HA ワクチン（新型）：76 ロット

人血清アルブミン：295 ロット

加熱人血漿たん白：20 ロット

肺炎球菌ワクチン：20 ロット

沈降 7 価肺炎球菌結合型ワクチン（無毒性変異ジフテリア毒素結合体）：6 件

乾燥BCGワクチン（最終製品）：17ロット

乾燥BCG膀胱内用（日本株）（最終製品）80mg：3ロット

乾燥BCG膀胱内用（日本株）（最終製品）40mg：3ロット

乾燥BCG膀胱内用（コンノート株）：7ロット

乾燥BCGワクチン（中間段階）：15ロット

乾燥BCG膀胱内用（日本株）（中間段階）：5ロット

精製ツベルクリン一般診断用（1μg）：1ロット

精製ツベルクリン一般診断用（一人用）：8ロット

経口生ポリオワクチン：1 ロット

２．国家検査（行政検査）の実績

（１）薬剤耐性菌関係

福岡市内の医療機関において *Acinetobacter baumannii* の院内感染疑いについて、福岡市長から細菌行政検査の依頼を受けた。30 株の多剤耐性 *A. baumannii* はすべて PFGE によるタイピング解析で同一もしくは非常に類似したバンドパターンを示した（cluster B）。これらの菌株は 2008 年から 2009 年にかけて大学病院に関連して分離されており、特定の株に由来する同じ遺伝的背景を有する菌株が患者間で伝播したこと強く示唆する結果であった。1 ～2 剤耐性の *A. baumannii* のうち、cluster A, cluster C に分類された株が示すように、2005 年～2007 年、2009 年に大学病院救命センターの複数の入院患者から類似したバンドパターンを示す株が分離されており、これら 1 ～2 剤耐性の *A. baumannii* も多剤耐性菌同様に患者間で伝播していたと思われた。Sporadic と分類された感性の *A. baumannii* や一部の 1～2 剤耐性の *A. baumannii* は個々に異なるバンドパターンであり、これらの株が患者間で伝播したことを否定する所見であった。（細菌行政検査：第 87152 号、第 87153 号、第 87157 号）［鈴木里和、松井真理、近田俊文、荒川宜親］

（２）ジフテリア関係

ア）平成 21 年 8 月 21 日福島県衛生研究所から、ジフテリア疑患者の咽頭スワブと血清 1 本について、ジフテリアの検査依頼を受けた。検査の結果、ジフテリア菌、ジフテリア毒素遺伝子及び毒素は検出されず、血中ジフテリア抗毒素価は、0.371 IU/ml であった。（細菌行政検査：第 97041 号、第 97052 号）［小宮貴子、高橋元秀］

イ）平成 21 年 11 月 6 日愛媛県立衛生環境研究所から、ネコ由来 1 菌株（羊血液寒天培地 1 枚）について、ウルセランスの検査依頼を受けた。検査の結果、菌株は、ジフテリア毒素原性陽性の *C. ulcerans* と同定された。この菌株のグリコーゲン分解能は非常に低く、アピコリネ同定試験では「*C. pseudotuberculosis*」の可能性が高いと出

たが、追加試験として、トレハロース試験、*rpo* B 遺伝子検査、PFGE を行った結果、*C. ulcerans* と最終同定された。(細菌行政検査：第 97085 号)［小宮貴子、高橋元秀］

ウ)平成 22 年 1 月 15 日愛媛県立衛生環境研究所から、イヌ由来 1 菌株、ネコ由来 3 菌株（羊血液寒天培地 4 枚）について、ウルセランスの検査依頼を受けた。検査の結果、4 菌株は全て、ジフテリア毒素原性陽性の *C. ulcerans* と同定された。この 4 菌株のグリコーゲン分解能は非常に低く、アピコリネ同定試験では「*C. pseudotuberculosis*」の可能性が高いと出たが、追加試験として、トレハロース試験、*rpo* B 遺伝子検査、PFGE を行った結果、*C. ulcerans* と最終同定された。(細菌行政検査 : 第 97107 号)［小宮貴子、高橋元秀］

（３）破傷風関係

ア）平成 21 年 4 月 2 日付で、久留米市から患者創傷部か皮及び膿からの菌分離及び患者血清中の破傷風毒素の検出及び抗破傷風毒素抗体価の測定の依頼を受けた。患者創部及び膿より検出された菌について、その培養上清はマウスを用いた毒素原性試験により破傷風毒素を検出限度以下であった。また、患者血清には破傷風毒素も抗破傷風毒素抗体も検出限度以下であった。(細菌行政検査：第 97003 号)［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

イ）平成 21 年 8 月 3 日付で、高知県衛生研究所から破傷風毒素の検出及び抗破傷風抗体価の測定の依頼を受けた。患者血清には破傷風毒素も抗破傷風毒素抗体も検出限度以下であった。(細菌行政検査：第 97034 号)［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

ウ）平成 21 年 10 月 27 日付で、福島県環境保健研究所より患者創傷部から分離された菌について、破傷風毒素原生試験の依頼を受けた。分離菌のクックドミート培養上清中には、破傷風毒素が検出された。(細菌行政検査：第 97074 号)［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

（４）ボツリヌス関係

平成 21 年 9 月 3 日付で、福山市保健所より乳児ボツリヌス症疑い患者の血清及び便中のボツリヌス毒素、菌検出検査依頼を受けた。検査の結果、患者の血清及び便中のボツリヌス毒素は検出限界以下であった。また、ボツリヌス菌も分離されなかった。(細菌行政検査 : 第 97065 号)［見理 剛、高橋元秀］

（５）BCG関係

ア）依頼検査として、ユニセフ向け乾燥BCGワクチン（皮内用0.5mg）5ロットについて実施した。［堀野敦子、森茂太郎、和知野純一、山根一和、柴山恵吾］

イ）書類審査として、ユニセフ向け乾燥BCGワクチン（皮内用0.5mg）47ロットについて実施した。［堀野敦子、和知野純一、山根一和、森茂太郎、柴山恵吾］

（６）精製ツベルクリン関係

依頼検査として、精製ツベルクリンの試作品の力価試験を 3 ロットについて実施した。［和知野純一、持田恵子、堀野敦子、山根一和、柴山恵吾］

（７）マイコプラズマ関係

千葉県よりマイコプラズマ肺炎後の髄膜炎起因菌についての検査依頼があり実施したが、結果は陰性であった。(細菌行政検査：第 97047 号)［堀野敦子、佐々木裕子］

（８）*Clostridium difficile* 関係

Clostridium difficile 感染のアウトブレイクが認められた医療機関から、さいたま市健康科学研究センターを通じて糞便検体の解析が依頼され（平成 22 年 3 月 5 日、3 月 17 日）、*C. difficile* の分離培養、分離菌株の解析を行った。医療機関に対する感染管理指導に関して、さいたま市保健福祉局保健所に助言指導をした。(細菌行政検査：第 97125 号、第 97128 号)［加藤はる、加地千春、吉村由美子、甲斐久美子、瀧世志江、荒川宜親］

３．収去検査の実績

（１）抗生物質医薬品

注射剤（注射用セフタジジム）(力価試験、エンドトキシン試験)：14 ロット

経口剤（セフポドキシムプロキセチル錠）(力価試験)：4 ロット

経口剤（シロップ用セフポドキシムプロキセチル）(力価試験)：2 ロット

４．承認前検査及び抜取検査等の実績

（１）無菌試験：12 件（抜取 8 件、依頼 4 件）

（２）沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1）原液：1 件

５．標準品、参照品等の交付・分与の実績

（１）交付実績

日本薬局方抗生物質標準品（94 品目）：計 930 本

抗生物質試験用菌株（1 品目）：1 本

標準ジフテリアトキソイド：10 本
標準沈降ジフテリアトキソイド：40 本
参照沈降ジフテリアトキソイド（混合ワクチン用）：83 本
標準ジフテリア抗毒素：13 本
参照ジフテリア抗毒素（フロキュラシオン用）：38 本
ジフテリア試験毒素（ウサギ試験用）：1 本
ジフテリア試験毒素（モルモット試験用）：5 本
ジフテリア試験毒素（培養細胞法用）：29 本
シック試験毒素（動物用）：7 本
標準破傷風トキソイド：17 本
標準沈降破傷風トキソイド：71 本
参照破傷風トキソイド（混合ワクチン用）：33 本
標準破傷風抗毒素：10 本
参照破傷風抗毒素（フロキュラシオン用）：48 本
破傷風試験毒素：31 本
はぶ試験毒素（出血Ⅰ）：10 本
はぶ試験毒素（出血Ⅱ）：15 本
標準まむし抗毒素：2 本
標準ボツリヌス A 型抗毒素：5 本
標準ボツリヌス B 型抗毒素：3 本
標準ボツリヌス E 型抗毒素：3 本
標準ボツリヌス F 型抗毒素：3 本
標準百日せきワクチン：47 本
参照百日せきワクチン（毒性試験用）：73 本
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：15 箱（180 本）
標準精製ツベルクリン：60本
BCG Tokyo172-1：12本

（2）分与実績

標準ジフテリア抗毒素：大阪府立大学大学院、ミロクメディカルラボラトリー：各 1 本
ジフテリア抗毒素（エレク用）：ミロクメディカルラボラトリー：2 本
ジフテリア試験毒素（培養細胞法用）：大阪府立大学大学院、ミロクメディカルラボラトリー：各 2 本
VERO 細胞：大阪府立大学大学院：1 本
Corynebacterium diphtheriae PW 8：大分県衛生環境研究センター、大阪府立大学大学院、栃木県保健環境センター、富山県衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所、ミロクメディカルラボラトリー：各 1 本
Corynebacterium ulcerans（ジフテリア毒素産生株）：大分県衛生環境研究センター、大阪府立大学大学院、栃木県保健環境センター、愛媛県立衛生環境研究所、富山県衛生研究所、山口県環境保健センター、石川県保健環境センター、徳島県保健環境センター：各 1 本
Corynebacterium diphtheriae（ジフテリア毒素非産生株）：ミロクメディカルラボラトリー：1 本
ボツリヌス毒素検出・診断用ガス壊疽抗毒素（*C. perfringens*、*C. septicum*、*C. oedematiens*）、ボツリヌス毒素検出・診断用破傷風抗毒素：国内 15 ヶ所のボツリヌスリファレンスセンター：各 5 本

６．依頼試験等の実績

（1）ジフテリア関係

ア）平成 21 年 5 月～7 月、九州地方（宮崎、熊本等）から、猟犬の血清 177 本、猟犬スワブ 43 本、猟犬由来ダニ 5 匹について、ウルセランスの検査依頼を受けた。検査の結果、猟犬血清 177 本中 21 本からジフテリア抗毒素が検出された。猟犬スワブは、菌及びジフテリア毒素原性とも全て陰性であった。猟犬由来ダニからは、*C. urealyticum*、*C. propinquum*、*Rhodococcus* spp.、*Aureobacterium* spp.、*Arthrobacter* spp.が分離されたが、*C. ulcerans* は検出されなかった。またジフテリア毒素遺伝子及び毒素も検出されなかった。［小宮貴子、高橋元秀］

イ）平成 21 年 10 月 14 日、大阪府立公衆衛生研究所から、九州地方の猟犬由来菌株 2 本（ゼラチンディスク）について、ウルセランスの検査依頼を受けた。2 菌株とも、アピコリネコード 0111326、%ID 99.7%の *C. ulcerans* と同定され、ジフテリア毒素原性は陽性であった。PEGE の結果、2 菌株は同じタイプであった。［小宮貴子、高橋元秀］

ウ）平成 21 年 8 月 6 日と平成 22 年 10 月 26 日に、カンボジアから、ヒト咽頭スワブ合計 6 本と血清 2 本について、ジフテリア検査依頼を受けた。全検体から菌は検出されず、ジフテリア毒素原性も陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は、0.0814 IU/ml と、0.163 IU/ml であった。［小宮貴子、高橋元秀］

エ）平成 21 年 7 月～10 月、DTaP 追加接種臨床試験（DT 接種時期における DTaP 接種の安全性と免疫原性の検討会）のジフテリア抗毒素調査のため、国内 9 病院からヒト血清 537 本のジフテリア抗毒素価を測定した。［小宮貴子、高橋元秀］

オ）平成 21 年 10 月 7 日、14 日、21 日に静岡県小川動物病院から、ネコ由来菌株 1 本、スワブ 2 本、血清 1 本、環境調査材料のスワブ 7 本について検査依頼を受けた。ネコ由来菌株及びスワブから、アピコード 0111326、%ID 99.7%の *C. ulcerans* が分離同定された。3 菌株のジフテリア毒素原性は、陽性であり、PFGE の結果、同じタイプ

であった。血中ジフテリア抗毒素価は、0.552 IU/ml であった。［小宮貴子、高橋元秀］

カ）平成 21 年 10 月 15 日、大分県衛生環境研究センターから、イヌ由来 5 菌株について、ウルセランスの検査依頼を受けた。全菌株とも、ジフテリア毒素原性陽性の *C. ulcerans*（アピコリネコード 0111326、%ID 99.7%）であった。PFGE の結果、全て同じタイプであった。［小宮貴子、高橋元秀］

キ）平成 21 年 10 月 29 日と 12 月 18 日、埼玉県の動物園から、サルの咽頭スワブ 65 本、血清 126 本について、ウルセランスの検査依頼を受けた。全検体から、菌は検出されず、ジフテリア毒素原性も陰性であった。血中ジフテリア抗毒素は、2 検体から検出され、抗毒素価は、0.0255 IU/ml と 0.0360 IU/ml であった。［小宮貴子、高橋元秀］

ク）平成 21 年 11 月 11 日、岡山県環境保健センターから、ネコ由来 5 菌株について検査依頼を受けた。5 菌株全て、ジフテリア毒素原性陽性の *C. ulcerans*（アピコード 0111326、%ID 99.7%）であった。 この 5 菌株のグリコーゲン分解能は非常に低く、アピコリネ同定試験では *C. pseudotuberculosis* の可能性が高いと出たが、追加試験でトレハロース試験、*rpo* B 遺伝子検査、PFGE を行った結果、*C. ulcerans* と最終同定された。［小宮貴子、高橋元秀］

ケ）平成 21 年 11 月 12 日、新潟県信楽園病院から、患者由来 1 菌株について、ジフテリアの検査依頼を受けた。菌株は、ジフテリア毒素陰性の *C. diphtheriae* バイオタイプ mitis 型（アピコリネコード 0010324、%ID 99.4%）であった。この患者で、新潟県では 4 例目の症例となった。［小宮貴子、高橋元秀］

コ）平成 22 年 2 月 26 日、新潟県信楽園病院から、患者由来 1 菌株（羊血液寒天培地 1 枚）について、ジフテリアの検査依頼を受けた。菌株は、ジフテリア毒素陰性の *C. diphtheriae* バイオタイプ mitis 型（アピコリネコード 0010324、%ID 99.4%）であった。この患者で、新潟県 5 例目となった。PFGE の結果、2、3、4 例目の菌株が同じタイプであった。［小宮貴子、高橋元秀］

サ）平成 22 年 1 月 21 日と 2 月 25 日に、国立国際医療センター（平成 21 年度国際医療研究委託研究費（21 指９）の一環）から、海外渡航者のペアー血清 56 本について、ジフテリア抗毒素価測定依頼を受け測定を行った。［小宮貴子、高橋元秀］

（２）破傷風関係

ア）平成 21 年 3 月 10 日付で、武蔵野赤十字病院から患者創部組織より菌分離と患者血清中の破傷風毒素の検出及び抗体価の測定の依頼を受けた。患者創部及び膿より検出された菌について、その培養上清はマウスを用いた毒素原性試験により破傷風毒素を検出限度以下であった。また、患者血清には破傷風毒素も抗破傷風毒素抗体も検出限度以下であった。［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

イ）平成 21 年 8 月 19 日付で、釜石病院より患者炎症滲出液より培養された菌液について破傷風菌検出について依頼を受けた。送付された菌液について試験したところ、破傷風菌は検出されなかった。［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

ウ）平成 21 年 9 月 17 日付で、昭和伊南病院より患者より分離された菌について破傷風菌毒素検出について依頼を受けた。送付された分離菌には、破傷風毒素遺伝子を有せず、破傷風毒素も検出限度以下であった。［山本明彦、岩城正昭、見理 剛、高橋元秀］

（３）ボツリヌス関係

平成 21 年 9 月 14 日付で、東京税関から鑑定嘱託された関税法違反嫌疑者から差し押さえた薬品について、検査した。その結果薬品は、ボツリヌス A 型毒素を乾燥したものであることと、各バイアル中の毒素量は表示単位を大幅に異なるものではないことを確認した。［見理 剛、山本明彦、岩城正昭、高橋元秀］

国際協力関係業務

Ⅰ．WHO 関連

１．WHO により進められている BCG ワクチンの基準の改定作業に参加し、日本の考え方を改定案に反映させた。WHO 本部で開催された会議に出席し、討議を行った（2009 年 9 月 22ー23 日）。［柴山恵吾］

２．WHO の Collaborating Centre for Research and Reference Service for Immunological and Biological Products の活動として、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドの国際標準品の設定、百日咳ワクチンのシードの characterization 等を実施した。［岩城正昭、高橋元秀、蒲地一成、柴山恵吾、荒川宜親］

３．WHO の Informal Consultation on aP, DTwP, HepB and Combination Vaccines に、WHO からの招請状を得て参加し討議を行なった（2009 年 11 月）。［岩城正昭］

Ⅱ．JICA 関連

１．JICA ワクチン品質管理技術コース参加研修生（海外 5 名）にワクチンの品質管理について講義した（2009 年 11 月）。［高橋元秀、岩城正昭、蒲地一成、佐々木裕子］

２．JICA 国別研修 中国ワクチン予防可能感染症サーベイランス及びコントロール（VPD）プロジェクトにおいて、ワクチンの検定について講義した（2009 年 11 月）。［岩城正昭］

Ⅲ．研修関連

１．ベトナムの The Company for Vaccine and Biological Production No.1 より 2 名の研修生が来日し、ヘモフィルス b 型（Hib）ワクチンの品質管理（異常毒性否定試験、エンドトキシン試験、多糖含量試験等）に関わる研修を行った（2009 年 11 月 24ー26 日）。［佐々木裕子、木村幸司、加藤はる、荒川宜親、持田恵子、益見厚子（血液・安全性研究部）］

２．中国・武漢生物製品研究所の品質管理担当者（Yang Xiaoming 所長、以下 8 名）に対して、第三室の品質管理業務について講義・説明を行なった（2009 年 7 月）。［岩城正昭、小宮貴子、山本明彦、見理 剛、髙橋元秀］

３．台湾 BFDA の Dr. Chang-Wen Chi 研修生に対してジフテリア抗毒素製剤の品質管理の技術研修を実施した（2009 年 7 月）。［山本明彦、見理 剛、高橋元秀］

４．台湾 CDC 所属の Dr. Kuang-Lo Chen に対して、ボツリヌス菌病原体診断と抗毒素製剤の品質管理法の研修を約 2 週間実施した（2009 年 11 月）。［見理 剛、山本明彦、高橋元秀］

Ⅳ．講義等関連

１．大阪大学感染症国際研究拠点プロジェクト推進のために、大阪大学微生物病研究所長の要請により、タイ NIH における共同研究・開発の協議および指導のために出張した（2009 年 7 月）。［高橋元秀］

２．台湾 Bureau of Food and Drug Analysis（BFDA）の招聘依頼を受けて、ジフテリア毒素の品質管理および生物学的製剤の品質管理に用いる実験動物の関わりについて講演した（2009 年 8 月）。［高橋元秀］

３．米国カリフォルニアで開催された Interagency Botulism Research Coordinating Committee に参加し、複合筋活動電位測定によるボツリヌス毒素中和抗体価の定量化法を発表した（2009 年 9 月）。［見理 剛、高橋元秀］

４．米国カリフォルニアで開催された Interagency Botulism Research Coordinating Committee に参加し、日本国内のボツリヌス抗毒素の受給体制と品質管理の現状について講演した（2009 年 9 月）。［高橋元秀］

５．ラトビア共和国リガ市で行なわれたジフテリア国際ネットワーク DIPNET の 2009 年ミーティングに出席し、日本における *Corynebacterium ulcerans* 感染症について紹介するとともに海外のジフテリアおよび同菌の感染症に関する最新の情報を収集した（2009 年 10 月）。［岩城正昭］

研修業務

Ⅰ．薬剤耐性菌に関する研修

実地疫学専門家養成プログラム（FETP）への分子疫学実習：薬剤耐性菌による院内感染事例の調査時に行う分子疫学的解析の結果の解釈に必要な臨床微生物・分子生物学の基本的な知識の習得を目的とし、FETP 研修生（4 名）に対し実習コースを実施した（2009 年 10 月 5ー9 日）。［山根一和、松井真理］

Ⅱ．*Clostridium difficile* に関する研修

医療機関の検査技師や地方衛生研究所職員を対象として、依頼に応じて *Clostridium difficile* 分離培養、PCR、LAMP による毒素遺伝子の検出を中心とした *C. difficile* の細菌学的検査の実技研修を行った。［加藤はる］

Ⅲ．ジフテリアに関する研修

第 30 回衛生微生物技術協議会研究会において、ジフテリア百日せきレファレンスセンター会議に出席し、20 年度の活動内容の報告をした（2009 年 7 月）。［高橋元秀］

Ⅳ．生物学的製剤の品質保証に関する研修

国立保健医療科学院における短期研修薬事衛生管理研修コース（受講者 31 名）において、生物学的製剤の品質保証の現状について講義及び査察演習引率を行った（2009 年 6 月）。［高橋元秀、佐々木裕子、加藤はる］

その他

Ⅰ．行政科学等に対する対応

１．独立行政法人医薬品医療機器総合機構からの依頼により、専門委員としてメーカーへの GMP 査察に同行し

調査を行った。［柴山恵吾］

２．日本薬局方の抗生物質委員会、標準品委員会に関する活動：独立行政法人医薬品医療機器総合機構の専門委員として、日本薬局方原案審議委員会の抗生物質委員会に出席し、第 15 改正日本薬局方（追補を含む）及び第 16 改正日本薬局方の改正案及び収載案の審議に従事した。［近田俊文］

３．日本薬局方の生物試験法委員会に関する活動：生物試験法委員として、委員会に出席した。［加藤はる］

４．日本薬局方エンドトキシン標準品評価委員会に評価委員として出席した。［蒲地一成］

５．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が 4 回開催され出席した。［高橋元秀］

６．監視指導・麻第対策課より各都道府県衛生主管部局に発出された「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」の改正作業を行なった（厚生労働科学研究：医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)。［佐々木裕子、他指針作成委員］

７．病原体等の登録・保管・輸送・廃棄に関する一括管理システムの開発と検証班にて、この一括管理システムの具体的な運用の可能性を探るためにボツリヌス菌の管理について実証実験を行った（厚生労働科学研究費補助金 : 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）。［山本明彦］

８．新型インフルエンザワクチン株の製造施設（９号棟）稼働準備において、微生物管理に関する衛生管理基準作成に携わった。［佐々木裕子、他稼働準備委員］

Ⅱ．感染症等についての対応

１．薬剤耐性菌等についての対応：検査診断や院内感染対策等に関する事項を中心に、E-mail や電話等による質問、相談に個別に対応し、回答を行った。［荒川宜親、山根一和、鈴木里和、松井真理、近田俊文］

２．抗生物質医薬品の試験法についての対応：日本薬局方、日本薬局方外医薬品規格（第四部）及び旧日本抗生物質医薬品基準に収載された抗生物質医薬品（標準品を含む）の試験法等についての照会に対して、E-mail 等による書面での回答を行った。［近田俊文］

３．*Clostridium difficile* 感染症についての対応：検査診断や施設内感染に関する事項を中心に 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］

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ．誌 上 発 表

１．欧文発表

1）Kato H, Kato H, Nakamura M, Iwashima Y, Nakamura A, and Ueda R.: Rapid analysis of *Clostridium difficile* strains recovered from hospitalized patients by using the *slpA* sequence typing. J Infect Chemother, 15: 199-202, 2009.

2）Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, and Sata T.: Characterization of quasispecies of pandemic 2009 Influenza A virus (A/H1N1/2009) by De Novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. PloS One 5; e10256, doi: 10.1371/journal.pone. 0010256, 2010.

3）Kimura K, Wachino, J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata S, and Arakawa Y.: Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility. J Clin Microbiol, 47: 4154-4157, 2009.

4）Nagano N, Kimura K, Nagano Y, Yakumaru H, and Arakawa Y.: Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer. J Antimicrobial Chemother, 64: 1326-1328, 2009.

5）Honma Y, Yoshii Y, Watanabe Y, Aoki N, Komiya T, Iwaki M, Arai H, Arakawa Y, Takahashi M, and Kimura H.: A Case of Afebrile Pneumonia Caused by Non-Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. Jpn J Infect Dis, 62 (4): 327-329, 2009.

6）Katsukawa C, Kawahara R, Inoue K, Ishii A, Yamagishi H, Kida K, Nishino S, Nagahama S, Komiya T, Iwaki M, and Takahashi M.: Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Isolated from the Domestic Dog for the First Time in Japan. Jpn J Infect Dis, 62 (2): 171-172, 2009.

7）Hall AJ, Cassiday PK, Bernard KA, Bolt F, Steigerwalt AG, Bixler D, Pawloski LC, Whitney AM, Iwaki M, Baldwin A, Dowson CG, Komiya T, Takahashi M, Hinrikson AP, and Tondella ML.: A Novel *Corynebacterium diphtheriae* Isolated from Domestic Cats (*Felis catus*). Emerg Infect Dis, 16 (4):

688-691, 2010.

8) Horino A, Kenri T, Sasaki Y, Okamura N, and Sasaki T.: Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversions of phase-variable *mpl* lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*. Microbiology, 155: 1241-1249, 2009.

9）Kataoka M, Yamamoto A, Ochiai M, Harashima A, Nagata N, Hasegawa H, Kurata T, and Horiuchi Y.: Comparison of acellular pertussis based combination vaccines by Japanese control tests for toxicities and laboratory models for local reaction. Vaccine, 27: 1881-1888, 2009.

10）Kawamura-Sato K, Yoshida R, Shibayama K, and Ohta M.: Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance, and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan. Jpn J Infect Dis, 63 (2): 113-5, 2009.

11）Mori S, Shibayama K, Wachino J, and Arakawa Y.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Acta Crystallogr, F66: 279-281, 2010.

12）Mori S, Shibayama K, Wachino J, and Arakawa Y.: Purification and molecular characterization of a novel diadenosine 5',5'''-P(1),P(4)-tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Protein Expr Purif, 69: 99-105, 2010.

13）Kamachi K, Fukuda T, Han HJ, Toyoizumi-Ajisaka H, Mochida K, Konda T, Horiuchi Y, Arakawa Y, and DPT technical committee of the association of biological manufactures of Japan.: Genetic verification *of Bordetella pertussis* seed strains used for production of Japanese acellular pertussis vaccines. Biologicals, 38: 290-293, 2010.

14）Kamano H, Mori T, Maeta H, Taminato T, Ishida T, Kishimoto N, Katami T, Sato M, Kamachi K, and Mochida Y.: Analysis of *Bordetella pertussis* agglutinin titers during an outbreak of pertussis at a university in Japan. Jpn J Infect Dis, 63: 108-112, 2010.

15）Sakamoto T, Torii Y, Takahashi M, Ishida S, Goto Y, Nakano H, Harakawa T, Ginnaga A, Kozaki S, and Kaji R.: Quantitative determination of the biological activity of botulinum toxin type A by measuring the compound muscle action potential (CMAP) in rats. Toxicon, 54: 857-861, 2009.

16）Torii Y, Goto Y, Takahashi M, Ishida S, Harakawa T, Sakamoto T, Kaji R, Kozaki S, and Ginnaga A.: Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. Toxicon, 55: 407-414, 2010.

17）Torii Y, Takahashi M, Ishida S, Goto Y, Nakahira S, Harakawa T, Kaji R, Kozaki S, and Ginnaga A.: Quantification of potency of neutralizing antibodies to botulinum toxin using compound muscle action potential (CMAP). Toxicon, 55: 662-665, 2010.

２．和文発表

1）山根一和、荒川宜親：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌．成人病と生活習慣病, 39 (12): 1292-1299, 2009.

2）山根一和、荒川宜親：院内感染で問題となる薬剤耐性菌の最近の研究動向．麻酔, 59 (1): 4-16, 2010.

3）山根一和、鈴木里和、筒井敦子、荒川宜親：厚生労働省院内感染対策サーベイランスについて その経緯と概要．日本外科感染症学会雑誌, 7 (1): 23-28, 2010.

4）里村秀行、尾高郁子、酒井力、加藤はる：*Clostridium perfringens* による抗菌薬関連下痢症の 1 症例．日本感染症学雑誌, 83 (5): 549-551, 2009.

5）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症について．日本病院薬剤師会雑誌, 45 (7): 897-902, 2009.

6）加藤はる：シリーズ／微生物の検査診断 12. クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）感染症の細菌学的診断検査．化学療法の領域, 25 (11): 2213-2221, 2009.

7）佐々木裕子：マイコプラズマ抗原の特徴とワクチン開発の課題．日本マイコプラズマ学雑誌, 36: 88-90, 2009.

8）岩城正昭：海外における破傷風情報．病原微生物検出情報, 30 (3): 70-71, 2009.

9）落合雅樹、山本明彦、堀内善信：血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と基準化．エンドトキシン研究, 12: 93-97, 2009.

10）和知野純一、荒川宜親：薬剤感受性測定法と耐性菌『多剤耐性緑膿菌』．臨床と微生物, 増刊号, 36: 115-122, 2009.

11）和知野純一：臨床分離病原細菌において新たに発見された薬剤耐性の分子機構．日本細菌学雑誌, 64: 357-364, 2009.

12）蒲地一成：感染症動向 2010, 百日咳．メディカル朝日, 39: 42-44, 2010.

13）蒲地一成：百日咳毒素と分泌機構．化学療法の領域, 25: 21-27, 2009.

14）近田俊文（抗生物質委員会）：第十五改正日本薬局方第二追補（医薬品各条・抗生物質 29 項目）．厚生労働省,

2009.

Ⅱ．学　会　発　表

１．国際学会

1）Tsutsui A, Suzuki S, Yamane K, Matsui M, Konda T, and Arakawa Y.: Genotype shift in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) during a persistent nosocomial outbreak. 49th ICAAC, September 2009, San Francisco, USA.

2）Kato H, Ito Y, and Arakawa Y.: A rapid and simple identification of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 by loop-mediated isothermal amplification method. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, May 2009, Helsinki, Finland.

3）Sasaki Y, Nagata N, Yamada K, Ami Y, Harashima A, Suzaki Y, Miura H, Matsuda K, and Arakawa Y.: Establishment of *Mycoplasma fermentans*-inducing arthritis model in rabbit. 4th Academic congress of Asian Organization for mycoplasmology, November 2009, Taiwan.

4）Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino J, Suzuki S, Yamane K, and Arakawa Y.: Screening for group B streptococcus with reduced penicillin-susceptibility among clinical isolates during 1977 to 2005. 49th ICAAC, September 2009, San Francisco, USA.

5）Iwaki M, Ishiwa A, Komiya T, Arakawa Y, and Takahashi M.: *Corynebacterium diphtheriae* vaccine strain PW8 retains most of PAIs but shows largely reduced signs of pathogenicity. 14th European Workshop Meeting on Bacterial Protein Toxins (ETOX14), June 2009, Obernai, France.

6）Komiya T, Yamamoto A, Iwaki M, Kenri T, Noguchi Y, Tsunoda A, Arakawa Y, and Takahashi M.: A human *C. ulcerans* case: isolation of the pathogen from the patient and from cats. 11th International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) & 3rd Annual Meeting of Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2009, Riga, Latvia.

7）Iwaki M, Ishiwa A, Komiya T, Nagata N, Arakawa Y, and Takahashi M.: *Corynebacterium diphtheriae* C7(-) and PW8 strains: genome diversity and pathogenicity. 11th International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) & 3rd Annual Meeting of Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2009, Riga, Latvia.

8）Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Matsui M, and Arakawa Y.: Identification of Novel Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Genes Among Clinically isolated CTX-M-Producing *Escherichia coli*. 49th ICAAC, September 2009, San Francisco, USA.

２．国内学会

1）山根一和：薬剤耐性機序のトピックスと我が国における薬剤耐性菌の現状. 平成 21 年度中国地区感染制御部会研修会, 2009 年 10 月，松江.

2）筒井敦子、鈴木里和、山根一和、荒川宜親：バンコマイシン耐性腸球菌の効率的なスクリーニング方法に関する研究. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月，東京.

3）加藤はる、赤羽貴行、里村秀行、酒井 力、中村 敦、加藤秀章、岩島康仁、伊藤陽一郎、横山敏之、荒川宜親：日本の医療機関での binary toxin 遺伝子陽性 *Clostridium difficile* 臨床分離株について．第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月，東京.

4）里村秀行、尾高郁子、酒井 力、加藤はる：当センターにて検出された *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 による抗菌薬関連下痢症の 1 症例. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月，東京.

5）里村秀行、尾高郁子、酒井 力、加藤はる：*Clostridium difficile* 菌株からの Toxin 検出の検討．第 58 回東日本感染症学会地方会学術集会, 2009 年 10 月，東京.

6）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査. 平成 21 年度地方衛生研究所東海北陸ブロック微生物部門専門家会議, 2009 年 10 月，名古屋.

7）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症 -診断、治療、感染予防について-．第 2 回新潟臨床微生物研究会, 2009 年 10 月，新潟.

8）岩島康仁、中村 敦、加藤秀章、脇本幸夫、塩田有史、加藤はる：毒素産生性および PCR ribotype による *Clostridium difficile* infection（CDI）の臨床像の比較検討. 第52回日本感染症学会中日本地方会学術集会, 2009年11月，名古屋.

9）里村秀行、尾高郁子、福原麻后、加藤はる：*Clostridium difficile* 菌株による毒素産生能の疫学的調査への試み. 第 21 回日本臨床微生物学会総会, 2010 年 1 月，東京.

10）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症について -たかが下痢なり、されど下痢なり-．第 10 回市大センター病院感染症フォーラム（横浜市立大学附属市民総合医療センター）, 2010 年 1 月，横浜.

11）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症と薬剤部の関わり．第 31 回病院薬剤師会近畿学術大会 専門薬剤師分科会，「感染制御領域」, 2010 年 1 月，京都.

12）加藤はる：*Clostridium difficile* 感染症の現状と細菌学的検査における留意点. 平成 21 年度希少感染症診断技術

研修会, 2010 年 2 月，東京.

13）加藤はる：Q and A レクチャー *Clostridium difficile* 感染症 -よくある質問から-. 第 25 回日本環境感染学会総会, 2010 年 2 月，東京.

14）加藤はる：入門編：*Clostridium difficile* 感染症. 第 25 回日本環境感染学会総会, 2010 年 2 月，東京.

15）村端真由美、矢野久子、脇山直樹、三輪信彦、脇本幸夫、相楽弘文、加藤はる：長期入院がん患児療養環境における *Clostridium difficile* 汚染. 第 25 回日本環境感染学会総会, 2010 年 2 月，東京.

16）加藤はる：教育講演 *Clostridium difficile* 感染症—変化する疫学と日本における現状—. 第 40 回日本嫌気性菌感染症研究会, 2010 年 3 月，東京.

17）加地千春、加藤はる、鈴木 聡、若松由紀子、中嶋知子、庄司知摩、荒川宜親：*Clostridium difficile* 感染症院内アウトブレイク事例における分子疫学的検討. 第 40 回日本嫌気性菌感染症研究会, 2010 年 3 月，東京.

18）Sasaki Y, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, Matsuda M, and Arakawa Y.：Formation of lymphoid follicles induced by *Mycoplasma fermentans* in rabbit arthritis model. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

19）佐々木裕子：マイコプラズマ抗原の特徴とワクチン開発の課題. 第 36 回日本マイコプラズマ学会学術集会, 2009 年 6 月，北海道.

20）木村幸司、長野則之、長野由起子、荒川宜親：ペニシリン低感受性B群連鎖球菌（PRGBS）の遺伝学的背景に関する解析・Genetic background of Group B Streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月，横浜.

21）筧 紘子、山岡明子、大竹 明、雨宮 伸、木村幸司、荒川宜親、山崎 勉、上原すゞ子：生後6ヶ月でB群溶血性連鎖球菌による髄膜炎を発症した母子感染例. 第41回日本小児感染症学会総会, 2009年11月，福井.

22）北澤克彦、本多昭仁、前本達男、松本 弘、小林宏伸、荒畑幸絵、小暮裕之、小林 匡、高野稔明、中村文人、木村幸司、荒川宜親：慢性 ITP に対するステロイド治療中に GBS による敗血症を発症した 10 歳女児. 第 41 回日本小児感染症学会総会, 2009 年 11 月，福井.

23）木村幸司、石田香志枝、柴田尚宏、荒川宜親：ペニシリン低感受性B群連鎖球菌に関する依頼解析. 第57回日本化学療法学会総会, 2009年6月，東京.

24）木村幸司、矢越美智子、鈴木里和、山根一和、柴田尚宏、荒川宜親：ペニシリン低感受性B群連鎖球菌に関する依頼解析. 第83回日本感染症学会総会, 2009年4月，東京.

25）福田 靖、岩城正昭、見理 剛、山本明彦、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀：市販乾燥ヘモフィルス b 型ワクチン（破傷風トキソイド結合体）（Hib）の破傷風トキソイド力価. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会, 2009 年 9 月，札幌.

26）福田 靖、高橋元秀、荒川宜親、中島秀喜：Hib と DPT の同時接種と混合接種の違いによる破傷風抗体誘導の一考察. 第 67 回神奈川県感染症医学会, 2010 年 3 月，横浜.

27）木田兼以、山本明彦：*Clostridium tetani* を分離し得た破傷風症例. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月，東京.

28）山本明彦、岩城正昭、小宮貴子、見理 剛、荒川宜親、高橋元秀：抗破傷風人免疫グロブリンの力価定量法の改善. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会, 2009 年 9 月，札幌.

29）落合 雅樹、山本 明彦、片岡紀代、堀内 善信、荒川宜親：Development of alternative assay to the histamine sensitization test for acellular pertussis vaccine. 第 13 回日本ワクチン学会学術集会, 2009 年 9 月，札幌.

30）入江由美、岡 真起子、山本明彦、高橋元秀：瘡蓋より分離された破傷風の一例. 第 42 回中国四国医学検査学会総会, 2009 年 11 月，高松.

31）石和玲子、岩城正昭、荒川宜親、高橋元秀：ラクトース結合中空糸に対する B 型ボツリヌス毒素複合体の吸着. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

32）柴山恵吾：*Helicobacter pylori* のアスパラギナーゼの生理病理的機能の解析. 第 15 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2009 年 6 月，東京.

33）和知野純一、森茂太郎、柴山恵吾、荒川宜親：アミノ配糖体耐性を付与する 16S rRNA methyltransferase NpmA の X 線結晶構造解析. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

34）柴山恵吾、和知野純一、森茂太郎、荒川宜親：*Helicobacter pylori* のアスパラギナーゼの生理病理的機能. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

35）森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親：結核菌由来新規 diadenosine 5’,5’’’-P1, P4-tetraphosphate 加リン酸分解酵素の結晶構造解析. 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月，東京.

36）大塚菜緒、蒲地一成、豊泉裕美、中村幸嗣、齋藤良一、荒川宜親：百日咳菌における定着因子 Prn の欠損機構. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

37）蒲地一成：分子疫学から見た百日咳流行株の細菌学的特性. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

38）蒲地一成、豊泉裕美、中村 敦、中島夏樹、石川 隆、多屋馨子、荒川宜親、岡部信彦、岡田賢司：咳嗽成人患者を対象とした百日咳保菌率調査. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月，東京.
39）松尾里沙、中根大介、見理 剛、宮田真人 : *Mycoplasma pneumoniae* 滑走接着器官の電子顕微鏡による構造観察. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月，横浜.

6．寄 生 動 物 部

部長　野 崎 智 義

概　要

当部は、原虫及び蠕虫による感染症全般に係る基礎ならびに応用研究を行っている。疾患対象としては、赤痢アメーバ、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ミクロスポリジアなどの腸管寄生性の原虫、アカントアメーバ等自由生活性アメーバ、トキソプラズマ・マラリア原虫などの単細胞真核生物である原生生物（原虫）による感染症と、条虫・回虫・肺吸虫・アニサキス・エキノコックス症など、多細胞真核生物である蠕虫による感染症が挙げられる。これら寄生虫感染症の国内外の現況把握のために、疫学・分子疫学調査を継続的に行った。また、寄生虫感染症に対する検査・診断法の開発・評価、治療法の創成に繋がる基盤的な研究を行った。同時に、寄生虫感染症の病理と寄生・病原機構の分子レベルでの理解を目指した基礎研究を行った。また、各寄生虫に関する依頼検査、レファレンス業務、研修、国際協力活動を行った。

第一室では、腸管原虫症、特に赤痢アメーバ症・ジアルジア症・クリプトスポリジウム症・ミクロスポリジア症の診断法開発や疫学・分子疫学研究を行った。また赤痢アメーバの病原・代謝機構の統合的解明を目指す研究を展開した。同時に、原虫特異的代謝経路を標的とした創薬研究を行った。また、自由生活性アメーバの起こす角膜炎ならびにこれに媒介される細菌感染症に関する疫学・分子疫学・病因学的な研究を行った。

第二室においては、食品由来寄生蠕虫症（アニサキス症、肺吸虫症、横川吸虫症・異形吸虫症、裂頭条虫症、テニア症、有鉤嚢虫症など）、ならびに動物由来寄生蠕虫症（エキノコックス症、アライグマ回虫症、トキソカラ症など）を対象とし、遺伝子診断法や血清診断法開発のための基礎的研究や疫学的研究を行った。また、テニア症(有鉤嚢虫を含む)、裂頭条虫症や肺吸虫症に関しては、その検査診断法開発に不可欠な寄生虫材料の採取や疫学的情報収集を海外の流行地において行った。エキノコックス症については汚染地域拡大防止と食肉衛生検査所を対象に分子病理診断に関する研修事業を行った。アライグマ回虫による幼虫移行症については発生予防と監視を目的にした調査研究を行った。国内外の医療研究機関から送付された臨床検体（病理組織標本を含む）については、血清検査や遺伝子検査により診断のサポートを行った。

第三室では、マラリア、住血吸虫、トキソプラズマ、赤痢アメーバなどを主な研究対象とした。マラリアや住血吸虫は、現在日本ではもっぱら輸入感染症として問題になっているが、いまだ国内にベクターとなる蚊や陸生貝が生息しており、今後、再興感染症となる可能性を否定できない。そこで、これらの感染症の浸淫地との国際交流や気候・環境変化に伴う、日本での感染拡大の可能性を検討し、効果的防御法に関する研究を行った。特に、対象とする病原体の国内侵入と蔓延を阻止するうえで利用可能な検査・診断法の研究を重点的に進めているが、研究成果の一部は、実際に途上国での寄生虫症対策にも応用された。さらに、トキソプラズマにおける植物様細胞内器官、植物様ホルモンに関する研究を行った。また、赤痢アメーバ原虫の細胞内侵入や病原性と関連する膜輸送に関する研究を行った。

研究費としては厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興研究事業費、顧みられない病気に関する研究等）、文部省科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス財団政策創薬総合研究事業費等を取得した。人事面では 4 月 1 日付けで永宗喜三郎が第三室主任研究官として採用された。再任用職員として、川中正憲、古屋宏二、客員研究員として影井昇、松田肇、千種雄一、亀井喜世子、協力研究員として佐藤暖、渡辺恒二、高岡紀子、岡田麻美、川原史也、下河原理江子、黒木俊郎、荒川京子、小村麻子、梅原梓里、Jeelani Ghulam, Ahmad Bilal Andrabi Syed、Claudia Leticia Mendoza Macias、Bethel Kwansa-Bentum, Mohammed Essa Marghany Tolba, 流動研究員として三田村文香、牧内貴志、青沼宏佳、坪井久美子、研究生として Mohammad Abu Yousuf, Afzal Husain, Aleyla Escueta-de Cadiz, Gil Mallari Penuliar, 非常勤職員として、桝田京子、森有加、村上裕子、臨時研究補助員として中曽根英子、田原美智留、賀川千里、古川敦、福士路花が、実習生として間瀬望、花館有希が在籍し、研究等に従事した。

業　績

調査・研究

I. 検査法・診断法・不活化法の開発

1. 原虫症診断法・検出法・不活化法の開発

(1) ジアルジア迅速診断検査法の開発

国内外で重要な消化管寄生性原虫であるジアルジア症に関して、国内での抗原検査用抗体生産を目的に、ジアルジアのシスト壁由来成分を抗原としてモノクロナル抗体の開発を行った。その結果、複数の有用な抗体作成に成功した。クリプトスポリジウムや赤痢アメーバ等ジアルジア以外の消化管寄生性原虫に対する交叉反応性、また検査目的とする糞便内の 65KDa タンパク質との反応性試験の結果から、特異性、感度に関して作成された抗体の有用性が高いことが確認された。現在、ELISA 等実用的な免疫抗原検査キット開発への準備を進めている。[八木田健司、宮崎誠生（株アーク・リソース）]

(2) クリプトスポリジウムの生残性に関する研究

生きたクリプトスポリジウムの示す生物活性の指標となる脱オーシスト能とクリプトスポリジウムの 18SrRNA の RT 定量 PCR との関係を調べた。マウス糞便中に排出された *C. parvum* のオーシストを実験的に失活させるため、温度 40℃、10 日間保管した。排出直後と比較して脱オーシスト能は約 25%に低下、また 18SrRNA 量は約 10%に低下し、18SrRNA の RT 定量 PCR は脱オーシスト能と同様な

挙動を示した。さらに様々な条件下での試験を行い、18SrRNA の RT 定量 PCR のクリプトスポリジウムの生残性を評価する指標として有用性を明らかにする。[八木田健司、泉山信司、村上裕子]

(3) LAMP 法によるクリプトスポリジウム等の検出感度

RT-LAMP 法によるクリプトスポリジウムならびに LAMP 法によるジアルジアの検出感度を検討した。同じ鋳型量の反応を 8 回行い、rRNA を標的としたクリプトスポリジウムの RT-LAMP による検出は限界希釈法によってオーシスト 0.006 個相当から安定して陽性反応が得られることを確認した。一方、ジアルジアは rDNA のコピー数が多いことから逆転写反応を行うことなく、シスト 0.006 個相当の抽出液から安定して陽性反応が得られた。検出系が高感度化されたことで、核酸の最終抽出液を増量（50 ないし 100μL）させることが可能となり、その結果、繰り返しの反応が保証され、さらに同一の核酸抽出液を用いてクリプトスポリジウムとジアルジアの検出試験が可能となった。[泉山信司、遠藤卓郎、百田　隆祥（栄研化学（株））]

(4) Cycleave プローブを用いた RT-PCR 法によるクリプトスポリジウム等検査法の開発

Cycleave プローブを用いた RT-PCR によるクリプトスポリジウムならびにジアルジアの検出系を開発した。rDNA を標的とした qPCR の検出は、限界希釈法によってオーシスト 0.24 個相当、rRNA を標的とした qRT-PCR では最終の反応チューブあたりでオーシスト 0.0048 個相当から安定して増幅産物が得られると計算された。同様に、ジアルジアの rDNA を標的とした qPCR の検出はシスト 0.01 個相当、rRNA を標的とした qRT-PCR ではシスト 0.002 個相当から安定して増幅産物が得られた。実際の河川水試料を用いた検出実験では顕微鏡、RT-LAMP 法のいずれの方法においてもおおむね同様の陽性結果が得られた。増幅産物の直接塩基配列決定を行った結果、目的とするクリプトスポリジウムならびにジアルジアの塩基配列であり、特異的な増幅と検出であったことを確認した。[泉山信司、遠藤卓郎、猪又明子（東京都健康安全研究センター）、碓井圭名子（タカラバイオ株式会社）]

(5) Universal QProbe PCR 法を用いたクリプトスポリジウム検出法の開発

耐塩素性病原性原虫による水道水由来の健康影響リスクを定量的に推定し，管理するためには，水道原水や浄水中の原虫濃度を正確に測定する方法が必要となる．顕微鏡観察による原虫類の計数は多検体の処理には不向きで、顕微鏡観察に代わる遺伝子検査技術を用いた定量手法に期待が寄せられている。当該研究では，耐塩素性病原性原虫の定量手法として，Universal QProbe PCR 法に着目した。結果として 7.5×10-5 oocysts/tube から定量可能な系を構築し、河川試料からの定量値は顕微鏡の推定値にほぼ近似した。今後は適用試料数を増やし，定量系の実用に向けた検討を行う予定である。[岸田直裕，秋葉道宏（国立保健医療科学院水道工学部）、野田尚宏、関口勇地（産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門）、泉山信司]

(6) LAMP 法と顕微鏡法によるクリプトスポリジウム等検査法の比較検討

耐塩素性病原微生物のクリプトスポリジウムやジアルジアの試験は顕微鏡観察法（以下検鏡法）が一般的に利用されているが、検鏡法は形態学的な理解度の差が結果の違いに現れる懸念があること、量的な処理に不向きなことが問題とされる。このような背景からクリプトスポリジウム遺伝子検査法が期待され、複数の研究報告がこれまでなされている。本研究ではその一つの LAMP 法を用いて、水道原水、河川水、及び畜産排水での原虫試験を行い、検鏡法と結果を比較した。クリプトスポリジウム及びジアルジアともに、概ね検鏡法と LAMP 法の結果は一致した。試料を TE で希釈したり、LAMP 試験サンプル量を減じたりすると LAMP 試験結果が陰性から陽性に転じて阻害物質の存在が強く示唆され、試料前処理が重要と考えられた。[勝山志乃、大谷喜一郎（神奈川県内広域水道企業団水質管理課）、百田隆祥（栄研化学）、遠藤卓郎（細菌第一部）、泉山信司]

(7) 粉体ろ過層形成濃縮方法の検討

水道クリプトスポリジウム対策指針では、食品の検食制度に倣い、浄水を毎日 20 リットル（L）採水し、ポリタンクに注入した水または採水した水から得られるサンプルを 14 日間保存することが推奨されている。ポリタンクによる保存はスペースや冷暗所環境の確保が課題となることや、濃縮試料からは速やかに検査が可能となることから、濃縮したサンプルの保存が望ましい。当該研究ではハイドロキシアパタイトを用いた粉体ろ過層形成濃縮法の検討を行った。直径 35㎜ の使い捨て容器を組み合わせて使用した結果、浄水では 40 分で 20L、約 4 時間で 100L のろ過濃縮に達した。連続濃縮では、400L 程度まで初期設定流速でろ過が可能であった。この方法によって得られた濃縮サンプルから、クリプトスポリジウムを磁気ビーズ法で回収できることが確認された。直径 90㎜ の原水適用装置モデルで、濁度 1.3～2.2 度の原水 10L を約 15 分程度で濃縮できることが確認され、40～50L 程度の濃縮が実用的と判断された。[勝山志乃、大谷喜一郎（神奈川県内広域水道企業団）、大内一敏（東洋濾紙）、遠藤卓郎（細菌第一部）、泉山信司]

(8) モノクロラミンによる入浴施設の消毒

浴槽の維持管理方法の構築を目的として、入浴者にとって安全で許容し得る浴槽水の消毒方法の検討を行っている。レジオネラ属菌汚染防止等の目的で温泉を含む浴用水の施設の塩素消毒は必須となっているが、高 pH やアンモニウムイオン、ある種の金属イオンを多く含む泉質の湯などでは著しく効果を減ずることが指摘されている。当該研究では遊離塩素消毒に代わってモノクロラミン消毒に着目し、モノクロラミンは宿主アメーバの栄養体とレジオネラ属菌を不活化できることをこれまで示してきた。モデル循環式浴槽のモノクロラミン消毒を行い、換水なしで 2 週間の入浴試験中、レジオネラ属菌とアメーバは検出されなかった。同時に測定した従属栄養細菌数も低く、微生物の増殖は抑えられていた。なお、ボランティア入浴者から、いわゆる塩素臭がほとんどなかったとの感想を得ており、モノクロラミンによる消毒では臭気の低減が期待できた。消毒を停止すると宿主アメーバとレジオネラが検出され、浴槽が汚染されやすい状態であったことは確認された。今後、入浴施設での実地試験数を増やすことを課題とし、営業施設への応用が期待された。[杉山寛治（静岡県環境衛生科学研究所）、小坂浩司（国立保健医療科学院）、縣邦雄（アクアス）、遠藤卓郎（細菌第一部）、泉山信司]

(9) モノクロラミンの測定と管理の方法

浴槽のモノクロラミン消毒には、トリクロラミン臭気の抑制と、適切な濃度の維持管理方法が必要である。当

該研究では 2 週間の入浴試験中の塩素消毒が適切であることをモデル浴槽で確認し、また現場向きの測定方法について検討した。モノクロラミンは、アルカリ性（pH8.4）条件下の井水 1L に次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、次いで塩化アンモニウム水溶液を添加・混合することで生成した。生成したモノクロラミンをモデル循環式浴槽に加え、その後は 1 日 1 回の不足分の追加で 3mg/L の濃度を維持した。DPD/FAS 滴定法では、ジクロラミンがわずかに検出された程度にとどまり、塩素臭の主要な原因となるトリクロラミンは検出されなかった。高感度な HS-GC/MS 法による測定においても、トリクロラミンは検出されなかった。インドフェノール法とサリチル酸法による測定結果より、消毒効果の低い有機クロラミンはほとんど検出されないと判断された。簡易の DPD 吸光度法（全塩素）は他の複数のモノクロラミン測定方法と同等の測定値が得られたことから、DPD 吸光度法による全塩素濃度はモノクロラミン濃度に相当するものと判断され、現場向きの測定法として利用可能であった。[小坂浩司（国立保健医療科学院）、杉山寛治（静岡県環境衛生科学研究所）、縣邦雄（アクアス）、遠藤卓郎（細菌第一部）、泉山信司]

(10) 微胞子虫 *Encephalitozoon cuniculi* 感染における尿中胞子および抗体排泄（１）血清学的高度流行コロニーのウサギにおける尿抗体の検出

ある種のウイルスや細菌感染では抗体がヒトや動物の尿から検出され臨床診断に応用されている。寄生虫感染でも、*Leishmania*、*Schistosoma* などに対する尿抗体の診断的研究が行われている。我々はペットウサギにおける *Encephalitozoon* 感染の血清疫学的研究過程で尿抗体が排泄されていることを発見し、微胞子虫播種性感染における尿抗体排泄の機序、診断的意義等を明らかにする目的で研究をスタートさせた。今回は２つの集団飼育コロニーウサギ（N 群、H 群）における尿抗体の排泄について調べた結果、Ｎ群に spore-ELISA 法（CVI, 14, 168, 2007）による陽性例を認めた。Ｎ群 15 頭のうち 6 頭から抗 SW 抗体が、7 頭から抗 PT 抗体が検出された。H 群 16 頭からは尿抗体は検出されなかった。sAg-ELISA 法（J. Vet. Med. Sci., 70, 1301, 2008）による N 群 31 頭の血清抗体測定結果は、すべて OD 0.5 以上の陽性値を示し、16 頭が＞3 であったが、H 群 27 頭のうち 18 頭は OD 0.5 以下の陰性値を示した。ヒトおよび動物の微胞子虫感染における尿抗体についての研究はこれまでほとんど行われていない。コロニー内流行ウサギからの尿抗体陽性結果を踏まえ、今後、感染実験を含めた更なる研究を行うことを予定している。[古屋宏二、朝倉登喜子、五十嵐慎（帯広畜大）、森田達志（日獣大）]

(11) 微胞子虫 *Encephalitozoon cuniculi* 胞子の免疫組織化学的検出のための染色法の改良

前回、affinity 精製した biotin 標識抗 *Encephalitozoon cuniculi* 抗体（b-α-Ec）が自然感染ウサギからの臓器抽出液内胞子の検出に有用な免疫試薬であることを報告した。今回、細胞培養由来の胞子に対するホルマリン（For）あるいはメタノール（Me）固定後の b-α-Ec による免疫染色の最適条件を探るため、先ず、b-α-Ec 結合胞子に対する peroxidase streptoavidin (PO)/aminoethyl carbazol (AEC) 基質と PO/HistMark Blue (HMB) 基質の染色性を比較検討したところ、何れの固定でも PO/HMB が約 10 倍高い染色感度を示すことが分かった。次に、b-α-Ec 結合胞子に更に biotin 標識抗ウサギ IgG 抗体（b-α-Ra）を反応させ、PO/HMB で染色したところ、b-α-Ra を反応させなかったものより、4～8 倍染色感度を高めた。しかしながら、Me 固定胞子に比べ、鏡検による免疫染色後の For 固定胞子の検出は容易ではなかったので、免疫染色の手順に入る前に抗原賦活化剤（LAB、TUF、Trypsin）による前処理を行ったところ、著しい改善が認められた。特に LAB 処理では一次抗体の希釈が 8,000 倍でも胞子を容易に検出できることが分かった。今回の染色条件を参考に、今後、各種の For 固定・パラフィン包埋組織切片材料への応用を進めたい。[朝倉登喜子、古屋宏二、杉山広、宇根有美（麻布大）]

(12) 尿中抗体検出によるマラリア診断法の検証

最近のマラリア感染率の推移がわかっているソロモン諸島で、熱帯熱マラリア原虫に対する尿中抗体価の測定が、マラリア低浸淫地での疫学的指標や Rapid assessment 手法として利用できるか検討した。1990 年代初めにはマラリア感染率が人口の 30～40%だった２地域の住民から、2009 年９月採取された尿を用い、尿中熱帯熱マラリア原虫抗体価を、熱帯熱マラリア原虫（PfNF54 株）感染ヒト赤血球を Tetanolysin 処理して破砕、遠心した上清を抗原とし測定した。1990 年代にマラリア対策が進んだ地域 A（ホニアラ市）では、B（ガダルカナル島北東岸、タシンボコ地域村落群）に比して、特に 20 歳以下の若年者で陽性率が低く抗体価も低い例が多くなった。また、若年者で尿中抗体価が陽性となった例の 90%では、最近３年間のマラリア罹患が、顕微鏡による観察で確認されていた。尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、年齢層毎に比較することにより、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できることが示唆された。[大前比呂思、伊藤誠（愛知医科大学）、亀井喜世子（平成帝京大学）]

2. 蠕虫症診断法・検出法の開発

(1) イムノクロマト法による血清診断キットの開発

ア. ES 抗原を用いた肺吸虫症血清診断キットの開発

ウェステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫から調製した ES 抗原を用いて、免疫クロマトグラフィー法に基づく血清診断キットを新たに作製した。原因種が明らかな患者の血清パネルを用いて、本キットの性能を評価した。その結果、患者の原因種と診断キットの由来種が同一の場合に強い反応を認め、確実に診断される事が分かった。異なる場合には、反応強度が弱まる例もあったが、陰性となる事はなかった。本キットのこの特徴を活かせば、原因種の予想が困難な症例の診断にも、本キットが活用できると考えられた。［杉山広、森嶋康之、山﨑浩、小林行治・小林薫　（アドテック株式会社）］

イ. レコンビナント抗原を用いたトキソカラ症（イヌ・ネコ回虫症）の迅速血清診断キットの開発

イヌ・ネコなどのペットから、あるいは牛レバーの生食によって感染するイヌ・ネコ回虫症（トキソカラ症）の血清検査キット開発をイヌ回虫幼虫のレコンビナント抗原を用いてイムノクロマトキットを試作し、健常人血清、ならびにトキソカラ症患者血清を用いてキットの感度を評価するとともに、改良を重ね、概ね良好な結果が得られるキットを作成することが出来た。［山﨑 浩，森 有加，小林行治・小林 薫・福田健太（アドテック株式会社）］

(2) 宿主サワガニの加熱による肺吸虫感染リスクの除去

市販の食用サワガニを原因に、肺吸虫に感染する事例の報告が続いている。このような感染の予防を視野に、

サワガニの加熱条件を検討した。加熱効果の判定に当たっては、加熱サワガニから分離したメタセルカリアの形態を精査すると共に、マウスへの感染試験も実施した。その結果、サワガニを 55℃で 5 分間加熱すれば，その体内のメタセルカリアは感染能力を消失することが明らかとなった。より短い 2 分間処理では感染するマウスも認め、予防効果は不十分であった。より高い温度での加熱や冷凍なども、サワガニの処理として肺吸虫の感染予防に有用と考えられたので、検討を進める予定にしている。[杉山広、森嶋康之、山﨑浩、柴田勝優・川上 泰（麻布大）]

(3) 病理組織標本を用いた寄生虫の分子同定

国内外の医療機関から寄生虫の依頼検査の中には、ホルマリン固定標本やパラフィン包埋標本が含まれているが、ホルマリン固定は DNA を分解するために、一般に DNA の増幅は困難である。しかし、DNA の抽出条件や PCR 条件を検討することによって、その寄生虫の種の鑑別が可能になってきた。平成 21 年度には、チリ大学医学部寄生虫学教室から、チリ人で発生した裂頭条虫症 5 例について、原因となった条虫成虫（3 検体）と虫卵（2 検体）が送られてきた。ミトコンドリア DNA 解析の結果、原因となった裂頭条虫は広節裂頭条虫 *Diphyllobothrium latum*（成虫 2、虫卵 1）と太平洋裂頭条虫 *Diphyllobothrium pacificum*（成虫、虫卵各 1 例）であった。［山﨑浩、森有加、川中正憲、杉山広,、森嶋康之］

(4) *Metagonimus* 属吸虫による腸吸虫症検査法の改良

腸吸虫症は日本国内において依然発生の多い寄生蠕虫症であるが、従来の顕微鏡検査では原因種を正確に同定することはできない。そこで我々は、本症の原因種を正確に鑑別することを目的とし、*cox1* 領域を標的部位としたマルチプレックス PCR 法を開発・使用してきた。ところが、実際の臨床検体に対しては感度が不十分な例が認められることがあったため、実験感染材料を用いて検査法としての信頼性の評価を行うとともに、感度を向上させるための臨床検体からの DNA 抽出法の最適化を図った。[森嶋康之、杉山広、川中正憲、山﨑 浩、加島準子（日本寄生虫予防会）]

(5) 日本住血吸虫症の免疫診断法の開発

尿を用いた簡便、迅速かつ非侵襲的な診断法の開発を目して、日本住血吸虫（SJ）感染者の尿中に検出される特異抗体の特徴を明らかにし、SJ 成虫体の tegument に局在し、22.6kDa の分子量をもつ成分のレコンビナント蛋白（rSJA226）を SJ 症の免疫診断に導入してきた。rSJA226 は、尿中の抗体検出に優れ、治療後、従来の成虫・虫卵抗原を用いた免疫血清検査の抗体価よりも速やかに陰転化する特徴を有している。2009 年度はレコンビナント蛋白のアミノ酸配列に基づいてペプチドライブラリーを作製し、特異的モノクロナール抗体（SJA111 mAb）のＢ細胞エピトープを決定した。また、SJA111 mAb を用いて、SJ226 循環抗原を検出したところ、循環抗原として高率に存在するが、治療後速やかに消失することが確認された。[朝日博子、大前比呂思、田邊将信（慶応大）、山下隆夫（山形県立保健医療大）、太田伸生（東京医歯大学大学院）]

II. 疫学・型別･分子疫学的研究

1. 原虫症の分子疫学的研究・調査

(1) 消化管寄生性原虫類の国内感染実態調査

現在、国内における消化管寄生性原虫類感染に関する実態については不明な点が多い。本年度、国立国際医療センターと共同で、同センターにおいて診断された AIDS 関連下痢症および渡航者下痢症における消化管寄生性原虫類の感染調査を行った。原虫全般でみると、AIDS 下痢症では約 46%、渡航者では約 41%の検出率であり、AIDS では赤痢アメーバ、ジアルジア感染が、また渡航者下痢ではクリプトスポリジウム、ジアルジア、サイクロスポラの感染がみられた。医療機関全般における寄生虫・原虫検査の必要性が再認識される。[八木田健司、渡辺恒二（国立国際医療センター）、泉山信司、津久井久美子、永宗喜三郎]

(2) アカントアメーバ性角膜炎全国サーベランスと分子疫学的研究

前年度より、コンタクトレンズ関連の重症角膜感染症であるアカントアメーバ角膜炎の全国サーベランスに関連して分子疫学的な研究を開始した。本年度その継続調査を行ったが、分離株のほとんどすべてが 18SrRNA タイピングにおける T4 タイプの中で、T11 タイプが 1 例検出されたこと、また近年のアメーバ性角膜炎患者増加の一因とされる MPS（Multi Purpose Solution、いわゆるレンズ保存・洗浄液）が患者の角膜分離株と同じ株で汚染されていたこと等、感染実態の証左となるような疫学的データも得られた。[八木田健司、村上裕子、井上幸次（鳥取大）]

(3) アメーバ内共生（寄生）微生物に関する研究

今後の新興感染症への備えとして、自由生活性アメーバに共生する微生物のヒトへの健康影響に関する研究を進めている。国内の調査では、これまでに *Parachlamydia* と同定されたクラミジアが共生する *Acanthamoeba* を分離した。当該の共生アメーバは、あるレジオネラ集団感染事例の浴槽水から分離され、同事例ではレジオネラ以外の原因と想定される呼吸器疾患がみられたこと、また *Parachlamydia* が呼吸器感染の原因微生物とされることが近年国外調査で明らかになっている。今回分離された *Parachlamydia* の呼吸器疾患との関連性が注目される。[八木田健司、村上裕子]

(4) 飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究（微生物分科会）

クリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物の混入による大規模な水系集団感染の経験を契機として，塩素消毒に依存した微生物対策の見直しが求められている。当該分科会では研究分担者、協力者との研究協力により、耐塩素性病原微生物に関する研究と併せて、水道に関連する細菌・ウイルスの研究についての取りまとめを行っている。一般細菌に比べて高感度な従属栄養細菌測定が開始され，不検出ではない，有意な測定値が得られることが全国的に明らかになった。ウイルスでは浄水処理によるインフルエンザウイルスの処理性が検証された。耐塩素性病原微生物対策として，試料水の濃縮方法，迅速遺伝子検査法を開発された。rRNA の逆転写によるクリプトスポリジウム等高感度検出によって実用化に向けての道が開けてきており，qRT-PCR による定量，並びに直接塩基配列決定による種や型の情報が得られた。一方，顕微鏡検査によりクリプトスポリジウム等検査が定期的に行われているが，209 水道事業体中 22 事業体（11%）において原水からの検出を確認した。畜産排水処理施設における病原性原虫を調査したところ，処理施設への流入水中の濃度は高く、排水処理による原虫除去は 2～3 log 程度であったが，処理に不良が生じると性能が著しく低

下した。[泉山信司、秋葉道宏（国立保健医療科学院水道工学部)、松下拓、松井佳彦（北海道大学大学院工学研究科）]

(5) 河川水からのクリプトスポリジウム等検出状況

全国的なクリプトスポリジウム等検出状況を調べるため、ホームページ上でクリプトスポリジウムの検出状況を公表している水道事業体を調査したところ219事業体が確認できた（平成22年3月現在)。原水について試験を行っていたのは209事業体で、最大値は10L中26オーシストであった。浄水から検出されている例はなかった。水源の種類は表流水から地下水まで広範囲であり、事業体が実施している試験回数や試験水量も一律ではないが、このうちクリプトスポリジウムの検出を報告している事業体は22事業体であり、約11%に過ぎなかった。地域的には北海道と南関東で検出率が高く、地位的な偏りがあり、想定すべき検出状況に比べて低いことが懸念された。精度管理の必要性が強く感じられた。[泉山信司、浅見吉之（神奈川県内広域水道企業団）]

(6) 養豚施設における *Cryptosporidium*、*Giardia* の分布状況

水源を汚染する *Cryptosporidium* および *Giardia* の汚染源に関する基礎資料として、養豚施設で飼育されているブタの *Cryptosporidium* および *Giardia* の保有状況を調査した。2ヶ月齢のブタから *Cryptosporidium* が検出され、pig genotype II および *C. suis* と相同性が高い配列が得られた。*Giardia* では2〜6ヶ月齢の子ブタから検出され、遺伝子型はAssemblage Eであった。いずれも稀にヒトからの検出例が報告され、注意を要すると考えられた。[黒木俊郎、稲田貴嗣（神奈川県衛生研究所)、大谷喜一郎（神奈川県広域水道企業団)、泉山信司]

(7) アフリカにおけるマラリア原虫CQ耐性遺伝子 *pfcrt* の遺伝的多型の解析

アフリカで蔓延するクロロキン(CQ)耐性マラリアは、1970年代から *in vivo* での耐性が報告されている。今世紀に入り、薬剤標的遺伝子の多型解析によって、アフリカの耐性株は主に東南アジアからの移入であることが判明した。しかし、薬剤耐性の存在を耐性遺伝子の遺伝子型で証明することは、CQ標的遺伝子として *pfcrt* が同定される1990年代以前は極めて困難である。そこで、感染研の1984年から1998年までのアーカイブ標本から *pfcrt* の遺伝子型の同定を行った。まず、*pfcrt* は全期間を通して半数以上のサンプルがCQ耐性型で、野生型の *pfcrt* もかなり存在していた。これは 100%が耐性型を示した東南アジアと対照的である。アフリカはマラリアに対する免疫があるため、CQの使用量が少ないことを反映していると推測される。[中野由美子、中曽根英子、田邉和裕（大阪大学微生物病研究所）]

(8)アフリカにおけるマラリア原虫 Pyr 耐性遺伝子 *dhfr* の遺伝的多型の解析

ピリメサミン(Pyr)耐性熱帯熱マラリアは1980年代後半から *in vivo* での耐性が報告されている。アーカイブ標本から *dhfr* の遺伝子型の同定を行ったところ、1980年代から現在まで希少な単独変異(N51I または C59R)が同定された。その後1990年代に入って、単独変異は減少し、アジア由来の三重変異とアフリカ起源の二重変異が同定された。1993年以降、マラウイ等のアフリカ諸国はCQからPyrに一次選択薬を切り替えたが、それ以前に三重変異株がアフリカに流入していたことが分かった。今回のアフリカにおける耐性遺伝子型の同定は、これまでで最も古い年代となるとともに、CQとPyr耐性熱帯熱マラリアは東南アジアから独立に移入したことを遺伝学的に証明した。[中野由美子、美田敏宏（東京女子医大)、中曽根英子、田邉和裕（大阪大学微生物病研究所）]

(9)日本における三日熱マラリア再流行の可能性に関する研究

1970年代に一度制圧されたが、1993年以降韓国で再流行が続いている三日熱マラリアについて、日本国内での再流行の可能性を、ハマダラカ生息数の年次変化が記録されている富山県氷見地方と成田空港周辺のモデル地域で、数理モデルを作成して検討した。三日熱マラリア浸淫地からのヒトや蚊の移動による、日本での2次感染・再流行の可能性は、現在の気象条件やハマダラカの生息密度であれば、非常に低いことがわかった。しかし、今後気候・環境変化に伴って、ハマダラカの生息密度が急速に増加した場合、空港マラリアの発生から散発的2次感染が続く可能性を否定することはできない。［大前比呂思、石川洋文（岡山大学)、渡辺譲（富山衛生研究所)、長谷山路夫（成田空港検疫所）]

(10) 気候・環境変化に伴う世界的な三日熱マラリア再流行の可能性に関する研究

中国寄生虫症研究所と協力して、1990年代の中国雲南省の温度・降水量変化と三日熱マラリア発生との関連について分析し、今後、亜熱帯・温帯地方における三日熱マラリア感染拡大を予測できる数理モデルの作成を試みた。まず、中国雲南省(40 地区)で、10 年間（1994 年 1 月〜2003 年 12 月）観察された、日照時間・気温(最高、最低、平均)・降水量と三日熱マラリア発症者数の相関を分析した。さらに、多変量時系列解析手法を利用して、予測が現実に近くなるようにモデルを修正し、数理モデルを構築した。観測された範囲では温度が高いほど発症者数も多くなったが、降雨量は 200 ミリ前後が最適で、それより多い場合や少ない場合、発症者数は少なくなる傾向が捉えられた。しかし、極端な患者数の変化については、構築したモデルで捉えることはできなかった。[大前比呂思、湯林華（中国寄生虫症研究所)、石川洋文（岡山大学)、笛田薫（岡山大学)、小野雅司（国立環境研究所）]

2. 蠕虫症の分子疫学的研究・調査

(1) アニサキス症の文献資料を用いた発生実態解析

我が国におけるアニサキス症の発生数を調べる目的で、医学中央雑誌（以下, 医中誌）を検索エンジンとし、2001年から2009年までに収録された日本語・英語の論文を対象に,「アニサキス症」というキーワードを用いて文献検索した。その結果、102報の文献が検出され、これらから130例のアニサキス症例が抽出された（年平均で14.4例)。一方、医中誌検索で検出できなかった論文(唐澤ら, 日本医事新報4386, 68-74, 2008）に、2,511例の症例が取り上げられていた(2001年以降の5年間、年平均で502例)。アニサキス症の患者は年間に2,000例から3,000例の発生があると推察されてきた。文献調査だけでは、アニサキス症例の総てを発掘できないことが明らかとなった。［杉山広、賀川千里、森嶋康之、春日文子（国立衛研）]

(2) アニサキス症のレセプトデータを用いた発生実態解析

株式会社日本医療データセンターが保有するレセプト

のデータベースには、2005 年から 2008 年に至る 4 年間の健康保険組合のデータ（約 33 万名分・5 組合）が蓄積されている。このデータベースを用いて，我が国におけるアニサキス症の発生状況を推定した。今回はレセプトの傷病名に注目し、「アニサキス」を含むデータを検索した（アニサキス症・胃アニサキス症・腸アニサキス症・消化管アニサキス症・アニサキス幼虫移行症)。その結果，59 名（年平均で 14.75 名）が抽出された。この数値を，当該組合加入者の性別・年齢階級別に振り分け，2005 年の国勢調査に基づく全国の性別・年齢階級別の人口で拡大推計した。その結果，我が国で発生する年間のアニサキス症患者は，7,303 名と推計された。［杉山広、賀川千里、森嶋康之、春日文子（国立衛研)、木村真也（日本医療データセンター）］

(3) チリ産サケ・マスにおける裂頭条虫属幼虫の感染状況調査

南米チリは、ノルウェーに次ぐ世界第 2 位の養殖サケ・マス生産国で、ニジマス（＝トラウトサーモン)、ギンザケ、アトランティックサーモンの養殖が盛んに行われている。このチリ産養殖サケ・マスを感染源と推定される裂頭条虫症の集団発生が 2005～2006 年にブラジルで起きたことからブラジルでは公衆衛生上、問題になった。わが国も大量のチリ産養殖サケ・マスを輸入しており、これらを感染源とする裂頭条虫感染予防対策の観点から、チリ産養殖サケ・マスにおける裂頭条虫の寄生状況調査を行った。その結果、ギンザケにおいては、ヒトに寄生する広節裂頭条虫(*Diphyllobothrium latum*)と *Diphyllobothrium dendriticum* の幼虫（plerocercoid）寄生が確認されたが、ニジマスにおいては今回の調査では裂頭条虫幼虫の感染は確認されなかった。［山﨑浩、川中正憲、荒川京子、森有加、加藤基恵（チリ大学歯学部）］

(4) ネパール・カトマンズにおける有鉤嚢虫とエキノコックス感染状況調査

ネパールは宗教、文化、食習慣などを異にする民族で構成される国で、公衆衛生状況は劣悪で、食肉検査体制の不備によって寄生虫感染症の発生が後を絶たない。中でも、有鉤嚢虫症は公衆衛生学上、重要な寄生虫感染症になっている。また、エキノコックス病変を有する豚肉や水牛肉は食肉衛生上問題であることから、これらの寄生虫汚染状況について、カトマンズ市内の養豚場に隣接する屠畜場で解体された豚や食肉屋の店頭に並ぶ豚肉、水牛肉を対象に有鉤嚢虫とエキノコックス感染調査を実施した。得られた寄生虫材料については cox1 遺伝子のハプロタイプ解析を行った。その結果、解析した 9 個体の有鉤嚢虫についてはすべて同一のハプロタイプでインドやタイに分布する型と同じであった。また、豚の膵臓、ならびに水牛の肝臓から得られたエキノコックス 2 個体はいずれも cox1 遺伝子解析から、単包虫（*Echinococcus granulosus* sensu stricto, G1, sheep strain）であることがネパールではじめて明らかにされた。［山﨑浩、Durga D. Joshi（ネパール国立人獣共通感染症・食品衛生研究所）］

(5) ペットとして飼養されているアライグマのアライグマ回虫に関する調査

「外来生物法」により環境省に届出された飼養アライグマについて、飼養者へのアンケート調査と糞便検査を実施した。現在までに実施している国内野外捕獲アライグマのアライグマ回虫調査では、幸いにして陽性例の検出はない。今回のペットアライグマ(127 件 219 頭対象)調査で、実際の糞便検査によりアライグマ回虫陰性の確認が実施出来たのは 71 件 85 頭に止まった。また、展示施設等において飼育されているアライグマの一部では、現在もアライグマ回虫が存在するような可能性も否定できない。従って、万が一感染が確認された場合には、当該アライグマへの治療（駆虫）と共に、飼育者や施設外の動物への感染防止といった適切な飼育管理が重要であり、引き続き実態把握に努めていく必要がある。［川中正憲、山﨑浩、杉山広、森嶋康之、荒川京子］

(6) 青森県のと畜場で検出された豚のエキノコックス（多包虫）について

平成 10 年 8 月及び 10 月に、青森県十和田食肉衛生検査所所管のと畜場に搬入された豚 3 頭が多包虫症と診断された。これらの感染豚はいずれも青森県内の同一農場から搬入されていたことから、多包条虫の青森県での土着が疑われた。しかし、これら陽性豚の生産地に関しては、当該農場が自家繁殖豚のみならず家畜市場から購入した豚も保有しており、多包条虫の青森県土着説の確認が必要であった。その後、同食肉衛生検査所において、当該農場からの豚を含む年間 70 万頭もの食肉検査を実施しながら、多包虫感染豚は全く検出されなかった。また、この 10 年間に実施された動物疫学調査では陽性例が確認されていない。そして、平成 20 年度末に同食検により、青森産ではなく北海道産の豚 6 頭より多包虫感染が確認された。従って、現時点では青森県において、多包条虫の生活環が存在している可能性は低いと結論された。[木村政明（青森県健康福祉部)、東海林彰・立崎元・田中成子・原田邦弘・新井山潤一郎（青森県十和田食肉衛生検査所)、山﨑浩、杉山広、森嶋康之、川中正憲]

III. 分類・同定

1. インド東北部で重要な人体寄生性肺吸虫の種同定

インド東北部のマニプール州では、*Paragonimus skrjabini*（スクリアビン肺吸虫）および *Paragonimus heterotremus*（ヒロクチ肺吸虫）という 2 種類の肺吸虫幼虫が中間宿主の淡水産カニから検出されている。このマニプール州と更に隣接のナガランド州では、患者の喀痰から肺吸虫卵が検出されていたが、原因種は不明であった。そこでアルコール固定された患者虫卵について、形態を観察し、塩基配列の解読・解析した。その結果、いずれもヒロクチ肺吸虫と同定された。本虫による人体症例は、ベトナム・タイ・ラオスなどからも報告がある。東南アジアから、更に南アジアに掛けての広い地域で、本虫は人体寄生種としての重要な役割を果たしていると考えられた。［杉山広、シャンティクマール・シン（シッキム医科大学・インド）］

2. 同胞種間で異なるアニサキスの感染リスク：魚体内における虫体主要寄生部位からの推定

我が国の人体症例由来のアニサキス虫体を同胞種レベルで解析すると、*Anisakis pegreffii* は極めて少なく、殆ど総てが *Anisakis simplex* sensu stricto（s. str.）であることが報告されている。一方で，我が国で水揚げされた魚介類からは、*A. pegreffii* と *A. simplex* s. str. とが共に検出されている。そこで、日本近海で漁獲されたマサバ 29 尾を詳細に検索して、虫体の検出部位を同胞種間で比較した。*A. simplex* s. str. と同定された虫体は 85 匹で、20 匹（24%）が筋肉，65 匹（76%)は内臓から検出された。一方、*A. pegreffii* と同定された 895 匹は，総て内臓から検出された。可食部の筋肉から検出される

アニサキスは，専ら *A. simplex* s. str.であり、その結果として本虫が人体感染を引き起こすと考えられた。[杉山広、梅原梓里、川上泰（麻布大）]

3. 中国青海省で流行する *Echinococcus granulosus* の遺伝子型

中国青海省の果洛チベット族自治州には 3 種の *Echinococcus* 属条虫が分布するが、とりわけ *E. granulosus* による単包虫症が公衆衛生上の大きな問題となっている。しかしながら、これまでその詳細な遺伝子型は不明であった。そこで今回、同自治州において採集された各宿主（イヌ・オオカミ・ヒツジ・ヤク・チベットガゼル）由来の 249 検体を用い、12S rRNA 領域を対象とした PCR 法により遺伝子型を決定したところ、すべて G1（狭義の *E. granulosus*）であることが明らかとなった。［森嶋康之、山﨑浩、杉山広、川中正憲、韓秀敏・王虎（青海省 CDC)、余森海（中国 CDC)］

IV. 生理・生化学・分子生物学

1. 原虫症の病原機構・生物学にかかる研究

(1) 自由生活性アメーバの病原機構・生物学にかかる研究

アカントアメーバ性角膜炎の病理として、角膜実質層内における炎症および潰瘍形成の過程は重要である。前年度、ヒト培養角膜実質細胞（HCSC）に対するアメーバの細胞障害性(CPE)が明らかなことを示したことから、本年度はマイクロプレート培養系を用いて、実質細胞の CPE を定量的に解析するアッセイ系を構築した。これまでのところ角膜炎分離株間では CPE 発現に大きな差はみられていない。今後、このアッセイ系を用いることで CPE 阻害要因の検索、またアメーバ分離株の遺伝学的タイプと病原性の関連性を明らかにする。[高岡紀子（東京女子医大東医療センター)、八木田健司]

(2) 赤痢アメーバの病原機構・生物学・代謝学にかかる研究

ア．赤痢アメーバの貪食と脂質シグナルをつなぐ EhFP4 の解析

赤痢アメーバの貪食時に、フォスファチジルイノシトール３－リン酸（PtdIns3P）と、PtdIns3P に結合するドメインである FYVE ドメインと RhoGEF ドメインを持つタンパク質 EhFP4 が貪食胞に動員されることを見出した。EhFP4 の機能を知るためその脂質結合特異性を検討したところ、全長で PtdIns4P へ結合した。予想に反してこの結合は FYVE ドメインではなく、その下流の C 末端領域により担われていた。さらに点変異を導入した FYVE ドメインを持つ EhFP4 では PtdIns4P だけでなく、PtdIns3P, PtdIns5P へも結合した。EhFP4FYVE ドメインを発現する赤痢アメーバ株では、動物細胞に対する貪食活性が低下した。これは FYVE ドメインの強発現によるドミナントネガティブ効果と考えられた。以上の結果より、EhFP4 は PtdIns4P もしくはその他のシグナルに応じて貪食胞へ動員され、貪食を活性化させていると考えられた。[津久井久美子、野崎智義]

イ．赤痢アメーバ薬剤耐性に関与する遺伝子のトランスクリプトーム解析

現在抗赤痢アメーバ薬としてメタロニダゾールが唯一の薬として使用されているが、特に発展途上国での濫用があり、薬剤耐性株の出現が危惧される。そこで実験室で作成したメタロニダゾール耐性株を用い、トランスクリプトーム解析から、薬剤耐性に関与する遺伝子の特定を試みた。もっとも変動があった遺伝子が EHI_092110（hypothetical protein）であり、耐性株で 83 倍発現上昇がみられた。酸化還元制御に関わる遺伝子としては EHI_045340（glutamate synthease beta subunit）：7.2x 低下、EHI_067720 等（iron-sulfur flavoprotein）：2.3～2.7x 低下、EHI_021570(serine acetyltransferase 1)：2.8x 上昇、EHI_171750（cysteine synthase 2）：1.4x 低下、といった遺伝子で発現差があった。よってメタロニダゾール耐性株では酸化ストレスを緩和する分子システムが作動していると考えられた。しかし変動の大きい遺伝子群（5 倍以上）では多くが機能未知の分子であった。よって酸化ストレス以外の環境適応システムが存在する可能性がある。[Gil Penuliar、津久井久美子、野崎智義]

ウ．赤痢アメーバシステインプロテアーゼ輸送機構の解明

赤痢アメーバの重要な病原因子であるシステインプロテアーゼ(CP)の輸送に関与すると考えられる分子 CPBF1 を同定し、解析を行った。HA-tag を付けた CPBF1 の細胞内局在は、定常状態では小胞体と小胞膜上に、動物細胞貪食後には一部の貪食胞に動員された。しかしリソソームとの共局在はほとんど観察されなかったことから、CPBF1 は CP5 を小胞体から成熟前のリソソームやファゴソームへ輸送する受容体であると考えられた。また、CPBF1 の C 末端部分に保存されていた、アダプタータンパク質(AP)との結モチーフとして知られる YxxΦ モチーフを AxxA に置換した変異体を作成し、このモチーフの CPBF1 輸送における役割を検討した。しかしその局在は野生型の CPBF1 と変化がなく、YxxΦ モチーフの CPBF1 輸送への関与は明らかでない。赤痢アメーバには AP やクラスリンが保存されているが、今回の解析で見逃した変化が存在したか、新規のアダプター分子がその輸送を制御していることが示唆された。[津久井久美子、古川敦、坪井久美子、野崎智義]

エ．赤痢アメーバ pyridine nucleotide transhydrogenase (PNT)の解析

赤痢アメーバは嫌気呼吸をし、典型的なミトコンドリアを持たない。しかしミトコンドリアに存在するいくつかの分子を持ち、それらが直径約 100～200nm のマイトソームというオルガネラに集積していることが示唆されている。PNT は他種生物でミトコンドリアに存在するトランスポーターでありながら、以前行われた貪食胞のプロテオーム解析で最もペプチド数の多いタンパク質として見出されていた。そこで PNT 抗体を作成し、局在を検討した。定常状態で小胞状とドット状の局在を見せ、さらに貪食胞、エンドソーム、リソソームとの一部共局在が観察された。しかしマイトソームマーカーである CPN60 との共局在は無く、赤痢アメーバにおいて、PNT はミトコンドリアではなく、タンパク質分解に関わるオルガネラに局在することが示された。また、N 末部分にシグナル配列と予想される部分があったためシグナル配列と GFP との融合タンパク質を発現させその局在を確認したところ細胞質へ局在した。よって PNT はマイトソームタンパク質ではなくリソソーム形成に関わり、その役割は赤痢アメーバで独自に進化していると考えられた。[Mohammad Abu Yousuf、三田村文香、津久井久美子、野崎智義]

オ．赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラの機能の解析

赤痢アメーバ原虫は単細胞真核生物であるが、典型的なミトコンドリアを持たない。かわりにマイトソームと呼ばれるミトコンドリア関連オルガネラ（嫌気性の原生生物にみられる退化したミトコンドリア）を持つ。シャペロン3種類、トランスポーター1種類の蛋白質がマイトソームに局在すると報告されていたが、これだけではマイトソームの生理的意義を議論することは難しい。そこで赤痢アメーバマイトソームの本来の生理的機能を明らかにすることを目的に研究を行い、プロテオーム解析により新たなマイトソーム蛋白質として硫酸活性化経路の酵素を見出した。そして硫酸活性化経路が確かにマイトソームに局在していることを、免疫蛍光法および、活性測定により確認した。硫酸活性化経路は、通常は細胞質・色素体に存在する。他の嫌気性原生生物のミトコンドリア関連オルガネラにも硫酸活性化経路は存在せず、赤痢アメーバ原虫の酵素の起源がα-proteobacteriaと異なることから、赤痢アメーバ原虫のオルガネラは、単にミトコンドリアが退化したものではなく、進化の過程で硫酸活性化経路を取り込み、独自に進化したと考えられる。赤痢アメーバにユニークなオルガネラの同定は、新しい抗赤痢アメーバ薬剤の開発に繋がる可能性を有する。
［三田村文香、津久井久美子、Mohammad Abu Yousuf、野崎智義］

カ．赤痢アメーバ臨床分離株のゲノム解析

赤痢アメーバは遺伝的に多様な株の集合であり、感染により起こる症状も無症候ー腸炎ー肝膿瘍と様々である。株間のゲノム情報の相違を明らかにすることを目的に、無症候性症例と腸炎症例とから得られた2種類の分離株を用いて、illumina 次世代シーケンサーによるゲノム解読を行った。その結果、腸炎株に存在し、無症候性株に存在しないタンパク質コード領域約30種類が同定された。今後、病原性・臓器親和性に関与する遺伝子群が同定されることが期待される。［関塚剛史、黒田誠（病原体ゲノム）、津久井久美子、Aleyla Escueta-de Caz、野崎智義］

キ．赤痢アメーバのメタボローム解析

赤痢アメーバにおける中心代謝を理解することを目的に、CE-ToFMS を用いた網羅的代謝産物の定量解析を行った。これにより、細胞外のL-cysteine濃度の減少に伴い、いくつかの代謝経路が影響を受けることが明らかとなった。例えば、解糖経路では代謝の上流の代謝物が蓄積するのに対し、発酵最終産物やそのすぐ上流の AcetylCoA などの濃度は減少していた。また、リン脂質代謝やアミノ酸代謝にも明瞭な影響が見られた。
［Afzal Husain、Ghulam Jeelani、佐藤暖、末松誠、曽我朋義（慶応大学）、野崎智義］

ク．赤痢アメーバのスフィンゴミエリン代謝に関する解析

赤痢アメーバ栄養型における脂質代謝を理解することを目的に、赤痢アメーバから中性及び酸性スフィンゴミエリン分解酵素を同定し、組換え酵素を用いて酵素学的な特質を明らかにした。［Claudia Leticia Macias Mendoza、津久井久美子、中野由美子、野崎智義］

ケ．貪食を行う原虫に見出される膜輸送の多様化

赤痢アメーバにおいて病原因子の分泌や宿主細胞の貪食など、膜輸送は病原性で重要な役割を担っている。また赤痢アメーバや細胞性粘菌などのアメーバには、細胞内輸送に関与する遺伝子の数が多細胞生物よりも多様化していることが報告されていた。膜融合を調節する低分子量GTPaseであるRabの数をゲノムが公開されている原虫で検索したところ、単細胞の原虫（マラリア、トリパノソーマ、ジアルジア、クリプトスポリジウム）では出芽酵母とほぼ同等の数のRabをコードしていた。Rabのアミノ酸配列を元に細胞内局在を推定したところ、寄生性原虫では輸送経路に単純化が起きていることが推測された。一方で貪食能がある原生生物（赤痢アメーバ、トリコモナス、テトラヒメナ、ゾウリムシ）では、ヒトや高等植物よりもはるかに多いRabがコードされていた。これらの原虫ではRabだけでなく、細胞内輸送に関与する遺伝子全体が増幅していた。貪食という膜のダイナミクスを要する現象には、メンブレントラフィック全体の遺伝子のレパートリーが増幅する必要であったと考えられる。
［中野由美子、野崎智義、沼田治（筑波大）、中野賢太郎（筑波大）］

(3) フラスコ培養法による腸管寄生性微胞子虫 *Encephalitozoon intestinalis* に対するオゾンの不活化効果の確認

Encephalitozoon intestinalis は腸管寄生性微胞子虫であり水系感染症の重要な起因病原体の一つである。前報では、BS-C-1細胞を接着させた24穴プレートを用いて同虫に対する殺菌剤等の不活化効果を調べ、オゾンでは0.1 ppm・5分、0.2 ppm・2分の曝露により99.9%不活化が得られることを報告した（Jpn. J. Infect. Dis., 62, 413, 2009）。今回、同細胞接着25 cm2フラスコに、0.1あるいは0.2 ppmオゾンを曝露（0, 0.5, 1, 2, 5, 10分）させた胞子を接種後0, 3, 10, 17, 24, 31日目の培養上清中胞子数と31日目の細胞内spore foci数を測定した結果について分析したところ、0.1 ppmオゾン10分曝露胞子、0.2 ppmオゾン5および10分曝露胞子で経過に伴い31日目まで数の曲線的減衰を認めた。これらのフラスコにはspore fociは不形成であった。他の曝露条件では、24、31日目に胞子数増加の立ち上がりとspore fociの形成がみられた。その結果、胞子数の曲線的減衰はオゾンによる同虫の不活化を反映したものと考えられた。フラスコ培養法による時間経過に伴う上清中胞子数の減衰曲線解析と最終的に培養細胞内に形成されたspore foci数の測定は、E. intestinalis胞子に対する殺菌剤等の不活化効果を確認する有用な方法と思われた。［朝倉登喜子、古屋宏二、泉山信司、八木田健司］

(4) トキソプラズマの病原機構・生物学・代謝学にかかる研究

ア．植物ホルモンジベレリン合成阻害薬によるトキソプラズマの増殖阻害効果

我々は最近、トキソプラズマが植物ホルモンであるアブシジン酸を産生し、自身の増殖や分化の調節に用いていることを明らかにした。また、アピコンプレクス門に属する原虫であるトキソプラズマやマラリア原虫がいくつかの植物ホルモン阻害薬により増殖が阻害されることを示した。これらの結果はアピコンプレクス門原虫がアブシジン酸以外の植物ホルモンを産生し、増殖の制御に用いている可能性を示唆している。そこで本研究では、植物ホルモンの一種であるジベレリン生合成阻害剤がトキソプラズマに与える影響について検討をおこなった。

トキソプラズマのタキゾイトをジベレリン生合成阻害

剤存在下で培養したところ、その分裂が阻害され、トキソプラズマの増殖が著しく抑制された。この増殖抑制メカニズム解明のため、まず、ジベレリン生合成阻害剤処理したトキソプラズマを電子顕微鏡解析により詳細に観察した。すると、被処理トキソプラズマの lipid body 様の構造の増加と肥大、及び、トキソプラズマミトコンドリアの膨張とクリステの構造の崩壊が観察された。さらに、トキソプラズマのコレステロールの総量を測定したところ、被処理トキソプラズマでは、コレステロール総量が通常の約２倍になっていた。一方、ナイルレッド染色による蛍光顕微鏡観察では、被処理トキソプラズマは膜構造が染まらず、lipid body のみが強く染色され、その数も増加していた。現在これらの現象がトキソプラズマの分裂にどのように関わっているのかについて、解析を進めている。[青沼宏佳、永宗喜三郎]

イ．植物ホルモンサイトカイニンによるトキソプラズマの増殖制御機構の解明

サイトカイニンには植物が自然界で生合成しているものと人工合成されたものに大別でき、いずれも細胞分裂の促進、光合成の活性化、葉緑体の分化・増殖といった作用を持つことが知られている。そこでそれぞれのサイトカイニンをトキソプラズマの培養中に添加し、原虫の増殖率を測定したところ、天然サイトカイニン（trans-zeatin）は、高等植物の知見から期待されるとおり原虫の増殖が促進したが、合成サイトカイニン（thidiazuron）は逆に原虫の増殖を阻害した。また高等植物において、サイトカイニンはある種のサイクリンの発現量を調節することで細胞周期を制御していることが知られている。そこで我々はトキソプラズマのゲノム・データベースから全てのサイクリン様遺伝子を同定し、それらのサイトカイニン添加による発現量の変化を qPCR により経時的に観察した。その結果、ある特定のサイクリンの発現量が trans-zeatin 処理により 1,000 倍以上上昇し、thidiazuron 処理により約 100 倍減少していた。また、FACS による解析から、trans-zeatin は原虫の細胞周期のうち G1 期から G2 期への移行を誘導し、thidiazuron は逆に G2 期への移行を阻害していた。さらに通常原虫内に 1 つしか観察されないアピコプラストが trans-zeatin 処理によりその数が劇的に上昇し、thidiazuron 処理により消失した。これらの結果からトキソプラズマにおいて植物ホルモンであるサイトカイニンは、ある特定のサイクリンの発現を制御することで、原虫の細胞周期自体と、細胞周期の進行と厳密にリンクしているアピコプラストの分裂のタイミングを調節しているものと考えられた。[Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎]

ウ．宿主細胞 GPI がトキソプラズマ感染に与える影響の解析

宿主側の GPI アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響を調べるため、GPI アンカー生合成能欠失変異 CHO 細胞における原虫への感受性を野生株と比較した。その結果、変異株は野生株に対して有意に感受性が上昇していた。また野生株と変異株では、原虫の宿主細胞への侵入過程及び感染前期の増殖においては差が認められず、感染後期の増殖のみに差が認められた。また、宿主細胞からの脱出の過程にも差は認められなかった。これらのことから、宿主の GPI アンカーあるいは GPI アンカー型蛋白質が、原虫の増殖のうち後期の増殖のみを特異的に阻害している可能性が示唆された。

トキソプラズマ原虫は宿主細胞内での増殖の際、自身の周囲に宿主のミトコンドリアや ER をリクルートしてくるという現象が知られている。そこでこれらの細胞内における原虫の宿主ミトコンドリア・リクルート能を比較したところ、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。次にミトコンドリアや ER のリクルートメントの原因であると考えられているロプトリー蛋白質に着目した。ロプトリー蛋白質は原虫の宿主侵入に先立ち、独立した小胞（evacuole）として原虫から宿主細胞に注入されることが知られている。原虫による ROP1 及び ROP16 を含む evacuole 形成能を宿主の GPI の有無で比較したところ、GPI 生合成能欠失変異株では明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。[田原美智留、永宗喜三郎]

(5) アピコンプレクサ特異的な膜輸送

赤内期のマラリア原虫は寄生胞膜を介して赤血球細胞質中のヘモグロビンをエンドサイトーシスし、栄養源を摂取する。マラリア原虫のエンドサイトーシスには低分子量 GTPase の PfRab5a が関与することが報告されている。ゲノムの検索により、PfRab5 には３つのアイソタイプが存在し、その中の PfRab5b は膜への結合が N 末端のミリストイル化に依存することが分かった。熱帯熱マラリアだけでなく、ミリストイル化される Rab5b を持つ原虫は、全てのマラリア原虫種に保存すると共に、他のアピコンプレキサ（*Toxoplasma gondii, Babesia bovis*）にも保存されていた。一方で、細胞内の Rab のレパートリーが単純化したアピコンプレキサ(*Theileria annulata, Cryptosporidium parvum*)またはアルベオラータ生物群に分類される繊毛虫（*Tetrahymena thermophila, Paramecium tetraurelia*）には Rab5 の多様化ならびに N 末端のミリストイル化は存在しなかった。熱帯熱マラリア原虫における Rab5b の機能を解析するために、FCR3 株のトロフォゾイト／スカイゾント期より cDNA を合成し、クローニングを試みた。最も発現の高い PfRab5 アイソタイプは 5a であり、次に PfRab5c の発現が高かった。PfRab5b は最も発現量が少ないもののトロフォゾイト／スカイゾント期に発現していることが確認された。[中野由美子、駒木-安田加奈子（国際医療センター）]

2．蠕虫症の病原機構・生物学にかかる研究

(1) 有鉤嚢虫システインプロテアーゼの in situ における発現様態の組織化学的解析

有鉤嚢虫はヒトの脳など中枢神経系に寄生すると、癲癇発作、麻痺、発語障害などの症状が見られ、嚢虫寄生部位周辺の組織では、浮腫や炎症性細胞の集積が認められる。これらの病理学的変化の原因として、有鉤嚢虫のカテプシンＬ様システインプロテアーゼ（以下、カテプシンＬ）の関与が考えられている。カテプシン L は細胞障害性の高いプロテアーゼであり、嚢虫液中に強い酵素活性が検出されることから、嚢虫が変性、死滅する過程において虫体より漏出し、これが周辺組織の浮腫など嚢虫症の病態に関与することが示唆されている。

このカテプシン L の組織内における局在は不明であったので、カテプシン L の細胞内局在性を解明するために、有鉤嚢虫カテプシン L 特異的ペプチド抗体を作成し、これを用いて免疫染色を行った。その結果、カテプシン L は有鉤嚢虫においては、頭節の吸盤を構成する筋組織、嚢胞壁の外層、内層、柔組織内に局在していた。一方、成虫では、片節組織よりはむしろ子宮内虫卵、とりわけ六鉤幼虫で強いシグナルが検出され、発生の早い時期からすでに発現していることが明らかになった。このことは虫卵から孵化した六鉤幼虫が組織に定着・侵入時にも

カテプシンＬが関与している可能性が示唆された。
［山﨑浩、森有加、森嶋康之、杉山広、李远林・罗天鹏（雲南省大理州血吸虫病防治研究所）、千葉厚郎（杏林大･医･脳神経内科）］

(2) チリ産裂頭条虫属幼虫プレロセルコイドの cox1 遺伝子のハプロタイプ解析
南米チリの南部に位置する Llanquihue 湖で捕獲されたギンザケ（*Oncorhynchus kisutch*）の胃や筋肉から採取された広節裂頭条虫(*D. latum*)と *D. dendriticum* の幼虫（plerocercoid)、それぞれ 2、58 個体について cox1 遺伝子のハプロタイプ解析を行ったところ、広節裂頭条虫のハプロタイプは同一で、多様性は認められなかったが、*D. dendriticum* については、少なくとも 10 個の異なるハプロタイプが検出され、特定のハプロタイプが優占的に検出され、裂頭条虫の種によって個体群構造が異なるという興味深い知見が得られた。［山﨑浩、川中正憲、荒川京子、森有加、加藤基恵（チリ大学歯学部）］

寄生虫症依頼検査業務

1. 消化管寄生性原虫類および病原性アメーバ類の検査
海外渡航者および HIV 感染者を中心に、下痢症の確定診断を目的として原因となる原虫の検査を行っている。本年度は 69 検体を検査し、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム、ジアルジア、サイクロスポラを検出した。
また国内で発生するアメーバ性角膜炎ならびにアメーバ性脳炎に関する検査診断を行っており、角膜擦過物、コンタクトレンズ保存液等角膜炎関連の検体については本年度 30 検体を検査し、アカントアメーバを検出あるいは同定し、株の分離を行った。またアメーバ性脳炎に関連しては 1 検体を検査した。［八木田健司、泉山信司、津久井久美子］

I. 血清を用いた寄生虫抗体検査
線虫 8 種（ドロレス顎口虫、犬回虫、犬鉤虫、アニサキス、豚回虫、犬糸状虫、広東住血線虫)、条虫 4 種（有鉤嚢虫、マンソン弧虫、多包虫、単包虫)、吸虫 6 種（ウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、肝蛭、肝吸虫、日本住血吸虫、マンソン住血吸虫）の抗原を用いた抗体検査が可能であり、通常は ELISA（酵素抗体法）を実施しているが、寄生虫症によって、dot-blot、 western blot（有鉤嚢虫症、エキノコックス症)、あるいは虫体切片標本を用いた免疫染色検査（旋尾線虫症）を行っている。計 39 血清サンプルのうち、14 検体で特異抗体が検出された。内訳は肺吸虫症 (5)、有鉤嚢虫症 (4)、トキソカラ症 (3)、幼線虫移行症 (1)、マンソン孤虫症 (1)。［山﨑浩、森有加、杉山広、森嶋康之］

II. 遺伝子解析による寄生虫分子同定
自然排出あるいは駆虫された虫体、あるいはパラフィン包埋標本中に見出された虫体の同定依頼が 20 件あり、ミトコンドリア DNA の cox1 遺伝子の解析結果に基づいて種の同定を行った。20 件の内訳は、日本海裂頭条虫(11)、有鉤嚢虫 (4)、無鉤条虫 (1)、多包条虫 (1)、有鉤条虫 (1)、鯨複殖門条虫 (1)、アメリカ鉤虫 (1) であり、傾向としては、サケ･マスの刺身や寿司を好む日本人の食生活習慣を反映して、日本海裂頭条虫症が多かった。また、輸入症例として有鉤嚢虫症と無鉤条虫症、アメリカ鉤虫症があった。特記すべきは、有鉤嚢虫症の 1 例は有鉤条虫症との重複感染例であった。［山﨑浩、森有加、杉山広、森嶋康之］

レファレンス業務

I. 衛生微生物技術協議会・レファレンスセンター会議
第 30 回衛生微生物技術協議会において寄生虫に関するレファレンスセンター会議を行った。食品媒介寄生蠕虫症の現況と対応気候、環境変化に伴う寄生虫症の変容、プール等で感染する可能性のある寄生虫症、赤痢アメーバ症の現状と検査体制を中心とした話題を提供し議論した。(2009 年 7 月 9-10 日、堺市)
［八木田健司、山﨑浩、杉山広、大前比呂思、野崎智義］

II. 原虫類のリファレンス活動
感染研および外部共同研究機関（医療機関、地方衛生研究所等）の行う調査研究から得られる材料をもとに各種原虫類の分離株の収集を行っている。具体的には分離株の遺伝子型を調べ、その結果を共同研究者側に還元するとともに、固定標本、DNA あるいは培養可能な場合は病原体として保存を行っている。［八木田健司、泉山信司］

研修

I. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会において、トキソプラズマ症の最近の話題について講義した。(2010 年 2 月 25-26 日）［永宗喜三郎］

II. 平成 21 年度水道クリプトスポリジウム試験法実習（国立保健医療科学院主催）にて、水道原水からのクリプトスポリジウム、ジアルジア検出の実習を行った。その他、地研からの要請に対して適宜行った。［八木田健司、泉山信司］

III. 平成 21 年度細菌研修コース（国立保健医療科学院主催）にて、寄生性原虫類概論ついて講義した。［八木田健司］

IV. JICA 中米血液スクリーニングコースの受講生に対して､LAMP 法による遺伝子検査法の講義と実習を行った。［大前比呂思、泉山信司、布施晃（血液･安全性研究部）］

V. 平成 21 年度新興再興感染症希少感染症研究会にて、全国の地方衛生研究所などの職員･技師約 180 名を対象に､「トキソカラ症とイヌ糸状虫症」に関する講演を行った（2010 年 2 月 26 日、感染研･村山庁舎）［山﨑浩］

VI. 国立保健医療科学院･食肉衛生検査研修コースにて、「旋毛虫病その他の寄生虫病」について講義を行った（2009 年 7 月 13 日、国立保健医療科学院）［川中正憲］

VII. 国立感染症研究所・医師卒後臨床研修プログラム
「臨床や公衆衛生の現場で問題となる寄生虫症の考え方」に関する研修を行った。［大前比呂思］

VIII. Field Epidemiology Training Program (FETP)
初期研修に協力し､「国際的な寄生虫症対策と疫学の変化」に関する研修を行った。［大前比呂思］

IX. 国際協力機構（JICA）のアフリカ向け研修コース
地域保健システム強化による感染症対策に協力して､「寄生虫症のサーベイランスと対策」に関する研修を行った。［大前比呂思］

国際協力関係業務

I.　中国科学院生態環境研究所クリプトスポリジウム実習

試料機材用意、実習講義等の各種協力を行った。[泉山信司、遠藤卓郎（細菌第一部)、黒木俊郎（神奈川県衛生研究所)、浅見真理（国立保健医療科学院水道工学部）]

II. 国際的な寄生蠕虫症対策への貢献

WHO は、世界的にみて感染者が多いのにも関わらず、今まであまり注目を集めてこなかった感染症を Neglected Tropical Diseases(NTDs)とし、最近その対策に力を入れている。NTDs 対策のうち、特に寄生蠕虫症対策に着目した WHO 主催の TDR Regional Consultation in Infectious Diseases of Poverty in Asian Countries とアジア開発銀行が主催する Evaluation of parasitic diseases control programs in Mekong region に招聘され、治療的介入でメコン住血吸虫症が制圧される可能性と、免疫血清検査を住血吸虫低浸淫地でコントロールの指標として用いる意義について報告した。会議では、多くの寄生蠕虫症対策で治療的介入を中心とした成果があがる一方、従来の疫学的指標の限界が明らかになっている問題点を共有し、今後のモニタリング手法に対する研究の重要性を確認して、他の参加者とともに報告書を作成した。[大前比呂思]

III. アジアにおけるマラリアの疫学と対策に関する共同研究と情報共有の促進

アジア諸国の研究機関とのネットワークを強化し、情報や研究成果の共有をさらに進めるため、2011 年 1 月 29～31 日には、11 カ国から 14 の研究機関の参加を得て、中国寄生虫症研究所、中国 CDC と国立感染症研究所が共催する第２回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議（The 2nd International Conference on Vivax malaria in Asia and Pacific area ）を上海で開いた。参加国・参加地域におけるマラリアの流行状況や対策に関する情報交換を進めるとともに、2008 年の前回国際会議で重点的に研究を進める分野とされた、三日熱マラリアにおける臨床診断・迅速診断法の意義・LAMP 法のフィールド応用・プリマキン集団治療の効果などの項目については、詳細な報告と討議がなされた。そのうち、三日熱マラリア診断に関する迅速診断キットの限界については、ソロモン諸島での実例に即して報告した。[大前比呂思、湯林華（中国寄生虫症研究所）]

IV.メコン川流域における住血吸虫症対策への協力

ラオス・カンボジア国境付近のメコン川中流域に拡がるメコン住血吸虫症対策に協力した。カンボジアの浸淫地であるクラチエ省では、プラジカンテルの集団治療の継続の結果、2004 年以降新規感染者がゼロの状態が続いていたが、2009 年にメコン住血吸虫卵抗原による免疫血清検査（ELISA）を実施した 8 村落で、抗体陽性率は 6.7%～72.5%を示した。高い抗体陽性率を示した 2 村落では７％の児童に糞便内虫卵が確認された。メコン住血吸虫浸淫地では、未だ感染の機会が多い地域が点在しているが、免疫血清検査よるモニタリングは、住血吸虫症対策の進展の中で部分的に残った高リスク地域の検出に有用なことがわかった。[大前比呂思、千種雄一（獨協医大)、桐木雅史（獨協医大)、Duon Socheat（National Center for Control of Malaria and Vector Borne Diseases）]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 原著論文、総説（欧文）

1) Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. Phosphatidylinositol-phosphates mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoon *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol., 11, 1471-1491, 2009.

2) Sato, D. and Nozaki, T. Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. IUBMB Life, 61, 1019-1028, 2009.

3) Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106, 21731-21736, 2009.

4) Sato., D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Int. J. Antimicrob. Agents, 35, 56-61, 2010.

5) Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. Parasitol. Int., 59, 75-81,2010.

6) Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria Cell. Microbiol., 12, 331-342, 2010.

7) Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V,, and Nozaki, T. Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol., 170, 100-104, 2010.

8) Mendoza-Macías, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., and Padilla-Vaca, F. *Entamoeba histolytica*: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. Exp. Parasitol., 125, 279-285, 2010.

9) Khan, S. M., Debnath, C., Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, G. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. Vet. Parasitol., 2010. In press

10) Mishra, V., Ali, V., Nozaki, T., and Bhakuni,V. *Entamoeba histolytica* phosphoserine aminotransferase (EhPSAT): Insights into the structure-function relationship. BMC Res. Note, 3, 52, doi:10,1186/1756-0500-3-52, 2010.

11) Hirakawa, Y., Nagamune, K., and Ishida, K. Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106, 12820-12825, 2009.

12) Inomata,A., Kishida,N., Momoda, T., Akiba, S.,

Izumiyama, S., Yagita, K. and Endo,T. Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. Water Sci. Technol., 60,2167-2172, 2009.

13) Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. Exp. Parasitol., 121, 144-150, 2009.

14) Nakada-Tsukui, K., Kobayashi, Y., and Watanabe, N. Characterization of a cDNA encoding guinea pig I3 associated with the delayed-type hypersensitivity reaction. Zoolog. Sci., 26, 617-622, 2009.

15) Furuya, K., Asakura, T., Igarashi, M., Morita, T. Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in rabbit urine samples. Vet. Rec., 165, 85-86, 2009.

16) Furuya K. Spore-forming microsporidian *Encephalitozoon*: Current understanding of infection and prevention in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 62, 413-422, 2009.

17) Sugiyama H., Umehara A., Morishima Y., Yamasaki H., Kawanaka M. Detection of *Paragonimus* metacercariae in Japanese freshwater crabs, *Geothelphusa dehaani*, bought at retail fish markets in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 62, 324-325, 2009.

18) Takeda M., Sugiyama H., Qian B.-Z. Records of three species of freshwater crabs from China. J. Teikyo Heisei Univ., 20, 193-202, 2009.

19) Sakudoh T., Iizuka T., Narukawa J., Sezutsu H., Kobayashi I., Kuwazaki S., Banno Y., Kitamura A., Sugiyama H., Takada N., Fujimoto H., Kadono-Okuda K., Mita K., Tamura T., Yamamoto K., Tsuchida K. A CD-36 related transmembrane protein is coordinated with an intracellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. J. Biol. Chem., 285, 7739-7751, 2010.

20) Shirakawa K., Yamasaki H., Ito A., Miyajima H. Cerebral sparganosis: The wandering lesion. Neurology, 74, 180, 2010.

21) Mercado R., Yamasaki H., Kato M., Muñoz V., Sagua H., Torres P., Castillo D. Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species causing diphyllobothriasis in Chilean patients. Parasitol. Res., 106, 995-1000, 2010.

22) Kimura M., Toukairin A, Tachizaki H., Tanaka S., Harada K., Araiyama J., Yamasaki H., Sugiyama H., Morishima Y., and Kawanaka M. *Echinococcus multilocularis* detected in slaughter pigs in Aomori, northernmost prefecture of mainland Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 63, 80-81, 2010.

23) Hasan, A.U., Suguri, S., Sattabongkot, J., Fujimoto, C., Amakawa, M., Harada, M., Ohmae, H. Implementation of a novel PCR based method for detecting malaria parasites from naturally infected mosquitoes in Papua New Guinea. Malar J., 8, 182, 2009

24) Nakagawa, Y., Ueki, M., Fueda, K., Ishikawa, H., Ohmae, H. Risk assessment of re-emerging *Plasmodium falciparum* on Ishigaki Island using a stochastic model. Trop. Med. Health, 37, 97-107, 2009

2. 原著論文、総説（和文）

1) 永宗喜三郎. 植物としてのトキソプラズマ原虫：植物ホルモンとカルシウムシグナリング, 蛋白質 核酸 酵素. 54, 1047-1052, 2009.

2) 青沼宏佳, 田原美智留, 永宗喜三郎. トキソプラズマ、増殖の仕組み. 医事新報. 4489, 39-43, 2009.

3) 烏谷竜哉, 黒木俊郎, 大谷勝美, 山口誠一, 佐々木美江, 齊藤志保子藤田雅弘, 杉山寛治, 中嶋 洋, 村上光一, 田栗利紹, 蔵元 強, 倉 文明, 八木田健司, 泉山信司, 前川純子, 山崎利雄, 縣 邦雄, 井上博雄. 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子. 感染症学雑誌, 83, 36－44, 2009.

4) 杉山 広. 食習慣を背景に発生する我が国の肺吸虫症. Clin. Parasitol. (臨床寄生虫学会誌). 20, 9-11, 2009.

5) 寺島 剛, 竹内英二, 西尾久明, 石川将史, 山本徳栄, 荒木 潤, 杉山 広. 肺切除で宮崎肺吸虫の虫嚢内寄生を認めた1例. Clin. Parasitol. (臨床寄生虫学会誌). 20, 43-46, 2009.

6) 梅原梓里, 荒木 潤, 川上 泰, 内田明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析：人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 獣医寄生虫学会誌. 8, 52, 2009.

7) 多々良成紀, 杉山 広, 熊澤秀雄, 斑目広郎. 動物園飼育ミーアキャットにおける宮崎 肺吸虫症の1例. 日本野生動物医学会誌. 15, 45-47, 2010.

8) 杉山 広. 食品媒介寄生虫による食中毒. 日本食品微生物学雑誌. 27, 1-7, 2010.

9) 山崎 浩, 川中正憲, 荒川京子, 森 有加, 杉山 広, 森嶋康之, Ruben Mercado, 加藤 基恵. 南米チリよりDNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について. Clin. Parasitol. 20, 27-29, 2009.

10) 姜 朱美, 住田菜穂子, 福田 均, 杉山 広, 山崎 浩. 皮膚二核顎口虫症. 皮膚科診療. 31, 977-980, 2009.

11) 児玉紀子, 山本佳史, 本津茂人, 吉川雅則, 木村弘, 西尾福真理子, 王子幸輝, 石坂 重明, 吉川正英, 赤尾信明, 山崎 浩. 所在の変わる皮膚および関節の疼痛を訴えた 肺トキソカラ症の 1 例. Clin. Parasitol. 20, 49-51, 2009.

12) 小出照子, 山崎 浩, 渡辺伸元, 木許 泉, 河邊太加志. 日本海裂頭条虫症の兄妹例. 日小児誌. 114, 1065-1068, 2010.

13) 山本徳栄, 近 真理奈, 斎藤利和, 前野直弘, 小山雅也, 砂押克彦, 山口正則, 森嶋康之, 川中正憲. 埼玉県のイヌおよびネコにおける腸管寄生虫類の保有状況. 感染症誌. 83, 223-228, 2009.

14) 木村政明, 東海林 彰, 立崎 元, 田中成子, 原田邦弘, 新井山潤一郎, 山崎 浩, 杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲. 青森県のと畜場に搬入された豚から検出されたエキノコックス（多包虫）について. 病原微生物検出情報. 30, 243-244, 2009.

3. 書籍（英文）

1) Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén (2010) Dissecting the

Actin Cytoskeleton of Entamoeba histolytica from a Genomic Perspective. In "Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology" Editted by C. Graham Clark, Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, March 2010.

2) Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi Nozaki (2010) Genomic and post-genomic approaches to understand the pathogenesis of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. In "Genomes of Food- and Water-borne Pathogens" Editted by Pina Fratamico, Sophia Kathariou, and Yanhong Liu. ASM Press, Washington, D.C. In press.

4. 書籍（和文）

川中正憲，共著者多数．「食品安全の事典」．日本食品衛生学会編集．朝倉書店．2009.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sep 8-11, 2009.

2) Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. MEtabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sep 8-11, 2009.

3) Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. Functional analysis of a putative cysteine protease receptor from *Entamoeba histolytica*. The XXth Molecular Parasitology Meeting. Woods Hole, Sep 13-17, 2009.

4) Nozaki, T. Rab small GTPases and phosphatidylinositides regulate phagocytosis and membrane trafficking of virulence factors: their roles in the pathogenesis of amebiasis. XVIIIth Congress of Parasitology. Aguascalientes, Mexico, Sep 21-26, 2009.

5) Nozaki, T. Mitosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Adaptive and Innate Immune Response to Neglected Tropical Diseases. US-Japan Cooperative Medical Science Program. San Diego, Jan 10-11, 2010.

6) Kumiko Nakada-Tsukui, Atsushi Furukawa, Yoko Yamada, and Tomoyoshi Nozaki Identification of a YxxL motif-containing transmembrane protein as a putative receptor of the major virulence factor cysteine protease in the enteric protist Entamoeba histolytica 49th The Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Diego, CA, Dec 5-9, 2009.

7) Sugiyama H. and Rangsiruji A. How many kinds of *Paragonimus westermani* are there? The 6th seminar on food-and water-borne parasitic zoonoses. Bangkok, Dec 2-4, 2009.

8) Singh S.T., Devi Kh.R. and Sugiyama H. Paragonimiasis haemoptysis in children on the Indian Subcontinent. The 6th seminar on food-and water-borne parasitic zoonoses. Bangkok, Dec 2-4, 2009.

9) Singh S.T., Sugiyama H., Rangsiruji A., Devi Kh.R. and Singh L.D. Experimental infection of laboratory animals with *Paragonimus heterotremus* metacercariae occurring in Manipur, India. Joint International Tropical Medicine Meeting Bangkok, Dec 2-4, 2009.

10) Ohmae, H., Sugiyama, M., Ebihara, M., Chigusa, Y., Kirinoki, M., Blas, B.L., Ducussin, B., Sinuon, M., Sochet, D. Impact of Climate Changes on Parasitic Diseases. The 1st East Asian International Symposium on Climate Change and Health. Tsukuba, Jun 22-23, 2009.

11) Asahi, H., Izumiyama, S., Kwansa-Bentum, B., Tolba M.E. Identification of components of intraerythrocytic Plasmodium falciparum that interact with growth-promoting lipids. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, the 58th Annual Meeting. Washingtom, USA, Nov18-22, 2009.

12) Kwansa-Bentum, B., Kitamura, K., William, K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S., Asahi, H., Wison, M.D., Ohta, N., Tolba M.E. Comparative study of Plasmodium falciparum growth in serum-free media and expression levels of Pfcrt gene after exposure to drug. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, the 58th Annual Meeting. Washingtom, USA, Nov 18-22, 2009.

13) Ohmae, H. Limitation of clinical diagnosis and evaluation of rapid diagnostic tests to detect vivax malaria in the field. The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area. Shanghai, China, Jan 29-30, 2010.

14) Ohmae, H., Ishikawa, H., Fueda, T., Ono, M., Tnag, L., Gu, Z. Basic analysis to estimate relationship between climate change and emerging of vivax malaria. The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area. Shanghai, China, Jan 29-30, 2010.

15) Sawabe, K., Tsuda, Y., Ohmae, H. Current distribution and molecular identification of anopheline mosquitoes in Japan. The 2nd international conference on vivax malaria in Asia and Pacific area. Shanghai, China, Jan 29-30, 2010.

16) Tahara, M., Andrabi,S.B., Kinoshita, T., and Nagamune, K. GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to the Toxoplasma gondii infection. 10th International Congress on Toxoplasmosis. Karkrade, the Netherlands, Jun 19-23, 2009.

17) Tahara, M., Andrabi,S.B., Kinoshita, T., and Nagamune, K. The effect of GPI-deficient mutation of the host cell to the Toxoplasma gondii infection. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, Japan, Sep 8-11, 2009

2. 国内学会

1) 永宗喜三郎．Toxoplasma gondii as a plant: plant hormone and calcium signaling，帯広畜産大学第９回AGHセミナーコンソーシアム（JICAセミナー），帯広，2009年６月11日

2) 永宗喜三郎. The effect of GPI-deficient mutation to the Toxoplasma gondii infection, 筑波大学「次代を担う若手大学人育成イニシアティブ」若手フェスティバル, 下田, 2009年7月2-3日
3) 永宗喜三郎. トキソプラズマ原虫の産生する低分子量生理活性物質とカルシウムシグナリング, 第56回トキシンシンポジウム, 岐阜, 2009年8月26-28日
4) 平川泰久, 永宗喜三郎, 石田健一郎. 二次共生色素体へのタンパク質輸送機構, 第82回日本生化学会, 神戸, 2009年10月21-24日.
5) 永宗喜三郎. トキソプラズマの植物様ホルモンと宿主特異性, 第32回日本分子生物学会, 横浜, 2009年12月9-12日
6) 野崎智義. 赤痢アメーバ症新規創薬, 第147回日本獣医学会学術集会, 宇都宮, 2009年4月2-4日
7) 野崎智義. 寄生虫と感染症, 知の市場　早稲田大学, 東京, 2009年6月30日
8) 古川敦, 津久井久美子, 野崎智義.　赤痢アメーバシステインプロテアーゼ結合タンパク質の機能解析, 第17回分子寄生虫ワークショップ, 草津, 2009年8月6-9日
9) 津久井久美子, 野崎智義. イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ貪食制御機構,　第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 大阪, 2009年10月9-10日
10) 見市文香, 野崎智義. ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能ー赤痢アメーバ原虫"sulfosome"に存在する硫酸活性化経路ー, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21-24日
11) 岡田麻美, 見市文香, Nirianne Marie Q. Palacpac, 野崎智義, 狩野繁之, 三田村俊秀. 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質滴の生合成と輸送, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21-24日
12) 津久井久美子, Aleyla Escueta, 中野由美子, 野崎智義. 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様性と進化, 第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21-24日
13) 唐木剛, 村野祥子, 亀井加恵子, 佐藤暖, 野崎智義, 原田繁春. Entamoeba histolytica 由来メチオニンガンマリアーゼ1と2のX線結晶構造解析,　第82回日本生化学会大会, 神戸, 2009年10月21-24日
14) 野崎智義. 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答のメタボローム解析, 第4回メタボロームシンポジウム, 横浜, 2009年11月18-19日
15) 黒田誠, 野崎智義. 赤痢アメーバの比較ゲノミクス, 寄生虫ゲノム討論会：次世代シーケンサーによる新規寄生虫ゲノムの解読, 大阪, 2009年12月4日
16) 河津信一郎, 野崎智義. 宿主・組織特異性を規定する宿主・寄生体インターフェースの分子基盤, （ワークショップ）第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9-12日
17) 野崎智義. 真核生物におけるミトコンドリアの多様性：腸管寄生原虫赤痢アメーバの新規オルガネラの解析, 第9回日本ミトコンドリア学会年会,　東京, 2009年12月17-19日
18) 田原美智留, Andrabi, S.B.A., 木下タロウ, 永宗喜三郎. トキソプラズマ感染に宿主細胞側ＧＰＩアンカーが与える影響, 第17回分子寄生虫学ワークショップ, 群馬, 2009年8月6-9日
19) 田原美智留, Andrabi, S.B.A., 木下タロウ, 永宗喜三郎. トキソプラズマ感染における宿主細胞側ＧＰＩアンカーの影響, 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 大阪, 2009年10月9-10日
20) 遠山知子, 永宗喜三郎, 田原美智留, 堀井俊宏, 田邉和裕. 植物生長調節物質の抗マラリア作用, 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 大阪, 2009年10月9-10日
21) 泉山信司, 猪又明子, 百田隆祥, 岸田直裕, 秋葉道宏, 八木田健司, 遠藤卓郎. RT-LAMP 法によるクリプトスポリジウム検査法の開発, 第69回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2009年10月3日
22) 高岡紀子, 八木田健司, 亀井裕子, 山上　聡, 野崎智義, 松原正男. 当院で得られたアカントアメーバの遺伝学的分類, 第46回日本眼感染症学会, 大阪, 2009年7月10-12日
23) 猪又明子, 百田隆祥, 泉山信司, 遠藤卓郎. RT-LAMP 法による水試料からのクリプトスポリジウム高感度検出, 日本水処理生物学会第46回大会, 高知, 平成21年11月11-13日
24) 百田隆祥, 太田嘉則, 神田秀俊, 猪又明子, 泉山信司, 遠藤卓郎. RT-LAMP 法を用いたクリプトスポリジウムの高感度迅速検出, 第44回日本水環境学会年会, 福岡, 2010年3月15-17日
25) 岸田直裕, 秋葉道宏, 泉山信司, 宮田　亮, 野田尚宏, 関口勇地, 古田篤史, 常田　聡. 新規遺伝子定量手法 ABC-PCR 法を用いた水中の病原微生物の定量, 第44回日本水環境学会年会, 福岡, 2010年3月15-17日
26) 杉山寛治, 神田 隆, 高橋奈緒美, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎. 循環ろ過式浴槽モデルにおけるクロラミンBの消毒効果, 第36回日本防菌防黴学会年次大会, 大阪, 2009年9月14-15日
27) 高橋淳子, 久保田佳子, 畔上二郎, 大島赴夫, 小島幸一, 香川（田中）聡子, 神野透人, 泉山信司, 遠藤卓郎. モノクロラミン（塩素代替消毒剤）の皮膚一次刺激性に関する研究, 第36回日本防菌防黴学会年次大会, 大阪, 2009年9月14-15日
28) 泉山信司, 猪又明子, 八木田健司, 遠藤卓郎. LAMP 法（Loop-mediated Isothermal Amplification）によるクリプトスポリジウム検出のためのオーシスト精製と DNA 抽出, 第60回全国水道研究発表会, さいたま, 2009年5月20-22日
29) 泉山信司, 八木田健司, 倉 文明, 遠藤卓郎. モノクロラミンによる Naegleria アメーバの消毒, 第9回環境技術学会研究発表大会, 堺, 2009年9月11日
30) 高橋淳子, 香川（田中）聡子, 久保田佳子, 大島赴夫, 小島幸一, 泉山信司, 遠藤卓郎, 高鳥浩介, 神野透人. 公衆浴場における消毒副生成物の暴露評価と真菌汚染の実態調査について, 第9回環境技術学会研究発表会, 大阪, 2009年9月11日
31) Nakada-Tsukui, K., Picazzari, K., Tsuboi, K., and Nozai, T. Unique role of the autophagic pathway in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9-12日
32) Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi Nozaki FYVE domain of EhFP4 does not mediate direct binding to PtdIns-Ps, but regulates their specificity. 第61回細胞生物学会大会, 名古屋, 2009年6月2-4日
33) 梅原梓里, 荒木 潤, 川上 泰, 内田明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析：人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索, 第147回日本獣医学会学術集会, 宇都宮, 2009年4月2-4日
34) 佐山宏一, 藤原 宏, 長谷川直樹, 石坂彰敏, 仲地一郎, 金蔵孝介, 山岸由幸, 伊藤 亮, 山﨑 浩, 田邊

将信．肺・肝臓に多発嚢胞を認め経皮的嚢胞液ドレナージ治療(PAIR)とアルベンダゾールの長期投与で改善した単包条虫症の 1 例，第 562 回日本内科学会関東地方会，東京，2009 年 5 月 9 日

35）杉山 広．食習慣を背景に発生する我が国の肺吸虫症， 第 20 回日本臨床寄生虫学会学術年会， 吹田，2009 年 6 月 20 日．

36）寺島 剛，竹内英二，西尾久明，石川将史，山本徳栄，荒木 潤，杉山 広．肺切除で宮崎肺吸虫の虫嚢内寄生を認めた 1 例，第 20 回日本臨床寄生虫学会，吹田，2009 年 6 月 20 日．

37）山﨑 浩，川中正憲，荒川京子，森 有加， 杉山 広，森嶋康之，Mercado R，加藤基恵．南米チリより DNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について，第 20 回日本臨床寄生虫学会学術年会，大阪， 2009 年 6 月 20 日．

38）杉山 広，森嶋康之，川中正憲，山﨑 浩． 食品媒介寄生蠕虫症．アニサキス症・肺吸虫症を例として，第 30 回衛生微生物技術協議会総会・研究会，堺，2009 年 7 月 9-10 日．

39）杉山 広，アチャリヤ・ラングシルジ．ウェステルマン肺吸虫の同定論に関連する最近の話題，第 3 回蠕虫研究会，宮崎， 2009 年 11 月 13-14 日

40）桑原奈々，杉原徳彦，宮下 勉，金谷光恵，山﨑 浩，朝日博子，上野正純，福富裕之， 杉原壽彦．プラジカンテルを用いた駆虫で頭節を回収した得た無鉤条虫の一例，日本衛生検査所協会学術研究発表会，東京，2009 年 11 月 26 日

41）森嶋康之、山﨑 浩．エキノコックス・関連条虫のゲノムワイド解析の現状，寄生虫ゲノム討論会，大阪，2009 年 12 月 4 日

42）中野由美子．原虫における膜輸送の特殊性と多様性：赤痢アメーバからの情報発信，つくばプロティストロジーフォーラム，つくば，2009 年 10 月 26 日

43）北村圭，熊谷貴，Bethel Bentum K，三田村俊英， 坪井敬文，朝日博子，太田伸生．熱帯熱マラリア原虫におけるオートファジー関連遺伝子の機能解析， 第 20 回日本生体防御学会学術総会，東京，2009 年 7 月 25-26 日

44）Kwansa-Bentum, B., Asahi, H., Kitamura, K., William, K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S., Ohta, N. Comparative study of Plasmodium falciparum growth in three different serum-free media after exposure parasite to chloroquine or artemisinin. 第 50 回日本熱帯医学会，沖縄，2009 年 10 月 22-23 日

45）大前比呂思，中澤港，Suraj Eka，伊藤誠，長岡史晃，木村英作，亀井喜世子，山内太郎，Bernard Bakote’e. ソロモン諸島におけるマラリア疫学調査への尿診断法の応用，第 50 回日本熱帯医学会，沖縄，2009 年 10 月 22-23 日

46）大前比呂思．寄生虫症の疫学と対策 -マラリアと住血吸虫症対策の現場から-，第３回現象数理 21 世紀 COE シンポジウム 「感染症 -実像とモデリング 分野の垣根を越えて- 」， 東京，2010 年 2 月 17-18 日

寄生動物部

7．感　染　病　理　部

部長　佐多徹太郎

概　要

1. 人事等

感染病理部の職員定数は現在１４名で、内訳は、部長１名、室長３名、主任研究官７名、研究官３名である。戸山庁舎に１０名、村山庁舎に４名の職員と再任用職員各１名が在籍している。小島朝人と原嶋綾子には平成２１年度も引き続き時間給再任用職員として部の業務等に貢献していただいた。平成２１年４月には長谷川秀樹第二室室長が新設のインフルエンザウイルス研究センター第六室長に配置換えになったが、引き続き感染病理部に併任している。インフルエンザウイルス研究センター第六室の相内章も同様に併任となった。１０月には北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターから鈴木忠樹を第二室の任期付き研究員として採用した。１１月には永田典代主任研究官が第二室室長に配置換えとなった。非常勤職員の下ノ原望は６月末に自己都合により退職し、８月中旬から黒澤明日香が後任として採用となり、プリオン行政検査等を手伝っている。また非常勤職員としては、戸山庁舎の電子顕微鏡室に　齋藤典子、金子(田中)恵子、村山庁舎の電子顕微鏡室に波多野煜持、片岡紀代が所全体の業務に対応したが、年度末に波多野煜持が退職した。戸山では奥田 薫、天野朱実子、矢野辰江、村山では藤野美穂子が業務を補助した。

2.　感染病理部の研究業務

感染病理部で行われた研究・業務の概要は次のとおりである。

調査・研究

Ⅰ. 感染病理に関する研究
1. ヒト病理検体におけるレファレンスとしてのウイルス感染症に関する研究
2. ウイルス感染症の診断に関する研究
3. インフルエンザウイルス感染症に関する研究
4. ウイルス肝炎に関する研究

Ⅱ. ウイルス感染の発生機序に関する研究
1. ヘルペスウイルスに関する研究
2. ATL (HTLV-1)に関する研究
3. SARS コロナウイルスに関する研究
4. 国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究
5. HIV に関する研究
6. メルケル細胞ポリオーマウイルスに関する研究
7. JC ポリオーマウイルスに関する研究

Ⅲ. ワクチンに関する研究
1. ウエストナイルウイルスワクチンの開発研究
2. HIV-1 ワクチンの開発研究
3. SARS-CoV のワクチンに関する研究
4. カポジ肉腫ワクチンの開発に関する基礎研究

Ⅳ. プリオンに関する研究
1. Immuno-AT 法によるプリオン検出法
2. BSE 由来プリオンの感染性を評価する新規トランスジェニックマウスの開発
3. ヒトプリオン病の早期診断系の開発

Ⅴ. 厚生労働省共同利用機器の運用
1. SU6600 形低真空分析走査電子顕微鏡の運用

Ⅵ. 機器管理運営委員会機器の運用
1. 戸山庁舎透過型電子顕微鏡
2. 村山庁舎透過及び走査電子顕微鏡

品質管理に関する業務
1. 検定検査
2. 行政検査

国際協力関係業務

業　績

調査・研究

Ⅰ．感染病理に関する研究

1. ヒト病理検体におけるレファレンスとしてのウイルス感染症に関する研究

国内外の医療なら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索している。平成 21 年度(2009)年度、人体由来検体数は 184 例であった。検索の結果、EB ウイルス感染 9 例、ヒトヘルペスウイルス 8 型感染 5 例、JC ウイルス感染 2 例、ロタウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、アデノウイルス感染ほか、新型インフルエンザ

ウイルス感染疑い 8 症例においても病理学的、免疫組織化学的、そして分子生物学的に検索し、共同研究レファレンスとして結果を依頼者に報告した。(佐藤由子、片野晴隆、中島典子、佐多徹太郎)

2. ウイルス感染症の診断に関する研究

(1) 携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の検討

フィールドで簡便にしかも確実に生物テロ病原体の同定ができる診断法の確立を目指し、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP (loop isothermal amplification)法の開発に取り組んだ。炭疽菌遺伝子を標的とし、反応液を含んだ PCR チューブを携帯用使い捨てカイロではさみ、発泡スチロール箱中で保温することで LAMP 反応を行った。本法の感度及び特異性はヒートブロックを使用した LAMP 法と比較して差がなかった。本法は、フィールドにおける有用な生物テロ病原体検出法になりうると考えられる。(波多野 弁[協力研究員]、福本 瞳[協力研究員]、井上 智[獣医科学]、佐多徹太郎、片野晴隆)

(2) swH1N1pdm 新型インフルエンザウイルス感染症の早期診断系構築に関する研究

ベットサイドでの迅速な診断を可能とし、swH1N1pdm を特異的に検出するイムノクロマトグラフィー法開発のため swH1N1pdm 抗原発現系を構築し、swH1N1pdm 特異的な抗体を検出する系の作出を行った。発現させる抗原は、感染性を有するインフルエンザウイルスと同様に糖鎖の修飾を受ける哺乳動物細胞を用いた発現系から精製した。この方法により精製したインフルエンザウイルス抗原を用いて swH1N1pdm 特異的な抗体のスクリーニングを行い、swH1N1pdm 特異的イムノクロマトキット作成に寄与した。(飛梅 実、佐多徹太郎、および免疫部、獣医科学部との共同研究)

3. インフルエンザウイルス感染症に関する研究

(1) 本邦初の 2009H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症の剖検例の解析

基礎疾患として拡張型心筋症、肥満のある 33 歳男性で第 8 病日に永眠した。肺水腫が主たる病変で I 型肺胞上皮細胞の喪失と、II 型肺胞上皮細胞の増生また一部に硝子膜形成がみられ、初期のびまん性肺胞障害像(DAD)と考えられた。免疫組織化学により A 型インフルエンザウイルス NP 抗原は主に肺胞上皮細胞に検出され、定量 RT-PCR 法によりウイルス核酸も気管、気管支、肺に限局されて検出された。肺からウイルスが分離された。新型インフルエンザウイルスは肺胞上皮細胞に感染・増殖し、ウイルス性肺炎を引き起こすことがわかった。

(中島典子、飛梅 実、佐藤由子、片野晴隆、永田典代、金子恵子、片岡紀代、長谷川秀樹[インフルエンザウイルス研究センター]、相内 章[インフルエンザウイルス研究センター]、佐多徹太郎)

(2) 2009H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症の病理に関する研究

15 医療機関から依頼された 2009H1N1 剖検組織 20 例の病理学的検索をおこなった。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片を HE 染色、A 型インフルエンザウイルス NP 抗原の免疫組織化学, 蛍光二重染色で解析した。2009H1N1 ウイルス核酸を定量 RT-PCR 法で調べた。70%が男性で平均 38.5 歳であった。基礎疾患は心血管系疾患と肥満が多く 64%が 4 日以内に死亡していた。病理組織学的に 2009H1N1 ウイルス性肺炎は 25%、2 次性細菌性肺炎は 20%、肺炎像のない例が 50%であった。免疫組織化学によりウイルス抗原は 10 例で陽性で、呼吸器にのみ検出された。(中島典子、佐藤由子、片野晴隆、佐多徹太郎)

(3) 鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染症の病理学的解析

ベトナムハノイ国立小児病院 (NHP) との共同研究により、H5N1 感染症の剖検組織について病理学的に解析している。今年度は 2003- 2008 年に死亡した 5 例のホルマリン固定パラフィン包埋肺についてさらに解析した。In vitro で H5N1 インフルエンザウイルスがアポトーシスを誘導することが報告されているが、これをヒト感染肺組織で確認した。いくつかの症例で TUNEL 陽性細胞が検出された。また CaspaseIII, TNF-α などアポトーシス関連蛋白質も検出された。(中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎)

4. ウイルス肝炎に関する研究

(1) 小児肝癌の成因に関する国際共同研究

未だ成因が不明である小児の原発性肝癌の成因について、国際共同研究を行った。病理組織学的に小児の肝細胞癌と診断された症例 42 例(ベトナム 28 例、韓国 7 例、台湾 4 例、日本 3 例) を検索対象とした。肝癌組織から PCR 法にて 36/42(86%)に HBV DNA が検出されたが、HCV RNA は全例陰性であった。HBV pre-S1/pre-S2 のシークエンス解析から、塩基の部分欠損が pre-S2 領域で 20/30(74%)、pre-S1 領域で 5/30(18.5%)において観察された。興味あることに、pre-S2 領域での欠損が全例で nt 4

～57 の位置に出現していた点である。この欠損箇所には、CD8 T cell エピトープが存在することから、エスケープ変異と考えられた。さらに母児感染により HBV キャリアに移行した少年で長期追跡調査を行ったところ、6 歳で慢性肝炎、8 歳で HBV pre-S2 変異、13 歳で pre-S1+pre-S2 変異が出現した後、まもなく肝癌が発症した。同じ母から生まれた別の姉妹も HBV キャリアに移行したが、ウイルス変異や肝機能異常は観察されなかった。以上のことから、小児肝癌発生要因として HBV 感染が重要であり、またこの引き金として pre-S2 のホットスポット変異（nt 4～57 欠損変異）が深く関わっていることが強く推察された。HBV pre-S2 変異による肝発癌の分子機構を考える上で、重要な知見を得ることができた。（阿部賢治、Swan N. Thung［マウントサイナイ病院病理学：米国］、Tung Thanh Tran［ホーチミン第一小児病院病理科：ベトナム］、Phuc Le Hoang［ホーチミン第一小児病院消化器科：ベトナム］、Khai Dinh Truong［ホーチミン第一小児病院外科：ベトナム］、Young Nyun Park［延世大学医学部病理学：韓国］、Ja June Jang［ソウル国立大学病院病理学：韓国］、乾あやの［済生会横浜市東部病院こどもセンター］、Ih-Jen Su［国立衛生研究院臨床研究部：台湾］）

（2） 東南アジアに流行する HCV バリアントに関する分子疫学と病態解明に関する研究

ベトナム南部地域を中心として、HCV の分離とその分子疫学、臨床、感染病理学的特徴を検討した。今年度は、50 例の HCV 持続感染患者から、5’UTR-core と NS5B 領域の HCV ゲノムを分離して、その特徴を解析した。ゲノタイプ 6 感染患者の病態と治療効果について、現在長期追跡調査を行っている。（阿部賢治、Banh Vu Dien［チョーライ病院肝炎治療科：ベトナム］、Nguyen Duy Phong［ホーチミン医科薬科大学病院感染症科：ベトナム］、Xuan Lien［パスツール研究所ホーチミン：ベトナム］、Ling Lu［ユタ大学医学部消化器病センター：米国］）

（3）ベトナムにおける各種感染症および肝疾患に関する研究

ベトナムにおけるエマージング感染症を含む各種感染症および肝疾患の特徴解明を目的に、共同研究調査を継続的に実施した。各種ウイルス肝炎、新生児肝炎、胆汁うっ滞、肝腫瘍、Wilson 病、成因不明脳炎、デング熱などの症例を、病理・ウイルスの観点から検討した。（阿部賢治、Tung Thanh Tran［ホーチミン第一小児病院病理科：ベトナム］、Phuc Le Hoang［ホーチミン第一小児病院消化器科：ベトナム］、Khanh Huu Truong［ホーチミン第一小児病院感染症科：ベトナム］、Ngo Quoc Dat［ホーチミン医科薬科大学医学部病理学：ベトナム］、Nguyen Duy Phong［国立熱帯病病院消化器科：ベトナム］）

（4）タイにおける感染症に関する研究

タイにおけるエマージング感染症を含む各種感染症の特徴解明を目的に、共同研究を継続して実施した。ヒトおよび動物における比較病理を目的にして、ウイルス肝炎・肝癌、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスを含む各種ウイルス感染症の病理、分子疫学的調査を行った。（阿部賢治、Yong Poovorawan［チュラロンコン大学病院臨床ウイルス研究センター：タイ］、Roongroje Thanawongnuwech［チュラロンコン大学獣医学部病理学：タイ］）

Ⅱ. ウイルス感染の発生機序に関する研究

1. ヘルペスウイルスに関する研究

（1）大腸菌内ウイルスゲノム改変系を利用した HSV ウイルス制御因子の解析

我々は、BAC system を利用し、感染性 HSV full genome の大腸菌保持に世界で初めて成功し、この大腸菌をもとに、様々な大腸菌内での巨大 HSV genome の改変を試みてきた。現在、あらゆる組換えをかなり効率よく導入できる組換え法の確立も樹立中である。この手法を用いて様々な HSV 病原性因子の解析を行い、基礎研究のみでなくこれからも注目度が高まるであろう遺伝子治療ベクターとしての HSV の開発にも貢献していく予定である。（田中道子、川口 寧［客員研究員］、佐多徹太郎）

（2）日本における KSHV 関連疾患の臨床病理と KSHV 遺伝子解析

KSHV 関連疾患（カポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャッスルマン病）の 75 症例を対象に年齢、性別、HIV 感染の有無などの臨床病理学的特徴と KSHV の遺伝子型について検討した。エイズ関連カポジ肉腫は全員男性であるのに対し、非エイズ関連 KS では約半数が女性であった。また、エイズ関連カポジ肉腫では発症年齢が若かった。KSHV の遺伝子型の解析からは、遺伝子型 C, D は日本元来のウイルスであり、遺伝子型 A は米国エイズ患者由来であることが推察された。（菅野隆行、佐藤由子、中村智之［研究生］、坂本康太［研究生］、片野晴隆、佐多徹太郎）

2. ATL (HTLV-1)に関する研究

（1）CXCR4 アンタゴニスト（AMD3100）を用いた成人 T 細胞白血病（ATL）新規治療法の開発

HTLV-I の調節遺伝子である Tax を lck promoter 下で強制発現させた Tax トランスジェニックマウスを作成した。このマウスはヒト ATL と同様に白血病を発症し、多くの臓器で血管周囲性に腫瘍細胞浸潤を示した。今までにヒト ATL 症例由来の腫瘍細胞と Tax トランスジェニックマウス由来の腫瘍細胞（pML 細胞）のいずれもが、ケモカインである SDF-1α に対して走化性を示すこと、SDF-1α により ERK1/2 がリン酸化されること、SDF-1α のレセプターである CXCR4 のアンタゴニスト（AMD3100）は SDF-1α による ERK1/2 のリン酸化及び腫瘍細胞の走化性を抑制することを明らかにした。このことから AMD3100 は ATL の新規治療法として利用出来る可能性がある。そこで本研究では、AMD3100 の in vivo における腫瘍抑制効果を検討した。結果、AMD3100 は in vitro においてヒト ATL 細胞及び pML 細胞の走化性を抑制するだけではなく in vivo においても腫瘍細胞の組織への浸潤を抑制する事が明らかになった。しかしこの抑制能は肉眼的な病変が明らかではない早期の段階で認められた事から、ATL の発症早期の段階での SDF-1α による腫瘍細胞の誘引の抑制に AMD3100 が働いている事が示唆された。（長谷川秀樹、川口 晶［北大大学院］、澤 洋文［北大大学院］、辻 隆裕、相内 章、佐多徹太郎）

（2）ATL マウスモデルを用いた NF-κB 阻害薬による新規治療法の開発

HTLV-1 Tax トランスジェニックマウスに発症する白血病に対し、新規 NF-κB 阻害剤：Bay65-1942（BAY）は in vitro でアポトーシスを誘導し、腫瘍を移植した SCID マウスに延命効果を示すことが前年度までに明らかになった。本年度は BAY によるアポトーシス誘導機構の解析を行った。ウエスタンブロット法にて Caspase 3 および 9 の活性化が薬剤処理 3 時間後から観察されるのに対し、Caspase8 の活性化は 12 時間後まで観察されなかった。さらに Caspase の活性化とともに Bcl2 の発現が著明に減少していた。以上の結果から NF-κB 経路の抑制を介して Bcl2 発現量が減少することで、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが誘導されている可能性が考えられた。（辻 隆裕、神戸光彦［研究生］、相内 章、岡本 尚［名古屋市大］、佐多徹太郎、長谷川秀樹）

3. SARS コロナウイルスに関する研究

（1）SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連

Th1/Th2 バランスと重症急性肺炎の発症の関連性を解明することを目的とした。SARS-CoV マウス馴化株を用いた感染実験の結果、半年齢、4 週齢の C57BL/6 マウスはいずれも SARS の発症を示さなかった。半年齢の C57BL/6 マウスの肺では、ウイルス感染後 1-2 日目には炎症性、抑制性サイトカイン等がバランスよく発現している。一方で、半年齢の BALB/c マウスでは感染 3 日目までに IL-6、KC 等が持続的な発現を示し、炎症性反応が持続、亢進しており、感染 3 時間後の IFN-γ 投与により SARS 発症が阻止される。これらの結果から、マウスモデルにおいては、Th1 優位な反応は SARS-CoV の排除や感染後の免疫調整作用に重要であり、Th2 側へシフトした個体における感染後の免疫応答の Th1/Th2 バランス異常が SARS 発症の引き金になると考えられた。（永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎、福士秀悦［ウイルス第一部］、西條政幸［ウイルス第一部］、森川 茂［ウイルス第一部］）

4. 国内で発生のないベクター媒介性感染症の疫学診断法等の研究

Puumala 型ハンタウイルスの病原性を明らかにするために、実験的感染した 4 週齢と 8 週齢の Syrian hamster の組織標本を用いて、病理学的検討を行った。7，14，28 日目の組織標本を用いて病理組織学的解析を行った結果、皮下接種後のウイルス感染増殖の程度は週齢によって違いがみとめられることが病理組織学的に明らかとなった。4 週齢のシリアンハムスターにおける肺の上皮細胞、腎尿細管上皮細胞、副腎実質細胞、小脳プルキンエ細胞におけるウイルス増殖は非常にゆっくりで、限局しており、炎症性反応は軽度であった。一方で、8 週齢動物では明らかな組織学的変化は認められなかった。（永田典代、岩田奈織子、原嶋綾子、佐藤由子、長谷川秀樹、苅和宏明［北大大学院］）

5. HIV に関する研究

（1）HIV-1 Vpu によるウイルス放出抑制因子 BST-2/tetherin の細胞内分解経路の解明

ウイルス粒子放出を抑制する宿主膜蛋白 BST-2/tetherin（以下 BST-2）は、HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu により不活化される。本研究では Vpu 発現による BST-2 の細胞内分解経路を解明することを目的とした。ライソゾーム阻害剤存在下で BST-2 が Vpu と共にライソゾームに存在すること、また endocytosis を抑制すると Vpu を共発現しても BST-2 の細胞表面発現が維持されることから、Vpu は細胞表面 BST-2 を標的とし、endocytosis

により細胞内に取り込んだ後、ライソゾーム分解経路へ導くことが明らかになった。また、BST-2 が Vpu を介し宿主蛋白 βTrCP と相互作用すること、βTrCP ノックダウン細胞からの野生型ウイルス産生が半分程度に抑制されることから、Vpu による BST-2 の細胞内分解は部分的に βTrCP 依存的である可能性が示唆された。(岩部幸枝[流動研究員]、藤田英明[九大院薬細胞生物]、石坂幸人[国立国際医療セ]、田中嘉孝[九大院薬細胞生物]、佐多徹太郎、徳永研三)

(2) HIV-1 Vpu と BST-2/tetherin の Transmembrane 領域間における相互作用

抗ウイルス宿主蛋白 BST-2/tetherin (以下 BST-2) の構造は特殊で、中央部に位置する細胞外領域は N 末側の cytoplasmic tail (ct) に続く transmembrane (tm) 領域と C 末側の GPI anchor により 2 か所で膜に留まっている。同じく膜蛋白である HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu と BST-2 が相互作用することを昨年度までに明らかにしてきた。本年度は BST-2 と Vpu が相互作用するそれぞれの結合領域を同定することを目的とした。BST-2 の ct 及び tm 領域をタイプ 2 型膜蛋白であるトランスフェリンレセプターのそれと組換えた各キメラ発現ベクターを作製、また Vpu 側も tm 領域を CD4 の tm と組換えた CD4tmVpu 発現ベクターを作製した。それらを用いてウイルス産生及び Vpu との結合能を検討した結果、BST-2 と Vpu の両 tm 領域がそれぞれ相互作用の責任領域であることが明らかになった。(岩部幸枝[流動研究員]、藤田英明[九大院薬細胞生物]、石坂幸人[国立国際医療セ]、田中嘉孝[九大院薬細胞生物]、佐多徹太郎、徳永研三)

(3) HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif 蛋白の機能解析

昨年度までに HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif 蛋白(C-Vif)が高い抗 APOBEC3G 活性を持ち、それが N 末領域に規定されることを明らかにしてきた。本年度は Vif 点変異体を多数作製して更に細かく責任領域を絞り込んだ結果、V^{31} までの N 末領域のクラスターが C-Vif の強い抗 APOBEC3G 活性能を規定することが明らかになった。更に末梢血リンパ球に感染した C-Vif を有する HIV-1 では B-Vif を有する HIV-1 に比べて遥かに G→A 変異が少ないことが分かった。(岩部幸枝[流動研究員]、巽 正志 [エイズ研セ]、佐多徹太郎、徳永研三)

(4) HIV-1 感染細胞での核膜制御

HIV-1 感染細胞における核異常 (核膜ヘルニア) が報告されているが、その分子機序は不明である。本年度 HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpr が核膜内膜に局在することを電顕レベルで明らかにし、更に Vpr による核膜裏打ち蛋白ラミン B1 の核膜層からの顕著な脱落、及び核膜脂質層の部分的崩壊を見出した。以上より Vpr によるラミン B1 の喪失を伴う核膜脆弱化が核ヘルニアの原因である可能性が強く示唆された。(志村まり[国立国際医療セ]、前島一博[国立遺伝研生体高分子]、網蔵玲子[国立国際医療セ]、岩渕万里[名大理生命理学]、徳永研三、今本尚子[理研細胞核機能]、佐多徹太郎、瀧澤俊博[日本医大第 1 解剖]、大隅圭太[名大理生命理学]、石坂幸人[国立国際医療セ])

(5) プロテアーゼ阻害剤感受性を低下させる HIV-1 CRF01_AE 型 Gag の責任領域の同定

HIV-1 CRF01_AE 株の Gag (AE-Gag)がプロテアーゼ阻害剤に対する感受性を低下させる現象を昨年度見出した。本年度は薬剤感受性に影響を及ぼす AE-Gag の責任領域検索を行った。アミノ酸残基を置換した一連の AE-Gag 変異ウイルスを作製して薬剤感受性を解析した結果、Gag 165 番目 (N165K) が責任アミノ酸であることが明らかになった。(亀岡正典[阪大微研タイ感染症共同研究セ]、中村昇太[阪大微研タイ感染症共同研究セ]、徳永研三、生田和良[阪大微研ウイルス免疫])

(6) HIV-1 粒子成熟の解析

HIV-1 の出芽後、Gag 蛋白がどのように粒子を成熟させていくのか、酸化によって生じる結合を含め調べた。還元剤を培養上清に加えると、粒子中の Gag 間にジスルフィルド結合が生じないことが判明した。プロセシングが開始される前に Gag のシステイン残基にジスルフィド結合が形成され Gag 多量体が一体となっていると考えられたが、システイン残基のなかにはジスルフィド結合形成を一箇所で説明できるところはなく、Gag 間の結合に関与する領域がジスルフィド結合形成にも大きく影響することが判明した。一方、Env 蛋白は成熟の前後でコアとの結合を保っており、HIV-1 ワクチン開発のための抗原準備に有用な情報であると考えた。(高橋秀宗、金子恵子[臨時職員]、飛梅 実、佐多徹太郎)

6. メルケル細胞ポリオーマウイルスに関する研究

メルケル細胞癌から検出されるメルケル細胞ポリオーマウイルスの large T 抗原 (LT) について、欠失変異体を作成し、核局在化シグナル(NLS)を同定した。メルケル細胞癌由来の LT 遺伝子では NLS の下流に休止コドンを伴う変異が見られたことから、日光等の刺激により変異

が入ることで、ウイルス複製に関わる下流のヘリケースドメインが欠損し、N 末側の Rb 結合ドメインなどの作用により発癌に至るものと推察された。（中村智之[研究生]、佐藤由子、渡辺大輔[愛知医大]、伊東秀記[慈恵医大]、下ノ原 望、辻 隆裕、中島典子、鈴木良夫[旭中央病院]、松尾光馬[慈恵医大]、中川秀巳[慈恵医大]、佐多徹太郎、片野晴隆）

7. JC ポリオーマウイルスに関する研究

（1）JC ウイルス Agnoprotein によるウイルス粒子の形態制御機構の解明

JC ウイルス（JCV）は、ヒトの脱髄性疾患である進行性多巣性白質脳症の原因ウイルスである。JCV 粒子はエンベロープを持たず、VP1 を主体とするカプシドタンパク質で構成される直径 40-50 nm の正 20 面体のカプシドから成る。二本鎖環状 DNA をゲノムとして有する JCV は核内でゲノムの複製を行い、その場で複製されたゲノムを取り込んで、新たなウイルス粒子を形成する。本研究ではアクセサリータンパク質である Agnoprotein のウイルス粒子形成における機能を解析した。電子顕微鏡解析により、Agnoprotein 欠損ウイルスでは、カプシドタンパク質は野生型と同様に核内に局在したが、そのウイルス粒子は野生型に比べ不整形であることが明らかになった。さらに大腸菌で作成したリコンビナント VP1 モノマーを用いた in vitro reassociation assay により Agnoprotein は VP1 多量体の形成を促進することが明らかになった。これらの結果から Agnoprotein は、VP1 の自己集合を促進させることにより均一な形状の子孫ウイルス粒子産生に寄与していることが考えられた。（鈴木忠樹、仙葉慎吾[旭川医大]、寸田裕嗣[北大]、大場靖子[北大]、小林進太郎[北大]、澤 洋文[北大]）

（2）JC ウイルス Agnoprotein によるウイルス粒子放出機構の解明

多くのエンベロープを持たないウイルスは、感染細胞を破壊することにより、子孫ウイルスを細胞外へと放出する。この過程で、Viroporin と呼ばれるウイルスタンパク質により形質膜の透過性が亢進していくことが知られており、これより形質膜の破綻が誘導され、子孫ウイルスの放出が起こることが多くのウイルスで報告されている。JCV は、ヒトを自然宿主とするポリオーマウイルスであるが、ポリオーマウイルスのウイルス粒子はエンベロープを持たず、子孫ウイルスの放出は細胞の破壊により起こると考えられている。しかしながら、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。これまでに、我々は JCV のコードするウイルスタンパク質である Agnoprotein が感染の拡大に寄与していることを報告してきた。本研究では、宿主細胞内における Agnoprotein の細胞内局在や細胞膜との関係性を詳細に解析した。その結果、Agnoprotein が細胞内の小胞体および形質膜に局在し、形質膜透過性を亢進させウイルス粒子の放出を促進させている Viroporin として機能している事が明らかになった。（鈴木忠樹、大場靖子[北大]、岡田由紀[京大]、寸田裕嗣[北大]、澤 洋文[北大]）

Ⅲ．ワクチンに関する研究

1. ウエストナイルウイルスワクチンの開発

ウエストナイルウイルス（WNV）のウイルス様粒子（VLP）抗原について、持続発現細胞を樹立した。抗原性状解析とマウスを使用した免疫及びウイルスチャレンジ実験を行った。レイトゾーナルショ糖密度勾配遠心法により、大きく WNV に近い VLP 粒子と小さな VLP 粒子を分離することができた。大きな VLP 粒子のマウス腹腔内免疫により、WNV 中和抗体および WNV 感染に対する防御免疫誘導が可能であることを確認した。VLP 抗原は新規サブユニットワクチン候補として有望であると思われる。（大滝尚広[HS 財団 RR]、高橋秀宗、金子恵子［臨時職員]、小島朝人[再任用職員]、石川豊数[阪大微研]、佐多徹太郎）

2. HIV-1 ワクチンの開発

HIV-1 中和抗体を誘導する抗原の開発を目的とし、ウイルス様粒子（VLP）からディタージェントにより、脂質膜を除いた抗原を準備した。TiterMax をアジュバントとしてマウス皮下へ免疫し、中和血清を得た。免疫したマウスから誘導したモノクロナール抗体は精製 Env 蛋白を認識し、中和能を示した。精製 Env 糖蛋白、不活化ウイルスなどの免疫ではマウスにおいて中和抗体誘導が難しいことが知られていたが、脂質を除いた VLP 抗原は有効であったと考える。また既存の HIV-1 中和ヒトモノクロナール抗体には、脂質膜を認識するものが複数あることから、VLP から脂質を除く意義はあったと考えた。（高橋秀宗、金子恵子[臨時職員]、飛梅 実、佐多徹太郎）

3. SARS-CoV のワクチンに関する研究

（1）SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について

本研究では重症急性呼吸器症候群（SARS）発症マウスモデルを用い、SARS コロナウイルス（SARS-CoV）不活化ワクチンの免疫効果と副反応について病理学的に検討

する。UV 不活化ウイルス粒子(UV-V)、水酸化アルミニウム(Alum)添加 UV-V（UV-V+Alum）、あるいは LPS, PolyI:C, PolyU 添加 UV-V を約 15 週齢の BALB/c マウスに 6 週間隔で 2 回皮下免疫した。最終免疫から 8 あるいは 10 日でマウス馴化 SARS-CoV を経鼻接種し病理学的解析を行った。非免疫群は重度のび慢性肺胞傷害の組織像を示し致死的となった。免疫群はいずれも肺胞傷害はみられず、3 日目の肺感染局所で血管周囲の軽度な好酸球浸潤がみられた。さらに 10 日目には UV-V および UV-V+Alum 免疫群の肺では好酸球浸潤が顕著であった。一方で、LPS,PolyI:C,PolyU 添加 UV-V 免疫群では 10 日目には好酸球は殆ど見られなかった。SARS-CoV 不活化ワクチン免疫はマウスにおいて感染防御効果を示したが、感染局所に好酸球浸潤が誘導される可能性が示された。しかし、アジュバントの種類を工夫することでそれは軽減された。（岩田奈織子、永田典代、辻 隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子[免疫部]、水谷哲也[ウイルス第一部]、西條政幸[ウイルス第一部]、森川 茂[ウイルス第一部]、佐多徹太郎）

4. カポジ肉腫ワクチンの開発に関する基礎研究

ヒトヘルペスウイルス 8 (HHV-8)のワクチン開発を目指し、HHV-8 もしくは関連蛋白のマウスへの免疫応答を検討した。粘膜に HHV-8 を免疫したマウスで、有意に IgA を含む抗体が誘導され、特にウイルス抗原蛋白である K8.1 は感染阻止に有用な分子であることも明らかとなった。HHV-8 感染は唾液、または同性愛行為を介した粘膜感染であり、本実験の結果から、IgA を効率よく誘導する粘膜ワクチンは HHV-8 の予防ワクチンとして有効である可能性が示唆される。（坂本康太[研究生]、浅沼秀樹[インフルエンザウイルス研究センター]、中村智之[研究生]、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆）

Ⅳ. プリオンに関する研究

1. Immuno-AT 法によるプリオン検出法

ウシ海綿状脳症(BSE)のホルマリン固定ギ酸処理パラフィン包埋脳組織切片から異常型プリオン蛋白質を検出するために、免疫組織化学の高感度化を目的とする immunoAT-tailing (Immuno-AT 法)を改良してきた。今年度は 2003 年～2006 年に本邦で発症した BSE 症例の脳切片上にプリオン蛋白を Immuno-AT 直接法及び間接法で検出した。Envision 法(DAKO）と比べ直接法、間接法共に検出感度が増加することを示し、陰性コントロールの結果も含めて論文にまとめ報告した。（中島典子、佐藤由子、下ノ原 望、花木賢一[東大疾患生命工学センター研究基盤部門]、佐多徹太郎）

2. BSE 由来プリオンの感染性を評価する新規トランスジェニックマウスの開発

プリオンが持続感染可能な神経芽細胞腫由来細胞株 N2a から再クローニングにより樹立されたプリオン高感受性細胞 N2a-5 と低感受性の N2a-1 の比較 2 次元電気泳動法から、プリオン感染成立に関与すると考えられる生体側因子 peripherin を同定した。この分子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し BSE 由来プリオン（和歌山株をマウスで 3 代経代したもの）を脳内接種したところ、0.02%脳乳剤接種群では peripherin 過剰発現トランスジェニックでは病期の短縮が認められた。試験管内での解析では、peripherin 過剰発現細胞ではプリオンの細胞内への取り込み効率が増強されることが示唆されており、peripherin トランスジェニックマウスは微量プリオンの病原性評価に有用なマウスと成り得ることが示唆された。現在、peripherin の細胞内へのプリオン取り込みに関する作用機序について解析を行っている。（飛梅 実、黒沢明日香、佐藤由子、松田潤一郎[基盤研]、高橋秀宗、佐多徹太郎）

3. ヒトプリオン病の早期診断系の開発

クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）に代表されるプリオン病の診断は、脳組織中よりの異常型プリオンの検出により確定されるが、生検は患者への負担が大きい。CJD では髄液中へ細胞内のシグナル伝達分子である 14-3-3 蛋白質が特異的に放出されることが報告されている。我々はウエスタンブロット法を用いた髄液中 14-3-3 蛋白質濃度測定法を開発し、各病院からの検査依頼に応じている。また、同時に国内での濃度基準の統一を図るため、ヒト由来細胞株を用いて作成した 14-3-3 蛋白質を標準標品として作成し、国内の検査機関に配布している。加えて、BSE 由来プリオンの感染により引き起こされるヒトプリオン病（vCJD）のモデルである BSE 接種サルの経時的な髄液検査から BSE 感染サルモデルにおいても病態の進行に付随し髄液中 14-3-3 蛋白質濃度の上昇が認められることを明らかにしている。（飛梅 実、高橋秀宗、佐藤由子、佐多徹太郎）

Ⅴ．厚生労働省共同利用機器の運用

1. SU6600 形低真空分析走査電子顕微鏡の運用

平成 21 年度も順調に運用された。本年度中に処理した検体数は 208 検体で、その内訳は感染研内部 149 検体、外部との共同研究 20 検体、外部のみ 39 検体であった。

このうちダニの中腸を細切してサンプリングするものが5匹分あったが、1匹を1とカウントしている。

また、見学者の対応は8回、18名であった。公務員が8名、学生ら3名、外国人2名、一般5名であった。（齋藤典子[臨時職員]）

VI. 機器管理運営委員会機器の運用

1. 戸山庁舎透過型電子顕微鏡

総依頼件数17件、EPON包埋検体数43検体（142ブロック）、ネガティブ染色検体数11検体であった。ネガティブ染色としては主にHCV粒子、HPV－VLP、WNV－VLPについて行った。小胞体膜蛋白質p180がゴルジ装置の発達に寄与し、コラーゲン分泌を活性化することを確認した。劇症型株溶血性レンサ球菌と好中球の関係の確認を試みた。HPV感染中和抗体の機能解析を細胞を用いて行っている。新型豚インフルエンザの剖検例でのウイルスの形状を確認した。(金子(田中)恵子[臨時職員]、佐多徹太郎)

2. 村山庁舎透過及び走査電子顕微鏡

本年度の総依頼件数は39件であり、透過電子顕微鏡利用は35件、走査電子顕微鏡は4件であった(2件重複)。うち一件は検定業務関連の検索依頼であった。依頼者は感染病理部の他、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、インフルエンザウイルス研究センター、病原体ゲノム解析研究センター、昆虫医科学部、動物管理室、細菌第二部、血液・安全性研究部であった。(片岡紀代[臨時職員]、波多野煜持[臨時職員]、永田典代、佐多徹太郎)

品質管理に関する業務

1. 検定検査

経口生ポリオワクチン（3 型）の神経毒力試験（病理試験）を1件実施した。また、検定業務に関わる病理検査依頼は5件で、依頼者は血液安全性研究部（3件）、ウイルス第三部（2件）であった。(辻 隆裕、岩田奈織子、永田典代、藤野美穂子［臨時職員]、原嶋綾子［再任用職員]、佐多徹太郎)

2. 行政検査

本年度はなし

国際協力関係業務

（1）阿部賢治：ベトナム、タイ、中国の大学および医療機関における病理、血清、ウイルス、遺伝子診断に関する研究・技術指導、現地セミナーの開催。

（2）徳永研三：2010年度JICA集団研修「HIV/AIDSの診断・予防・対策モデル」における講義“Viral properties of African HIV-1”、JICA大阪、平成21年5月20日

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. Int J Cancer. 2009, 124:622-9.

2) Takahashi H, Kitagawa Y, Maeda-Satoh M, Hasegawa H, Sawa H, Sata T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppress telomerase activity. Hybridoma (Larchmt) 2009, 28:63-5.

3) Mitsuishi T, Nakatake M, Kaneko T, Ohara K, Kato T, Iida, K, Iwabu Y, Tokunaga K, Sata T, Kawana S, Yamada O. Evaluation of Telomerase Activity in Nongenital Bowen's Disease. J Eur Acad Dermatol Venereol 2009, 23:668-72.

4) Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective Immunity Afforded by Inactivated H5N1 (NIBRG-14) Vaccine Requires Antibodies against Both Hemagglutinin and Neuraminidase in Mice. J Infect Dis 2009, 199:1629-37.

5) Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, Koike S. Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. Virology 2009, 390:139-50.

6) Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa Y, Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, Sata T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines. immunohistochemistry. Pathol Int 2009, 59:555-66.

7) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I,

Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. J Gen Virol 2009, 90:2266-71.

8) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Ainai A, Sata T, Okamoto T, Hall WW, Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1alpha-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. Blood 2009, 114:2961-8.

9) Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. Vaccine 2009, 27:6276-9.

10) Morimoto T, Arii J, Tanaka M, Sata T, Akashi H, Yamada M, Nishiyama Y, Uema M, Kawaguchi Y. Differences in the regulatory and functional effects of the Us3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. J Virol 2009, 83:11624-34.

11) Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T. Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. J Med Virol 2009, 81:1951-8.

12) Takahashi H, Ohtaki N, Maeda-Sato M, Tanaka M, Tanaka K, Sawa H, Ishikawa T, Takamizawa A, Takasaki T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Kurata T, Kojima A. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. Microbes Infect 2009, 11:1019-28.

13) Kitagawa Y, Maeda-Sato M, Tanaka K, Tobiume M, Sawa H, Hasegawa H, Kojima A, Hall WW, Kurata T, Sata T, Takahashi H. Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles. Microbiol Immunol 2009, 53:609-20.

14) Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, Tokunaga K. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. J Biol Chem 2009, 284:35060-72.

15) Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. Ther Clin Risk Manag 2009, 5:125-32.

16) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, Tsunetsugu-Yokota Y. Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. Microbiol Immunol 2009, 53:75-82.

17) Utachee P, Jinnopat P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Chandimal de Silva U, Nakamura S, Siripanyaphinyo U, Wichukchinda N, Tokunaga K, Yasunaga T, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Auwanit W, Kameoka M. Genotypic Characterization of CRF01_AE env Genes Derived from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Residing in Central Thailand. AIDS Res Hum Retroviruses 2009, 25:229-36.

18) Utachee P, Jinnopat P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Chandimal de Silva U, Nakamura S, Siripanyaphinyo U, Wichukchinda N, Tokunaga K, Yasunaga T, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Auwanit W, Kameoka M. Phenotypic studies on recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) containing CRF01_AE env gene derived from HIV-1-infected patient, residing in central Thailand. Microbes Infect 2009, 11:334-43.

19) Kataoka M, Yamamoto A, Ochiai M, Harashima A, Nagata N, Hasegawa H, Kurata T, Horiuchi Y. Comparison of acellular pertussis-based combination vaccines by Japanese control tests for toxicities and laboratory models for local reaction. Vaccine 2009, 27: 1881-8.

20) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF-kappaB by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. Cancer Sci 2009, 100:737-46.

21) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol 2009, 81:1102-8.

22) Yoshikawa N, Yoshikawa T, Hill T, Huang C, Watts DM, Makino S, Milligan G, Chan T, Peters CJ, Tseng CT. Differential virological and immunological outcome of severe acute respiratory syndrome-coronavirus

(SARS-CoV) infection in susceptible and resistant transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. J. Virol. 2009, 83(11): 5451-65.

23) Yamada S, Nozawa N, Katano H, Fukui Y, Tsuda M, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N. Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes, UL128, and UL130. Virology 2009, 391:99-106.

24) Takahashi-Makise N, Suzu S, Hiyoshi M, Ohsugi T, Katano H, Umezawa K, Okada S. Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma in vitro and in vivo and induces apoptosis via suppression of the NF-kappaB pathway. Int J Cancer 2009, 125:1464-72.

25) Cheng B, Martinez FP, Katano H, Tang Q. Evidence of inability of human cytomegalovirus to reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency in body cavity-based lymphocytes. J Clin Virol 2009, 46:244-8.

26) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W. W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T- Cell Leukemia / lymphoma (ATL). Blood 2009, 114:2709-20.

27) Hoshino Y, Katano H, Zou P, Hohman P, Marques A, Tyring SK, Follmann D, Cohen JI. Long-term administration of valacyclovir reduces the number of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells but not the number of EBV DNA copies per B cell in healthy volunteers. J Virol 2009, 83:11857-61.

28) Jinnopat P, Isarangkura-na-ayuthaya P, Utachee P, Kitagawa Y, Chandimal de Silva U, Siripanyaphinyo U, Kameoka Y, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Auwanit W, Kameoka M. Impact of amino acid variations in Gag and protease of HIV Type 1 CRF01_AE strains on drug susceptibility of virus to protease inhibitors. J Acquir Immune Defic Syndr 2009, 52:320-8.

29) Dean J, Hashimoto K, Tsuji T, Gautier V, Hall WW, Sheehy N. Functional interaction of HTLV-1 tax protein with the POZ domain of the transcriptional repressor BCL6. Oncogene 2009, 28:3723-34.

30) Abe K. Pathology of hepadna virus infection in humans and animals. Thai J Vet Med 2009, 39:453-5.

31) Abe K, Thung SN, Wu H-C, Tran TT, Hoang PL, Truong KD, Inui A, Jang JJ, Su I-J. Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. Cancer Sci 2009, 100:2249-54.

32) Fukuda S, Iwamaru Y, Imamura M, Masujin K, Shimizu Y, Matsuura Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Onoe S, Hagiwara K, Sata T, Mohri S, Yokoyama T, Okada H.: Intraspecies transmission of L-type-like Bovine Spongiform Encephalopathy detected in Japan. Microbiol Immunol 2009, 53:704-7.

2. 和文発表

1) 中村智之、片野晴隆：メルケル細胞ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌。ウイルス 59: 37-42, 2009.

2) 片野晴隆：カポジ肉腫。皮膚科サブスペシャリティーシリーズ「一冊で分かる性感染症」文光堂（東京）pp177-181, 2009.

3) 徳永研三、佐多徹太郎：AIDS - 発症の背景は？、皮膚科サブスペシャリティーシリーズ「一冊でわかる性感染症」文光堂（東京）、pp159-161. 2009.

4) 片野晴隆：ヒトヘルペスウイルス８のウイルス学。特集: Human herpesvirus 8 (HHV-8)とその関連疾患。日本エイズ学会誌 11: 171-178, 2009.

Ⅱ．学 会 発 表

1. 国際学会

1) Tsuji T, Kanbe M, Ainai A, Okamoto T, Sata T, Hall W.W, Hasegawa H. Therapeutic effect of novel NF-kappaB inhibitor, Bay65-1942, in mouse ATLL model. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. July 2009, Salvador, Brazil.

2) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Sata T, Okamoto T, Hall WW, Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1α-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of human ATLL cells and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. July 2009, Salvador, Brazil.

3) Ueno T, Katano H, Yamamoto H, Taniguchi S, Eizuru Y, Sata T, Ogawa-Goto K. Establishment of rapid

phenotypic susceptibility testing for anti-HCMV drugs using PML assay. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, October 2009, Kobe, Japan.

4) Yamada S, Nozawa N, Katano H, Fukui Y, Tsuda M, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N. Characterization of the guinea pig cytomegalovirus genome locus that encodes homologs of human cytomegalovirus major immediate-early genes, UL128, and UL130. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. October 2009, Kobe, Japan.

5) Katano H. Pathology of Merkel cell polyomavirus in Japanese cases of Merkel cell carcinoma. Symposium on Pathophysiology of and Treatment for Viral Infections. National Institute of Infectious Diseases. November 2009, Tokyo, Japan.

6) Takahashi H, Tobiume M, Sata T. Immunogen utilizing the stable interaction of cytoplasmic tails of HIV-1 envelope and cores. AIDS vaccine 2009 conference. October 2009, Paris, France.

7) Thung SN, Tran TT, Hoang PL, Jang JJ, Park YN, Abe K. Stem cell origin of liver cancers in Asian children. United States and Canadian Academy of Pathology. March 2009, Boston, USA.

8) Abe K. Invited lecture: Pathogenesis of hepatitis B virus infection and its related hepatocellular carcinoma. The 7th Pathology Conference of Vietnam. September 2009, Ho Chi Minh City, Vietnam.

9) Abe K. Invited lecture: Pathology of hepadna virus infection in humans and animals. The 4th Asian Society of Veterinary Pathologists (ASVP) Conference. November 2009, Bangkok, Thailand.

10) Abe K, Thung SN, Wu H-C, Tran TT, Hoang PL, Inui A, Jang JJ, Su I-J. Hot spot mutation of hepatitis B virus pre-S2 gene related to hepatocellular carcinoma in Asian children. The Excellence in Paediatrics International Conference. December 2009, Firenze, Italy.

11) Nakajima N. First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan. 14th Annual meeting of US-Japan cooperative medical science program Acute respiratory infections (ARI) panel. January 2010, San Francisco, USA.

12) Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Masanobu Kinomoto, Keiko Kaneko, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga. The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). February 2010, San Francisco, USA.

13) Ikeda T, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, Harada S, Heidmann T, Koito A. Intrinsic Restriction Activity by APOBEC1 against the Mobility of Autonomous Retrotransposons: The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). February 2010, San Francisco, USA.

2. 国内学会

1) 佐々木裕子、永田典代、網 康至、須崎百合子、松田和洋、荒川宜親：Mycoplasma fermentans 生菌投与ウサギを用いた関節炎モデル開発と抗糖脂質抗体の解析。第 82 回日本細菌学会総会（名古屋）2009 年 3 月

2) 片野晴隆、鈴木良夫、辻 隆裕、佐多徹太郎：メルケル細胞癌および他の疾患におけるメルケル細胞ポリオーマウイルスの検出。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

3) 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎：重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)感染モデルを用いた SARS に対する治療法の検討。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

4) 辻 隆裕、佐多徹太郎、長谷川秀樹：ATL マウスモデルを用いた NF-κB 阻害薬による新規治療法の開発。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

5) 飛梅 実、長谷川秀樹、片野晴隆、佐藤由子、中島典子、佐多徹太郎：狂犬病ウイルス抗原の細胞内局在。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

6) 下ノ原 望、佐藤由子、花木賢一、中島典子、佐多徹太郎：Immuno-AT 法による牛海綿状脳症（BSE）脳切片の病理学的検討とその応用。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

7) 中島典子、佐藤由子、下ノ原 望、佐多徹太郎：in situ hybridization AT-tailing CSA 法を用いたウイルス感染症の病理学的検索。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

8) 長谷川秀樹：新興感染症と病理の関わり。第 98 回日本病理学会総会（京都）2009 年 5 月

9) 片野晴隆、坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎：KSHV のワクチン開発に関する基礎研究―KSHV 粘膜ワクチン開発の可能性。第 6 回

EB ウイルス研究会（東京）2009 年 6 月

10) 徳永研三：HIV-1 の遺伝的多様性：その薬剤耐性とウイルス複製機序への影響。第 19 回感染研シンポジウム「感染症コントロールにおける国際協力：感染研とパスツール研の協力」2009 年 6 月

11) 上野智規、栄鶴義人、片野晴隆、佐多徹太郎、後藤希代子: PML 法を用いた HCMV 臨床分離株の細胞指向性の解析。第 24 回ヘルペスウイルス研究会（三島）2009 年 7 月

12) 辻 隆裕、神戸光彦、相内 章、岡本 尚、佐多徹太郎、長谷川秀樹：マウス ATLL モデルに対する新規 NF-κB 阻害剤の治療効果。第 2 回 HTLV 研究会（東京）2009 年 8 月

13) 高橋秀宗、佐多徹太郎：HIV-1 中和抗体を誘導する抗原開発。第 13 回ワクチン学会総会（札幌）2009 年 9 月

14) 大滝尚広、高橋秀宗、石川豊数、東 雍、佐多徹太郎、小島朝人：ウエストナイルウイルス様粒子抗原の形態が免疫原性に与える影響。第 13 回ワクチン学会総会（札幌）2009 年 9 月

15) 相内 章、一戸猛志、田村愼一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進。第 13 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2009 年 9 月

16) 長谷川秀樹、相内 章、網 康至、永田典代、田村愼一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎 隆、小田切孝人、田代眞人、倉田 毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討。第 13 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2009 年 9 月

17) 西條政幸、網 康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、新村靖彦、横手公幸、飯塚愛恵、塩田智之、佐多徹太郎、倉田 毅、倉根一郎、森川 茂：痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果。第 13 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2009 年 9 月

18) 高橋秀宗、飛梅 実、金子恵子、佐多徹太郎: HIV-1 中和抗体を誘導する抗原開発。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

19) 坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆：KSHV のワクチン開発に関する基礎研究―KSHV 粘膜ワクチン開発の可能性。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

20) 菅野隆行、中村智之、坂本康太、佐藤由子、佐多徹太郎、片野晴隆：日本における KSHV 関連疾患の臨床病理と KSHV サブタイプ解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

21) 波多野 弁、小島朝人、佐多徹太郎、片野晴隆：バイオテロ対策を目的とした、飲料物からの迅速ウイルス回収法-Viro-Adembeads を用いたウイルス回収法の検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

22) 李 天成、片野晴隆、中村智之、宮村達男、佐多徹太郎、脇田隆字、鈴木哲朗：メルケル細胞ポリオーマウイルス（MCV）様粒子の作製と MCV 抗体保有率の血清疫学解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

23) 松田麻未、李 天成、清水弘樹、西村紳一郎、片野晴隆、中村智之、脇田隆字、鈴木哲朗：ヒトポリオーマウイルス BKV、JCV 及び MCV の糖脂質結合の比較解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

24) 相内 章、伊藤 良、岸田典子、小渕正次、高下恵美、小田切孝人、千葉 丈、田村愼一、倉田 毅、佐多徹太郎、田代眞人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

25) 長谷川秀樹、相内 章、永田典代、岩田奈織子、網康至、小渕正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代眞人：新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

26) 川口 晶、辻 隆裕、大場靖子、木村享史、相内 章、伊波英克、緒方正男、佐多徹太郎、澤 洋文、長谷川秀樹：CXCR4 アンタゴニスト(AMD3100)を用いた SCID マウスにおける Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の組織浸潤抑制。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

27) 岩田奈織子、永田典代、辻 隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川 茂、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

28) 岸田典子、小渕正次、高下恵美、徐 紅、氏家 誠、永田典代、岩田奈織子、相内 章、長谷川秀樹、田代眞人、齋藤玲子、鈴木 宏、池松秀之、小田切孝

人 : 季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

29) 酒井宏治、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、松井珠乃、網 康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎、森川茂 : 水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

30) 原崎一浩、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、山本直樹、高久 洋、佐藤人美、山本陽子、平松啓一、田代眞人、山本典生 : 免疫抑制剤の SARS コロナウイルス増殖に与える影響についての解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

31) 山本典生、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、松本武久、高久 洋、山本陽子、佐藤人美、平松啓一、田代眞人、平松啓一、山本直樹 : Structure-based drug design (SBDD)による SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

32) 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎 : SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

33) 加藤茂孝、永田典代、岩崎琢也、網 康至、須崎百合子 : 妊娠フェレットへの風疹感染により引きおこされた胎児眼球形成異常。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

34) 大岡静衣、永田典代、小池 智、野本明男 : カニクイザルを用いたポリオウイルス経口感染実験。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

35) 鳥羽（安部）優子、永田典代、佐多徹太郎、竹内 理、審良静男、小池 智 : ポリオウイルス感染による IFN 応答には TRIF を介する TLR 経路が重要である。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

36) 早坂大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池 智 : ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

37) 竹内 薫、永田典代、網 康至、須崎百合子、西江友美、森 一泰、永田恭介 : 麻疹ウイルスの細胞指向性決定と弱毒化における H タンパク質の役割。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

38) 森川 茂、福士秀悦、酒井宏治、永田典代、長谷川秀樹、松井珠乃、水谷哲也、平井明香、網 康至、緒方もも子、西條政幸、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎 : カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

39) 西條政幸、網 康至、須崎百合子、塩田智之、飯塚愛恵、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田 毅、森川 茂 : コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

40) 中島典子、佐藤由子、下ノ原 望、片野晴隆、熊坂利夫、ウエンリエム、河内正治、鈴木和男、佐多徹太郎 : 鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染症の病態の病理学的解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

41) 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三 : HIV-1 Vpu によるウイルス放出抑制因子 BST-2/Tetherin の細胞内分解経路の解明。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

42) 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三 : HIV-1 Vpu と BST-2/Tetherin の Transmembrane 領域間における相互作用。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

43) 岩部幸枝、巽 正志、佐多徹太郎、徳永研三 : HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif 蛋白の機能解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

44) 小山貴芳、孫賓蓮、峯本 譲、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人 : HIV-1 が誘導する宿主 DNA 二重鎖切断はマクロファージへの感染効率を上昇させる。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

45) 亀岡正典、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、Bongkot Soonthornsata 、 Piraporn Utachee 、 Pathom Sawanpanyalert、徳永研三、生田和良、Wattana Auwanit : プロテアーゼ阻害剤に対するウイルスの

薬剤感受性を低下させる CRF01_AE Gag 部位の固定。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

46) Piraporn Utachee、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、中村昇太、徳永研三、Pathom Sawanpanyalert、生田和良、Wattana Auwanit、亀岡正典：A single N-linked glycosylation site in V2 region of HIV-1 CRF01_AE gp120 regulates viral neutralization susceptibility to a recombinant human monoclonal antibody, IgG1 b12. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

47) 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚：哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント LINE-1 の阻害。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

48) 志村まり、前島一博、網蔵玲子、岩渕万里、徳永研三、今本尚子、佐多徹太郎、瀧澤俊博、大隅圭太、石坂幸人：HIV-1 感染細胞での核膜制御。第 82 回日本生化学会大会（神戸）2009 年 10 月

49) 片野晴隆：HHV-8 感染とカポシ肉腫、primary effusion lymphoma の発症病理。基礎系シンポジウム「エイズ発症の危険因子としての微生物間相互作用」第 23 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）2009 年 11 月

50) 片野晴隆：カポジ肉腫の臨床病理と HHV-8 感染。臨床系シンポジウム２「HIV-1 感染と悪性腫瘍」第 23 回日本エイズ学会学術集会（名古屋）2009 年 11 月

51) Hata S, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Odai T, Nakajima N, Tobiume M, Sato Y, Sata T: An Autopsy case of new influenza virus A/2009 (H1N1, PDM) pneumonia. 第 55 回日本病理学会秋期特別総会（東京）2009 年 11 月

52) 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚：哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント阻害。第 32 回日本分子生物学会（横浜）2009 年 12 月

53) 岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三：BST-2/Tetherin と HIV-1 Vpu の相互作用における結合領域の同定。第 32 回日本分子生物学会（横浜）2009 年 12 月

54) Kenzo Tokunaga, Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, and Tetsutaro Sata：HIV-1 Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin and leads it to lysosomes partially in a βTrCP-dependent manner. 第 32 回日本分子生物学会（横浜）2009 年 12 月

55) 志村まり、前島一博、網蔵玲子、岩渕万里、徳永研三、今本尚子、佐多徹太郎、瀧澤俊博、大隅圭太、石坂幸人：HIV-1 感染細胞での核膜制御。第 32 回日本分子生物学会（横浜）2009 年 12 月

56) 小山貴芳、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人：レンチウイルスベクターをヒトゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発。第 32 回日本分子生物学会（横浜）2009 年 12 月

57) 徳永研三：「ウイルスと宿主の対決： HIV-1 アクセサリー蛋白による抗ウイルス宿主因子の不活化の分子機構」九州大学・医歯薬セミナー（福岡）2010 年 3 月

8．免　疫　部

部長　小　林　和　夫

概　　要

免疫部は感染症、すなわち、病原体―宿主関係を宿主応答の視点から感染症の制圧研究を推進している。「研究室で得られた研究成果を医療や社会に還元し、すなわち、translational research（橋渡し研究）を推進し、健康増進や感染症による健康被害の減少」を究極の目標として、部員一同、邁進している。また、国立感染症研究所において、免疫部は感染免疫の学問領域から所内横断的協力体制に、加えて、人材育成や国際化に対応するため、研修や国際協力にも参加している。

免疫部では、ウイルス、細菌、原虫・寄生虫やプリオンなど、多種多様な病原体感染症に関する研究、免疫機能に関する研究、さらに、骨髄造血機構に関する研究を実施した。また、品質管理に関する業務、国際協力関係業務、研修業務や共同利用機器管理にも寄与した。今年度の特筆事項として、平成 21（2009）年 4 月に発生したインフルエンザ 2009 A/H1N1pdm 対策があるが、免疫部は１）検査業務協力や２）2009 A/H1N1pdm 特異的迅速免疫診断キットの研究・開発に寄与した。

免疫部で実施された研究･業務の概要は以下のとおりである。

調査・研究
I. ウイルス感染症
１．ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の増殖制御と病態に関する研究
２．インフルエンザに関する研究
３．C 型肝炎ウイルス（HCV）感染に関する研究
４．A 型肝炎ウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系最適化と特異抗体産生 B 細胞動態の検討
５．腸管上皮における MHV レセプターの解析
II. 細菌感染症
１．抗酸菌感染症に関する研究
２．劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する研究
３．類鼻疽の宿主防御に関する研究
III. 原虫・寄生虫感染症
１．マンソン住血吸虫感染防御に関する研究
IV. プリオン病
１．異常プリオン蛋白質の免疫系における増殖・伝播機構の研究
V. 免疫機能に関する研究
１．プレ B 細胞受容体の機能に関する研究
２．抗体産生Ｂ細胞分化における BILL カドヘリンの機能に関する研究
３．腸管上皮細胞に発現するカドヘリン・ファミリー分子と病原体細胞侵入機構に関する研究
４．粘膜ワクチンデリバリーシステムへの応用を見据えた M 細胞の免疫生物学的解析
５．マクロファージによる感染初期応答を制御する新規チロシンリン酸化タンパク質の機能解析
６．TIFA 関連タンパク質 TIFAB の機能解析
VI. 骨髄造血機構に関する研究
１．間葉系幹細胞分化と造血制御に関する研究
品質管理に関する業務
国際協力関係業務
研修業務
共同利用機器管理

人事では、平成 21 年 6 月 30 日に免疫部　大原　直也第四室長が退官し、7 月 01 日に岡山大学大学院医歯薬総合研究科口腔微生物学　教授として異動した。平成 22 年 3 月 31 日に葛西　正孝　主任研究官が定年退官した。

業　　績

調査・研究

I. ウイルス感染症

１．ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の増殖制御と病態に関する研究

（１）HIV-1 増殖制御のためのレンチベクターの開発

これまでに HIV 増殖抑制性レンチウイルスが慢性 HIV 感染者の Gag 特異的 CD4+T 細胞の増殖能を回復させうることを明らかにした。更にレンチウイルスの感染効率を高めるため、VSV-G の代わりに HIV-1 env gp120 の CD4 結合部位や ProteinA の Fc 結合領域(ZZ domain)をバキュロウイルスの gp64 と融合させてレンチウイルスを作製した。ZZ domain-gp64 融合 env は CD4 抗体と混合することにより、CD4 特異的なレンチウイルス導入が可能であることが示唆された。また、麻疹ウイルス env 利用レンチウイルスも準備開始した。[渋沢謙太郎（エイズ予防財団リサーチレジデント）、土屋貴嗣（東大医科研修士課程、研究生）、松浦善治・谷　英樹（大阪大学微生物病研究所）、柳　雄介（九州大学医学研究院）、渡辺俊樹（東京大学医科学研究所）、小林和夫、横田恭子]

（２）CCR5 を補助受容体とする HIV-1 の選択的増殖機構の解析

HIV-1 初期感染における R5 型 HIV-1 の選択的増殖機構を明らかにするため、ウイルス粒子との膜融合アッセイ系を用いて X4 型と R5 型 HIV-1 の細胞侵入効率を比較した。X4 型 HIV-1 の膜融合は未刺激 CD4+T 細胞で高く、活性化によりむしろ低下した。一方、R5 型 HIV-1 は CCR5 発現細胞の多いメモリー分画では高頻度で、ナイーブ分画ではごくわずかであり、膜融合過程は補助受容体の発現頻度とほぼ合致した。更に、CD4+T 細胞を CCR5 陽性細胞に純化して解析した結果、X4 型 HIV-1 も R5 型 HIV-1 も侵入効率は同等で、感染 40 時間後の逆転写から integration までの過程にも大きな違いはないことが明らかとなった。[横田恭子、寺原和孝、光木裕也（東京医歯大博士課程、研究生）、田中勇悦（琉球大学医学部）、小林和夫]

（３）CD４陽性 T 細胞の分化段階におけるマイクロ RNA 発現パターンの解析

マイクロ RNA(miRNA)は核内前駆体からプロセスされ

てできる約 22 塩基の小分子 RNA で、PTGS (Post-transcriptional gene silencing)に関与するが、その詳細な機能については不明なものが多い。昨年の CD8+T 細胞同様 CD4+T 細胞の分化段階の違いによる miRNA 発現パターンを解析し、それぞれの分化段階に特徴的な発現パターンを示す miRNA を明らかにした。このうち特にナイーブやセントラルメモリー分画の CD4+T に強く発現する miRNA について更に解析を進めている。[光木裕也（東京医歯大博士課程、研究生)、山本拓也（アメリカ合衆国国立アレルギー感染症研究所ワクチン研究センター、協力研究員)、土屋貴嗣（東大医科研修士課程、研究生)、渡辺俊樹（東京大学医科学研究所)、横田恭子]

（4）HIV-1 感染による麻疹ウイルス感染増悪機構の解析

HIV-1 感染小児で麻疹感染(MV)が重篤化することが知られるがその機構は不明である。そこで DsRed 発現 HIV-1 を PBMC に感染させ、5 日後に GFP 発現野生株あるいはワクチン株 MV を感染させて両ウイルスの相互作用を解析した。興味深いことに、野生型 MV のみにおいて、HIV との重複感染により単独よりも MV 感染細胞が増加した。HIV-1 感染 5 日後の MV 受容体 SLAM の発現は非感染 PBMC と比較して増強しており、HIV-1 感染により SLAM 発現が誘導される機構の存在が示唆された。[光木裕也（東京医歯大博士課程、研究生)、柳　雄介（九州大学医学研究院)、竹田　誠・駒瀬勝啓（ウイルス第三部)、寺原和孝、小林和夫、横田恭子]

（5）HIV-Nef 発現による免疫不全発症の解明

HIV-Nef 発現による T 細胞免疫への影響を明らかにするため、OVA 特異的 T 細胞抗原受容体トランスジェニックマウス(TGM)と、コクサキー・アデノウィルス受容体 TGM をかけあわせた double TGM を作成した。このマウスより精製した CD4+T 細胞に Nef 発現アデノウィルス、CD4 の発現抑制を起こさない Nef 変異体発現ウイルス(nefΔCD4)を感染させ、FACS を用いて Nef 発現、NefΔCD4 発現、および Nef 非発現 T 細胞を分離後個体に移入し、T 細胞機能を検討した。その結果、Nef 発現細胞は、非発現細胞と比べ抗原刺激に対する活性化が低下し、T 細胞遊走活性障害、また、所属リンパ節への移動も抑制された。しかし、活性化によるアポトーシス(AICD)に関しては nef 発現による影響は認められなかった。さらに、Nef 発現により、二次応答における CD4+T 細胞のヘルパー機能が低下することが示された。しかしこれらの T 細胞の異常は Nef による CD4 発現抑制とは無関係であった。これらの結果から、Nef 発現により CD4+T 細胞の抗原刺激に対する活性化が低下し免疫不全の要因の一つとなる可能性が示唆された。

[藤猪英樹（協力研究員)、阿戸　学、高橋宜聖、竹森利忠（理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター)]

（6）ヒト化マウスを用いた HIV 感染小型動物モデルの確立、ならびに in vivo における HIV 感染機構の解析

重度免疫不全マウス（NOD/SCID/Jak3 KO）の肝臓にヒト臍帯血由来造血幹細胞を移植してヒト化マウスを作製した。移植後 16 週目前後からセントラルメモリーCD4+ T 細胞の急激な増加が認められ、同時に高い活性化レベルを伴っていた。また、ヒト末梢血 CD4+ T 細胞と比較して CXCR4 の発現は低レベルであり、その傾向は特にメモリーサブセットで顕著であった。一方、CCR5 の発現は主としてエフェクターメモリーに認められるものの、一部のナイーブ、セントラルメモリーにも認められた。ヒト化マウスに EGFP 発現 X4 型 HIV-1 あるいは DsRed 発現 R5 型 HIV-1 をチャレンジした結果、両ウイルス共に感染が成立することを確認した。現在、生体内における X4 型および R5 型ウイルスの感染・複製様式、全身分布の違いについて解析を進めている。[寺原和孝、石毛真行（熊本大学エイズ学研究センター博士課程)、光木裕也（東京医歯大博士課程、研究生)、渋沢謙太郎（エイズ予防財団リサーチレジデント)、土屋貴嗣（東大医科研、実習生)、小林和夫、岡田誠治（熊本大学エイズ学研究センター)、横田恭子]

（7）HIV-1 Nef によるマクロファージ自然免疫機能の撹乱とエイズ病態

アデノウイルスベクターを用いて Nef を単球由来マクロファージ(MDMf)で強制的に発現させ、マイクロアレイ解析を行った結果、Nef 発現に伴って発現低下する TLR5 と IL-10Rβについて詳細に解析した。TLR5 と IL-10Rβともに MDMf でのタンパク発現は本来低レベルであったが、flagellin で刺激時の IL-6 産生は Nef 発現アデノウイルス感染 MDDC で有意に低下することを確認した。[横田恭子、水越文徳（獨協大学医学部微生物)、光木裕也（東京医歯大博士課程、研究生)、小林和夫、寺原和孝]

（8）腸管粘膜における HIV-1 特異的 CTL の誘導機構に関する解析

腸管粘膜における HIV-1 抗原特異的 CTL の誘導について、パイエル板の重要性を明らかにすることを目的としている。パイエル板への侵入性の異なる *Salmonella typhimurium* に HIV-1 Gag を発現させ、マウスに経口投与して腸管ならびに全身系の免疫応答について解析を進めている。[寺原和孝、石毛真行（熊本大学エイズ学研究センター博士課程)、小林和夫、横田恭子]

（9） サルエイズワクチンモデルにおけるヘルパーT 細胞機能の解析

新たなエイズ予防ワクチンとして注目を浴びているセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いた CTL 誘導型ワクチンの多機能性ヘルパーT 細胞誘導効果について解析を進めている。これまで、SIV Gag 導入 B lymphoblastoid cell line を用いた抗原刺激法、また、フローサイトメトリーによる MIP-1β, IL-2, TNF-α, IFN-γ, CD107 a の同時発現解析系を確立した。本解析系により、ウイルス非コントロール群に比して、ウイルスコントロール群で多機能性ヘルパーT 細胞が誘導されていることが確認された。[寺原和孝、俣野哲朗（東京大学医科学研究所)、横田恭子]

２．インフルエンザに関する研究

（1）H5N1 高病原性トリインフルエンザ高感度検出系の確立

H5N1 型インフルエンザのワクチン品質管理あるいは診断に応用するためのマウスモノクローナル抗体を作製し、H5HA に特異的なサンドイッチエライザ法を確立したが、不活化ウイルス粒子 20 ng/ml 程度が検出限界であった。そこで共同研究として東洋紡（株）が独自の技術で開発した化学発光による抗原検出簡易装置に免疫部で確立したモノクローナル抗体を用い、その感度と特異性を検討した。その結果、我々のエライザや市販の簡易キットよりも高感度で特異性の高い H5HA 検出キットの作製に成功した。[横田恭子、大西和夫、三澤修平（東洋紡敦賀研究所）小林和夫、影山　努・板村繁之（インフルエンザセンター)]

（2）新型インフルエンザワクチンに対するヒト液性記憶応答に関する研究

新型インフルエンザワクチン接種による液性免疫の誘導機構を明らかにするため、ヒト末梢血リンパ球を移入し

たヒト化マウスを作製した。このマウスに新型インフルエンザワクチンを接種すると、血清学的にナイーブなドナー由来のリンパ球にも関わらず、67%の割合で中和抗体が産生誘導されることを見いだした。この結果から、新型インフルエンザワクチンに対するヒト中和抗体産生応答をこのヒト化マウスのシステムで再現できることが明らかとなった。[高橋宜聖、小林明日香（実習生）、小野寺大志、阿戸　学、田代眞人（インフルエンザウイルス研究センター）、小林和夫]

（３）インフルエンザウイルスの感染防御に寄与する肺記憶 B 細胞に関する研究

インフルエンザウイルス経鼻投与後の肺において、記憶 B 細胞が長期に渡り維持され、感染防御に寄与することを見いだした。記憶 B 細胞の発現遺伝子を網羅的に解析した結果、脾臓記憶 B 細胞と類似した遺伝子発現パターンを示す一方で、発現量の大きく異なる分子の存在が明らかとなった。感染防御における機能的役割の解析を行うため、遺伝子欠損マウス用のターゲティングベクターを作製した。[高橋宜聖、小野寺大志、横井勇祐（実習生）、小林和夫]

（４）インフルエンザウイルス RNA による液性免疫記憶の活性化機構に関する研究

インフルエンザ不活化全粒子ワクチンに含まれる RNA は、抗体産生賦活作用を有すると考えられているが、その作用メカニズムの詳細は不明である。ウイルス RNA が記憶 B 細胞応答に果たす役割を検証するため、宿主レセプターである Toll-like receptor（TLR）からのシグナルを欠如したマウスを用いて記憶 B 細胞応答の変化を解析した。その結果、T 細胞非存在下で起こる迅速な記憶 B 細胞応答において、TLR シグナルが必須の役割を果たすことが判明した。[小野寺大志、相澤竜太郎（実習生）、高橋宜聖、小林和夫]

（５）新型インフルエンザウイルスを特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製とこれを利用した免疫クロマトグラフィーキットの開発

新型インフルエンザウイルス（2009 A/H1N1pdm）に特異的に結合する 29 種類の新規マウスモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体の中から、検出感度の最も高い抗体の組み合わせを選択し、体外診断薬メーカー（デンカ生研株式会社）と国立感染症研究所の共同で新型インフルエンザウイルスを特異的に検出する迅速・簡便免疫クロマトグラフィー診断キット（検査所要時間：約 10 分）を開発した。[高橋宜聖、阿戸　学、松村隆之、小野寺大志、平山中己、葛西正孝、大島正道、岡部真裕子、寺原和孝、大西和夫、横田恭子、田代眞人（インフルエンザウイルス研究センター）、小林和夫]

（５）ウイルス感染に対する宿主抵抗因子に関する研究

インフルエンザウイルス感染に際し肺胞上皮由来人細胞株 A549 は感受性であり感染ウイルスを排除できずに死滅する。しかし気管上皮由来細胞株 NCI-H292 は２４時間で感染ウイルスを排除し回復する。ウイルス感染により interferon(IFN) をはじめ宿主側抵抗遺伝子が誘導される状況を網羅的に解析した。細胞によるウイルス感染に対する反応性の違いを宿主抵抗因子の観点から検討している。[大島正道、戸高玲子（非常勤職員）、清水一史（日大医学部ゲノムセンター、客員研究員）]

（６）インフルエンザ誘導性の劇症肺炎の好中球機能による発症メカニズムの解明

インフルエンザウイルス感染症による致死率の高い劇症呼吸器障害は、感染時において好中球の急激かつ大量の肺への浸潤によって引き起こされる。これまでの研究成果から、劇症肺炎の発症には、好中球の主要因子であるミエロペルオキシターゼ（MPO）が関わっていることが示唆される。そこで感染肺における好中球および MPO 活性に着目して肺炎発症メカニズムの解明を目指している。[菅又龍一（千葉大医学部、協力研究員）、長尾朋和（千葉大医学部、協力研究員）、富澤一夫（国立国際医療センター、協力研究員）、戸高玲子（非常勤職員）、鈴木和男（千葉大医学部、客員研究員）、大島正道]

（７）Ventilator-induced lung injury モデルマウス作製

強毒型鳥インフルエンザは特に低年齢層に多くの重症患者が集中しサイトカインストームを通じ急激な呼吸状態の増悪を引き起こし ARDS（急性呼吸窮迫症候群）にいたり死亡する症例が多い。この ARDS のメカニズムを解析し治療につなげるために ARDS モデル（機械的肺損傷モデル）を作成した。[前原康宏（国立国際医療センター、協力研究員）、河内正治（国立国際医療センター、客員研究員）、鈴木和男（千葉大医学部、客員研究員）、長尾朋和（千葉大医学部、協力研究員）、戸高玲子（非常勤職員）、大島正道]

３．C 型肝炎ウイルス（HCV）感染に関する研究

C 型肝炎患者血液中及び肝組織内に HCV ウイルス short RNA が存在しその量比がウイルスの感染性、活動性と逆相関することを明らかにし発表した (J Viral Hepatitis 13(11):746-55,2006)。この short RNA 産生維持機構の解析を通してウイルス複製のメカニズムを解析し、効率よいウイルス細胞培養系を確立する。C 型肝炎治療におけるインターフェロン（IFN）の治療効果判定に short RNA が有用か調べた。short RNA の量比はウイルスの感染性、活動性と逆相関し IFN 治療効果判定の有用な基準となることが明らかとなった。今後 short RNA の産生メカニズムについて検討する。[大島正道、戸高玲子（非常勤職員）、清水洋子（日本大学医学部、協力研究員）、土方美奈子（国立国際医療センター）、吉倉　廣（CODEX）]

４.A 型肝炎ウイルス特異的新規モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系最適化と特異抗体産生 B 細胞動態の検討

A 型肝炎は B 型、C 型肝炎と異なりキャリア化・慢性化しないことから、A 型肝炎ウイルス（HAV）感染後に惹起される免疫応答によるウイルス排除が効果的におこり免疫記憶も長期に保持されることが知られているが、その本態については不明な点が多い。この免疫反応過程を解析する上で必要な技術として、HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 系の最適化とフローサイトメトリーを用いた HAV 抗体産生 B 細胞動態解析法の検討を行った。不活化 HAV 粒子をマウスに免疫して定法により多数のハイブリドーマを確立した。HAV 抗体検出 ELISA について抗原濃度、抗体濃度、抗体の組み合わせ、抗体標識法、サンドイッチ法、競合法などの諸条件を検討して最適化を行った結果、十分な感度・特異性・再現性を持つ ELISA 系を確立することができた。また、HAV 抗体産生 B 細胞の動態解析を行った結果、B220 陽性 CD5 陰性 HAV 結合 B 細胞が HAV 免疫後有意に増加しており、抗原特異的 B 細胞を検出できることが示された。しかし、HAV を免疫していない CD5 陽性脾細胞にも低レベルのシグナルが検出された。この結合が、HAV 受容体と報告された huHAVcr-1

様 TIM-1 分子に由来するものか検討中である。[望月康子実習生、清原知子・石井孝司（ウイルス第二部）、小林和夫、大西和夫]

５．腸管上皮における MHV レセプターの解析

MHV は腸管上皮に発現する CEACAM1a を介して感染する。CEACAM1a は選択的スプライシングにより 4 種類の受容体型構造をとるアイソフォームが知られているが、RT-PCR の結果、マウス小腸上皮層において新たに 3 種類の選択的スプライシングバリアント(CEACAM1a-2: GenBank# AB236330 、 CEACAM1a-2C1: GenBank# AB236331、CEACAM1a-4C1: GenBank# AB236332)の発現を認め、そのいずれとも分泌型構造を有することが推測された。さらにタンパクレベルでの解析から腸管分泌液中に CEACAM1a-4C1 が認められ、MHV との結合能および感染中和能を有していた。[Biochem Biophys Res Commun, 383:340-346, 2009.]
[寺原和孝、横田恭子、山本拓也（東大医科研博士課程、研究生）、田口文広（ウイルス第三部）、吉田理人・五十嵐脩・野地智法・後藤義幸・清野　宏（東京大学医科学研究所）、Beauchemin, N.（McGill 大学、カナダ）]

II．細菌感染症

１．抗酸菌感染症に関する研究

（１）抗酸菌におけるチミジル酸合成酵素の役割

チミン誘導体合成系は生物に必須の代謝経路であり、チミジル酸合成酵素（thymidylate synthetase, TS）による dUMP から dTMP への過程を含む。抗酸菌は TS として ThyA と ThyX を持つ。これまでの研究で、BCG の *thyX* 遺伝子欠損株はカタラーゼを含有しない 7H10-ADS 培地では増殖が顕著に抑えられることを明らかにした。この結果をもとに *thyX* 遺伝子産物による増殖の回復を指標とした抗酸菌の宿主―ベクターシステムの作製を試みた。*thyX* 遺伝子欠損株を宿主、*thyX* 遺伝子を発現する大腸菌－抗酸菌シャトルプラスミドをベクターとしたところ、約 1 割の擬陽性が生じた。陽性クローンを選択し、7H10-ADS 培地で継代したところ、長期にわたりプラスミドを安定に保持していることが示された。このことから、*thyX* 欠損株－*thyX* 発現プラスミドが新たな抗酸菌の宿主－ベクター系として機能する可能性が示された。[岡部真裕子、小林和夫、吉村満美子（大阪市立大学大学院医学研究科）、大原直也（岡山大学大学院医歯薬総合研究科）、中山浩次（長崎大学大学院医歯薬総合研究科）]

（２）日本株 BCG Tokyo 172-1 Ⅰ型とⅡ型の遺伝学的検討

BCG は結核ワクチンとして世界中で広く使用されてきた。最近になり日本で使用されている BCG Tokyo 172-1 に２つのタイプⅠ型とⅡ型が混在することが示された。両者の遺伝学的差異を明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析を行った。Ⅰ型のみに高い発現が認められる領域は細胞壁糖脂質 phthiocerol dimycocerosate（PDIM）の合成酵素 phenolpthiocerol synthesis type-I polyketide synthase と DIM の輸送に関わるトランスポーター daunorubicin-DIM-transport integral membrane protein ABC transporter をコードしている遺伝子群を含む領域であった。また機能未知であるが、BCG 3475c – BCG 3478 もⅠ型のみに高い発現が認められた。Ⅱ型で発現量が多くなっている遺伝子としては低酸素状態で働く 2 成分制御系 DevRS（DosRS）に支配されている遺伝子群が多く認められた。これらの遺伝子群が BCG のワクチン効果に影響を与えていることが示唆された。これらの遺伝子産物の役割について現在解析を進めている。[岡部真裕子、小林和夫、大原直也（岡山大学大学院医歯薬総合研究科）、瀧井猛将（名古屋市立大学大学院薬学研究科）、山本三郎（日本 BCG 研究所）]

（３）潜在性結核菌感染症

多くの活動性成人結核は潜在性結核菌感染に起因する。潜在性結核菌感染者は全世界の人口で約 30%であり、結核対策に重要である。潜在性結核菌感染における休眠菌の制御系を分子生物学的に解析した。

休眠期結核菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1（MDP1）、alpha crystalline-like protein （Acr）、heat-stress-induced ribosome binding protein A （ HrpA 、 Acr2 ） や heparin binding hemagglutinin（HBHA）を発現した。他方、分裂増殖期結核菌は early secreted antigen target 6 kDa（ESAT-6）や culture-filtrate protein 10 kDa（CFP-10）を発現した。これらの遺伝子をクローニングし、DNA 塩基配列を確認後、大腸菌 BL21 株に各プラスミドを導入し、各蛋白質が発現することを確認した。

休眠期抗酸菌関連蛋白質を抗原として、潜在性結核菌感染の血清診断を試みた。血清抗 MDP1-IgG 抗体価は潜在性（治癒後）結核患者で活動性結核に比し、有意に高値を示した。潜在性結核菌感染症の血清診断で MDP1 抗原は有用と考えられる。 [小林和夫、岡 真優子・吉村満美子・松本壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科）、北田清悟・前倉亮治（独立行政法人国立病院機構刀根山病院）]

（４）*Mycobacterium avium* complex（MAC）感染症の迅速血清診断：アメリカ合衆国における有用性

MAC 感染症は「臨床所見（画像、経過）および微生物学的検査」を総合的に考慮し診断される。このため、確定診断に長期間（2 ヵ月以上）を要することが多い。MAC 特異的抗原を用いた MAC 感染症の血清診断の有用性は既に報告した。MAC 肺感染症は地域や民族により、異なることが指摘されている。国立ユダヤ医療研究センター（アメリカ合衆国コロラド州デンバー市）で迅速血清診断キットの感度や特異度を検証した。その結果、感度：77%、特異度：94%であることが判明し、迅速・簡便血清診断（所要時間：約 3 時間）として有用であった。[小林和夫、北田清悟・前倉亮治（独立行政法人国立病院機構刀根山病院）、Charles Daley 呼吸器内科部長（国立ユダヤ医療研究センター）]

（６）遅発育性抗酸菌における sliding 能の検討

結核菌など抗酸菌の特徴の一つとして、菌体表面を覆う厚い脂質の層がある。これらの糖脂質は宿主に対する抗原性や薬剤標的として有用である一方、抗酸菌に sliding という性質を与えている。Sliding は菌増殖に伴って表面上を広がる性質であり、拡散する上で有効であると考えられる。これまで主に迅速発育抗酸菌にて sliding 能が報告されていたが、我々は抗結核ワクチン株の BCG も sliding することを確認した。このことから結核菌群においても sliding 能を有すると予想され、感染における関与の可能性も考えられる。現在日本で用いられている BCG Tokyo 172 株には遺伝学的に異なる二種の亜型が混在しており、subtype 間で比較したところ BCG においてもコロニー性状と sliding 能が関連することが分かった。[岡部真裕子、大原直也（岡山大学大学院医歯薬総合研究科）、山本三郎（日本 BCG 研究所）、小林和夫]

２．劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する研究

（１）劇症型溶連菌感染症における宿主好中球機能修飾

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、いったん発病すると急速に進行し、ショック症状、多臓器不全などを伴う、致死率の高い重篤な感染症である。主たる劇症型感染起因菌である *Streptococcus pyogenes* について、劇症感染患者分離株および非劇症感染患者分離株を収集し、ヒトの急性細菌感染防御機構の中心的役割を担う細胞群である好中球の防御能を解析した。その結果、劇症型感染患者分離株のみに認められる、遺伝子発現調節因子をコードする csrS 遺伝子の変異によって、病原因子である溶血毒素ストレプトリシン O(SLO)や IL-8 を分解するセリンプロテイナーゼ ScpC の発現が増強し、好中球への直接傷害を増強することと感染局所への好中球走化を抑制することが明らかになった。一方、劇症型感染患者分離株のみに認められる、別の遺伝子発現調節因子をコードする *rgg* 遺伝子の変異によっては、SLO の上昇は認められるが、ScpC の発現上昇は認められず、好中球傷害は起こるが、遊走は抑制しないことが明らかになった。マウスモデルを用いて病理学的に解析した結果、*csrS* 変異株の感染によって、感染部位での炎症細胞の欠如と菌の蓄積が認められる一方、rgg 変異株の感染組織では、好中球を主とする炎症細胞の浸潤と菌の蓄積が共に認められた。以上より、劇症型レンサ球菌感染症起因菌の遺伝子変化によって、病原因子発現パターンが異なり、感染局所での好中球防御能を様々に障害する結果、感染部位での特異な病態を伴う劇症型感染を惹起する可能性が示唆された。

[阿戸　学、松村隆之、池辺忠義（細菌第一部）、長谷川秀樹・佐多徹太郎（感染病理部）、渡邉治雄（細菌第一部）、小林和夫]

（２）劇症型溶連菌感染症における好中球傷害の分子機構

劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症の機序として、劇症型感染分離株において高発現しているストレプトリシン O(SLO)が、好中球ネクローシスを誘導することが、その一因であることが判明した。劇症型と非劇症型分離株の間で SLO の産生量を比較したところ、劇症型分離株において有意な増加が認められた。しかし、培養上清中の SLO の産生量は、好中球障害を引き起こす閾値濃度より低いことが判明した。また、劇症型分離株の培養液のみを好中球と培養しても、好中球のネクローシスは誘導されなかった。このことから、劇症型分離株の SLO を介する好中球障害は、接触依存性に生じることが強く示唆された。この相互作用に係る分子を菌と好中球の共培養系で検索した結果、活性化型 CD11b に対する抗体の添加によって、ネクローシスが阻害され、EDTA の添加によってほぼ完全に抑制された。また、NAD グリコシダーゼ(Nga)欠損劇症分離株は、好中球のネクローシスを誘導することができなかった。以上より、劇症型分離株は、カルシウム依存的に好中球表面のβインテグリンに結合し、接触面で分泌する SLO と Nga により効果的に好中球障害をもたらすことが示唆された。

[阿戸　学、松村隆之、池辺忠義・渡邉治雄（細菌第一部）、小林和夫]

３．類鼻疽の宿主防御に関する研究

（１）類鼻疽における糖尿病患者由来好中球防御機能異常

類鼻疽は *Burkholderia pseudomallei* によって起こる重篤で治療困難な感染症である。発症の主要な危険因子は糖尿病であるが、その発症機序に関する免疫学的検索はなされていない。本研究では、タイ人糖尿病患者および健常人より精製した好中球の *B. pseudomallei* に対する in vitro 防御機構を解析した。その結果、*B. pseudomallei* は他のグラム陰性菌であるサルモネラ菌や大腸菌に比べて好中球の貪食に対して抵抗性を示し、好中球の殺菌に対しても他の菌と比べて抵抗性を示すことが判明した。さらに、糖尿病患者由来好中球は、健常人由来好中球に比べて *B. pseudomallei* 貪食能の低下と、IL-8 に対する遊走能の低下が認められた。殺菌能に関しては、糖尿病患者と健常人の間で差が認められなかった。以上より、類鼻疽で糖尿病が発症危険因子である理由として、糖尿病患者における好中球機能障害が原因である可能性が示唆された。現在、*B. pseudomallei* と糖尿病患者好中球、あるいは健常人好中球の相互作用時のトランスクリプトーム解析を行い、類鼻疽発症に関わる分子の同定とその機序の解明を行っている。

[阿戸　学、Sujin Chanchamroen、Donporn Riyapa、Chidchamai Kewcharoenwong、Ganjana Lertmemongkolchai（Khon Kaen 大学、タイ王国）]

４．細菌べん毛の輸送装置に関する分子機序

細菌の運動器官であるべん毛は独自の輸送装置により構築される。細胞膜内在性の輸送装置構成タンパク質 FlhA および FlhB は、細胞質性構成タンパク質 FliH、FliI、および FliJ の結合プラットフォームを形成する。温度感受性 flhA(G368C)変異の効果を調べたところ、輸送基質タンパク質の輸送ゲートへの挿入が阻害されること、FlhA のＣ末端側細胞質ドメイン（$FlhA_C$）が少なくとも 3 つのサブドメインからなること、flhA(G368C)株から単離された偽復帰変異株の抑制変異がこれらのサブドメイン内のみに存在することが判明し、$FlhA_C$ がべん毛タンパク質の輸送に直接関与することが示唆された。

[岡部真裕子、南野徹・島田賢史・濱野(西條)由見子・今田勝巳・難波啓一（大阪大学大学院生命機能研究科）、May Kihara（Yale University、アメリカ合衆国）]

III. 原虫・寄生虫感染症

１．マンソン住血吸虫感染防御に関する研究

（１）マンソン住血吸虫感染防御に関する研究

ヒトのマンソン住血吸虫（*Schistosoma mansoni*: S.m.）感染モデルとして、マウス S.m.感染系を用いて、これまでの実験で弱毒化幼虫感作による比較的強い感染防御効果が得られている。弱毒化幼虫は、セルカリアの in vitro 培養系に弱毒化試薬として DNA 合成阻害剤を加えて作成している。引き続き行われたアジュヴァント併用による防御効果実験では、より強い感染防御効果と長期間の防御効果が示された。この感作方法を用いて、再感染に対する防御効果の実験が行われた。実験は非感作マウスと感作マウスに７週間隔で２度感染を行い、この２度の感染に対する防御効果が調べられた。この実験背景には、ヒト・家畜の住血吸虫症が、再感染を繰り返す疾患で、結果として致死性の慢性感染症を引き起こすことが知られている。実験結果は、非感作マウスでは再感染後８週までに 60%が死亡した。一方、感作マウスでは死亡が全くなかった。また、感染虫数も感作マウスの方が少なく、強い感染致死予防効果が見られた。

[平山中己、朝日博子（寄生動物部）、吉成正裕（横浜市立大学大学院医学研究科）、金澤　保（産業医科大学）]

（２）マンソン住血吸虫感染マウスに対する治療的ワクチン効果に関する研究

マンソン住血吸虫(S.m.）感染に対するワクチン効果として、感染予防効果に関しては、我々の感作方法｛弱毒化シストソミューラー(S.m.幼虫)と或るアジュヴァントの組み合わせ｝が、より強い防御効果を誘導することが判明している。一方で、ワクチン効果の１つとして、疾病の治療効果に関しては、有効なワクチン報告は見られない。そこ

で、我々の感作方法による疾病治療効果を調べる実験が行われた。実験はS.mマウスで、慢性疾患の原因となるS.m.虫卵の排泄が見られる次期にワクチン感作を行い、その後の疾病状況を調べる方法が行われた。2群マウスにセルカリア感染を行い、7-8 週後、糞便中の虫卵排泄を確認し、この時期に1群のマウスにワクチン感作を行い、非ワクチン感作マウス群との間での感染虫数、その他の比較を行った。マウスは感作後8週目に剖検を行い、感染虫数、虫卵結節のある肝臓の重量、脾腫の認められる脾臓の重量が調べられた。結果は、感染虫数（すべてが生存成虫）、肝臓重量、脾臓重量、いずれも2群間で統計的有意差がなかった。結論として、我々のワクチン感作には、感染成虫を排除する治療効果は認められないことが判明した。その後、感作虫(S.m.幼虫) 数を増やしたワクチン感作による治療効果の実験が継続して行われている。[平山中己、吉成正裕（横浜市立大学大学院医学研究科）]

IV．プリオン病

１．異常型プリオン蛋白質の免疫系における増殖・伝播機構の研究

プリオン病は、異常型プリオン蛋白質が病原分子となり、異常な蛋白質立体構造が伝播して疾病を引き起こす、いわゆる「コンフォーメーション病」の典型例である。BSE牛由来危険部位を摂食することにより体内に侵入し、長期潜伏期間を経て海綿状脳症を引き起こす。この過程には神経系と共に免疫系細胞が異常型プリオン蛋白質の伝播に関与することが知られている。これまでのプリオン発現細胞を用いた研究で、免疫系と神経系に発現する表面電荷に富む蛋白質分子 S100B が異常型プリオンの N 末端と相互作用する可能性を明らかにした。この相互作用は *in vitro* 実験系による証明が困難であったことから、*in silico* の解析すなわちホモロジーモデリングと分子動力学的手法を用いたシミュレーションにより解析を行っている。昨年度までの短時間（２ナノ秒）の計算結果から、両ドメインが静電的に相互作用する可能性が示唆されたが、本年度はさらに 10 ナノ秒までシミュレーションを進め、S100B 蛋白質と正常型プリオン蛋白質の立体構造変化を追った。作業仮説は、S100B 蛋白質分子表面に存在する陰性荷電コアと陽性荷電コアがプリオン蛋白質の特異領域と相互作用して立体構造の異常を引き起こすとするものであり、今後、シミュレーションの条件を変えてさらに検討を続ける。コンフォーメーション病の病因理解を目指す。[大西和夫・山口沙由里（非常勤職員）]

V．免疫機能に関する研究

１．プレ B 細胞受容体の機能に関する研究

抗体は生体防御の要となる免疫因子であり、その抗原認識多様性は 10^8 以上であると計算されている。この抗原認識多様性が発生する過程で重要な因子として働くプレ B 細胞受容体の機能を解析している。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ことを明らかにした［Nature Immunology 4, 849-856, 2003］。我々は、突然変異を導入したプレ B 細胞受容体の再構築実験から、代替Ｌ鎖の機能に関するいくつかの重要な予測を行っているが、Non-Ig 領域は結晶解析法による立体構造証明が困難であるため、ホモロジーモデリングおよび分子動力学法による *in silico* 解析を行っている。本研究は、抗体の抗原認識多様性を飛躍的に高める技術の基礎となり、感染症に対するワクチン開発の理論的枠組みの形成に寄与することを目的に行っている。[大西和夫、傅　舟一（筑波大学大学院生命環境科学）、Lill Martensson（Babraham Institute、英国）、Fritz Melchers（Max Planck Institute for Infection Biology、ドイツ連邦共和国）、藤本浩文（放射能管理室）、野口　保（産業技術総合研究所）]

２．抗体産生Ｂ細胞分化における BILL カドヘリンの機能に関する研究

カドヘリン分子ファミリーはカルシウムイオン依存的に働く細胞接着因子であり、形態形成や神経系の構築に重要な働きを担うことが知られている。BILL カドヘリン（Cdh-17）は、我々が発見したリンパ球カドヘリンで、免疫系で働くカドヘリンとしては唯一既知の分子である。BILL カドヘリンは抗体産生 B 細胞分化の過程で Spatiotemporal な発現制御を受けており、この分子の遺伝子欠損マウスでは記憶Ｂ細胞の形成・機能が低下することを既に明らかにしている（論文投稿中）。また、DNA マイクロアレイの結果から記憶Ｂ細胞にこの分子の mRNA が強く発現していることが示されており、多パラメータ・フローサイトメトリーによる解析から、$Lin^-B220^+IgM^-IgD^-IgG^+CD38^+PNA^-$ で免疫抗原を認識する記憶Ｂ細胞表面に BILL カドヘリン蛋白質が再帰的に発現することも証明した。我々は、この分子が記憶Ｂ細胞の形成・貯蔵ニッチに関与すると考えて研究を進めており、ワクチン技術に記憶Ｂ細胞形成促進効果を付与することを目標としている。[傅　舟一（筑波大学大学院生命環境科学）、清水健之（札幌医科大学）、村田英崇（日本歯科大学、研究生）、春原正隆（日本歯科大学、協力研究員）、沼田　治（筑波大学大学院生命環境科学）、Fritz Melchers（Max Planck Institute for Infection Biology、ドイツ連邦共和国）、小林和夫、大西和夫]

３．腸管上皮細胞に発現するカドヘリン・ファミリー分子と病原体細胞侵入機構に関する研究

BILL カドヘリンは抗体産生 B 細胞分化の過程で Spatiotemporal な制御を受けて発現する細胞接着因子であり、腸管上皮細胞などの粘膜免疫組織にも発現する。粘膜免疫系における BILL カドヘリンの機能を知る目的で、腸管、肺などの粘膜免疫組織における発現パターンを詳細に検討した。その結果、腸管上皮細胞の頂側膜並びに側底膜に非常に強く局在していることが明らかになった。この結果は、腸管内腔の抗原取り込みや腸内細菌との相互作用にこの分子が関与している可能性を示唆する。腸管は主要な病原体侵入部位の一つであり、腸管上皮には細菌・ウイルスの侵入標的分子が多数局在する。例えば E カドヘリンが、重篤な食中毒を引き起こすリステリア菌の細胞侵入標的分子であることはよく知られる。我々は、腸管上皮頂部の BILL カドヘリンを侵入標的とする病原体をスクリーニングする *in vitro* 実験系を構築することに成功し、これを用いて腸内病原体侵入機構への関与について Crohn 病を含む炎症性腸疾患（IBD）との関連が指摘されている抗酸菌との関連を中心に検討を進めている。[傅　舟一・沼田治（筑波大学大学院生命環境科学）、大西　真（細菌第一部）、Fritz Melchers（Max Planck Institute for Infection Biology、ドイツ連邦共和国）、小林和夫、大西和夫]

４．粘膜ワクチンデリバリーシステムへの応用を見据えた M 細胞の免疫生物学的解析

病原体などの異物侵入門戸である、粘膜上皮 M 細胞の分化・形成に対する腸管内環境ストレスの影響について解析した。マウスに cholera toxin、dextran sulfate sodium、あるいは indomethacin を投与した結果、いずれも場合でもマウス小腸Ｍ細胞のマーカー糖鎖α(1,2)fucose の発現上昇が

小腸上皮層全体で認められた。しかしながら、誘導型α(1,2)fucose 陽性細胞は形態・機能ともに M 細胞と区別すべき細胞集団であり、また、fucosyltransferase I（FUT1）がマウスパイエル板 M 細胞の新規マーカーとなり得ることが示唆された。従って、少なくとも一過性の腸管内環境ストレスでは M 細胞の過形成による抗原侵入は起こらず、腸管内ホメオスタシスは維持されているものと推測された（論文投稿中）。
[寺原和孝、横田恭子、小林和夫、清野　宏（東京大学医科学研究所）]

５．マクロファージによる感染初期応答を制御する新規チロシンリン酸化タンパク質の機能解析

生体は病原体の感染を受けると、マクロファージや樹状細胞などの貪食細胞に発現する Toll 様受容体(TLR)ファミリーを介して多様な病原体成分を認識し、炎症性サイトカイン(TNF-α、IL-6)や抗炎症性サイトカイン(IL-10)の産生などの宿主応答を行う。本研究では TLR4 シグナルにおけるチロシンリン酸化ネットワークの全体像を解明し、宿主応答の分子機構の理解を深め、その知見を応用した感染応答の制御を目指す。前年度にプロテオミクス技術 SILAC（Stable isotope labeling by amino acids in cell culture）を用いて同定された因子は、TNF-α の産生には影響しないが、IL-6 および IL-10 の産生を負に制御する因子であることが明らかとなった。今回、本因子の関わるシグナル伝達経路を探索した結果、Syk-PI3K-PLCγ2 経路を介した転写因子 NF-κB の持続的活性化を抑制する分子であることが示唆された。本研究により、マクロファージにおいて IL-6 および IL-10 の産生を負に制御する新たな因子が同定され、サイトカイン産生調節における新規分子機構が明らかとなった。[松村隆之、石川公輔・井上貴史・仙波憲太郎（早稲田大学理工学術院）、尾山大明・秦　裕子・井上純一郎（東京大学医科学研究所）]

６．TIFA 関連タンパク質 TIFAB の機能解析

Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-interacting protein with a forkhead-associated domain（TIFA）は TRAF6 を活性化し、細胞の増殖や成熟化に関わる転写因子 NF-κB の活性化を誘導する。TIFA 関連タンパク質 TIFAB は TIFA による NF-κB の活性化を阻害するが、TIFAB を発現する細胞の種類やその細胞での機能はほとんど知られていなかった。本研究では、①TIFAB が T 細胞よりも B 細胞に発現し、さらに B 細胞よりも樹状細胞やマクロファージにおいて高発現していること、②TIFAB の発現は TRAF6 が誘導する B 細胞の細胞増殖シグナルあるいは樹状細胞およびマクロファージの成熟化シグナルによって負に制御されていること、③TIFAB は細胞周期の S 期移行を阻害することが明らかとなった。以上の結果から TIFAB は、TRAF6 が誘導する B 細胞の増殖およびマクロファージや樹状細胞の成熟化における負の制御因子であると考えられた（J. Biochem. 146: 375-381, 2009）。
[松村隆之、仙波憲太郎（早稲田大学理工学術院）、都竹順子・山本　雅・井上純一郎（東京大学医科学研究所）]

VI. 骨髄造血機構に関する研究

１．間葉系幹細胞分化と造血制御に関する研究

骨髄不全症を呈する *Translin* 遺伝子欠損（TSN-KO）マウスの骨髄では、好中球などの顆粒球のみならず B 細胞やγδT 細胞の成熟停止が観察された。我々は、この現象が骨髄微小環境（ニッチ）に依存していることを骨髄移植実験で明らかにした。さらに、海綿骨と骨芽細胞の異所的な形成や血管新生と褐色脂肪細胞の蓄積が骨髄内で認められたことは、骨髄ニッチを形成する間葉系幹細胞が TSN 遺伝子によって影響を受けていることを示唆している。そこで、ニッチの形成に係わる間葉系幹細胞を TSN の標的細胞と想定して、間葉系幹細胞へ TSN siRNA を移入して変動する遺伝子の解析を行った。その結果、中胚葉形成に不可欠な Twist-2 遺伝子の発現が高まることを発見した。この結果は、TSN が Twist-2 遺伝子の発現を抑制的に制御していることを示唆している。今後、間葉系幹細胞の分化関連遺伝子のプロモーター領域に結合する転写抑制因子の探索によって、血液難病の原因が解明され、臨床応用に発展することが期待される。[石田礼子（協力研究員）、齋藤祐美・浅野茂隆（早稲田大学理工学術院）、中原一彦（大学評価・学位授与機構）、葛西正孝]

品質管理に関する業務

I. 急性 A 型ウイルス（HAV）肝炎診断薬承認前審査業務

A 型肝炎ウイルス（HAV）抗体体外診断薬の承認前検査に必要な体制を整備・更新している。承認前検査に必要となる HAV 抗体陽性の国内血清を含むパネル血清の整備を続けている。これまでに HAV 集団感染に際して収集した IgM 型 HAV 抗体陽性血清パネルに加え、日本赤十字社の協力を得て IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内血清を収集し、高品質の検体パネルを作製している。急性 A 型肝炎の発生報告数は年々減少傾向にあり、HAV 抗体陽性血清の確保が困難になってきている。今後さらに HAV 抗体陽性血清をインフォームドコンセントに基づき、患者から提供を受け、その品質を管理して HAV 抗体国内血清パネルの整備を続ける。この整備事業は「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 : ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究」（研究代表者 : 小林和夫）の支援による。[大西和夫、山口沙由里（非常勤職員）、小林和夫]

研修業務

I. 医師卒後臨床研修

医師卒後臨床研修として「結核など抗酸菌感染症」に関し、2009 年 12 月 14 日、講義した。[小林和夫]

II. 高校生を対象としたシンポジウム：エイズ

国立国際医療センター研究所、国立健康・栄養研究所、東京女子医科大学、早稲田大学と共にアウトリーチ活動を行い、その一環として国立感染症研究所において高校生を対象としたシンポジウム : 2009年度第2回箱根山周辺の身近な医療先端科学「世界の感染症」を2009年11月14日、主催した。[大島正道]

共同利用機器管理

機器の使用に関する予約と使用記録を管理・保存した。その結果、平成 21 年度細胞自動解析装置の使用は、822 回、1,783 時間であった。また、機器使用者が円滑に実験を遂行できるよう、機器の定期的な点検を行い、故障等のトラブルには早急に対処した。新規解析装置の導入に際し、機器操作に関する講習会を開催した。さらに不慣れな使用者や、特殊な操作法を希望する使用者に関しては、個別に技術指導を行った。[渡辺恵理（非常勤職員）、高橋宜聖、小林和夫]

発表業績一覧

I. 誌上発表

１．欧文発表

1) Ikebe, T., M. Ato, T. Matsumura, H. Hasegawa, T. Sata, K. Kobayashi, and H. Watanabe. 2010. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. PLoS Pathog. 6: e1000832.
2) Tomizawa K, T. Nagao, R. Kusunoki, K. Saiga, M. Oshima, K. Kobayashi, T. Nakayama, M. Tanokura, K. Suzuki K. 2010. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. Rheumatology (Oxford). 49: 1245-1256.
3) Kishishita, N., T. Matsuno, Y. Takahashi, H. Takaba, H. Nishizumi, F. Nagawa. 2010. Regulation of antigen-receptor gene assembly in hagfish. EMBO. Rep**.** 11: 126-132.
4) Man, R.Y., T. Onodera, E. Komatsu, T. Tsubata, 2010. Augmented B lymphocyte response to antigen in the absence of antigen-induced B lymphocyte signaling in an IgG-transgenic mouse line. PLoS One 5: e8815.
5) Minamino T., M. Shimada, M. Okabe, Y. Saijo-Hamano, K. Imada, M. Kihara, K. Namba. 2010. Role of the C-terminal cytoplasmic domain of FlhA in bacterial flagellar type III protein export. J. Bacteriol. 192: 1929-1936.
6) Yamamoto, T., Y. Tsunetsugu-Yokota, Y-Y. Mitsuki, F. Mizukoshi, K. Terahara, Y. Inagaki, N. Yamamoto, K. Kobayashi, and J-L.Inoue. 2009. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell–T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. PLoS Pathog. 5: e1000279.
7) Ishii, K., H. Hasegawa, N. Nagata, Y. Fukushi, F. Taguchi, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2009. Neutralizing antibody against SARS-CoV spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. Microbiol. Immunol. 53: 75-82.
8) Mizukoshi, F., T. Yamamoto, Y-Y. Mitsuki, K. Terahara, A. Kawana-Tachikawa, K. Kobayashi, A. Iwamoto, Y. Morikawa, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2009. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8+ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. Microbes Infect. 11: 191-197.
9) Yamamoto, T., N. Iwamoto, H. Yamamoto, T. Tsukamoto, T. Kuwano, A. Takeda, M. Kawada, Y. Tsunetsugu-Yokota, T. Matano. 2009. Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control. J. Virol. 83: 5514-5524.
10) Terahara, K., M. Yoshida, F. Taguchi, O. Igarashi, T. Nochi, Y. Gotoh, T. Yamamoto, Y. Tsunetsugu-Yokota, N. Beauchemin, H. Kiyono. 2009. Expression of newly identified secretory CEACAM1 isoforms in the intestinal epithelium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 383: 340-346.
11) Konno, H., T. Yamamoto, K. Yamazaki, J. Gohda, T. Akiyama, K. Semba, H. Goto, A. Kato, T. Yujiri, T. Imai, Y. Kawaguchi, B. Su, O. Takeuchi, S. Akira, Y. Tsunetsugu-Yokota, J-I. Inoue. 2009. TRAF6 established innate immune responses by activating NF-κB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. PLoS One 4: e5674.
12) Yamamoto, T., A. Samri, Y-Y. Mitsuki, B. Autran, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2009. siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific $CD4^+$ T cells in chronically HIV-infected individuals. AIDS 23: 2265-2275.
13) Matsumura, T., J. Kawamura-Tsuzuku, T. Yamamoto, K. Semba, and J. Inoue. 2009. TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain B (TIFAB) is a negative regulator of the TRAF6-induced cellular functions. J. Biochem. 146: 375-381.
14) Takahashi, Y., H. Hasegawa, Y. Hara, M. Ato, A. Ninomiya, H. Takagi, T. Odagiri, T. Sata, M. Tashiro, and K. Kobayashi. 2009. Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. J. Infect. Dis. 199: 1629-1637.
15) Yokoyama S, Y. Ito, H. Ueno-Kudoh, H. Shimizu, K. Uchibe, K. Mitsuoka, S. Miyaki, M. Kiso, A. Nagai, N. Fukuda, L. Puri, M. Kasai, Y. Hayashizaki, H. Okado, M. Hashimoto, H. Asahara. 2009. Systems approach reveals myogenesis genome network anchored by transcription repressor Rp58. Dev. Cell 17: 1-13.
16) Okado H, C. Ohtaka-Maruyama, Y. Sugitani, Y. Fukuda, R. Ishida, S. Hirai, A. Miwa, A. Takahashi, K. Aoki, K. Mochida, O. Suzuki, T. Honda, K. Nakajima, M. Ogawa, T. Terashima, J. Matsuda, H. Kawano, M. Kasai. 2009. The transcriptional repressor RP58 is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex. Dev. Biol. 331: 140-151.
17) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. Microb. Pathog. 46: 6-12.
18) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. PLoS Pathog. 5: e1000643.

２．和文発表

1) 横田（恒次）恭子. 2009. レトロウイルス進化における AIDS、病原体の進化ＮＩによる疾病、特集：生活習慣病ＨＡ進化病である、成人病と生活習慣病、東京医学社、12:1301-1305.
2) 池辺忠義、阿戸　学、小林和夫、渡辺治雄．2009．劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序―菌の免疫回避機構と菌の特性―，感染症誌，83: 485-489.
3) 池辺忠義、阿戸　学、小林和夫、渡邉治雄．2009．劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序−菌の特徴と免疫回避機構−．BIO Clinica　23：1321-1326.
4) 小林和夫．2009．マイコバクテリウム属（抗酸菌）．標準微生物学　第１０版（平松啓一、中込　治　編）東京：医学書院．286-298.　ISBN: 978-4-260-00638-5
5) 大原直也、小林和夫．2009．抗酸菌（マイコバクテリウム）感染症．コンパクト内科学（井上修二、上原誉志夫、金澤真雄、川口　実、代田常道　編）　京都：金芳堂．418-420.　ISBN: 978-4-7653-1382-7

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Matsumura, T., T. Ikebe, H. Watanabe, K. Kobayashi, and M. Ato. 2009. Involvement of IFN-γ and IL-6 in severe invasive group A *Streptococcus* infection. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (金沢、7 月).
2) Kasai M. 2009. Translin is indispensable for normal differentiation of mesenchymal niche and stem cell control in mice. Gordon Research Conferences, Stem Cells & Cancer, Les Diablerets (スイス連邦、9 月）
3) Ato, M. 2010. Incompetence of neutrophils in invasive infections. Symposium on Infection and Immunity and Translational Medicine.(タイ王国、 1 月)

2. 国内学会

免疫部

1) 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫．2009．ヒト血清抗体・細胞移入マウスを用いた防御免疫評価系の構築．日本食品免疫学会 2009 年度大会（東京、5 月）．
2) 大山尭人、細野　朗、柳橋　努、津田真人、八村敏志、高橋宜聖、伊藤喜久治、平山和宏、高橋恭子、上野川修一．2009．マウス腸内共生菌が誘導する腸管 IgA 産生の特徴．日本食品免疫学会 2009 年度大会（東京、5 月）．
3) 小川晋平、梅田幸子、高橋宜聖、上野川修一、佐藤隆一郎、八村敏志．腸管特有の細胞群 CD3-IL-2R+細胞の機能解析．日本食品免疫学会 2009 年度大会（東京、5 月）．
4) 高橋宜聖、小野寺大志、阿戸　学、小田切孝人、田代眞人、小林和夫．2009．ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザ感染防御能の解析．第 13 回日本ワクチン学会総会（札幌、9 月）．
5) 阿戸　学．2009．劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる宿主要因の解明．第 58 回日本感染症学会東日本地方会第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会（東京、10 月）．
6) 光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺原和孝、竹田　誠、柳　雄介、森川裕子、山岡昇司、横田（恒次）恭子．2009．HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析．第 57 回ウイルス学会学術集会（東京、10 月）．
7) 岩田奈織子、永田典代、辻　隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川　茂、佐多徹太郎．2009．SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について．第 57 回ウイルス学会学術集会（東京、10 月）．
8) 森　一泰、杉本知恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之．2009．糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する．第 57 回ウイルス学会学術集会（東京、10 月）．
9) 清原知子、石井孝司、小林和夫、大西和夫．2009．HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた ELISA 検出系の最適化と HAV 抗体産生 B 細胞動態解析法の検討．第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京、10 月）．
10) 小林和夫．2009．感染症の現状と制圧戦略（特別講演）．第 56 回昭和医学会総会（東京、11 月）．
11) 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳　雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子．2009．樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウィルスの開発．第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
12) 阿戸　学、松村隆之、小林和夫．2009．劇症型溶血性レンサ球菌感染症分離株の分泌毒素による接触依存性好中球傷害．第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
13) 満　栄勇、小野寺大志、鍔田武志．2009．Ligand-independent high tonic signaling through IgG-BCR induces B-cell receptor signaling defect and enhances B cell response．第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
14) 小川晋平、梅田幸子、倉岡雅征、高橋宜聖、紅露　拓、高津聖志、上野川修一、佐藤隆一郎、八村敏志．2009．腸管特有の細胞群 CD3-IL-2R+細胞の表現型および機能解析．第 39 回日本免疫学会総会（大阪、12 月）．
15) 加地友弘、杉本晶子、疋田正喜、饗場祐一、高橋宜聖、黒崎知博、竹森利忠．2009．Non-mutated memory B cells develop under T-cell help without germinal center reaction, followed by the functional maturation as immune response progresses．第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
16) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野　朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖．2009．T cell-independent activation of memory B cells with B-2 phenotype by whole virus particles. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
17) 松村隆之、小林和夫、阿戸 学．2009．Monocytes are the major producers of IFN-γ in severe invasive group A streptococcal infections．第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
18) FU, S., M. KUBOTA, K. KOBAYASHI, K. OHNISHI. 2009. Localization and Functional Analysis of BILL-cadherin(Cadherin-17) Expressed in the Mouse Intestine. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪、12 月）．
19) Tomizawa. K., T. Nagao, R. Sugamata, Y. Aratani, K. Kobayashi, S. Kawachi, T. Nakayama, and K. Suzuki. 2009. Role of neutrophils and myeloperoxidase in lung injury induced by influenza A/H1N1 (PR-8) infection in mice (1-G-W12-4-O/P). 日本免疫学会・学術集会記録、39：67、2009．第 39 回日本免疫学会総会・学術総会（大阪、12 月）．
20) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋沢謙太郎、小林和夫、渡邉俊樹、横田(恒次)恭子．2009．CD4 標的レンチウイルスベクターの開発．第 32 回日本分子生物学会年会（横浜、12 月）．
21) 阿戸　学、松村隆之、池辺忠義、渡邉治雄、小林和夫．2010. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害．第 8 回　感染症沖縄フォーラム（沖縄、2 月）．
22) 松村隆之、池辺忠義、渡邉治雄、小林和夫、阿戸　学．2010. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロンγ産生細胞の解析. 第 8 回　感染症沖縄フォーラム（沖縄、2 月）．
23) 大山尭人、細野　朗、鈴木あみ、柳橋　努、津田真人、八村敏志、高橋宜聖、伊藤喜久治、平山和宏、高橋恭子、上野川修一．2010．*Bacteroides*の刺激を受けたパイエル板細胞におけるIgA誘導の特徴．日本農芸化学会2010年度大会（東京、3月）．
24) 小川晋平、梅田幸子、倉岡雅征、高橋宜聖、紅露　拓、高津聖志、上野川修一、佐藤隆一郎、八村敏志. 2010. IL-5 を高産生する腸管 NK 様細胞の同定. 日本農芸化学会 2010 年度大会（東京、3 月）．
25) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、小倉　壽、小林和夫．2010．結核菌の宿主ヒアルロン酸を利用した細胞外増殖．日本細菌学会雑誌、65：125、2010．第 83 回日本細菌学会総会（横浜、3 月）．
26) 大原直也、岡部真裕子、阿戸　学、吉村満美子、井上哲圭、中山浩次、小林和夫．2010．チミジル酸合成酵素遺伝子を利用した BCG 宿主-ベクター系．日本細菌学会雑誌、65：155、2010．第 83 回日本細菌学会総会（横浜、3 月）．
27) 尾関百合子、菅原　勇、岡　真優子、小林和夫、松本壮吉．2010．結核菌感染における制御性 T 細胞の関与．日本細菌学会雑誌、65：189、2010．第 83 回日本細菌学会総会（横浜、3 月）．
28) 岡　真優子、平山幸雄、立石善隆、小林和夫、松本壮吉．2010．潜在性結核の診断法の確立に向けた臨床への橋渡し研究：第 1 報．日本細菌学会雑誌、65：198、2010．第 83 回日本細菌学会総会（横浜、3 月）．

９．生物活性物質部

部長　宮﨑 義継

概 要

当部は、わが国における真菌感染症の制圧、ならびに、感染症制御薬の基盤強化と有効活用を目標として研究を推進している。真菌症研究では、アスペルギルス症の新規抗原探索に基づく効果的診断と治療法開発に関する研究と、カンジダ属の薬剤耐性機構解明や病原因子制御に関する研究を軸としているが、新たにヒストプラスマ症やクリプトコックス症など健常者に発症する真菌症の疫学や制御法の研究にも着手した。感染症制御薬に関する研究では、細胞内シグナル伝達制御の解明と応用による感染症制御と活性評価系開発による創薬研究、及び、ゲノム情報を応用した天然物の生合成経路の解明とそれを利用した天然型新規薬剤の開発と産生効率化に関する研究を行っている。今年度の主たる研究項目は下記のとおりである。

Ⅰ．病原真菌の病原性解明と新しい診断・治療法開発のための研究

ＩＩ．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、ならびに、細胞内シグナル伝達制御の解明と応用

ＩＩＩ．宿主因子と免疫制御の解明による難治性感染症の制圧に関する研究

ＩＶ．微生物の有用遺伝子探索による創薬と薬剤耐性機構に関する研究

本年度の研究に対する受賞等は、梅山隆「第11回真菌症フォーラム奨励賞」、金子幸弘「第11回真菌症フォーラム優秀賞」金城雄樹「第4回日本免疫学会研究奨励賞」であった。

各室が担う業務は、それぞれ以下のとおりである。

第１室は、真菌の病原因子に関する研究と真菌症レファレンス業務を遂行している。昨年度から開始した糸状菌感染症の制圧に関する研究に関しては、アスペルギルス症の病原因子同定とこれらを感染症制御に応用する研究を行っている。カンジダ属を対象とした研究ではエルゴステロール生合成系に着目した薬剤耐性機構と病原因子の解明を継続している。また、不明真菌の同定や診断困難例の確定診断を支援しており、行政検査等を実施した。

第２室は、宿主および病原真菌の細胞内シグナル伝達系の解明とそれを応用した疾病制御に関する研究、ならびに、新規の活性評価系構築による薬剤のスクリーニングと構造活性相関についての研究を行った。また、検査業務のうち抗菌薬の収去検査を第４室と共同で担っている。

第３室は、６月に金城雄樹室長が着任し、宿主因子や免疫機構の制御に基づいた難治性感染症や難病の制圧をめざして基盤研究を開始した。真菌感染症のレファレンス業務のうち薬剤感受性試験を分担している。

第４室は、ゲノム情報を駆使した二次代謝産物をはじめとする天然物の同定や代謝経路解明、それらに立脚した新規感染症制御薬の創薬研究、及び、放線菌症の病態解明に関する基盤研究を行っている。また、品質管理業務を担当した。

平成１９年度から開始した真菌症レファレンス業務の成果として、今年度はバイオセーフティーレベル３のヒストプラスマ属の培養や、エキノキャンディン系耐性カンジダ株の検出、病理標本からのニューモシスチスの遺伝子検出などを行った。同様に品質管理業務については、後発医薬品等の品質管理業務のうち、抗菌薬の力価試験を担当しており、検査実施と共に標準作業手順書の改訂を行った。

依頼された行政対応として、宮﨑は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の専門委員等を務め、また、パンデミック（H1N1）2009に際して台湾在留邦人に対する現地説明を実施した。また、大野第１室長は、ベトナム国立衛生疫学研究所能力強化計画プロジェクトのうち、BSL3実験室における結核菌取扱手順書の作成や取扱技術の向上を目的に、現地での指導、助言を行なった。

国際交流では、米国疾病予防管理センター（CDC）の派遣事業により米CDC真菌疫学研究部門Dr. Tom Chillerを招聘し、「病原真菌の新規診断標的と検査法構築」に関するセミナーを実施し研究討議を行った。また、タイチェンマイ大学と共同で、ヒストプラスマやクリプトコックスの診断や分子疫学調査に関す

る研究を開始した。

業 績

調査・研究

Ⅰ．病原真菌の病原性解明と新しい診断・治療法開発のための基盤的研究と開発研究

１．アスペルギルス属の新規抗原の探索と応用研究

（1）病原真菌 *Aspergillus fumigatus* の細胞壁、細胞膜あるいは細胞外に存在する蛋白質の網羅的同定

前年度に引き続き特異的かつ感度の高いアスペルギルス属の検出系の確立、さらには創薬を目的として研究を進めている。シグナルシークエンストラップ法をもとに、10 個の遺伝子産物について、マウスモノクローナル抗体の作製を試みた。その中で、Y-1, Y-58, B-68 と命名した遺伝子産物に対するモノクローナル抗体を、それぞれ数種類ずつ得ることができた。
［山越　智、橋本ゆき、岡部智也（ACTGen 社）、梅山　隆、田辺公一、大野秀明、宮﨑義継］

（2）B-68 に対するサンドイッチ ELISA 系の構築

１次抗体としてモノクローナル抗体 6F8A3G10 を用い、2 次抗体としてモノクローナル抗体 H2B9D10 を用いた、B-68 に対するサンドイッチ ELISA を構築したところ、数十 ng/ml 程度の感度が得られた。しかしながら、*Aspergillus fumigatus* 各種培養液中に、B-68 蛋白質は検出できなかった。
［山越　智、橋本ゆき、岡部智也（ACTGen 社）、梅山　隆、田辺公一、大野秀明、宮﨑義継］

（3）カンジダ等の病原真菌を用いたシグナルシークエンストラップ法による解析と抗体作製

昨年度、病原真菌 *Candida albicans*、 *Candida glabrata*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus flavus*、*Cryptococcus neoformans*、*Rhizopus oryzae*、*Trichosporon asahii*、非病原真菌 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus versicolor*、*Penicillium expansum* について、真菌由来細胞外蛋白質をコードすると考えられる遺伝子を同定した。*A. fumigatus* と同様に、検出系の確立、さらには創薬を目的として、各種菌由来の遺伝子産物についてマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。いくつかの遺伝子産物に対して、モノクローナル抗体を、それぞれ数種類ずつ得ることができた。
［山越　智、岡部智也（ACTGen 社）、梅山　隆、田辺公一、大野秀明、宮﨑義継］

（4）*Aspergillus fumigatus* の遺伝子破壊

Ku70 遺伝子欠損株 Afs35 を用い、シグナルシークエンストラップ法をもとに選んだ *A. fumigatus* の 5 つの遺伝子について遺伝子欠損株を作製した。
［山越　智、梅山　隆、橋本ゆき、田辺公一、大野秀明、宮﨑義継］

（5）*Aspergillus fumigatus* の形態と病原性の研究

Ku70 遺伝子欠損株 Afs35 を用い pSK397 のハイグロマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を選択マーカーとして使い *A. fumigatus* の プロテインキナーゼをコードしている遺伝子 8 種類の遺伝子破壊株を作製した。
［梅山　隆、山越　智、大野秀明、田辺公一、宮﨑義継］

２．　カンジダ属の薬剤耐性機構と病原性因子の解析

（1）　ステロールトランスポーターとアゾール系抗真菌薬非感受性化

Candida glabrata の ABC 蛋白質 CgAus1p は細胞外から代替ステロールを取り込んで、アゾール系抗真菌薬によるエルゴステロール合成阻害を回避する。*CgAUS1* の発現を制御すると予想される転写因子である *UPC2A* 破壊株においては、fluconazole や lovastatin のようなステロール合成阻害剤に対する感受性が増加しており、血清によるアゾール非感受性化も認められなかった。また、複数のエルゴステロール合成関連遺伝子の発現調節にも *UPC2A* が関与する結果を得た。以上の結果から、*UPC2A* は *C. glabrata* のステロール合成を調節する主要な転写因子であると推測された。
［田辺公一、中山浩伸（鈴鹿高専・生物応用化学科）、名木　稔、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮﨑義継］

（2）ステロールトランスポーターの病原性との関与

Candida glabrata の ABC 蛋白質 CgAus1p は血清添加によって発現誘導されることから、生体内において何らかの機

能を発揮することが予想された。そこで、テトラサイクリンで *CgAUS1* 遺伝子の発現を抑制できる変異株を用いてマウス感染実験を行った。ドキシサイクリンで *CgAUS1* の発現を抑制すると、2 週目の感染効率が低下することを明らかにした。以上の結果より、CgAus1p はマウスでの持続的感染に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

［田辺公一、中山浩伸（鈴鹿高専・生物応用化学科）、名木　稔、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮﨑義継］

３．真菌症病態解明と治療法開発のための臨床研究

（1）血液疾患に合併する真菌症の調査・解析

日本成人白血病治療共同研究グループ、東京移植コンソーシアム、Febrile Neutropenia 研究会との合同で、「日本人血液疾患患者におけるアスペルギルス属およびその他の糸状菌類による侵襲性真菌感染症についての疫学調査」に Central laboratory として参加し、糸状菌類の同定、薬剤感受性など真菌学的な面から調査・解析を行っている。

［大野秀明、宮﨑義継、草地弘子、大川原明子、山越　智、吉田　稔（帝京大学）］

（2）慢性肺アスペルギルス症に対するアムホテリシン B リポソーム製剤とボリコナゾールの比較試験

臨床的に治療に難渋する慢性肺アスペルギルス症に対する、アムホテリシン B リポソーム製剤とボリコナゾール注射薬の初期治療における有効性や安全性に関する非盲検無作為化比較試験において、分離真菌の遺伝学的同定と薬剤感受性を検討している。

［宮﨑義継、大野秀明、草地弘子、倉島篤行（複十字病院）、小川賢二（東名古屋病院）、鈴木克洋（近畿中央胸部疾患センター）、沖本二郎（川崎医科大学）、掛屋　弘（長崎大学）、二木芳人（昭和大学）、河野　茂（長崎大学）］

４．ヒストプラスマ属の本邦ならびに東南アジアでの生息状況の調査

ヒストプラスマ症はわが国では輸入真菌症として扱われているが、海外渡航歴のない日本人にも発病が確認されている。また、東南アジアはヒストプラスマ属の生息地域と考えられているが、環境中における生息を確認した報告はない。このような状況を背景として、日本やタイでの自然環境中に生息すると考えられるヒストプラスマ属を検出し、感染経路の解明や疫学、公衆衛生への寄与を目的とした調査・研究を行なった。

［大野秀明、田辺公一、草地弘子、山越　智、梅山　隆、宮﨑義継、Trepradab Norkaew、Pojana Sriburee（チェンマイ大学）］

５．COPD 等における難治性感染症の病態把握等に関する研究

（1）慢性肺糸状菌感染症の診断基準作成に関する研究

本邦と欧米における慢性肺糸状菌感染症に関して、慢性壊死性肺アスペルギルス症の臨床診断骨子案を作成した。それに基づくレトロスペクティブな臨床研究を行い、細菌性肺炎との比較において有意に高率に認められる患者背景と症状に関する項目を見いだした。

［宮﨑義継、山越　智、河野茂（長崎大学）、二木芳人（昭和大学）、小川賢二（国立病院機構東名古屋病院）、安藤常浩（東京日赤医療センター）、泉川公一（長崎大学）、亀井克彦（千葉大学）、渡邊浩（久留米大学）、大野秀明］

（2）糸状菌感染症に対する新規診断系の構築

１次抗体としてモノクローナル抗体 1B4C あるいは 3G4 を用い、2 次抗体としてウサギポリクローナル抗体を用いて、Y-1 に対するサンドイッチ ELISA を構築した。300ng/ml 程度の感度が得られ、*Aspergillus fumigatus* 各種培養液中に Y-1 蛋白質を検出できた。

［山越　智、橋本ゆき、岡部智也（ACTGen 社）、梅山　隆、田辺公一、大野秀明、宮﨑義継］

６．深在性真菌症と輸入真菌症に関する新しい検査法と抗真菌薬の開発、ならびに病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

（1）*Candida albicans* 薬剤排出ポンプの基質認識機構解明

C. albicans 薬剤排出ポンプの基質認識機構の解明を目的として、ABC 蛋白質とその阻害剤である FK506 の相互作用に特異的なアミノ酸残基の同定を行った。

［大野秀明、田辺公一］

（2）*Cryptococcus neoformans* の潜伏感染診断系の検討

C. neoformans の潜伏感染のメカニズムを解明するためのアプローチとして、低酸素条件下での培養で *C. neoformans* の遺伝子発現について検討したところ、未同定の遺伝子が多く認められたと同時に糖代謝に関与する遺伝子の発現が多いことを確認した。また SST－REX 法を使用し、低酸素条件下で発現する膜・分泌蛋白を同定し、これらを標的とした潜伏感染診断系の構築について検討を進めている。

［大野秀明、山越　智、橋本ゆき、草地弘子、田辺公一、梅山隆、金子幸弘］

（3）*Cryptococcus neoformans* 感染に対する生体防御における LECT2 の役割の解析

真菌感染における LECT2 の関与を調べるために、LECT2 遺伝子欠損マウスを用い、*C. neoformans* 感染における感受性を調べた。*C. neoformans* を感染させ、生存率および脳、肺、肝臓、脾臓における経時的な菌量、病理組織像、炎症性サイトカインの発現を、野生型と比較検討した。その結果、LECT2 は感染初期に何らかの感染防御能を持つのではないかと推測された。現在更なる解析を行なっている。

［大野秀明、山越　智、奥村彰規、草地弘子、田辺公一、梅山隆、宮﨑義継］

ＩＩ．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、ならびに、細胞内シグナル伝達制御の解明と応用

１．新しい活性評価系による生物活性物質の研究

（1）プロテインキナーゼ阻害物質の研究

文部科学省がん特定領域研究・統合がん「化学療法基盤情報支援班」において、プロテインキナーゼ阻害の検定（II）を担当した。NRK 細胞を血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor, PDGF）で刺激し、活性化される PDGF レセプターチロシンキナーゼおよび主要な細胞内シグナル伝達経路（PI3 kinase-AKT pathway、classical MAP kinase pathway、PLC-PKC pathway）に対する阻害効果をウエスタンブロットにより検出する系を用い、検体の評価を行った。

［福山まり、矢守隆夫（癌研）、深澤秀輔］

（2）抗 HCV ウイルス薬の探索と作用機序に関する研究

HCV-JFH1 を Huh7.5.1. に感染させて阻害物質をスクリーニングするアッセイで、既知の化合物ライブラリーよりタモキシフェンが抗 HCV 活性を示すことを見いだした。そこで、これに関連する他の SERM （Selective Estrogen Receptor modulator）についても阻害活性があるかどうか調べた結果、エストロゲン受容体α のアンタゴニストとされる化合物は阻害活性がありアゴニストにはなかった。これらの SERM は、レプリコン細胞でも HCV の複製を阻害したが、さらに HCV シュードウイルスの侵入も阻害した。水疱性口内炎ウイルスのシュードウイルスの侵入は阻害しなかったことから、HCV に特異的に侵入を阻害すると思われた。

［村上裕子、鈴木哲朗、脇田隆字、深澤秀輔］

２．細胞内シグナル伝達制御の解明と応用

（1）*Candida albicans* のバイオフィルムとストレス応答についての検討

C. albicans のバイオフィルムの治療抵抗性とストレス応答に関する検討を行った。抗真菌薬によってストレス応答が誘導されること、また、ストレス応答阻害剤がバイオフィルムに対する抗真菌薬の効果を増強することを示した。今後は、ストレス応答を制御するための新たな手法を検討する。

［金子幸弘、深澤秀輔、宮﨑義継］

（2）CAGE 法による *Candida albicans* バイオフィルムにおけるトランスクリプトーム解析

CAGE 法により、網羅的な *C. albicans* バイオフィルムのトランスクリプトーム解析を行った。抗真菌薬投与により変化する遺伝子に関して、さらにその詳細を検討している。

［金子幸弘、宮﨑義継］

（3）質量顕微鏡を応用した細胞内分子分布の解析による感染病態の解明

腎症モデルマウスの腎臓内分子分布を質量顕微鏡で検討した結果、質量電荷比 854.7、856.7、880.7、882.7 など複数のピークに、正常マウスと相違を確認し、これらのピークのいくつかを同定してきた。今後は、同定できていない分子の同定を進めるとともに、分子分布と病因との関連を検討する。

［金子幸弘、宮﨑義継、小畑陽子（長崎大学）、早坂孝宏（浜松医科大学）、瀬藤光利（浜松医科大学）、河野　茂（長崎大学）］

ＩＩＩ．宿主因子と免疫制御の解明による難治性感染症の制圧に関する研究

１．*Candida albicans* 細胞壁表層のマンナン構造と炎症惹起性の関係の解析

（１） α型マンノース転移酵素欠失株の解析

C. albicans 細胞壁の表層付近に存在する、α-1,3 結合型マンノースの転移酵素の遺伝子と推定される遺伝子の破壊株を作製した。その菌株より精製したマンナン蛋白質刺激によるマウス樹状細胞の炎症性サイトカイン産生誘導について解析を行ったところ、破壊株では親株と比較して、IL-6 及び IL-12p40 の産生誘導の低下を認めた。また、病原性を解析するため、破壊株と親株をマウスに経静脈的に接種したところ、破壊株感染マウスでは、親株感染マウスと比較して、生存期間の延長および腎臓内菌数の減少を認めた。以上の結果より、細胞壁表層付近のα-1,3 結合型マンノースを欠損していると推定される *C. albicans* では、炎症惹起性及び病原性が低下すると考えられた。

［大川原明子、金城雄樹、樽本憲人、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮﨑義継］

（２） β型マンノース転移酵素欠失株の解析

定常状態において、*C. albicans* 細胞壁の表層部はβ-1,2 結合型マンノースが存在すると考えられている。β-1,2 結合型マンノースの転移酵素の遺伝子と推定される遺伝子の破壊株を作製した。その菌株より精製したマンナン蛋白質刺激によるマウスのマクロファージや樹状細胞、ヒトおよびマウスモノサイトの炎症性サイトカイン産生誘導について解析を行ったところ、破壊株では親株と比較して、IL-6 及び IL-12p40 の誘導能が亢進していた。また、破壊株または親株より精製したマンナン蛋白質をマウスに投与したところ、破壊株由来のマンナン蛋白質投与マウスでは、血管炎の発症率が高まった。以上の結果より、マンナンの構造と炎症惹起性、血管炎の発症に関係性があることが示唆された。

［大川原明子、金城雄樹、樽本憲人、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮﨑義継］

２．*Candida albicans* の細胞壁蛋白抗体による *in vitro* 増殖抑制効果の検討

SST-REX （signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening）法を用いて得られた *C. albicans* の細胞膜・分泌蛋白のうち、比較的多く発現している抗原を同定し、抗原に対する抗体産生 hybridoma を作製した。計 16 種類の hybridoma から得られた上清の抗真菌活性について *in vitro* での増殖抑制効果などスクリーニングを行った。

［樽本憲人、金城雄樹、山越　智、大川原明子、梶川益紀（ACTGen 社）、大野秀明、宮﨑義継］

３．*Cryptococcus neoformans* 糖脂質の解析と自然リンパ球刺激機序の解析

自然リンパ球の Natural killer T（NKT）細胞は、*C. neoformans* 肺感染において感染後早期に肺に集積し、真菌の排除に重要な Th1 反応を増強する。*C. neoformans* による NKT 細胞刺激機序を明らかにするため、*C. neoformans* lysate をマウス樹状細胞にパルスし、NKT 細胞を含む肝臓の白血球と培養したところ、IFNγ 産生の誘導を認めた。また、その反応は CD1d 依存性であることより、NKT 細胞を介した反応であることが分かった。さらに、*C. neoformans* の脂質を解析したところ、単糖型の糖脂質が検出されたことから、*C. neoformans* が NKT 細胞の認識抗原を有する可能性が示唆された。

［金城雄樹、宮﨑義継、阿部譲・仲川清隆・宮澤陽夫・川上和義（東北大学）］

４．播種性カンジダ症モデルマウスでの炎症反応における糖脂質投与の影響

播種性カンジダ症の炎症反応の誘導と制御機構を解析するため、*Candida albicans* 感染マウスに自然免疫を刺激する糖脂質抗原を投与し、マウスの生存率及び臓器内菌数への影響を調べた。糖脂質投与マウスでは、コントロールマウスと比較して、*C. albicans* 感染後の生存期間の短縮及び腎臓内菌数の増加を認めた。さらに、糖脂質投与マウスでは、腎臓及び血中における炎症性サイトカイン産生の増加を認めた。このことから、糖脂質投与による自然免疫の刺激により、*C. albicans* 感染後の炎症反応が増強し、真菌の

排除に影響を及ぼすことが考えられた。現在、その機序について解析を進めている。

［樽本憲人、金城雄樹、大川原明子、宮﨑義継］

５．NKT 細胞が認識する肺炎球菌由来糖脂質抗原の同定

これまでに NKT 細胞が、肺炎球菌（市中肺炎やインフルエンザ感染後の二次性肺炎の主要な起炎菌である）感染において、感染防御に重要な役割を担うことを明らかにした。NKT 細胞の肺炎球菌への反応性の機序を解明するため、肺炎球菌より糖脂質を抽出し、NKT 細胞の刺激活性を調べた。肺炎球菌より精製した糖脂質は、NKT 細胞の T 細胞抗原受容体を特異的に刺激し、サイトカイン産生を誘導した。このことより、肺炎球菌感染において、NKT 細胞が菌由来の糖脂質を認識して、感染免疫応答を誘導することが示唆された。

［金城雄樹、Petr Illarionov（バーミンガム大学）、川上和義（東北大学）、Jose Luis Vela・Mitchell Kronenberg（ラホヤアレルギー免疫研究所）］

６．感染病態や難治化に及ぼす LECT2 の機能解析に関する研究

（1）ガラクトサミン/LPS 肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析

リポポリサッカライドによるエンドトキシンショックモデルとして、ガラクトサミン/LPS 肝障害マウスモデルを用いて LECT2 の機能を解析した。LECT2-KO マウスにおいて IFNγ の発現レベルが有意に低いことを見いだした。さらに、ガラクトサミン/LPS 投与後のマウス肝臓からリンパ球画分を採取し、IFNγ の発現をフローサイトメーターにて解析した。その結果 IFNγ の産生レベルの差が見られた。

［山越　智、奥村彰規、橋本ゆき、大野秀明、宮﨑義継］

（2）ウシ LECT2 結合蛋白質の同定

LECT2 は、肝実質細胞から分泌され血液中に存在する。そこで、血中蛋白質との相互作用を考え、抗ウシ LECT2 蛋白質抗体カラムでウシ FBS 中の LECT2 を吸着させ、SDS-PAGE で分離後、LC-MS-MS で 12 種類の特異的結合をすると考えられる血清蛋白質を同定した。

［奥村彰規、鈴木健裕（理研）、岡部智也（ACTgen 社）、橋本ゆき、大野秀明、宮﨑義継、山越　智］

（3）マウス LECT2 レセプターの同定

昨年度に引き続き LECT2 のレセプターを同定するために、レトロウイルスベクターを用いマウス cDNA 発現ライブラリーを作製し、Ba/F3 細胞に感染後、マウス LECT2-Fc 融合蛋白質の結合を指標に、フローサイトメトリーにて、レセプター遺伝子を発現する Ba/F3 細胞の濃縮を試みた。

［山越　智、岡部智也（ACTgen 社）、奥村彰規、橋本ゆき、大野秀明、宮﨑義継］

（4）サイトカイン LECT2 のペプチダーゼ活性の検討

LECT2 の C 末端側は、Pfam データベースによると、peptidase family M23 に分類される。このファミリーの大半は、亜鉛イオン結合性のペプチダーゼである。そこで CHO 細胞で発現させた組換え LECT2 で亜鉛イオンの結合の有無を ESI-MS および XAFS で測定し、ペプチダーゼ活性の有無について検討した。その結果、LECT2 は亜鉛結合蛋白であるが、ペプチダーゼ活性を見出すことはできなかった。

［奥村彰規、橋本ゆき、大野秀明、宮﨑義継、山越　智］

（5）サイトカイン LECT2 の軟骨細胞に対する作用機序解析

LECT2 は軟骨細胞の成長刺激因子としても同定されているが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで、LECT2 ノックアウトマウスおよび LECT2 トランスジェニックマウスの成長板軟骨について野生型マウスとの差異を病理組織的に調べた。その結果、LECT2 の有無によって軟骨細胞の分化に違いが認められた。さらに、LECT2 が軟骨前駆細胞株の遺伝子発現に及ぼす影響を DNA マイクロアレイ法により解析すると、軟骨細胞分化に関与するいくつかの因子の発現に影響がみられた。

［奥村彰規、宇田晶彦（獣医科学部）、橋本ゆき、大野秀明、宮﨑義継、山越　智］

Ⅳ. 微生物の有用遺伝子探索による創薬と薬剤耐性機構に関する研究

１．創薬に関する研究

（1）ノコバクチン生合成遺伝子の改変による新規化合物の

創製

Nocardia farcinica IFM 10152 株のノコバクチンの生合成経路の改変株を用いて、新規化合物の取得を試みた。改変株を培養し、菌体のメタノール抽出物を野生株のものとHPLC により比較した結果、改変株で新たなピークが観察された。その化合物を精製し、質量分析により解析を行った結果、得られた化合物は、ノコバクチンの生合成過程の途中で停止した新規化合物であると予想された。これにより、生合成経路の改変により、新規化合物の取得が可能であることが示された。

［星野泰隆、石川　淳］

（2）Mutasynthesis を用いたノコバクチンアナログの創製

Nocardia farcinica IFM 10152 株のノコバクチン生合成の最初過程であるサリチル酸生合成をになう遺伝子の破壊株を用いて、mutasynthesis を行った。数種類のサリチル酸アナログを利用して培養を行い、サリチル酸アナログが取り込まれたノコバクチンを生産させ、精製を行った。得られた化合物の抗微生物活性を検討したところ、顕著な活性を示すものはなかった。今後、その他の生物活性に関して検討を行う。これらの結果より、mutasynthesis により、多くの新規化合物の創製が可能であることが示された。

［星野泰隆、石川　淳］

（3）次世代シークエンサーを用いた放線菌からの生物活性物質生合成遺伝子の探索

次世代シークエンサーを用いた *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 のゲノムスキャニングを行い、ポリケチド合成酵素（PKS）および関連遺伝子を含むコンティグのカセット PCR 法による連結を行った結果、50kb を超える領域に、複数の PKS 遺伝子がクラスターを形成していることが明らかとなった。さらに PKS のドメイン解析によって、この遺伝子群は brasilinolide の生合成遺伝子である可能性が示唆された。

［渋谷健太、石川　淳］

（4）次世代シークエンサーを用いた糸状菌からの生物活性物質生合成遺伝子の探索

次世代シークエンサーを用いて、糸状菌の生産する生物活性物質の生合成遺伝子を見出すために、ゲノムスキャニングを行った。その結果、生物活性物質生産に関与すると予想されるポリケチド合成酵素、非リボゾーム型ペプチド合成酵素や酸化酵素等をコードする遺伝子が多数見いだされ、本法が糸状菌における有用遺伝子の探索に有効であることが示された。

［星野泰隆、石川　淳、関塚剛史、黒田　誠（ゲノムセンター）］

（5）LtsA の *Nocardia farcinica* 病原性への関与

LtsA の病原性への関与を検討するため、マウスマクロファージ様細胞 J774A.1 細胞への感染実験を行なった結果、*ltsA* 遺伝子破壊株は、野生株に比べ、炎症性サイトカインの産生が上昇していることを見出した。LtsA はリゾチーム耐性に関与するなど、*Nocardia* および近縁細菌による感染症の治療薬ターゲットとなる可能性が示唆されるため、現在、サイトカイン産生上昇と病原性との関連および LtsA 蛋白質の機能解析を行なっている。

［石野敬子、渋谷健太、石川　淳］

（6）*lux* operon 導入による *Nocardia farcinica* の細胞内検出系の開発

N. farcinica IFM 10152 株の宿主細胞内での挙動や生存率を検討するために、高 GC 細菌用にコドンを改変した *Photorhabdus luminescens* の *lux* operon を *N. farcinica* に導入した結果、*tac* プロモーターを用いることにより、検出可能な発光強度を得た。さらに *lux* 遺伝子上流に *Mycobacterium smegmatis* 由来の acetamidase regulon を導入した結果、acetamide 添加により *tac* プロモーターを用いた場合の 5 倍の発光強度を得た。

［関野山涼介、石野敬子］

2．薬剤耐性機構に関する研究

（1）リファンピシンモノオキシゲナーゼによるリファマイシン SV の変換化合物の構造解析

Nocardia farcinica IFM 10152 株のリファンピシンモノオキシゲナーゼを大腸菌にて発現させ、リファマイシン SV の変換反応を行った。その変換後の化合物を精製し、NMR による構造解析を行った。^{1}H-, ^{13}C-NMR スペクトルの結果から、リファマイシン SV の変換後の化合物の芳香環に変化が認められた。今後詳細な解析により、本酵素のリファマイ

シン系化合物に対する反応機構の解明を進める。

［星野泰隆、深井俊夫（横浜薬科大）、石川　淳］

（2）*Nocardia farcinica* のアミノグリコシド耐性遺伝子の同定

N. farcinica IFM 10152 株のゲノム解析により見出された 3 種のアミノグリコシドりん酸化酵素遺伝子の破壊実験を行った結果、*nfa31340* 遺伝子はトブラマイシン、ジベカシン、ゲンタマイシンおよびシソマイシン耐性、*nfa38480* 遺伝子はカナマイシン、ネオマイシン、パロモマイシンおよびリボスタマイシン耐性、*nfa38620* 遺伝子はストレプトマイシン耐性を支配することが明らかとなった。

［藤井匠子、石川　淳］

なお、上記研究には厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業、難治性疾患対策事業）、ヒューマンサイエンス振興財団・政策創薬総合研究事業、文部科学省科学研究費補助金、経済産業省地域イノベーション創出研究開発事業の支援を受けた。

真菌症レファレンス業務

医療機関や研究機関、自治体などからの要請にもとづき、真菌感染症の診断、真菌に関する調査、真菌症に対する相談業務などを行った。おもな内容として、真菌症疑いならびに診断困難例等の臨床検体からの真菌検出および血清診断が22件 45 検体、培養真菌の同定不能例における菌種同定業務など 12 件 117 株、感染症相談件数 2 件であった。また、大野と梅山は地方衛生研究所診断技術研修会で真菌症診断に関する講演を行った。

［大野秀明、草地弘子、梅山　隆、田辺公一、金子幸弘、大川原明子、山越　智、金城雄樹、宮﨑義継］

品質管理業務

収去検査による抗生物質医薬品の力価試験

今年度は、抗生物質医薬品 2 品目 20 ロット（セフポドキシムプロキセチル錠剤 4 ロット、シロップ剤 2 ロット、および注射用セフタジジム 14 ロット）について、日局各条収載の液体クロマトグラフィー法に準拠した定量法により、力価試験を行った。収去品 19 ロットは規定の含有量を示し、「適合」と判定されたが、注射用セフタジジム 1 ロットについては規定の含有量を満たさず、「不適合」と判定した。

［村上裕子、石川 淳、金子幸弘、石野敬子、深澤秀輔、星野泰隆、宮﨑義継］

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Seki M, Kosai K, Hara A, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. Expression and DNA microarray analysis of a platelet activating factor-related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection. Jpn J Infect Dis. 62:6-10, 2009.

2) Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Pulmonary cryptococcosis in late pregnancy and review of published literature. Mycopathologia. 167:125-131, 2009.

3) Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 22:291-321, 2009.

4) Nagi M, Tanabe K, Takano Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Niimi M. Serum or bile affects the in vitro azole susceptibilities of *Candida* spp. Jpn J Infect Dis. 62:306-308, 2009.

5) Okumura A., Suzuki T, Dohmae N, Okabe T, Hashimoto Y, Nakazato K, Ohno H, Miyazaki Y, Yamagoe S. Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Biosci Trends. 3:139-143, 2009.

6) Li Z, Umeyama T, Wang CC. The Aurora kinase in Trypanosoma brucei plays distinctive roles in metaphase-anaphase transition and cytokinetic initiation. PLoS

Pathog. 5:e1000575, 2009.

7) Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. Intern Med, 49:491-495, 2010.

8) Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. Antiviral Res. 83:112-117, 2009.

9) Lee S, Hinz A, Bauerle E, Angermeyer A, Juhaszova K, Kaneko Y, Singh PK, Manoil C. Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. Proc Natl Acad Sci USA. 106:14570-14575, 2009.

10) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. The effects of an hsp90 inhibitor on the paradoxical effect. Jpn J Infect Dis. 62:392-393, 2009.

11) Teruya T, Sasaki H, Fukazawa H, Suenaga K, Bisebromoamide, a Potent Cytotoxic Peptide from the Marine Cyanobacterium Lyngbya sp.: Isolation, Stereostructure, and Biological Activity. Org Lett. 11: 5062-5065, 2009.

12) Fukazawa H, Ikeda Y, Fukuyama M, Suzuki T, Hori H, Okuda T, Uehara Y. The resorcylic acid lactone hypothemycin selectively inhibits the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cells. Biol Pharm Bull. 33:168-173, 2010.

13) Kronenberg M, Kinjo Y. Innate-like recognition of microbes by invariant natural killer T cells. Curr Opin Immunol. 21:391-396, 2009.

14) Mukai A, Fukai T, Hoshino Y, Yazawa K, Harada K, Mikami Y. Nocardithiocin, a novel thiopeptide antibiotic, produced by pathogenic *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757. J Antibiot. 62:613-619, 2009.

15) Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Arai K, Saito F, Fukai T, Satoh H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the *rox* gene product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. J. Antibiot. 63:23-28, 2010.

2. 和文発表

1) 河野　茂、宮﨑義継ほか：「一般医療従事者のための抗真菌薬使用ガイドライン」日本化学療法学会　2009

2) 河野　茂、二木芳人、網谷良一、小川賢二、倉島篤行、宮﨑義継：肺アスペルギルス症に対する micafungin の臨床効果　日本化学療法学会誌 58, 128-139. 2010

3) 大野秀明、宮崎義継：微生物の種類別にみた施設内感染制御　3）真菌　アスペルギルス　医療福祉施設における感染制御と臨床検査　臨床検査　53：1381-1386、2009 医学書院　東京

4) 露口一成、大野秀明、吉山　崇、土井教生、重藤えり子：日本における多剤耐性結核 結核 85: 125-137, 2010

5) 石川 淳：オーソログ比較による新規代謝経路の発見とゲノムマイニング　ファルマシア 45:875-879, 2009 （社）日本薬学会　東京

II.　学 会 発 表

1. 国際学会

1) Miyazaki Y. Management of Invasive fungal Infections focusing on Respiratory Tract Infections. International Symposium joined with 49th Congress of Japanese Respiratory Society. Jun 14, 2009, Tokyo.

2) Miyazaki Y. Antifungal Agent Update：Candins. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection. June

19-21, 2009, Toronto, Canada.

3) Saito Y, Ogawa K, Kurashima A, Amitani R, Okimoto J, Niki Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Kohono S. A First Randomized Trial Comparing Micafungin and Voriconazole for Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis in Japan. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 12-15, 2009, San Francisco, USA.

4) Li Z, Umeyama T, Wang C C. The Aurora-like kinase in *Trypanosoma brucei* plays critical roles of promoting metaphase- anaphase transition and initiating cyokinesis、Kinetoplastid. Molecular Cell Biology Meeting, April 26-29, 2009, Woods Hole, MA, USA.

5) Tanabe K, Nagi M, Lamping E, Monk BC, Cannon RD, Miyazaki Y and Niimi M. Domain-shuffled chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal structural determinants affecting substrate and inhibitor specificities. 17th congress of the International Society for Human and Animal Mycology, May 25-29, 2009, Tokyo.

6) Li Z, Umeyama T, Wang CC. Polo-like kinase is required for trans-localization of the chromosomal passenger complex in regulating cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. 20th Annual Molecular Parasitology Meeting, September 13-17, 2009, Woods Hole, MA, USA.

7) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Hsp90 inhibitor preferentially attenuates postnadir resistance to micafungin and tolerance to voriconazole of *Candida albicans*. 109th General Meeting, American Society for Microbiology, May 16-21, 2009, Philadelphia, USA.

8) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole attenuates the effect of micafungin against *Candida* biofilms in vitro possibly via stress responses. 109th General Meeting, American Society for Microbiology, May 16-21, 2009, Philadelphia, USA.

9) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Combination therapy of micafungin with voriconazole and amphotericin B against *Candida* biofilms. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, May 25-29, 2009, Tokyo.

10) Kaneko Y, Ohno H, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Effects of Antifungal Combinations Against *Candida* Biofilms and Stress Responses. 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 12-15, 2009, San Francisco, USA.

11) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Evaluation of Mycological Character and Early Immune Response against Different Structures of Cell Surface Mannan of *Candida albicans*. 109th General meeting of American Society for Microbiology, May 16-21, 2009, Philadelphia, USA.

12) Ishida-Okawara A, Ohno H, Yamagoe S, Kaneko Y, Niimi M, Miyazaki Y. Characterization of mycological features of putative α-type mannosyltransferase deleted *Candida albicans*. 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, May 25-29, 2009, Tokyo.

13) Ishikawa J, Hoshino Y, Kuroda M Sekizuka T. Discovery of secondary metabolite biosynthetic genes in *Nocardia brasiliensis* by genome scanning with next generation sequencer. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, August 20-25, 2009, Shanghai, China.

14) Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Identification of the rifampicin monooxygenase gene of *Nocardia farcinica*. The 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, August 20-25, 2009, Shanghai, China.

15) Ishino K, Hoshino Y, Chiba K, Hirai A, Ishikawa J. Nocobactin production is required for virulence of *Nocardia farcinica*. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes,

August 20-25, 2009, Shanghai, China.

2. 国内学会

1) 宮崎義継：わが国の深在性真菌症ガイドラインの特徴と課題. 第83回日本感染症学会総会学術講演会, 平成21年4月23-24日, 東京.

2) 宮崎義継：真菌感染症のこれからの診断法. 第83回日本感染症学会総会学術講演会, 平成21年4月23-24日, 東京.

3) 宮崎義継：教育講演　真菌感染症治療のパラダイム. 第57回日本化学療法学会総会, 平成21年6月3-5日,　東京.

4) 宮崎義継：シンポジウム　難治性呼吸器真菌感染症の現況と制御へのアプローチ. 第49回呼吸器学会学術講演会, 平成21年6月13日, 東京.

5) 宮崎義継：特別講演　内臓真菌症に対する治療戦略. 第30回関東医真菌懇話会, 平成21年11月21日, 東京.

6) 宮崎義継：シンポジウム　未承認薬を考えるーポサコナゾール. 第52回日本感染症学会中日本地方会学術総会・第57回日本化学療法学会西日本支部総会合同学会, 平成21年11月27-28日, 名古屋.

7) 田辺公一：病原真菌のアゾール系抗真菌薬耐性機構. 第177回酵母細胞研究会, 平成21年7月3日, 千葉.

8) 大野秀明：真菌性髄膜炎に対する抗真菌薬療法. 第14回日本神経感染症学会総会, 平成21年10月17日, 宇都宮.

9) 木村敬朗、鈴木亮介、山越　智、鈴木建裕、堂前　直、勝二郁夫、松浦善治、千葉　丈、脇田隆字、鈴木哲郎：Prohibitin2はC型肝炎ウイルス(HCV)NS5A蛋白質と相互作用をしHCV複製調節に働く. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 平成21年10月25-27日, 東京.

10) 田辺公一、名木　稔、新見昌一、山越　智、梅山　隆、大野秀明、宮崎義継：血清による*Candida albicans*のazole系抗真菌薬感受性の変化の検討. 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第56回日本化学療法学会東日本支部総会・合同学会, 平成21年10月30-31日,　東京.

11) 山越　智、大野秀明、宮崎義継：アスペルギルス属の表層蛋白質をターゲットとしたアスペルギルス症の新しい診断・治療法開発の試み. 第30回関東医真菌懇話会, 平成21年11月21日, 東京.

12) 大森深雪、安藤一義、上芝秀博、有村 祐、山越　智、鈴木和男、八木淳二：敗血症におけるLECT2の役割. 第39回日本免疫学会総会学術集会, 平成21年12月2-4日, 大阪.

13) 大野秀明：シンポジウム　抗真菌薬その適応と限界を探る　新規抗真菌薬と新たな治療の可能性. 第11回真菌症フォーラム, 平成22年3月13日, 東京.

14) 若山　恵、大久保陽一郎、篠崎　稔、笹井大督、中山晴雄、蜜田亜希、安藤常浩、大野秀明、宮崎義継、亀井克彦、渋谷和俊：In situ hybridizationを用いたヒトヒストプラスマ症の検討. 第11回真菌症フォーラム, 平成22年3月13日, 東京.

15) 中村竜也、乾佐知子、清水千裕、奥田和之、佐野　一、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、植村芳子、高橋伯夫、田辺公一、大野秀明、宮崎義継：*FKS2*遺伝子上のアミノ酸欠損によるmicafungin低感受性*Candida glabrata*の検出. 第11回真菌症フォーラム, 平成22年3月13日, 東京.

16) 田辺公一、名木　稔、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：真菌AUS1トランスポーターの比較解析. 日本農芸化学会2010年度大会, 平成22年3月27-30日, 東京.

17) 名木　稔、田辺公一、中山浩伸、大野秀明、宮崎義継：ステロールトランスポーター*CgAUS1*の機能解析. 日本

農芸化学会 2010 年度大会, 平成 22 年 3 月 27-30 日, 東京.

18) 梅山　隆、大野秀明、新見昌一、上原至雅、: *Candida albicans* のプロテインキナーゼ網羅的遺伝子破壊による新規治療ターゲットの探索. 真菌症フォーラム第 11 回学術集会, 平成 22 年 3 月 13 日, 東京.

19) 安田　愛、片山和浩、三橋純子、蓑島維文、板東俊和、杉山　弘、山越　智、杉本芳一、野口耕司 : がんウイルス Epstein-Barr Virus 由来の EBNA1 を新規分子標的とする阻害薬の探索研究. 日本薬学会第 130 年会, 平成 22 年 3 月 28-30 日, 岡山.

20) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野　茂、宮崎義継 : *Candida albicans* の biofilm に対する micafungin と voriconazole、amphotericinB との併用効果. 第 83 回日本感染症学会総会学術講演会, 平成 21 年 4 月 23-24 日, 東京.

21) 金子幸弘、大野秀明、河野　茂、宮崎義継 : 難治性緑膿菌感染症に対するガリウム治療の効果および耐性機序に関する検討. 第 57 回日本化学療法学会総会, 平成 21 年 6 月 3-5 日, 東京.

22) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 : 難治性緑膿菌呼吸器感染症に対するガリウム治療の呼吸機能等に与える影響. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会, 平成 21 年 6 月 12-14 日, 東京.

23) 深澤秀輔 : cis-enone resorcylic acid lactones によるチロシンキナーゼ阻害. 日本がん分子標的治療学会,　平成 21 年 6 月 24-26 日, 徳島.

24) 村上裕子、赤澤大輔、鈴木哲朗、脇田隆字、深澤秀輔 : C 型肝炎ウイルス（HCV）に対する SERM（Selective Estrogen Receptor Modulator)の作用. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 平成 21 年 10 月 25-27 日, 東京.

25) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継、河野　茂 : 緑膿菌のガリウム耐性機序とガリウム耐性の影響についての検討. 第 44 回緑膿菌感染症研究会, 平成 22 年 2 月 12-13 日, 東京.

26) 金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野　茂、宮崎義継 : ストレス応答阻害による *Candida albicans* の抗真菌薬耐性の制御. 真菌症フォーラム第 11 回学術集会, 平成 22 年 3 月 13 日, 東京.

27) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上裕子、深澤秀輔、鈴木哲朗、脇田隆字、花田賢太郎、西島正弘、深澤征義 : C 型肝炎ウイルス JFH1 株変異体におけるウイルス産生の上昇. 日本薬学会　第 130 年会, 平成 22 年 3 月 28 日ー30 日, 岡山.

28) 大川原明子、山越　智、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 : *C. albicans* 細胞壁表層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第 83 回 日本感染症学会, 平成 21 年 4 月 23-24 日, 東京.

29) 奥村彰規、大川原明子、山越　智、（共同研究者 : 斎藤武、大野秀明、宮崎義継）: ガラクトサミン/LPS 肝障害モデルを用いた LECT2 の機能解析. 第 39 回日本免疫学会総会学術集会, 平成 21 年 12 月 2-4 日, 大阪.

30) 金城雄樹、Illarionov P、Pei B、Vela JL、Li X、川上和義、Tsuji M、Kronenberg M. : グラム陽性菌由来 iNKT 細胞糖脂質抗原.　第 39 回日本免疫学会総会学術集会,　平成 21 年 12 月 2-4 日, 大阪.

31) 石川 淳、星野泰隆、黒田 誠、関塚剛史、五ノ井 透、三上 襄 : 次世代シークエンサーを用いたゲノムスキャニングによる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索. 第 24 回日本放線菌学会大会, 平成 21 年 7 月 16-17 日, 秋田.

32) 藤井匠子、星野泰隆、佐藤浩之、宮崎義継、石川 淳 : 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* に おけるリファンピシンモノオキシゲナーゼ遺伝子の同定. 第 24 回日本放線菌学会大会, 平成 21 年 7 月 16-17 日, 秋田.

33) 三浦広美、林 健二、加藤泰樹、池田治生、石川 淳、市川夏子、藤田信之、大村 智、高橋洋子：*Kitasatospora setae* KM-6054T の液体培養中での形態分化に伴うタンパク質発現パターンの変化. 第 24 回日本放線菌学会大会, 平成 21 年 7 月 16-17 日, 秋田.

34) 石野敬子、星野泰隆、千葉和宏、平井明香、石川 淳：病原性放線菌ノカルジア病原性へのノコバクチンの関与. 第 29 回 日本細菌学会関東支部総会, 平成 21 年 11 月 5-6 日, 東京.

35) 藤井匠子、石野敬子、千葉和宏、石川 淳：病原性放線菌 *Nocardia farcinica* のアミノグリコシド耐性機構の解明. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月 27-29 日, 横浜.

36) 石野敬子、渋谷健太、 星野泰隆、石川 淳： *ltsA* 遺伝子のノカルジアの病原性への関与. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月 27-29 日, 横浜.

3.その他

1) 金子幸弘：Bacterial & Fungal Biofilms. 東北大学臨床微生物解析治療学講座, 平成 21 年 4 月 28 日, 仙台.

2) 宮崎義継：新型インフルエンザ. (財) 交流協会講演会, 平成 21 年 5 月 12-13 日, 台北、対中、高尾.

3) 宮崎義継：真菌症. 大阪大学医学部感染症学講義, 平成 21 年 6 月 8 日, 大阪.

4) 金子幸弘：感染症総合管理 1a カビが起こす重篤な感染症. 早稲田大学規範科学総合研究所, 平成 21 年 6 月 16 日, 東京.

5) 田辺公一：深在性真菌症治療の現状と展望. 東京農工大学大学院 生物生産科学フロンティア II, 平成 21 年 6 月 19 日, 東京.

6) 宮崎義継：進歩する真菌症診療. 岡山真菌症フォーラム, 平成 21 年 6 月 24 日, 岡山.

7) 宮崎義継：市民公開講座 カビが起こす肺の病気. 第 57 回日本化学療法学会西日本支部総会, 平成 21 年 11 月 28 日, 名古屋.

8) 宮崎義継：講義 侵襲性真菌症について. 医師卒後臨床研修, 平成 21 年 12 月 15 日, 東京.

9) 金城雄樹：細菌・真菌感染防御における NKT 細胞の役割：NKT 細胞による微生物由来糖質抗原認識. 千葉大学 Global-COE(G-COE)セミナー, 平成 21 年 12 月 18 日, 千葉.

10) 宮崎義継：特別講演 最近の侵襲性真菌症のとりあつかい. 第 3 回広島真菌症研究会, 平成 22 年 1 月 28 日, 広島.

11) 宮崎義継：特別講演 変貌する呼吸器領域の真菌症. 第 16 回和歌山呼吸器真菌症懇話会, 平成 22 年 2 月 13 日, 和歌山.

12) 大野秀明：輸入真菌症概論. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会, 平成 22 年 2 月 26 日, 東京.

13) 梅山 隆：輸入真菌症の診断法ーコクシジオイデス症とヒストプラスマ症ー. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会, 平成 22 年 2 月 25-26 日, 東京.

14) 宮崎義継：特別講演 呼吸器内科における肺アスペルギルス症の取り扱い. 第 3 回関東呼吸器真菌症研究会, 平成 22 年 3 月 6 日, 東京

１０．細胞化学部

部長　花田　賢太郎

概　要

細胞化学部の目的は､｢感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス、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、オートファジーに関する研究、志賀毒素の受容体の発現制御に関する研究、細胞内脂質輸送に関する研究、細胞外遊離アミノ酸濃度変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究などで成果を挙げた。

培養細胞系でのＣ型肝炎ウイルス(HCV)感染において、オートファジーがHCV粒子のアセンブリまたは放出に関与することを示唆した。コレステロール合成に関わるスクワレン合成酵素の阻害剤がHCV産生を阻害することを見出した。Huh7.5.1 細胞に対する感染価が従来の HCV JFH1 株に比べて 100 倍程度高い亜型を見出し、その適応変異部位を明らかにした。

プリオン病に関する研究では、非定型ウシ海綿状脳症プリオン（L-type BSE プリオン）は従来型 BSE プリオンとは異なり近交系マウスへの伝播が困難であるが、サルへの伝播・感染においてはL-type BSE プリオンのほうがむしろ早期の病態進行を示すことを明らかにした。また、マウス PrP^{C}→PrP^{Sc} 変換に対するドミナント・ネガティブ効果を有する PrP^{C} 変異体を見いだした。なお当部では、平成 13 年 12 月からウェスタンブロティング法による BSE の行政検査を担当している。

また、質量分析器を用いた蛋白質解析を通じて、他部との共同研究も積極的に進めている。

花田は、薬事・食品衛生審議会臨時委員、また、(独)医薬品医療機器総合機構が行う医薬品 GLP 査察および医療機器 GLP 査察に対する評価委員の任もはたした。

本年度も当研究部の研究に対し、経常研究費に加え、厚生労働省、文部科学省などから援助を受けた。

以下に本年度の業績を記す。

業　績

調査・研究

Ⅰ．プリオン病に関する研究

（１）近交系マウスへのウシ海綿状脳症（BSE）の伝達

従来型 C-type BSE（ウシ JP6；1996 年生と JP12；1999 年生に由来）および非定型 L-type BSE（JP24 由来）プリオンについて、近交系マウスへの伝播実験を行った。3 代伝播を経た C-type BSE プリオンは終末期が一定に収束し、マウス馴化株としてほぼ確立できたと考えられた。マウス馴化後の潜伏期、病理、PrP^{Sc} の生化学的性状には誕生年コフォート間の差は認められなかった。一方、L-type BSE プリオンの初代伝播は、長期観察後も感染成立は確認できず、2 代目に’blind passage’したマウスも接種後約 1 年経過したが感染・発症の兆候は無い。[萩原健一、山河芳夫、原英之、大内史子；佐藤由子・佐多徹太郎（感染病理部)]

（２）非定型 L-type BSE の霊長類への伝播

L-type BSE（JP24 由来）のヒトへのリスクを検討するため、当該ウシの脳乳剤をカニクイザルに脳内接種し、潜伏期間､発症経過などを従来型C-type BSE と比較した。その結果、2 匹の接種サルは 1.6、1.7 年で行動異常や神経症状を呈し、0.4 年の病期を経て起立不能となった。これは C-type BSE の潜伏期（2.3、2.3、3.7 年）や病期（0.6、0.8、1.2 年）に比べて顕著に短く、脳内接種法で比較するかぎり L-type BSE は C-type BSE より強毒性であることを示している。2 匹のサルの（神経）症状として、驚愕反応は顕著では無く、末期の激しいミオクローヌスが特徴的に観察された。[山河芳夫、萩原健一；小野史子（予防衛生協会)；柴田宏昭・寺尾恵司（基盤研)；黒澤明日香・佐藤由子・飛梅実・佐多徹太郎（感染病理

部)]

（３）カニクイザルに伝播した非定型 L-type BSE プリオンの分布と病理解析

カニクイザルに伝播した L-type BSE プリオン（JP24 由来）の特徴をウエスタンブロット法（WB）および免疫組織化学法（IHC）を用いて解析した。WB 解析では PrP^{Sc} は中枢神経に局在し､その糖鎖型は JP24 の PrP^{Sc} の糖鎖型と酷似していた。IHC では、大脳および脳幹部において PrP^{Sc} が拡散シナプス型の沈着を示し、小脳ではプラークあるいは顆粒状の沈着が顕著であった。プリオン病に特徴的な空胞変性は大脳から小脳まで広範囲に分布したが、C-type BSE に感染した霊長類の大脳に特徴的に認められる花弁状沈着はL-type BSE感染サルでは見られなかった。[山河芳夫､萩原健一;小野史子(予防衛生協会);柴田宏昭・寺尾恵司（基盤研）;黒澤明日香・佐藤由子・飛梅実・佐多徹太郎（感染病理部)]

（４）C末端欠失型CRMP-2の細胞内分布について

スクレーピー・プリオン（Obihiro I株）に感染したマウスの脳内プロテオーム解析から､CRMP-2のC末端欠失型（CRMP-2-ΔC）がPrP^{Sc}の蓄積に伴い増加することを示してきた。脳の発生過程ではある種の短鎖型CRMP-2が核内移行するという報告があるため、今回、CRMP-2-ΔCのC末端欠失が細胞内局在に及ぼす影響について神経芽細胞腫（ScN2a）を用いて検討した。この細胞では内在性CRMP-2-ΔCは存在量が少なく、検出が困難である。そこでCRMP-2-ΔCをプラスミドにより発現させたところ、内在性CRMP-2と同様に細胞質画分に検出され､C末端欠失がCRMP-2-ΔCの細胞内局在を変化させる可能性は低いと考えられた。[大内史子、萩原健一、山河芳夫、原英之]

（５）PrP^{C}→PrP^{Sc} 構造変換を抑制するプリオンタンパク質ドメインの解析

マウス・プリオンタンパク質（moPrP）のオクタペプチドリピート近傍（アミノ酸 9 残基）をニワトリ・PrP の対応配列で置換したキメラ PrP は、プリオン持続感染細胞（ScN2a）に強制発現させても Proteinase K（PK）抵抗性の PrP^{Sc} に変換されない。そこで、この 9 残基をそれぞれアラニンに置換した moPrP 変異体を作製したところ、それ自身が PK 抵抗性の PrP^{Sc} に変換されないだけでなく、PrP^{C}→PrP^{Sc} 変換に対するドミナント・ネガティブ効果も有する 4 つの変異体を見いだした。これらの 4 つの変異体の変異ドメインが、PrP^{C}→PrP^{Sc} の変換過程にどのような役割を担っているのかについて、現在検討を加えている。[原英之、中村優子、萩原健一]

（６）プリオンへの感染におけるガングリオシドの役割の解析

ガングリオシド生合成酵素遺伝子のノックアウト(KO)マウス２系統に対して Obihiro Ⅰ株を腹腔内接種し、複合ガングリオシドの欠損がプリオン病の病態に与える影響を検討した。その結果、野生型マウスと比較して GM2/GD2 KO マウスでは終末期までの経日期間が顕著に縮まり、また終末期での小脳顆粒細胞層の空胞化が目立った。しかし、PrP^{Sc} の糖鎖型、脳の沈着部位には野生型マウスとの間に差は認められなかった［萩原健一、原英之、山河芳夫、花田賢太郎；佐藤由子・佐多徹太郎（感染病理部）；山下匡（北大・先端生命科学研究院)]

（７）ガラクトシルセラミド欠損マウスでのプリオン病の病態解析

プリオン感染個体においては病原体プリオンが軸索・シナプスを経由してニューロン間を伝播すると考えられている。そこで、ミエリン-軸索形成に異常があるガラクトシルセラミド合成酵素ノックアウト（KO）マウスに Obihiro I株を脳内接種し、軸索形成が健常な野生型マウスとの比較を行った。その結果、KOマウスでは、野生型およびヘテロ型接合型マウスとは異なり、感染中期において脳内のPrP^{Sc}の蓄積がほとんど検出されなかった。またヘテロ型マウスが感染末期に至るまでの経過は、野生型よりも約20日長いことも明らかとなった。現在、その詳細を解析中である。[原英之、萩原健一、山河芳夫、大内史子、花田賢太郎]

（８）血液のプロテオーム解析のための技術検討

血漿バイオマーカー探索のためのプロテオーム解析技術の検討を行い、抗体カラムによる常在タンパク質の一括除去や液相等電点電気泳動（IEF）による粗分画が有効であることを示してきた。今年度は粗分画した試料中のタンパク質を LC-MS で同定するにあたり、直接 LC-MS で分析する方法と再電気泳動で高度分離後に in-gel 酵素消化を行った試料を用いる GelC-MS 法を比較･検討した。その結果、いずれの方法でも血液中に 1 ng/μl 程度含まれるタンパク質を同定できたが、病態依存的に血中に漏出すると考えられるタンパク質群（～10 fg/μl）の解析には機器の高感度化と試料のさらなる濃縮が必要であった。[大内史子、萩原健一、山河芳夫]

（９）PrP^{Sc} の細胞間伝播に関与する宿主因子の探索

共培養条件下において ScN2a 細胞から N2a 細胞への PrP^{Sc} 細胞間伝播を検出するアッセイ系を用いて、伝播に関与する宿主因子の探索を行った。その結果、ARF ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質の構成的活性化型変異体の発現が PrP^{Sc} 細胞間伝播を抑制することを新たに見いだした。現在は、この宿主因子の PrP^{Sc} 細胞間伝播における作用機序の解析を行っている。[田中正彦、前濱朝彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎]

II. 感染症とオートファジーに関わる研究

（1）C型肝炎ウイルス(HCV)粒子産生におけるオートファジーの関与

HCV (JFH1 株)感染・粒子産生におけるオートファジーの関与について、オートファゴソーム膜形成に関わる鍵酵素 Atg7 および PI3 キナーゼ複合体のサブユニット Beclin1 に注目して解析をおこない、オートファジーは HCV 粒子のアセンブリあるいは放出に関与していることを示唆した。オートファジーを誘導する制御因子が HCV 産生に影響するかどうかを解析している。[谷田以誠、深澤征義、脇田隆宇（ウィルス第２部)、花田賢太郎]

（2）クロロキン処理によるオートファジーの HCV 複製の影響

クロロキンは細胞内酸性コンパートメントの酸性化を阻害することで、オートファジーによる分解を阻害する。HCV サブジェノミックレプリコン細胞にクロロキン処理をしたところ、HCV レプリコンの発現レベルが低下した。また、オートファジー関連因子 *ATG7*、*ATG5*、*LC3* のノックダウンをおこなったところ、同様に HCV レプリコンの発現量が低下していた。[水井智和・山科俊平・上野隆・木南英紀・渡辺純夫（順天堂大学）； 谷田以誠]

III. C型肝炎ウイルスに関する研究

（1）C型肝炎ウイルスに非感染性の Huh7.5.1 細胞変異株の分離と性状解析

HCV に感染できない宿主肝細胞変異株の分離を昨年度に引き続き行った。昨年度の検討から、我々のスクリーニング系では CD81 欠損株が高頻度に分離されることがわかっていたので、それを避けるために、CD81 を過剰発現下でスクリーニングを行うなどの工夫を行った。複数の HCV 非感染株が樹立され、そのうちの一つはタイトジャンクション分子の細胞内局在に異常が見られた。タイトジャンクション形成と HCV 感染との関連が強く示唆され、さらに解析を進めている。

[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎；西島正弘(医薬品食品衛生研)；鈴木哲朗・脇田隆宇（ウイルス第２部)]

（2）HCV の細胞間感染における Claudin1 の重要性

昨年度までの研究により、ヒト肝細胞株 Huh7.5.1 細胞より CD81 欠損株、Claudin1 欠損株を分離し、HCV に全く感染しないことを示した。今回、これらの細胞変異株を用い、HCV 感染した野生株との共培養を行い細胞-細胞間の感染性を調べたところ、CD81 欠損株では感染が見られたが Claudin1 欠損株では感染が見られなかった。以上より、Claudin1 は細胞-細胞間感染にも必須の因子であることが示された。[深澤征義、花田賢太郎；西島正弘(医薬品食品衛生研)；鈴木哲朗・脇田隆宇（ウイルス第２部)]

（3）高感染性 HCV-JFH1 亜株の分離

C型肝炎ウイルス(HCV)-JFH1 株由来の野生型ウイルスゲノム RNA を Huh7.5.1 細胞に導入することで野生型 HCV-JFH1 ウイルス粒子を作成し、これを非感染 Huh7.5.1 細胞に感染後、その培養上清を繰り返し Huh7.5.1 細胞に感染させた。この過程で、ウイルス感染能が 100 倍以上上昇した HCV-JFH1 亜株が分離された。ゲノム配列を調べた結果、2ヶ所に変異が見られた。コア蛋白質部分の K74T 変異、及び E2 部分の I414T 変異であった。このウイルス亜株は、蛋白質レベルでもウイルス感染の検出が容易であり、様々なウイルス感染実験に有用である。[深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎；村上裕子・深澤秀輔(生物活性物質部)、鈴木哲朗・脇田隆宇（ウイルス第２部)]

（4）Squalene synthase を標的とした C 型肝炎ウイルス産生阻害

我々は、コレステロール生合成系において squalene synthase (SQS) に着目し、その阻害剤、YM-53601 を用いて HCV の増殖過程におけるコレステロール生合成系の重要性について解析を行った。HCV (JFH1 株)をヒト肝癌由来 Huh7.5.1 細胞に感染させた後、無血清培地下で YM-53601 を添加したところ、ウイルス RNA の合成、ウイルス蛋白質の産生、培地へのウイルス粒子の放出が阻害された (IC_{50}: ～0.5μM)。YM-53601 の抗 HCV 効果は、コレステロールに富む低密度リポ蛋白質を感染細胞の培地に添加すると消失した。また、siRNA の導入により感染細胞の SQS 発現量を低下させると、同様の HCV 増殖阻害が認められた。以上の結果から、コレステロール生合成系が、培養細胞における HCV の増殖に重要であることが示唆された。恐らく、細胞内コレステロール（あるいはその代謝物）の量が HCV 産生に影響を与えているものと考えられた。また、SQS 阻害剤は抗 HCV 薬の候補になり得る可能性が考えられた。[齊藤恭子、花田賢太郎、深澤征義；鈴木哲朗・相崎英樹・脇田隆宇（ウイルス第２部)；西島正弘（医薬品食品衛生研）]

（5）C 型肝炎ウイルス NS4B 蛋白質安定発現細胞の作製

HCV の NS4B 蛋白質は、ウイルスの RNA 複製の場と考えられている membranous web という膜構造を誘導する蛋白質である。我々は、NS4B 蛋白質が membranous web を誘導する機構についての手がかりを得るために、同蛋白質に結合する細胞因子の同定を目指している。これまでのドキシサイクリン発現誘導系では NS4B 蛋白質の Huh7 細胞における発現が低く、細胞内での分布を確認できなかった。そこで、新たに NS4B 蛋白質の安定発現 Huh7 細胞

を作製したところ、十分な発現が得られ、web 様構造を確認できた。今後、この細胞を用いて同蛋白質に結合する細胞因子を生化学的に探索する。[齊藤恭子、深澤征義、大内史子、花田賢太郎]

（６）HCV 産生に PPARγアゴニストが与える影響

PPARγは多彩な機能をもつ転写因子であるが、その機能の一つに脂質代謝に関連する遺伝子群を制御することが挙げられる。HCV の産生において脂質代謝が重要な役割を果たしていることから、HCV と PPARγの関連について検討した。 Huh7.5.1 細胞を PPARγアゴニストで処理したところ、HCV(JFH1)の増殖が抑制された。しかしながら、HCV の増殖を抑制する濃度では当該薬剤による細胞毒性が起きており、PPARγアゴニストは HCV に対する抗ウイルス薬としては期待できないことが明らかになった。[熊谷圭悟、深澤征義、花田賢太郎]

Ⅳ．スフィンゴ脂質と細菌毒素に関する研究

（１）志賀毒素耐性遺伝子に関する研究

志賀毒素はスフィンゴ糖脂質 Gb3 を受容体として細胞内に侵入し、最終的に細胞死を引き起こす。以前、志賀毒素による細胞死に対し耐性を示す遺伝子として、GRINA truncate form (GRINA-C)及びこのホモログを同定しており、これらの過剰発現により志賀毒素受容体である糖脂質 Gb3 の低下を引き起こすこと、また Gb3 合成酵素の mRNA の低下は見られず、その作用点は転写以降であることをこれまで報告してきた。本年度さらにその詳細な作用機構解明を行ったところ、Gb3 合成酵素の蛋白レベルでの発現量が GRINA-C の発現により低下すること、その発現量はリソソーム酵素の阻害剤で元に戻ることを明らかにした。このことは GRINA-C の発現が Gb3 合成酵素の分解を促進していることを意味しており、糖転移酵素に関して mRNA 量に依らない新たな発現制御機構の可能性が示唆された。[山地俊之、花田賢太郎；西川喜代孝（同志社大・生命医科学）]

（２）レンチウイルス shRNA ライブラリーによる志賀毒素関連因子の探索

上記の発現クローニング法、及び以前報告した遺伝子トラップ法に加え、今回新たにレンチウイルスによる shRNA ライブラリーを用いて、志賀毒素関連因子の探索を行った。レンチウイルス shRNA ライブラリーを HeLa 細胞に導入した後、志賀毒素に対し耐性を示す細胞群を回収し、挿入されているヘアピン配列のシークエンスを行ったところ、その中に志賀毒素受容体 Gb3 の生合成に必須なグルコシルセラミド合成酵素の配列が含まれていた。このことはスクリーニング系が機能していることを示しており、志賀毒素のみならず他の病原体に対しても関連因子を同定するツールとして期待される。[山地俊之、花田賢太郎]

（３）セラミド輸送蛋白質 CERT のリン酸化状態の制御機構

細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理すると、セラミド輸送蛋白質 CERT の SR モチーフが脱リン酸化されて、CERT は活性化される。この現象はスフィンゴミエリン量を回復させるためのフィードバック機構であると理解されているが、詳細についてはよく分かっていない。本年度は、SR モチーフとは異なるリン酸化サイトを同定し、更に、そのサイトのリン酸化が SR モチーフのリン酸化状態に影響を及ぼしていることを明らかにした。CERT のリン酸化状態は幾つかのリン酸化サイトが相互に影響を及ぼし合いながら制御されていると考えられる。[熊谷圭悟、冨重斉生、花田賢太郎]

Ⅴ．細胞外環境変化を感知し応答する細胞内情報伝達システムの研究

（１） mTOR 活性化制御機構の解明

細胞は外環境の変化、特に栄養素状態を感知して、変化に応答した細胞機能の調節を行っている。mTOR は細胞の栄養素感知において重要な役割を担うキナーゼであるが、その活性制御機構には不明な点が多い。今回我々は遊離アミノ酸に応答して三量体型 GTP 結合タンパク質を介したホスホリパーゼ C の活性化および細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が起こること、また細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇が mTOR 活性化に必要であることを見いだした。現在は、GTP 結合タンパク質と共役していることが考えられる受容体の探索および Ca^{2+}の作用機序の解明を行っている。
[前濱朝彦、花田賢太郎]

Ⅵ．行政検査

プリオン行政検査（ウエスタンブロット法による確認検査）を行っているが、本年度は依頼がなかった。

Ⅶ．機器管理運営委員会機器の管理と運用

戸山庁舎の MALDI-飛行時間型質量分析機（Voyager-DE STR、AXIMA-QIT）の保守、運用を行った。機器の主たる利用者は、プロテオーム研究に携わる感染研（戸山庁舎・村山庁舎）の研究者であり、利用者に対しては試料の前処理法を含めた機器の操作法の説明・助言を行った。また、機器本体の消耗品の交換、トラブルへの迅速な対処とともに、プロテオーム研究に必須なデータベース検索ソフト・ハードウエアを整備・管理し、利用者にはソフ

トウエアの操作法について説明を講じた。なお、機器の使用時間（データベース検索のための使用時間を除く）は、約 47 時間 （Voyager-DE STR）および約 51 時間（AXIMA-QIT）であった。［大内史子、山河芳夫、萩原健一、花田賢太郎］

その他

（１）感染研パンデミック検査関連ワーキンググループによる新型インフルエンザ A/H1N1 パンデミック対応
［前濱朝彦］

（２）感染研パンデミック疫学関連ワーキンググループによる新型インフルエンザ A/H1N1 パンデミック対応
［谷田以誠］

（３）Interview-From Special Topics. *Science Watch*, Thomson Reuters, October, 2009.

トムソン・ロイター社の Essential Science Indicator という指標においてオートファジー研究で TOP10 にランクされたため、Science Watch 誌(Web Journal)でインタビューを受けた。
［谷田以誠］

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ．誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Fukuda S., Iwamaru Y., Imamura M., Masujin K., Shimizu Y., Matsuura Y., Shu Y., Kurachi M., Kasai K., Murayama Y., Onoe S., Hagiwara K., Sata T., Mohri S., Yokoyama T., Okada H.: Intraspecies transmission of L-type-like bovine spongiform encephalopathy detected in Japan. Microbiol. Immunol. 53, 704-707, 2009

2) Sato H., Kusumoto-Matsuo R., Ishii Y., Mori S., Nakahara T., Shinkai-Ouchi F., Kawana K., Fujii T., Taketani Y., Kanda T., Kukimoto I.: Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 387, 525-530, 2009

3) Ogawa M., Shinkai-Ouchi F., Matsutani M., Uchiyama T., Hagiwara K., Hanada K., Kurane I., Kishimoto T.: Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. Clin. Microbiol. Infect. 15, 239-240, 2009

4) Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., Suzuki T.: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. J. Virol. 83, 5137-5147, 2009

5) Tanida, I., Fukasawa, M., Ueno, T., Kominami, E., Wakita, T., Hanada, K.: Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. Autophagy 5, 937-945, 2009

6) Kasai, M., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Seki, S., Ikeda, T., Mizuochi, T.: Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. J. Immunol. 183, 7278-7285, 2009

7) Mizui, T., Yamashina, S., Tanida, I., Takei, Y., Ueno, T., Sakamoto, N., Ikejima, K., Kitamura, T., Enomoto, N., Sakai, T., Kominami, E., Watanabe, S.: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. J Gastroenterol. 45, 195-203, 2010

8) Fukasawa, M: Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle. Biol. Pharm. Bull. 33, 355-359, 2010

9) Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Mogi, C., Kimura, T., Kurose, H., Tomura, H., and Okajima, F.: Role of Rap1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid-induced migration by isoproterenol in glioma cells. Mol. Biol. Cell 20, 5156–5165, 2009

10) Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N., and Yamaji, T.: CERT-mediated trafficking of ceramide. Biochim. Biophys. Acta 1791, 684-691, 2009.

11) Momin, A. A., Park, H., Allegood, J. C., Leipelt, M., Kelly, S. L., Merrill, A. H. Jr., and Hanada, K.: Characterization of mutant serine palmitoyltransferase 1 in LY-B cells. Lipids 44, 725-732, 2009

12) Separovic, D., Kelekar, A., Nayak, A. K., Tarca, A.L., Hanada, K., Pierce, J. S., Bielawski, J.: Increased ceramide accumulation correlates with downregulation of the autophagy protein ATG-7 in MCF-7 cells sensitized to photodamage. Arch. Biochem. Biophys. 494, 101-105, 2010

13) Nakamura, H., Wakita, S., Sunagami, A., Tamura, Y., Hanada, K., and Murayama, T: Modulation of the activity of cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha) by cellular sphingolipids and inhibition of cPLA2alpha by sphingomyelin. J. Lipid Res. 51, 720-728, 2010

14) Kudo, N., Kumagai, K., Matsubara, R., Kobayashi, S., Hanada, K., Wakatsuki, S., Kato, R.: Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer. J. Mol. Biol. 396, 245-251, 2010

15) Mitsuki, M., Nara, K., Yamaji, T., Enomoto, A., Kanno, M., Yamaguchi, Y., Yamada, A., Waguri, S., and Hashimoto,

Y.: Siglec-7 mediates nonapoptotic cell death independently of its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in monocytic cell line U937. Glycobiology. 20, 395-402, 2010

16) Sugiki, T., Takahashi, H., Nagasu, M., Hanada, K., and Shimada, I.: Real-time assay method of lipid extraction activity. Anal. Biochem. In press

2. 和文発表

1) 萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎：ヒト・プリオン病--感染症としての変遷と新たな課題. ウイルス 59, 155-166, 2009

2) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナル、細胞工学、28, 760-764, 2009

3) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナルーmTOR 活性化の分子機構ー、アミノ酸研究、3, 5-14, 2009

Ⅱ. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Tanida, I.: Autophagy Basics -molecular mechanisms, functions, and dynamics International Conference on Autophagy and Cell Death, 2009. 7. 4. Tokyo, Japan.

2) Tanida, I.: Autophagy in Naive Hepatitis C Virus Production, 5th International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.

3) Ueno, T., Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Fujimura, T., Tanida, I., Furuya, N., Kominami, E.: Essential role of liver autophagy in maintaining blood glucose and plasma amino acids. 5th International Symposium on Autophagy. 2009. 9. 27. Shiga, Japan.

4) Tanida, I., Koike, M., Tada, N., Iwata, J., Ueno, T., Uchiyama, Y., Kominami, E., Hanada, K.: Visualization of GABARAP in mice. 49th Annual Meeting of American Society of Cell Biology, 2009.12.8. San Diego, U.S.A.

5) Aizaki, H., Yamamoto, M., Goto, K., Fukasawa, M., Hanada, K., Sato, S., Takahashi, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. :The role of the host membrane in the infectious HCV particle formation, 2009.9.9, Awaji, Japan,

6) Fukasawa, M., Shirasago, Y., Hanada, K., Suzuki, T., Wakita, T., Nishijima, M.: Isolation of Huh7.5.1 cell mutants resistant to hepatitis C virus infection, 16h International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2009.10.3-7, Nice, France,

7) Aizaki, H., Yamamoto, M., Goto, K., Fukasawa, M., Hanada, K., Sato, S., Takahashi, N., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T.: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, 16h International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, 2009.10.3-7

8) Hanada, K.: Regulation of CERT-mediated trafficking of ceramide, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), 2009, 5. 25-28, Tokyo, Japan

2. 国内学会

1）小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫：病原性の異なる*Orientia tsutsugamushi*の発現タンパク質の2次元電気泳動による比較・解析　第一報、第27回日本クラミジア研究会・第16回リケッチア研究会合同研究発表会、2009.11、東京

2）原英之、中村優子、萩原健一:Molecular mechanism for conformational change of PrP in prion infectivity. 日本分子生物学会　第32回年会、2009.12.9-12、横浜

3）小川基彦、大内史子、萩原健一、松谷峰之介、内山恒夫：病原性の異なる *Orientia tsutsugamushi* の発現タンパク質の 2 次元電気泳動による比較・解析、第 83 回日本細菌学会総会、2010.3.27-29、横浜

4）高木美幸、淺沼克彦、谷田以誠、児玉史子、浅尾りん、高原久嗣、多田昇弘、小松雅明、上野隆、木南英紀、富野康日己: ポドサイトにおける GABARAP の役割の検討、日本腎臓学会学術総会、2009.6.3、横浜

5）谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、上野隆、木南英紀、花田賢太郎:オートファジー関連遺伝子のノックダウンは HCV 粒子産生を抑制する。第 82 回日本生化学会大会、2009.10.23、神戸

6）谷田以誠、深澤征義、脇田隆字、花田賢太郎: オートファジーは HCV 粒子産生に関与している。第 57 回日本ウィルス学会学術集会、2009.10.25、東京

7）相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤慈子、高橋信弘、深澤 征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田 隆字、鈴木哲朗：HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009.10.27、東京

8）深澤征義、白砂圭崇、花田賢太郎、鈴木哲朗、脇田 隆字、西島正弘：C型肝炎ウイルスに感染しないHuh7細胞株の分離と性状解析、第82回日本生化学会大会大会、2009.10.24、神戸

9）齊藤恭子、鈴木哲朗、相崎英樹、花田賢太郎、脇田隆字、西島正弘、深澤征義：Squalene synthaseを標的としたC型肝炎ウイルス産生阻害、第82回日本生化学会大会、

2009.10.24、神戸

10) 田丸友裕、森裕美子、笠原優子、深澤征義、下遠野久美子、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦：HCV-RNA ポリメラーゼ阻害活性を有するスルホンアミド型フラーレン誘導体、創薬懇話会 2009、2009.12.10、岐阜

11) 白砂圭崇、齋藤恭子、村上 裕子、深澤秀輔、 鈴木哲朗、 脇田隆宇、花田賢太郎、西島正弘、深澤征義：C 型肝炎ウイルス JFH1 株変異体におけるウイルス産生の上昇、日本薬学会第 130 年会、2010.3.30、岡山

12) 前濱朝彦:細胞外環境の変化に応答した mTOR 活性調節機構の解析、第 8 回生命科学研究会、2009.6.26-27、神戸

13) 前濱朝彦：アミノ酸感知シグナルーmTOR 活性化の分子機構ー、日本アミノ酸学会第 3 回夏のシンポジウム、2009.7.19、筑紫野

14) 田中正彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎、仁科博史、前濱朝彦：共培養系を用いた高効率な PrP^{Sc} 伝播実験系の確立、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

15) 西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、鈴木聡：PTEN 結合分子 PICT1 の T 細胞分化における機能解析、第 71 回日本血液学会総会、2009.10.23-25、京都

16) 前濱朝彦:細胞外環境の変化に応答した mTORC1 活性調節機構の解析、第 4 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2009.11.13-14、熊本

17) 前濱朝彦：mTORC1 活性化の分子機構ーアミノ酸感知シグナルー、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12、横浜

18) 山地俊之、 西川喜代孝、 花田賢太郎： 志賀毒素耐性遺伝子の単離 第 29 回日本糖質学会年会、2009.9.9-11、高山

19) 山地俊之、西川喜代孝、花田賢太郎:志賀毒素耐性遺伝子の単離、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

20) 冨重斉生、熊谷圭悟、楠田潤、西島正弘、花田賢太郎：CKIgamma2 はセラミド輸送タンパク質を不活性化することでスフィンゴミエリン合成を負に制御する、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

21) 工藤紀雄、熊谷圭悟、松原亮介、小林修、花田賢太郎、若槻壮市、加藤龍一：脂質セラミド選別輸送タンパク質 CERT START ドメインと阻害剤 HPA の複合体の X 線結晶解析による脂質輸送機構の解明、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

22) 花田賢太郎、熊谷圭悟、冨重斉生:スフィンゴミエリン生合成におけるセラミド輸送をカゼインキナーゼⅠガンマ 2 は負に制御する、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.21-24、神戸

１１．昆虫医科学部

部長　小林　睦生

概要

平成 21 年，当該部の研究は，定員８名（部長を含む）以外に，客員研究員９名，協力研究員５名，流動研究員１名，研究生１名，実習生２名，臨時職員３名の協力で推進された。

研究内容としては，衛生昆虫類の媒介生態および分類に関しての研究が第１室と２室を中心に行われ，生理・生化学・遺伝学的研究に関しては，第２室および３室で行われた。1999 年に米国で初めて確認されたウエストナイル熱は，多種の媒介蚊と野鳥が関係して流行が起こることが知られており，我が国に分布するアカイエカ種群やヒトスジシマカの発生状況，スズメやカラスなどウイルスの著しい増殖がみられる野鳥の生息を考えると，このウイルスが我が国に侵入した場合に，大きな流行が起こることが予測される。一方，2005-2006 年にインド洋島嶼国，インド，スリランカなどで数百万人の患者が発生したチクングニヤ熱は，現在も東南アジアで流行が継続しており，ウイルスのエンベロープタンパク質の１アミノ酸が変異した株のヒトスジシマカ体内での増殖活性が 100 倍以上高まったことから，ヒトスジシマカが生息する我が国への本ウイルスの侵入が危惧されている。また，温暖化が感染症の流行や媒介動物の分布域拡大に影響することが，ヒトスジシマカの東北地方での分布域拡大に顕著に現れており，上記感染症が流行する可能性のあるリスク地域の拡大に注意が必要と考えられる。

日本脳炎ウイルス(JEV)の重要な媒介蚊であるコガタアカイエカは，成虫で越冬することが知られているが，どのような地域で，また，どのような環境で越冬するか全く分かっていない。　一方，一部のコガタアカイエカは毎年中国大陸から JEV を持って長距離を飛行してくると考えられており，それを示唆する結果が得られている。媒介蚊の長距離飛翔，ウイルスの侵入，国内での成虫越冬，ウイルスの越冬など未だに解決できない問題が多いが，多角的な調査から少しずつ解明されると期待している。コロモジラミが媒介する塹壕熱病原体が我が国の路上生活者に寄生しているコロモジラミから検出され，ネパールのスラムやストリートに生活する子供達のアタマジラミからも検出された。今後，我が国での塹壕熱の流行状況をより詳細に調査する必要がある。アタマジラミに関しては，全国規模でピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性の発達状況調査が行われており，ある県からの検体は全て抵抗性遺伝子を保有していることが明らかとなっている。より検体数を増やして全国的な抵抗性発達状況調査が必要である。

最近，トコジラミ（ナンキンムシ）が世界各地のホテル等で大きな問題となっている。現在のところ感染症の伝播には関わらないとされているが，夜間激しく吸血することが知られており，我が国の簡易宿舎，一般アパート，旅館，ホテルで吸血被害が報告されている。このような害虫が将来一般家屋に侵入する可能性も否定できず，殺虫剤抵抗性の発達状況を注意深くモニタリングする必要がある。昆虫医科学部では２種類の新規昆虫フラビウイルスの分離に成功し，衛生昆虫学の新しい分野をリードする研究業績を報告しており，内外からの期待も大きい。媒介昆虫類からの迅速な病原体の検出法の確立も進んでおり，全体として昆虫医科学部の調査・研究体制の強化も進んでいる。しかし，デング熱やチクングニヤ熱などの突発した流行に備えた防除対策の技術指導，抵抗性発達の管理，防除対策に関する技術移転などが出来る体制の構築も必須であり，地方自治体が必要としている地道な研究・調査が強く望まれている。少数精鋭でこれらの諸問題に対応し，我が国の感染症対策に貢献できる体制を構築したいと考えている。

業績

調査・研究

Ⅰ.　衛生昆虫の媒介生態・分類に関する研究

(1)渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査（徳島県那賀川流域）

徳島県那賀川流域の水田地帯で，2009 年５月－10 月に疾病媒介蚊調査を実施した。周辺環境の異なる６ヶ所を選び，各 2 台のドライアイストラップを設置して成虫の捕獲を行

った。合計 18 種類 5172 個体が捕獲された。コガタアカイエカが全体の 60%を占め，ついでアカイエカ群，カラツイエカ，ヒトスジシマカの順であった。カラツイエカの構成割合が全体の 10%とやや高いことが，過去に調べた出雲平野などの蚊相と異なっていた。水田地帯と丘陵地帯との境界に位置する溜池の周辺では，日向や日蔭の湿地発生性種と樹洞発生性種で構成される多様な蚊群集が形成されていた。［津田良夫・金京純］

(2)2009 年の東京地方の疾病媒介蚊の発生状況

国立感染症研究所構内で 2003 年より継続調査している疾病媒介蚊の捕獲個体数データ（過去 7 年間）を分析した。ヒトスジシマカの 2009 年の捕獲総数は 264 で，過去 5 年間の平均捕獲個体数の 62%に相当し，レベル２：平年よりも低い（50-90%）状態であった。アカイエカ群の捕獲総数は 120 個体で，5 年間の平均捕獲個体数（361±206）のわずか 33%にすぎず，平年よりもはるかに低いレベル１：（＜50%）の発生量であった。　ヒトスジシマカの発生はシーズン初期の環境条件に左右されやすく，アカイエカ群の発生は 6，7 月の環境条件に大きく影響されることが示唆された。［津田良夫，林利彦，倉橋弘，主藤千枝子］

(3)コガタアカイエカの集団飛来と越冬に関する研究（2008 年秋-2009 年春の調査結果）

2007 年 9 月～12 月に休眠前のコガタアカイエカが多数飛来した東京都の都市域にある公園で，2008 年秋にも同様の集団飛来が観察された。飛来個体数は 2007 年よりも 2008 年の方が常に高く，最高密度は 1 時間あたり 3，740 個体で 2007 年の 3.5 倍であった。卵巣の形態観察の結果，飛来成虫の 96.5%　(222/230)は繁殖休眠の状態であった。2009 年 3，4 月に，合計 211 雌（内 4 個体は吸血個体）の越冬覚醒したコガタアカイエカが捕獲された。吸血蚊の吸血源動物を同定した結果，2 個体はヒト，1 個体はネコを吸血していたと推定された。［津田良夫・金京純］

(4)彦根－近江八幡の水田地帯における水田発生性蚊幼虫の発生状況調査

彦根市街地の南西に流れる犬上川の下流から上流に沿って，湖岸から内陸丘陵地の裾まで約 10km の範囲を対象にした現地調査を行った。 7 ヶ所の採集場所を選定し，各 10 枚の水田をランダムに選んで，１水田から柄杓 30 杯当たり幼虫数を記録した。幼虫発生が確認された水田の比率は，上流部で 80%，中流域では 30～40%，湖岸に最も近い下流域では調査した 30 枚の水田のうち１ヶ所の水田で幼虫が採集された。水田発生性蚊の繁殖シーズンの初期には幼虫の分布にかなり大きな偏りがあることがわかった。［津田良夫，金京純］

(5)釧路湿原における疾病媒介蚊調査

釧路市動物園および釧路湿原野生生物保護センターで疾病媒介蚊の調査を行った。ドライアイストラップ採集によって合計 16 種類 4545 個体が捕獲された。エゾヤブカが最も多く全体の 54%を占めていた。ついでヤマトハボシカ，キンイロヤブカ，ミスジハボシカの順であった。最も多く吸血蚊が捕獲されたのはエゾヤブカで，138 個体であった。half gravid や gravid のようにある程度消化が進み，卵形成が進行中の個体が 29 個体（21%）捕獲されていることから，吸血後の休息場所として植物が利用されていると推察された。2008 年 7 月末の採集結果に比べ 2009 年の捕獲個体数は約 5.7 倍であり，捕獲個体数は非常に多かった。［津田良夫，金京 純］

(6)渡り鳥飛来地で採集された蚊の吸血源動物と鳥マラリア原虫の感染状況（東京港野鳥公園）

東京港野鳥公園で 2007 年に実施した疾病媒介蚊の定期調査で，アカイエカ群を主とする 7 種の蚊が採集された。40 個体の吸血蚊の吸血源動物を同定したところ，アカイエカは 95%が鳥から吸血していたのに対して，ヒトスジシマカはすべて哺乳動物から吸血していた。アカイエカの吸血個体の 65%とアカイエカ未吸血蚊（MIR=29.9）とチカイエカ未吸血蚊（MIR=13.5）から鳥マラリア原虫遺伝子が検出された。さらに 1 個体のトラフカクイカ（未吸血）からも原虫遺伝子が検出された。検出された鳥マラリア原虫は相互に 0.21～5.86%異なる 5 つに区別された。［津田良夫，金京純］

(7) 我が国におけるマラリア媒介蚊の分布・分類の再検討と医学上重要な疾病媒介蚊の分子分類システムの構築

現地調査によってわが国でこれまで報告されている 12 種のハマダラカのうち 6 種類の分布が確認された。かつて北

海道においてはシナハマダラカの分布は西部に限られていたが，2004 年以来継続して調査している釧路湿原では，形態分類によってシナハマダラカと同定されるハマダラカが採集された。マラリア媒介蚊以外の疾病媒介蚊についても，イエカ類とシマカ類についてrDNAのITS領域の塩基配列から種特異的なプライマーを設計し，検出感度の検討を行った結果，感度の良いプライマーが作成できた。［沢辺京子，金　京純；當間孝子（琉球大），比嘉由紀子（長崎大・熱研）］

(8)岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査

2009 年 8-10 月，岩手県盛岡市，花巻市，奥州市，一関市，大船渡市，釜石市，宮古市，住田町，大槌町，山田町の計 99 地点で，古タイヤなどの溜まり水に生息している蚊幼虫を採集し，ヒトスジシマカの分布を調査した。同蚊の分布が確認された 26 地点の日平均気温の年平均は 10.8℃以上であった。　盛岡市内では 2003 年に初めてヒトスジシマカが確認された後，定着が認められなかった 2009 年幼虫が確認された。また，花巻市では 2007 年から３年連続して同蚊が確認されている事から，既に定着していると考えられる。

［二瓶直子，小林睦生；佐藤　卓，松本文雄，安部隆司（岩手県環境保健センター・地球科学部）］

(9)コガタアカイエカの成虫密度の極端な地域差と冬期温度条件との関係

コガタアカイエカは一般に関東以西では個体群密度が高いが，東北，北海道では分布は確認されるものの，密度が低く，極端な地域差が存在する。CDC 型のライトトラップとブラックライト型のトラップを用いて，牛舎および豚舎で蚊の捕集を行い，各捕集場所における１晩，トラップ当りの平均捕集数を算出した。それらの平均値と冬期の温度との関係を調べたところ，１月の最低気温の平均，冬期３ヶ月の最低気温の平均にある程度の相関が認められた。１ｋｍメッシュ気候図を種々の１月の最低気温によって作成したところ，冬期に越冬が可能と考えられる地域では捕集数が多い傾向が認められた。今後，詳細に冬期の温度条件と越冬可能性に関して検討する予定である。

［小林睦生，駒形　修，森林敦子，鍬田龍星，金　京純，斉藤一三，渡辺　護，沢辺京子，津田良夫，二瓶直子；米島万有子（立命館大）］

(10)都市部公園におけるヒトスジシマカの潜み場所に関する予備調査

公園や墓地などヒトスジシマカが生息している環境において，ある一定の時間捕虫網で吸血飛来してきたヒトスジシマカを捕集する方法「８分間ヒト囮法」で密度の評価を行った。その結果，小さな公園であっても，８分間で 10 頭以上捕集される環境から 0 頭の環境まで存在することが明らかとなった。そこで，同蚊が潜んでいる植生がどのような種類か明らかにするために，灌木に蚊帳(2×2.5×1.9m)を被せてその中の蚊を捕集した。その結果，ユキヤナギとアベリアからの平均捕集数が多い傾向が認められた。ヒトスジシマカは，公園内や周年の雨水枡で発生し，植生の中に潜んで吸血源動物を待つタイプの蚊である。これらの潜み場所の環境がより明らかになれば，防除対策を行う場合に効果的に駆除できると考えられる。

［小林睦生，二瓶直子；平良常弘，米正静男（西宮市環境衛生），吉田政弘（いきもの研究社)］

(11)ヒトスジシマカを中心とした蚊防除法の検討

調査対象の公園内および周辺の幼虫発生源である雨水枡に昆虫発育制御剤(IGR)を投入し，その防除効果を８分間ヒト囮法で評価した。その結果，幼虫防除を行って成虫の発生を抑えたにも関わらず，ヒト囮法での捕集数には顕著な減少が認められなかった。これは，その公園に潜んでいる蚊が相当広範囲から飛来して，植生に潜んでいる可能性を示唆している。次年度は，公園周辺 150m の幼虫発生源を薬剤で処理し，同様の評価を行い，ヒトスジシマカの防除対象地域の範囲を明らかにする予定である。

［小林睦生，二瓶直子；　吉田政弘（いきもの研究社)，平良常弘，米正静男（西宮市環境衛生)］

(12)本州における元マラリア常在地のマラリア媒介蚊発生状況調査

土着マラリアが多発した本州マラリア５県における媒介蚊の調査を，昨年に引き続き行った。今年度は滋賀県，福井県，石川県の湿地や牛舎などで，成虫と幼虫を採集した。資料の収集および関係者への聞き込みにより過去の捕集成績を調べた。現在では，ハマダラカは福井県・石川県ではごく少数しか採集できず，シナハマダラカのみが採集さ

れた。一方滋賀県ではハマダラカは 5 月から 10 月まで採集された。その他にはチョウセンハマダラカが採集された。これらの蚊について季節消長を追跡した。

[渡辺　譲, 二瓶直子, 津田良夫, 小林睦生； 米島万有子, 中谷友樹（立命館大）]

(13)景観解析によるコガタアカエイカおよびハマダラカ捕集数の地域差の検討

水田耕作などの人為的水管理が実施されていないコガタアカイエカ・ハマダラカ発生源における季節消長を把握するため, 滋賀県琵琶湖湖東地域の内湖や河川周辺の湿地帯において, 蚊相を調査した。成虫の捕集数と土地利用などの環境要因の関係を空間解析した。琵琶湖湖東地域においては, コガタアカイエカの捕集数は半径 2km 圏内, シナハマダラカでは半径 500m 圏内の土地利用が分布と関係していることが分かり, 地域内の蚊の捕集数の予測図を作成した。

[渡辺　譲, 二瓶直子, 津田良夫, 小林睦生； 米島万有子, 中谷友樹（立命館大）]

(14)山形市におけるヒトスジシマカの定着と他のヤブカとの種間競争

山形市の一部で 2000 年にはじめてヒトスジシマカの侵入が確認され, 2002 年には山形市内の広域で定着が確認された。在来種のヤマトヤブカと外来種のヒトスジシマカの種間競争の状況を, 環境条件から見て境界領域で観察するため, 2009 年 8 月山形市およびその周辺の寺院, 墓地や放置古タイヤで幼虫の生息調査を行った。2 種の生息場所の特徴を, 地理情報システムや日本の人工衛星「ALOS だいち」の画像を用いて検討している。

[駒形　修, 小林睦生, 二瓶直子, 斉藤一三； 望月貫一郎(パスコ)]

(15)大阪府周辺におけるセアカゴケグモ咬症被害の把握

1996 年に大阪府で輸入毒グモであるセアカゴケグモの定着が確認されて以来, 近畿地方の諸府県では分布が拡大しただけでなく, 中国・九州地方の港湾地域や新興住宅団地にも拡大している状況が報告されるようになった。特に大阪府においては, 侵入定着の古い市町にセアカゴケグモの咬症が増加している。　個人情報保護法の制定以降, 把握しにくくなった咬症実態に関して調査を行った。

[小林睦生, 二瓶直子, 駒形　修； 吉田政弘（いきもの研究社), 金田弘幸（パスコ）]

(16)国産陸域観測技術衛星 ALOS「だいち」を用いた感染症監視体制整備のための基礎研究

国産陸域観測技術衛星 ALOS「だいち」の利用に関する独立行政法人宇宙航空研究開発機構 JAXA と本研究所の共同研究契約に基づいて, 感染症監視における ALOS の衛星の利用を検討している。本年は主に中国長江周辺の日本住血吸虫症浸淫地を地域区分し, また温暖化による同症の拡散の状況を GIS やデジタルマップを用いて検討していた。その他ヒトスジシマカの分布解析における利用についても検討した。

[二瓶直子, 小林睦生, 駒形　修； 太田伸生(東京医歯大), 斎藤康秀(麻布大), 望月貫一郎(パスコ)]

(17)無弁翅ハエ類の分類学的研究

フィジー, ニューギニア産フンコバエ, *Opalimosina* 属の 1 新種を記載した。また台湾産 *Crumomyia* 属の 1 新種を記載し, 日本産未記録種を報告した。*Opalimosina* 属は南太平洋地域では未知の属であった。また, *Crumomyia* 属は台湾から初めて記録された。中国産フンコバエの *Sphaerocera* 属とミギワバエの *Cavatorella* 属を調べ, 報告した。[林　利彦; Junhua Zhang, Hui Dong, Ding Yang（中国農業大学)]

Ⅱ. 衛生昆虫類の生理・生化学・遺伝学的研究

1. 節足動物からの病原体検出

(1)　平成 20 年国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と系統解析

2008 年 6～9 月にかけて 1 都 11 県の養豚場を含む畜舎とその周辺でコガタアカイエカの捕集調査を行った。その結果, 例年ブタの JEV 抗体陽性保有率の高い静岡, 長崎, 鹿児島県で捕集されたコガタアカイエカからは高率に JEV が分離された（プール陽性率 6.3－16.7%)。分離株のゲノム中の E 領域の遺伝子配列を解析した結果, 分離株はすべて 1 型に属し, 近年, 東アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であった。また, 3'非翻訳領域(UTR)の可変領域にいくつかの特徴的な配列欠損も認められた。E および

3'UTR 領域の遺伝子解析から，2007 年分離株はアミノ酸レベルで新たな変異が認められたものの，2008 年の分離株は 2007 年よりもむしろ 2006 年以前の分離株に近縁であることが示唆された。今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況を把握し，分離株の遺伝子解析を継続する必要がある。

［鍬田龍星，伊澤晴彦，佐々木年則，星野啓太，金京純，津田良夫，小林睦生，沢辺京子； 梁瀬徹，白藤浩明，今田忠男（動物衛生研究所九州支所）；奥薗義美，山崎嘉都夫，内村江利子（鹿児島県南薩家畜保健衛生所）；足立諭（静岡県環境衛生科学研究所）；小川智子（千葉衛生研究所）；佐山勇輔（東北大学）；中村憲夫（安房健康福祉センター）；比嘉由紀子，前川芳秀，川田均，高木正洋（長崎大・熱研）；高崎智彦，小滝徹，倉根一郎（ウイルス第 1 部）］

（2）国内外における蚊媒介性ウイルスの RDV 法による網羅的探索

2006－2008 年の 3 年間にベトナム全土的に捕集された蚊（合計 5 属 16 種 13, 452 個体）から 4 種類の既知のウイルス（日本脳炎ウイルス，ナムディンウイルス，バンナウイルス，*Culex* flavivirus）が分離された。細胞変性効果が確認されたがウイルス種の同定ができなかった蚊プールに対して，RDV 法（Rapid determination system of viral RNA sequence）を用いて蚊由来感染性因子の特定を試みた。次いで，同様の方法で 2006 年捕集の秋田県捕集のアカイエカから分離された未同定検体を解析した結果，感染特異的な遺伝子断片が複数得られ，その遺伝子配列を BLAST により検索したところ，新規の RNA ウイルスであることが判明した。

［伊澤晴彦，鍬田龍星，星野啓太，佐々木年則，津田良夫，矢野和彦，斉藤一三，小林睦生，沢辺京子； 酒井宏治（動物管理室）；渡辺俊平（東京大）；水谷哲也（ウイルス第 1 部）；佐藤朝光，西村美保（福岡大）；Nguyen Thi Yen， Phan Thi Nga（ベトナム国立衛生疫学研究所）；比嘉由紀子，高木正洋（長崎大・熱研）］

（3）国内捕集コガタアカイエカからの新規ウイルスの分離

国内各所で捕集したコガタアカイエカから日本脳炎ウイルス（JEV）の分離と遺伝子解析を 2005 年より継続して行っている。2008 年千葉県および鹿児島県の豚舎周辺で捕集されたコガタアカイエカの各プール検体の中に，蚊由来培養細胞 C6/36 に対して標準的な JEV とな異なる細胞変性効果が観察された検体が複数見られた。JEV 特異的なリアルタイム RT-PCR およびフラビウイルス汎用プライマーを用いて遺伝子検出を試みたがウイルス種の同定はできなかった。しかし，RT-PCR で得られた非特異的増幅産物の解析から，この増幅産物の塩基配列はラブドウイルス科に属するウイルスの L 遺伝子の一部と類似性があることが分かった。現在詳細な性状解析，ならびに遺伝子解析を行っている。

［鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，金京純，津田良夫，佐々木年則，小林睦生，沢辺京子； 梁瀬徹，白藤浩明，今田忠男（動物衛生研究所九州支所）］

（4）本邦産ヒトスジシマカ由来新規フラビウイルスの分離と性状解析

我々はこれまでに，西ナイルウイルス（WNV）の国内への侵入監視を目的として，本邦産野外捕集蚊を対象としたフラビウイルスの分離および検出を行ってきた。この調査過程において，ヒトスジシマカの磨砕液を蚊由来培養細胞 C6/36 に接種した際に細胞変性効果を観察し，その継代培養上清から RT-PCR により新規フラビウイルスの存在を確認した。本ウイルスは国内の他の地域で捕集されたヒトスジシマカおよびヤマダシマカから分離されたことから，*Aedes* flavivirus（AEFV）と命名した。ウイルス学的性状解析および遺伝子構造解析から，AEFV は WNV や日本脳炎ウイルス等の蚊媒介性フラビウイルスとは遠縁の昆虫フラビウイルスであり，ヤブカ属蚊類に特異性の高い新規ウイルスであることが明らかになった。

［星野啓太，伊澤晴彦，津田良夫，沢辺京子，小林睦生］

(5) 川崎市内での蚊捕集調査ならびに蚊集団における鳥マラリア原虫の保有状況

現在までのところ，国内での西ナイルウイルス（WNV）の存在は確認されていない。しかし，鳥マラリア原虫のようにヒトへの病原性のない鳥類由来病原体の発生動向を知ることは，本ウイルスの国内への侵入・定着および流行のリスクを予想する手段として有効であると考えられる。そこで，川崎市内で実施した蚊の捕集調査からその種構成，次いで，それら集団における鳥マラリア原虫の保有状況を

調査した。4～8 月の調査期間を通してヒトスジシマカの捕集数は最も多く（全体の 54%），次いでアカイエカ（22%），チカイエカ（14%），その他 3 種類（10%）であった。鳥マラリア原虫はアカイエカ（3 頭）とキンパラナガハシカ（1 頭）から検出されたことから，両種が鳥類吸血性であることが示唆された。

［平尾邦道，糸山　亨（明治大），鍬田龍星，伊澤晴彦，金京純，津田良夫，葛西真治，小林睦生，沢辺京子］

2. 生理学的基礎研究

（1）コガタアカイエカの脂質含量と脂肪酸組成

国内での日本脳炎ウイルスの伝搬と感染様式を考える上で，主要な媒介種であるコガタアカイエカの越冬生理を知ることが重要である。2007 年 9 月下旬にコガタアカイエカが東京都目黒区内の公園に突如として大量に飛来し，その現象は 2008 年も観察された。そこで，それら飛来個体の脂質含量と脂肪酸組成の季節変動を調べた。9 月下旬の飛来個体の体重に占める脂肪量は 10%以下であったが，その後脂質含量は徐々に増加した（10 月は>20%，11 月は>30%）。それらの脂肪酸組成中パルミトオレイン産含量は常に高い値であった（40－50%）。この数値は 2 月の越冬中のアカイエカとほぼ同じであったことから，コガタアカイエカの越冬ならびに長距離飛翔の可能性が示唆された。

［森林敦子，沢辺京子，金京純，津田良夫，小林睦生］

(2) アカイエカ吸血個体の飛翔距離に関する知見

2008 年夏大阪城公園において，土管内で休息している吸血後のアカイエカを多数見出した。それらの多くは哺乳類（ヒト 44.4%，ネコ 37%）を吸血しており，鳥類（ハシブトガラス，スズメ）を吸血していた個体は 20%であった。本結果は 2003-2006 年に実施した国内主要都市の住宅地で捕集される蚊の吸血源動物種の推定結果（アカイエカは鳥類と哺乳類の両者を同程度に吸血した）とは大きく異なるものであるが，本種蚊の吸血嗜好の柔軟性が表れた結果であると思われた。また，約 4km 離れた場所の動物園に展示されている動物由来の遺伝子配列が得られたことから，吸血後のアカイエカの飛翔距離は従来の推定値である 1－2km よりもさらに長距離の飛翔が可能であることが示唆された。

［沢辺京子，平尾邦道，小林睦生；吉田政弘，山下敏夫（いきもの研究社）］

（3）オオクロヤブカ由来細胞障害性因子

蚊の溶血因子については，デング熱ウイルスの媒介蚊ネッタイシマカにおいて古くから研究され，報告されている。しかしながら，分子レベルでの特徴付けまではなされていない現状である。そこで，今回，日本脳炎ウイルス媒介蚊として近年報告されたオオクロヤブカ体液由来細胞障害性因子（溶血因子）について，分子レベルでの特徴付けを行った。

[佐々木年則，小林睦生；平岡　毅（東京農工大）]

(4) 我が国におけるマラリア媒介蚊の分布と分類に関する系統学的研究

国内における最近のハマダラカ属蚊の分布状況を把握することを目的として，2001 年より国内各地でハマダラカの調査を行った。得られた個体のリボソーム DNA Internal Transcribed（ITS）2 領域の部分配列情報をもとに系統解析を行い，2001～2003 年時点で北海道にはオオツルハマダラカ，エセシナハマダラカ，エンガルハマダラカの分布が確認されたが，1970 年代に生息していたシナハマダラカの存在は確認できなかった。しかし，2004～2009 年に釧路湿原で捕集された個体の外部形態の特徴はシナハマダラカであったが，遺伝子解析の結果，2005 年韓国で新たに報告された *Anopheles belenrae*（Rueda，2005）に最も近縁であるハマダラカが定着していることが示唆された。また，シナハマダラカの重要な鑑別点である Cu2 脈末端の縁飾明斑を欠く個体が 10%存在することがあきらかになった。

［沢辺京子，金京純，津田良夫，渡辺護，斉藤一三，二瓶直子，小林睦生］

3．衛生害虫の殺虫剤抵抗性のモニタリング，遺伝学的，分子生物学的解析

(1) アタマジラミの駆除剤抵抗性遺伝子の頻度分布に関する研究

2009 年度に国内より収集した 110 コロニー，276 個体のアタマジラミについて，駆除薬スミスリン抵抗性遺伝子

(*kdr*)のジェノタイピングを行った。その結果，抵抗性コロニー率は 10.0%であった。2006 年より始めた調査結果を 4 年間通算すると，抵抗性コロニー率は 8.5%（30 都道府県由来の 519 コロニーのうち）であり，抵抗性の年次増加傾向も示された。自治体によっては抵抗性率が全国平均から高低それぞれに大きく隔たっているケースも認められ，特に沖縄県内で採取されたアタマジラミについては 9 コロニーすべてが抵抗性遺伝子を保有していた。このような地域においては駆除薬がほとんど効果を示さないと考えられることから，新たな薬剤の開発が望まれる。

［葛西真治，駒形修，小林睦生，冨田隆史］

(2) 疾病媒介蚊野外個体群の殺虫剤感受性と薬剤作用点のジェノタイピング

ネッタイシマカのシンガポール系，ネッタイイエカのシンガポール系，ヨハネスブルグ系，ケニヤ系についてピレスロイド剤および有機リン系殺虫剤数種に対する感受性を幼虫と成虫についてそれぞれ調べ，半数致死薬量を算出した。シンガポールのネッタイシマカおよびネッタイイエカがペルメトリンに高い抵抗性を示した。また，強い抵抗性が認められた個体群については解毒酵素の関与を調べる目的で，阻害剤 PBO を用いた共力試験を行い，抵抗性機構としてシトクロム P450 酸化酵素が関与していることを明らかにした。さらに作用点ナトリウムチャネルの遺伝子解析を行った結果，両個体群ともほぼ 100%の割合で抵抗性型の遺伝子（*kdr*）を有していることが明らかになった。

［葛西真治，駒形修，小林睦生，冨田隆史］

(3) 疾病媒介蚊の室内淘汰によるピレスロイド抵抗性系統の確立

抵抗性機構解明に有用なモデル系統確立のために，成虫の殺虫剤淘汰を行った。各世代羽化後まもなく未交尾個体を雌雄に分け，1000 匹程度について一匹ずつ局所施用し薬剤選抜を行った。ネッタイシマカのシンガポール系（5 世代），ネッタイイエカのシンガポール系（4 世代），ケニヤ系（3 世代）について淘汰を行った結果，最終的に 100－400 倍の抵抗性を示す系統を確立することに成功した。このレベルはこれまで世界的に報告された成虫の抵抗性と比べてもトップクラスの値であり，今後の抵抗性機構研究に有益な材料となる。

［葛西真治，駒形修，小林睦生，冨田隆史］

(4) ピレスロイド抵抗性ネッタイシマカのペルメトリン代謝様式

ネッタイシマカシンガポール系は，室内淘汰の結果ペルメトリンに 457 倍の抵抗性を示す。本系統の抵抗性機構を明らかにするために，放射性同位体で標識したペルメトリンを用いた *in vitro* 代謝試験を行った。その結果，シンガポール系統の代謝活性は感受性系統の 3 倍以上であり，体内でペルメトリンを速やかに解毒し，排泄していることが明らかになった。また，解毒様式としてはシトクロム P450 酸化酵素による水酸化に加え，それをさらにタンパクもしくは糖と抱合し，体外へ排出する系が含まれていることも明らかになった。この抱合を担う酵素は今後，新たな殺虫剤のターゲットとなる可能性を秘めている。

［葛西真治，駒形 修，小林睦生，冨田隆史］

(5) ヒトスジシマカから世界で初めて検出された *kdr* 遺伝子

ヒトスジシマカはチクングニヤ熱の主要な媒介蚊であり，デング熱の媒介にも関与する。シンガポールで採集した個体群について，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変異の有無を調査した。これまでに他種蚊の抵抗性個体からアミノ酸変異が見つかっている 1011I, 1014L, 1016V, 1269F について調べたところ，1269F が薬剤非感受性型のシトシンへと変異した遺伝子が高頻度(73%)で見つかった。これまでヒトスジシマカからノックダウン抵抗性遺伝子(*kdr*)が確認された例は世界的にもない。今後，この抵抗性遺伝子を有する本種蚊が世界的に拡散すれば，防除が一層困難になるばかりでなく，チクングニヤ熱やデング熱対策にも影響が及ぶことが危惧される。

［葛西真治，駒形修，小林睦生，冨田隆史］

(6) ピレスロイド抵抗性アカイエカ種群蚊の *kdr* 頻度

東京都新宿区落合および戸山(都市緑地)と神奈川県横浜市（住宅街）に生息するおけるアカイエカ種群蚊の *kdr* 変異の頻度を調べた。遺伝子数に対する *kdr* 頻度は，チカイエカは落合 38%，落合 67%，横浜 0%，アカイエカは，

戸山 8%，横浜市 8%であった。落合ではアカイエカは採集できなかった。専門業者による防除が行われる大型建築の多い都市部ではチカイエカの *kdr* 頻度は高いが，そうした建造物の少ない住宅地では極めて低く，一方，アカイエカでは *kdr* 頻度は低いが広まっている可能性があることを示した。

［駒形 修，葛西真治，糸川健太郎，小林睦生，冨田隆史］

(7) ピレスロイド抵抗性トコジラミの作用点遺伝子のジェノタイピング

日本産トコジラミでピレスロイド抵抗性と唯一明らかにされている富山衛研コロニー（2001 年富山県内採集に由来）を使い，ピレスロイド作用点であるナトリウムチャンネル(VSSC)遺伝子のジェノタイピングを行った。対象とした変異は，近年，全米的に分布し抵抗性要因として強く疑われている V419L と L925I アミノ酸置換変異である。同コロニーは野生型遺伝子のみを保有していたため，そのピレスロイド抵抗性は別座位の変異または解毒代謝の増大により生じている可能性が示された。

［冨田隆史，葛西真治，駒形修，渡辺 護，小林睦生］

(8) 殺虫剤抵抗性に連鎖するネッタイシマカの *Cyp9m10* 遺伝子重複ハプロタイプ

ネッタイシマカのピレスロイド抵抗性 JPal-per 系統では，１つのシトクロム P450 遺伝子 *Cyp9m10* が，２倍に重複していると共に，殺虫剤感受性系統(S)に比べ終齢幼虫期に 264 倍過剰発現している。本系統と S 系統の交雑で得た *F1* を S 系統で戻し交配して得た *BC1* 世代終齢幼虫に対し，*F1* 世代と S 系統を識別可能なペリメトリン濃度で殺虫試験を行った結果，JPal-per 系統に由来する *Cyp9m10* 遺伝子重複ハプロタイプは，ピレスロイド抵抗性と遺伝学的に強固に連鎖していることを明らかにした。

［糸川健太郎，葛西真治，駒形修，冨田隆史］

(9) *Cyp9m10* 遺伝子の構造解析(2)

JPal-per 系統の *Cyp9m10* 遺伝子は約 100 kb の増幅単位に含まれて倍化しており，*Cyp9m10* 遺伝子とその転写開始点より 160 塩基上流に挿入された 670 塩基長の *CuRE1* と名付けた MITE 族転移因子を含む約 3 kb の配列は，２つの増幅単位の間で完全に一致していた。一方，殺虫剤感受性系統に比べ 40 倍過剰発現する JHB-NIID-B 系統では，*Cyp9m10* とその隣接域に，先述の 3 kb とほぼ一致する配列を有していた。２系統間で共通する *CuRE1* 挿入が *Cyp9m10* 遺伝子過剰発現の主要因である可能性が示された。

［糸川健太郎，駒形 修，葛西真治，冨田隆史］

(10) ネッタイイエカ集団に遍在する *Cyp9m10* 遺伝子の過剰発現ハプロタイプ

ネッタイイエカ JPal-per 系統は 1981 年のサウジアラビアでの採集に由来するピレスロイド抵抗性系統である。ピレスロイド代謝性を有する *Cyp9m10*（酸化酵素であるシトクロム P450 の１つ）がシス作用性変異により過剰発現することが，幼虫期の同剤抵抗性の主要因として強く疑われている。分子ジェノタイピングにより，本系統の *Cyp9m10* 遺伝子構造に示される「転移因子配列が遺伝子上流域に挿入され，遺伝子重複により倍化したハプロタイプ」が，ケニア，シンガポール，ベトナムの集団中にも存在することを確認した。

［糸川健太郎，葛西真治，駒形 修，沢辺京子，冨田隆史，川田均（長崎大・熱研）］

(11)液化炭酸ガス製剤のヒトスジシマカに対する野外での効力評価

デング熱およびチクングニヤ熱媒介蚊対策を目的として，フェノトリンを 1%含有する液化炭酸ガス製剤のヒトスジシマカ成虫に対する野外試験を 2009 年 8 月および 9 月に沼津市内で行った。処理前，後の成虫密度を，捕虫網を用いた 8 分間採集法で比較した。その結果，試験時のヒトスジシマカの生息密度や実験場所の環境条件などにより効果に差が認められたものの，フェノトリン含有の液化炭酸ガス製剤はヒトスジシマカ成虫に対して一定の防除効果が期待できると判断された。

[皆川恵子，数間亨，武藤敦彦，橋本知幸，小泉智子（日本環境衛生センター）；芳村健治（日本液炭）；池田文明，渡辺登志也（日本防疫殺虫剤協会）；葛西真治，小林睦生]

レファレンス業務

衛生動物同定検査報告

平成 21 年 4 月から平成 22 年 3 月までの間，25 件 155 個

体の昆虫・ダニ等の同定依頼を受けた。多くの個体は双翅目昆虫（ハエ，カ，チョウバエ，ヌカカ等）であった。ヒトへの被害例ではタカサゴキララマダニ, シュルツェマダニ，ヤマトマダニの咬着例が各 1 例，イエダニ，トコジラミ２例，ケジラミ，ヒロズキンバエによるハエ幼虫症，海外からの輸入例ではアフリカ, 中米からのスナノミ症が各 1 例，アフリカからのヒトクイバエ幼虫寄生例があった。依頼者は大学，医療機関，公的研究機関，民間企業，個人等であった。［林　利彦，津田良夫，栗原　毅］

研修業務

(1)沢辺京子. 節足動物媒介性感染症に関する最近の知見. 医師卒後臨床研修プログラム，2009 年 12 月 14 日．感染研.

(2)冨田隆史．アタマジラミの駆除剤抵抗性とその対策，相模原市保健所研修会，2009 年 5 月 25 日，相模原市.

(3)津田良夫．蚊の分類実習．日本環境衛生センター平成 21 年度疾病媒介蚊防除対策実技講習．2009 年 7 月 31 日．川崎市.

(4)小林睦生．今私たちが直面している課題，第 4 回国家機関技術「海洋地球観測探査システム」フォーラム，2009 年 11 月 4 日，東京.

(5)小林睦生．我が国の媒介蚊発生状況，ウエストナイル熱に係わる関係省庁連絡会議，2009 年 7 月 16 日，東京.

(6)小林睦生．アルボウイルス感染症の流行域拡大，地球規模での温暖化とリスク, 我が国の防疫対策に関するガイドラインについ，動物由来感染症技術対策研修会，2009 年 11 月 6 日，東京.

(7)小林睦生．蚊媒介感染症の動向と我が国の防疫対策，第５回「新潟市ねずみ・昆虫等研究会」，2009 年 11 月 20 日，新潟市.

(8)小林睦生．シンポジウム「温暖化と環境」，温暖化にたいする感染症の対策　2009 年度日仏会館科学シンポジウム，2009 年 12 月 12 日，東京.

発 表 業 績 一 覧

欧文発表

1)Maekawa Y，Tsuda Y，Dachlan Y．P，Yotopranoto S, Gerudug I K K，Yoshinaga K，Kanbara H and Takag M. Anopheline fauna and incriminatory malaria vectors in malaria endemic areas on Lombok Island，Indonesia．Med．Entomol. Zool.　60: 1-11，2009.

2)Tsuda Y，Sasaki E，Sato Y，Katano R，Komagata O, Isawa H，Kasai S and Murata K．Results of mosquito collection from coastal areas of Tokyo Bay receiving migratory birds.　Med.　Entomol.　Zool.　60:119-124，2009.

3)Kim K S，Tsuda Y and Yamada A．Blood-meal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay，Japan．J．Med．Entomol．46:1230-1234，2009.

4)Tsuda Y，Matsui S，Saito A，Akatani K，Sato Y，Takagi M and Murata K．Ecological study on avian malaria vectors on an oceanic island of Minami-Daito，Japan．J．Am. Mosq．Control Assoc．25:279-284，2009.

5)Tsuda Y，Hayashi T，Higa Y，Hoshino K，Kasai S, Tomita T，Kurahashi H and Kobayashi M.　Dispersal of a blow fly，*Calliphora nigribarbis*，in relation to the dissemination of highly pathogenic avian influenza virus.　Jpn. J.　Infect.　Dis．62: 294-297，2009.

6)Kim K S，Tsuda Y，Sasaki T，Kobayashi M and Hirota Y. Mosquito blood meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo，Japan. Parasitol.　Res.　105: 1351-1357，2009.

7)Hayashi T．Taxonomic notes on the genus *Crumomyia* (Diptera: Sphaeroceridae) from Japan and Taiwan.　Med. Entomol.　Zool.　60: 277-281，2009.

8)Zhang J，Yang D and Hayashi T.　Species of the genus *Cavatorella* from China (Diptera: Ephydridae).　Trans.　Amer. Entomol.　Soc.　135: 205-208，2009.

9)Dong H，Yang D and Hayashi T.　Review of the species of *Sphaerocera* (Diptera: Sphaeroceridae) from China.　Trans. Amer.　Entomol.　Soc.　135: 175-184，2009.

10)Hayashi T．A new species of the genus *Opalimosina* Roháček (Diptera，Sphaeroceridae) from the Oriental and Australasian Regions.　Med.　Entomol.　Zool.　6: 221-224，2009.

11) Imura T，Sato Y，Ejiri H，Tamada A，Isawa H, Sawabe K，Omori S，Murata K and Yukawa M.　Molecular

identification of blood source animals from black flies (Diptera: Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. Parasitol. Res. 106: 543-547, 2010.

12) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe K and Kobayashi M. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. Virology. 391: 119-129, 2009.

13) Sawabe K, Tanabayashi K, Hotta A, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Yamada A, Kurahashi H, Shudo C, and Kobayashi M. Survival of Avian H5N1 influenza A viruses in *Calliphora nigribarbis* (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 46: 852-855, 2009.

14)Sasaki T, Hiraoka T and Kobayashi M. Hemolytic activity is mediated by the endogenous lectin in the mosquito hemolymph serum. J. Insect Physiol. (in press).

15) Kasai S, Ishii N, Natsuaki M, Fukutomi H, Komagata O, Kobayashi M and Tomita T. Monitoring of *kdr*-mediated pyrethroid resistance in head louse colonies in Japan, in: Clark JM, Bloomquist JR, Kawada H (Eds.), Advances in Human Vector Control. ACS Publications, Washington, pp. 217-224, 2009.

16) Komagata O, Kasa S and Tomita T. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens* complex, in: Clark JM, Bloomquist JR, Kawada H (Eds.), Advances in Human Vector Control. ACS Publications, Washington, pp. 27-37, 2009.

17) Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen, TY, Loan LL, Sanchez RA and Takagi M. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e527, 2009.

18) Komagata O, Kasai S and Tomita T. Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 146-152, 2010.

19) Kasai S, Komagata O, Okamura Y and Tomita T. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say. Pestic. Biochem. Physiol. 94: 21-29, 2009

20)Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Okamura Y, Masada M and Tomita T. Genomic structures of *Cyp9m10* in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus*. Insect Biochem. Mol. Biol. (in press)

和文発表

1) 沢辺京子. 遺伝子情報から分かる病害動物のこと. 有害生物, 7: 44-53, 2010.

2) 城谷歩惟, 柴田明弘, 江尻寛子, 佐藤雪太, 畠山吉則, 岩野英俊, 津田良夫, 村田浩一, 湯川眞嘉. 神奈川県内の大学農場における蚊の分布および鳥マラリア原虫保有状況. 日本獣医師会雑誌 62 巻 : 73-79. 2009.

3) 冨田隆史. 日本における主要媒介蚊種の薬剤感受性. 殺虫剤研究班のしおり, 通巻 80 号: 3-17, 2009.

4) 葛西真治. シンガポールのチクングニヤ熱・デング熱媒介蚊対策, 殺虫剤研究班のしおり通巻 80 号: 58-66, 2009.

5) 冨田隆史. スミスリン耐性のアタマジラミへのよい対処法を教えて下さい. 健康教室 60(10): 22-25, 2009.

6) 冨田隆史. 殺虫剤抵抗性アタマジラミ対策が喫緊の課題. ペストコントロール. 33-37, 2009.

7) 冨田隆史, 駒形修, 葛西真治. アタマジラミとスミスリン抵抗性. 皮膚病診療 31: 906-913, 2009.

8) 葛西真治. トコジラミって何ですか？健 38, 10-12, 2009

9) 葛西真治. 6. 4 殺虫剤抵抗性, 神村学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 畠山正統, 石橋純 編, 分子昆虫学, pp. 360-378, 共立出版, 東京, 2009.

10) 駒形修. 6. 4. 3 代謝酵素における解毒活性の増大, 神村学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 畠山正統, 石橋純 編, 分子昆虫学, pp. 365-370, 共立出版, 東京, 2009

11) 春成常仁, 谷川 力, 二瓶直子, 駒形 修, 小林睦生. ネズミの生息予測に都市地理情報を利用する試み, ペストロジー 24(2):47-50, 2009.

12) 小林睦生, 駒形 修, 二瓶直子. 温暖化と感染症, ペストロジー 24(1):27-30, 2009.

13) 葛西真治, 駒形 修, 二瓶直子. 分子生物学から見たアカイエカ種群の種の問題とチカイエカに関する最近の知見, 有害生物 6:67-83, 2009.

14) 関 なおみ, 小林睦生. インターネットリサーチを

利用したアタマジラミ症の実態調査，衛生動物
60(3)：225-231， 2009.
15)小林睦生． 衛生昆虫類，空気調和・衛生工学
83(9)：739-745， 2009.
16)小林睦生 地球温暖化に関する社会的影響――節足動物感染症から考える，生活と環境 54(4)：17-21， 2009.
17)二瓶直子，駒形 修，小林睦生． 地理情報システムを利用した大阪府におけるセアカゴケグモ咬症リスクエリアの検出，地図 48(1)：17-23， 2010.

学会発表

1．国際学会

1)French-Japanese Joint Meeting on Environment and Health Challenges， May 28-19， 2009， Paris， France， Mutsuo Kobayashi: Entomology as an indicator of ecological change.
2)5th International Congress of Vector Ecology， October 11-16， 2009， Belek-Antalya， Turkey
Symposium III Vector transmission of *Bartonella* species， Mutsuo Kobayashi: Experimental infection of *Bartonella quintana* to body lice.
3)International Symposium on Climate Change and Insect Pest， October 28-30， 2009， Jeju， Republic of Korea. Mutsuo Kobayashi， Osamu Komagata， Naoko Nihei: Climate change and vector-borne infectious diseases: Future prospect of northern expansion of vector mosquitoes.

2．国内学会

「第 61 回日本衛生動物学会大会シンポジウムおよび一般講演，21 年 4 月 2 日－4 月 4 日，高松市」
シンポジウム２「日本の疾病媒介蚊の研究」
1) 沢辺京子．我が国におけるマラリア媒介蚊の分布と分類に関する系統学的研究.
2) 小林睦生．デング熱，チクングニヤ熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布域拡大と成虫密度の評価
3) 津田良夫：コガタアカイエカの越冬に関する最近の知見
一般講演
1）津田良夫，金京純．宍道湖西部水田地帯における疾病媒介蚊の発生状況調査.
2）津田良夫，金京純．2007 年と 2008 年の秋に突然飛来したコガタアカイエカの大集団.
3）金京純，津田良夫，小林睦生．東京港野鳥公園における捕集蚊からの鳥マラリア原虫と吸血源動物の検出
4）大橋和典，津田良夫，葛西真治，川田均，阿部眞由美，都野展子，高木正洋．住宅地におけるウエストナイルウイルスの潜在的媒介蚊の特定とその季節消長.
5) 小林睦生，米島万有子，吉田政弘，水谷正時，二瓶直子，津田良夫． 都市公園におけるヒトスジシマカの成虫発生密度と環境要因との関係.
6) 吉田政弘，小林睦生，二瓶直子，水谷正時，高木征次．西宮市の人工島における広域蚊幼虫防除の効果評価.
7) 吉田政弘，山下敏夫，小林睦生，沢辺京子，平良常弘．都市環境におけるイエカ類の休息場所の観察
8) 星野啓太，伊澤晴彦，津田良夫，沢辺京子，小林睦生．本邦産ヒトスジシマカ由来新規フラビウイルスの分離および性状解析.
9) 伊澤晴彦，鍬田龍星，星野啓太，酒井宏治，渡辺俊平，津田良夫，矢野和彦，佐藤朝光，西村美保，佐々木年則，斉藤一三，小林睦生，水谷哲也，沢辺京子．本邦イエカ属蚊から新たに分離されたウイルスの RDV 法による同定.
10) 鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，佐々木年則，津田良夫，金京純，梁瀬徹，白藤浩明，今田忠男，川田均，前川芳秀，高木正洋，小林睦生，沢辺京子．2008 年国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出および遺伝子解析.
11) 鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，津田良夫，金京純，梁瀬徹，白藤浩明，今田忠男，佐々木年則，小林睦生，沢辺京子. 国内捕集コガタアカイエカからの新規ラブドウイルスの分離.
12) 佐々木年則，平岡 毅，小林睦生．オオクロヤブカ *Armigeres subalbatus* の細胞障害性因子.
13) 森林敦子，沢辺京子，金京純，津田良夫，小林睦生．東京都の公園に秋に飛来したコガタアカイエカの脂質含量と脂肪酸組成.
14) 沢辺京子，平尾邦道，吉田政弘，山下敏夫，小林睦生．アカイエカ吸血個体の飛翔距離に関する興味ある事例.
15) 平尾邦道，鍬田龍星，伊澤晴彦，金京純，津田良夫，葛西真治，小林睦生，糸山亨，沢辺京子．川崎市生田における媒介蚊ならびに鳥マラリア原虫保有状況の調査.
16）葛西真治， 石井則久， 夏秋優， 駒形修， 小林睦生，

冨田隆史． 駆除薬抵抗性アタマジラミの迅速分子診断法確立と 2008 年の調査結果.

17) 葛西真治， 駒形修， 冨田隆史． 殺虫剤抵抗性ネッタイイエカのシトクロム P450 による permethrin 代謝

17) 川田均， 比嘉由紀子， 駒形修， 葛西真治， 冨田隆史， Nguyen， TY， Nguyen TH， 高木正洋． ベトナム全土における古タイヤに発生する蚊類の生態調査(5) ネッタイシマカの *kdr*.

遺伝子頻度の地域分布に関する解析.

18) 冨田隆史， 葛西真治， 駒形修， 比嘉由紀子， 津田良夫， 沢辺京子， 小林睦生， Wang H-C， Weerasinghe， IS． コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子のアジアにおける分布.

19)二瓶直子，米島万有子，渡辺　護，津田良夫，沢辺京子，大橋　眞，中谷友樹，小林睦生．滋賀県における元マラリア浸淫地で媒介蚊調査.

20)米島万有子,渡辺　護,津田良夫,沢辺京子,大橋　眞,中谷友樹，二瓶直子，小林睦生．滋賀県湖東地区における蚊の発生状況調査.

21)渡辺　護，米島万有子，山内健生，及川陽三郎．石川県かほく市における蚊の発生調査.

22)二瓶直子，吉田政弘，駒形　修，金田弘幸，小林睦生．大阪府およびその周辺地域におけるセアカゴケグモの分布拡大とその咬症例発生状況について.

23)吉田政弘，二瓶直子，小林睦生，金田弘幸．セアカゴケグモの新たな侵入が認められた地域における調査範囲について.

「第 61 回日本衛生動物学会大会殺虫剤研究班研究集会，2009 年 4 月 2 日，高松市」

1) 葛西真治． シンガポールのチクングニヤ熱・デング熱媒介蚊対策.

2) 冨田隆史． 日本のアカイエカ種群の薬剤感受性.

「第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2009 年 6 月 19 日－20 日，千歳市」

1) 沢辺京子，比嘉由紀子，Nguen Thi Yen，Phan Thi Nga，鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，佐々木年則，高木正洋，小林睦生. ベトナムにおける蚊媒介性ウイルスの野外捕集蚊集団における保有状況.

2) 鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，佐々木年則，津田良夫，金京純，小林睦生，沢辺京子．2008 年国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの分離および遺伝子解析.

3) 津田良夫，金京純．コガタアカイエカの越冬に関する生態的研究：2008 年秋と 2009 年春の野外調査結果.

4)小林睦生, 駒形　修, 米島万有子, 二瓶直子, 鍬田龍星, 金　京純, 渡辺　護，斉藤一三，沢辺京子，津田良夫．コガタアカイエカの西日本および東北地方における個体群密度の違いに関係した気象要因について.

5)渡辺　護, 山内健生, 米島万有子, 二瓶直子, 小林睦生. 富山県，岐阜県，石川県，滋賀県の畜舎における 2008 年のコガタアカイエカの捕集状況

「第 61 回日本衛生動物学会東日本支部大会，2009 年 10 月 17 日，東京都新宿区」

1) 糸川健太郎， 駒形修， 葛西真治， 政田正弘， 冨田隆史． ネッタイイエカ幼虫のピレスロイド抵抗性に関与する解毒酵素シトクロム P450 (*CYP9M10*)の遺伝学的研究

2) 沢辺京子， 津田良夫， 金京純， 渡辺護， 佐々木年則， 斎藤一三， 小林睦生．Hyrcanus グループハマダラカの翅に見られる縁飾明斑と ITS2 領域をもとにした系統解析.

3) 津田良夫，金京純．コガタアカイエカ越冬世代の生態調査.

4)渡辺　護，及川陽三郎，米島万有子，山内建生，小林睦生．石川県河北潟干拓地における蚊の調査成績について.

5)小林睦生．シンポジウム「道路環境にみられる雨水枡の維持管理と媒介蚊対策の将来的課題」，兵庫県西宮市における道路, 公園等の雨水枡における蚊の発生状況と防除対策.

「2009 年日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム，2009 年 7 月 25 日～26 日，北海道音更町」

1) 伊澤晴彦．日本国内の野外捕集蚊から分離された新規昆虫フラビウイルスについて.

「第 21 回学術集会日本比較免疫学会，2009 年 8 月 3 日－5 日，藤沢市」

1) 佐々木年則，平岡毅，小林睦生．蚊の細胞障害性因子．

「第 11 回有害生物研究会フォーラム，2009 年 9 月 5 日，川崎市」

1) 沢辺京子．遺伝子情報から分かる病害動物のこと．

「第 148 回日本獣医学会，2009 年 9 月 25 日－27 日，鳥取市」

1) 水谷哲也，伊澤晴彦，沢辺京子，星野啓太，鍬田龍星，小林睦生，渡辺俊平，明石博臣，佐藤朝光，酒井宏治，緒方もも子，倉根一郎，森川茂．ウイルスの網羅的検出法（RDV 法）の改良と新規ウイルスの検出．

「第 16 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会，2009 年 10 月 24 日，東京」

1) 沢辺京子．ウイルス媒介蚊の生理・生態とウイルスサーベイランスの実際．

「第 53 回日本応用動物昆虫学会大会， 2009 年 3 月 26 日－28 日，千葉市稲毛区」

1) 葛西真治， 糸川健太郎， 駒形修， 小林睦生， 冨田隆史． ネッタイイエカ成虫のピレスロイド剤抵抗性機構 (1).

2) 駒形修， 葛西真治， 糸川健太郎， 冨田隆史． ピレスロイド抵抗性アカイエカ種群蚊の *kdr* 遺伝子型．

3) 糸川健太郎， 駒形修， 葛西真治， 川田均， 岡村佳香， 政田正弘， 冨田隆史． 殺虫剤抵抗性と連鎖する *CYP9M10* 遺伝子の過剰発現と進化．

4) 冨田隆史． 殺虫剤抵抗性蚊におけるシトクロム P450 遺伝子の過剰発現．

「第 54 回大会日本応用動物昆虫学会，2010 年 3 月 26 日－28 日，千葉市」

1)星野啓太，廣瀬麻美，岩淵喜久男．クリストフコトラカミキリ由来細胞系の樹立．

「第 827 回日本皮膚科学会東京地方会城西地区，2009 年 11 月 14 日，東京都」

1)四津里英， 記村貴之， 山田ひかり， 浜野真紀， 横林ひとみ， 石浦信子， 中島広子，玉木毅， 氏家無限， 竹下望， 金川修造， 工藤宏一郎， 林利彦． スナノミ症の 2 例．

「第 28 回国際保健医療学会西日本地方会 2010 年 3 月 13 日， 長崎市」

二瓶直子，駒形 修，小林睦生，斎藤康秀，望月貫一郎，陸紹紅，陳睿，聞礼永，汪天平，太田伸生．
中国における日本住血吸虫症の分布におよぼす温暖化の影響．

調査

1) 沢辺京子.「東南アジア地域に分布する未知の吸血昆虫媒介性ウイルスの網羅的探索」に関する共同研究．2009 年 1 月 11 日－14 日，フィリピン．

2) 沢辺京子.「東南アジア地域に分布する未知の吸血昆虫媒介性ウイルスの網羅的探索」に関する共同研究．2009 年 7 月 6 日－8 日，フィリピン．

3) 伊澤晴彦.「疾病媒介蚊に対する効果的な微生物防除資材（蚊病原性微生物）の収集・性状調査，ならびに蚊病原微生物のライブラリ―構築」に関する共同研究．2009 年 11 月 10 日－14 日，ベトナム．

4) 沢辺京子.「ベトナムにおけるフラビウイルスの蚊からの検出と分離」に関する共同研究．2009 年 3 月 7 日－10 日，ベトナム．

その他

佐々木年則「マラリア媒介蚊の自然免疫に関する研究「Institute of Molecular and Cellular Biology 特定国派遣研究者， 2009 年 6 月 15 日－7 月 14 日， フランス ストラスブール」

１２．獣 医 科 学 部

部 長　山 田 章 雄

概　要

平成 21 年度はメキシコに端を発するインフルエンザが WHO によりパンデミック宣言され、感染研は大きな影響を受けた。その渦中において、獣医科学部も感染研の 24 時間体制による診断への協力、あるいは科学振興調整費による緊急研究への参画などで、新型インフルエンザ対応に少なからぬ影響を被ることになった。幸いなことに当初予想されたような健康被害にはつながらなかったが、動物に起因する新興感染症の出現が今後も続くであろうこと、その対応・対策が如何に重要であるかを再認識させるには十分であった。この年は歴史に残る政権交代の実現した年で、新興動物由来感染症に対する基礎研究、対策研究等への新たな取り組みをはじめられそうな淡い期待を抱いたのであるが、その期待がどのように実現されていくかについては、更に見守る必要がありそうである。研究においてはこれまでに引き続きブルセラ症、カプノサイトファーガ感染症、狂犬病、ニパウイルス感染症、炭疽、野兎病、高病原性鳥インフルエンザウイルスなどに関する研究が進められた。国内外の研究機関との連携も滞りなく進められ、ほぼ順調であると言える。

業　績

調査・研究

I. 動物由来感染症に関する研究

１．*Brucella* 特異的抗体検出法の開発に関する研究

B. canis 感染および非感染イヌ血清を用いて、試験管内凝集反応（TAT）、マイクロプレート凝集反応（MAT）、市販の免疫クロマト法（ICA）KIT および蛍光抗体法（IFA）KIT を入手し検討した。その結果、TAT で感度が若干劣るものの、検査結果には有意な相関が認められた。ウエスタンブロッティング法（WB）との比較も行ったが、TAT で陰性と判断された *B. canis* 感染流行施設内のイヌ血清で、陽性となるケースが認められた。このことは、WB が、他の検出方法よりも感度が良いことによると思われるが、通常の検査法では感染流行施設内の抗体価低値の感染イヌを見逃す可能性を示している。また、特異性の高いタンパクの同定・解析、組換えタンパクの作成など、新たな in-house の ICA の開発を進めている。[木村昌伸、鈴木道雄、今岡浩一]

２．国内野生イノシシ・シカにおける抗 *Brucella* 抗体の保有状況に関する研究

国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。イノシシでは、家畜ブルセラ菌に対し 2/334（0.6%）、*B. canis* に対し 32/334（9.6%）が、ニホンジカについては、*B. canis* に対し 1/97（1.0%）が、MAT により抗体陽性を示した。これら陽性サンプルは、*B. canis* を抗原として用いた WB でも陽性を示した。さらに、抗体陽性血液サンプルから DNA を抽出し、ブルセラ特異的 PCR を実施したところ、イノシシで 21/34、ニホンジカで 1/1 が陽性となった。増幅産物のシーケンスを確認したところ *B. canis* 遺伝子と 100%配列が一致した。国内のイノシシとニホンジカのブルセラ属菌感染が示唆されるが、確定には、他菌との交差反応の確認も含め、さらに検証が必要である。[今岡浩一、木村昌伸、鈴木道雄、山田章雄]

３．カプノサイトファーガ属菌に関する疫学的調査・研究

（１）カプノサイトファーガ属菌はイヌやネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、特に *Capnocytophaga canimorsus* が臨床的に重要で、ヒトがイヌやネコに咬傷、掻傷を受けた際に傷口から感染する。国内症例報告を医中誌、各種学会抄録集などを検索し調査したところ、2002 年以降、14 例が報告されており、うち 6 例が死亡症例(イヌ咬傷 1 例、ネコ掻傷 4 例、不明 1 例)であった。また、イヌ・ネコの同菌保有率について特異性の高いプライマーを新たに作製し PCR で解析を行ったところ、イヌの 74%、ネコの 57%が *C. canimorsus* 陽性であった。収集した臨床分離株、イヌ・ネコからの分離株、ATCC 株の生化学的性状解析を行った結果、生化学的性状には糖の分解能以外に大きな違いは見られなかった。また、16S rRNA 遺伝子のシーケンス比較を行った結果、大きく 2 つのグループに分けられる他、ところどころに変異

も認められた。情報の収集と、菌株の解析、カプノサイトファーガ属菌の感染・発症メカニズムについて解明してくことが重要である。[鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄、今岡浩一]

（２）カプノサイトファーガ症のリスクプロファイリングを行った。イヌ・ネコの飼育頭数と飼育者数、動物病院獣医師・動物看護士数、動物取扱業者数、それぞれ対象人集団におけるイヌ・ネコ咬傷、ネコ掻傷の年間推定受傷回数、イヌ・ネコの保菌率、受傷した際の感染成立率および発症率の推定値、を用いて年間推定患者数を算出した。その結果、500~600 人の感染発症者がいると推定された。オランダ、デンマークでは 100 万人対 0.7, 0.6 人との報告があり、日本の人口を考えると、500~600 人という推定は妥当であると思われる。すなわち、現在は重症例のみ数例が報告されているが、報告されていない軽症例がまだ多く存在すると推定された。今後も継続した調査が必要である。[今岡浩一、東レリサーチセンター]

４．鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況調査

Blocking-ELISA を用いて、2009 年度の渡り鳥（カモ類）における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した。しかし、いずれもの抗原に対しても特異的抗体は検出されなかった。[今岡浩一、鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄]

５．狂犬病に関する研究

（１）狂犬病の診断技術向上のための解剖手技習得モデル・教材の開発に関する研究

自治体・大学・獣医臨床などの専門家とともに開発した狂犬病の診断技術向上のために必要な解剖手技習得モデルについて、技術研修等を利用した手技等の試行と自治体の公衆衛生領域への普及・啓発、厚生労働行政における有効性について調査を行った。結果、開発したモデルと教材は自治体の現場での狂犬病啓発と技術研修等に対して波及効果があると期待され、本研究の目的である「狂犬病の診断技術向上のために必要となる解剖手技習得モデル・教材の開発」は自治体等における担当者への実技伝達のみならず発生時を想定した意識啓発と動物由来感染症である狂犬病の感染源対策に対する危機管理意識の向上にも大いに貢献することが示唆された。[井上智、野口　章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄（獣医科学部）、志村　薫、齊藤　薫（モルフォバイオイメージング研究所）、佐藤　克（狂犬病臨床研究会）、村山悠子（さいたま市動物愛護ふれあいセンター）、織間博光、長谷川大輔（日本獣医生命科学大学）、川田　睦、王寺隆（ネオ・ベッツ VR センター）、朴　天鎬（北里大学獣医畜産学部）、安藤秀二（国立感染症研究所ウイルス一部）沼田一三、川島　朗、久本千絵（兵庫県動物愛護センター）、頓名昌宏（兵庫県健康生活部生活衛生課）、西條和芳（徳島県保健福祉部生活衛生課）、魚住佳世（徳島県動物愛護管理センター）、高橋朱実（岩手県北上保健所）、佐野哲也（滋賀県健康福祉部生活衛生課）、宗村佳子（東京都動物愛護相談センター）、川越辰也（宮崎県衛生管理課）、坊薗慶信（宮崎県都城保健所衛生環境課）、小川知子（千葉県衛生研究所）、明石　誠（千葉県動物愛護センター）、松本尚美（鳥取県衛生環境研究所）、木山真大（鳥取県生活環境部公園自然課）、大下幸子（鳥取県西部総合事務所生活環境局）、田原研司（島根県保健環境科学研究所）、川瀬　遵（島根県健康福祉部）

（２）侵入・不許可動物等の公衆衛生リスク評価と管理に関する研究

海外における狂犬病罹患動物の不法侵入事例および我が国の関連情報等の分析、狂犬病の発生を想定した机上訓練の実際と課題の検討（我が国に必要な狂犬病サーベイランス）、外国犬不法上陸防止等に関わる課題分析（北海道 根室・網走における不法上陸犬等の実態調査）を行った。今回特に、タイの赤十字研究所狂犬病診断部の研究協力によって、狂犬病が疑われた動物を臨床判断する方法を我が国に導入して狂犬病の臨床サーベイランスの検証を行った。[井上　智、野口　章、加来義浩、奥谷晶子（獣医科学部）、浦口宏二（北海道立衛生研究所）、深瀬　徹（明治薬科大学）、佐藤　克（狂犬病臨床研究会）、村山悠子（さいたま市動物愛護ふれあいセンター）、横山敦志（北海道保健福祉部保健医療局）、梅澤めぐみ（根室保健福祉事務所保健福祉部）、宗村佳子（東京都動物愛護相談センター）、沼田一三、久本千絵（兵庫県動物愛護センター）、西條和芳（徳島県保健福祉部生活衛生課）、魚住佳世（徳島県動物愛護管理センター）、川越辰也（宮崎県衛生管理課）、坊薗慶信（宮崎県都城保健所衛生環境課）、佐野哲也（滋賀県健康福祉部生活衛生課）、松本尚美（鳥取県衛生環境研究所）、Veera Tepsumethanon（タイ赤十字サオパー王女記念研究所）]

（３）侵入・不許可動物等の生態学的リスク評価と管理に関する研究

北海道では寄港したロシア船からの不法上陸犬が依然あり、野生動物であるキツネとの接触が否定できない。今回、北海道に生息するキツネに狂犬病が侵入した場合

の流行予測モデルを確立するために必要な基礎的データの収集と解析を行った。北海道は本州以南に較べてキツネの生息密度が高く(根室半島:キツネの生息密度は 0.85 頭/km^2)、港湾区域（稚内港、紋別港、網走港、根室港）でキツネと不法上陸犬が接触するリスクを否定できなかった。現在、流行予測を行うために必要なキツネの個体数推定・個体数密度情報、港湾の地理情報・周辺環境情報を調査している。[浦口宏二（北海道立衛生研究所)、深瀬　徹（明治薬科大学)、井上　智、野口　章、加来義浩、奥谷晶子（獣医科学部)、佐藤　克（狂犬病臨床研究会)、村山悠子(さいたま市動物愛護ふれあいセンター)、横山敦志（北海道保健福祉部保健医療局)、関谷紀幸（宗谷保健福祉事務所)、竹下日出夫、児玉晋治（網走保健福祉事務所)、梅澤めぐみ（根室保健福祉事務所保健福祉部）]

（４）アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

本研究はアジアの CDC 機能を持つ国立の研究機関等と狂犬病ラボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。[井上　智、杉浦尚子、宇田晶彦、Bordbaatar Bazartseren、佐藤　豪、野口　章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄（獣医科学部)、朴　天鎬（北里大学)、黒田　誠、関塚剛史（病原体ゲノム解析研究センター)、Jun R.C. Orbina、Catalino Demetria、Daraia L. Manalo、Plebian Medina、Beatriz Quiambao（RITM)、Nguyen Thi Kieu Anh、Dong V. Nguyen、Giang C. Ngo（NIHE)、Qing Tang（China CDC)]

(a) 狂犬病ウイルスの分子疫学に関する研究：フィリピンで流行している狂犬病ウイルスの地域性を分子疫学的系統解析によって識別可能とし、流行拡大しているウイルス株の特定と地域性や輸入経路推定方法について検討した。ラボラトリーネットワークが構築できればアジア地域における国境を越えた狂犬病の侵入・流行拡大について情報共有が可能となり公衆衛生領域での狂犬病対策に大きな波及効果があるものと考えられた。

(b) 狂犬病ウイルスの迅速抗原検出系に関する研究：野外での検査を想定して、遺伝子診断系として野外検体を利用した RT-LAMP 法の感度とその特異性について検証を行い、また抗原診断系として検査に使用する抗体作成の簡易化と標本固定の簡便化を dRIT 法で可能にした。

(c) 狂犬病の新しい診断法の開発に関する研究：狂犬病ウイルスに感染した宿主の生体側の遺伝子応答をマイクロアレイで解析をした。感染を特徴付ける宿主遺伝子応答について脳で 941 遺伝子、脊髄で 850 遺伝子、脳と脊髄に共通したものについて 1258 遺伝子を抽出することができた。現在、発現が有意に高かった遺伝子群についてその機能分類を行い、感染した宿主で見られる病態との関連性及び因果関係について解析を行っている。

（５）狂犬病の免疫組織化学によるウイルス抗原検出に関する研究

免疫組織化学による狂犬病ウイルスの抗原検出系は簡便・安価である。今回、検出用の抗体をウサギとニワトリ卵黄で作製して、それぞれの抗狂犬病ウイルス蛋白抗体の特性等についてホルマリン固定材料を用いて比較検討した。最も染色感度が高いのはウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗 P 蛋白抗体であり、ニワトリ卵黄由来の P 抗体では非特異反応が殆どみられないことが示された。また、HE 標本ではネグリ小体の観察が困難であるが、免疫組織化学では抗原検出によるウイルスの特定が可能であった。[朴　天鎬、小嶋大亮、石田　誠（北里大学)、井上謙一、高田昌彦(京都大学霊長類研究所)、杉浦尚子、佐藤　豪、野口　章、井上　智（感染研)]

（６）狂犬病の病態解析のための感染モデル実験系

感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期を解析する感染実験モデルを確立するために、狂犬病ウイルス(CVS11 株）を C57BL/6J マウスの右後肢下腿三頭筋に末梢感染させて後躯麻痺を伴う致死性の脳炎をマウスに発病させることに成功した。下腿の麻痺はウイルス接種側で顕著であり、麻痺症状の主因は大脳に見られたアポトーシス病変よりも脊髄で顕著な壊死性病変に起因することが組織病理学的検索によって強く示唆された。 [朴　天鎬、小嶋大亮、石田　誠（北里大学）、杉浦尚子、Bazartseren BOLDBAATAR、野口　章、井上　智（感染研）]

（７）狂犬病の免疫グロブリン（RIG）に関する研究

現在、RIG はわが国では生産されていない。万が一、狂犬病を強く疑うイヌ等による咬傷被害が国内で報告された場合には緊急輸入もしくは過去に輸入された RIG を使用しなければならないことが想定される。本研究では、「Aventis Behring 社」から輸入した RIG（Berirab P、Lot.No. 03947131L）について冷蔵状態（4℃）保存で有効期限を４年経過した時点でも安定した力価を維持していることを実験的に明らかとした。また、狂犬病の概要、アジアにおける現状、患者の臨床症状、暴露後予防の方法、公衆衛生対策等についてまとめた啓発資料等を作成した。[野口 章、井上　智（獣医科学部)、倉根一郎（ウイルス一部）]

（８）狂犬病野外ブラジル株を用いた In vivo 接種試験とゲノム配列の決定

狂犬病野外株の馴化メカニズムを解明するために、食虫コウモリおよび家畜（ウシ・ヒツジ）より分離された 6 株をマウス脳内で、また、食虫コウモリ・ヒツジ分離株各 1 株をマウスの筋内接種で継代して、ウイルスのゲノム配列を継代毎に決定した。構造遺伝子上の変異は散発的であり、非コード領域上の変異は全てリン蛋白(P)および膜蛋白(M)遺伝子間に存在し、特に P-M 遺伝子間の転写終了シグナル(TTS)上に集中していた。また、P-M TTS 上の変異は継代 1 代後であり、RABV の新たな宿主への順化では短い継代期間でゲノムのへ変異が起きていることが示唆された。[佐藤　豪、Ito H. Fumio(州立サンパウロ大学)、井上　智、伊藤　琢也（日本大学)、酒井健夫（日本大学）]

６．炭疽に関する研究

（１）キノロン耐性炭疽菌のゲノム解析による耐性関連遺伝子の同定

炭疽菌が有するキノロン耐性メカニズムを網羅的に解明するために、キノロン剤感受性である炭疽菌（日本分離株 BA103, BA104）を親株とし、薬剤耐性株と感受性株との間に見られる遺伝子変異をゲノムワイドに同定したところ、キノロン耐性化には段階的なメカニズムがあり、 QRDR のような必須遺伝子上の変異導入よりも先に、変異導入しやすい TetR タイプ・レギュレーター(GBAA0834)を機能欠損させ中等度耐性化していることが示唆された。また、中等度耐性株は、キノロン剤選択圧下においても菌集団を増加し、QRDR 変異を伴う高度耐性化の危険性を増大させることが明らかとなった。[奥谷晶子、井上 智 (獣医科学部)、芹澤昌邦、関塚剛史、坂野聡美、黒田 誠 (病原体ゲノム解析研究センター)]

（２）病原体等の登録、保管、輸送、廃棄に関する一括管理システムを利用した炭疽菌の取り扱いについての研究

炭疽菌の取り扱い等については感染症法により二種病原体等に指定されており、バイオセキュリティ上の観点から、法に基づく厳重な保管管理が必要とされている。今回、バイオセーフティ管理室で研究開発中の「病原体等の登録、保管、輸送、廃棄に関する一括管理システム」を炭疽菌について導入可能かを検討したところ、危機管理の視点から感染症法に基づいた分離菌株の届け出、保管、輸送、廃棄が迅速かつ適切、確実に行われるために大変有用であることが示された。[奥谷晶子、井上 智 (獣医科学部)、篠原克明（バイオセーフティ管理室）]

７．ヘニパウイルス感染症に関する研究

（１）ニパウイルス中和代替法の開発

現在、NiV、HeV 抗体の確定診断では感染性ウイルスを用いた中和試験が行われるが BSL4 施設が必要である。そこで、NiV-F, G 蛋白を発現した VSV シュードタイプを用いて BSL2 以下で行える中和代替法の開発を行った。すでに、GFP 発現シュードタイプを利用した系を開発しているが、測定に蛍光顕微鏡／蛍光プレートリーダーが必要であった。そこで、より簡便に測定できるよう、分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）発現シュードタイプを利用した系の確立を試みたところ、本中和試験は（感染性ウイルスを用いた）現行法よりも高感度に中和抗体を検出できることが明らかになった。SEAP 発現シュードタイプは、安価な ELISA プレートリーダーで、迅速に感染価を計測できるため、本法は、途上国でも普及しうる中和試験法として期待できる。 [加来義浩、野口　章、奥谷晶子、山田章雄、井上　智]

（２）ニパウイルスの抗原 capture ELISA の開発

現在、ニパウイルス（NiV）感染症、ヘンドラウイルス（HeV）感染症の迅速診断法として、RT-PCR または realtime RT-PCR が広く利用されている。その一方で、近年、現行の診断用プライマーでは増幅できないヘニパウイルス株の出現が報告されている。そこで、ウイルス遺伝子のプライマー相当領域が変異した株でも検出できるよう、capture ELISA による抗原検出系の開発を行った。豪州家畜衛生研究所 BSL4 施設において、感染性ウイルス（NiV マレーシア株、NiV バングラデシュ株および HeV）を用いて、検出限界の測定を行ったところ、それぞれ 6.0×10^5($TCID_{50}$/100 μl/well)、NiV-B では 2.5×10^4、HeV では 9.4×10^5 であった。現在、（脳脊髄液など）臨床検体への反応性を検証するため、本症発生国とのネットワークを検討している。[加来義浩、野口　章、奥谷晶子、山田章雄、井上　智]

８．季節性インフルエンザ（H1N1）に関する研究

（１）ファージディスプレイ scFv 法を利用した新型 H1N1 検出イムノクロマト法の開発

インフルエンザの簡易検査として広く利用されているイムノクロマト法は、季節性 H1N1 株と 2009 年に発生した新型 H1N1 株の両方に反応するため、これらの株を識別することはできない。そこで、single chain variable fragment (scFv) phage display library より、新型株に特異的な scFv を選択し、新型／季節性 H1N1 識別用イムノクロマトキットの構築を目指した。ELISA と IFA で 5 クローンが新型株と季節株に対して同等に反応した。また、1

クローンが ELISA、IFA、IP で新型株に強く反応したが、季節性株に対しても、若干の反応性を有したため両株識別用イムノクロマト法に使用することは難しいと思われた。低分子量の scFv は、抗原認識部位の立体構造に可塑性があることから、わずかな抗原性状の違いを識別するよりは、むしろ幅広い抗原性状に対応できるモノクローナル抗体として有用なフォーマットと考えられた。[加来義浩、野口　章、奥谷晶子、井上　智、山田章雄]

（２）新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性遺伝子迅速検出法の検討

パイロシークエンシング法を用いて、我が国で分離された季節性 H1N1 株のタミフル耐性遺伝子の迅速塩基配列解読を可能にした。耐性遺伝子の検出には、国内分離タミフル感受性株および耐性株から抽出した RNA、WHO 推奨のプライマーと耐性遺伝子増幅用に設計したプライマーを使用して、LightCycler による耐性遺伝子の迅速増幅を行った。本法では、抽出された検体 RNA から遺伝子増幅を開始して 1 時間後に耐性遺伝子の塩基配列を解読することができた。[奥谷晶子、井上　智、山田章雄（獣医科学部）、小田切孝人（インフルエンザウイルス研究センター）]

９．野兎病に関する研究

（１）野生動物における抗野兎病菌抗体調査

過去に野兎病患者発生が多数あった福島県内で捕獲された野生動物由来血液検体（ツキノワグマ 34 を含む全 126 検体）について野兎病菌に対する抗体調査を実施した。微量凝集反応によるスクリーニング陽性検体についてウエスタンブロット法および間接蛍光抗体法により確認試験をしたところ、ツキノワグマ由来 1 検体が陽性と判断された。過去のツキノワグマの調査で長野県以西の 310 検体からは陽性例はなく、岩手県内由来 62 検体からは陽性 8 例が認められたことや、過去の野兎病患者報告状況などから、今後、野生動物における野兎病菌に関する調査は福島県以北ついて進める必要があると考えられる。[堀田明豊、棚林　清、藤田　修、山本美江、宇田晶彦（感染研）溝口俊夫（福島県鳥獣保護センター）]

（２）野鼠における野兎病に関する調査

環境中の野兎病菌の存在様式の解明を目的に、野兎病罹患ノウサギの発見場所周辺で発見同時期の 6 月に 54 個体の野鼠を捕獲した。前年秋期と比較し、捕獲個体の生存率は高く、血液 46 検体を採取できた。微量凝集反応で 40 倍を呈した 1 例を含む 4 例が酵素抗体法にて陽性であった。しかし、いずれもウエスタンブロット法と間接蛍光抗体法で陰性であった。脾臓や肝臓からの菌分離及びゲノム検出はいずれも陰性であったが、ダニやツツガムシなどの外部寄生動物については、弱いながらリアルタイム PCR で反応する検体が存在した。今後、野兎病菌の類似菌の存在も考慮し、血清学的反応やゲノム検出の特異性について詳細に検討し調査を継続する必要がある。[堀田明豊、棚林　清、藤田　修、山本美江、宇田晶彦（感染研）、朴天鎬、小山田敏文、進藤順治、畑井　仁、工藤上（北里大）]

（３）日本国内で分離された野兎病菌のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた遺伝学的解析に関する基礎研究

日本国内に分布する野兎病菌（*Fransicella tularensis*）の遺伝的特性を明らかにする目的で、種々の制限酵素を用い日本国内分離株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を行った。まず、PFGE 解析に利用可能な 7 種の制限酵素を選択し、これらを用いて解析した結果、北米やヨーロッパなどに分布する同亜種菌株に比較して国内株は非常に高い遺伝的多型を有している事が明らかとなった。さらに、今回用いた制限酵素の全てで日本分離株は海外由来株と明確に異なるバンドパターンを示し、国内外由来株間の鑑別にも PFGE が有用な手法の一つであることが示唆された。

［藤田　修、宇田晶彦、堀田明豊、山本美江、棚林　清］

（４）*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU 株の強毒性に関わる因子の同定

F. tularensis は、ヒトや動物に野兎病を引き起こす細胞内寄生性のグラム陰性桿菌である。我々は、保管していた弱毒性の SCHU 株をマウスで 9 代継代し強毒性復帰株を得ることができた。これらは近似した遺伝的背景を有しながらマウスに異なる病原性を示すことから、各株の人工培地や培養細胞での増殖性および全ゲノム解析を行い、病原性関連遺伝子の同定を試みた。弱毒株と強毒株の人工培地やマクロファージでの増殖速度は同等だったが、骨髄由来樹状細胞では強毒株が高い増殖性を示した。また、全ゲノム塩基配列解析を行った結果、ゲノム上の 1 塩基に違いが見つかり、本菌株の病原性を支配している可能性が示唆された。

[宇田晶彦、関塚剛史*、藤田　修、黒田　誠*、堀田明豊、山本美江、棚林　清、山田章雄（*病原体ゲノム解析センター）]

１０．インフルエンザウイルスの検出法に関する研究

（１）インフルエンザ A ウイルス RNA 増幅法について

の検討

インフルエンザ A ウイルス(InfAv) RNA を簡便・短時間・大量に増幅する方法の構築を目的とした。プライマーは既知の InfAv の HA 遺伝子の株間で比較的保存されていた領域内に設計し、定温で増幅可能な NASBA 法と TRC 法を用いて各種 InfAv から抽出したウイルス RNA の増幅を試みた。その結果、TRC 法は鋳型 RNA の添加量が少ないと増幅効率が低下したが、NASBA 法では新型 H1、季節性 H1、H5 亜型のウイルス RNA を 1 万倍以上の安定した増幅が認められた。高額な機器を必要としない NASBA 法は HA 亜型の異なる少量の InfAv の HA 領域 RNA を短時間で効率良く増幅する方法として有用性の高い事が示唆された。

［藤田　修、宇田晶彦、棚林　清、堀田明豊、山本美江、山田章雄］

（２）新型インフルエンザウイルス検出のためのハイブリクロマトグラフィー

これまでに病原体を網羅的に検査できるマイクロアレイを開発してきた。この研究成果を応用し、特異性（サンドイッチハイブリダイゼーション）と迅速性（イムノクロマトグラフィー）を組み合わせた新しい遺伝子検出システム『ハイブリクロマト』の構築を試みた。また、短時間かつ一定温度で RNA を増幅できる NASBA 法によりウイルス RNA を増幅してハイブリクロマトを検討した結果、非特異反応が確認されるものの新型インフルエンザウイルスを検出でき、ハイブリクロマトで新型インフルエンザを診断できる可能性が示唆された。

［宇田晶彦、棚林　清、藤田　修、堀田明豊、山本美江、山田章雄］

（３）鳥インフルエンザウイルスの保存性に関する研究

家禽や野鳥で高病原性鳥インフルエンザが疑われた場合には、簡易キットによる検査に続いて確定検査のために検体を採取し、検査可能な施設へ輸送する必要がある。本研究ではウイルスが安定して保持されるための検体輸送用培地の検討を行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販のトランスポート培地に H5N1 亜型ウイルスを添加しその生残性を調べたところ、7 日後の感染価の低下は 20℃保存ではやや低下したが 4℃では安定であった。ウイルス核酸もよく保存されていることがわかった。家禽等の咽頭スワブやクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる体液や糞便等の影響についてはさらに検討が必要である。

［山本美江、宇田晶彦、堀田明豊、藤田　修、棚林　清］

１１．SARS コロナウイルスに関する研究

SARS-コロナウイルス(CoV)感染 hACE2Tg マウスの肺における初期宿主応答の解析

SARS-CoV 感染後の hACETg マウスの免疫応答や遺伝子応答をを観察することを目的として、hACE2Tg マウスにおける感染前、感染後 2 日目、4 日目の肺から全 RNA 抽出を行った。これらの RNA についてマイクロアレイ解析を行い、SARS-CoV 感染後有意に変動している遺伝子を抽出し、遺伝子機能分類解析を行った。Tg マウスにおいて、感染後 2 日目には感染応答遺伝子群が強く誘導されていた。感染 4 日目ではアポトーシス、免疫抑制遺伝子や一部の炎症関連遺伝子発現量が上昇していた。一方で細胞間シグナルや細胞分化に関わる遺伝子応答関連遺伝子の発現量が減少していた。これらの現象は、SARS-CoV が増殖に伴い免疫抑制効果を発揮していた可能性が示唆された。

[宇田晶彦、 棚林　清、 永田典代（感染病理部）、 藤田　修、 堀田明豊、 山本美江、山田章雄]

国際協力

（１）ベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）能力強化計画プロジェクト（JICA）への協力

ベトナム NIHE において、JICA 支援で建設された BSL3 実験室で使用する P3 病原体（結核菌、炭疽菌、狂犬病ウイルス、リケッチア、インフルエンザ）の取り扱いに関わるバイオセーフティ/基準微生物実験技術（SOP）について NIHE と国立感染症研究所（NIID）の各病原体専門家での情報・意見交換、NIHE バイオセーフティ部が作成中のバイオセーフティ教育・研修用 DVD への助言等（SOP の検証、課題抽出、SOP の修正とリスク評価、等）を行った。 [篠原克明（バイオセーフティ管理室)、影山　勉（インフルエンザウイルス研究センター)、大野秀明（生物活性物質部)、安藤秀二（ウイルス一部)、井上　智、奥谷晶子（獣医科学部）]

（２）ベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）能力強化計画プロジェクト（JICA）本邦研修への協力

ベトナム NIHE において、JICA 支援で建設された BSL3 実験室で使用する P3 病原体（炭疽菌、狂犬病ウイルス）の取り扱いに関わるバイオセーフティ/基準微生物実験技術（SOP）の研修を NIHE 担当者（炭疽：Pham Thanh Hai、狂犬病：Nguyen Vinh Dong）とともに国立感染症研究所において行った。 [奥谷晶子、野口　章、井上　智（獣医科学部）]

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ．誌　上　発　表

１．欧文発表

1) Suzuki,M., Kimura,M., Imaoka,K. and Yamada,A. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. Veterinary Microbiology, doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.001 (Available online 18 January 2010)

2) Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J.R.C., Demetria C., Miranda M.E., and Yamada A. (2009) Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Jpn.J.Infect.Dis. 62:187-191.

3) Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., McEachern J.A., Okutani A., Hotta K., Boldbaatar B., Fukushi S., Broder C.C., Yamada A., Inoue S., and Wang L.-F. (2009) A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. J.Virol.Methods 160:7-13.

4）Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. 2009. Rabies. In: Animal Viruses (Maeda A., ed.). RESEARCH SIGNPOST. (in press).

5）Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I., and Sata T. (2009) Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. Pathol.Int. 59:555-66.

6) Russell-Lodrigue, K. E., Andoh, M., Poels, M. W., Shive, H. R., Weeks, B. R., Zhang G. Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, D. N., and Samuel, J. E. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infect. Immun. 77: 5640-5650, 2009

7) Park, C-H., Nakanishi, A., Hatai, H., Kojima, D., Oyamada, T., Sato, H., Kudo, N., Shindo, J., Fujita, O., Hotta, A., Inoue, S., and Tanabayashi, K. Pathological and microbiological studies of Japanese hare *(Lepus Brachyurus Angustidens*) naturally infected with *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. J. Vet. Med. Sci. 71: 1629-1635, 2009

8) Sawabe, K., Tanabayashi, K., Hotta, A., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Yamada, A., Kurahashi, H., Shudo, C., and Kobayashi, M. Survival of avian H5N1 influenza viruses in Calliphora Nigribarbis (Diptera: Calliphoridae). J. Med. Entomol. 46: 852-855, 2009

２．和文発表

1) 山田章雄 : 動物由来感染症にどう対処するか　田村優（監）最新獣医公衆衛生　チクサン出版社 pp60-65 2009

2) 山田章雄：家畜からの反逆－BSE・ヒトと動物の共通感染症　林良博、森裕司、秋篠宮文仁、池谷和信、奥野卓司（編）ヒト動物の関係学　第 2 巻　家畜の文化 岩波書店　2009　pp197-217

3) 岸本寿男、山田章雄　監修・著　ズーノーシスハンドブック　メディカルサイエンス　2009

4) 太田求磨, 加澤敏広, 津畑千佳子, 鈴木道雄, 今岡浩一. *Capnocytophaga canimorusus* による敗血症の 1 剖検例. 感染症学雑誌, 83:661-664, 2009

5) 今岡浩一, 高橋英之. エルシニア症. in：ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.118-120, 2009

6) 今岡浩一. 鼠咬症. in : ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp132-133, 2009

7) 今岡浩一. ブルセラ症. in : ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.156-158, 2009

8) 高橋英之, 今岡浩一. ペスト. in : ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.159-161, 2009

9) 今岡浩一. ブルセラ症 －人・家畜・犬－. in：獣医畜産新報, 文永堂, 62(6): 457-461, 2009

10) 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 山本和正, 丸山総一, 福士秀人, 今岡浩一, 岸本壽男, 吉川泰弘. 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査. in：獣医畜産新報, 文永堂, 62(6): pp.487, 2009

11) 今岡浩一. 犬, 猫由来細菌感染症. in：獣医疫学雑誌, 獣医疫学会, 13(1): pp.65-70, 2009

12) 鈴木道雄, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. *Capnocytophaga canimorsus* 感染症. in：獣医畜産新報, 文永堂, 63(3): 217-218, 2010

13) 井上　智。（３）リッサウイルス感染症（四類感染症）。６ 神経疾患。III 疾患別各論編。東京都 感染症マニュアル 2009。監修・東京都新たな感染症対策委員会。東京都福祉保険局。262-263、2009

14) 井上　智。　狂犬病 in : ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.41-43、2009

15）井上　智。リッサウイルス感染症　in：ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.75-76、2009

16) 棚林　清：B ウイルス病（ヘルペス B 感染症）in :

ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp 66-70, 2009

17) 棚林 清：細菌性赤痢. in：ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.130-131, 2009

18）棚林 清：腸管出血性大腸菌感染, in：ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp136-137, 2009

19） 棚林 清：野兎病. in：ズーノーシスハンドブック（岸本寿男, 山田章雄 監修）, メディカルサイエンス社, 東京、pp.165-167, 2009

Ⅱ．学 会 発 表

１．国際学会

1) Inoue, S., Kojima, D., Boldbaatar, B., Sugiura, N., Noguchi, A. and Park C.-H. Histopathogenesis of paralytic rabies in mice following inoculation of the CVS-11 strain into the triceps surae muscle. 43rd joint working conferece on viral diseases of US-Japan Cooperative Medical Science Program. 20-22 July, 2009. Philadelphia, USA.

2) Orbina, J.R., Saito, M., Kamigaki, T., SDe Guzman, A., Inoue, S., Noguchi, A., Manalo, D., Demetria, C., Quiambao, B., Segubre-Mercado, E., Miranda, M.E., Suzuki, A., Lupisan, S., Olveda, R., and Oshitani H. Molecular Epidemiology of Rabies in the Philippines. International Joint Forum on Infectious Diseases. 16-17 September, 2009. Bangkok, Thailand.

２．国内学会

1) 今岡浩一, 野村篤史, 今西一, 木村昌伸, 鈴木道雄, 山田章雄, 志水英明. *Brucella canis* 感染症例とその背景、事後対応. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月、東京

2) 鈴木道雄, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. イヌ・ネコ咬傷感染症原因菌(*Capnocytophaga*、*Pasteurella*)の薬剤感受性. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月、東京

3) 古谷明子, 吉田里美, 久保綾, 山下麻衣子, 伊藤達章, 鈴木道雄, 大楠清文. 血液培養で陽性シグナルを呈しなかった *Capnocytophaga canimorsus* による敗血症の 1 例. 第 21 回日本臨床微生物学会, 2010 年 1 月、東京

4) 小嶋大亮、朴 天鎬、辻川真太朗、小原慶子、野口 章、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス（CVS-11）を脳内接種した BALB/c マウスの脳脊髄に関する病理学的研究。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月、宇都宮

5) 野口 章、青木憲雄、佐藤 克、Boldbaatar Bazartseren、杉浦尚子、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄、井上 智。飼育犬の狂犬病ワクチン接種による防御抗体産生能。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月、宇都宮

6) Boldbaatar Bazartseren、Naoko Sugiura、Jun Ryan C. Orbina、Catalino Demetria、Akira Noguchi、Mary Elizabeth Miranda、Akio Yamada、Satoshi Inoue。Rapid detection of street rabies virus by RT-LAMP。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月、宇都宮

7) 小嶋大亮、朴 天鎬、小原慶子、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤 豪、野口 章、畑井 仁、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス（CVS-11）を後肢筋肉内に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの脊髄に関する比較病理学的研究。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月、鳥取

8) 杉浦尚子、Demetria Catalino、Boldbaatar Bazartseren、Manalo Daria、小嶋大亮、朴 天鎬、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、佐藤 豪、山田章雄、Quiambao Beatriz、井上 智。迅速免疫組織化学とプラスミド免疫抗体を利用した狂犬病ウイルス簡易検査系の確立。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月、鳥取

9) 齊藤麻理子、井上 智、神垣太郎、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、関塚剛史、黒田 誠、鈴木 陽、押谷 仁。フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討。第 50 回日本熱帯医学会大会、2009 年 10 月、宜野湾

10) 齊藤麻理子、井上 智、神垣太郎、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、関塚剛史、黒田 誠、鈴木 陽、押谷 仁。フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

11）黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上 智。全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索。第 92 回日本細菌学会・関東支部会、2009 年 11 月、東京

12) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上 智。全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索。第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜

13) 坂野聡美、奥谷晶子、井上 智、黒田 誠。炭疽菌病原プラスミドにコードされる分泌タンパク質の培養細胞への影響。第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月、横浜

14) 朴 天鎬、中西 中、小山田敏文、佐藤久聡、進藤順治、藤田 修、堀田明豊、棚林 清：野兎病菌(*Francisella*

tularensis)に感染後死亡したノウサギに関する病理学的研究。　第 147 回日本獣医学会学術集会　2009 年 4 月、宇都宮

15)　堀田明豊、棚林　清、山本美江、藤田　修、宇田晶彦、溝口俊夫、進藤順治、朴　天鎬、小山田敏文、畑井仁、工藤　上、山田章雄：国内野生動物からの野兎病菌検出。　第 149 回日本獣医学会学術集会　2010 年 3 月、東京

３．セミナー・講演等

1)　鈴木道雄，木村昌伸，今岡浩一，山田章雄．*Capnocytophaga canimorsus* 感染症．第 9 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 2009 年 11 月、東京

2)　今岡浩一．日本におけるブルセラ症の現状: 特別講演．第 47 回レプトスピラ･シンポジウム, 2010 年 3 月、東京

3)　Inoue S. Research for rabies prevention in Japan. RITM-TOHOKU research collaboration workshop: working towards rabies control in the Philippines. RITM training center, Alabang, Muntinlupa city, the Philippines. April 29-30, 2009.

4)　井上　智。狂犬病の予防（発生を想定した取り組み）。狂犬病予防及び動物愛護関係協議会合同会議。九州地区獣医師会連合会。2009 年 8 月 6 日、福岡

5)　Inoue,S. Rabies. Core Curriculum for Zoonosis Control 2009. Global COE (Center of Excellence) Program “Establishment of International Collaboration Centers for Zoonosis Control”, Global COE program Hokkaido University, Hokkaido, 31 August,

6)　井上　智。狂犬病の発生を想定した取り組みについて。宮崎県獣医師会公衆衛生講習会。宮崎県獣医師会。宮崎県総合保健センター。2009 年 9 月 18 日、宮崎

7)　井上　智。人獣共通感染症について知る：社会人として知っておいて欲しいズーノシス。早稲田大学、規範科学総合研究所、レギュラトリーサイエンス教育講座（WT221 シラバス（09 後期））。2009 年 10 月 29 日、東京

8)　井上　智。平成 19 年に徳島県で開催された狂犬病の国内発生を想定した実地訓練から学ぶ（有事の際に必要となる行政対応における課題点とマニュアル整備等の意義）。平成 21 年度 動物由来感染症対策（狂犬病を含む）技術研修会。厚生労働省健康局結核感染症課。2009 年 11 月 6 日、東京

9)　井上　智。狂犬病への取り組み（発生を想定した対応策）。外国犬不法上陸防止対策連絡会議。北海道根室保健福祉事務所。2009 年、11 月 11 日、根室

10)　井上　智。狂犬病への取り組み（発生を想定した対応について）。平成 21 年度 獣医職研修（初級）。東京都福祉保健局健康安全部。2009 年 11 月 13 日、東京

11)　井上　智。海外における狂犬病の現状と課題について（狂犬病への取り組み - 発生を想定した対応について）。狂犬病講演会。福井県獣医師会。2009 年 12 月 3 日、福井

12)　井上　智。人獣共通感染症-社会人として知っておいて欲しいズーノシス；特別講義．公衆衛生学 III。2009 年 12 月 17 日、東京

13)　井上　智。準量産型解剖手技モデル（犬解剖手技・骨切断モデル）を用いた実技演習。準量産型解剖手技モデル（犬解剖手技・骨切断モデル）の使用に関する技術講習会。2010 年 2 月 25 日、東京

14)　井上　智。他国における狂犬病の発生について。平成 21 年度 狂犬病予防業務担当者会議。厚生労働省健康局結核感染症課。2010 年 2 月 26 日、東京

15)　井上　智。準量産型解剖手技モデル（犬解剖手技・骨切断モデル）の活用について。平成 21 年度 狂犬病予防業務担当者会議。厚生労働省健康局結核感染症課。2010 年 2 月 26 日、東京

16)　井上　智。準量産型解剖手技モデル（犬解剖手技・骨切断モデル）を用いた実技演習。平成 21 年度 狂犬病予防業務担当者会議。厚生労働省健康局結核感染症課。2010 年 2 月 26 日、東京

17)　棚林　清：野兎病について。衛生微生物技術協議会第 30 回研究会　平成 21 年 7 月 10 日、堺

18)　棚林　清：動物由来感染症。平成 21 年度獣医師高度技術研修事業。東京大学動物医療センター　平成 21 年 12 月 4 日、東京

19)　棚林　清：人獣共通感染症について－話題の感染症と今後の課題－。平成 21 年度岩手県獣医師会研修会　平成 22 年 2 月 27 日、盛岡

20）棚林　清：鳥インフルエンザウイルスの病原性の違いについて:　平成 21 年度動物の輸入届出業務に係る担当者会議　平成 22 年 3 月 5 日、東京

１３．血液・安全性研究部

部長　濵口　功

概　要

血液・安全性研究部はワクチン、血液製剤、及び体外診断薬の品質に関する国家検定および標準品の整備、またこれらの業務に関連した科学的調査･研究を行っている。当部は４室で構成されており、第１室（血液製剤室）は血液製剤に関わる業務、第２室（輸血病態室）は輸血関連病態に関わる業務、第３室（物理化学室）は物理化学に関わる業務、第４室（ワクチン・血液室）は安全性（毒性試験など）に関わる業務を行っている。

平成２１年度は当部において試練の年であった。新型インフルエンザワクチンの出検数の急増およびインフルエンザ関連ワクチンの出検数の増加により、一部検定業務が逼迫したものの、行動計画に基づき安全なワクチン供給のためのロットリリースにつとめた。部員が一丸となり、底力を発揮することができた。一方で新しいタイプのワクチンが海外より導入された。これは新規のアジュバントを含有することにより、少量のワクチン抗原で高い免疫能誘導を期待できるものである。今後、このようなアジュバントの導入が急速に進むことが想定され、安全性を含めた品質管理における更なる対応が求められるであろう。当部としては、既存の試験法での対応を検討するとともに、新しい技術を導入した安全性試験の開発・改良に関する研究を推進したい。また、国際的視野に立ったワクチンのロットリリースのあり方についても、真剣に検討すべき時期に来ている。日本の優れた点を保ちつつ、国際化に対応したシステムの構築に努める。

血液製剤についても、ワクチンと同じく、品質管理の国際化は必須となりつつある。ロットリリースの今後のあり方の検討、血液を介する病原体検出のために必要な標準品の整備は喫緊の課題である。現在Ｅ型肝炎ウイルスRNAの国際標準品をWHOと協力して作製している。この他に、品質管理試験法の改良や試験に用いる標準品、参照品の整備も重要で、積極的に取り組むとともに、試験の精度および信頼性の向上に努めていきたい。一方で、当部の新しい試みとして、血液製剤に関連する病原体検出法の新規開発、血液製剤の副反応に関するモニタリングの確立は着実に成果を挙げつつあり、今後更なる発展を目指す。

当部の研究は、厚生労働省科学研究費および文部科学省科学研究費の援助をうけて活発に行われている。現在建設計画中の１０号棟（仮称）に部内の研究機能を集約し、ワクチンおよび血液に関する研究の活性化を図っていきたい。

人事の面では、平成２１年４月１日より、山口一成前部長の後任として、浜口功が部長の任にあたっている。平成２１年８月１日に倉光球が任期付研究員として第４室に着任した。平成２１年１０月に第４室の非常勤職員、鶴原百香が退職し、１１月に第４室の非常勤職員、荒木久美子が採用された。

業　績

調査・研究

Ⅰ．血液製剤の安全性確保に関する研究

１．人アンチトロンビンⅢ国内標準品（第一世代）の作製

今まで人アンチトロンビンⅢの力価の国内標準品が整備されていなかったので、このたびＷＨＯ国際標準品に基づいて力価を定めた国内標準品を新規に作製することとした。感染研と国内で販売しているアンチトロンビンⅢ製剤を製造する製造業者３社とで共同研究を実施して候補品の測定を行い、感染研が測定結果の解析を行った。その結果、分注量 2mＬの凍結乾燥品で表示力価 49 IU/vial の国内標準品（第一世代）を制定した。

[水澤左衛子、岡田義昭、落合雅樹（品質保証室）、山口一成、浜口功]

２．血液製剤の核酸増幅試験の精度管理に関する研究

（１）血液製剤の安全性向上のために実施するＢ型肝炎ウイルス核酸増幅試験の遺伝子型特異性に関する研究

血漿分画製剤製造所は原料血漿プールにおいて､また、衛生検査所は遡及調査のガイドラインに基づく輸血後検査として B 型肝炎ウイルスの核酸増幅検査(HBV-NAT)を実施している。現に実施している HBV-NAT によって日本で検出される遺伝子型の HBV を検出できているかを確認することを目的として､遺伝子型 A～D からなるパネルを用いたコントロールサーベイを実施した。対象施設である全 12 機関 16 施設が参加し、21 組の測定が実施され、全施設が結果を提出した。すべての測定において、遺伝子型に係わらず HBV-DNA を検出あるいは定量できることを確認した。

[水澤左衛子、岡田義昭、種市麻衣子、野島清子、斎賀菊江、浜口功]

（２）核酸増幅試験のための HBV 遺伝子型国際参照パネル作製のための WHO 国際共同研究への参加

核酸増幅試験(NAT)のための HBV 遺伝子型国際参照パネルを新規に作製するための国際共同研究に参加した。12 カ国から 17 研究機関が参加し、第二次 HBV-DNA 国際標準品と遺伝子型 A～G の 15 検体とからなる国際参照パネル候補品の力価を測定した｡提出された 19 組のデータを Paul-Ehrlich-Institut が解析し、どの遺伝子型の検体もほとんどの参加者によって大差なく測定できることが示された｡2009 年 10 月の WHO の ECBS 会議において NAT のための HBV 遺伝子型国際参照パネル（第一次）として承認された。パネルの個々の検体の力価は表示しないことになった。 [水澤左衛子]

３．E型肝炎ウイルスRNAの国際標準品及び国内標準品作製のための共同研究

従来､E型肝炎は発展途上国における糞便を介した感染症と考えられていたが、近年になって日本を含む先進国においてもE型肝炎ウイルス（HEV）が常在することが明らかになり、輸血による感染が問題になっている。ドイツのポール エーリッヒ研究所と日本の感染研において夫々国際標準品と国内標準品の作製 が進められていたが､今般､WHO共同研究によって国際標準品候補品と日本の国内標準品候補品の力価を一緒に決定することになった。本共同研究により国際標準品の制定と同時期に高品質な国内標準品を制定することが可能になった。

[水澤左衛子、岡田義昭、百瀬暖佳、浜口功]

４．ウイルス等感染症の体外診断薬の評価のための標準品等の整備に関する研究

WHOのECBS会議とNIBSC主催の第二回SoGAT-CV会議に参加し、体外診断薬のための標準品等の整備に関する情報を収集した。その結果、2009年に開催された第二回WHOコラボレーションセンター会議において「体外診断薬のための標準品整備5ヵ年計画2007」が改訂され、それに基づいてECBS会議においてHIV-2-RNA国際標準品とHBV遺伝子型参照パネルが制定され、HEV-RNA国際標準品とHIV抗体国際参照パネルの新規作製が承認されたことが明らかになった。国立感染症研究所では体外診断薬委員会を通じてHEV-RNA国際標準品とHIV抗体国際参照パネル作製のためのWHO国際共同研究に参加することになった。

［水澤左衛子、水落利明、浜口功、小林和夫(免疫部)］

５．国内献血血液を用いた血清／血漿パネル（国立感染症研究所国内標準パネル）の整備

これまでに、HIVAg, HBsAg, HCVAb,HCV RNA,HBV DNA,HAVAb の国内標準パネル整備が完了した。国立感染症研究所国内標準パネル運営委員会規程（案）が作成され、今後のパネル管理及び譲渡申請に関する審査等の事項を適正かつ円滑に実施するために標準パネル運営委員会が設置された。また、臨床検査薬協会を通じてキットメーカーへの説明会を行った。現在、今後のパネル譲渡に関する実務について、本省審査管理課との調整をはかっている。

[水落利明、鈴木哲朗（ウイルス第２部)、巽正志（エイズ研究センター)、大西和夫（免疫部）]

６．体外診断用医薬品の性能向上に向けた研究

HBs 抗原検出キット、および HCV core 抗原検出キットについて、HBV および HCV の genotype が、それぞれのキットの検出感度に及ぼす影響を検討した結果。ある特定の genotype を持つウイルスによってコードされた各抗原に対する感度に相違があることが明らかになり、その原因がアミノ酸１残基の違いによるものであることを明らかにした。メーカーと協議の上、これらキットの改良を促し、genotype による感度の相違が解消された。

[水落利明、水澤左衛子、野島清子、岡田義昭、鈴木哲朗（ウイルス第２部）]

７．血液を介するウイルス検出システムの開発

本年は HIV、HCV、HBV に PvB19 と WNV を加えた５種のウイルスに対応した DNA-Chip を作製した｡このチップを使用し、血漿中から調整したウイルス核酸を用いて検出感度の評価を行った結果、1PCR 反応液中に２-10IU（又は Copies）という高感度を得ることができた。また各ウ

イルス核酸の増幅産物を混ぜた合わせた状態で検出を行っても、交差することなく目的のウイルス核酸のみを検出することができ、1 枚の DNA-chip 上で複数の病原体を同時に検出することが可能であることを示した。更に、ウイルス変異株の配列を基に作製した合成オリゴを用いて検証した結果、Degenerate プライマーと検出用プローブを組み合わせることで、ほぼ全ての変異株に対応することが可能であることも示唆された。そこで本研究の成果を基に平成２１年末に特許出願の申請を行った。特願 2009-283366

[滝澤和也、水上拓郎、倉光球、水谷哲也（ウイルス 1 部)、遠藤大二（北海道大学)、古田里佳（日赤)、中島龍生（日本パーカーライジング)、浜口功]

８．非対称 RT-PCR 核酸クロマト法を用いた新型インフルエンザ A/H1N1pdm 簡便検出法の開発

医療機関や検査センター等で新型インフルエンザを診断することは、投薬選択、治療方針を決定する上で重要である。我々は、汎用 PCR マシンを用いて新型インフルエンザを３時間１５分で検出できる方法として、非対称 RT-PCR 核酸クロマト法により新型インフルエンザを特異的に高感度に検出する方法を開発した。本検出法は HA 遺伝子をターゲットとしており、Taqman 法とほぼ同程度の感度と特異性を持つ.非対称 RT-PCR 反応産物を核酸クロマトデバイスに滴下して目視で判定する方法で、１患者１反応で判定可能である。この方法を用いた検査キットが開発され、2009 年 11 月に研究用試薬として発売された。

[野島清子、影山努（インフルエンザウイルス研究センター)、中内美名(インフルエンザウイルス研究センター)、田代眞人（インフルエンザウイルス研究センター）和山行正（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所)、浜口功]

９．病原体不活化に関する研究

輸血を介する感染事故を予防するために、病原体の不活化は重要なことだが、赤血球製剤における病原体の不活化法は実用化されていない。我々は、加圧処理による不活化の研究から、酸性条件で加圧を行なうと不活化効果が増強することを見いだした。今年度は、赤血球が耐え得る酸性条件と病原体の不活化について検討した。溶血が生じない酸性条件ではウイルスの不活化は困難であったが、加温することで仮性狂犬病ウイルスに有効な不活化効果が認められた。しかし、HCV のモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルスには効果がなかった。ウイルスによって感受性が異なることがわかったが、予想した以上に不活化の条件に赤血球が耐え得ることも判明した。

[岡田義昭、野島清子、浜口功]

１０．日本における血液製剤の副作用サーベイランス体制の確立に関する研究

2007 年 11 月に輸血製剤による副作用全数把握に向けてのサーベイランスシステムを構築し、オンライン登録による副作用収集の体制づくりの検討を行っている。7 つの大学病院から開始したパイロットスタディは、2009 年度に 300 床以下の 6 病院が加わり、順調に進行している。2009 年に収集された結果を「輸血製剤副反応動向 -2009-」として報告した。今後全国網羅のシステムの構築を目指すための基盤作りとして、新たに全国の大学病院の 34 施設が 2010 年度よりパイロットスタディに参加することとなった。

[小高千加子、岡田義昭、種市麻衣子、大隈和、浜口功]

１１．本邦における HTLV-1 感染及び関連疾患の実態調査と総合対策

ヒトT細胞白血病ウイルス１型（HTLV-1）関連疾患である成人T細胞白血病（ATL)、及びHTLV-1関連脊髄症（HAM）の現在の実態把握を全国調査により実施した。ATLの調査では、高齢者を中心に今後も持続的にATLは発症し、患者はますます高齢化すると推測された。HAMの調査（中間報告）では、新規に発症し診断される患者は増加傾向にあり、HAM患者は九州以外の大都市でも多くみられることが分かった。また、各施設において独自に行われているウイルス量の測定について、全国的なサーベイランスを行う手段としての標準的な測定法の確立に向けた検討を行った。

[大隈和、山口一成、山田恭暉（長崎大)、岡山昭彦（宮崎大)、佐竹正博（日本赤十字社)、出雲周二（鹿児島大)、望月學（東京医科歯科大)、渡邉俊樹（東京大)、徳留信寛（国立健康・栄養研究所）]

Ⅱ．輸血・細胞治療を介する病原体に関する研究

１．プリオンの研究

TritonX-100 や SDS は代表的な界面活性剤であるが、これらの処理がウイルス除去膜による異常プリオン除去に与える影響について解析した。それぞれの界面活性剤を用いて、室温で異常プリオンを含む培養液を 1 時間反

応させた後、ウイルス除去膜で濾過し、ろ液を希釈して細胞に感染させ、濾過前後の感染価を求めた。Triton 処理した異常プリオンはウイルス除去膜によって効率良く除去できたが、SDS では全く除去できなかった。界面活性剤の種類によって異常プリオンの性状が変化することが示唆された。

［岡田義昭、水澤左衛子、野島清子、浜口功］

２．B 細胞における HCV 持続感染の機構解析

昨年度の研究で HCV 慢性感染患者においては末梢血 B 細胞に HCV が感染していること、また HCV 蛋白の発現が見られることから、HCV が B 細胞内で増殖していることが示された。今年度の研究においては、HCV に感染にした B 細胞ではウイルス排除・防御に関わる自然免疫系が機能していないことを明らかにした。このことが B 細胞での HCV の持続感染を可能にし、B 細胞機能異常と関連していることが示唆された。また、C 型肝炎陽性肝移植患者では肝炎ウイルスは高率に移植肝に再感染し、肝硬変などを起こすことから、HCV が潜伏感染している B 細胞の除去が再感染防止に重要であると考えられる。

[伊藤昌彦、村上恭子（ウイルス第２部)、鈴木哲朗（ウイルス第２部)、益見厚子、持田恵子（細菌第２部)、鈴木美穂（埼玉医大)、池淵研二（埼玉医大)、溝呂木ふみ（慈恵医大第３病院)、水落利明］

３．C 型肝炎ウイルス(HCV)感染患者由来 B 細胞の解析

我々は寫血療法を行なっている HCV 感染者の血液から B 細胞を分離し、遺伝子等の発現について正常者の細胞と比較した。インターフェロン制御関係の遺伝子について検討すると，HCV に対する細胞質のセンサーである RIG-I の上昇が見られた。しかしながら、HCV 感染者 B 細胞においては RIG-I を介した下流の IFN 産生までの経路は抑制されていた。また IRF ファミリーのうち IRF-2 が遺伝子、タンパクレベルにおいて 感染者由来血液 B 細胞で上昇していることを見いだした。さらに RIG-I promoter 上に IRF の結合部位 ISRE like-site が存在し、IFN 刺激によって RIG-I promoter が活性化されるが、Huh7 培養細胞を用いた系で IRF-2 遺伝子導入によってもプロモーター活性は上昇した。このことから IRF-2 は RIG-I を転写レベルで正に制御していることが明らかとなった。

［益見厚子］

４．新規抗 HIV-1 バイオ治療薬候補／組換え VSV の開発とヒト化マウスを用いた評価

ヒト免疫不全ウイルス１型（HIV-1）感染症/エイズに対する現在の多剤併用療法は効果的ではあるが、副作用や薬剤耐性ウイルスの出現等の問題点があるため、必要に応じてそれを補完或いは代替する新規薬剤の開発が必要である。そのため我々は、これまでの薬剤にない作用機序を持った新規薬剤候補である組換え水疱性口内炎ウイルス（VSV）を種々作製し、その治療効果の評価を、*in vitro* のみならず､HIV-1 が感染したヒト化マウスを用いた *in vivo* において行っている。

［大隈　和、鶴野親是、深川耕次、渡辺　哲（エイズ研究センター)、山本直樹（エイズ研究センター)、田中勇悦（琉球大学)］

５．新規レポーターアッセイ系を用いた HIV-1 スプライシング機構の解析

HIV-1 は個々のウイルス蛋白を発現させるために複雑な選択的スプライシングを行っているが、このスプライシング機構に宿主因子が重要な役割を果たしている。我々は、HIV-1 スプライシング機構への関与が想定される HIV-1 pre-mRNA 結合因子を既に同定しており、この因子の機能／作用を、mRNA 発現の変化をレポーター蛋白発現の変化に置換することでスプライシング活性への作用を生細胞で検出できる新規アッセイ系を構築して解析している。

［大隈和、鶴野親是、倉光球、大江賢治（藤田保健衛生大)］

６．ATL モデルマウスにおける腫瘍幹細胞の同定

近年、癌細胞への化学治療に対して耐性を示す腫瘍幹細胞（CSC）の存在が注目されている。我々は昨年、ATL 様病態のモデルマウス（HTLV-1 Tax トランスジェニックマウス）の腫瘍細胞中に高い腫瘍再構築能を持った腫瘍幹細胞が存在していることを解明した。そこで本年はマイクロアレイ解析を用いて腫瘍幹細胞における発現遺伝子のプロファイリングを行った。腫瘍幹細胞においては造血幹細胞や腫瘍関連の遺伝子として報告されているものの多くが高発現していたが、特に TEK (Tie2), CD93 (AA4.1), Cxcl9, CD44, c-Kit (CD117)の発現が顕著に亢進していた。現在、さらに詳細な機能的遺伝子の解析を進めると供に、これらの機能分子が腫瘍幹細胞の維持機構、あるいは腫瘍細胞の増殖に果たす役割について研究を進めている。

［滝澤和也、水上拓郎、大隈和、長谷川秀樹、浜口功、山口一成］

Ⅲ．品質管理に関する業務、研究

１．新規ワクチン承認前試験等における物理化学試験

(1) はしか風しん混合生ワクチン

上記につき、含湿度試験を行った。測定値は、基準を満たしたが、くりかえし測定により、2 ヶ月ほどの保存中に含湿度値が上昇する傾向が認められた。申請書類中にも、経時的に数値が上昇することが記載されており、申請書中に記載された力価の低下と考え合わせると、安定性に問題がある可能性が考えられた。

［田中明子、矢野茂生］

(2) 乳濁（細胞培養）A 型インフルエンザ HA ワクチン

新型インフルエンザ流行に伴う、上記ワクチンの輸入に際して、国家検定の試験項目を検討するため、参考試験を実施した。たんぱく窒素含量試験、及びアジュバント成分である、スクワレン及び、α-トコフェロール含量試験を行った。たんぱく窒素含量試験は、たんぱく質含量がごく微量であるため、試験実施が困難と考えられたが、残り 2 種類は、国家検定試験として実施可能であると判断し、計 95 検体ほど試験を実施した。

［田中明子、笠井道之、矢野茂生］

２．平成２１年医薬品製造業一斉監視指導抜き取り試験検査品(抗生物質)の赤外吸収(IR)スペクトル法による確認試験

KBr ディスク法を実施し、標準品と検体のスペクトルの比較から同定確認を試みた。

(1) 日本薬局法注射用セフタジシム(静注用、10 社、14 ロット)の結果

検体は 1400-1500 cm^{-1}および 880 cm^{-1}の領域(炭酸ナトリウムに由来する)を除いていずれも標準品と同じ波数に吸収を認めた。これらの検体はいずれも標準品と同等の成分を含有すると推定された。［笠井道之］

(2) 日本薬局法セフポドキシムプロキセチル錠(錠剤：4 社、4 ロット、細粒：2 社、2 ロット)の結果

いずれの検体も一部の領域で標準品と同じ波数に吸収を認めた。しかし、その他の領域では異なる波数に吸収を認めた。本試験法では標準品と同一製剤であるかを判定できなかった。［笠井道之］

３．平成２１年度抗生物質収去品ＮＭＲスペクトル確認試験（^{1}H、^{13}C-スペクトル）

(1) セフタジジム（注射用：１４検体）の確認

標準品、検体ともに、シグナルがほぼ分離され、シフト、パターンがほぼ同一であり、一次解析が可能な同定に適したスペクトルが得られた。検体スペクトルはメーカー、ロットに関わらず、いずれも類似した結果を与え、添加剤ピークが検出されず、表示成分のみと考えられた。等量混合スペクトルは全てのシグナルが標準品と一致した。微量の不純物シグナル（1.2ppm）の有無から、製剤の原薬が８ロット（５社）と６ロット（4 社）の２つに分類された。［矢野茂生］

(2) セフポドキシムプロキセチル（錠剤：４検体、シロップ：2 検体）の確認

^{13}C-スペクトルは、ほぼ等量のエピマー混合物（１：１）を示し、水/重クロロホルムによる抽出処理の有無により、著しい違いが観測された。一方、^{1}H-スペクトルでは単一成分を示す情報のみであった。添加物由来のシグナルを除けば、検体スペクトルはメーカーや形状に関わらず、標準スペクトルと類似のスペクトルを与えた。等量混合スペクトルは全てのシグナルが標準品と一致した。［矢野茂生］

Ⅳ．品質管理試験法の開発・改良

１.インフルエンザワクチンの新しい品質管理試験法構築に向けた試み

これまでに我々は、インフルエンザワクチンの新たな品質管理法として、トキシコゲノミクスの技術を応用した新規安全性試験法の構築に取り組んできており、毒性評価のためのマーカー遺伝子を約20同定している。マーカー遺伝子の発現解析を用いた新規安全性試験法の感度検討のため、ワクチンや高濃度原液等を用いて解析を行ったところ、ワクチン接種ラットの生体反応を高感度に検出できることが明らかとなった。現在試験法の簡便化に向けた取り組みを行っている。

［百瀬暖佳、板村繁之(インフルエンザウイルス研究センター)、甲斐光(デンカ生研)、渡辺隆雄(北里研究所)、福家功(阪大微研)、尾堂浩一(化血研)、倉光球、益見厚子、滝澤和也、浜口功］

２．インフルエンザワクチンの新しい性状解析法

エーテル処理、ホルムアルデヒドによる不活化等の製造工程でのウイルスの変化と、それらの免疫原性について解析するとともに、市販品についても検討した。不活化後も、ウイルス核酸の PCR による増幅は可能であったが、ウイルス型による差があった。HA 製剤では、製造所間での差が大きく、増幅効率において最大で 50 倍程度の差が認められた。核酸が維持されている製品ほど、イン

フルエンザ関連遺伝子の発現誘導が高い傾向があり、免疫能との関連が示唆された。また、ワクチン中の粒子径の分布と核酸の増幅効率の間に関連があり、製造所間でのウイルス由来成分の差が明確になった。

［田中明子，笠井道之，矢野茂生］

３．粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

粘膜投与等の新投与経路ワクチンは不活化全粒子型ウイルスまたはウイルスコンポーネントに TLR リガンドをアジュバントとして加え、免疫原性を高めた製剤である。転写因子(NF-kB)の下流にレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト細胞株(THP 細胞)を用いて不活化型全粒子と TLR リガンドの自然免疫誘導能力を測定した。同時に、培養液中のサントカインを測定し、IL-1β と IL-18 の測定がワクチンの免疫原性を評価するのに有効であることを示した。［笠井道之］

４．重合物否定試験の試験法標準化と試験法バリデーションついての研究

静注グロブリンにおける重合物否定試験は、アナフィラキシーショック等の副反応の原因となるグロブリン重合物含量が 1.0%以下であることを確認する試験である。現在の規格値はカラムゲルクロマトグラフ法で品質管理が行われていた時代に規定されたが、現在、高速液体クロマトグラフ法を用いており、以前は分離できなかったグロブリン三量体およびオリゴマーが分離できるようになっている。血液製剤メーカーの品質管理部との共同研究により本試験の試験法および規格値の見直しを行い、現在の分析技術に見合った分析方法で品質管理を実施して製剤の安全性を担保することを目指している。

［野島清子、岡田義昭、浜口功］

５．超遠心分析を用いたグロブリン凝集体の解析

静注用グロブリンに含まれるグロブリン凝集体量は高速液体クロマトグラフ（サイズ排除クロマト SEC）法により管理されているが、SEC による分析はカラム担体との相互作用による影響を避けられない。FDA はモノクローナル抗体医薬品中のグロブリン凝集体の測定法として担体の影響を受けない超遠心分析法を推奨している。そこで静注用グロブリンに含まれる凝集体量を超遠心分析法により測定し、SEC 法による解析結果と比較検討をし、グロブリン製剤の品質管理法として最適な試験法を検討した。

［野島清子、岡田義昭、内山進（大阪大）］

Ⅴ．ワクチン開発および接種に関する研究

１．ワクチンの非臨床・臨床ガイドラインの作成

ワクチンの薬事承認の手続きを円滑にすすめるために、品質・有効性・安全性の確認に関し開発時に利用されるガイドラインの作成が望まれている。日米欧におけるワクチン承認審査等に関する事例を調査するとともに、一般の医薬品とは異なるワクチンの特性を踏まえた非臨床・臨床ガイドラインの作成を行った。

［浜口功、宮崎義継（生物活性物質部）、駒瀬勝啓（ウイルス３部）、神谷齊（三重病院）、倉田毅（富山衛研）、井上達（国立衛研）、伊藤澄信（国立病院機構）、石井健（阪大微研）、川上浩司（京都大）］

２．獲得性免疫賦活化方法の開発とその効果の検証法および副作用評価法の確立

胸腺内中枢性自己寛容性成立の分子機構：胸腺上皮細胞が発現する自己抗原は胸腺内未熟 T 細胞が MHC 拘束性と自己寛容性を獲得する過程に関与する。胸腺上皮培養細胞内の MHC クラスⅡ拘束性細胞質抗原提示過程について調べ、細胞質抗原提示にマクロオートファジーが関与すること示した。さらに、新生児胸腺凍結切片を用いて、胸腺上皮細胞内においても細胞質抗原提示にマクロオートファジーが関与することを示した。［笠井道之］

３．TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

新規 A 型 CpG-DNA である G9.1 の作用について、成人ヒト末梢血から採取した形質細胞様樹状細胞（ｐDC）に対して RS ウィルス-A2 株を感染させ、G9.1 によって生じる細胞反応への影響を調べた。その結果、ｐDC は、G91 に反応して IFN-α をわずかながら産生し得ることが示され、TRAIL 発現の増強が認められた。IFN-α は、IL-29 または IP-10 と G91 を共添加すると G91 単独添加時の約２倍多く産生された。IFN-α 産生抑制能のある微生物感染に対しては、G91 を効果的に用いるために、何らかな方法で感染の影響を阻止する必要がある。

［前山順一、伊保澄子（福井大）、山本三郎（日本ＢＣＧ研究所）］

４．細菌性感染症の粘膜ワクチン開発

劇症型 A 群連鎖球菌の NADase と M タンパクについて rCTB をアジュバントとして用いて粘膜免疫した場合を検討した。はじめに、両抗原を rCTB と共にマウスへ経鼻

投与したが、血清特異抗体価は両抗原共に上昇しなかった。そのため各抗原のトキソイド化を試みたところ、NADase トキソイドを経鼻免疫した場合、有意に特異的 IgG 抗体価および中和抗体価が上昇した。これは劇症型発症抑制効果が期待できると考えられた。今後 M タンパクについて検討を進める。

［前山順一、井坂雅徳(名古屋市大]

５．BCG ベクターの開発と応用

（１）エイズワクチン

高コピー変異型プラスミドベクターを構築し、HIV の Gag 遺伝子を組み込み、BCG に導入して、外来抗原を高発現する組換え BCG ワクチンの構築を試みた。BCG ベクターについて、コドン至適化以外で外来抗原発現を増強できる方法を検討し、プラスミドのレプリコンに変異を導入した高コピー変異型プラスミドを用いたところ、オリジナルのプラスミドを用いた場合よりも BCG での HIV-1 Gag の発現レベルが約 10 倍上昇するにもかかわらず、組換えプラスミドが安定に保持されることがわかった。このベクターは、エイズワクチン開発において極めて有用である。

[前山順一、松尾和浩(エイズ研究センター)、矢野郁也(日本ＢＣＧ研究所)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（２）エイズワクチンのサルでの評価系の検討

rBCG-SIVgag/rDIs-SIVgag で免疫したカニクイザルにおける、SIVmac239 感染によるウイルス血症を有意に低下させ、サルでの有効性を確認した。細胞性免疫の評価は、SIVgag 蛋白刺激に対する T 細胞の IFNγ、IL-2、TNFα産生を総合的に評価する必要があることが示唆された。

［前山順一、網康至（動物管理室)、松尾和浩(エイズ研究センター)、矢野郁也(日本ＢＣＧ研究所)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（３）栄養要求性を指標とする新しい抗酸菌の宿主－ベクター系開発

抗生物質耐性遺伝子の代わりに ThyX を指標とした宿主－ベクターシステムの構築を試みた。BCG ΔThyX を宿主、thyX を保持した pNN5 をベクター、7H10-ADS 寒天培地を選択培地とした組み合わせでは 85％でプラスミド保有株を得ることができた。このことは簡便な２次スクリーニングを行なうことで目的のクローンが得られることを意味しており、この宿主－ベクターシステムを利用できる可能性を示している。形質転換６カ月後のプラスミドの保持率を調べたところ、カナマイシンで選択した場合と同様の保持率であったことから、安定な宿主－ベクターシステムであることが示された。

［前山順一、大原直也（岡山大)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

６．BCG の多様性に関する研究

（１）BCG 亜株の脂質生化学的比較

BCG には多くの亜株が派生しており、そのうちの 14 株についてフェノール糖脂質（PGL)，フチオセラン酸ジマイコセロセート（phthiocerol dimycocerosate，PDIM)の発現を検討したところ、4 株（Moreau，Glaxo，Tice，Australian）で欠損し、10 株（Russian，Japanese，Birkhaug，Danish，Connaught，Phipps，Pasteur，Montreal，Mexican，Sweden）で発現していた。

[前山順一、藤原永年（大阪大)、矢野郁也(日本ＢＣＧ研究所)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（２）BCG 亜株の各種ストレス感受性の比較

In vitro での一酸化窒素ストレス、及び酸化ストレスに対する感受性試験を行った結果、Japan、Danish、Glaxo、Pasteur 株が一酸化窒素に対して比較的耐性であり、Russia、Japan、Birkhaug、Connaght 株が過酸化ストレスに対して比較的耐性を示した。

[前山順一、藤原永年（大阪大)、矢野郁也(日本ＢＣＧ研究所)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（３）BCG-I と BCG-II の脂質の比較

日本(Japan)株 BCG である BCG Tokyo172 の遺伝子領域 RD16 が異なっているサブポピュレーション BCG-I と BCG-II について脂質生化学的検討を加え、構成脂質を明らかにした。主要な糖脂質、リン脂質の分布を二次元 TLC で検定したところ、I 型のみに発現している糖脂質のスポットを検出した。これは BCG 菌における mycoside B に相当する PGL であると同定した。PGL の脂質部分であるフチオセラン酸ジマイコセロセート（PDIM）の有無を TLC で確認したところ PGL 同様、II 型で欠損していた。

［前山順一、藤原永年（大阪大)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（４）BCG-I 型と BCG-II 型の遺伝子発現の差異

BCG Tokyo 株 I 型と II 型の遺伝子発現プロファイルを調べた結果、RD16 領域の BCG3405c-BCG3408、BCG 2953 - BCG 2957（ppsA-E)、BCG 2958 - BCG 2960（drrA-C）は BCG Tokyo 172 株 I 型で発現し、II 型では発現量がわずかであった。BCG3405c が完全長である Pasteur 株と Russia 株では BCG3405c-BCG3408 の発現が Tokyo 株 I 型と同様に認められず、BCG3405c の下流部分が欠損している Moreau 株では BCG3405c-BCG3408 のすべての遺伝子が BCG Tokyo 株 II 型と同様に発現していた。このことから、BCG3405c 内に存在する塩基配列がこの領域の遺伝子を

負に制御する可能性が考えられた。
[前山順一、大原直也(岡山大学)、藤原永年（大阪大)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

（５）BCG-I 型と BCG-II 型の遺伝子発現の差異の遺伝子導入による解析

I 型 BCG3405c あるいは BCG3406 - BCG3408 を II 型に導入することによって BCG 2953 -BCG 2958 のメッセージ RNA 量が増加した。このことから BCG3405c および BCG3406 - BCG3408 の遺伝子産物が BCG 2953 - BCG 2957 と BCG 2958 - BCG 2960 の転写を制御している可能性が示された。今後 BCG3405c および BCG3405－BCG3408 の転写調節因子としての役割を明らかにしていく必要がある。
［前山順一、大原直也(岡山大)、藤原永年（大阪大)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)］

（６）BCG-I と BCG-II の宿主の反応での比較

低用量でモルモットに免疫するとき、I 型は II 型より強い抗結核免疫誘導能があり、より強い遅延型アレルギー反応を誘導する結果が得られているが、現在用いている製品は、完全に純粋な標品ではなかった。またタイ BCG は、II 型であっても強い免疫誘導能を有し、RD16 の差異が免疫活性に本質的か検証する必要がある。そこで、クローニングした 22 株について、スクリーニング的に免疫活性を調べたところ、II 型であっても強い免疫誘導能を有する 1 株が見出された。これについて今後さらに遺伝子やその発現の差異を検討する必要がある。
[前山順一、網康至(動物管理室)、須崎百合子(動物管理室)、山本三郎(日本ＢＣＧ研究所)]

７．CTL 誘導型インフルエンザワクチンの開発

前年度までの検討により、抗原（タンパクまたはペプチド）を特定の脂質組成からなるリポソームの表面に結合して免疫することによって抗原特異的な細胞性免疫（CTL）が誘導されることが明らかになった。この抗原結合リポソームを用いて細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの創製を試みた。インフルエンザウイルスを構成するタンパクの中から CTL エピトープとなりうるアミノ酸配列を検索・同定し、リポソームに結合させてマウスに免疫したところ、インフルエンザウイルス亜型(H1N1、H3N2、H5N1）に対する感染抵抗性が誘導されることが確認されたことから、1.細胞性免疫を誘導する事によりインフルエンザウイルス感染抵抗性を誘導する事が可能である事が示唆され、2.ウイルス亜型に共通な抗原をワクチン抗原として用いることにより、新型インフルエンザにも対応可能なインフルエンザワクチンの創製が期待された。
［内田哲也、種市麻衣子］

８．肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築

今年度は本研究班の最終年度にあたり、これまでの研究成果を踏まえてユニバーサル HB ワクチン投与(universal vaccination)の必要性について行政に向けた「提言」を作成し提出した。これまでの施策では「母子（垂直）感染」による HBV 感染拡大を防ぐことに重点を置いていたが、今後は「性（水平）感染」の拡大を防ぐ必要性を強調し、我が国でのユニバーサル HB ワクチン投与導入を目指す。
[水落利明、田中憲一(新潟大)、小方則夫(燕労災病院)、岡部信彦（感染症情報センター)、多屋馨子（感染症情報センター)、片山惠子（広島大)、菅内文中（名古屋市大)]

VI. 血液学,細胞治療に関する研究

１．造血幹細胞特異的チロシンキナーゼ Tie2 の機能解析

造血幹細胞の機能発現には、造血niche を構成するniche細胞のAng1によって、造血幹細胞のTie2が活性化されることが重要であると考えられている。一方我々は、Tie2シグナルの活性化によって血液細胞でのAng1の発現が亢進し、Tie2の活性がさらに増強されることを明らかにした。i*n vivo*の移植実験において、Ang1をノックダウンした造血幹細胞では、造血再建能の顕著な低下を認めたことから、niche細胞のAng1だけでなく、造血幹細胞のAng1の重要性が示唆された。
［百瀬暖佳、滝澤和也、浜口功］

２．先天性赤芽球癆の原因遺伝子の機能解析

先天性赤芽球癆(DBA)は、造血幹細胞からの赤芽球分化・増殖異常により重症の貧血をおこす。近年、RPS19、RPS17、RPS24、RPL5、RPL11、RPL35A 等のヘテロ接合型で変異が同定され、これらの遺伝子の機能解析を行うことにより、病態解明につながると考えられる。原因遺伝子のコピー数測定法を構築し、DBA 遺伝子変異解析技術の向上を試みた。また RPS19 と始め原因遺伝子を shRNA 発現レンチウイルスベクターで発現抑制すると細胞増殖抑制が観られること、このときオートファジーを伴う細胞飢餓様の状態が誘導されることを見出した。今後、リボソームストレスから赤芽球分化抑制が誘導されるメカニズムについて解析を進め新しい治療法開発を目指す。
［倉光球、浜口功］

３．IRF-2 のマウス造血幹細胞に及ぼす影響について

これまで我々はインターフェロン制御転写因子 IRF-2 がマウス骨髄細胞の Stem cell 分画に高発現していることをリアルタイム PCR および in situ hybridization を用いて報告してきた。IRF-2 欠損マウスの骨髄細胞からセルソーターを用いて KSL（c-kit+, Sca-1+、Lin-）を分画し、KSL を別のマウスに移植する方法を用いて骨髄への生着率を見た。また KSL 以外の骨髄細胞画分も検討した。IRF-2 欠損マウスの KSL 分画が野生型のそれと比較して 3 倍程度細胞の割合が増加していることが見いだされた。IRF-2 欠損マウスの KSL を別のマウスに移植すると 3 ヶ月たってもほとんど生着しなかった。IRF-2 欠損マウスにおいて増加が認められる KSL 細胞は造血幹細胞としての正常な機能を担っていないと考えられた。そこで野生型と IRF-2 欠損マウスにおける KSL 細胞の遺伝子等の違いについて検討している。　［益見厚子］

４．マウス胸腺の微小環境に関する研究

RhoB は細胞骨格に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質ファミリーに属するが、胸腺では髄質上皮細胞に発現している。その機能を明らかにするため RhoB 欠損マウスの胸腺を調べたところ、早期の胸腺萎縮が観察された。そして、RhoB 欠損マウスの髄質上皮細胞での TGF-b receptor type II の発現が上昇していた。　これらの結果より、RhoB は髄質上皮細胞の TGF-b receptor type II の発現を制御することにより、胸腺の機能を維持していることが示唆された。　［小高千加子］

国家検定、収去試験、抜き取り検査、依頼検査、行政検査、承認前試験等の実績

１．国家検定

血液製剤力価試験：88 ロット
免疫グロブリン G 重合物否定試験：103 ロット
抗補体否定試験：67 ロット
含湿度試験：174 ロット
ホルムアルデヒド定量試験：222 ロット
たん白質定量試験：188 ロット
たん白窒素定量試験：92 ロット
凝固性たん白窒素定量試験：43 ロット
アルミニウム定量試験（スチルバゾ）：1 ロット
アルミニウム定量試験（プラズマ発光）：6 ロット
フェノール定量試験：20 ロット
MPL 含量試験：6 ロット
ヘモグロビン定量試験：6 ロット
クエン酸ナトリウム定量試験：4 ロット
ヒスタミン定量試験：2 ロット
水素イオン濃度試験：2 ロット
スクワレン含量試験：17 ロット
α トコフェロール及びスクワレン含量試験：78 ロット
異常毒性否定試験：363 ロット
発熱試験：267 ロット

２．収去試験

抗 A 血液型判定用抗体、3 サンプル
抗 B 血液型判定用抗体、3 サンプル
抗 D 血液型判定用抗体、5 サンプル
抗ヒトグロブリン抗体、4 サンプル
赤外線吸収：20 ロット
NMR 試験：20 ロット

３．抜き取り検査

力価試験：6 ロット
活性化凝固因子否定試験：6 ロット
免疫グロブリン G 含量試験：2 ロット
同定試験：2 ロット
異種たん白否定試験；2 ロット
異常毒性否定試験：8 ロット
発熱試験：8 ロット
熱安定性試験：2 ロット

4. 依頼検査

含湿度試験（水分定量法）：15 ロット
含湿度試験（乾燥減量法）：4 ロット
ホルムアルデヒド定量試験：4 ロット
たん白質定量試験：18 ロット
チメロサール定量試験：2 ロット
スクワレン含量試験：10 ロット

5. 承認前検査

チメロサール定量試験：7 サンプル
アルミニウム定量試験（スチルバゾ）：12 サンプル
水素イオン濃度試験：3 サンプル
たん白質定量試験：4 サンプル
ホルムアルデヒド定量試験：4 サンプル
浸透圧試験：1 サンプル
含湿度試験（乾燥減量法）：7 サンプル
たん白窒素定量試験：1 サンプル

スクワレン含量試験：16 サンプル以上
αトコフェロール及びスクワレン含量試験：12 サンプル以上
異常毒性否定試験：2 ロット
発熱試験：1 ロット

６．行政検査
異常毒性否定試験：2 ロット

国際協力関係業務

1) 2009年9月8日　大韓民国赤十字からの訪問を受け、講義を行った。内容は「国立感染症研究所の業務」(浜口)、「核酸増幅検査のための日本の国内標準品とコントロールサーベイについて」（水澤、岡田)、「ヘモビジランス」（小高）および「肝炎ウイルス感染診断キット」（水落）［浜口功、水澤左衛子、岡田義昭、小高千加子、水落利明］

2) 2010 年 2 月 4 日　JICA 集団研修コース「血液スクリーニング検査向上（中米地域)」の中で「日本のヘモビジランス」に関する講義を行った。　［浜口功］

3) 2010 年 3 月 10 日　JICA 集団研修コース「AIDS の予防及び対策」の中で、 村山庁舎において講義を行った。「ヘモビジランス」(小高)、「肝炎ウイルス感染診断キット」（水落)、「HIV の感染機構 Mechanism of HIV infection」(大隈)。 ［小高千加子、水落利明、大隈和］

発　表　業　績　一　覧

Ⅰ．誌　上　発　表

1. 欧文発表

1) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall WW, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K: Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T- cell leukemia / lymphoma (ATL). ***Blood***. 114: 2709-2720, 2009

2) Mizuochi T, Ito M, Takai K, Yamaguchi K: Differential susceptibility of peripheral blood CD5+ and CD5− B cells to apoptosis in chronic hepatitis C patients. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 389: 512-515, 2009

3) Ito M, Mizoroki F, Takai K, Yamaguchi K, Mizuochi T: Phenotypes and gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C patients who developed non-Hodgkin's B-cell lymphoma. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 390: 269-272, 2009

4) Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, Mizuochi T: Autopahgic compartments gain access to the MHC class II-compartments in thymic epithelium. ***J Immunol.*** 183: 7278-7285, 2009

5) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N: The novel CXCR4 antagonist, KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. ***Antimicrob Agents Ch.*** 53: 2940-2948, 2009

6) Masumi A, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Mizukami T, Takizawa K, Momose H, Naito S, Yamaguchi K: Interferon Regulatory factor-2 induces megakaryopoiesis in mouse bone marrow hematopoietic cells. ***FEBS Lett.*** 538: 3493-3500, 2009

7) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T: Highly efficient anti-viral $CD8^+$ T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. ***Clin Vaccine Immunol.*** 16: 1383-1392, 2009

8) Kohyama S, Ohno S, Suda T, Taneichi M, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Hayashi H, Uchida T, Matsui M: Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes spscific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structual polyprotein 1a. ***Antivir Res.*** 84: 168-177, 2009

9) Mohsan S, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays for detecting recombinant viral antigens derived from various genotypes. ***J Clin Microbiol.*** 47:4141-4143, 2009.

10) Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M,Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H: Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with

extracts of mushroom mycelia. ***J Med Virol.*** 82: 128-137, 2010

11) Mizuochi T, Mizusawa S, Nojima K, Okada Y, Yamaguchi K: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) “a” determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. ***Clin Chim Acta.*** 411: 605-606, 2010

12) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T: A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 391: 1494-1499, 2010

13) Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, Yamaguchi K: Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+B cells to the liver in chronic hepatitis C patients. ***J Interf Cytok Res.*** 30: 243-252, 2010

14) Momose H, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. ***Jpn J Infect Dis.*** 63: 25-30.2010

15) Nagai Y, Asaoka Y, Namae M, Saito K, Momose H, Mitani H, Furutani-Seiki M, Katada T, Nishina H: The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 396: 887-93, 2010

16) Masumi A, Ito M, Mochida K, Hamaguchi I, Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Tsuruhara M, Takizawa K, Kato A, Yamaguchi K: Enhanced RIG-I expression is mediated by interferon regulatory factor-2 in peripheral blood B cells from hepatitis C virus-infected patients. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 391: 1623-1628, 2010

17) Tehranchi R, Woll PW, Anderson K, Buza-Vidas N, Mizukami T, Mead AJ, Åstrand-Grundström I, Strömbeck B, Horvat A, Ferry H, Dhanda RS, Hast R, Rydén T, Vyas P, Göhring G, Schlegelberger B, Johansson B, Hellström-Lindberg E, List A, Nilsson L and Jacobsen SE: Persistent Malignant Stem Cells in del(5q) Myelodysplastic Syndrome in Remission. ***New Engl J Med.*** in press

18) Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K: A New Method for the Evaluation of Vaccine Safety Based on Comprehensive Gene Expression Analysis. ***J Biomed Biotech.*** in press

19) Reesink HW, Panzer S, Gonzalez CA, Gimbatti S, Wood E, Lambermont M, Deneys V, Sondag D, Alport T, Towns D, Devine D, Turek P, Auvinen M-K, Koski T, Lin CK, Lee CK, Tsoi WC, Lawlor E, Grazzini G, Piccinini V, Catalano L, Pupella S, Kato H, Takamoto S, Okazaki H, Hamaguchi I, Wiersum-Osselton JC, van Tilborgh AJW, Zijlker-Jansen PY, Mangundap KM, Schipperus MR, Dinesh D, Flanagan P, Flesland Ø, C. Steinsvåg CT, Espinosa A, Letowska M, Rosiek A, Antoniewicz-Papis J, Lachert E, Koh MBC, Alcantara R, Corral Alonso M, Muñiz-Diaz E: Haemobigilance for the optimal use of blood products in hospital. ***Vox Sanguinis.*** in press

20) Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T: Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral B cells of chronic hepatitis C patients. ***Clin Immunol.*** in press

21) Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, Mizuochi T: Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent infection of hepatitis C virus. ***J Innate Immun.*** in press

22) Uchiumia F, Enokida K, Shiraishia T, Masumi A, Tanuma S: Characterization of the promoter region of the human IGHMBP2 (Smbp-2) gene and its response to TPA in HL-60 cells. ***Gene.*** in press

2. 和文発表

1）倉光球、浜口功：Diamond-Blackfan 貧血におけるリボソーム機能異常． 血液診療エキスパート「貧血」、中外医学社，212-214

2）浜口功：ヘモビジランス（血液安全監視体制）とは．検査と技術、第 37 巻、864-866、2009

3）内田哲也、種市麻衣子：インフルエンザと抗原．Medical Science Digest、第 35 巻 14 号、566-567、2009

4）内田哲也：新発想のインフルエンザワクチン －『細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチン』の開発．化学、第 64 巻 11 号、26-29、2009

5）紀野修一、浜口功：輸血副作用報告の標準化．検査と

技術、第 38 巻、371-375、2010
6) 浜口功、山口一成：ワクチンの非臨床安全性試験ガイドライン．医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、第 41 巻、 530-535、2010
7) 水落利明：「HCV infection and B-lymphomagenesis」第２７回犬山シンポジウム「C 型肝炎」．メディカルトリビューン,143-153、2010
8) 水落利明：B 型肝炎の Universal Vaccination 感染制御．第 6 巻、45-48、2010
9) 内田哲也:リポソームを用いた感染症ワクチンの開発．DDS、第 25 巻 1 号、29-36、2010
10) 内田哲也：季節性及び新型インフルエンザに有効な CTL 誘導型リポソームワクチン．ファルマシア、 第 46 巻 2 号、119-123、2010
11) 内田哲也：細胞性免疫誘導型リポソームワクチン．Bio Clinica、第 25 巻 5 号、29-33、2010
12) 笠井道之：細胞質抗原の MHC クラス II による提示．臨床免疫/アレルギー科、第 51 巻 6 号、573-579、2009
13) 笠井道之、水落利明：オートファジイと抗原提示．メディカルサイエンスダイジェスト（印刷中）
14) 浜口功、倉光球:Diamond-Blackfan 貧血の分子異常．細胞（印刷中）
15) 浜口功、Ribosomal protein と造血障害．臨床血液（印刷中）

Ⅱ．学 会 発 表

1. 国際学会

1) Kasai M, Seki S, Ikeda T: Macroautophagy intercross to MHC class II-antigen presentation in thymic epithelial cells. 5th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto, June 2009
2) Mizusawa S, Okada Y: NAT proficiency program in Japan. SoGAT XXI, Brussels Belgium, May 2009
3) Mizusawa S: Preparation of Reference Panels for *in vitro* Diagnostic Tests in Japan. SoGAT-Clinical Diagnostics II, Istanbul, Sept 2009
4) Masumi A, Hamaguchi I, Kuramitsu T, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Mochizuki M, Yamaguchi Y: The role for Interferon regulatory factor-2 on hematopoietic differentiation. FEBS special meeting, Austria, Feb 10-13, 2010

2. 国内学会

1) 浜口功：ヘモビジランス・輸血副作用-輸血副作用パイロットスタディーから-．第 57 回日本輸血・細胞治療学会総会．大宮、2009 年 5 月
2) 浜口功：新興感染症．第 57 回日本輸血・細胞治療学会総会．大宮、2009 年 5 月
3) 岡田義昭、水澤左衛子:BSE 由来プリオンの in vitro 感染系の確立とその応用（第 3 報)、プリオンシンポジウム 2009、蔵王（宮城)、2009 年 8 月
4) 高山俊輔、須田達也、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則：SARS コロナウイルスの polyprotein 1a 由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定と､そのペプチドを結合したリポソームによる細胞障害性 T 細胞の誘導． 第 13 回日本ワクチン学会学術集会．札幌 、2009 年 9 月
5) 内藤誠之郎、片岡紀代、清原知子、落合正樹、前山順一、倉永雅彦、千北一輿：溶解性マイクロニードルアレイを利用した経皮ワクチンの試み.第 13 回日本ワクチン学会総会．札幌、2009 年 9 月
6) 百瀬暖佳、水上拓郎、内藤誠之郎、前山順一、益見厚子、倉光球、滝澤和也、浜口功：遺伝子発現解析を用いた新たなワクチン安全性評価法構築への試み.第 13 回日本ワクチン学会学術集会．札幌、2009 年 9 月
7) 前山順一、網康至、山本三郎：BCG 免疫モルモット脾臓細胞のサイトカイン遺伝子発現の様相.第 13 回日本ワクチン学会総会．札幌、2009 年 9 月
8) 益見厚子：C 型肝炎ウイルス感染患者における血液由来 B 細胞の解析．日本薬学会関東支部大会．埼玉、 2009 年 10 月
9) 益見厚子、浜口功、倉光球、水上拓郎、滝澤和也、百瀬暖佳、内藤誠之郎、山口一成：インターフェロン制御転写因子(IRF-2)の血液細胞分化における影響について．第 82 回日本生化学会．神戸、2009 年 10 月
10) 浜口功：Ribosomal protein と造血障害．第 71 回日本血液学会学術集会．京都、2009 年 10 月
11) 倉光球、水上拓郎、益見厚子、百瀬暖佳、滝沢和也、笠井道之、山口一成、浜口 功:先天性赤芽球癆(Diamond Blackfan anemia)原因遺伝子によるオートファジー活性化の解析．第 71 回日本血液学会学術集会．京都、2009 年 10 月
12) 益見厚子、浜口功、倉光球、水上拓郎、滝澤和也、百瀬暖佳、内藤誠之郎、山口一成：インターフェロン制御転写因子(IRF-2)の血液細胞分化における影響について．第 71 回日本血液学会学術集会．京都、2009 年 10 月
13) 滝澤和也、水上拓郎、山崎淳平、倉光 球、百瀬暖佳、益見厚子、本嶋 藍、鶴野親是、大隈和、長谷川秀樹、浜口功、山口一成：HTLV-1 Taxトランスジェニックマウス

を用いたATL様腫瘍幹細胞の同定と解析.第71回日本血液学会学術集会. 京都、2009年10月

14) 百瀬暖佳、滝澤和也、水上拓郎、倉光球、益見厚子、山口一成、浜口功：Tie2 / Angiopoietin-1 シグナルを介した造血幹細胞の自律的制御機構の解析.第 71 回日本血液学会学術集会. 京都、2009 年 10 月

15) 伊藤昌彦、益見厚子、持田恵子、山口一成、水落利明： 慢性 C 型肝炎患者 B 細胞における HCV 持続感染機構の解析.第 57 回日本ウイルス学会学術集会.東京、2009 年 10 月

16) 田中明子、笠井道之、矢野茂生：インフルエンザワクチンの新しい性状解析法.第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009 年 10 月

17) 大隈和、鶴野親是、田中礼子、田中勇悦、浜口功：CD4、CXCR4 を併せ持つ新規 HIV 攻撃用 VSV の作製：OX40 リガンド共発現の効果. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009 年 10 月

18) 鶴野親是、倉光球、高浜洋一、浜口功、大江賢治、大隈 和：新規レポーターアッセイ系を用いた HIV-1 スプライシングに関与する宿主因子の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009 年 10 月

19) 岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会.東京、2009 年 10 月

20) 野島清子、影山努、中内美名、魚住利樹、藤間昭勝、岡田清美、和山行正、田代眞人、浜口功：非対称 PCR-核酸クロマト法による新型インフルエンザ (H1N1)pdm 簡便診断法の開発. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 東京、2009 年 10 月

21) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析. 第 79 回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 福岡、2009 年 11 月

22) 大隈和、田中礼子、田中勇悦：新規バイオ治療薬候補のヒト化マウス感染モデルを用いた評価：CCR5 指向性 HIV-1 感染細胞を選択的に破壊する組換えウイルス VSV. 第 23 回日本エイズ学会学術集会. 名古屋、2009 年 11 月

23) 益見厚子、滝澤和也、倉光球、水上拓郎、百瀬暖佳、山口一成、浜口功：インターフェロン制御転写因子(IRF-2)の血液細胞分化における影響について. 第 32 回日本分子生物学会. 横浜、2009 年 12 月

24) 水落利明、笠井道之：慢性 C 型肝炎患者末梢 B 細胞の動態および腫瘍化関連遺伝子発現.第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪、 2009 年 12 月

25) 小高千加子：RhoB deficiency in thymic medullary epithelium leads to early thymic atrophy. 第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪、2009 年 12 月

26) 高山俊輔、須田達也、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則：Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a. 第 39 回日本免疫学会学術集会.大阪、2009 年 12 月

27) M. Kasai, T. Ikeda, and T. Mizuochi.: Macroautophagy intersects the thymic MHC class II-restricted presentation process.(マクロオートファジーは胸腺 MHC クラスⅡ拘束性抗原提示過程と交差する). 第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪、2009 年 12 月

28) 前山順一、網康至、山本三郎：ＢＣＧ免疫モルモット脾臓細胞のサイトカイン遺伝子発現の様相.第 83 回日本細菌学会総会. 横浜、2010 年 3 月

29) 井坂雅徳、立野一郎、市川麻里子、南正明、前山順一、長谷川忠男：劇症型 A 群連鎖球菌由来 NADase と M タンパクのマウスへの経鼻投与による抗原性および防御効果. 第 83 回日本細菌学会総会. 横浜、2010 年 3 月

１４．国 際 協 力 室

室長　中嶋建介（～H21.7）
谷　伸悦（H21.8～）

概　要

近年の国際交流の進展にともない、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、アジアを始めとする世界各国の動物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、そしてインド周辺国で流行中のチクングニヤなど、例にいとまがない。このような状況において、世界規模での情報収集、研究・技術面での国際貢献等、諸外国の研究機関や国内関係機関との連携調整が重要になっている。

国際協力室は、平成 9 年設置後、国立感染症研究所の所掌事務に係る国際的な協力と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(感染症国際対策のための専門家派遣、保健大臣等要人の受け入れ等を含む)の調整、関係外国研究機関との協力調整等、以下のような業務を実施している。

Ⅰ.諸外国との技術協力の調整

諸外国との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といった人的交流がその中心となる。外国人研修生の受け入れについては、平成 21 年 4 月から平成 22 年 3 月までに、60 カ国から 318 名の外国人研修生を受け入れた(別表 1)。また、国立感染症研究所の専門家の派遣については、平成 21 年 4 月から平成 22 年 3 月までに、41 カ国 350 名の派遣を行った(別表 2)。

また外国政府機関との協力については、関係国との国際シンポジウムの開催、新興・再興感染症の発生地域への緊急職員派遣等を行っており、その概要は以下の通りである。

１．各国との感染症協力体制

(1)　シンポジウム開催

ア　平成 21 年 9 月 5 日　日韓の国立感染症機関（感染研、韓国 CDC）の共同シンポジウム開催（戸山庁舎において、2009～2010 年シーズンのパンデミックインフルエンザ対策を題材に)。

イ　平成 21 年 9 月 10-11 日　台湾交流協会からの依頼に基づく日台シンポジウムの開催（戸山庁舎において、新型インフルエンザ H1N1 並びにウイルス性下痢性及び迅速診断法の開発を題材に)。

ウ　平成 21 年 11 月 24 日　日中韓の国立感染症機関（感染研、中国 CDC、韓国 CDC）の第三回共同セミナーの開催〔東京において、2009 年パンデミックインフルエンザＡ型（H1N1）並びにはしかウイルス及びエンテロウイルス 71(手足口病)を題材に〕。

(2)　外国研究機関との覚書締結

ア　平成 22 年 2 月 18 日　中華人民共和国中国科学院武漢ウイルス研究所と感染症協力に関する覚書を締結（当所戸山庁舎において)。

(3)　個別分野における所内研究部と外国研究機関（部）との覚書等締結

ア　平成 21 年 4 月 22 日　寄生動物部がメキシコ合衆国国立グアナファト大学自然基礎科学部と教育研究における国際協力推進に関する覚書を締結。

イ　平成 21 年 4 月 28 日　エイズ研究センターがアメリカ合衆国エモリー大学医学大学院病理学臨床検査部と教育と科学研究に関する相互協力促進に関する契約を締結。

２．JICA との研修協力

(1)　集団研修

ア　世界ポリオ根絶のための実験室診断技術

（平成 22 年 1 月 18 日-2 月 5 日・4 名・ウイルス第二部）

イ　診断とモニタリングのための HIV 感染検査マネジメント（平成 21 年 6 月 15 日-7 月 14 日・8 名・エイズ研究センター）

(2)　地域別研修

ア　アジア地域新興感染症バイオハザード対策（平成 21 年 11 月 30 日-12 月 18 日・5 名・バイオセーフティ管理室）

イ　中米地域血液スクリーニング検査向上（平成 22 年 2 月 3 日-5 日・9 名・感染症情報センター・細菌第一部・血液安全性研究部・寄生動物部・バイオセーフティ管理室）

(3)　国別研修

ア　世界ポリオ根絶のための実験室診断技術（平成 22 年 1 月 18 日-2 月 5 日・3 名・ウイルス第二部）

３．ベトナムにおける JICA 協力(国立衛生疫学研究所能力強化計画プロジェクト支援のための技術協力等)

(1)　派遣

ア　平成 21 年 6-7 月　バイオセーフティ/基準微生物実験技術に関する指導を行うためバイオセーフティ管理室、ウイルス第一部、獣医科学部、生物活性物質部の各職員をベトナム NIHE に派遣。

イ　平成 21 年 10 月　トリインフルエンザ及び新型インフルエンザに対する実験室診断能力強化支援のためインフルエンザウイルス研究センター職員とバイオセーフティ/基準微生物実験技術に関する指導を行うためバイオセーフティ管理室の職員をベトナム NIHE に派遣。

ウ　平成 22 年 1 月　実験室診断/トリインフルエンザ指導のためインフルエンザウイルス研究センター職員とバイオセーフティ/基準微生物実験技術に関する指導を行うためバイオセーフティ管理室、獣医科学部、生物活性物質部の各職員をベトナム NIHE に派遣。

エ　平成 22 年 3 月　バイオセーフティ/基準微生物実験技術に関する指導を行うためバイオセーフティ管理室、ウイルス第一部、獣医科学部、生物活性物質部の各職員をベトナム NIHE に派遣。

(2)　受入

ア　平成 21 年 7-8 月　鳥インフルエンザ/動物実験研修のためベトナム NIHE から研修員をインフルエンザウイルス研究センターに受入（２名）。

イ　平成 21 年 11-12 月　BSL-3 実験室維持管理習得のためベトナム NIHE から研修員をバイオセーフティ管理室に受入（１名）。

ウ　平成 21 年 11-12 月　バイオセーフティ/基準微生物実験技術（炭疽菌・狂犬病）研修のためベトナム NIHE から研修員を獣医科学部に受入（２名）。

４．中華人民共和国における JICA 協力（ワクチン予防可能感染症のサーベイランス及びコントロールプロジェクト支援のための技術協力等）

(1)　派遣

ア　平成 21 年 9 月　麻疹実験室実技トレーニングのためウイルス第三部職員を中国 CDC へ派遣。

イ　平成 21 年 10 月　ポリオ実験室査察のためウイルス第二部職員を中国 CDC へ派遣。

(2)　受入

ア　平成 21 年 9 月　「麻疹実験室診断」研修のため中国 CDC から研修員をウイルス第三部に受入（１名）。

イ　平成 21 年 11 月　EPI 疫学研修のため保健省、中国 CDC 等の研修員を受入（７名）。

ウ　平成 22 年 3 月-平成 23 年 3 月　「麻疹実験室診断」研修のため寧夏省 CDC から研修員をウイルス第三部に受入（１名）。

５．インドネシアにおける JICA 協力（鳥インフルエンザ・サーベイランスシステム強化支援のための技術協力等）

(1)　派遣

ア　平成 21 年 4-5 月　運営指導調査に係る調査団員として感染症情報センター職員を保健省等へ派遣。

イ　平成 21 年 11 月　サーベイランスシステム指導のため感染症情報センター職員を保健省等へ派遣。

ウ　平成 22 年 2 月　中間レビュー調査団員として感染症情報センター職員を保健省等へ派遣。

エ　平成 22 年 3 月　サーベイランスシステム指導のため感染症情報センター職員を保健省等へ派遣。

(2)　受入

ア　平成21年12月　サーベイランス研修のため保健省等の研修員を感染症情報センターインフルエンザウイルス研究センターに受入（６名）。

６．ザンビア国におけるJICA協力（結核及びトリパノソーマ症の診断法と治療薬開発プロジェクト支援のための技術協力等）

(1)　派遣

ア　平成22年2月　実験室管理に係る調査団員としてバイオセーフティ管理室職員を保健省等へ派遣。

７．WHOフェロー受入

(1)中国「バイオテクノロジー」

平成21年6月　4名（病原体ゲノム解析センター）

８．海外の感染症に係るセミナー開催

(1)　平成21年4月　Dr. Malcolm Reginald Dando氏（英国ブラッドフォード大学教授）並びにDr. Brian Rappert氏（英国エクスター大学准教授）による「ライフサイエンスのミスユース防止に向けた国際動向について」セミナーを開催。

(2)　平成21年6月　Dr. Yves Charpak氏　（フランスパスツール研究所国際部長)、Dr. Paul Brey氏（ラオスパスツール研究所所長)、宮村達男国立感染症研究所長による「感染症対応における国際協力　－パスツール研究所との連携－」セミナーを開催。

(3)　平成21年10月　蜂矢正彦氏（国立国際医療センター派遣協力課医師）による「中国ワクチン予防可能感染症のサーベイランス及びコントロール（ＶＰＤ）プロジェクト帰国報告会―現状、課題、展望―」セミナーを開催。

(4)　平成21年12月　羅会明氏（中国疾病予防控制中心）他日中麻疹関係者による第２回「日中麻疹セミナー」を開催（国立国際医療センターと共催)。

(5)　平成22年2月　田中慎氏（国立長寿医療センター研究所加齢動物育成室長）による「実験動物種別の外挿範囲の限界について」セミナーを開催。

９．海外の要人来訪

(1)　平成21年4月　DR. ARTURO LARA LÓPEZ

メキシコ合衆国国立グアナファト大学学長来所。感染症等について意見交換。寄生動物部と覚書締結。

(2)　平成21年6月　Dr. Francois AILLERE フランスパスツール研究所理事長、Dr. Françoise BARRÉ-SINOUSSI フランスパスツール研究所教授来所。感染症等について意見交換。感染研シンポジウム講演。

(3)　平成21年6月　Dr. Yves Charpak フランスパスツール研究所国際部長、Dr. Paul Brey ラオスパスツール研究所所長来所。感染症等について意見交換。感染研セミナー講演。

(4)　平成21年7月　楊暁明武漢生物製品研究所長来所。村山庁舎を見学。

(5)　平成21年7月　行松泰弘国際科学技術センター（ISTC）次長来所。ISTC事業等について意見交換。

(6)　平成22年2月　楊栄閣中国科学院武漢ウイルス研究所副所長来所。感染症等について意見交換。覚書締結。

(7)　平成22年3月　P. Nymadawa モンゴルAcademy of Medical Sciences総裁来所。

インフルエンザ、ムンプス対策、国際連携に関する情報及び意見交換。

Ⅱ.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

１.多国間協力

国際機関等との協力については、WHO 本部及びWPROとの協力を中心に行っており、関係の専門家会議等に適宜専門家を派遣。

２．国際交流事業に係る募集・申請

日本学術振興会等国際交流事業（外国人研究者招へい、国際学会等派遣、二国間共同研究・セミナー等）に係る募集、申請手続、調整等を行っている。

３．その他

二国間科学技術協力協定に基づく協力プロジェクト（スイス等)、実地疫学専門家養成コースに係る調整の他、厚生労働省結核感染症課、JICA、国立保健医療科学院、国立国際医療センター、等との国際協力連絡・調整等を行っている。

１５．バイオセーフティ管理室

室長　杉山　和良

概　要

バイオセーフティ管理室は、病原体等安全管理規程(以下、管理規程) に基づき、感染研全体にわたる病原体等の安全な取り扱いに関する管理業務 (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と実施、病原体等の取扱い者の健康管理や血清保存等) および共同利用施設である BSL3 と 4 の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･研修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。

感染症法で定める感染症発生予防規程の内容を盛り込んだ管理規程を平成19年6月1日から施行した。その後、バイオリスク管理委員会にて、管理規程の一部改定作業を行ってきた。平成 21 年度には病原体の BSL 分類の見直しと、本文、病原体等の BSL 分類等（別冊 1）および取扱様式集（別冊 2）を用意する分冊化を行う等の一部改定のための作業を行った。また、輸送分類青の見直しなどのため、病原体等の輸送・運搬に関する取扱要領の改定を行った。教育訓練の明確化などについて病原体等安全管理区域運営規則の一部改定を行った。また、各部でのバイオリスク管理教育のために利用できるようにするという方針で、BSL2 実験室安全操作指針の改定版を作成した。

病原体等取扱者への教育訓練として、新規に取扱う者に対しては 2 ヶ月毎にバイオリスク管理講習会を実施した。本年度は、継続者への講習会を実施した。二種の特定病原体等取扱者を対象とした感染症法の解説および病原体管理に関する講習会を実施した。新規の BSL3 実験室利用者へは利用者講習を実施した。

施設整備に関しては、戸山庁舎 BSL3 実験室、村山庁舎高度封じ込め施設、3 号棟および 6 号棟の年次点検を実施した。平成 21 年度には、ハンセン病研究センター BSL3、ABSL3 実験室および村山庁舎 9 号棟 BSL3 実験室の第 1 回目の年次点検を実施した。

研究業務としては、バイオリスク管理の包括的強化および必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究、バイオハザード対策用の防護服の防護性能に関する研究、バイオセキュリティに関する一括管理システムの検討、ウイルスの不活性化に関する研究、抗酸菌およびレジオネラに関する研究等を行った。

第 52 回米国バイオセーフティ学会総会、第 12 回欧州バイオセーフティ学会総会および第 9 回日本バイオセーフティ学会に参加し、研究成果を発表するとともにバイオリスク管理についての最新情報の収集を行った。

嶋崎典子研究員が平成21年5月1日付けでインフルエンザウイルス研究センターへ転出した。

業　績

調査・研究

I.　バイオセーフティに関する研究

1. バイオリスク管理の教育および教材等の開発に関する研究

厚生科学研究助成金 新型インフルエンザ等新興･再興感染症研究事業「バイオリスク管理の包括的強化および必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究」(研究代表者　杉山和良）として、特に、検証実験に基づく教材の作成および教育プログラムの作成と実用化、運用による評価を行うことでバイオリスク管理の強化を図った。

(1) バイオリスク管理の教育に関する研究

1) 病原体輸送担当者の教育に関する研究

改正感染症法の施行で、特定病原体輸送には運転手

への情報提供や同乗者教育が必要となった。この教育内容や輸送時に携帯するイエローカードの改良を行った。

［佐多徹太郎(感染病理)、安藤秀二(バイオセーフティ・ウイルス 1)、重松美加(感染症情報)、伊木繁雄、杉山和良］

2) 保健所関係者を対象としたバイオリスク管理講習

東京都特別区保健所関係者を対象とした講習会を実施し、受講者からの評価を行った。これらもとに講習のあり方について検討した。

［伊木繁雄、杉山和良］

3) 結核菌輸送に関する研修とアンケート調査

保健所、病院、衛生検査所を対象として結核菌の取扱いと輸送、保管等に関する研修会を実施した。引き続き法律周知のための対策が必要と考えられた。

［鹿住祐子(結核研)、御手洗聡(結核研)、杉山和良］

(2) バイオテロ防止におけるバイオリスク管理、教育、訓練の方法論に関する研究

1) 施設毎に自己診断できるバイオセキュリティリスク評価ツールの配布版作成、科学的バイオリスク評価理論の確立への協力、リスクコミュニケーションを含めたバイオリスク低減に関する管理の実践的方法と、日常研究活動を支援する継続教育としてのバイオリスク対応の教育訓練法の検討と教材の作成を、米国、英国、カナダ、デンマーク、スウェーデン、国際学術団体と協力し、調査と概要のまとめを行った。また、実用的な教材として、教育用生物学用安全キャビネット(BSC)の作成とそれを用いた研修の提案、BSC を所有していない機関での研修用の模型の作成、輸送用教材ビデオの作成を行った。また、国際指針に基づく研修の作成、ワークショップやシンポジウムの開催、翻訳などによる情報の普及などを行った。

2) バイオリスク管理の国際基準作成「CEN WORKSHOP AGREEMENT 15793」を背景に、欧州バイオセーフティ学会のイニシアチヴによる、バイオセーフティ専門家の定義と必要技能の特定および、技能評価と資格認証の仕組みの確立への討議へ参加協力し、報告文書と技能修得モデルプログラムの作成に着手した。

3) バーチャルリアリティを活用した疑似体験型研修の検討を開始した。

4) 千葉科学技術大学､九州大学での学生および大学院生を対象としたバイオリスク管理入門研修を実施した。

［上記 1)-4): 重松美加(感染症情報)、安藤秀二(バイオセーフティ・ウイルス 1)、佐多徹太郎(感染病理)、Helmut Prendinger(国立情報学研究所)、Jennifer Gaudioso (Sandia National Laboratories:SLN), Susan Caskey (SLN)］

2. BSL3 実験室空調システムの検証

BSL3 実験室の空調制御システムについて総合的に長期間観察中である。

［篠原克明］

3. 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

(1) バイオハザード対策専用防護服の防護性能に関する調査

バイオハザード対策専用防護服の防護性能などについて、国内外の情報収集（規格、文献、関連学会、施設訪問など）を行っている。

［篠原克明、小野澤哲夫］

(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浮遊粒子浸透防護性能および飛沫粒子浸透防護性能を総合的に検討するために、試験装置や試験方法などを開発、検証している。

［篠原克明、熊谷慎介、森本美智子］

4. バイオセキュリティに関する一括管理システムの検討

病原体の登録、保管、輸送、廃棄における一括管理システムの構築と実践のために、関連機器、装置の開発、試作と、性能の検証並びにフィールド試験を実施している。

［篠原克明］

5. 二酸化チタン担持不繊布によるウイルス吸着作用に関する研究

二酸化チタン 4mg/cm^2 で担持させた不繊布に 3 種類のウイルスをそれぞれ滴下し、その吸着性を調べたところインフルエンザウイルスにおいて顕著な吸着性が認められた。株によりその速度は異なるが滴下 30 分後では供試 7 株すべてで約 4log$_{10}$TCID$_{50}$ の感染価減少が認められた。現在この吸着性向上と作用機序解明のため、担持材や方法の検討を進めている。※本研究は平成 21 年度旭化成せんい株式会社との共同研究によるものである。

［高木弘隆、杉山和良］

6. カリシウイルスのエタノール感受性に関する研究

マウスノロウイルス（MNV）が消毒用エタノールに高い感受性を示すことが明らかとなり、従来感受性のないとされていたネコカリシウイルス（FCV）と合わせて詳細に比較検討した。その結果 MNV ではエタノール終濃度 50%までは 1 分以内で 4log$_{10}$TCID$_{50}$ 以上の感染価減少が認められたが、それ以下の濃度では感染価は減少しなかった。一方 FCV ではエタノール終濃度 60%で最も高い感受性を示し、5 分で 4log$_{10}$TCID$_{50}$ 以上の感染価減少が認められ、従来の消毒用濃度 80%では感染価減少がほとんどなく、至適濃度が非常に狭く MNV とは著しく異なることが示された。

［高木弘隆、岡智一郎(ウイルス第 2 部)、片山和彦(ウイルス第 2 部)、杉山和良］

7. 病原体輸送に対するイメージ調査

病原体を運ぶことが住民に認知された際の風評被害への懸念から、ほとんどの輸送業者は病原体輸送に対し消極的な状況にある。これは今後病原体輸送に支障が生じる可能性を示唆している。したがって、住民が病原体輸送の現状についてどのように認識するかなど、住民の意識や考えを知ることを目的として、フォーカス・グループ・インタビューによる質的調査を実施した。

［伊木繁雄、杉山和良］

8. 病原体輸送容器の消毒・滅菌処理後の強度に関する検討

国内で販売されている病原体輸送容器は再利用が担保されていないが、その根拠は明確ではない。再利用の場合、内装容器は安全性を図るため滅菌等の処理が必要と考えられる。このため、国産品と輸入品各 1 点について汎用性の高い紫外線照射、薬液（エタノール、次亜塩素酸ナトリウム）処理または高圧蒸気滅菌処理後に国連基準に則った強度試験のうち 2 試験（4 項目）を行い、再利用の可否について検討した。

［伊木繁雄、杉山和良］

9. 高圧蒸気滅菌処理の条件と温度に関する検討

病原体の不活化の際汎用されるのが高圧蒸気滅菌器であるが、被滅菌物の状態によっては水蒸気が十分に行き渡らず、滅菌が不十分となる可能性が懸念される。本研究では、被滅菌物に実験室用ガウンを用い、⑴オートクレーブバッグの口を閉じた状態、⑵オートクレーブバッグ内に水を入れ、口を閉じた状態、⑶オートクレーブバッグの口を開けた状態の 3 通りの方法で高圧蒸気滅菌処理を施し、装置内の温度分布について調査した。

［伊木繁雄、杉山和良］

10. 国立感染症研究所におけるバイオリスク管理講習

新規入所者対象に 2 カ月ごとに行われるバイオリスク管理講習会の評価書を作成し、受講者に対し単元別に講習会内容の評価を求めた。その結果をグラフ化して各講師に配布し、今後の講義の仕方についての検討材料とした。

［伊木繁雄、杉山和良、高木弘隆、山崎利雄、富田康浩、篠原克明］

11. 細胞および再生組織の取扱操作のトレーサビリティーシステムの研究開発

細胞および再生組織を安全キャビネットで無菌的に取り扱いを行う際のトレーサビリティーシステムを開発し、非目的細胞のコンタミネーション､培養容器の取り違え、

作業譲渡の過誤、放置や紛失、等々といった人為的なミスの防止、状態変化（温度、湿度等）や材料管理、作業プロトコル管理、製造履歴や薬剤使用履歴等の記録、製造指図書等 GMP 基準に係わる書類出力、検体チェック等の自動化、を実証した。

［原井基博（富士ソフト)、杉山和良］

II. 抗酸菌に関する研究

1. ストレプトマイシン依存性結核菌(18b 株)の純化

ストレプトマイシン(SM)依存性結核菌 18b 株を SM200μg/ml 入り Middlebrook 7H9 液体培地と Middlebrook 7H10 寒天培地に接種し、3 週間後に釣菌し増菌した。この作業を 3 回繰り返し、純化を行い以後の動物実験の供試菌株とした。

［山崎利雄、阿戸　学、大原直也（免疫部)］

2. 18ｂ由来 SM 非依存株の純化

SM 依存性結核菌 18b 株ストックを SM200μg/ml 含有あるいは未含有の Middlebrook7H10 寒天培地あるいは、1%小川培地に増殖させた結果、SM 含有培地で純化した株は、SM 未含有培地では増殖できなかった。一方、SM 未含有培地で増殖した株は、SM 含有、未含有培地のどちらでも増殖し、ストックに混入していた SM 非依存株の分離に成功した。今後 SM 依存性がゲノム配列の変化によるかどうかを解析する予定である。

［山崎利雄、阿戸　学、松村隆之、大原直也（免疫部）］

3. 18b 株を用いた動物実験

18b株1x10^{5}CFUを経気道的にC57BL6マウスに感染後、SM 10mgを毎日２週間腹腔内投与した。次にSM投与を中断後、感染後2、4、8、10週目に、肺と脾臓の還元培養を行った。感染後2週目が最も菌数が多く、SM投与群の方が、SM未投与群に比べて菌数が多かった。いずれの群も、継時的に菌数は低下し、SM投与によって感染の程度をコントロールするマウス感染モデルが確立された。

［山崎利雄、阿戸　学、松村隆之、小林和夫（免疫部)］

III. レジオネラに関する研究

1. 市販 DDH キットで同定できないレジオネラ属菌種の同定法の確立

昨年度に引き続き、市販 DDH キットで同定できない *L.busanensis*、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii* の 5 菌種に *L. geestiana* を追加し、塩基配列決定法でしか同定できなかったレジオネラ属菌、あるいは、未確定である環境分離株の DDH 法での同定と検査精度の向上をはかった。この方法により、日本の環境水から分離されたがこれまで不明であったレジオネラ属菌株の菌種が同定された。

［山崎利雄・前川純子・倉文明(細菌第一部)］

2. 市販の DDH キットと自家製プレートの組み合わせによるレジオネラ属菌の同定試験

L. busanensis、*L. gresilensis*、*L. londiniensis*、*L. nautarum*、*L. quinlivanii*、*L. geestiana* の 6 菌種 6 株を固相させた自家製プレートと市販 DDH キット内の 25 菌種同定可能プレートとの組み合わせによる DDH 試験をおこなった。いずれの菌種も基準株が固着されている箇所の発色がもっとも強く 2 番目に発色した箇所との相対類似度が 70%以下という判定基準を満たし、肉眼的にみても菌種同定が可能であった。

［山崎利雄・前川純子・倉文明(細菌第一部)］

3. 自家製プレートを用いた DDH 法によるレジオネラレジオネラ属菌種の同定

市販の DDH キットと塩基配列決定法でも同定不能であった環境分離菌 11 株の自家製プレートを用いた DDH 法の結果は、*L. busanensis* 6 株、*L. gresilensis* 1 株、*L. quinlivanii* 1 株、同定不能 3 株であった。塩基配列決定法で複数菌種名に一致率が高く、同定不能とされた株であっても DDH 法では明確に同定された。一致率が比較的低かった 3 株は、DDH 法でも同定できなかった。また、市販の DDH キットでは同定不能で、16S rRNA 遺伝子の DNA 塩基配列決定法では、同定可能であった環境分離菌 13 株について、自家製プレートを用いて DDH 法を行った結果は、*L. londiniensis* 11 株、*L. nautarum* 2 株と同定された。

［山崎利雄・前川純子・倉文明(細菌第一部)］

国際協力関係業務

I. JICA ベトナム国 NIHE 能力強化計画プロジェクト

ベトナム国 NIHE（国立衛生疫学研究所）の能力強化計画プロジェクト（第 4 年度）に短期専門家として参加し、NIHE のバイオセーフティ管理室の部員に対してバイオセーフティマネージメントの教育と NIHE におけるバイオセーフティ管理に関する規則の作成の指導を継続している。また、NIHE の BSL3 実験室の性能検証と運転計画、メンテナンス計画や技術指導を行った。

［篠原克明］

研修業務

I. バイオリスク管理講習会

新規受講者を対象としたバイオリスク管理講習会を年間予定に従い 2 ヶ月に一度、6 回実施した。佐多徹太郎感染病理部長がバイオリスク管理委員長を務め、バイオリスク管理の考え方について講演した。管理室長がバイオセーフティの実践についての講義を行った。また、外国人を対象としたバイオリスク管理講習会は随時行い、15 回開催した。

1. バイオリスク管理講習会受講者数

(1) 平成 21 度　新規・継続取扱者対象講習会

実施月日	新規受講者数	継続受講者数
4 月 6 日	56	
5 月 14 日		212
5 月 15 日		153
5 月 21 日		30
5 月 22 日		147
6 月 11 日	27	
6 月 22 日		27
6 月 23 日		21
8 月 4 日	47	
10 月 2 日	39	
12 月 7 日	28	
2 月 2 日	21	
計	218	590

(2) 平成 21 度　外国人対象講習会

実施日	受講者数
4 月 3 日	2
4 月 15 日	2
5 月 11 日	1
5 月 29 日	3
6 月 4 日	1
7 月 28 日	4
8 月 12 日	1
10 月 7 日	2
10 月 30 日	1
11 月 17 日	2
12 月 1 日	1
12 月 14 日	1
1 月 12 日	1
2 月 3 日	1
3 月 30 日	1
計	24

2. バイオリスク管理講習会資料の見直し

バイオリスク管理の考え方、病原体等安全取り扱いの基本、生物学用安全キャビネット、消毒・不活化法、病原体輸送等の資料の見直しを行った。

［山崎利雄、伊木繁雄、高木弘隆、富田康浩、篠原克明、杉山和良、佐多徹太郎（感染病理)］

3. 二種病原体等取扱者講習会

感染症法の解説および病原体管理に関する講習会を戸山及び村山庁舎にて 5 月 28 日と 6 月 12 日に実施した。受講者数は 48 名であった。 x

［杉山和良、佐多徹太郎(感染病理部)、高橋元秀 (細菌第二部)］

II. 所外研修

特定病原体等の運搬に関する講習会(厚生労働省主催)において、病原体等の輸送時の梱包についての講義及び緊急時対応の実習指導を行った。

［伊木繁雄、杉山和良］

III. JICA バイオセーフティアジア研修

1. JICA アジア地域研修としてバイオセーフティ担当者を対象とした、新興感染症に係るバイオセーフティ制御に関するトレーニングコースを平成 19 年から 3 年間バイオセーフティ管理室が企画実施した。平成 21 年 12 月に感染研において、3 週間コースで、WHO 指針をベースとして、バイオリスクマネジメント、実験室技術、生物学用安全キャビネットの正しい使用法および病原体輸送等についての講義・実習を行った。ラオス、モンゴル、ミャンマーおよびタイからの 5 名が参加した。

［杉山和良、山崎利雄、伊木繁雄、富田康浩、高木弘隆、篠原克明］

安全管理、教育および情報提供等に関する業務

I. BSL3 実験室の管理・運営および利用状況

BSL3 の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、山崎および藤井、浅沼非常勤職員が担当した。村山庁舎においては篠原、高木、富田および山口、野川、佐藤非常勤職員が担当した。伊木は両庁舎の管理・運営を行った。ハンセン病研究センターにおいては、向井および原田非常勤職員が担当した。引き続き、各庁舎 BSL3 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。

平成 21 年度 BSL3 実験室の利用登録者数と BSL3 実験室利用者講習会月別受講者数を表 1、表 2 に示した。

表 1

	登録者数
戸山庁舎	89
村山庁舎	67
ハンセン病研究センター	22
計	178

表 2

	戸　山		村　山		ハンセン	
	実施回数	受講者数	実施回数	受講者数	実施回数	受講者数
4 月	0	0	1	1	0	0
5 月	3	5	4	5	0	0
6 月	2	2	2	2	1	3
7 月	0	0	1	2	0	0
8 月	2	3	0	0	0	0
9 月	0	0	0	0	0	0
10 月	0	0	2	3	1	8
11 月	1	2	0	0	1	1
12 月	1	2	2	2	1	1
1 月	1	1	0	0	0	0
2 月	0	0	1	1	0	0
3 月	1	2	0	0	1	1
計	11	17	13	16	5	14

II. 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(保健所)、大学、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;エイズ国際研修、ポリオ国際研修)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。ポリオ国際研修では生物学用安全キャビネットの正しい使用方法についての実習指導を行った。結核研究所における外国人研修のなかでバイオセーフティについての講義を昨年に引き続き行った。

保守・警備担当者対象の特別管理区域取講習会、新規採用者研修会、地方衛生研究所職員研修等で、バイオセーフティ関係講義を行なった。

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、BSL2,BSL3 の管理運営法、病原体の消毒方法およびバイオリスク管理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。

厚生労働省、人事院、財務省、消防庁、大学生、高校生、外国人など多数の BSL3 施設見学者の受け入れと、これら見学者に対して施設説明およびバイオセーフティについての解説も多数行った。

［高木弘隆、篠原克明、山崎利雄、伊木繁雄、富田康浩、杉山和良］

III. バイオセーフティ管理室ホームページの整備

感染症法の改正により必要となった書類等を定型化し、ホームページのコンテンツを増やすとともにデザインを改良した。特に、使用頻度や重要性と、内部ユーザの利便性、情報の迅速共有などに考慮し、WEB 申請システムへの将来的移行にも有用なデータベース管理システムを構築し、運用を開始した。

［杉山和良、中西三季、伊木繁雄、山崎利雄、高木弘隆、篠原克明、富田康浩、佐多徹太郎、浅沼みゆき］

IV. 病原体等輸送品チェック業務

感染研から発送される病原体等の輸送品が、適切に梱包されているかの確認業務を引き続き行った。「赤、黄、青」ラベル輸送のチェックシートの見直しや、青除外品目を検討し一部除外を実施した。

［伊木繁雄、高木弘隆、山崎利雄、篠原克明、富田康浩、野川加奈、浅沼みゆき、山口安子、杉山和良］

発 表 業 績 一 覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. : Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS, 2009 Jul 31;23(12):1485-1494

2. 和文発表

1) 杉山和良：バイオセキュリティの国際基準と日本感染症 Vol.39, No.6, 9-18, 2009

2) 篠原克明：バイオセーフティの実際. セイフティ・ダイジェスト.（Safety & Health Digest）Vol.55. No.4. 38-42. 2009. 4 月.社団法人日本保安用品協会（JSAA）.

3) 篠原克明 : バイオハザード対策用防護服. セイフティ・ダイジェスト.（Safety & Health Digest）Vol.56. No.5. 46-52. 2010. 5 月.社団法人日本保安用品協会（JSAA）.

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Shinohara, K., Kurata, T., Takada, A., Hayakawa, N., Komatsu, R., Kajiwara, T., Kogure, K., Automated logging system in storage of infectious materials. European Biological Safety Association, 12th Annual Conference, June 16-17, 2009, Stockholm-Solna, Sweden.

2) Shinohara, K., Kurata, T., Takada, A., Hayakawa, N., Komatsu, R., Kajiwara, T., Kogure, K., Reinforcement of automated logging system in storage of infectious materials. American Biological Safety Association, 52nd Annual Biological safety Conference, October 18-21, 2009

2. 国内学会

1) 清水博之、斉藤真紀、小松俊彦、杉山和良、小林一司、大坪寛子：野生株ポリオウイルス実験室封じ込めの現状と今後の課題　第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2009 年 12 月、仙台

2) 鹿住祐子、御手洗聡、杉山和良 : 特定病原体等の運搬における吸収材の有用性と国連規格容器による事故対応　第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2009 年 12 月、仙台

3) 伊木繁雄、堀口逸子、重松美加、杉山和良、佐多徹太郎：病原体輸送に対するイメージ調査－専業主婦を対象としたグループインタビューから－、第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2009 年 12 月、仙台

4) 伊木繁雄、亀井範雄、山本孝男、仁平朋子、髙木弘隆、杉山和良：病原体輸送容器の消毒・滅菌処理後

の強度に関する検討、第 9 回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、2009 年 12 月、仙台

5) 篠原克明、倉田毅、高田礼人、早川成人、梶原唯行、小松亮一：病原体登録、保管、輸送、廃棄の一括管理システム（ICBS システム）の開発と検証。第 9 回日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会、2009 年 12 月 10-11 日、仙台。

6) 篠原克明、小野澤哲夫、熊谷慎介、佐藤清：わが国におけるバイオハザード対策用防護具の現状。第 9 回　日本バイオセーフティ学会学術総会・学術集会、2009 年 12 月 10-11 日、仙台。

7) 篠原克明、長澤 秀俊：バイオハザード対策用防護具。第 7 回　日本防護服研究会学術総会、2010 年 2 月、東京。

8) 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良：マウスノロウイルス(MNV)のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響についての検討。第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月、東京

9) 山崎利雄、山本三郎、結核菌の ATP 法による迅速薬剤感受性試験法の検討、第 79 回実験結核研究会、札幌、2009 年 7 月

10) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、DNA-DNAハイブリダイゼーション法によるレジオネラ属菌の同定、第58回日本感染症学会東日本地方学術集会、東京、2009年10月

11) 山崎利雄、前川純子、杉山寛治、渡辺祐子、鈴木敦子、市瀬正之、倉文明、市販DNA-DNAハイブリダイゼーション（DDH）法キットで同定できないレジオネラ属菌の同定、第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月

12) 山崎利雄、結核菌のバイオセーフティ管理、サル疾病ワークショップ、麻布大学、相模原、2009年7月

１６．放 射 能 管 理 室

室長　土 田　耕 三

概　要

当室は、放射性同位元素等の安全取り扱いの徹底を図り、また放射性同位元素の利用に関する研究と指導を行なっている。平成２１年度の放射性同位元素の保管、使用、廃棄に関しては、放射線業務従事者、各部等の使用施設責任者及び放射能委員によって的確におこなわれ、また排気や排水中の放射能濃度、環境の空間線量率等は定められている基準値よりもはるかに少ないものであった。施設設備の点検も定期的に行い、フィルター類の交換を行い、また稼働も正常に保たれていることを確認した。

放射線取扱主任者は、戸山が土田耕三・藤本浩文、村山では加藤篤(ウイルス第三部･第三室長)が武田直和(元ウイルス第二部・第一室長）から引き継ぎ、ハンセンが中永和枝（生体防御部・主任研究官）と鈴木幸一（生体防御部・第三室長）である。加藤篤は、平成２１年４月１日から放射能管理室兼任となった。

放射線業務従事者登録に関して、新規に登録する者に対する講習会（新規者講習会）を２カ月おきに年６回、戸山庁舎で行い、継続して登録する者に対する講習会(継続者講習会)を、戸山研究庁舎で５回、村山庁舎で２回とハンセン病研究センターで１回行った。また英語で行う外国人向け新規者講習会を、１回行った。新規者講習会受講者は日本語８７名、外国語１名、継続者講習会は３６８名であった。新規者講習会受講者は講習終了後、確認テストを行い、全員合格した。継続者講習会は、改正した規則の説明を行い、放射性同位元素の安全取扱の徹底を図った。

本年度、戸山庁舎及び村山庁舎において設備の更新を行った。戸山庁舎では、排水設備、排水系統の測定装置及び排気系統の測定装置の更新を行った。村山庁舎では、平成２１年８月村山庁舎ガンマセル室を廃止し、平成２２年３月に新ガンマセルを導入し７号棟ガンマセル室を管理区域に復帰させた。これに伴い、新^{60}Coガンマ線照射装置を用いた照射実験を平成２２年４月から開始できるようになった。村山庁舎５号棟放射性同位元素使用室を廃止し、一般実験室とし、５号棟放射性同位元素排水系統並びに排気系統を一般実験室系統に切り替えた。また、放射性同位元素有機廃液を日本アイソトープ協会に払い出しできるように変更した。平成２１年８月９日と８月１１日に東京２３区震度４の地震が発生したため、放射能管理室員で戸山庁舎放射線管理区内の点検を行い、文部科学省に異常がみられず正常に稼働していることを連絡した。

土田、加藤、藤本、作道は主任者部会年次大会、放射線安全管理研修会及び講習会に参加し、放射線安全管理に対する新たな知識の習得を行った。室員は、土田耕三、高田直子、藤本浩文、作道隆、菅原朋子（臨時）、横山健（臨時）、加藤篤（併任）である。

本年度も経常研究費、文部科学省、日本学術振興会や財団からの研究費によって、また米国ユタ大学、アリゾナ大学、フロリダ国際大学、琉球大学、日本大学、信州大学、北海道大学、九州大学、東京農工大学、東京大学、東京薬科大学、農業生物資源研究所、国立医薬品食品衛生研究所、放射線医学総合研究所、理化学研究所、日本原子力研究開発機構、富士化学工業株式会社と協力して、以下の研究を行った。

I.　放射線によるDNA損傷とその修復機構の解析
II.　放射線による生物学的影響を可視化するための生物試料の探索
III.　医学への応用を目指した生体内脂質動態の解明

I. 放射性同位元素使用状況

１．戸山

（独立行政法人国立健康・栄養研究所も含む）

（単位　kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
^{3}H	707120	38850	91923
^{14}C	122626	16687	28606
^{32}P	1272961	650378	1432719
^{35}S	147260	675250	342325
^{125}I	74492	37000	37492

保管量下限数量比合計 5078.5

２．村山

（単位　kBq）

	前年度繰越量	入庫量	使用量
^{3}H	161722	55500	76672
^{14}C	9897	1850	997
^{32}P	22030	166500	178545
^{35}S	558290	70300	1182840

保管量下限数量比合計 101.9

Ⅱ．従事者登録数

１．戸山　　３１９名
（独立行政法人国立健康・栄養研究所も含む）

２．村山　　１１８名

3．ハンセン　　１６名

Ⅲ．講習会受講者数

１．　　通常講習会

日時	受講者数	備考
平成21年 4月 7日	29	新規
5月 14日	152	継続
5月 15日	109	継続
5月 19日	59	継続（村山）
5月 20日	19	継続（ハンセン）
6月 5日	13	新規
6月 8日	1	継続
6月 22日	15	継続
6月 23日	9	継続（村山）
8月 3日	20	新規
8月 14日	4	継続
10月 5日	10	新規
12月 4日	5	新規
平成22年 2月 3日	10	新規
合計	455	

２．外国語講習会

日時	受講者数	備考
平成21年 6月 3日	1	新規
合計	1	

業　績

調査・研究

生物学研究における放射性同位元素の利用を図るために、生化学、遺伝学、分子生物学に応用可能な放射性同位元素を用いた以下のような研究を展開した。

Ⅰ．　放射線によるDNA損傷とその修復機構の解析

放射線が生物へ与える影響のうち、最も影響が大きいと考えられるのがDNAの損傷である。これらの損傷は修復されなければ強力な突然変異原となり、細胞がガン化する一因になると考えられている。当室では、放射線照射されたDNAがどの程度の頻度で損傷を受けるのか、また、損傷を受けたDNAはどのように修復されているのかに注目して研究を行っている。

(1)PCR法を利用した放射線によるDNA損傷頻度検出法の開発

昨年度に引き続き、リアルタイムPCRを利用したDNA損傷頻度測定手法の開発を行っている。本年度は本手法で塩基欠損部位が検出可能かを検証したところ、塩基除去部位でPCR反応が停止することが判明した。このことから、以前から行ってきた放射線照射したプラスミドDNA試料におけるPCR反応停止の原因が脱塩基である可能性が示唆された。また、熱を加えることで脱塩基化された鎖と相補鎖塩基の部位でPCR反応が停止する場合があることも見出された。

［前川（琉球大），屠（浙江大），斎藤（原子力機構），藤本，高田，作道，土田］

(2)Kuタンパク質によるDNA二重鎖切断の認識・結合機構の解明

放射線に起因するDNA損傷のうち、DNA二本鎖切断は最も重篤な損傷の一つである。Kuタンパク質は最初にこの二本鎖切断を認識・結合し、二本鎖切断修復経路の一つである非相同末端再結合過程の開始を促すキータンパク質である。計算化学的手法を用いてKuタンパク質とDNA末端間の結合・解離のプロセスに関与するKuタンパク質の構成アミノ酸の推定をおこなった。Kuタンパク質-DNA複合体の分子モデルを設計し、Kuタンパク質の一部アミノ酸を変異させたタンパク質モデルを用いて野生型と変異型でKu-DNA間の結合力を比較した。その結果、Ku70のリジン残基のうちK338をグルタミンに置換するとKu-DNAの結合力が減少し、既報の実験結果と一致したが、K338をアセチル化しても結合力は野生型と変わらないことが判明した。したがって、K338はアセチル化のターゲットではあるが、実際にはDNAの結合には関与していない可能性がある。

［藤本，小池（放医研），斎藤（原子力機構），前川（琉球大），高田，作道，土田］

(3)YファミリーDNAポリメラーゼの酸化損傷dNTP取り込み活性に関する分子機構

放射線等によって生じるDNA損傷部位を乗り越えてDNA合成を行える能力を持つYファミリーポリメラーゼは、酸化dN

TPのゲノムDNAへの取込みにも関与している。本研究ではヒトポリメラーゼκ (hPolκ)及びη (hPolη)の8-oxo-dGTPの取込みに影響を与えるアミノ酸を調査した。hPolκにおいて、Y112A置換すると、取り込みは影響をうけた。hPolηでは、Y112に対応するF18を置換しても取込み特性に影響を与えなかった。しかし、Polηに特有のアミノ酸部位であるR61を置換すると、取り込み活性は大きく変化した。
［片渕（国立衛研），佐々（東京薬科大），能美（国立衛研），藤本，前川（琉球大），高田，作道，土田］

Ⅱ. 放射線による生物学的影響を可視化するための生物試料の探索

放射線照射による損傷指標としての翅原基の利用

ガンマ線をカイコ幼虫に照射すると翅が小さくなる現象が知られている。重イオンビームを利用して原基の前後2組のどれかあるいはその一部を照射することで羽全体に影響が出るかどうかを検証した。ガンマ線照射後原基発生を観察することで、ガンマ線照射線量によって現れる影響を可視化、定量できる方法を確立した。これによりバイスタンダー効果を解析できる系の確立を図ることとした。［前川（琉球大）、小林（原子機）、白井（信州大）、木口（信州大）、高田、藤本、土田］

Ⅲ. 医学への応用を目指した生体内脂質動態の解明

脂質は細胞膜構成成分や栄養分、また生理活性メディエイターとして生体に必須の成分である。脂質は動物細胞の外来細菌認識機構やウイルスの複製機構において多くの役割を果たしており、生体内の脂質動態の解明は感染症の理解と制御において重要である。また、放射線照射によって細胞膜の脂質構成が変化することも報告されおり、脂質動態の解明は放射線が生体に与える影響を理解する上でも重要である。水が豊富な生体内において水に溶けない脂質を輸送するには何らかの装置が必要であり、その装置となる遺伝子の同定と機能の解明を行っている。

1. CD36遺伝子群の機能解析

CD36遺伝子群は、膜貫通部位を２つ持つことが推測される約500アミノ酸からなる遺伝子群であり、哺乳類や昆虫に存在している。近年、網羅的解析によるスクリーニング等によって、CD36遺伝子群が肝炎ウイルスや黄色ブドウ球菌、マイコバクテリウム属細菌、マラリア原虫、エンテロウイルスの感染成立に重要な役割を果たす遺伝子として報告されてきている。しかし、CD36遺伝子群がどのような分子作用機序で機能しているのかについては知見が乏しい。たとえば、CD36遺伝子群は、体液リポタンパク質から脂質のみを選択的に細胞内に取り込むことが知られているが、その選択性を生じさせる分子機構はほとんど明らかでない。カイコの遺伝子資源を利用して、それぞれ異なる脂質を選択的に細胞内に取り込む二つの遺伝子を同定し、それらが共にCD36遺伝子群に属することを明らかにした。また、この二つの遺伝子が細胞内の脂質輸送因子と協調的に機能することも明らかにした。この二つの遺伝子のキメラを解析することで、CD36遺伝子群の脂質選択性を担う分子機構を解明することが出来るものと期待している。
［作道、高田、藤本、土田、杉山（寄生動物部）、飯塚（生物研）、小林（生物研）、瀬筒（生物研）、田村（生物研）、生川（生物研）、桑崎（生物研）、門野（生物研）、三田（生物研）、山本（生物研）、伴野（九大）、北村（富士化学工業）］

2. apoLTP遺伝子の解析

脂質組成は組織によって異なる。脂質組成の違いは病原体の標的組織を決定する要因となっている可能性がある。脂質組成の違いを生む機構として、体液内の脂質転移因子（apoLTP）の関与が考えられるが、その分子生物学的な解明は進んでいない。 昆虫体液のapoLTPを精製し、その精製した蛋白質をコードする遺伝子配列の全長決定を行った。
［横山（日大）、横山（農工大）、湯浅（農工大）、藤本、作道、高田、土田、濱野（農工大）、岩野（日大）］

3. 新規脂質輸送遺伝子の探索

脂質輸送に関わることが表現型から明らかにされているカイコの遺伝子について、その遺伝子がコードする分子を同定することを目的としてポジショナルクローニングを進めた。
［作道、高田、藤本、土田、飯塚（生物研）、瀬筒（生物研）、田村（生物研）、生川（生物研）、山本（生物研）］

4. 家畜化におけるゲノム構造の変化の解析

生物の家畜化は人類が歴史上成し遂げた最大の技術革新のひとつであり、その結果生まれた家畜は、歴史的にも、そして現代においても、感染症を伝播させる主要要因となっていると考えられている。家畜化の過程で生物のゲノムにどのような変化が起きたかを知るために、家畜の形質を支配する遺伝子の一部を、定量的 PCR 法などを用いて複数の野生種と家畜系統で調べた。その結果、ゲノム中の遺伝子のコピー数が１コピーから１～２０コピーと家畜化の過程で大幅に多様化し、重複したコピーにトランスポゾンの挿入など大きな構造変化が起きる場合があることを見出した。この結果は、進化的時間スケールの中においては比較的短い家畜化の期間においても、家畜の遺伝子は野生種と比較して大きな構造変化を起こした場合があることを示している。
［作道、中島（信州大）、高田、藤本、土田、嶋田（東大）、伴野（九大）、中垣（信州大）］

管理業務

Ⅰ．講習会

新規放射線取扱業務従事者、継続者、新規外国人放射線取扱業務従事者、ＲＩを使用しない管理区域立入者に対する講習会を実施した。実施詳細は、最初の表を参照。

Ⅱ. 日常管理業務

1. 通常の日常管理業務を行った。放射性同位元素の購入、入荷登録、管理、放射性同位元素の廃棄物の集荷と払い出し、施設点検、汚染検査、排気、排水の放射性同位元素量の測定、施設日常点検、定期点検、自主点検、放射線取扱業務従事者の被ばく管理、放射線取扱業務従事者出入り管理、一時立ち入り者の出入り管理と講習、他日常の管理。

2. 放射性同位元素等の在庫管理状況を部等別に調査し、長期保存中の放射性同位元素は廃棄を行った。

3. 放射性同位元素等で汚染した保存廃棄物の調査し、廃棄物等を日本アイソトープ協会に払い出した。

4. 文部科学省の通達により、管理下にない放射性同位元素等の一斉調査を行い、また、購入、使用及び廃棄について見直しを行い、将来においても管理下にない放射性同位元素が発生させない管理体制を確立した。

5．例年通り管理状況報告書を文部科学省に6月に提出した。

Ⅲ．その他

1．放射能委員会、ＲＩ３施設協議会等の開催

2．放射線取扱主任者講習会等へ出席し研修した

発 表 業 績 一 覧

Ⅰ. 誌 上 発 表

1.　欧文発表

1) Niimi N., Sassa A., Katafuchi A., Grúz P., Fujimoto H., Bonala R.-R., Johnson F., Ohta T. and Nohmi T., "The Steric Gate Amino Acid Tyrosine 112 Is Required for Efficient Mismatched-Primer Extension by Human DNA Polymerase κ", *Biochemistry*, **48**, 4239-4246, 2009.

2) Bhosale P, Li B, Sharifzadeh M, Gellermann W, Frederick JM, Tsuchida K, Bernstein PS. Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry*. 48, 4798-807. (2009)

3) Wang HB, Sakudoh T, Kawasaki H, Iwanaga M, Araki K, Fujimoto H, Takada N, Iwano H, Tsuchida K. Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 55, 1065-71. (2009)

4) Sakudoh T, Tsuchida K. Transport of carotenoids by a carotenoid-binding protein in the silkworm. In: Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties. CRC Press, 511-523. (2009)

5) Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kobayashi I, Kuwazaki S, Banno Y, Kitamura A, Sugiyama H, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K. A CD36-related transmembrane protein is coordinated with an intracellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 7739-51. (2010)

6) Tsuchida K, Yokoyama T, Sakudoh T, Katagiri C, Tsurumaru S, Takada N, Fujimoto H, Ziegler R, Iwano H, Hamano K, Yaginuma T. Apolipophorin-III expression and low density lipophorin formation during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 155, 363-70. (2010).

7) Katafuchi A., Sassa A., Niimi N., Grúz P., Fujimoto H., Masutani C., Hanaoka F., Ohta T. and Nohmi T., "Critical amino acids involved in erroneous incorporation of oxidized nucleotides by human DNA polymerases η and κ", *Nucl. Acids Res.*, **38**, 859-867, 2010.

Ⅱ．学　会　発　表

1.国際学会等

1) Niim N., Sassa A., Katafuch A., Grúz P., Fujimoto H., Bonala R.-R., Johnson F., Ohta T., Nohmi T., "A crucial role of steric gate amino acid tyrosine 112 for efficient mismatched-primer extension by human DNA polymerase κ", DNA Repair and Mutagenesis: From Molecular Structure to Human Disease, Whistler, Canada, May, 2009.

2) Kawahishi Y., Ajimura H., Fujimoto H., Tu Z., Banno Y., Nho S-K., Mita K., Yamamoto K., Nakajima Y. and Maekawa H., "Evolutionary analysis of rDNA sequence differences among *Bombyx mandarina* inhabiting China, Korea, Taiwan and Japan." International symposium on *Bombyx mori*, Functional genomics and modern silk road, Chongqing, China, Oct., 2009.

3) Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kuwazaki S, Banno Y, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K：Carotenoid Cocoon Coloration is Controlled by a Combination of a CD36/SR-BI-related Receptor and a Cytosolic START Lipid-binding Protein The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences ”Bioactive Lipid Molecules and Transporters”, Tokyo, Japan, May, 2009

4) Kataoka H, Matsuya T, Sakudoh T, Yamanaka N, Fujimoto Y, Niwa R：Cytochrome P450s involved in biosynthesis of ecdysteroids in insects; Identification and regulation of gene

expression by neuropeptides, 16th International Conference on Cytochrome P450, Okinawa, Japan, Jun, 2009

5) Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kuwazaki S, Banno Y, Takada N, Fujimoto H, Kadono-OkudaK, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K：Carotenoid Cocoon Coloration is Controlled by a Combination of a CD36/SR-BI-related Transmembrane Receptor and a Cytosolic START Lipid-binding Protein in the Silkworm Bombyx mori, The Eighth International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA, Crete, Greece, August, 2009.

6) Sakudoh T., Kitamura K., Yuasa M, Fujimoto H., Takada N., Banno N., Tsuchida K.: Molecular machinery for the delivery of specific carotenoids to specific tissues. Gordon Research Conference, Ventura, USA, Jan. 2010.

2. 国内学会等

1) 作道隆. 黄繭遺伝子（C）のクローニング. 昆虫ポストゲノム研究会, 札幌, 9 月, 2009 年

2) 作道隆, 中島健陽, 高田直子, 藤本浩文, 土田耕三. カイコとクワコにおけるカロテノイド結合タンパク質（CBP）の遺伝子構造, 昆虫ワークショップ, 福岡, 10 月, 2009 年

3) 横山健, 藤本浩文, 作道隆, 高田直子, 土田耕三. カイコ Lipid Transfer Particles cDNA 塩基配列の決定, 昆虫ワークショップ, 福岡, 10 月, 2009 年

4) 湯浅正志, 作道隆, 藤本浩文, 高田直子, 土田耕三. CI 系統では、C 系統より Cameo2 の発現時期が遅れている, 昆虫ワークショップ, 福岡, 10 月, 2009 年

5) 片渕淳・佐々彰・Petr Grúz・藤本浩文・益谷央豪・花岡文雄・能美健彦, 「ヒトDNAポリメラーゼηおよびκの8-oxo-dGTP取り込み活性に関する分子解析」, 日本放射線影響学会 第52回大会, 2009年 11月

6) 川西祐一･伴野豊･藤本浩文･三田和英･味村博･山本公子･屠振力･盧時甲･中島裕美子･前川秀彰,「南西諸島の地殻変動とリボゾーマル DNA の 5.8S-28S 間 ITS 領域の配列比較に基づく日本産クワコの進化解析」第 65 回日本蚕糸学会九州支部大会, 2009 年 11 月.

7) Fujimoto H., Higuchi M., Koike M., Pinak M., Bunta J.K., Nemoto T., Sakudoh T., Takada N., Maekawa H., Saito K., Tsuchida K., "Structural analysis of the interaction between the Ku protein and DNA", 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月

8) Kawanishi Y., Ajimura H., Banno Y., Fujimoto H., Tu Z., Kamauchi Y., Nho S.K., Mita K., Yamamoto K., Nakajima Y., Maekawa H., "Geographical analysis on South-west islands for evolution of *Bombyx mandarina* (Japan) using rDNA sequence.", 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月

9) Tu Z., Oikawa M., Fujimoto H., Saito K., Tsuchida K., Nakajima Y., Maekawa H., "Application of plasmid DNA inserted modified synthesized oligomers for analysis of cluster damages by radiation.", 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月.

10) Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kuwazaki S, Banno Y, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K. A CD36-related transmembrane protein facilitates selective uptake of carotenoid pigment and cocoon coloration in coordination with an intracellular START lipid binding protein, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月, 2009 年

１７．動 物 管 理 室

室長　山田靖子

概　要

村山庁舎に昨年度末、新型インフルエンザウイルスの動物実験を想定した動物実験施設(ABSL3)が完成したが、平成 21 年度に入った途端、時期をあわせたように新型インフルエンザの流行が起こった。インフルエンザウイルスに対する感受性が実験動物の中で特に高いフェレットの動物実験が必要となり、動物管理室は新施設でのフェレットの飼育管理システムを立ち上げ、対応した。また、新型インフルエンザ流行の予期せぬ影響として、動物実験施設で日常的に使用するマスクの入手が困難になったことが挙げられる。

村山庁舎では、動物施設のリヒーター、給湯設備、空調設備等の工事が相次いだ。戸山庁舎では、動物実験管理区の着衣を前着からオーバーオールに変更し、ABSL2 区ではオーバーオールの上に前着を着用することに変更した。

平成 21 年度は動物実験管理区内で２件、針刺しと咬傷が発生した。１件は注射針廃棄容器の処理中に従事者が誤って指に針を刺した。もう１件はカニクイザルによる咬傷であった。所へ報告をし、医師の診断を受け、経過観察を行なって、問題がないことを確認した。

動物管理室は、動物実験施設の管理運営を業務とし、その一環として動物実験施設の定期的微生物検査を行っている。また、昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行なった。実験動物の感染症に関する研究では、以前より行なっているマウス肝炎ウイルスの研究を進めるとともに、新たにマウスノロウイルス、*Corynebacterium ulcerans* の研究を行なった。モデル動物の開発研究では、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカニクイザル、ガングリオシド蓄積症、リフトバレー熱ウイルスの研究を行った。

動物管理室は海外および国内から動物実験施設見学や動物実験管理運営の研修に対応している。平成 21 年度に対応した実験動物関係及び獣医学関係の見学は、中国動物実験施設視察団、東京大学獣医学科（２回)、岐阜大学連合獣医学研究科、日本大学獣医学研究科、麻布大学獣医学部、JICA 集団研修、アジアバイオセーフティ地域研修会であった。また、韓国 CDC 動物実験施設管理者１名の研修を 12 月に受け入れた。

厚生労働省が所管する国立研究機関（独立行政法人を含む）の動物実験施設では、国内の動物実験を取り巻く状況に対応する横の連携を取り合う協議会（名称：厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会）を発足し、感染研が初代の会長を務めることとなった。

講習会開催及び動物管理区の利用状況

動物管理室は動物実験委員会の事務局を担当し、動物実験講習会を開催している。平成 18 年度に動物実験に関わる感染研内の各種規程を改正したが、改正後の講習会を受講した人数は平成 22 年 3 月 31 日までに 723 名となり、平成 21 年度に申請された動物実験計画は 330 件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、各庁舎ではそれぞれの動物実験施設の利用方法および実験動物の飼養・保管に関する講習会を行い、受講者を施設利用者として登録している。各施設の利用登録者数は平成 22 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 328 人、村山庁舎 197 人、ハンセン病研究センター16 人である。

実験動物施設利用者講習会および動物実験講習会　実績

		受講者数			
開催月日	開催場所	施設利用（戸山）	施設利用（村山）	施設利用（ハンセン）	動物実験（全所）
4 月 3 日	村山		1		
4 月 6 日	戸山	22			29
4 月 13 日	ハンセン			1	
4 月 17 日	*戸山*				*2*
6 月 11 日	戸山	7			9
6 月 25 日	ハンセン			1	
7 月 7 日	村山		7		

7月8日	村山		3		
7月28日	*戸山*				*3*
7月29日	村山		2		
8月4日	戸山	9			14
8月7日	村山		3		
8月14日	*戸山*	*1*			
10月2日	戸山	13			20
10月21日	*戸山*	*2*			*3*
12月7日	戸山	7			9
2月2日	戸山	9			13
2月3日	ハンセン			1	
合計		70 新規	16 新規	3 新規	102 年度内 受講者

（斜字は外国人対照講習会）

業　績

調査・研究

I　動物実験施設の微生物モニタリング

I-1　定期検査

戸山、村山両庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し，月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。戸山庁舎ではウサギ、モルモットの飼育匹数が減少したため、平成 21 年度はこれらの動物種の微生物モニタリングを行なわなかった。結果は別表 1 に示す。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。

（網　康至、滝本一広、新倉　綾、田原口元子、平井明香、酒井宏治、小川敏雄、須崎百合子、山田靖子）

II　実験動物の感染症に関する研究

II-1　異なる受容体を持つマウスのマウス肝炎ウイルス感受性に関する研究

マウス肝炎ウイルス(MHV)は CEACAM1 を受容体として利用し、感受性 C57BL/6 (B6)マウスは CEACAM1a (1a)を、比較的抵抗性 SJL マウスは CEACAM1b (1b)を発現している。両系統の MHV 感受性が受容体に依存するか検討するために、B6 マウスの 1a 遺伝子上のウイルス結合部位を 1b 遺伝子のものと置換した CEACAM1ba(1ba)を発現する遺伝子改変マウス cB6*1ba* を作製し、これは SJL より高度な MHV 抵抗性を示し感染が認められなかった。本年度は cB6*1ba* 生体内で 1ba が機能的蛋白質として発現しているか調べるために CEACAM1 の MHV 受容体以外の機能を検討した。CEACAM1 はインスリン代謝に関与しており *Ceacam1* 欠損 B6 マウスではインスリン代謝障害が報告されている。そこでインスリンクリアランス試験を行ったところ、cB6*1ba* マウスは野生型 B6 マウスと同様な挙動を示し相違は認められなかった。このことから cB6*1ba* マウスのインスリン代謝機能は正常であることが示唆され、マウス生体に発現している 1ba は機能的蛋白質であると考えられた。［平井明香、網康至、田口文広[1]、山田靖子（[1]ウイルス３部、日本獣医生命科学大学)］

II-2　マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究

マウス肝炎ウイルスの親株 MHV2 とその変異株 MHV-2f の病原性を解明するため、BALB/c マウスへの感染実験を実施した。MHV2 の 10^4 および 10^7PFU 接種群では、感染 3 日目から沈鬱症状の後、削痩等を呈し感染 5 日以内にそれぞれにおいて全て死亡の兆候を得て安楽死処置し、100%の致死率を示したのに対し、10^1PFU 接種群では 20%の致死率を示した。それに対して MHV-2f の 10^1、10^4 および 10^7PFU 接種群の全てにおいて生存し致死率は 0%を示した。MHV-2f はマウスに対する病原性が著しく低下しており、遺伝子変異により病原性が変化したと考えられる。また、培養細胞に対する増殖性を検討するため、MHV2 および MHV-2f を DBT 細胞に感染させ経時的にウイルス力価を測定した。その結果、MHV-2f は感染初期に MHV2 よりゆっくり増殖した後、最終的に MHV2 と同程度の力価まで達し増殖性の相違を認めた。

(田原口元子、新倉　綾、山田靖子)

II-3　実験用マウスコロニーからのマウスノロウイルスの分離と分子系統学的解析

国内実験用マウスコロニーの MNV 浸潤状況の把握及び既知の MNV 分離株との遺伝学的な比較を行った。複数の動物施設由来から実験用マウス糞便を採材し、抗生物質添加 PBS にて乳剤作製後、RAW 264.7 細胞（マウスマクロファージ由来株化細胞）に接種し、ウイルス分離を試み、MNV 特異的 RT-PCR による同定を実施した。MNV 陽性検体については、VP1 及び VP2 遺伝子の配列決定を行い、系統学的解析を実施した。これまでに 64 検体のマウス糞便乳剤感染細胞から、24 検体について RT-PCR 陽性が認められた。様々なクラスターに分類される分離株が認められ

たが、既知の MNV と比較して遺伝学的に大きく異なる分離株は認められなかった。本研究により、実験用マウスコロニーから MNV を分離・同定し、国内の複数の動物施設において MNV が浸潤していることが明らかとなった。
［酒井宏治、網康至、須崎百合子、山田靖子］

II-4 サル由来 *Corynebacterium ulcerans* の性状解析

ヒトのジフテリア様疾患の原因菌であるジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が国内のイヌ、ネコ、ライオン、シャチから分離されている。海外ではサル類からも分離されているが、国内のサル類での感染状況は明らかでない。そこで、異なる２つの施設から当施設に導入した国内繁殖カニクイザルの咽頭から *C. ulcerans* を分離しジフテリア毒素産生性を検討した。その結果 68 頭から 31 株の *C. ulcerans* が分離され、そのうち 9 株がジフテリア毒素を産生した。これら 11 株の分子系統を検討するためにパルスフィールドゲル電気泳動解析を行った結果、２つのグループに分けられ、それぞれのグループには異なる繁殖施設の個体からの分離株が含まれていた。以上から、国内のカニクイザルが毒素産生性 *C. ulcerans* を保菌していることが明らかとなった。また異なる繁殖施設由来の個体から同一の遺伝子型の株が分離され、これらの施設は同じ原産国のカニクイザルを繁殖していることから、共通する原産国のカニクイザルが保菌していた本菌が飼育集団内で感染・維持されている可能性が示唆された。［平井明香、小宮貴子[1]、高橋元秀[1]、酒井宏治、新倉綾、須崎百合子、網康至、山田靖子（[1]細菌２部）］

III　モデル動物の開発

III-1 麻疹ウイルス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視床に接種し、脳脊髄液中に麻疹ウイルス中和抗体が認められたカニクイザルの中枢神経細胞から、感受性細胞との共培養により、細胞変性効果をほとんど示さない麻疹ウイルスを分離した。この個体において、麻疹ウイルスの持続感染が成立していたと考えられる。
（網　康至、須崎百合子）

III-2 MCC 系マストミス腎臓におけるガングリオシド蓄積症

MCC マストミス腎における GM2 およびの蓄積の原因の一つとして、β-hexosaminidase（GM2 分解酵素）活性の基質濃度による反応性の違いについて検討した。PNP GlcNAc を基質として、MCC（5 ヶ月齢）の腎における β-hexosaminidase 活性を測定し，正常マストミス（MWC）と比較した。MCC ではシグモイド状の反応が予想されたが、両系統ともに直線状の反応を示し、活性にも差は認められなかった。
（滝本一広）

III-3　リフトバレー熱ウイルス L 蛋白に関する研究

リフトバレー熱ウイルス（RVFV）の L 蛋白（L）は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有し、ウイルス増殖に必須の蛋白である。分節型のウイルスがもつ L 蛋白は分子量約２５０ｋDa の大型蛋白質であり、ウイルスゲノムの複製および転写に含まれる各ステップやその他の多様な機能を持つと考えられているが、その詳細は明らかでない。本研究では、RVFV-L の N 末端 200-221 に見つかったロイシンジッパー様モチーフ（L-(X)6-L-(X)6- L-(X)6-L）と L 蛋白の複製および転写機能との関連を調べた。我々はまず 207 のロイシンをプロリンに置換したミュータント L207P を作製し、ミニゲノムアッセイを行った。L207P は Wildtype と同様十分に哺乳類細胞内で発現したが、ミニゲノムの転写機能が認められず、ゲノム複製機能も低下していた。また、ミニゲノム由来のルシフェラーゼ活性も L207P では認められなかった。次に、他のロイシン（200、207、214、221）ついても、ポイントミューテーションを挿入したミュータントを用いて解析を行ったところ、214 と 221 のロイシンは機能的に類似したアミノ酸に交換可能だが、200 と 207 のロイシンは交換不能であった。この事は、同じフレボウイルス属に属するサンドフライウイルス等が持つ L 蛋白の 214 と 221 のアミノ酸がバリンあるいはイソロイシンにコードされていることと一致していた。さらに CoIP-RT－PCR にて L 蛋白とミニゲノムのインタラクションを解析したところ、L207P ではミニゲノムとの相互作用が低下していることが分かった。以上の結果から、ロイシンジッパー様モチーフが、L 蛋白のポリメラーゼ機能に重要であり、ウイルスゲノムとのインタラクションに関与していること、また、フレボウイルス属のウイルスに保存されたモチーフであることが示唆された。[新倉綾、池上徹郎[1]、C.J.Peters[1]、牧野伸治[1] 森川茂[2]、山田靖子([1]テキサス大学医学部、ウイルス１部)]

発 表 業 績 一 覧

I　誌上発表

I-1　欧文発表

1) Takimoto K, Kawamura N, and Kasama T : Storage of gangliosides GM2 and fucosyl GM1 in the kidney of MCC strain of mastomys (*Praomys coucha*). Journal of Biochemistry, 146: 439-447 (2009)
2) Murakami T,　Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, and Honda M. : Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue.　AIDS, 23:1485-94 (2009)
3) Zamoto-Niikura A, Terasaki K, Ikegami T, Peters CJ, and Makino S : Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer. J Virol., 83: 12779-12789 (2009)
4) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, and Morikawa S : Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. The Journal of general virology 90: 2266-2271 (2009)
5) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M and Morikawa S : Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. Journal of Medical Virology 81: 1102-1108 (2009)
6) Sakai K, Ueno Y, Ueda S, Yada K, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Mutoh K, Yoshioka K, Nakamura M, Takehara K, Morikawa S and Mizutani T : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan.　Veterinary Microbiology. 134: 227-232 (2009)
7) Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S and Mizutani T : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Archives of virology 154: 153-158 (2009)

Ⅱ　学会発表

II-1 国際学会

1) Hirai A, Ohtsuka N, Ikeda T, Taniguchi R, Nakagaki K, Suzuki S, Ami Y, Yamada YK, Itohara S and Taguchi F : Role of mouse hepatitis virus (MHV) receptor CEACAM1 in the resistance of mice to MHV infection as revealed by *Ceacam1* gene-replaced mice. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep 2009. Awaji, Japan
2) Niikura AZ, Ikegami T, Peters CJ and Makino S : Oligomerization of Rift Valle Fever Virus L protein. 28th annual meeting of American Society for virology. July 2009. Vancouver, Canada
3) Niikura AZ, Ikegami T, Peters CJ, and Makino S : Oligomerization of Rift Valle Fever Virus L protein. IHII/McLaughlin Colloquium. Feb 2009. Texas, U.S.A.

II-2　国内学会

1) 酒井宏治、網康至、水谷哲也、岩切章、山本正悟、平井明香、須崎百合子、福士秀悦、西條政幸、永田典代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂：急性呼吸器感染症患者からの新型レオウイルス分離とマウス感染モデルの作製。第 148 回日本獣医学会学術集会、平成 21 年 9 月、鳥取
2) 水谷哲也、伊澤晴彦、澤辺京子、小林睦生、渡辺俊平、明石博臣、前田健、佐藤朝光、酒井宏治、緒方もも子、倉根一郎、森川茂 : ウイルスの網羅的検出法（RDV 法）の改良と新規ウイルスの検出。第 148 回日本獣医学会学術集会、平成 21 年 9 月、鳥取
3) 平井明香，　大塚信久，　池田敏男，　谷口理絵，　中垣慶子，　鈴木秀佳，網　康至，山田靖子，糸原重美，田口文広：マウス系統間におけるマウス肝炎ウイルス感受性差に関する解析。第 57 回日本ウイルス学会，平成 21 年 10 月，東京
4) 酒井宏治・永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、松井珠乃、網康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎、森川茂：水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析。第 57 回日本ウイルス学会，平成 21 年 10 月，東京
5) 森川茂、福士秀悦、酒井宏治、永田典代、長谷川秀樹、松井珠乃、水谷哲也、平井明香、網康至、西條政幸、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎：カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析。第 57 回日本ウイルス学会，平成 21 年 10 月，東京
6) 新倉（座本）綾、寺崎香織、池上徹郎、C.J.Peters、牧

野伸冶：リフトバレー熱ウイルス L 蛋白は多量体を形成して機能する。第 57 回日本ウイルス学会，平成 21 年 10 月，東京

7) 山田靖子 : 動物感染実験における感染対策。第 13 回予防衛生協会セミナー「サル飼育施設における個人用保護具（Personal Protective Equipment: PPE）」、平成 21 年 12 月、筑波
8) 酒井宏治、池郁生、浦野徹、網康至、平井明香、須崎百合子、岡智一郎、片山和彦、山田靖子：実験用マウスコロニーからのマウスノロウイルスの分離と分子系統学的解析。第 149 回日本獣医学会学術集会、平成 22 年 3 月、東京

１８．検定検査品質保証室

室長　花田賢太郎

概　要

当室の業務は、生物学的製剤および抗菌性物質製剤の国家検定・検査の妥当性評価ならびに標準品の管理・評価などを通じて、より一層の国家検定・検査の信頼性の確保を図ることにある。初代室長の山口一成が平成 21 年 3 月 31 日付で定年退官し、本年度から花田賢太郎が新室長として着任した（細胞化学部長との併任)。また、大槻紀之研究官（ウイルス第三部）および水澤左衛子主任研究官（血液・安全性研究部）の当室への併任が解かれた。したがって本年度の当室の業務は、室長（併任）１名、主任研究官 2 名、技術補助員 1.5 名（１名は、週に 2 日のみ検定コンピュータ管理業務に当たる）で実施された。

6 月に WHO の Belgharbi 氏が来日し、平成 22 年度中に日本のワクチンの National regulatory system（国家規制制度）に対するアセスメントを実施することが要望された。この際、感染研もロットリリースおよびラボラトリーアクセスの機能に関してアセスメントの対象になる。アセスメントの準備段階として、自己評価票および関連資料を平成 21 年中に提出することになった。当室がその取り纏めを担当することになり、対応に忙殺された。ワクチン株製造施設（9 号棟）における新型インフルエンザワクチン株の製造においては、当室が自己点検責任者を務めるなど、品質保証業務の一部を担うことになった。新たに 10 号棟が建設されることになり、当室から提案した標準品保管室が設置されることになった。標準品の管理体制の改善に貢献するものと期待される。

上記以外に、本年度、当室で行った品質管理、品質保証に関する主な業務を挙げると、１．国家検定の実施に関わる SOP 原本の管理と SOP 作成支援、２．検定コンピュータシステムの管理、３．検定検査品質保証室ホームページおよび生物学的製剤基準のページの運営、４．教育研修小委員会による検定検査教育研修会の開催への協力、5 .検定業務評価委員会による定期査察への協力、６．品質マネジメント指針をはじめとする内規等の整備などである。

研究業務としては、内藤を中心に経皮デリバリーワクチンに関する研究、落合を中心に生物学的製剤の品質管理に関する研究、標準品に関する研究が、それぞれ進展した。

来年度は、WHO によるアセスメントが予定されており、自ずと品質保証体制の課題も明らかになってくると思われる。すでに、ワクチンのロットリリースに際してサマリーロットプロトコールの評価が我が国の制度では十分になされていないという問題点が明らかになっている。今後、一歩一歩着実に課題を克服し、品質保証体制の改善に努めてゆきたい。

業　績

調査・研究

Ⅰ．生物学的製剤の品質管理に関する研究

１．残存百日咳毒素活性測定法に関する研究

DPT ワクチンの残存百日咳毒素活性は、現在マウスヒスタミン増感（HS）試験により管理されているが、欧米を中心に動物実験代替試験法の確立が求められている。そこで非動物系試験法として百日咳毒素の ADP-リボシル化活性及び糖タンパクに対するレクチン様 Binding 活性を測定し、in vivo HS 活性との重回帰分析により HS 活性の推定式を得、こうして得られた理論的 HS 活性と in vivo での実測 HS 活性の一致度を評価した。その結果、本研究に用いたすべてのワクチンに対し相関を示す共通の推定式を与えることはできなかったが、製品別の回帰係数、定数を算出し解析することで ADP-リボシル化活性及び Binding 活性から HS 活性を推定する近似式を導くことができた。［落合雅樹、片岡紀代、山本明彦（細菌第二部)、堀内善信（医薬品医療機器総合機構)、Chun-Ting Yuen (英国 NIBSC)、Dorothy Xing (英国 NIBSC)、Michael J. Corbel (英国 NIBSC)］

２．不活化ポリオ混合ワクチンの品質確保に関する研究

不活化ポリオワクチン（IPV）は、DPT-IPV４種混合ワクチンとして開発が進められている。現在 DPT ワクチンの力価試験に用いられている標準品、参照品及び IPV の参照品を用いて、DPT-IPV を試験することに問題がないか検討した。その結果、DPT ワクチンの力価標準品、参照品はDPT-IPVに対しても使用可能であることが示唆さ

れた。IPV では参照品と試作 DPT-IPV で反応性に違いが認められる型があったが、限られたロット数による解析であることから引き続き検討が必要である。[落合雅樹、白土東子(ウイルス第二部)、片山和彦(ウイルス第二部)、脇田隆宇（ウイルス第二部)、高橋元秀（細菌第二部)、蒲地一成（細菌第二部)、堀内善信（医薬品医療機器総合機構)]

３．予防接種後健康被害ならびに副反応とワクチン成分及び性状に関する研究

DPT ワクチン接種後副反応として、急性血小板減少性紫斑病（ITP）が平成 17，19 年度にそれぞれ 6，5 例と、従来の発生頻度（1000 万人接種あたり１人程度）に比べ高頻度な報告があった。そこで、ITP の発症に関与する可能性があるワクチン側の因子について検討した。品質管理試験として国家検定が実施されている因子についてはその成績と ITP が報告されたワクチンロットの関連性ついて調査が進められることが、ワクチン側のリスク因子解明に重要である。[落合雅樹、内藤誠之郎、片岡紀代、多屋馨子（感染症情報センター)、堀内善信（医薬品医療機器総合機構)]

４．血液製剤へのエンドトキシン試験法適用に関する研究

これまでの研究からアンチトロンビン製剤はエンドトキシン試験において強い反応阻害作用を示すことから、希釈による反応干渉因子の除去では感度が不足し本試験法の適用は不可能であった。そこで、近年開発された光散乱方式エンドトキシン測定法を用いてアンチトロンビン製剤へのエンドトキシン試験適用の可能性について検討した。本法は、従来のカイネティック比濁法に比べ高感度なエンドトキシン測定が可能であったが、希釈のみでアンチトロンビン製剤の反応干渉因子を除去することはできなかった。しかし、希釈後加熱することにより反応干渉因子を除去し、エンドトキシンの測定が可能となることが示唆された。[落合雅樹、山本明彦(細菌第二部)、岩城正昭（細菌第二部)、内藤誠之郎]

５．日本の国家検定制度と WHO の考えるワクチンロットリリースの比較

日本の国家検定制度と WHO が作成した「Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities 案（第５版)」に示されるロットリリースに対する考え方を比較した。その結果、現在のところ我が国で実施していないロットリリースにおけるサマリープロトコール審査は、ワクチンの品質保証システムの向上にとって重要なプロセスであり、国際的な調和の観点からも今後 我が国に導入し、発展させていくことが望まれる。[落合雅樹、内藤誠之郎、花田賢太郎、渡辺治雄（副所長)]

Ⅱ．新規ワクチンに関する研究

１．溶解性マイクロニードルアレイを用いた経皮ワクチンに関する研究

溶解性マイクロニードルアレイは、薬物を含有した水溶性・洩糸性高分子を、マイクロメートルオーダーの微小針に成型・乾燥し、基盤上に配列した新規の皮膚薬物送達システムである。微小針は皮膚上層のみに刺入・溶解し、薬物を皮内に送達する。この新規システムのワクチンへの応用可能性を検討するため、以下の研究を行った。

(1) 皮内注射との比較

卵白アルブミン（OVA）をモデル抗原として溶解性マイクロニードルアレイで免疫した場合と皮内注射した場合とでのマウスにおける抗体応答の用量反応性を比較した。その結果、溶解性マイクロニードルアレイは、皮内注射と同等の効率で免疫応答を誘導することが明らかになった。

(2) 血中抗体の持続

OVA 含有溶解性マイクロニードルアレイでマウスを３回免疫してから、約１０ヶ月後採血して、血中の抗原特異的 IgG 抗体価を測定したところ、免疫直後の抗体価とほとんど変わらないレベルであった。溶解性マイクロニードルアレイによって誘導される血中抗体が長期間持続することが示された。

[内藤誠之郎、落合雅樹、片岡紀代、清原知子（ウイルス第二部)、前山順一（血液・安全性研究部)、伊藤由佳子、高田寛治（京都薬科大学）]

品質管理に関する業務

Ⅰ．生物学的製剤の国家検定・検査に関する品質保証業務

１．WHO アセスメントへの対応準備

平成 22 年中に計画されている「ワクチンの National regulatory system（国家規制制度）に対する WHO アセスメント」への対応として、WHO への事前提出が必要な自己評価票及び関連資料（規制当局によるロットリリース及びラボラトリーアクセス）を厚生労働省および所内

関連部門と調整し取り纏めた。[内藤誠之郎、落合雅樹、内田孝子、片岡紀代、花田賢太郎]

２．国家検定に関する SOP 原本の一元管理

平成 21 年度中に、新規作成 38 通、修正 7 通、改訂 38 通、廃止 1 通の SOP を受け付けた。また、初期の回収から漏れていた SOP 原本を 50 通回収した。平成 21 年度末に有効な SOP は 436 通である。
[内田孝子、内藤誠之郎、落合雅樹、花田賢太郎]

３．検定・検査標準作業手順書作成要綱の改定

当室で作成した改定案をもとに品質保証運営委員会における修正を経て、業務運営委員会および検定協議会（平成 22 年 2 月 4 日）にて承認された。[内藤誠之郎、落合雅樹、内田孝子、花田賢太郎]

４．生物学的製剤の国家検定における品質マネジメント指針の改定（第 4 版）

品質マネジメント指針の「原則」および付属資料２などの改定案について、品質保証運営委員会での修正を経て、業務運営委員会および検定協議会（平成 21 年 5 月 7 日）にて承認された。[内藤誠之郎、落合雅樹、内田孝子、花田賢太郎]

５．国家検定関連内規の制定

当室で原案を作成した「国家検定の実施に関わる標準作業手順書の閲覧について」（平成 21 年 4 月 30 日）、「部長等および室長が交代する際の検定 SOP の取扱いについて」（平成 21 年 6 月 25 日）、「生物学的製剤基準に収載されている国内標準品及び国内参照品、試験毒素等の製品交付についての国立感染症研究所の内規」（平成 21 年 9 月 3 日）が、それぞれ承認された。[内藤誠之郎、落合雅樹、内田孝子、花田賢太郎]

６．検定・検査教育研修会への協力

教育研修小委員会による講習会の開催に協力し、講師等を務めた。また、これに伴い、検定関係者の名簿を整備し、講習会への出席者の記録を行った。[内藤誠之郎、落合雅樹、内田孝子、花田賢太郎]

７．検定業務評価委員会による査察への協力

事前に査察対象室の SOP ファイルを準備して、査察委員に提出した。すべての査察に同行して意見を述べた。[落合雅樹、内藤誠之郎、内田孝子]

８．検定検査品質保証室のウェブページの運営

検定検査業務の円滑な遂行に資するために、検定検査品質保証室のウェブページを、随時、最新の状態に更新した。[内田孝子、内藤誠之郎、落合雅樹、花田賢太郎]

９．生物学的製剤基準ウェブページの整備

生物学的製剤基準のウェブページを、これまでの生物学的製剤基準の改正内容を反映させて最新の状態に整備した。[内田孝子、内藤誠之郎、落合雅樹、花田賢太郎]

Ⅱ．国家検定・検査業務品質管理コンピュータシステム関連業務

１．検定コンピュータシステムの管理者業務

検定コンピュータシステムの日常メンテナンス業務およびシステム管理業務を実施するとともに、トラブル等への対応、必要に応じてシステムの改善を図った。またシステム開発業者との定例会を開催し、システムに関する情報の共有化および今後の方針について検討した。[落合雅樹、片岡紀代、内田孝子、内藤誠之郎]

２．生物学的製剤基準の一部改正等に伴うシステム情報の登録業務

生物学的製剤基準の一部改正（平成 21 年 3 月 31 日及び 7 月 7 日告示）に伴う、検定基準の一部改正（同日告示）に対応し、システム情報の変更を実施した。今年度、新規に承認されたヒトパピローマウイルスワクチン、結合型肺炎球菌ワクチン、輸入新型インフルエンザワクチン（特例承認）のシステムへの登録を行った。また、A 型インフルエンザ HA ワクチン（H1N1 株）については、季節性インフルエンザ HA ワクチンとシステム上で区別できるような対応を行った。[片岡紀代、落合雅樹、内田孝子、内藤誠之郎]

Ⅲ.ワクチン株製造施設（9 号棟）の運営支援業務

１．品質管理文書の整備に関する支援

9 号棟での新型インフルエンザワクチン株製造の稼働に向けて、品質管理文書を整備する業務を支援した。[内藤誠之郎、落合雅樹]

国際協力関係業務

Ⅰ．研修

１．台湾BFDA（Mr. Chang-Wen Chi）：ワクチンの品質保証、品質管理について（平成21年7月）［落合雅樹、内藤誠之郎］

２．韓国FDA（Mr. Ho-Kyung Oh）：ワクチンの品質管理、標準品の制定・管理ついて（平成21年12月）［落合雅樹、内藤誠之郎］

３．韓国FDA（Dr. Choongman Hong, Mr. Young Min Park, Dr. Young-Man Cho）：日本のワクチンの品質保証制度と感染研の役割について（平成21年12月）[内藤誠之郎]

Ⅱ．講演

１．JICA「ワクチン品質管理技術コース」研修：標準品の制定について（平成21年11月）［落合雅樹］

２．JICA「中国ワクチン予防可能感染症サーベイランス及びコントロール（VPD）プロジェクト」研修：日本のワクチンの品質管理について（平成21年11月）[内藤誠之郎]

Ⅲ．WHO 会議参加

１．60th WHO Expert Committee on Biological Standardization（第 60 回　WHO 生物学的製剤の標準化に関する専門家会議）:平成 21 年 10 月､ジュネーブ WHO 本部［落合雅樹、濱口功（血液・安全性研究部）、水澤左衛子（血液・安全性研究部）］

２．WHO Workshop on Lot Release of Vaccines（ワクチンのロットリリースに関するワークショップ）：平成 21 年 12 月、北京．[内藤誠之郎、大井恒宏（医薬食品局）]

発　表　業　績　一　覧

Ⅰ．誌　上　発　表

１．欧文発表

1) Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J, Furuhata K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. Biologicals 37:8-17, 2009.
2) Masumi A, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Mizukami T, Takizawa K, Momose H, Naito S, Yamaguchi K. Interferon regulatory factor-2 induces megakaryopoiesis in mouse bone marrow hematopoietic cells. FEBS Letters 583:3493-500, 2009.

２．和文発表

1) 落合雅樹、山本明彦、堀内善信：血液製剤に対するエンドトキシン試験法の適用と基準化、エンドトキシン研究 12、医学図書出版、93-7, 2009

Ⅱ．学　会　発　表

１．国際学会

1) Yuen, C., Horiuchi, Y., Asokanathan, C., Cook, S., Douglas-Barsley, A., Ochiai, M., Corbel, M. and Xing, D. An *in vitro* biochemical assay system alternative to the *in vivo* Histamine sensitisation test for pertussis vaccines. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, August 30 – September 3, 2009, Rome, Italy

２．国内学会

1) 内藤誠之郎，高田寛治：溶解性マイクロニードルアレイを用いた無痛ワクチンの開発．第 8 回国際バイオフォーラム，平成 21 年 7 月，東京．
2) 落合雅樹、山本明彦、片岡紀代、堀内善信、荒川宜親、Development of alternative assays to the mouse histamine sensitization test for acellular pertussis vaccines、第 13 回日本ワクチン学会学術集会、平成 21 年 9 月、札幌
3) 内藤誠之郎，片岡紀代，清原知子，落合雅樹，前山順一，倉永雅彦，千北一興，高田寛治：溶解性マイクロニードルアレイを利用した経皮ワクチンの試み．第 13 回日本ワクチン学会，平成 21 年 9 月，札幌．
4) 百瀬暖佳，水上拓郎，内藤誠之郎，前山順一，益見厚子，倉光　球，滝沢和也，浜口　功：遺伝子発現解析を用いた新たなワクチン安全性評価法構築への試み．第 13 回日本ワクチン学会，平成 21 年 9 月，札幌．

１９．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。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1−5類感染症（平成15年11月1−5類に類型が変更された。それまでは1−4類感染症）を中心にしたサーベイランスを行っている。その後幾度か感染症法改正が行なわれているが，その都度サーベイランスの重要性が強調されている。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。現在これらのサーベイランスシステムは、NESID (Natonal Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases)と総称されている。

血清疫学調査は、感染症流行予測調査事業の中で行っている。このデータ等を基礎とし、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、あるいは新たに判明した感染症について過去に遡った血清抗体保有状況の検索なども 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感染症危機管理対策上、極めて重要である。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。FETP も平成21年度には11期生を向かえた。

IDSC には、ラボ機能もある。予防接種関連疾患のウイルス診断、血清抗体保有状況、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。ことに、不明疾患のスクリーニングに関しては、感染研各専門部と競合しないような形での機能充実を図っており、また外部からの検査依頼に関して感染研の窓口機能なども要に応じて引き受けている。自治体などにおける病原体検査の標準化、検査法の伝達などの病原体診断にかかわる技術伝達講習も行っている。

IDSC は、上記のような機能を６室で分担ないしお互いに協力し合いながらし、主に以下のような業務研究を行っている。なお平成２１年度の新型インフルエンザ（パンデミック H1N1 2009）発生時には、それぞれの室の共同作業で対策に当たることができた。

第一室　（感染症対策計画室：谷口清州室長）

感染症対策における技術的な対応として、国内や国外における公衆衛生インパクトの強い感染症流行の早期探知とその調査、感染症対策のための計画立案と関係機関への技術的な支援を一義的な業務としており、この一環として、感染症実地疫学専門家の養成を行っており（Field Epidemiology Training Program)、国内外における感染症アウトブレイクの際には、国、地方自治体の要請に基づいてチームを派遣し、疫学的調査対応の支援を行っている。また国際的な感染症対策についても、世界保健機関（WHO)、世界健康安全保障イニシアティブ（GHSI）の枠組みにおいて国際機関や厚生労働省と協力して従事している。これらと並行して、業務をより効果的に行うための早期探知、調査手法、健康危機事例への対応に関する研究を行っている。

第二室　（感染症情報室：多田有希室長）

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の収集・分析、及びそ

の結果の還元と提供を行っている。感染症情報の還元、提供は、感染症週報(IDWR)、病原微生物検出情報（IASR)、感染症発生動向調査事業年報、感染症情報センターホームページなどによって、主に同室の業務として行われている。

より良いサーベイランスのための情報解析方法の研究、システム改善、蓄積された情報の効率よいまた分かりやすい還元方法の研究、メデイアとのコミュニケーションなども，二室の主なテーマである。

第三室　（予防接種室：多屋馨子室長）

感染症流行予測調査事業の一環として行われている血清疫学調査(感受性調査)ならびに感染源調査の立案と実施、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。また感染症研究所業務として行われている国内血清銀行の管理運営を行っている。この一環として、新たに判明した感染症について過去に遡った血清抗体保有状況の検索なども行なっている。

また麻疹対策 (Measles Elimination)は世界においてまたわが国においても重要な課題であるが、国内における麻疹ゼロ作戦は、三室を中心に行っている。

第四室　（病原診断室：藤本嗣人室長）

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。全国衛生微生物協議会の病原微生物レファレンスセンターのうち、アデノウイルス、ノロウイルスのレファレンスセンターを担当している。ことに、不明疾患のスクリーニングに関しては、感染研各専門部と競合しないような形での機能充実を図っており、また外部からの検査依頼に関して感染研の窓口機能なども果たしている。

第五室　（細菌研修室：伊藤健一郎室長）

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。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。 また、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、 新規検査法の開発研究なども行っている。

第六室　（ウイルス研修室：木村博一室長）

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。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。また、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、 新規検査法の開発研究なども行っている。

麻疹対策 (Measles Elimination)は世界においてまたわが国においても重要な課題であることは3室においても述べたが、ラボ診断に関しては，全国地衛研における麻疹実験室診断の標準化と強化など、ウイルス3部と協力して行なっている。

また、これらの室業務とは別個に、再任用制度を利用し布施主任研究官（元血液安全性研究部）を情報センター所属とし、広報委員会活動ならびに情報センターにおける広報活動を担当するようになった。

業　　績

調査・研究

Ⅰ．感染症発生動向調査事業に関する研究

1.　サーベイランスシステムの改善に関する研究

厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業として「国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能および我が国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究」(主任研究者　谷口清州）を組織し、国際的、あるいは国内における感染症サーベイランスの在り方について研究を行い、折からのパンデミック (H1N1)2009 の発生に際しては、パンデミックの臨床疫学的な研究を行う、今後の戦略的なサーベイランス手法やシステムの改善事業に対して技術的支援を行った。

［谷口清州、多田有希、安井良則、藤本嗣人、山下和予、重松美加、森兼啓太、砂川富正、大日康史、島田智恵、菅原民枝、井内田科子、岡部信彦］

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究」(研究代表者　谷口清州）の一環として、感染症発生動向調査の対象疾患の報告状況に関して検討した。定点報告疾患については、注意報・警報システム及び全国罹患数推計の検討および検討方法の評価を、2008 年を追加して行った。また、2009 年は新型インフルエンザが発生し流行したので、急遽これも解析に加えた。全数報告疾患については、4 類および 5 類感染症の時間的推移・空間的分布の

解析を継続して行った。また、性感染症の罹患数推計を実施した。さらに、発生動向調査システムの改善方法の提案を文書にまとめた。

［多田有希、谷口清州、重松美加、安井良則、島田智恵、永井正規（埼玉医科大学)、太田晶子（埼玉医科大学)、橋本修二（藤田保健衛生大学)、川戸美由紀（藤田保健衛生大学)、村上義孝（滋賀医科大学社会医学講座医療統計学部門)］

3. 中央感染症情報センターの視点からの感染症サーベイランスの評価と改善に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究」(研究代表者　谷口清州）の一環として、中央感染症情報センターの立場から、地方感染症情報センターの立場から検討する分担班と共に、全国の地方感染症情報センターへのアンケート調査結果を含め、感染症発生動向調査システムの現状と課題を抽出した。この結果は、今後のシステム改善に向けた基礎資料として活用する。

［多田有希、島田智恵、阿保満（東京都多摩府中保健所)、鈴木智之（群馬県衛生環境研究所)、松館宏樹（岩手県環境保健センター)、神谷信行（東京都健康安全研究センター)、灘岡陽子（東京都健康安全研究センター)、山田文也（埼玉県衛生研究所）他］

4. 症候群サーベイランスの実用

新型インフルエンザの発生に伴い薬局サーベイランスと学校欠席情報共有システムを稼働させえた。薬局サーベイランスについて2009年4月から全国約4000薬局(2010年3月末現在)の協力を得て、前日のタミフル・リレンザの情報を毎朝関係者に還元するとともに、国、感染研、都道府県担当者に除法提供を行った。また国民一般に対しても情報提供を毎日行った。都道府県では、発生動向調査よりもより速く、より細かく、より正確な情報として、対策に活用された。学校欠席情報共有システムは、2009年2学期から9県の全校において実施し、その情報を保健所・県庁に提供し、対策に貢献した。

［大日康史、菅原民枝、谷口清洲、、岡部信彦］

5. 百日咳発生ＤＢの構築・運用

平成19年の百日咳の集団発生を受けて、百日咳発生DBを構築し、運用した。年4回サマリーを公開した。

［大日康史、菅原民枝 、山本久美 、多屋馨子 、安井良則 、岡部信彦］

6. HIB発生ＤＢの構築・運用

2008年12月から、Hibワクチンが接種可能となり、ワクチンの効果によるHib感染症発生動向の変化を見る意味においても、国内の患者発生動向を把握することが重要課題となり、DBを構築し運用した。

［大日康史、菅原民枝 、山本久美 、多屋馨子 、安井良則 、岡部信彦］

7. 有志医師によるインフルエンザDBの運用

2000年から継続して実施しているMLインフルエンザ前線情報 DB の運用を今年度も継続して行い、パンデミック A（H1N1）流行の2009年の夏季期間中においても、394名の有志のご協力、89,361件のインフルエンザ症例に関する報告を得られた（2010年7月21日現在)。このDBは麻疹や百日咳のDBのモデルともなったもので、今後のパンデミックインフルエンザ再流行の検出・推移の把握、および他の新型インフルエンザの検出についても有用であることが期待される。

［砂川富正、谷口清州、西藤なるを(西藤こどもクリニック)、岡部信彦］

Ⅱ．パンデミック、バイオテロ、公衆衛生対策に関する研究

1. 国際保健規則（IHR 2005）の改正に伴う国内体制に関する研究

厚生労働省健康安全・危機管理対策総合研究事業「改正国際保健規則への対応体制構築に関する研究」(主任研究者　谷口清州）を組織し、米、英、仏、独、豪の先進各国における進捗状況について、報告システム、PHEIC の判断、サーベイランスに着目して情報収集と現地での担当者聞き取り調査を行い諸外国における対応をまとめ、日本における体制の整備に関してまとめた。

［谷口清州、森兼啓太、砂川富正、重松美加、松井珠乃、山本久美、押谷　仁（東北大学)］

2. 新型インフルエンザのパンデミック対策に関する研究

厚生労働科学特別研究事業「新型インフルエンザ（インフルエンザ A/H1N1swl）発生への検査、調査についての準備及び初期対応の総括と病原体検査や感染者調査に関する今後の国と地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究」（主任研究者　宮村達男）において、2009年から2010年に掛けて発生したパンデミック（H1N1)2009 における対応を総括し、それらの評価を行った。

［感染症情報センター、FETP 全員］

3. 内閣府重要政策課題への機動的対応の推進プログラム

推進事業の一環として､｢新型インフルエンザの国内発生状況の早期把握と迅速な国内対応の決定に関する緊急研究」を行い、国民のインフルエンザ（H1N1)2009 に対する血清学的免疫性の検証、インフルエンザ（H1N1）2009 ウイルスサーベイランス体制の構築、およびワクチン接種推奨のあり方を含む、国民への情報発信、リスクコミュニケーション確保の方法について検討を行い、提言を作成した。

［岡部信彦、多屋馨子、谷口清州、安井良則、新井智］

4. 人工呼吸器の標準化に関する研究

厚生労働科学特別研究事業「非常時対応人工呼吸器の標準化に関する研究」(主任研究者　大村昭人)の分担研究として、米国における戦略的備蓄プログラム（SNS）における人工呼吸器の備蓄に関して調査を行い、我が国における人工呼吸器の備蓄についての基礎資料を提供した。

［谷口清州］

5. 新型インフルエンザ対策としての検疫の有効性・国内外の体制の検証に関する研究

パンデミック発生に伴い特別研究として発足した厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業)「新型インフルエンザ対策における検疫の効果的･効率的な実施に関する研究」(主任研究者：吉村健清）において、検疫の有効性などを検証した。新型インフルエンザに対する検疫は､国内での発生初期には、その疾患の疫学に関する情報は十分ではなかったので、国民へのリスクコミュニケーションや、症状などの臨床情報を得るという意味で、当初は一定の役割は果たしたといえる。しかし、その疾患としての性質上、検疫によって効率よく全ての症例を検出することは困難であり、本ウイルス感染症の性質や地域での感染伝播の状況を早期に把握し、検疫の運用方法を早期に見直す必要があったと思われた。特にスピード感を持った柔軟な体制の変更が容易ではないことが問題であり、また、国内において海外渡航歴の無い症例を検出出来ない体制には問題があった。外国における情報としては、米国で最初に発見された 2 例のうち 1 例は通常のサーベイランスからの報告であり、日頃からのサーベイランスの重要性を示した結果であった。また、重症度ではなく、パンデミック発生地域によって異なる対応を準備し、状況に応じた対策が取られていた。WHO においては、IHR を元にした対応として、疾患の重症度や伝播力を見据えた対応が推奨されていた。以上を報告書にまとめた。

［砂川富正、島田智恵、神谷元、谷口清州、松井珠乃］

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

(1) 数理モデルを用いて、新型インフルエンザの被害を予測し、公衆衛生的対応を評価、検討した。首都圏、福岡県、仙台市、中京圏、関西圏、宮崎市、沖縄県、札幌市に加えて、弘前市、むつ市、秋田市、宍道湖中海都市圏、高知市、徳島市、富山市、新潟市において、首都圏で一例目の新型インフルエンザ感染者がでた後に、地方都市へ感染拡大したと想定したモデルを用いて、被害拡大を予測した。また政策介入として、休校、外出自粛の効果について検討した。それらの流行拡大に関して GIS（地理情報処理システム）を用いて表現し、自治体に提供した。

(2) 数理モデルに用いるパラメーターのうち、人々の行動に関する調査研究を行った。特に、パンデミック時の外出自粛の割合、在宅勤務体制の現状、食料備蓄の現状について検討した。

［大日康史、菅原民枝、谷口清州、岡部信彦］

7. バイオテロ対策の数理モデルの開発

昨年度に引き続きバイオテロに使用される可能性のある感染症、特に天然痘、ペスト、炭疽菌に関して、数理モデルを用いて公衆衛生対応について評価した。その結果を、GIS（地理情報処理システム）を用いて地図上に表現し、より現実的に被害の探知、地域的な拡散を検討した。天然痘の数理モデルは天然痘対応指針の改訂の議論に提供し、その成果およびプログラムはは厚生労働省をはじめ関係部局に提供した。本年度は特に、対策として備蓄が必要な本数の推定を行った。

［大日康史、菅原民枝、谷口清州、岡部信彦］

8. バイオテロ防止におけるバイオリスク管理、教育、訓練の方法論に関する研究

(1) 厚生労働科学研究費補助金　新興･再興感染症研究事業「バイオリスク管理の包括的強化及び必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究」（研究代表者：杉山和良）の研究分担として、効果的バイオリスク管理の実践のための教育方法の検討と教材作成を目標とした研究を行った。科学的なバイオリスク評価手法の確立、リスクコミュニケーションを含めたバイオリスク低減に関する管理の実践的方法、日常研究活動を支援する継続教育としてのバイオリスク対応の教育訓練法の検討と教材の作成提供について、米国、英国、カナダ、デンマーク、スウェーデン、国際学術団体と協力し、国際指針に基づく研修の作成、ワークショップやシンポジウムの開催、翻訳などによる情報の普及、施設毎に自己診断できるバイオセキュリティリスク評価ツールの配布版作成のための検討、バイオリスク評価理論の確立へ向けての国際調査とリスク評価を行った。郵便事業の再編を契機に、病原体

輸送にかかわる業種への研修の実施、携行品の検討などを行った。

(2) バイオリスク管理の国際基準作成「CEN WORKSHOP AGREEMENT 15793」を背景に、欧州バイオセーフティ学会のイニシアチヴによる、バイオセーフティ専門家の定義と必要技能の特定および、技能評価と資格認証の仕組みの確立への討議へ参加協力し、報告文書と技能修得モデルプログラムの作成に着手した。

［重松美加、安藤秀二（ウイルス第一部)、佐多徹太郎（感染病理)、Helmut Prendinger （国立情報学研究所)、Jennifier Gaudioso (Sandia National Laboratories), Susan Caskey （同）］

9. 感染症法のリスクコミュニケーションに関する研究

厚生労働科学研究費補助金 新興･再興感染症研究事業「感染症への国民啓発に効果的なリスクコミュニケーション方法と教育方法に関する研究」(研究代表者：丸井英二）の分担研究として、海外旅行、気候変動、パンデミックやバイオテロなどの感染症を取り巻く状況の変化から、あらゆる人にとって知識を身につけ、自己防衛することが重要となったことを受けて、効果的な感染症のリスクコミュニケーションの方法としての、映像、ゲーム、リーフレットの作成に協力し、効果的なリスクコミュニケーションのための研修方法に必要な事例情報に関する情報収集と、研修用シナリオ作成のモデル作成、新型インフルエンザのメディア対応の分析を行った。

［重松美加、谷口清州］

10. バイオテロ防止およびバイオテロ下における効果的な医療体制のあり方および評価に関する研究

厚生労働科学研究費補助金 健康安全･危機管理対策総合研究事業「健康危機管理における効果的な医療体制のあり方に関する研究」(主任研究者：大友康裕）の分担研究として、感染症医療体制と災害･救急医療体制の連携方法に関する研究、特に、バイオテロ関連疾患、新型インフルエンザについて情報を収集し、救急や災害医療の役割について検討を行った。得られた情報を､同研究班の DMAT 研修の場で現場の医師等に還元し、協議を行った。

また、バイオテロ関連疾患、新型インフルエンザと医療体制について、課題を整理した。

［砂川富正、松井珠乃、谷口清州、岡部信彦、大友康裕（東京医科歯科大学大学院救急災害医学分野）］

11. 健康危機情報の迅速な分析と提供によるリアルタイムの対策活用のために必要な人材と仕組みの特定と養成方法に関する研究

厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合事業「積極的健康危機情報の収集と分析および健康危機管理行政への情報提供のための情報探索機構に関する研究」(研究代表者：重松美加）において、改正国際保健規則（IHR2005）の求めるコア・キャパシティのひとつである新しいサーベイランスによる健康危機情報の早期検知に関する、運用、人材に着目した日本の課題達成への提言を目指した国際的情報収集と、調査分析を開始した。World Wide Web 上のニュース、ブログ、プレスリリース、ルーモア等から健康危機情報の早期検知を行っている世界の 6 つのシステムについて、情報分析の面から調査と比較解析を行った。また、システム運用の改善についての技術的検討を行った。

［重松美加、谷口清州、藤井 聡（京都大学)、Nigel Collier（国立情報学研究所）］

12. 2009 年度第一四半期の新型インフルエンザ対策実施を踏まえた情報提供のあり方に関する研究

厚生労働科学研究費補助金厚生労働科学研究特別研究事業「2009 年度第一四半期の新型インフルエンザ対策実施を踏まえた情報提供のあり方に関する研究」研究班の研究代表者として、本研究事業の実施全般に携わった。本研究班では、①ハイリスクとされている対象者が提供する情報の選択・作成に参画し､実際に求められている情報の探求と提供を行う。②流行に直面した自治体の側から、情報共有と提供をキーワードにした厚生労働省、医療機関との連携、市民への情報提供、メディア対応の実態をあげ、情報提供のありかたを検証する。③医療提供の最前線の医師が流行に際してどのような情報を取得し、認識していたかを確認し、適切な情報提供に向けての課題をあげる。の 3 点を主要なテーマとした。テーマ①ではそれぞれの疾患の患者委員の公募を行い、他に当該分野を専門とする医師やその他の専門家によって作成グループを構成してパンフレットの作成にあたり､「ぜんそくなどの呼吸器疾患のある人へ」、「糖尿病または血糖値が高い人へ」、「がんで治療中の人へ」、「妊娠中の人や授乳中の人へ」の 4 種類のパンフレットが作成され、完成順に 2009 年 9 月から 12 月にかけて厚生労働省のホームページに公開された。テーマ②では、横浜市、神戸市、東京都の 3 自治体で新型インフルエンザ対策の中心となった医師と研究グループを結成し、各自治体で行われた新型インフルエンザ対策について、情報提供と共有をテーマとして検証し、まとめを行った。テーマ③では、医療現場の医師を対象とし、開業医を中心に直接インタビューすることとし、国や自治体からの情報提供がマスコミ先行となることが多く、特に医療現場からは不満の声が

きかれた。研究成果は報告書としてまとめられたが、本研究班の研究成果に関しては、マスコミからの取材があり 2010 年 5 月 25 日付毎日新聞、同年 5 月 26 日付読売新聞にその一部内容が掲載された。

［安井良則、岩田真美（横浜市健康福祉局）、白井千香（神戸市保健福祉局）、中山健夫（京都大学大学院医学研究科）、前田秀雄（東京都福祉保健局）］

13. パンデミックインフルエンザ 2009 の分子進化額的解析に関する研究

日本で 5 月～9 月に採取されたパンデミックインフルエンザ A(H1N1)pdm の分離株（74 株）の全ゲノムの塩基配列と、公共データベース上の同時期の A(H1N1)pdm 164 配列をアライメントし分子進化学的解析法で解析した。世界中のウイルスは数個の例外を除き４つのクラスターに分類された。cluster 1 は cluster 2 よりも早くから発生していたが、cluster 2 がより世界中に分布を広げていた。残りの２つのクラスターは、cluster 1, 2 の各セグメントの reassortant であることがわかった。我が国で流行したウイルスは少なくとも約 28 の異なる起源をもっており、うち 12 ケースは複数の国内株が一つの単系統（micro-clade: MC）にまとまっていた。大阪・神戸の micro-clade と、初期の学校由来のアウトブレイクである福岡に関連する micro-clade に属するウイルスは、共に 6 月以降の国内検体からは検出されなかった。12 個の micro-clade すべてについて、その共通祖先ウイルスが何時生まれたか（tMRCA）を進化学的手法で推測し、micro-clade の大半が 5 月下旬から 6 月上旬に生じていることを突き止めた。これらのいくつかは夏季にわたって国内の様々な場所(沖縄アウトブレイクを含む）に感染を広げていた。

［椎野禎一郎、岡部信彦、安井良則、砂川富正、田代真人、小田切孝人（インフルエンザウイルス研究センター）、藤田信之（製品評価技術基盤機構）、渡邊治雄（副所長）］

14. 日本におけるパンデミックインフルエンザ A(H1N1) 2009 アウトブレイク時の学校閉鎖の効果に関する研究

厚生労働省循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業「健康日本２１の中間評価、糖尿病等の「今後の生活習慣病対策の推進について（中間取りまとめ）」を踏まえた今後の生活習慣病対策のためエビデンス構築に関する研究（主任研究者：緒方裕光）の分担研究者としてパンデミックインフルエンザ A(H1N1) 2009 アウトブレイク時における学校における感染リスクの検討と学校閉鎖の効果を検討した。対象は東京近郊の中核市で、保健所、学校及び教育委員会より情報を収集し、相対危険度を算出し、学校閉鎖の効果は発熱者数を解析した。学校閉鎖に関しては学校閉鎖後数日で発熱者が急激に減少し、近隣の学校と同等の発熱者数となり、学校閉鎖の効果がみられた。発熱者数を継続的に収集することが重要である。

［八幡裕一郎、山本久美、島田智恵、砂川富正］

Ⅲ. 感染症の疫学、統計等に関する研究

1. 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、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、「感染研」モデルを用いてインフルエンザによる超過死亡を推定し検討した。特に本年度は新型インフルエンザの死亡へのインパクトの推定が重要であったために、毎月厚生労働省統計情報部からの人口動態調査速報の公表を受けて実施し、厚生労働省と情報共有すｒとともに、一般公開した。

［大日康史、菅原民枝、谷口清州］

2. インフルエンザ関連死亡迅速把握に関する研究

18 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、各都市毎の週単位の超過死亡を推定し、迅速な情報還元を行った。

［大日康史、菅原民枝、前田明日香、谷口清州、厚生労働省健康局結核感染症課、18 大都市・特別区衛生主幹部局］

3. インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動に関する研究

インフルエンザ様疾患罹患時に見られる異常行動について、前向き調査を重度、軽度にわけ実態把握を行い、安全性調査委員会に情報提供した。

［岡部信彦、大日康史、菅原民枝、谷口清州］

4. リケッチア症サーベイランスの評価

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「リケッチアを中心としたダニ媒介性細菌感染症の総合的対策に関する研究」（研究代表者　岸本寿男、研究分担者　岡部信彦）により、全国の衛生研究所を対象としてつつが虫病、日本紅斑熱に関する広報状況を調査した。また、市民を対象としたつつが虫病、日本紅斑熱の認知度および受診行動について、熊本県（上天草市）、兵庫県（洲本市、神戸市）において調査を行った。また、全国の衛生研究所におけるリケッチア症に関する啓発活動状況について調査を行った。

［松井珠乃、藤本嗣人、冨岡鉄平、佐藤弘、島田智恵、岡部信彦］

5. 食中毒調査の精度向上のための手法の開発

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進　研究事業)「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」（研究代表者　岡部信彦）により、日本において市中で症例対照研究を実施するための基礎的な研究を実施した。
［松井珠乃、春日文子、岡部信彦］

6.　食品媒介経路の締める比率や原因食品の寄与率推定のための手法の開発

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心･安全確保推進　研究事業)「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」（研究代表者　岡部信彦）により、4 自治体（岩手県、群馬県、東京都多摩地区、熊本市を除く熊本県）の協力を得て、腸管出血性大腸菌の散発感染例に対して、インターネット調査会社の登録者から対照を選び症例対照研究を実施した。多変量解析により有意なリスク食品が特定された。
［松井珠乃、大日康史、八幡裕一郎、春日文子、岡部信彦］

7.　広域食中毒事例調査における課題検出の研究

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業)「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」（研究代表者　岡部信彦）により、国内で発生した広域食中毒事例 2 件における自治体の課題について、メールやインタビューによる調査を実施し、結果の一部を厚生労働省食中毒部会にて報告した。
［砂川富正、多田有希、島田智恵、齊藤剛仁、冨岡鉄平、杉下由行、吉田眞紀子、岡部信彦］

8.　海外の食品媒介疾患対応ガイドラインに関する調査

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心･安全確保推進　研究事業)「食中毒調査の精度向上のための手法等に関する調査研究」（研究代表者　岡部信彦）により、「世界保健機関　食品媒介疾患のアウトブレイク：調査と対策のためのガイドライン」及び「米国食品媒介アウトブレイク対応改善協議会　食品媒介疾患のアウトブレイク対応ガイドライン」を収集し、翻訳した。
［松井珠乃、中島一敏、春日文子、岡部信彦］

9.　性感染症（STD）発生動向に関する研究

厚生労働科学研究費補助金　新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「性感染症に関する予防、治療の体系化に関する研究」（研究代表者　小野寺昭一）の一環として、感染症法に基づきサーベイランスが実施されている性器クラミジア感染症、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症（以上定点把握）及び梅毒（全数把握）の発生動向を解析した。特に定点把握については、地域毎の定点数や診療科比率などを含め、サーベイランスデータの妥当性についての評価することが、引き続き今後の課題である。
［岡部信彦、多田有希］

10.　動物由来感染症の発生動向に関する研究

厚生労働科学研究費補助金　新興･再興感染症研究事業「我が国における動物由来感染症の感染実体把握に資する研究」（研究者代表者　多田有希）として、学会誌などで発表された動物由来感染症関連の症例報告を文献データベースをもとに収集し集計・分析した。感染症法により届け出られた動物由来感染症のうち 7 疾患についておよび動物の届出状況について、その届出内容を集計・解析した。また、臨床現場で利便性を考慮し、動物由来感染症の 6 疾患につき濾紙採血検体による動物由来感染症関連の抗体検査を試みた。狂犬病に関して、諸外国におけるヒト狂犬病症例をインターネット等を利用して収集し、治療については関連文献を収集し、分析した。またイヌ狂犬病の症状を過去の文献をもとに比較検討した。狂犬病ワクチンの皮内接種法について、健康成人を対象に接種前後の抗体検査及び副反応を調査して、その有効性と安全性を検討した。
［多田有希、佐藤弘、髙山直秀（客員研究員)、赤尾信行（東京医科歯科大学)、菅沼明彦（東京都立駒込病院)、福士秀人（岐阜大学)、丸山総一（日本大学)、万年和明（大分大学)、柳澤如樹（東京都立駒込病院）］

11.　急性脳炎・脳症の発生動向に関する研究

科学研究費補助金事業　基盤研究Ａ「小児における急性脳炎・脳症の病態・診断・治療に関する研究（研究代表者：森島恒雄）の一環として、感染症法のもとで行われている感染症発生動向調査において 2004～2009 年に報告された急性脳炎･脳症の発生状況をまとめた。6 年間に 1,467 例（15 歳未満が 992 例）報告された。6 年間に 1 例の報告されていない自治体もあり、報告漏れがあることも示唆された。届出の徹底、転帰の把握、病原体検索などが課題である。
［安井良則、多田有希、島田智恵、具芳明、岡部信彦］

12.　感染症疫学情報の解析・評価に関する研究

特定の感染症を患者発生情報と病原体情報の両面から総合的解析を行った。本年度中に「病原微生物検出情報」特集記事として掲載されたテーマは、2009 年 4 月号：腸チフス・パラチフス、5 月号：腸管出血性大腸菌感染症、6 月号：日本脳炎、7 月号：ポリオ、8 月号：サルモネラ症、9 月号：HIV/AIDS、10 月号：新型インフルエンザ、11 月号：インフルエンザ、12

月号：細菌性赤痢、2009 年 1 月号：カンピロバクター腸炎、2 月号:麻疹､3 月号:病原体サーベイランスシステムである。

［山下和予、赤塚昌江、加藤信子、徳永真里子、野地元子、齊藤剛仁、多田有希、安井良則、谷口清州、多屋馨子、藤本嗣人、伊藤健一郎、木村博一、岡部信彦、井上栄（感染症情報センター）、渡邊治雄（副所長、細菌第一部）、寺嶋淳、池辺忠義、森田昌知、泉谷秀昌、三戸部治郎（細菌第一部）、倉根一郎、安藤秀二、高崎智彦（ウイルス第一部）、脇田隆字、清水博之（ウイルス第二部）、竹田誠、駒瀬勝啓（ウイルス第三部）、田代真人、小田切孝人（インフルエンザウイルス研究センター）、荒川宜親、加藤はる（細菌第二部）、野崎智義（寄生動物部）、小林睦生（昆虫医科学部）、今岡浩一（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）、中嶋建介、谷伸悦（国際協力室）、杉浦亙、山本直樹（エイズ研究センター）、山本茂貴（国立衛研）、藤井紀男（企画調整主幹）、宮村達男（所長）、吉倉廣（前所長）、江浪武志、小林一司、中嶋健介、難波吉雄、、南川一夫、熊谷優子、田中誠、堀内直哉、大竹輝臣、渡辺顕一郎（厚生労働省）］

13.　インフルエンザ脳症の発生報告について

2008/09 シーズンおよび新型インフルエンザの国内における流行とインフルエンザ脳症の発生動向について、感染症発生動向調査による全国のインフルエンザ定点医療機関からのインフルエンザ患者発生報告と、地方衛生研究所からのインフルエンザウイルス分離報告、及び 2004 年 3 月から新たに 5 類全数把握疾患として届出対象疾患となった急性脳炎の中でのインフルエンザ脳症の発生報告を集計・解析し、その関連性と現在のインフルエンザ脳症発生例の把握システムに関する課題について考察を行った。

［安井良則、多田有希、島田智恵、具芳明、岡部信彦］

Ⅳ．予防接種ならびに予防接種で予防可能疾患における今後の感染症対策に関する研究

1.　予防接種後副反応に関する研究

(1) 予防接種後健康被害報告の効果的な解析と、迅速な対策に繋げるための研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「予防接種後健康被害審査の効率化に関する研究（研究代表者　多屋馨子)」として、現在の予防接種後健康被害救済申請の内容と、予防接種後副反応報告書の内容を合体して検討するための管理システムの構築を行い、直近の予防接種後副反応報告書を紙媒体から電子化した。また、海外での情報収集を行った。

［多屋馨子、岡部信彦、砂川富正、安井良則、新井智、佐藤弘、山本久美、北本理恵、田中敏博（カナダトロント小児病院）、落合雅樹（検定検査品質保証室）］

(2) 新型インフルエンザワクチン接種後の副反応に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）「副反応モニタリング体制の検討に関する研究（研究代表者加藤達夫）」の分担研究として、国内外の既存の副反応報告と新型インフルエンザワクチン副反応報告のあり方に関する検討を行った。

［多屋馨子、岡部信彦］

2.　麻疹、風疹ワクチンに関する研究

(1) 麻疹排除に向けた対策の構築ならびに実施

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）「予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究（研究代表者　岡部信彦）」の研究の一貫として、平成 24（2012）年という WHO 西太平洋地域における麻疹排除目標の達成に向けて、国が定める「麻疹対策技術支援チーム」として、国内で必要と考えられる様々な麻疹排除に関連する計画案の策定、および実施に携わった。その代表的なものとして以下を挙げる。

〈予防接種の徹底と接種率向上に向けた取り組み〉

－自治体別の定期的な接種率の評価と還元

－教育啓発ツールの作成・提供

〈患者発生動向の評価〉

－全数把握制度における麻疹患者発生の評価、解析と定期的な還元

〈集団発生対応〉

－集団発生に対する技術的助言の実施

〈各種ガイドライン作成〉

－2012 年の麻疹排除に向けた活動の基盤として、中間年である 2010 年には排除計画の進捗状況等に関連した中間評価の実施を予定しており、これ以降も必要なガイドラインの整備、政策への提言、各種調査の実施などが、感染症情報センターとして成されていく予定である。

［岡部信彦、多屋馨子、山本久美、佐藤　弘、多田有希、山下和予、安井良則、島田智恵、谷口清州、大日康史、菅原民枝、砂川富正、松井珠乃、中島一敏、神谷元、八幡裕一郎、木村博一］

(2) 麻疹の効果的制御に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）ウイルス感染症の効果的制御のための病原体サーベイランスシステムの検討（研究代表者：清水博之）の分担研究として、麻疹の検査診断を啓発するためのリーフレットを作成し、全国の保健所に配布した。

［多屋馨子、山本久美、佐藤　弘、多田有希、山下和予、安井良則、島田智恵、谷口清州、大日康史、菅原民枝、砂川富正、松井珠乃、中島一敏、神谷元、八幡裕一郎、木村博一、岡部信彦、駒瀬勝啓（ウイルス３部）］

(3) 第３期・第４期麻疹風疹ワクチンにおける接種率向上に向けた自治体の取り組み

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究（研究代表者　岡部信彦)」の研究の一貫として、第３期、第４期の麻疹・風疹ワクチンの接種率が高い自治体と低い自治体に対して、高かった理由、困難であった理由を調査するとともに、第４期対象者の中で接種率が低迷している東京都の状況に関して、希望する高等学校と連携して意識調査を実施するとともに、接種を受けたものと受けていないものの違いに関して検討した。

「多屋馨子、山本久美、戸口翔平］

(4) 群馬県MRワクチン接種勧奨活動「前橋市の高校におけるMR ワクチン勧奨方法の評価と勧奨方法の特定」

群馬県衛生環境研究所感染制御センターとともに、MRワクチン勧奨についてのKAP研究を計画・実施した。(「群馬県MRワクチン接種勧奨資料集」)

［大山卓昭］

(5) ラオスにおける麻疹・風疹と CRS の疫学

WPRO における 2012 年の麻疹排除、および今後の EPI 戦略にかかわる風疹の血清抗体保有状況に関して、ラオスの首都ビエンチャンに居住する妊婦を対象に血清疫学調査を計画した。麻疹は、予防接種キャンペーンが実施されたため、ワクチンによる免疫の獲得が考えられるが、風疹はラオス国内において、ワクチンは導入されていない。今後、調査の実施を行う予定である。

[山本久美､牛島廣治(藍野大学)､駒瀬勝啓(ウイルス第３部)、渡邉治雄]

(6) 風疹に関する予防対策，今後の風疹ワクチンのあり方に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究（研究代表者　岡部信彦、研究分担者　平原史樹)」の一貫として、先天性風疹症候群ならびに風疹対策として､国内の風疹患者､抗体保有状況、予防接種状況を検証し風疹罹患妊娠女性に関する二次相談窓口が設置ならびに産科領域における麻疹、水痘、ムンプスなどの院内感染問題についても検討した。

［平原史樹（横浜市立大学)、奥田実加（横浜市立大学)、駒瀬勝啓（ウイルス第３部)、寺田喜平（川崎医科大学)、種村光代（種村ウィメンズスクリニック)、川名尚（帝京平成看護短期大学)、多屋馨子、岡部信彦］

(7) 麻疹排除に対する効果的な社会動員に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究（主任研究者　岡部信彦)」の 2008 年度の委託研究として、麻疹排除を効果的に進めるためのテレビ・ラジオ用 CM を作成し、ポスターを作製した。これらの媒体を 2009 年度も引き続き使用し、実際の啓発効果および引き続く有効な社会動員策について検討した。

［砂川富正、山本久美、多屋馨子、安井良則、島田智恵、多田有希、知念正雄（沖縄県はしか“０”プロジェクト）、岡部信彦］

3.　疾病の流行状況とワクチンの意義に関する研究

厚生労働科学研究医薬品・医用機器等レギュレトリーサイエンス総合研究事業ワクチンの有用性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究（主任研究者　神谷　齊）の協力研究者として、三重県下３市における、ロタウイルス感染性胃腸炎の入院例の調査を行った。また、この地域でのロタウイルスの流行株の特定、さらにはこれらの結果に基づいて、ロタウイルスワクチンの我が国への導入の検討を行った。

［中野貴司（国立病院機構三重病院)、井上和正（山田日赤病院小児科)、神谷敏也（松阪中央総合病院小児科)、井戸正流（三重中央医療センター小児科)、谷口孝喜（藤田保健衛生大学ウイルス、寄生虫学講座教授)、神谷元］

4.　海外における予防接種政策のシステムに関する研究

米国 ACIP、WHO SAGE など、外国の予防接種専門家会議に出席し、予防接種の最新情報を収集するとともに、諸外国における予防接種政策のシステムについて調査した。

［神谷元］

5.　ワクチンの需要予測

ワクチンの安定供給を目的として、季節性インフルエンザワクチンの需要予測を行った。また、ワクチン需給予測プログラム開発事業において、及び新型インフルエンザワクチンの需要分析を行った。

［大日康史、菅原民枝、岡部信彦］

6. ワクチン予防可能疾患における予防接種の費用対効果分析

ワクチン予防可能疾患における予防接種の費用対効果分析をインフルエンザ、水痘、Hib ワクチンなどを対象に実施している。インフルエンザに関しては、高齢者における予防接種公費補助の効果および抗ウイルス剤の費用対効果について検討した。水痘ワクチンの公費補助を実施している自治体においては、ワクチンの有効性、ワクチン不全、軽症化も含めて検討した。

［大日康史、菅原民枝、岡部信彦］

7. 自治体における予防接種管理ソフトの改良と普及に関する研究

各自治体において、定期予防接種あるいは自治体独自の任意接種に対する公費補助を一元的に管理する予防接種管理ソフトを改良し、普及に努めた。本年度は予防接種台帳出力機能を備えた。

［大日康史、菅原民枝、岡部信彦］

8. Hib ワクチンに関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)「予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究（研究代表者　岡部信彦)」の研究の一貫として、Hib ワクチン接種後の健康状況調査ならびに副反応報告を迅速に収集するサーベイランス機能を構築し、無作為抽出した医療機関に調査依頼を行い、接種後の健康状況調査を実施した。

［富樫武弘（札幌市立大学）、多屋馨子、岡部信彦］

9. 百日咳集団発生の調査に関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）「インフルエンザ及び近年流行が問題になっている呼吸器感染症の分析疫学研究（主任研究者　廣田良夫)」の分担研究として、秋田県、北海道における百日咳の集団発生における過去のワクチン接種の効果に関する研究を行った。百日咳は、年長者あるいは若年成人の間で流行が懸念されており、わが国においても Tdap などの年長者向けワクチンの導入が今後要検討である。その基礎データを蓄積することを目的としている。

［砂川富正、島田智恵、神谷元、田中好太郎、土橋酉紀］

10. B 型ウイルス性肝炎の発生動向に関する研究

厚生労働科学研究費補助金　肝炎等克服緊急対策研究事業「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」（研究代表者　水落利明）の一環として、
感染症法のもとで行われている感染症発生動向調査において報告された B 型肝炎の発生状況をまとめた。血液由来感染として重要である本疾患は、従来の母子感染対策、医療行為による感染対策に加えて、性感染症としての対策が必要と考えられた。

［岡部信彦、多田有希］

11. B 型ウイルス性肝炎の届出状況に関する研究

厚生労働科学研究費補助金　肝炎等克服緊急対策研究事業「B 型肝炎ジェノタイプ A 型感染の慢性化など本邦における実態とその予防に関する研究」(研究代表者　溝上雅史）の一環として、感染症法にもとづく B 型肝炎の届出状況を検討した。2003～2006 年に 200～250 例で推移していた報告数は、2007 年以降 200 例を下回っている。しかし、これが真の報告数とは考えにくいことが専門家からも指摘されており、研究分担者・研究協力者の所属する多施設との共同により B 型肝炎の実態把握を試みている。

［多田有希、伊藤清顕（国立国際医療センター国府台病院)、溝上雅史（国立国際医療センター国府台病院）他］

12. 国内感染者集団の大規模塩基排列データに見出される HIV 集団の遺伝的変異に関する研究

日本国内の HIV 感染者集団の塩基配列データを大量に集め、HIV-1 集団の国内感染動向を推測した。解析には、東京都の確認検査検体（2004－2007 年 372 検体）および、名古屋医療センターで診察された新規患者の検体（2003－2007 年 390 検体）から得られた POL 領域の塩基配列を用いた。これらの配列を、サブタイプごとに新井案としたものを用い、最適塩基置換モデルの推定を行ったのち、Bayesian Markov c|hain Monte Carlo 法による時間的系統樹の推定と、Skyline plot 解析を行った。わが国の HIV-1 感染は、孤発例が半数以上を占めた。Subtype B においては、過去 10 年以内に起源を持つ少なくとも 33 種類の国内感染クラスターが見出された。これらの感染クラスターは、地域を越えての広がりは少なかった。一方、CRF01_AE については、感染クラスターは数種類が検出されるに止まった。わが国の HIV-1 感染は 80 年代後半に CRF01_AE の流行によって始まったが（血友病患者は除く)、

90年代に入ってからSubtypeBの感染が拡大し、今世紀に入るころにはこれが新規感染の主役になったことがわかった。
［椎野禎一郎、貞升健志、長島真美（東京都健康安全研究センター)、服部順子、杉浦亙（名古屋医療センター)］

13. B型肝炎ウイルスの水平感染に関する研究

厚生労働科学研究費補助金　肝炎等克服緊急対策研究事業「肝炎ウイルス感染防御を目指したワクチン接種の基盤構築」(研究代表者　水落利明）の分担研究として、B型肝炎ワクチンのuniversal vaccinationに向けた研究を行い、保育関係者に血液媒介感染症の啓発を目的として「保育所で気をつける血液のお話～血液媒介感染症のことをご存じですか?」を作成し保育関連の施設に送付した。
［多屋馨子、越田理恵（金沢市福祉保健局)、岡部信彦］

14. 日本脳炎に関する研究

(1) わが国における日本脳炎の疫学に関する検討

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業　「我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究　研究代表者　高崎智彦）の分担研究として、わが国における日本脳炎の現状と、日本脳炎ウイルスに関する検討を行った。近年の日本脳炎ウイルス活動状況を感染症流行予測調査事業、調査結果から解析し、予防接種状況と合わせて検討した。
［多屋馨子、佐藤弘、新井 智、岡部信彦］

(2) 日本脳炎ウイルスに関する研究

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（我が国における日本脳炎の現状と今後の予防戦略に関する研究　研究代表者　高崎智彦）の分担研究として、1980年代に北海道で分離された日本脳炎ウイルス3株の性状解析を行った。その結果、3株は極めて近似していることが明らかになった。［新井智、多屋馨子、岡部信彦、高島郁夫(北海道大学)］

Ⅴ．病原体等の研究

1. パンデミックインフルエンザに対する抗体保有率の研究

パンデミックインフルエンザウイルスに対する抗体保有状況を明らかにする目的で、国内血清銀行に保管されている血清を用いてパンデミックインフルエンザウイルスに対する抗体保有率を調査した。
［多屋馨子、荒木和子、新井 智、佐藤弘、山本久美］

2. インフルエンザウイルスの検出法ならびに検出部位に関する臨床的検討

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「ウイルス検出を目的とした体外診断薬の再評価技術基盤に関する研究」（研究代表者小林和夫、研究分担者　多屋馨子)の分担研究として、国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットの検出感度をA/California/2009 pdm株を用いて比較検討した。入手可能であった9キットについてその最小検出感度を比較した結果、最大10^3copies/testの差がみられた。
［多屋馨子、荒木和子、佐藤弘、新井智、岡部信彦］

3. OPV投与後のポリオウイルスの排出

OPV接種した乳幼児(計(4名6回)の糞便を25日間以上採取し、糞便中に排出されたポリオウイルスのウイルス量を血清型別にReal-time PCTで検出した。1回め接種の4例中長期排出が見られたのは、1型3例、2型は4例、3型は0例であった。2回め接種の2例において3型の長期排出があった。
［荒木和子、佐藤　弘、多屋馨子、岡部信彦］

4. トガリネズミ目の新しいハンタウイルスの検索

動物由来感染症対策の一環として新しいハンタウイルスの検索を行った。その結果、韓国済州島のトガリネズミ目動物の一つであるコジネズミにJeju virusの感染を確認した。本ウイルスは、典型的な食虫目由来ハンタウイルスであった。
［新井 智、浜田雅史、多屋馨子、岡部信彦、Hong-Shik Oh（韓国、済州島国際大学)、田原研司(島根県保環研)、高田伸弘(福井大学)、近真理奈(埼玉衛研)、Jin-Won Song(韓国、コリア大学)，Richard Yanagihara(米国、ハワイ大学医学部)］

5. ダニ媒介性疾患発生地域における不明熱疾患の検索

ダニ媒介性疾患発生地域には、ダニ媒介性疾患が疑われるものの、感染源の明らかにならない熱性疾患の発生が認められている。その原因を検索する一環として島根県および埼玉県のダニ媒介性疾患発生地域における野生動物の病原体保有調査を行った。［新井 智、浜田雅史、多屋馨子、岡部信彦、田原研司（島根県環境衛生研究所)、近真理奈(埼玉衛研)、石原智明(酪農大獣医)］

6. フロックドスワブのウイルス検査における有用性に関する研究

臨床検体中のウイルス採取効率の最適化をする目的で、これまで使用してきたポリエステル製スワブとフロックドスワブ(microRheologicsS.r.l)を比較した。プレートに培養した細胞

に感染させたアデノウイルスをぬぐって回収されたウイルスゲノム量を比べた。その結果、フロックドスワブが平均 9.46 倍（3.59～23.4 倍）アデノウイルス DNA の回収量が高く、アデノウイルス遺伝子検査の偽陰性を防ぐ一助になることが示唆され、その結果を論文発表した。

[藤本嗣人、榎本美貴(兵庫県立健康環境科学研究センター)、小長谷昌未、谷口清州]

7. 高速 PCR 法によるウイルス検査システムの開発

超高速 PCR システム(HyperPCR)をアデノウイルス診断へ適用した。その結果、17 分程度でこれまでの通常のリアルタイム PCR と感度および精度でアデノウイルスを定量的に検出できることがあきらかになった。この内容を Japanese Jounal of infectious Diseases で論文発表した。

[藤本嗣人、小長谷昌未、榎本美貴、谷口清州、岡部信彦、]

8. 新型インフルエンザウイルス AH1N1pdm の Hyper-PCR による迅速検出・同定

「重要政策課題への機動的対応の推進」プログラム「臨床現場でのインフルエンザ A/H1N1swl (H1N１pdm)の診断等の体制の構築に関する緊急研究」(研究代表者：渡邉治雄) の分担研究者としてインフルエンザ AH1N1pdm の高速検出･同定に取り組んだ。

(目的と方法)：トラストメディカル株式会社と共同開発した超高速 PCR(Hyper-PCR)を新型インフルエンザ(A H1pdm)の迅速検出および季節性インフルエンザ等との迅速鑑別に活用して、従来 1～３時間以上要していた real-time RT-PCR の所要時間を 20 分程度に短縮する。(結果と考察) Hyper-PCR を用いて感染研(公定法)と同等の検出感度で Influenza H1 pdm を検出可能であり、感染研の公定リアルタイム PCR で 3 時間程度かかっていた反応時間を 20 分程度に短縮可能であった。検出感度は 10copy 程度と高感度であった。この手法を導入すれば、現在のリアルタイム PCR の所要時間を大幅に短縮できると思われた。

[藤本嗣人、小長谷昌未、古宮伸洋、谷口清州 (国立感染研・感染症情報センター)、清水英明、石丸陽子 (川崎市衛生研究所)、三舛信一郎、田中景子、佐々木香織、谷中好子、井上真太郎 (神鋼加古川病院)、大西健児、中村ふくみ (都立墨東病院)]

9. インフルエンザ AH1N1 パンデミック時の多項目ウイルス検索

インフルエンザ感染が疑われ同意が得られた小児129名から採取した鼻咽腔拭い液129検体について、多種類のPCR法により呼吸器系ウイルスを検索した。新型インフルエンザパンデミック時に臨床的および疫学的にILIと診断された患者129名のうち、38名 (31%) はインフルエンザ陰性であった。 インフルエンザウイルス陰性の38名から28件の呼吸器系ウイルスが検出された。また、28件のうち、3名は重複感染を起こしていたので、25/38名 (66%) がインフルエンザ以外の呼吸器ウイルス陽性であった。

[藤本嗣人、谷口清州、小長谷昌未、岡部信彦 (感染症情報センター)、三舛信一郎、佐々木香織 (神鋼加古川病院)]

10. リアルタイム PCR による髄膜炎患者髄液からのエンテロウイルス遺伝子の検出および定量

生後 20 ヶ月の脳炎患者髄液からエンテロウイルス 71 遺伝子を検出した。患者の髄液、咽頭ぬぐい液、直腸ぬぐい液からエンテロウイルス 71 が RT-nesuted PCR により検出され、髄液からは pan-enterovirus RT-nested PCR を使用してエンテロウイルス 71 が検出されたシークエンシングにより同定された。リアルタイム PCR による定量で咽頭ぬぐい液、直腸ぬぐい液、および髄液はそれぞれ 1.8×10^4 , 9.8×10^4 および 1.8×10 コピーのエンテロウイルスゲノムを含んでいた。培養によって直腸ぬぐい液からのみエンテロウイルス 71 が分離された。

11. エンテロウイルス 71 の塩基配列に関する研究

重症事例から採集したエンテロウイルス７１株の塩基配列を調べた。全ゲノム配列を解析中である。

(宗村　徹也、藤本 嗣人)

12. 腸管凝集性付着性大腸菌（ＥAggＥＣ）の研究

EAggEC の調節因子 *aggR* を保持している大腸菌について、既知の 4 種類の線毛遺伝子に加え変異線毛遺伝子の分布を調べた。９０％の株でいずれかの線毛遺伝子が検出された。線毛の種類によって毒素遺伝子の分布や Clump 形成能・細胞付着性に違いが見られた。

[伊藤健一郎、松下秀 (東京都)、山﨑貢 (愛知県)、森屋一雄(佐賀県)、倉園貴至(埼玉県)、成松浩志(大分県)、上野伸広(鹿児島県)、熊谷則道 (名古屋検疫所)、橋本迪子 (名古屋検疫所)、蛭田徳昭(横須賀市)、磯部順子(富山県)、八柳潤(秋田県)、Orn-Anong Ratchtrachenchai (タイ国保健衛生研究所)]

13. 急性呼吸器感染症患者から検出されたライノウイルスの分子疫学に関する研究

ライノウイルス(HRV)は、小児や成人の呼吸器ウイルス感染症の主たる病原ウイルスとしてよく知られている。しかし、本ウイルスの分子疫学には不明な点が多い。そこで、山形県で分離されたHRV species A(HRV-A)の詳細な分子疫学に関する研究を行った。

その結果、分離株は、多数（11クラスター）に明瞭に分類され、遺伝学的に多様なウイルスが流行していたことが示唆された。

［水田克巳（山形県衛生研究所)、塚越博之（群馬県衛生環境研究所)、平田明日美（栃木県保健環境センター)、木村博一、秋山美穂、岡部信彦、野田雅博(ウイルス3部)、田代眞人(同)］

14. ヒトボカウイルス（HBoV）の分子疫学に関する研究

HBoVは最近新たに発見されたパルボウイルス科に属するウイルスであり、ヒトに呼吸器感染症を引き起こす。しかし、このウイルスの分子疫学はよくわかっていない。そこで、山形県、滋賀県及び東京都などで検出されたHBoVに関する全ゲノム解析による分子疫学解析を行った。その結果、検出された7株のHBoVはgroup1と2に分類され、株間の相同性は99.5～99.96%と非常に高いことがわかった。［五十嵐郁美（福島県衛生研究所)、水田克巳（山形県衛生研究所)、塚越博之（群馬県衛生環境研究所)、平田明日美(栃木県保健環境センター)、木村博一、秋山美穂、岡部信彦、野田雅博(ウイルス3部)、田代眞人(同)］

VI. 学会の中での研究、貢献

1. 日本ワクチン学会

理事として、ワクチン関連トピックスの原稿作成、学会運営に関与した。

［岡部信彦、谷口清州、多屋馨子］

2. 日本感染症学会

日本感染症学雑誌編集委員として、雑誌の編集作業に関与した。

［谷口清州］

同理事として活動した。

［岡部信彦］

3. 日本小児科学会

予防接種・感染対策委員会の委員として活動した。

［岡部信彦（委員長）、多屋馨子（委員）］

4. 日本環境感染学会

ワクチン接種プログラム作成委員会の委員として活動した。

［岡部信彦（委員長）、多屋馨子（委員）］

理事として活動した。

［岡部信彦］

5. 日本小児保健学会

予防接種感染症委員会の委員として活動した。

［多屋馨子］

6. 日本小児感染症学会

感染症情報委員会委員として活動した。

［岡部信彦(委員長)・山下和予］

研究教育委員会の委員として活動した。

［多屋馨子］

7. 日本公衆衛生学会

査読委員会委員として活動した

［岡部信彦］

感染症専門委員として活動した。

［砂川富正］

8. 日本性感染症学会

常任幹事として活動した。

［岡部信彦］

9. 日本ウイルス学会

理事として活動した。

［岡部信彦］

10. 日本感染症学会学会東日本地方会

理事として活動した。

［岡部信彦］

11. 日本渡航医学会

理事として活動した。

［岡部信彦］

12. 日本臨床微生物学会

理事として活動した。

［岡部信彦］

サーベイランス業務

Ⅰ．感染症発生動向調査事業の実施および情報の還元

1.　感染症発生動向調査（患者情報）全国データの集計・解析・還元

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」（平成 15 年 11 月改正法施行、平成 17 年 4 月改正法施行、平成 19 年 4 月・6 月改正法施行）に基づき、対象疾患を診断した医師、保健所、地方感染症情報センター（都道府県、政令市に設置）と連携し、感染症発生動向調査を実施している。

感染症情報センターは中央感染症情報センターとして、全数把握疾患及び週単位定点把握疾患については毎週 1 回、月単位定点把握疾患については毎月 1 回､全国データを集計し、各自治体に還元している。また、データの内容の確認及び解析を行い、感染症週報（IDWR）や病原微生物検出情報（IASR）として情報を公開するとともに、得られた情報を地方自治体と連携して必要な感染症対策へつなげている。

［多田有希、安井良則、島田智恵、齊藤剛仁、佐藤 弘、富澤伸五、加藤信子、大竹由里子、前田明日香、FETP 研修生 10・11 期生、神谷 元、八幡裕一郎、松井一乃、砂川富正、中島一敏、大山卓昭、岡部信彦］

2.　感染症週報の作成・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」（平成 15 年 11 月改正法施行、平成 17 年 4 月改正法施行、平成 19 年 4 月・6 月改正法施行）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イクに関する最新の記事、個々の疾患の発生動向のまとめなどを掲載し、「海外感染症情報」として WHO の感染症アウトブレイクニュースを中心に最新の海外感染症に関する記事を紹介している。その他、本年度は不十分ではあったが、「感染症の話」として感染症法に規定された疾患など感染症の解説を行い、「読者のコーナー」として外部からの問い合わせのあった質問や投稿などを多くの読者に公開している。

［岡部信彦、多田有希、安井良則、島田智恵、齊藤剛仁、、森兼啓太、佐藤弘、神谷 元、谷口清州、多屋馨子、山下和予、赤塚昌江、徳永真里子、加藤信子、富澤伸五、大竹由里子、前田明日香、FETP 研修生 10&11 期生、八幡裕一郎、松井珠乃、砂川富正、中島一敏、大山卓昭、山本久美］

3.　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確認、問い合わせ、データベースの管理、集計解析、月報および年報の作成、配布に関する一連の作業を継続的に実施した。

(1) 情報処理：NESID の病原体検出情報システムに登録された新しいデータの確認と公開処理を毎日行なった。2009 年 1 月－2009 年 12 月の病原体検出報告数は、病原菌検出報告（3A：地研・保健所）は 6,130 件、病原体個票は病原菌（原虫・寄生虫を含む）が地研・保健所 3,547、検疫所 1 件、ウイルス（リケッチア，クラミジアを含む）が地研 43,937 件（うち AH1pdm が 28,294）、検疫所 35 件（うち AH1pdm が 32）、集団発生病原体票は病原菌等が地研 158 件、ウイルス等が地研 649 件、ヒト以外からの病原体検出票は病原菌等が地研 296 件、ウイルス等が地研 1 件であった。

(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 30 巻）および第 30 巻索引が編集・印刷発行された。特集記事については英訳を行い同時に掲載した。

(3) 年報の編集：病原体情報に関する年報は、欧文による 2004 年年報を、Japan J. Infect. Dis., 2005 Vol.58 Supplement として発行した。

(4) 感染性腸炎研究会に参加する都市立感染症指定医療機関が入力した感染性腸炎患者調査票 751 件についてデータの確認と集計を行ない、年度末の総会資料および感染症学会発表資料として提供した。

［山下和予、赤塚昌江、加藤信子、野地元子、徳永真里子、齊藤剛仁、岡部信彦］

4.　感染症発生動向調査　週報・月報　速報データの作成・公開

感染症発生動向調査により集計された報告数を、感染症週報での公開（通常金曜日）より早く公開するため、2008 年第 47 週から、速報データとしての公開を（通常火曜日）実施している。また、インフルエンザについては、新型インフルエンザ発生を受け、2009 年第 42 週からはより早い公開（週報の一週間前の金曜日）を実施している。

［島田智恵、前田明日香、富澤伸五、加藤信子、安井良則、多田有希］

5. インフルエンザ流行レベルマップの作成

感染症発生動向調査により得られた全国のインフルエンザ患者発生動向を、過去の患者発生状況をもとに設けられた基準値に基づいて解析し、保健所ごとに警報レベル、注意報レベルを超えたことを情報還元するための「インフルエンザ流行レベルマップ」を作成し、毎週火曜日に感染症情報センターのホームページ上に公開した。コメント欄には、最新の患者発生状況と病原体情報から得られたインフルエンザウイルス分離結果を合わせて掲載している。2009 年度は新型インフルエンザの発生と流行があり、例年のように報告数の少ない時期に休止することはなく、1 年間ホームページへの掲載を続けた。インフルエンザ流行レベルマップは、全国のインフルエンザの最新の発生動向を掲載するものであり、特に新型インフルエンザの流行期間中は、ホームページ上に掲載されるとすぐにメディアに取り上げられ、全国に情報還元されていた。

［安井良則、富澤伸五、加藤信子、柴田博子、多田有希、谷口清州］

6. 麻しん速報グラフの作成

感染症発生動向調査により得られた麻しんの報告をもとにグラフ及び日本地図を作成し、毎週火曜日に感染症情報センターのホームページ上に公開した。この公開は 2008 年第 3 週から新たに開始したものであり、週別報告数（第 1 週～当該週の棒グラフ)、都道府県別報告数(当該週分の棒グラフ)、都道府県別病型別報告数（第 1～当該週累積分の棒グラフ)、都道府県ワクチン接種歴別報告数（第 1～当該週累積分の棒グラフ)、年齢群別ワクチン接種歴別報告数（第 1～当該週累積分の棒グラフ)、都道府県別累積報告数（第 1～当該週累積分の日本地図)、都道府県別報告状況（第 1～当該週の週毎の日本地図）の 7 種類の作成を行った。

［島田智恵、前田明日香、徳永真里子、加藤信子、山下和予、安井良則、多田有希、阿保　満（東京都健康安全研究センター)］

7. 腸管出血性大腸菌感染症速報（表・グラフ・マップ）の作成

感染症発生動向調査により得られた腸管出血性大腸菌感染症報告をもとに、週別報告数グラフ、都道府県別血清型別集計表、及び日本地図を作成し、毎週火曜日に感染症情報センターのホームページ上に公開した。この公開は 2009 年第 19 週から新たに開始し、週別報告数（第 1 週～当該週の棒グラフ)、都道府県別・血清型別報告数（当該週の集計表)、累積都道府県別・血清型別報告数（第 1～当該週累積分の集計表)、都道府県別累積報告数（第 1～当該週累積分の日本地図)、週別・都道府県別報告状況（第 1～当該週の週毎の日本地図）の 5 種類の作成を行った。

［齊藤剛仁、加藤信子、多田有希］

8. 麻しん報告数のWHO西太平洋事務局への報告

感染症発生動向調査により得られた麻しんの報告数をもとに、WHO の報告形式に適合した集計表を月毎に作成し、WHO 西太平洋事務局に報告した。

［島田智恵、山下和予、安井良則、多田有希、岡部信彦］

Ⅱ．感染症発生動向調査のシステムに関する業務

「感染症の患者の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」に基づく、感染症発生動向調査は、1999 年 4 月の法制定以降、厚生労働行政総合情報システム（WISH）上に構築され運用されていたが、システム稼動後の法改正に未対応の部分がある等の課題があったことから、再構築することとなり、2006 年 4 月に新たなシステム（NESID）が稼動開始された。NESID システムでは、中央データサーバーに、感染症発生動向調査(患者情報及び病原体検出情報)にとどまらず、疑い症例調査支援、症候群サーベイランス、感染症流行予測調査、インフルエンザ関連死亡、インフルエンザ施設別発生状況、さらに結核登録者情報に関する複数のシステムが統合され、一元的に管理されている。

1. 感染症発生動向調査（患者情報）システム

2006 年 4 月から運用開始した感染症発生動向調査システムのうち、感染症発生動向調査（患者情報）では、厚生労働省、システム開発会社とともに、法改正等による対象疾患の追加・変更や保健所の統廃合など関連した改修事項について、適宜対応している。また、システム稼動開始後に発生した問題点や改善すべき点について検討し、可能な限り順次改修を行ってきた。今後も改良すべき点、その解決方法を検討・実行していく。

［多田有希、安井良則、島田智恵、加藤信子、富澤伸五、大竹由里子、前田明日香、山下和予、谷口清州］

2. 病原体検出情報システム

2006 年 5 月 6 日に運用開始した病原体検出情報サブシステムは、引き続きまだ不具合が発生しているため、逐次プログラム修正の検証を行なっている。また、新型インフルエンザウイルス AH1pdm 発生に対し、2009 年 5 月にコードの追加・変更を行って、迅速な情報の収集・還元・公開を可能にした。さらに定型帳票作成プログラムを改修して、AH1pdm および B

型インフルエンザウイルスのビクトリア系統と山型系統の系統別のグラフを追加し、2009/10 シーズンより毎日更新可能となった。

［山下和予、赤塚昌江、徳永真里子、野地元子］

3. 感染症流行予測調査システム

2006年4月から運用開始した感染症流行予測調査システムでは、2009年度のデータ登録、集計、検索など一連の作業が滞りなく行われた。しかし、以前から各自治体より要望されている担当者の作業時間の負担を軽減するための改善はまだ実現されていない。データ登録の効率化と確実性を図る改善を今後も引き続きの課題としてシステム改善を検討していく。

［北本理恵、佐藤　弘、多屋馨子］

Ⅲ. 感染症に関する情報収集・発信業務

1. 各種疾患別情報および新着情報などのインターネットホームページへの掲載、更新、維持

感染症発生動向調査の各種集計および解析結果、時系列グラフ、地図グラフをホームページ上に掲載し、定期的に更新、維持管理を行った。また、各種疾患別情報および新着情報についても内容を検討し、維持管理を行った。

［前田明日香、大竹由里子、島田智恵、齊藤剛仁、安井良則、多田有希、加藤信子、山下和予］

2. 海外感染症情報の収集と評価

WER (WHO)、MMWR (米国 CDC)、Eurosurveillance Weekly (EU)、Health Protection Report （英国）、Health Protection Scotland Weekly Report （スコットランド）、Communicable Disease Intelligence(豪州)、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･評価した。

［岡部信彦、多田有希、島田智恵、齊藤剛仁、神谷元、FETP 研修生 10 期&11 期生、菅原民枝、森兼啓太、大山卓昭、砂川富正、中島一敏、松井一乃、安井良則、谷口清州］

3. 感染症流行時の情報発信

感染症情報センターのホームページ上にはフォーカスのコーナーがあり、話題となる感染症や大きく流行して国民に大きな影響を及ぼす可能性のある感染症についての情報提供を行っている。特に 2009 年度は新型インフルエンザのコーナーを新たに立ち上げ、最新の情報を掲載した。インフルエンザのコーナーにおいて流行状況やインフルエンザに関する Q&A を掲載し、またインフルエンザ流行レベルマップの更新情報を掲載した。麻疹のコーナーでは、流行状況の推移やワクチン接種率の集計結果等を中心に情報を更新した。百日咳のコーナーでは、百日咳の流行状況や 2008 年から開始した百日咳 DB（データベース）を掲載し、情報の提供を行った。

［安井良則、多田有希、島田智恵、山下和予、大竹由里子、前田明日香、加藤信子、森兼啓太、新井智、佐藤弘、山本久美、多屋馨子、菅原民枝、大日康史、岡部信彦］

Ⅳ. 感染症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

厚生労働省健康局結核感染症課及び感染研関係各部と共同で、平成 19 年度（2007 年度）報告書を作成した。

［多屋馨子、佐藤　弘、山本久美、北本理恵、戸口翔平、荒木和子、新井　智、岡部信彦］

2. 感染症流行予測調査結果速報の発信

平成 21 年度感染症流行予測調査のうち、インフルエンザ HI 抗体保有状況を 2009 年 11 月 30 日から 2010 年 2 月 5 日まで計 4 回、ブタの日本脳炎 HI 抗体保有状況を 2009 年 7 月 8 日から 11 月 13 日まで計 17 回、ならびにポリオ、日本脳炎、風疹、麻疹、百日咳、ジフテリア、破傷風の抗体保有状況、予防接種状況を速報としてホームページ上に公開した。

［佐藤　弘、多屋馨子、北本理恵、山本久美、荒木和子、新井　智、岡部信彦］

3. 感染症流行予測調査実施要領の作成

厚生労働省健康局結核感染症課と共同で、平成 21 年度版を作成した。

［多屋馨子、佐藤　弘、戸口翔平、山本久美、北本理恵、荒木和子、新井　智、岡部信彦］

4. 感染症流行予測調査システムの運用

平成18年4月に稼働した感染症流行予測調査システムの各自治体におけるデータ入力のサポート、およびトラブルに対する調査、対応をおこなった。

また、集計を迅速におこない、一部をホームページに公開した。

［北本理恵、佐藤　弘、多屋馨子、岡部信彦］

5. 事務局業務

厚生労働省健康局結核感染症課、都道府県、都道府県衛生研究所、感染研関係各部との密接かつ円滑な連携を保つための業務を行った。衛生微生物技術協議会の関連会議として感染症流行予測調査事業担当者会議を開催し、当該年度の調査に対する注意点や変更点などの説明や検査現場の声を関係者が共有化する場を設け事務局として業務の円滑な運営を進め

ている。

［多屋馨子、佐藤　弘、山本久美、北本理恵、荒木和子、新井　智、岡部信彦］

Ⅴ．感染症情報の収集、評価及び予防対策の策定

1.　国際的な感染症対策の枠組みに係わる技術支援

世界保健機関により行われている国際保健規則（IHR）の改正に関連して、その条文を技術的に検討し、また作業部会においてIHR2005におけるcore capacity requirementについての議論を行った。またバイオテロ対策やパンデミック対策において、G7+メキシコのGHSAGの会議に参加し、技術的な支援を行った。また政府間調整会議で議論を行った。ASEAN+3における新興感染症プロジェクト、あるいはGHSAGのリスクコミュニケーション会議に参加し、国際的な対応計画の策定に協力した。

［砂川富正、重松美加、森兼啓太、松井珠乃、山本久美、大日康史、夛田有希、安井良則、谷口清州、岡部信彦］

2.　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し運用した。昨年度までに収集した評価済み情報データベースの維持を行い、2009年度の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、感染症研究所として科学的見知からコメントし、関係諸機関へ報告した。既存の情報検索および蓄積・検索データベースのシステムの改良と、よりよい検出アルゴリズム開発、言語学的処理技術を駆使した情報選別の技術導入等に関しての検討を進めた。

［谷口清州、重松美加、多屋馨子、柴田博子、岡部信彦、渡邉治雄（副所長）］

3.　鳥インフルエンザの世界的流行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年末からアジアで発生している鳥インフルエンザ（H5N1）に関して、WHOやOIE（国際獣疫事務局）より発信された情報を整理し、随時日本語に翻訳し情報センターのホームページに掲出し、国民の情報ニーズに対応した。並行して、日本で鳥インフルエンザからのヒトでのパンデミック発生に備えた対応計画のための情報収集と指針作成を行った。

［森兼啓太、砂川富正、大山卓昭、FETP９期&10期、大竹由里子、前田明日香、谷口清州、岡部信彦］

4.　パンデミック（H1N1）2009への公衆衛生上の対応

(1) 総括

パンデミック対応は、国立感染症研究所のみならず、厚生労働省、あるいはその他の省庁を含む国家機関、各地方自治体の保健衛生部局、消防、学校、そして地域住民、ほぼ日本全体で行ったものであるが、特に疫学的な対応について、国立感染症研究所感染症情報センターにおいて、国立感染症研究所の本来の機能として、あるいは厚生労働省、あるいは地方自治体や種々の機関から依頼を受けて、パンデミック時のインフルエンザサーベイランス、ウイルスサーベイランス、実地疫学調査、血清疫学調査、「国内医療機関における新型インフルエンザ（A/H1N1）抗ウイルス薬による治療・予防投薬の流れ」や「新型インフルエンザ(swine-origin influenza A/H1N1)ヒト感染例に対する検査診断」を始めとするガイドラインの策定、疫学的・臨床的なデータ解析とそれらの情報提供・広報、感染症情報センターホームページ内の「パンデミック（H1N1）2009」のページ更新作業、WHOや米国CDC等からの海外情報の収集と翻訳、を行った。

［情報センター全員］

(2) パンデミックインフルエンザへの調査と対応

2009年４月にパンデミック（＝新型）インフルエンザの発生が明らかとなったが、感染症情報センターからは同年５月～6月の間に、成田空港、神戸市、大阪府、福岡市、船橋市、沖縄県等の日本国内での初期の新型インフルエンザの発生地域に疫学調査員が派遣され、積極的疫学調査が実施された。得られた結果は厚生労働省に速やかに報告され、厚生労働省、感染症情報センターやあるいは患者発生地域の自治体を通じて速やかに情報発信された。2009年８月以降の本格的な新型インフルエンザの流行時期には、感染症発生動向調査結果に基づいた流行情報をホームページやメディアを通じて発信し続けた。

［情報センター全員］

(3) 積極的疫学調査の一環としての新型インフルエンザに関する血清疫学調査の実施

兵庫県神戸市の医療機関に従事する者を対象とした抗体価測定を行った。

［佐藤弘、新井智、荒木和子、多屋馨子］

5. インフルエンザパンデミック対策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）

インフルエンザのQ＆Aを提供した。医療従事者およびそれ以外からの要望がある情報も掲載した。インフルエンザホットライン業務を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、松岡静香、夛田有希、安井良則、大山卓昭、砂川富正、佐藤 弘、山本久美、新井 智、FETP 研修生 10 期&11 期］

国際協力関係業務

Ⅰ．国際的調査協力及び支援

1. GHSAG に対する技術支援

G7 加盟国とメキシコ、WHO、EU による、Global Health Security Initiative の技術的な WG である GHSAG に対して、リスク管理ワーキンググループ、リスクコミュニケーションネットワーク、および CBRN 早期検知と早期対応のプロジェクト（EAR Project）について、アジアの中の日本の立場から議論に参加し、技術的な立場から国際的な健康危機事例に対する国際的な協力・協同業務に参画した。

［重松美加、安井良則、松井珠乃、谷口清州、Nigel Collier（国立情報学研究所）、野崎慎仁郎（長崎大学国際連携研究戦略本部）、木内哲平（厚生労働省大臣官房厚生科学課）］

2. WHO に対する技術的支援

(1) WHO あるいはその地域事務所での活動

GOARN 会議、その他の国際会議へ出席やガイドラインの作成、会議における議長あるいは副議長担当など、技術的支援、貢献を行った。

［谷口清州、森兼啓太、砂川富正、松井珠乃、重松美加、多屋馨子、多田有希、島田智恵、岡部信彦］

(2) WHO 西太平洋地域事務局における活動

ポリオ根絶監視委員会。

［岡部・副委員長］

TAG/ASPED 委員会。

［岡部・委員］

3. 途上国の新型インフルエンザに関わる疫学能力強化に関する研究

国際医療協力研究委託事業（村上班）の費用を用いて、インドネシア国南スラウェシ州において、インフルエンザや肺炎のサーベイランス情報の解析を行うと共に、鳥インフルエンザに対する保健従事者の KAP 調査を行った。

［砂川富正、八幡祐一郎、神谷元、島田智恵、村上仁（国立国際医療センター）］

4. JICA インドネシア鳥インフルエンザサーベイランス強化プロジェクト支援

2008 年 10 月から開始された JICA による同プロジェクトの短期専門家として現地の活動を支援した。今後も継続的な協力を行っていく。また、平成 21 年 4 月 25 日、26 日 Indonesia, Makassar, South Sulawesi にて行われた新型インフルエンザアウトブレイクの演習へも参加した。

［砂川富正、島田智恵、神谷元、吉田真紀子、田中好太郎、谷口清州、岡部信彦］

5. JICA 中国 EPI 活動支援

中国における麻疹、HB、日本脳炎、サーベイランス活動の強化支援に参加した。

［岡部信彦］

6. JICWELS/JICA 国際感染症研修プロジェクト

研修の受け入れを行った。

［岡部信彦（委員長）・情報センター］

Ⅱ．国際研修

海外からの来所者への感染症情報センターの活動および感染症対策に関する情報提供と広報

国立国際医療センター海外研修生、JICA 留学生、各国保健医療および政府関係者などの来所時に、感染症情報センターの活動、国内感染症の発生動向、国内および国際連携による感染症対策の現状、予防接種、鳥インフルエンザを含む国際感染症対策、パンデミック対策などについての研修、病原体情報の説明、情報提供、広報業務をおこなった。

［岡部信彦、谷口清州、藤本嗣人、大日康史、重松美加、森兼啓太、大山卓昭、砂川富正、山下和予、夛田有希、島田智恵、多屋馨子、山本久美］

研修業務

Ⅰ．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：FETP）に関する業務 ［研修指導：八幡裕一郎、松井珠乃、中島一敏、砂川富正、大山卓明、谷口清州、岡部信彦］

1. 全般実施状況

FETP の実施は 11 年目となり、平成 21 年 4 月、11 期生 5 名（大平文人、具芳明、小宮伸洋、豊川貴生、中村奈緒美）を迎えた。平成 22 年 3 月には 10 期生 4 名（高橋秀明、土橋酉紀、冨岡鉄平、山岸拓也）が研修終了した。

2. 感染症集団発生事例に対する実地疫学調査協力

平成 21 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。

新型インフルエンザ集団発生対応（千葉県成田市）
新型インフルエンザ集団発生対応（兵庫県）
新型インフルエンザ集団発生対応（大阪府）
新型インフルエンザ集団発生対応（千葉県船橋市）
新型インフルエンザ集団発生対応（福岡研福岡市）
施設内病原性大腸菌 0157 感染症集団発生事例(岐阜県など広域)
施設内病原性大腸菌 0157 感染症集団発生事例(神奈川県横浜市など関東広域)

3. 研修活動

FETP のトレーニングの一環として、初期導入研修前期（John Kobayashi；4 月)、国立保健医療科学院必修研修（4 月－7 月)、初期導入研修後期（John Kobayashi; 7-8 月）とともに、FETP10 周年記念行事に伴う研修セミナー（John Kobayashi; 10 月)、院内感染予防対策セミナー（Mike Bell; 1 月）を開催した。

4. 教育研修経験

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、新型インフルエンザ・パンデミック研修会での講義、地方自治体の感染症危機管理研修会（東京都、栃木県、兵庫県、国立保健医療科学院、独立法人動物衛生研究所）での講義・演習を実施した。

5. 感染症疫学研究

平成21年度に研修終了した10期生が以下の特別論文長期プロジェクトの研究発表をおこなった。

同時に論文作成し､国立保健医療科学院健康危機管理分野特別論文として提出して、公衆衛生学修士（MPH）を所得した。

「２００７年－２００８年の横須賀市における麻疹の流行について」高橋秀明
「新型インフルエンザにおける季節性インフルエンザワクチンの効果」土橋酉紀
「兵庫県内の２校の保護者における日本紅斑熱、つつが虫病の認知度および情報入手方法についての調査」冨岡鉄平
「男性性器の状態を問う質問紙の妥当性の検討」山岸拓也

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。

腸管出血性大腸菌感染症サーベイランスに対する情報交換・還元
性感染症の発生動向に基づいた提言
百日咳の発生動向をモニター
麻疹症例増加に対する予防接種推奨
新型インフルエンザの発生動向監視、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（IASR)、感染症発生動向調査週報（IDWR）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、新型インフルエンザ流行開始時期（4 月～）より、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・医療関係者に対する情報発信等に、FETP は情報センタースタッフとともに対応した。

Ⅱ．感染症危機管理研修会

感染症情報センターが事務局を務め、平成9年度より定期的に実施している感染症危機管理研修会を9月16

日、17日に開催した。2009年度の事務局は、第二室及び喜瀬清義が担当した。研修内容として、「国の危機管理体制について」「食中毒対策について」「今冬の新型インフルエンザ対策について（総論）」「今冬の新型インフルエンザ対策について（各論）」「新型インフルエンザ・滋賀県の対応」「新型インフルエンザ・神戸市衛研の検査対応」「新型インフルエンザ・豊中保健所の対応」「新型インフルエンザ・箕面市立病院の経験」「米国での新型インフルエンザの臨床情報について」「新型インフルエンザ対策におけるリスクコミュニケーション」「新型インフルエンザワクチンについて」「わが国の予防接種対策（日本脳炎・Hibワクチンを中心に）」「これからの麻疹・風疹対策」「デング熱・チクングニア」「福岡市で発生した赤痢菌(S.sonnei)食中毒事例について」「アシネトバクター院内感染事例」「感染症集団発生時の疫学調査」、感染症集団発生時の疫学調査に関するケーススタディ演習等を行った。全国の感染症担当部局、保健所、衛生研究所から110数名の受講者があった。

［感染症情報センター一同］

Ⅲ. 海外からの来所者への感染症情報センターの活動および感染症対策に関する情報提供と広報

国立国際医療センター海外研修生、JICA 留学生、各国保健医療および政府関係者などの来所時に、感染症情報センターの活動、国内感染症の発生動向、国内および国際連携による感染症対策の現状、予防接種、国際保健規則を含む国際感染症対策、パンデミック対策などについての研修、病原体情報の説明、情報提供、広報業務をおこなった。

［岡部信彦、谷口清州、藤本嗣人、大日康史、重松美加、森兼啓太、大山卓昭、中島一敏、神谷元、砂川富正、山下和予、島田智恵、夛田有希、多屋馨子、山本久美］

Ⅳ. 国立保健医療科学院による研修

1. 国立保健医療科学院による細菌研修の実施

国立保健医療科学院による短期研修細菌研修を、平成２１年 11 月２日から 11 月２０日まで、保健医療科学院及び感染症研究所村山庁舎で行った。地方衛生研究所あるいは保健所において細菌検査業務に従事する初級者を対象として、細菌学の体系的な理解と新しい知識及び技術の習得を目的としている。保健所・地方衛生研究所合計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、保健医療科学院、感染研関連各部室､名古屋検疫所､東京都安全健康研究センター、神奈川県衛生研究所、岡山県環境保健センター、大分県衛生環境研究センター、千葉県衛生研究所、高知県衛生研究所、杵藤保健福祉事務所、所帝京大学、東京都予防医学協会、海事検定協会の協力を得て遂行された。

［伊藤健一郎、木村博一］

2. 国立保健医療科学院によるウイルス研修の実施

国立保健医療科学院による短期研修新興再興感染症技術研修を、平成 21 年 10 月 5 日から 10 月 9 日まで、国立感染症研究所村山庁舎で行った。地方衛生研究所あるいは保健所においてウイルス検査業務に従事する専門職員を対象として、麻疹ウイルス感染症の新しい知識及び検査診断技術の習得を目的としている。受講生は、地方衛生研究所 15 名であった。本研修は感染症情報センターをはじめとして、感染研関連各部室、群馬県衛生環境研究所の協力を得て遂行された。

［木村博一、伊藤健一郎、添田浩美、岡部信彦］

Ⅴ. その他の研修の実施

1. 希少感染症診断技術向上事業に関する業務

平成 ２1 年度は麻疹、風疹の現状と麻疹診断法、風疹診断法、ヒトメタニューモウイルスについて、新型インフルエンザウイルスとワクチン、新型インフルエンザウイルスの検出法について、下痢症ウイルスの検出法アップデート（ノロウイルス、サポウイルスについて)、腸管ウイルス感染症の現状と実験室診断、野生株ポリオウイルスの実験室封じ込め、チクングニヤ熱－世界の流行状況と我が国への輸入症例－、チクングニヤ感染症の診断法、チクングニヤウイルスの媒介蚊について、腸管出血性大腸菌の分離状況と分離菌の特性について、0157, 026, 0111 以外の腸管出血性大腸菌の検査法とその問題点、多剤耐性アシネトバクターの現状と検査における留意点、Clostridium difficile 感染症の現状と細菌学的検査における留意点、抗酸菌検査法、トキソプラズマ症の世界的な状況と最近のトレンド､トキソカラ症とイヌ糸状虫症、輸入真菌症概論、輸入真菌症の診断法－コクシジオイデス症とヒストプラズマ症－が取り上げられた。

研修会は平成２1 年２月、感染研で２日間、全国の地方衛生研究所の技術担当者を対象に二日間開催され、72 地研、148 名が参加した。それぞれの疾患はウイルス第一部、ウイルス第二部、ウイルス第三部、山口県環境保健センター、インフルエンザウイルス研究センター、昆虫医科学部、細菌第一部、細菌第二部、結核予防会結核研究所、寄生動物部、生物活性物質部等の協力により行われた。

［藤本嗣人、岡部信彦（情報センター）、倉根一郎（ウイルス第一部）、情報センタースタッフ一同］

2. 医師卒後研修

国立感染症研究所で開催された医師卒後研修の一貫として、予防接種に関して研修を行った。

［岡部信彦］

その他

Ⅰ. 情報提供及び広報活動

1. 電話、メールによる問い合わせ業務

予防接種、麻疹、風疹、ポリオ、人獣共通感染症、SARS、パンデミック、インフルエンザ、鳥インフルエンザ、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。一般からの電話相談が最も多く、特に、メディアで報道された場合、電話問い合わせが殺到した。医療従事者、自治体、保健所、メディア等を含めて、年間の問い合わせ件数は、研究者１人あたり、電話約 500-1000 件、メール約 50-100 件である。

［岡部信彦、谷口清州、重松美加、森兼啓太、神谷元、夛田

有希、安井良則、島田智恵、多屋馨子、佐藤　弘、山本久美、藤本嗣人、松野重夫、伊藤健一郎、木村博一、布施　晃］

2.　来所者への感染症情報センターの活動および感染症対策に関する情報提供と広報

国内生徒、学生の修学旅行や社会見学などの来所時に、感染症情報センターの活動、国内感染症の発生動向、国内および国際連携による感染症対策の現状、SARS を含む国際感染症対策、パンデミック対策などについての情報提供、広報業務をおこなった。

［岡部信彦、谷口清州、重松美加、森兼啓太、砂川富正、中島一敏、神谷元、多田有希、安井良則、島田智恵、多屋馨子、佐藤弘、山本久美、藤本嗣人、布施　晃］

3.　メディアへの対応

メデイアからの問い合わせに対しては、通常は情報センター内に於いて問い合わせ内容別に担当者を決め、取材等の依頼に応じている。

［岡部信彦、情報センタースタッフ一同］

Ⅱ．血清銀行に関する業務

１．血清の保管および血清払い出し業務

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し用いた後の余剰血清のうち、国内血清銀行での保管の承諾が得られた血清を受け入れ、保管した。平成 20 年度に受け入れた血清は、計 3,777 であった。また、血清使用申請があった場合には血清銀行委員会の審査後払い出しを行っている。平成 21 年度は 3 件、1981 本の血清を払い出した。

［多屋馨子、荒木和子、谷口無我、山本明史、佐藤　弘、山本久美、新井 智、岡部信彦］

２．職員血清の保管業務

平成 21 年職員血清、計 479 本を受け入れ保管した。

［佐藤　弘、荒木和子、多屋馨子、山本久美、新井 智、岡部信彦］

Ⅲ．予防接種に関する業務

1.　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 2009 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更新した。

［多屋馨子、前田明日香、佐藤　弘、山本久美、岡部信彦］

Ⅳ．レファレンス業務

アデノウイルスレファレンスセンターとして、新型アデノウイルス 53 型および 54 型の同定法を検討し、迅速かつ簡便に検出同定ができる LAMP 法の検査系（キット）を作製した。アデノウイルス地区レファレンスセンターとともにこのキットの評価を実施した。その結果、アデノウイルス 54 型を 80 件、アデノウイルス 53/22 型を 10 件検出した。

［藤本嗣人、小長谷昌未、岡部信彦］

ノロウイルスレファレンスセンターとして活動した。

［岡部信彦、松野重夫、村上裕子］

Ⅴ．検査実施状況

第 3 室：

佐藤分：血清反応　研究　12 検体（新型 Flu 関連）

荒木分：　ウイルス分離　研究　１検体

　　核酸・抗原検出　研究 4 検体

［佐藤弘、荒木和子、多屋馨子］

第 4 室：

行政検査　93 件

検査項目：アデノウイルス等同定困難株の同定

2009/6/8 付　札幌市衛生研究所　　4 件、

2009/9/16 付　相模原市長 1 件、

2009/9/28 付　神戸市環境保健研究所　6 件

2010/1/18　福井県衛生環境研究所所長 81 件

2010/3/19　相模原市長 1 件

主な研究検査　161 件

神鋼加古川病院　核酸検査・分離 128 件、

東京都立墨東病院　核酸検査・分離 33 件

　など

［藤本嗣人、小長谷昌未、4 室室員］

Ⅵ．研究員・研究生

氏　　名	身　　分	期　　間	出　　身
金澤　保	客員研究員	H10. 7. 1- H23. 7.1	産業医科大学
押谷　仁	客員研究員	H18. 3. 1- H23. 3.1	東北大学大学院
西尾　治	客員研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	元職員
John M. kobayashi	客員研究員	H19. 3. 1- H23. 3.1	ワシントン州立大学
木村幹男	客員研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	元第二室長
髙山直秀	客員研究員	H21. 4. 1- H23. 3.31	東京都立駒込病院
山岸拓也	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	大和市立病院
冨岡鉄平	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	自衛隊中央即応集団司令部
土橋酉紀	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	岡山大学大学院
高橋英明	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	横須賀市保健所
五十嵐正巳	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	自衛隊中央病院
高橋亮太	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	自衛隊中央病院
池田雄史	協力研究員	H21. 4. 1- H23. 3.31	京都市伏見区役所深草支所
田中好太郎	協力研究員	H21. 4. 1- H23. 3.31	JICAAI サーベイランス強化プロジェクト
堀　成美	協力研究員	H21. 4. 1- H23. 3.31	聖路加看護大学
吉田眞紀子	協力研究員	H21. 4. 1- H23. 3.31	薬剤師
杉下由行	協力研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	東京都島しょ保健所
土田賢一	協力研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	横須賀市保健所
徳田浩一	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	鹿児島大学医学部
山田文也	協力研究員	H17. 4. 1- H23. 3.31	埼玉県衛生研究所
中瀬克巳	協力研究員	H11. 9. 1- H23. 3.31	岡山市保健所
加來浩器	協力研究員	H12. 9. 1- H23. 3.31	東北大学大学院
浦島充佳	協力研究員	H12. 12. 1- H23. 3.31	東京慈恵会医科大学
松永泰子	協力研究員	H13. 5. 1- H23. 3.31	元職員
藤井達也	協力研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	三宿病院・自衛隊中央病院
堀 佳美	協力研究員	H14. 4. 1- H22. 3.31	医療法人済恵会須藤病院
島田　靖	協力研究員	H14. 4. 1- H22. 3.31	日本医科大学救急医学講座
吉田英樹	協力研究員	H14. 4. 1- H23. 3.31	大阪市保健所
森　伸生	協力研究員	H14. 4. 1- H23. 3.31	厚生労働省厚生科学課
齋藤章暢	協力研究員	H14. 7. 1- H23. 3.31	埼玉県衛生研究所
三村敬司	協力研究員	H16. 4. 1- H23. 3.31	自衛隊中央病院
山口　亮	協力研究員	H16. 4. 1- H23. 3.31	北海道保健福祉医療局
森山和郎	協力研究員	H16. 4. 1- H23. 3.31	パナソニック電工株式会社
鈴木葉子	協力研究員	H16. 4. 1- H23. 3.31	東京女子医科大学東医療センター
松舘宏樹	協力研究員	H16.12.1- H23. 3.31	岩手県環境保健研究センター
松崎充宏	協力研究員	H16.12.1- H23. 3.31	(社)日本海事検定協会
宗村徹也	協力研究員	H17. 5. 1- H23. 3.31	横浜市食肉衛生検査所
飯田真里子	協力研究員	H18. 1. 1- H22. 3.31	東京医科歯科大学大学院
太田正樹	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	財団法人結核研究所
神垣太郎	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	東北大学大学院
小林幹子	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	獣医師
登坂直規	協力研究員	H18. 4. 1- H23. 3.31	東京医科歯科大学

阿保　満	協力研究員	H17. 4. 1- H23. 3.31	東京都多摩府中保健所
鷲見　宏	協力研究員	H17. 4. 1- H23. 3.31	兵庫県西播磨県民局
鈴木智之	協力研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	群馬県衛生環境研究所
宮城裕人	協力研究員	H18. 9. 1- H23. 3.31	聖マリア病院
井内田科子	協力研究員	H18.12. 1- H23. 3.31	ベルギー王立大使館
岡崎　薫	協力研究員	H18. 12. 1- H23. 3.31	東京都立小児総合医療センター
赤尾寿美子	協力研究員	H19. 4. 1- H23. 3.31	マニハ食品(株)
小長谷　昌未	協力研究員	H20. 3. 1- H23. 3.31	トラスト(株)
橋本　和宏	協力研究員	H20. 1. 1- H23. 3.31	トラスト(株)
榎本美貴	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	兵庫県立健康生活環境科学研究所
牧　隆之	協力研究員	H19. 10. 1- H22. 3.31	防衛省
川端利信	協力研究員	H19.10. 1- H23. 3.31	防衛省
柏原　茂	協力研究員	H19.10. 1- H22. 3.31	防衛省
小田興志郎	協力研究員	H20. 4. 1- H23. 3.31	防衛省
成松浩志	協力研究員	H20. 9. 1- H23. 3.31	大分県衛生環境研究センター
高木雅之	協力研究員	H21. 1. 20- H23. 3.31	陸上自衛隊
Bi Zhenwang	協力研究員	H20. 9. 18- H21. 8.31	山東省疾病予防控制中心伝染病防制所
Peter Doshi	研究生	H21.5.13-H21.5.19	東京大学大学院医学系研究科
帖佐徹	客員研究員	H21.4.1-H23.3.31	（財）九州産業衛生協会
具芳明	協力研究員	H21.4.1-H23.3.31	実地疫学専門家養成コース
古宮伸洋	協力研究員	H21.4.1-H23.3.31	実地疫学専門家養成コース
大平文人	協力研究員	H21.4.1-H23.3.31	実地疫学専門家養成コース
中村奈緒美	協力研究員	H21.4.1-H23.3.31	実地疫学専門家養成コース
田崎陽典	協力研究員	H21.5.1-H23.3.31	危機管理広報コンサルタント
豊川貴生	協力研究員	H21.4.1-H23.3.31	実地疫学専門家養成コース

発表業績一覧

Ⅰ．誌上発表

１．欧文発表

1) H.Sugiura,Y.Ohkusa,M.Akane,T.Sugiura,N.Okabe,T.Imamura:Construction of syndromic surveillance using a web-based daily questionnaire for health and application at the G8 Hokkaido Toyako Summit meeting,Epidemiol Infect 1-10.2010

2) T Matsui, J Kobayashi, H Satoh, T Fujimoto, N Okabe, S Ando, T Kishimoto and S yamamoto. Surveillance, recognition, and reporting of Tsutsugamushi disease (scrub typhus) and Japanese spotted fever by general practice clinics in Miyazaki Prefecture, determined by questionnaire survey in 2007. J Infect Chemother 15, 269-272, 2009

3) K Tanaka, T Matsui, T Tachibana, T Ichikawa, Y Imada, J Yano. Factors associated with acute otitis media in children due to penicillin intermediately resistant Streptococcus pneumonia. Int J Pedeatr Otorhinolaryngol Jul 9, 2009(Epub ahead of print)

4) M Yoshida, T Matsui, Y Ohkusa, J Kobayashi, T Ohyama, T Sunagawa, Y Yasui, T Tachibana, N Okabe. Seasonal influenza surveillance using prescription data for anti-influenza medications. Jpn J Infect Dis 62, 233-235, 2009

5) Kamiya H, Nakano T, Inoue M, Kamiya H, Abd TT, Patel M, Orenstein WA,Parashar UD. A retrospective evaluation of hospitalizations for acute gastroenteritis at 2 sentinel hospitals in central Japan to estimate the health burden ofrotavirus. J Infect Dis. 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S140-6.

6) Kamiya H, Shimada T, Okabe N. Current Incident Status of Vaccine-Preventable Bacterial and Viral Infectious Diseases in Japan. JMAJ 53(2):106-110, 2010

7) Odaira, F., Takahashi, H., Toyokawa, T., Tsuchihashi, T., et. al., Assessment of secondary attack rate and effectiveness of antiviral prophylaxis among household contacts in an

influenza A(H1N1)v outbreak in Kobe, Japan, May-June, 2009. Eurosurveillance, 2009; 14(35)

8) Kawazoe, A., Jin, L., Shigematsu, M., Bekki, D., Barrero, R., Taniguchi, K., Collier, N. The development of a schema for semantic annotation: gain brought by a formal ontological method. Applied Ontology. 4：5-20. 2009

9) Kawachi, S., Luong, S.T., Shigematsu, M., Furuya, H., Phung, T.T.B., Phan, P.H., Nunoi, H., Nguyen, L.T., Suzuki, K. Risk Parameters of Fulminant Acute Respiratory Distress Syndrome and Avian Influenza (H5N1) Infection in Vietnamese Children. Journal of Infectious Diseases. 200：510-515. 2009

10) N Komiya, Y Gu, H Kamiya, Y Yahata, T Matsui, Y Yasui, N Okabe,. Clinical features of influenza A (H1N1)pdm virus infection in Osaka Prefecture, May 2009. Eurosurveillance, 14: 13-15. 2009 Jun. Eurosurveillance, Volume 14, Issue 29, 23 July 2009

11) T Shimada, Y Gu, H Kamiya, N Komiya, F Odaira, T Sunagawa, H Takahashi, T Toyokawa, Y Tsuchihashi, Y Yasui, Y Tada, N Okabe：Epidemiology of influenza A(H1N1)v virus infection in Japan, May - June 2009. Eurosurveillance, 14,(24), 2009

12) Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike T, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H. Molecular Evolutionary Analysis of the Influenza A(H1N1)pdm, May – September, 2009: Temporal and Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan. PLoS ONE 2010 Jan 10; 5(6): e11057. doi:10.1371/journal.pone.0011057

13) Mori T, Tanaka-Taya K, Satoh H, Aisa Y, Yamazaki R, Kato J, Ikeda Y, Okamoto S . Transmission of chromosomally integrated human herpesvirsus 6 (HHV-6) variant A from a parent to children leading to misdiagnosis of active HHV-6 infection. Transpl Infect Dis. 11(6):503-6.2009

14) Kang, H. J., Arai, S., Hope, A. G., Song, J. W., Cook, J. A., Yanagihara, R Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virology journal*. 6:208 doi:10.1186/1743-422X-6-208. 2009.

15) Kang, H. J., Bennett, S. N., Disney, L., Sumibvay, L., Arai, S., Mocz, G., Hope, A., Song, J. W., Cook, J. A., Yanagihara, R. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*). *Public Library of Science ONE* 4: 7. 2009.

16) Kang, H. J., Bennett, S. N., Disney, L., Sumibvay, L., Arai, S., Ruedas, L. A., Song, J. W., R. Yanagihara. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 388: 8-14. 2009.

17) Yokoyama, E., Uchimura, M., Ito, K. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Food Protection. 73(6): 1064-72. 2009.

18) Etoh, Y., Murakami, M., Ichihara, S., Sera, N., Hamasaki, M., Takenaka, S., Horikawa, K., Kawano, K., Takeishi, T., Kuwana, Y., Inoue, A., Nagatsu, Y., Hira, Y., Takahashi, M., Ito, K. Isolation of Shiga Toxin 2f-Producing *Escherichia coli* (O115:HNM) from an Adult Symptomatic Patient in Fukuoka Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 62(4): 315-317. 2009.

19) Mukai, H., Seki, T., Nakano, H., Hokari, Y., Takao, T., Kawanami, M., Tsukagoshi, H., Kimura, H., Kiso, Y., Shimonishi, Y., Nishi, Y., Munekata, E. Mitocryptide-2: Purification, Identification and Characterization of A Novel Cryptide That Activates Neutrophils. Journal of Immunology. 182(8): 5072-5080. 2009.

20) Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcriptase PCR**.** Journal of Medical Microbiology. 58(5): 638-643. 2009.

21) Hishinuma-Igarashi, I., Mizuta, K., Saito, Y., Ohuchi, Y., Noda, M., Akiyama, M., Sato, H., Tsukagoshi, H., Okabe, N., Tashiro, M., Kimura*, H. Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. Journal of Infection. 58(4): 311-313. 2009.

22) Nakamura, M., Itokazu, K., Taira, K., Kawaki, T., Kudaka, J., Nidaira, M., Okano, S., Koja, Y., Tamanaha, K., Kimura, H., Noda, M. Genotyping and phylogenetic analysis of G protein gene in respiratory syncytial virus (RSV) prevalent in Okinawa, Japan 2008. Japanese Journal of Infectious Diseases. 62(4): 326-327. 2009.

23) Morita, Y., Komoda, E., Boonmar, S., Markvichtr, K., Chaunchom, S., Chanda, C., Yingsakmongkon, S., Padungtod, P., Jha, V C., Singh, S., Yamamoto, S., Kimura, H.

Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter coli* isolated from buffaloes in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. Nepalese Veterinary Journal. 29:42-45. 2009.

24) Honma, Y., Yoshii, Y., Watanabe, Y., Aoki, N., Komiya, T., Iwaki, M., Arai, H., Arakawa, Y., Takahashi, M., Kimura, H. A case of afebrile pneumonia caused by non-toxigenic *Corynebacterium diphtheria*. Japanese Journal of Infectious Diseases. 62(4): 327-329. 2009.

25) Kozawa, K., Aoyama, Y., Mashimo, S., Kimura, H. Toxicity and Actual Regulation of Organophosphate Pesticides. Toxin Reviews. 28(4): 245-254. 2009.

26) Kurosawa, H., Fujita, M., Kimura, H., Kobatake, S., Ohshima, M., Nagai, A., Kaneko, S., Iwasaki, Y., Kozawa, K. A Case of *Legionella* pneumonia Linked to a Hot Spring Facility in Gunma Prefecture, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 63(1):78-79. 2010.

27) Mizuta, K., Hirata, A., Suto, A., Aoki, Y., Ahiko, T., Itagaki, T., Tsukagoshi, H., Morita, Y., Obuchi, M., Akiyama, M., Okabe, N., Noda, M., Tashiro, M., Kimura*, H. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus genogroup A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. Virus Research. 147(2): 265-274. 2010.

28) Toda, S., Kimura, H., Noda, M., Mizuta, K., Matsumoto, T., Suzuki, E., Shirabe K. Phylogenetic Analysis of Human Metapneumovirus from Children with Acute Respiratory Infection in Yamaguchi, Japan during Summer 2009. Japanese Journal of Infectious Diseases. 63(2): 139-140. 2010.

29) Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., Morino, H., Lee, C., Maeda, K., Araki, K., Otake, T., Kawahata, T., Shibata, T. Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. Biocontrol Science. 15(2): 45-49. 2010

30) Fujimoto, T., Konagaya, M., Enomoto, M., Tsuboi, K., Hashimoto, K., Taniguchi, K., Kodama, T., Okabe, N. Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis. *Jpn J Infect Dis.* 63(1):31-35. 2010.

31) Fujimoto, T., Izumi, H., Okabe, N., Enomoto, M., Konagaya, M., Chikahira, M., Munemura, T., Taniguchi, K. Usefulness of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the diagnosis of echovirus aseptic meningitis using cerebrospinal fluid. *Jpn J Infect Dis.* 62 (6): 455-457. 2009.

32) Matsui, T., Kobayashi, J., Satoh, H., Fujimoto, T., Okabe, N., Ando, S., Kishimoto, T., Yamamoto, S. Surveillance, recognition, and reporting of Tsutsugamushi disease (scrub typhus) and Japanese spotted fever by general practice clinics in Miyazaki Prefecture, determined by questionnaire survey in 2007. *J Infect Chemother*. 15(4): 269-272. 2009.

33) Sasaki, Y., Fujimoto, T., Aragane, M., Yasuda, I., Nagumo, S. Rapid and sensitive detection of Lophophora williamsii by loop-mediated isothermal amplification. *Biol Pharm Bull*. 32(5):887-891. 2009.

34) Sata F, Kurahashi N, Ban S, Moriya K, Tanaka KD, Ishizuka M, Nakao H, Yahata Y, Imai H, Kakizaki H, Nonomura K, Kishi R. Genetic Polymorphisms of 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 3 and the Risk of Hypospadias. J Sex Med.(in print)

35) Okabe N.: The treat posed by new types of influenza: Avian influenza virus and impact on humans. Agriculture-Environment –Medicine. Edit: Minami K. Kitasato Univ, Agromedicine Series 7. P.98-102 Yokendo Publishers, Tokyo. 2009.

２．和文発表

1) 大日康史、菅原民枝。肺炎死亡の現状と動向。公衆衛生、74(1)、6-11、2010

2) 菅原民枝、大日康史、多屋馨子、山本久美、佐藤弘、安井良則、岡部信彦：百日咳のデータベース構築と運用の検討、小児科、51 (7)：929-934、2010

3) 河合直樹、川出靖彦、小林博、岡田就将、樋口行但、川治秀輝、大日康史：岐阜県リアルタイム感染症サーベイランスによる新型インフルエンザの流行解析、日本医事新報、4487、58-64、2010

4) 山内利朗、杉浦弘明、熊倉俊一、平賀瑞雄、今村知明、大日康史。出雲市における症候群サーベイランス。島根医学、30 (1)：39-46、2010

5) 大日康史、菅原民枝、多屋馨子、山本久美、佐藤弘、安井良則、岡部信彦。「Hib(b 型インフルエンザ菌)感染症発生データベース」による Hib 感染症の動向。病原微生物検出情報, 31(4)： 97－98, 2010.

6) 大日康史、菅原民枝、三野正博、島内康宏、尾崎貴視、香川嘉宏、岡部信彦。水痘予防接種に対する公費補助制度の政策評価。感染症学雑誌、84(2)、159-164、2010

7) 砂川富正, 岡部信彦。WHO の予防接種戦略。小児科診療, 72(12) ： 2257-2263, 2009.

8) 吉田眞紀子, 高橋秀明, 神谷元, 砂川富正, 大山卓昭, 岡部信彦. 広域細菌性赤痢発生事例における FETP の活動. 食品衛生研究 59 巻 9 号 Page15-20(2009.09)
9) 神谷元. 【これからの予防接種】 欧米の予防接種制度の動向. 公衆衛生 73 巻 10 号 Page722-725(2009.10)
10) 神谷元【新型インフルエンザへの備え】 病院のスタッフがインフルエンザにならないために 臨床栄養 115 巻 6 号 Page660-662(2009.11)
11) 神谷元、岡部信彦. 米国地方自治体における予防接種の現状 (ACIP のその先にあるもの) 小児科 50 巻 13 号 Page2189 - 2196 (2009.12)
12) 土橋酉紀、高橋秀明ら、我が国における新型インフルエンザ A (H1N1) の流行の現状 臨床とウイルス、2010;38(1): 121-9
13) 土橋酉紀、田中好太郎ら、「2008 年沖縄本島におけるレプトスピラ症の実地疫学調査 ー リスク因子の検討」獣医畜産新報 (JVM) 2010; 63(3): 219-20
14) 土橋酉紀ら、「実地疫学専門家養成コース FETPーJ と自治体でのアウトブレイク調査」 食品衛生研究、2009; 59(7): 53-5
15) 山岸拓也、岡部信彦、「新インフルエンザ A (H1N1) の世界動向」臨床とウイルス、2010; 38(1): 136-147
16) 豊川貴生、「新型インフルエンザの症状と重症化のリスク」調剤と情報、2009; 15(12): 14-18
17) 多田有希:STD サーベイランスを考えるーサーベイランスから実態をどこまで把握できるかー (梅毒). 日本性感染症学会誌 20(1):57-60.2009.
18) 多田有希:梅毒血清反応の問題点 (感染症法に基づく梅毒発生届けにおける問題点). 日本性感染症学会誌 20(1):75-77.2009.
19) 衞藤隆, 加藤達夫, 庵原俊昭, 岡田賢司, 古賀伸子, 三田村敬子, 住友眞佐美, 多屋馨子, 馬場宏一, 山口晃史, 齋藤昭彦, 薗部友良, 中島夏樹:正しい知識で予防接種を小児保健研究. 69 巻 2 号 Page148-172. 2010.
20) 馬場宏一, 加藤達夫, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 住友眞佐美, 多屋馨子, 三田村敬子, 日本小児保健協会予防接種・感染症委員会:新型インフルエンザ拡大防止対策 大阪府が断行した「学校臨時休業」に学ぶ. 小児保健研究. 69 巻 1 号 Page132-134. 2010.
21) 加藤達夫, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 住友眞佐美, 多屋馨子, 馬場宏一, 三田村敬子, 日本小児保健協会予防接種・感染症委員会市民から寄せられた予防接種に関する疑問に答える 特にHaemophilus influenzae type b(Hib):b型インフルエンザ菌(ヒブ)に関して. 小児保健研究. 68 巻 6 号 Page725-728. 2009.
22) 多屋馨子:2012 年までに麻しんをゼロに! 地域、学校における麻しん(はしか)対策について. あきた小児保健 45 号 Page5-6. 2009.
23) 多屋馨子:麻疹排除と麻疹風疹混合(MR)ワクチン追加接種の取り組み. 公衆衛生. 73 巻 10 号 Page726-731. 2009
24) 多屋馨子, 加藤達夫, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 住友眞佐美, 馬場宏一, 三田村敬子, 日本小児保健協会予防接種・感染症委員会:わが国の麻疹排除に向けた取り組み. 小児保健研究. 68 巻 5 号 Page590-594. 2009
25) 加藤達夫, 住友眞佐美, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 多屋馨子, 馬場宏一, 三田村敬子, 日本小児保健協会予防接種・感染症委員会:子どもたちを結核から守ろう!. 小児保健研究. 68 巻 4 号 Page493-497. 2009
26) 岡部信彦, 荒川創一, 岩田敏, 白石正, 多屋馨子, 藤本卓司, 三鴨廣繁, 安岡彰, 日本環境感染学会ワクチン接種プログラム作成委員会:日本環境感染学会院内感染対策としてのワクチンガイドライン 第 1 版. 日本環境感染学会誌. 24 巻 3 号 Pagenp1-S11. 2009
27) 加藤達夫, 岡田賢司, 庵原俊昭, 宇加江進, 古賀伸子, 住友眞佐美, 多屋馨子, 馬場宏一, 三田村敬子, 日本小児保健協会予防接種・感染症委員会:腸管出血性大腸菌感染症を予防しよう 予防の基本は正しい知識と手洗い. 小児保健研究. 68 巻 3 号 Page402-403. 2009
28) 多屋馨子:未熟児ですが予防接種はどのくらい遅らせて始めたらよいですか? 周産期医学. 39 巻増刊 Page771-774. 2009
29) 多屋馨子:予防接種健康被害救済制度・予防接種後副反応・健康状況調査. 小児科診療. 72 巻 12 号 Page2241-2250. 2009
30) 多屋馨子:世界標準にはるかに及ばないわが国の予防接種体制 麻疹・風疹混合(MR)ワクチン. 日本医師会雑誌. 138 巻 4 号 Page681-685. 2009
31) 多屋馨子:ウイルス抗体価からみた感染予防. 小児内科. 41 巻 7 号 Page1037-1043. 2009
32) 大石和徳, 岡田賢司, 多屋馨子, 永井英明:呼吸器感染症とワクチン. 呼吸. 28 巻 6 号Page585-594. 2009
33) 多屋馨子:予防接種後副反応・健康状況調査. 母子保健情報. 59 号 Page42-48. 2009
34) 多屋馨子:麻疹・風疹予防接種に関する話題. 小児科臨床. 62 巻 6 号 Page1175-1181. 2009
35) 佐藤 弘、多屋馨子:感染制御に必要な予防接種の知識.

臨床検査. 53：1496-1499. 2009.

36) 佐藤 弘、多屋馨子：インフルエンザの予防接種はどうすればよいですか?. 周産期医学. 39：778-780. 2009.

37) 佐藤 弘、多屋馨子、高崎智彦、倉根一郎、岡部信彦、調査担当都道府県:わが国のブタにおける日本脳炎に対する抗体保有状況（感染症流行予測調査より）. 病原微生物検出情報月報. 30：151-152. 2009.

38) 佐藤 弘、多田有希：感染症法に基づき獣医師より届け出られた「細菌性赤痢のサル」の報告状況. 病原微生物検出情報月報. 30：317-319. 2009.

39) 山本久美、多屋馨子：【周産期相談 318】お母さんへの回答マニュアル第 2 版. 周産期医学第 39 巻増刊号：781-783. 2009

40) 山本久美：麻疹ワクチン接種の現状. Medical Q 第 226 号：平成 21 年 10 月 20 日発行

41) 山本久美：麻疹風疹混合ワクチンの接種の状況. 小児科 51(6)： 765-771. 2010

42) 若井公子、 嶋田明、 竹内紗耶香、 小浦方久美子、 久保田知里、 朴明子、 佐野弘純、 外松学、 服部幸夫、山城安啓、 木村博一、 林泰秀、 3 世代にわたりみられた家族型・サラセミア家系の男児例. 日本小児血液学会雑誌 23(1)： 27-30. 2009.

43) 古田太郎、 楠田美和子、 隈下 祐一、 辻陽平、 松村玲子、 山本将司、 加藤由実、 木村博一、衛生対策薬剤のインフルエンザウイルスに対する不活化効果. 日本防菌防黴学会誌 37(9)： 656-666. 2009.

44) 藤本嗣人、榎本美貴、小長谷昌未、谷口清州. フロックドスワブのアデノウイルス検体採取での有用性.感染症学雑誌、83(4)： 398-400. 2009.

45) 松井珠乃、藤本嗣人、佐藤弘、安井良則、岡部信彦. つつが虫病および日本紅斑熱について発生頻度が異なる地域での市民医学講座参加者における認知度比較.感染症学雑誌、84(1)： 48-51. 2010.

46) 藤本嗣人、岡部信彦. アデノウイルスレファレンス. 病原微生物検出情報月報、31(3)： 77-77. 2010.

47) 藤本嗣人.高速 PCR システムによるアデノウイルス診断. 臨床と微生物、36(3)：257-262. 2009.

48) 西尾治、藤本嗣人. Astrovirus（アストロウイルス）. 食品由来感染症と食品微生物(中央法規)、577－582. 2009.

49) 西尾治、藤本嗣人. Enteric Adenovirus（腸管アデノウイルス）. 食品由来感染症と食品微生物(中央法規)、583－588. 2009.

Ⅱ．学会発表

１．国際学会

1) Yasushi Ohkusa, Tamie Sugwara, Nobuhiko Okabe: Syndromic Surveillances for the Early Detection of the Novel Influenza A/H1N1swl in Japan, Biosecure,Taiwan,2009,9

2) Yasushi Ohkusa, Tamie Sugwara, Kiyosu Taniguchi, Nobuhiko Okabe:Enhanced Surveillance as the Early Detection of the Novel Influenza A/H1N1swl in Japan, International Society for Disease Surveillance Conference. Miami, 2009, 12.

3) T Matsui, F Kasuga, Y Ohkusa, J Kobayashi, N Okbe, Comparison of random digit dialing and web-based methods for enrolling potential controls, Shaitama, Japan-January 2009, 5th Annual OutbreakNet Conference. 2009 年 9 月

4) Sunagawa, T.: Pandemic surveillance in Japan. International Scientific Symposium on Influenza Pandemic Response and Preparedness, Beijing, China, 2009.8

5) Kamiya H, Nakano T, Parashar UD, et al.Evaluation of Acute Gastroenteritis Hospitalizations at Two cities in Central Japan to Estimate the Health Burden of Rotavirus. 47th Infectious Disease Society of America, 2009 October, Philadelphia USA

6) Toyokawa, T. et al., “Evaluation about the efficacy of neuraminidase inhibitors among the first 49 laboratory-confirmed cases discovered in Kobe City located at western part of Japan, May 2009” (oral presentation)

7) TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

8) Yamagishi, T. et al., “An outbreak of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii at a hospital in Japan 2008-2009” (oral presentation)

9) TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

10) Odaira, F. et al., “Assessment of secondary transmission among household contacts in a novel influenza A(H1N1)pdm outbreak Kobe, Japan, 2009” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

11) Takahashi H. et al., “Pandemic Influenza A(H1N1)pdm Outbreak ? Hyogo Prefecture, Japan, 2009” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

12) Nakamura, N. et al., “School closures on the incidence of the novel influenza A(H1N1) virus infection among young students in Fukuoka City, Fukuoka Prefecture, Japan, 2009”

(poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

13) Komiya, N. et al., “Clinical features of an influenza A(H1N1)pdm outbreak in a private school, Osaka, May 2009” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

14) Tsuchihashi, U. et al., “Clinical characteristics of novel influenza A(H1N1)pdm of early outbreaks in Kobe city located at western part of Japan, May 2009” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

15) Tomioka, T. et al., “Epidemiological investigation of a novel influenza A(H1N1)pdm outbreak detected by entry screening at Narita international airport, Japan, 2009 ” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

16) Gu, Y. et al., “Overview of an Influenza A(H1N1)pdm Outbreak in one Private School, Osaka, Japan, 2009” (poster presentation) . TEPHINET Southeast Asia and Western Pacific Bi-regional Scientific Conference, 2009, Korea

17) Taniguchi K. National disease surveillance arrangements & experiences in providing assistance for capacity-building. Biological Weapon Convention. August 2009, Switzerland.

18) Fujimoto, S., Shigematsu, M., Kojima, F., Harada, Y., Higashida, S. : Molecular epidemiology of Campylobacter isolates in Fukuoka, Japan. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms. Niigata, Japan 2009.9.

19) Arai, S., Tabara, K., Oh, H.- S., Takada, N., Song, J.-W., Kang, H. J., Bennett, S. N., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Yanagihara, R. Genetically distinct Hantavirus in the Asian Lesser White-toothed Shrew on Jeju island, Korea. 28 th Annual Meeting of American Society for Virology. Vancouver, BC, Canada. July 11-15, 2009.

20) Kang, H. J., Bennett, S. N., Hope, A. G., Dizney, L., Sumibcay, L., Arai, S., Song, J.-W., Ruedas, L. A., Cook, J. A., Yanagihara, R. Phylogeography of Jemez Spring Virus: Evidence for Soricid-borne Hantavirus co-evolution and cross-species transmission. 28 th Annual Meeting of American Society for Virology. Vancouver, BC, Canada. July 11-15, 2009.

21) Kang, H. J., Bennett, S. N., Sumibcay, L., Arai, S., Mocz, G., Hope, A. G., Song, J.-W., Cook, J. A., Yanagihara, R. Evolutionary insights from a newfound Hantavirus harbored by the European Common Mole (*Talpa europea*). 28 th Annual Meeting of American Society for Virology. Vancouver, BC, Canada. July 11-15, 2009.

22) Yahata Y, Sunagawa T, Shimada T, Ueno-Yamamoto K, Tsutsui M, Watanabe Y, Taniguchi K, Okabe N. Effectiveness of School Closure in Novel Influenza A(H1N1) Outbreak in Japan. 137th American Public Health Association Annual Meeting, 2009,Philadelphia, USA

２．国内学会

1) 大日康史、菅原民枝、多屋馨子、山本久美、佐藤弘、安井良則、岡部信彦：Hib 感染症発生 DB（データベース）の構築と運用、第 13 回ワクチン学会．札幌，2009. 9

2) 大日康史、菅原民枝：感染症シミュレーション、日本オペレーションズ・リサーチ学会 2009 年秋季研究発表会．長崎，2009. 9

3) 森兼啓太　インフルエンザの感染対策　第 54 回日本透析医学会学術集会　神奈川県横浜市　2009. 6

4) 谷口弘美、森兼啓太　透析関連感染サーベイランスシステムの構築と経過報告　第 54 回日本透析医学会学術集会　神奈川県横浜市　2009. 6

5) 川畑竜洋、長谷川由美子、宇治川和也、南満寿美、高橋陽一、桝田周佳、張本幸司、 森兼啓太　当透析室の透析関連感染サーベイランスの現状報告　第 54 回日本透析医学会学術集会　神奈川県横浜市　2009. 6

6) 松井珠乃、院内感染、アウトブイレク発生時の FETP の活動、第 24 回日本環境感染学会総会　ベーシックレクチャー、2009 年 2 月

7) 松井珠乃、佐藤弘、藤本嗣人、岡部信彦、四国 4 県の内科標榜医療機関におけるつつが虫病と日本紅斑熱に関する調査～平成 20 年度、第 16 回リケッチア研究会 2009 年 11 月

8) 神谷元、中野貴司、井上正和、神谷敏也、神谷齊．三重県下 3 市におけるロタウイルス感染による急性胃腸炎の 5 歳未満児入院例の調査結果．第 13 回日本ワクチン学会学術大会、2009 年 9 月、札幌

9) 岡部信彦、中島一敏、神谷元．世界の小児感染症対策－米国と途上国の対策比較を中心に－（イブニングセミナー）第 41 回小児感染症学会総会・学術集会、2009 年 11 月、福井

10) 土橋酉紀、田中好太郎ら、「2008 年沖縄県本島におけるレプトスピラ症の実地疫学調査」第 9 回人と動物の共通感染症研究会、2009 年、東京

11) 堀口逸子、重松美加：新型インフルエンザの新聞におけ

る国内報道の実態. 第13回日本渡航医学会学術集会. 福岡県福岡市, 2009.7.

12) 谷口清州.パンデミック (H1N1) 2009 ワクチンと治療の最前線. 第34回東日本小児科学会. 2009年11月、栃木県.

13) 安井良則：新型インフルエンザとは. 日本産業衛生学会関東地方会. 東京都文京区. 2009.5

14) 安井良則：新型インフルエンザ事例発生時の発熱相談センター・誹謗中傷について. 近畿保健所長会緊急シンポジウム. 大阪府堺市. 2009. 7

15) 安井良則. 大阪における新型インフルエンザの発生事例について. 第 48 回日本公衆衛生学会近畿地方会. 大阪府堺市. 2009. 7

16) 安井良則. 新型インフルエンザの日本国内の動向と大阪での疫学調査結果について. 済生会学会シンポジウム. 大阪府住之江区. 2009. 10

17) 安井良則. 新型インフルエンザの日本国内の発生動向とその対策について. 第 55 回日本臨床検査医学会中四国支部総会. 岡山県岡山市. 2010. 2

18) 安井良則. 2009 年に発生した新型インフルエンザがA/H1N1 の流行状況とその対策について. 第83回日本薬理学会総会. 2010. 3

19) 椎野禎一郎、貞升健志、長島真美、服部純子、杉浦亙. 国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測される HIV 集団サイズの刑事的変化. 第23回日本エイズ学会学術集会総会. 名古屋市. 2009. 11

20) 多屋馨子, 谷口無我, 山本明史, 岡部信彦：都内医療機関に入院した麻疹症例に関する検討. 第50回日本臨床ウイルス学会. 高知県高知市. 2009. 6.

21) 多屋馨子：麻疹、インフルエンザなど感染症の流行状況について.日本小児科学会感染症・予防接種フォーラム. 京都府京都市. 2009. 12.

22) 多屋馨子：日本の麻疹排除(elimination)戦略. 第2回日中麻疹セミナー. 東京都新宿区. 2009. 12.

23) 多屋馨子：本邦と諸外国との麻疹対策の現状比較. 第41回日本小児感染症学会. 福井県福井市. 2009. 11.

24) 多屋馨子：小児ワクチンの現状と課題. 第58回日本感染症学会東日本地方会学術集会第56回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 東京都文京区. 2009. 10.

25) 多屋馨子：わが国の麻疹排除計画とその実践～2012年の排除を目指して～.第57回日本ウイルス学会学術集会. 東京都千代田区. 2009. 10.

26) 多屋馨子：麻疹排除 (2012 年) 計画に向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割. 第68回日本公衆衛生学会総会. 奈良県奈良市. 2009. 10

27) 多屋馨子：日本のワクチン戦略. 第57回日本化学療法学会総会. 東京都中央区. 2009. 6

28) 佐藤 弘、島田智恵、多屋馨子、多田有希、岡部信彦：0歳児における麻疹の発生状況および免疫保有状況. 第50回日本臨床ウイルス学会. 高知県高知市. 2009. 6.

29) 佐藤 弘、多屋馨子、高崎智彦、倉根一郎、岡部信彦、感染症流行予測調査事業担当者グループ:わが国におけるヒトおよびブタの日本脳炎抗体保有状況 (2008 年度感染症流行予測調査事業より).第13回日本ワクチン学会. 北海道札幌市. 2009. 9.

30) 近真理奈、山本徳栄、増田純一郎、大山龍也、大山通夫、岡部信彦、新井 智. 埼玉県に生息する野生化アライグマのバベシア原虫保有状況調査. 第149回 日本獣医学会学術集会. 東京都武蔵野市. 2010年3月26－28日.

31) 新井 智、田原研司、H.-S. Oh, 高田伸弘、J.-W. Song, H. J. Kang, S. N. Bennett, 多屋馨子、有川二郎、岡部信彦、R. Yanagihara. Genetically distinct Hantavirus in the Asian Lesser White-toothed Shrew on Jeju island, Korea. 第57回日本ウイルス学会学術集会 東京都千代田区 2009年10月25－27日

32) 山本久美、多屋馨子、岡部信彦：第3期・第4期麻疹風疹ワクチンにおける接種率向上に向けた自治体の取り組み. 第13回日本ワクチン学会. 北海道札幌市. 2009年9月26-27日

33) 荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、岡部信彦：OPV 接種後のポリオウイルスの排出―経時的血清型別ポリオウイルスゲノムの検出―. 第13回日本ワクチン学会. 北海道札幌市. 2009年9月26-27日

34) 伊藤健一郎、山﨑貢、成松浩志、倉園貴至、蛭田徳昭、森屋一雄、上野伸広、野田裕之： EAggEC(aggR 陽性)株の線毛遺伝子保有状況. 第８３回日本感染症学会総会、東京新宿区、200９． ４．

35) 村上光一、江藤良樹、竹中重幸、堀川和美、吉村健清、河野喜美子、伊藤健一郎：ハトの志賀毒素 2f 産生性大腸菌保有状況と分離株の特徴. 第１４９回日本獣医学会学術集会、東京都武蔵野市、2010.３.

36) 横山栄二、伊藤健一郎: Loop-mediated isothermal amplification 法による下痢原性大腸菌の検査法. 第58 回日本感染症学会東日本地方回学術集会、東京都文京区、２００９．１０

37) 木村博一: バイオセーフティの基礎と応用. 前橋保健所研修会. 群馬県前橋市. 2009. 4.

38) 榎本美貴、谷口清州、藤本嗣人： アデノウイルス採取

におけるフロックドスワブの有用性. 第50回日本臨床ウイルス学会. 高知市、2009. 6.

39) 酒井宏治、永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、松井珠乃、網　康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎、森川　茂：水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析.第57回日本ウイルス学会.東京都、2009. 10.

40) 浜本いつき、山口展正、多屋馨子、佐藤　弘、藤本嗣人、岡部信彦:インフルエンザウイルスの検出法ならびに検出部位に関する臨床的検討.第57回日本ウイルス学会.東京都、2009. 10.

41) 金子久俊、石古博昭、藤本嗣人、青木功喜、大野重昭、錫谷達夫:日本の流行性角結膜炎患者から分離された中間型ヒトアデノウイルス株の全塩基配列解析. 第57回日本ウイルス学会. 東京都、2009. 10.

42) 藤本嗣人、小長谷昌未、谷口清州、榎本美貴、岡部信彦：改良した高速 PCR システム(HyperPCR)とそのアデノウイルス診断への適用. 第58回日本感染症学会東日本地方会総会. 東京都. 2009. 10.

43) 小長谷昌未、藤本嗣人、谷口清州、榎本美貴、岡部信彦：改良した超高速PCRシステム(Hyper-PCR)によるアデノウイルス高速・高感度同定. 第10回日本アデノウイルス研究会. 東京都. 2009. 10.

44) 藤本嗣人、小長谷昌未、山口展正：耳鼻科を受診した母子の上咽頭からアデノウイルス1型, 5型重複感染が検出された症例について. 第10回日本アデノウイルス研究会. 東京都. 2009. 10.

45) 山口展正、藤本嗣人、小長谷昌未： 耳鼻咽喉科的見地からの上咽頭のアデノウイルス所見　preliminary study.第10回日本アデノウイルス研究会.東京都.2009. 10.

46) 金子久俊、青木功喜, 大野重昭、藤本嗣人、石古博昭、錫谷達夫:　日本の流行性角結膜炎患者から分離された中間型ヒトアデノウイルス株の全塩基配列解析. 第 10回日本アデノウイルス研究会. 東京都. 2009. 10.

47) 藤本嗣人, 山下和予：アデノウイルス感染症サーベイランス.第10回日本アデノウイルス研究会.東京都.2009. 10.

Ⅲ. その他

1) 佐藤　弘、北本理恵、新井　智、山本久美、多屋馨子：ブタの日本脳炎HI抗体保有状況調査（速報）. 第1報：2009.7.8－第17報：2009.11.13.
[http://idsc.nih.go.jp/yosoku/JEmenu-sw.html]

2) 佐藤　弘、北本理恵、多屋馨子：流行シーズン前インフルエンザ HI 抗体保有状況調査（速報）. 第 1 報：2009.11.30－第4報：2010.2.5.
[http://idsc.nih.go.jp/yosoku/Flumenu.html]

3) 佐藤　弘、北本理恵、山本久美、新井　智、多屋馨子：ポリオ、インフルエンザ、日本脳炎、風疹、麻疹、百日咳、ジフテリア、破傷風の抗体保有状況および予防接種状況[http://idsc.nih.go.jp/yosoku/index.html].

4) 多屋馨子、佐藤弘、前田明日香、岡部信彦、高崎智彦、倉根一郎、厚生労働省結核感染症課：日本脳炎Q&A第2版
[http://idsc.nih.go.jp/disease/JEncephalitis/QAJE02.html]

２０．エイズ研究センター

センター長　山 本 直 樹

概　要

エイズ/HIV の感染拡大はとどまるところを知らず、その矛先は当初の欧米やアフリカから次第に最大の人口と地域を有するアジアにも及んできた。我が国でも今後の感染拡大は大いに憂慮すべき状況にある。

平成 11 年 10 月にいわゆるエイズ予防指針が策定され、わが国のエイズ対策の抜本的見直しと新方針が打ち出された。爾来、当センターはわが国のエイズ対策研究のための中核としての役割を果たしてきた。活動は大きく、施策的なものとワクチン開発や HIV 感染症の特効薬開発という研究要素の強いものに分けられるが、いずれもわが国における HIV 感染者やエイズ患者の QOL の向上、新規感染拡大の防止を第一の、そしてその成果を国際誌上で発信することで世界のエイズ、HIV 問題に貢献することを最大の目標に置いてきた。

HIV の感染予防研究に関しては、とくに BCG 及びその増殖性において２種の異なるワクシニアウイルスをそのベクターとして用いた prime/boost ワクチンに力を注ぐほか、ユニークな糖鎖変異ウイルスによる効果的な生ワクチンを用いて、防御免疫のパラメーターを探り、臨床応用可能なワクチン開発の道を強力に探っている。また HIV の多様性に対応可能な中和抗体の誘導の研究さらには粘膜免疫の誘導の研究に力を傾注している。一方、治療の面からは、HAART の効果には目覚しいものがあり、感染者に大きな希望を与えている。しかし、そのコスト、慢性毒性、さらには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。このため耐性の起こりにくい薬剤開発にも力を注いでおり、今までにないような作用機序、とくに宿主因子を標的とした新たな抗 HIV 薬の開発が待望されている。さらに 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、感染予防のためのワクチン研究とともに、感染固体からのその根絶に向けた研究も重要である。一方、アジア、とくに中国やインドがエイズ/HIV の感染拡大において中心の場となりつつある現状で、すでに高い評価を受けている当センターのアジアの分子疫学研究を推し進めてきた。

HIV 感染及び診断検査については、方法の標準化とその精度管理において、これまでどおりわが国の中心的役割を果たすことになる。センター独特のウイルス分子クローンはその目的に大きな力となっている。また、感染者の治療については、直接あるいは間接的に感染者に還元できるような研究を推進している。その大きな柱の一つとして HAART を受けている患者の薬剤耐性モニタリングと耐性発現を抑える治療法の研究を行っている。

当センターはまた、国際協力機構(JICA)のアジアやアフリカにおけるエイズプロジェクト等にも積極的に協力してきた。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。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ており、我が国エイズ研究の中核となっている。

人事では、草川 茂主任研究官と藤野真之研究員が休職（平成 21 年 4 月 1 日付、期間は平成 24 年 3 月 31 日まで）し、任期付研究員として西真由子（4 月 1 日付、任期は平成 22 年 3 月 31 日まで）と、竹村太地郎（10 月 1 日付、任期は平成 24 年 9 月 30 日まで）が採用された。石川晃一主任研究官は平成 21 年 1 月 1 日より休職中である（平成 22 年 3 月 31 日まで）。また、椎野禎一郎主任研究官が感染症情報センターに配置換（エイズ研究センターに併任）（5 月 1 日付）、梁 明秀第 1 研究グループ長が横浜市立大学教授として転出した（7 月 31 日付）。平成 22 年 3 月 31 日には武部 豊第 1 室長が定年退官、平成 13 年 8 月 1 日よりセンター長をつとめた山本直樹が退職した。

当センターの運営に当たっては宮村達男所長、渡邉治雄副所長、佐多徹太郎感染病理部長、岡部信彦感染症情報センター長、濵口 功血液・安全性研究部長、佐藤裕徳病原体ゲノム解析研究センター第 2 室長、保富康宏医薬基盤研究所霊長類医科学研究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第 3 室の村山から戸山への移転などで多少の改善がみられたものの、研究スペースの確保

と統合は悲願のままいまだ達成されておらず、依然として最重要課題のひとつとなっている。

業績

調査・研究

I. エイズワクチンの開発

1. 組換え BCG ベクターを用いたエイズワクチン開発

(1) コドン至適化組換え BCG と組換えワクシニア DIs のプライムブーストワクチンの SIV 感染防御能評価

コドン至適化を施して抗原発現が約 10 倍増強された rBCG-SIVgag をプライミングに用い、同じ抗原を発現する rVaccinia DIs で２回ブーストしたサルは、２回目のブーストから３年後の SIVmac 239 high dose 経粘膜チャレンジに対して顕著な recall response を示し、少なくとも３年間はメモリーT 細胞を維持できることが判った。この群のサルは、ナイーブコントロールと比較してセットポイントでの血中ウイルス量は 100 倍弱程度抑制され、リンパ節での effector memory T 細胞の loss も抑制されていたことから、これまでに例を見ない長期間のワクチン効果が確認できた。

［網 康至（動物管理室）、兼清 優（米国 NIH）、松尾和浩、本多三男（米国 NIH）、山本直樹］

(2) 組換え BCG における HIV-1 Gag 抗原発現の最適化

コドン至適化は BCG ベクターの免疫原性を高めるのに有効な方法だが、発現レベルが BCG 菌体にストレスがかかるまでに上昇してしまうと、プラスミドを排除してしまう傾向にある。昨年度開発した多コピー変異プラスミドを用いると、BCG においてコドン至適化に匹敵する Gag 発現増強効果が得られる上に、菌体内でプラスミドも安定に保持されていることがわかった。さらに分泌発現型のコンストラクトでは、菌体外への Gag 分泌量が野生型では生育がプラトーに達すると速やかに減少するのに対して、変異型プラスミドでは一定の分泌量を維持しており、Gag 抗原が安定に分泌されることが明らかになった。このベクターは、実用化上極めて有用なツールになるものと期待される。今後、得られた Gag 高発現株の in vivo での免疫原性評価を行う。

［横溝香里、堀端重男、松尾和浩、山本直樹］

(3) BCG における HIV-1 Env 高発現系確立の検討

これまでの HIV-1 *env* 遺伝子の BCG での発現の検討から、gp160 や gp140 型を安定に可溶性蛋白質として発現させることは難しいが、Tat 分泌シグナル *blaF* 遺伝子につないだ *gp120* 遺伝子は、分泌はされないものの BCG 菌体内で安定して発現することが明らかとなっている。今回 *gp120* 遺伝子を *alpha* 抗原遺伝子及び *mpb64* 遺伝子由来の Sec 分泌シグナルにつないで BCG に導入し、Env 抗原の発現及び安定性の比較･検討を行った。その結果、*mpb64* 分泌シグナル遺伝子に繋いだ場合は gp120 抗原発現株を得られず、*alpha* 抗原分泌シグナルにつないだ場合は発現株が得られたものの、7H9 液体培地で再培養を行うと gp120 抗原の発現が減弱してしまい、*blaF* シグナルに勝るコンストラクトは得られなかった。分泌シグナルの選択が重要と考えられるので、今後は BCG 由来の Tat 分泌シグナルを標的として *gp120* 遺伝子をつなぎ、菌体外に Env 抗原を分泌する株の作製を目指す。

［堀端重男、横溝香里、松尾和浩、山本直樹］

2. 多様な HIV に有効なエイズワクチンが誘導する防御免疫

主要 HIV-I には 10 種類以上のサブタイプ、組み換えウイルスが存在し、感染地域では複数のサブタイプ、組み換えウイルスが流行している。ワクチン開発研究の課題のひとつは、これらの異なるサブタイプに対し有効な防御免疫を解明することである。我々は、その候補として、糖鎖修飾変異生ワクチンが誘導した防御免疫について、サブタイプが異なる SIVsmE543 チャレンジ感染を行ったアカゲザル 11 頭について解析した。チャレンジ感染後 2 週前後に約半数の個体でワクチンウイルスまたはチャレンジウイルスの一過性の増殖が見られたが、感染後 4 週から 10 週までは、すべてのサルにおいて血中ウイルス量は検出限界以下に抑制された。しかし慢性期において感染制御は二つのパターンに分かれた。7 頭では 80 週以上の期間で感染制御は維持されたが、4 頭では感染後 40 週前後にウイルス感染が上昇した。3 頭ではワクチンウイルスとチャレンジウイルスとの組み換えウイルスが、1 頭ではチャレンジウイルス由来の変異ウイルスが増殖していた。これらの変異ウイルスの共通する性質として gp120 はチャレンジウイルス由来であり、感染後 60 週以降ではほとんどの感染ウイルスにおいて N 型糖鎖の増加が確認された。感染制御した 7 頭に誘導された防御免疫を調べるために CD8 抗体を投与し CD8+細胞を一時的に消失させた。その結果、2 頭では SIV 感染の上昇はなく、チャレンジ感染がウイルス接種直後に防御されていたことが確認された。残り 5 頭では CD8+細胞の消失と同時に一過性の高いウイルス増殖が起こった。これらの結果から、慢性期では CD8+細胞が感染制御において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。その役割のひとつとして組み換えウイルス出現の原因となる重感染

の抑制に働いていることが推測された。
［渡辺 哲、森 一泰］

3. 三次元構造をとった HIV-1 envelope の部分ペプチドを用いた中和抗体の誘導

長年の研究にもかかわらず HIV-1 vaccine は未だに開発されていない。近年の研究の進歩により HIV-1 感染を効率良く抑制する抗体は HIV-1 の envelope タンパク質の立体構造を認識していることが発見された。HIV-1 の envelope タンパク質はウイルス上では三量体を形成することが分かっている。そこで我々は HIV-1 envelope の部分ペプチドに 3 量体構造をとらせ、それを免疫原とすることで、立体構造認識中和抗体の誘導をこころみた。

合成された三量体ペプチドと単量体ペプチドをマウスに免疫するとそれぞれを認識する抗体が誘導された。誘導された抗体の中和活性を調べたところ、三量体を免疫原として導入したマウスより得られた血清は単量体を免疫原として導入したマウスより得られた血清よりも強い HIV-1 中和活性を示した。以上のように我々は新たな三量体構造をとる免疫原を使用するワクチンの有用性を示した。今後、このコンセプトを用いたワクチンの開発が期待される。
［中原 徹（東京医科歯科大学）、野村 渉（東京医科歯科大学）、大庭賢二、村上 努、玉村啓和（東京医科歯科大学）、山本直樹］

II. HIV 感染症の薬剤耐性と治療に関する研究

1. 数珠多クローン遺伝子高速解析法の開発及び潜在的薬剤耐性HIV発掘調査

未治療 HIV 感染者の中にも存在が予想されている薬剤耐性 HIV、すなわち潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査を目的として、平成２０年度までに、耐性遺伝子超高感度定量法を開発した。この方法は絶対的定量法ではなく演繹的定量法であり、そのためいくつかの課題がある。この課題を克服するには、演繹的定量結果を絶対的定量結果で検証する必要がある。既存の絶対的定量法である多クローン遺伝子解析法での検証は、膨大な時間と費用を要する。まずその効率化のための数珠多クローン遺伝子高速解析法の理論設計を行った。本法は職務発明として認定された（感染研発第６９−４号:平成２２年２月１８日）。特許出願準備中のため概略は割愛する。この方法により、現時点では既存の多クローン遺伝子解析法に比較して１０倍の効率化が達成されている。今後、この絶対的定量法を用いて最初の目的である検証を行うと同時に、本法自体が潜在的薬剤耐性 HIV 発掘調査の主法となる可能性について検討する。
［仲宗根正、武田 哲、阪井弘治］

2. 酵素活性を指標とした HIV プロテアーゼ薬剤耐性新規検査法の開発

我々は、分子相互作用を高速検出できるアルファスクリーン法とコムギ無細胞翻訳系を組み合わせることで、HIV プロテアーゼ(PR)が基質を切断する活性に基づいて PI 耐性を迅速に評価できる新規検査法(CF 法)の開発を試みた。まず、無細胞合成した NL4-3 PR と薬剤耐性 PR について、4 種の PI(indinavir, atazanavir, amprenavir, darunavir)による活性阻害を測定し、ウエスタンブロット法により解析した基質切断パターンと比較した。CF 法によって得られた IC_{50} がウエスタンブロット法による解析結果とよく一致し、さらにそれらが GT 法と良く一致することを確認した。また 25 検体について従来の検査法との比較解析を行った結果、CF 法と PS 法が最もよく一致し（52%）、続いて CF 法と GT 法（49%）、PS 法と G 法（39%）の順であった。
［正岡崇志（名古屋医療センター、エイズ予防財団リサーチレジデント）、杉浦 亙、澤崎達也（愛媛大学）、松永智子（愛媛大学）、遠藤弥重太（愛媛大学）、巽 正志、山本直樹、梁 明秀］

3. 抗 HIV-1 療法を受けている HIV/AIDS 患者の薬剤耐性モニタリング

我々は平成 8 年度より適切な抗 HIV-1 治療実現のための支援事業として、薬剤耐性 HIV-1 検査を実施してきた。薬剤耐性遺伝子検査の結果は約 3 週間で主治医に報告され、治療薬剤選択の指標として活用されてきた。解析を行った検体は平成 22 年 3 月の時点で累積 8295 検体に達している。尚、平成 18 年度からは薬剤耐性遺伝子検査が保険収載されたため、検査は民間の検査会社にゆだねられることになり、我々のところで実施する検体は、精査を目的とするもの、経済的な理由により検査が困難なもの、そして次項に述べる疫学調査を目的としたものに限られるようになった。このため平成 18 年度以降は保険収載前と比較して解析検体数は大幅に減少した。保険収載により検査へのアクセスが容易になったのとは反対に薬剤耐性 HIV の遺伝子情報の収集は困難となった。この点を補うために平成 19 年度より新たにアンケート調査を主体とする情報収集を開始し、わが国における薬剤耐性 HIV の状況把握を開始した。平成 21 年度は各地の拠点病院等における抗 HIV 療法の現状と薬剤耐性に関連するアンケート調査を実施した。調査を依頼した 377 施設

中、回答を得た 211 施設(回収率 56%)における通院症例数は 9040 名、総服薬症例数 6296 名(通院症例数の 69%)、そのうち新規 ARV 使用症例数は 280 症例(通院症例数の 4.4%)だった。この 280 症例における新規 ARV の使用理由は、副作用による変更が 125 症例(新規 ARV 症例中 44.6%)、ウイルス学的失敗による変更が MDR 群で 97 症例(34.6%)、その他の理由による変更 31 症例(11.1%)、初回使用 24 症例(8.6%)、不明 3 症例であった。

［杉浦 亙、宮崎菜穂子、三浦秀佳、山本直樹、服部純子(名古屋医療センター)、岩谷靖雅(名古屋医療センター)］

4. 新規 HIV/AIDS 診断患者の動向調査

HAART が普及した今日、HIV/AIDS に新たに感染し、治療前にもかかわらず既に薬剤耐性を獲得している症例が世界各国で報告されており、その頻度は 10-20%ともいわれている。日本では新規 HIV 感染者数およびエイズ患者数報告数が年々記録を更新する勢いで増加しており、また治療を受けている患者数も増加を続けている。このことから本邦においても新規 HIV/AIDS 診断確定未治療患者への薬剤耐性 HIV の拡大が大きな関心をもたれている。我々は 2003 年から 2009 年にかけて全国の治療拠点病院、衛生研究所等の協力のもとに新規 HIV/AIDS 診断患者を対象に耐性検査を実施した。薬剤耐性検査ではプロテアーゼおよび逆転写酵素領域を、サブタイピングでは *env* C2/V3 領域を RT-PCR にて増幅し、その配列解析を行った。対象症例は 2003 年：273 例、2004 年：306 例、2005 年：429 例、2006 年：457 例、2007 年：482 例、2008 年：626 例、2009 年：617 例であった。いずれの年においても調査対象となった症例は 30-40 歳代の男性が中心で（>90%）、感染経路は同性間性的接触が 65-72%を占めていた。サブタイプは、いずれの年も 70%以上が B であり、次いで CRF_01AE であった。また少数ながらサブタイプ A、C、AG、G も観察された。薬剤耐性症例の頻度は 2003 年：5.9%、2004 年:5.4%、2005 年：8.0%、2006 年：7.0%、2007 年：9.9%、2008 年：8.3%、2009 年：8.6%であった。クラス別に見るとヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤耐性の頻度は 2003 年：4.0%、2004 年：4.0%、2005 年：5.0%、2006 年：5.2%、2007 年：5.7%、2008 年：3.7%、2009 年：3.5%であった。非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤では 2003 年:0.4%、2004 年:0.7%、2005 年：0.5%、2006 年：0.7%、2007 年：0.8%、2008 年：1.3%、2009 年：0.7%、同プロテアーゼ阻害剤では 2003 年：1.5%、2004 年：0.7%、2005 年：2.6%、2006 年：1.6%、2007 年：3.3%、2008 年：3.8%、2009 年：4.3%であった。

［杉浦 亙、鈴木寿子、三浦秀佳、西澤雅子、山本直樹、服部純子(名古屋医療センター)、岩谷靖雅(名古屋医療センター)、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)］

5. CRF01_AE（サブタイプ E）のプロテアーゼの結晶構造解析と数理モデル解析

従来の薬剤耐性研究はサブタイプＢを中心に行われてきが、これにより得られてきた薬剤耐性に関する知見がそのまま non-B サブタイプにも当てはめることができるのか明確ではない。我々はいままでに CRF01_AE ではネルフィナビルに対する耐性変異が異なっておりサブタイプ B で主に観察される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てきた。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平成 21 年度は活性型のプロテアーゼの結晶構造解析に取り組んだ。HXB2, NH1, NH1- L10F, NH1- N88S, NH1- L10F/N88S 各々のプロテアーゼの精製を行い、nelfinavir もしくは darunavir と結合させて結晶化を行った。その結果 NH1 ではいずれの薬剤に対しても薬剤の結合が HXB2 と比して弱い事が明らかになった。この結合力の違いが獲得する薬剤耐性変異の違いに繋がっていると考えられた。

［杉浦 亙、岩谷靖雅(名古屋医療センター)、セリア・シッファー(Univ. Massachusetts)］

6. タイ流行株 HIV-1（CRF01_AE）における薬剤耐性変異獲得機序に関する研究

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。我々は、タイ流行株の GPOvir 耐性変異頻度に関するデータをタイ国 NIH と共同で平成 16 年から 17 年にかけてランパンコホートで回収された GPOvir 脱落症例 64 例について Gag, protease、RT 全域の遺伝子配列解析を行い、薬剤耐性遺伝子の獲得パターンについて解析を行った。対象症例中には初回治療症例だけでなく過去に NRTI 単剤投与などの治療履歴をもつ既治療症例が含まれていたが、既知症例では初回治療症例に比して高い頻度で耐性変異が観察された。また観察された耐性変異のパターンも既治療症例では過去に暴露した AZT による耐性変異を呈する事が多かったのにたいして初回治療症例では AZT 関連変異は殆ど観察されなかった。

［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)、吉田レイミント(長崎大学熱

帯医学研究所)、有吉紅也(長崎大学熱帯医学研究所)、松田昌和(三菱化学メディエンス株式会社)、杉浦 亙]

7. インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析

多剤耐性を獲得した HIV/AIDS 症例ではインテグラーゼ（IN）領域の遺伝的多様性が高い傾向にある。これらの多様性が IN 阻害剤ラルテグラビル（RAL）の効果および RAL 耐性獲得に及ぼす影響について検討した。多剤耐性 3 症例（SHIN-1～3）について HXB２の IN と置換して組み換えウイルスを、さらに RAL 耐性変異 148K，148R，148H，155H，148K＋155Hを導入し耐性クローンを作成した。クローンの感染性と増殖能は MT-2 細胞、薬剤感受性は R5MaRBLE 細胞を用いて評価した。MT2 感染実験において耐性クローンはいずれも野生株よりも増殖能力の低下が認められた。RAL に対する感受性は HXB2、SHIN-2 の耐性クローンでは野生株より 14~72、14~190 倍の IC_{50} 値を示した。以上より SHIN-2 株が有する IN 領域の遺伝的多様性は RAL の耐性レベルを引き上げる方向に働くことが示唆された。

[鈴木寿子、服部純子(名古屋医療センター)、村田大吾(名古屋医療センター)、三浦秀佳、伊部史朗(名古屋医療センター)、藤野真之、西澤雅子、山本直樹、杉浦 亙]

8. 高感度薬剤耐性検査法を用いた新規未治療患者における微少集族薬剤耐性 HIV 検出の試み

定量 PCR を応用した高感度薬剤耐性検査法(高感度法)を用いて新規未治療 HIV/AIDS 症例中の微少集族(minority population)薬剤耐性変異の検出を試みた。逆転写酵素阻害剤耐性変異の M41L、K65R、K70R、K103N、Y181C、M184V、T215Y/F の 8 変異(CRF01_AE では K65R を除く 7 変異）を解析対象とした。国立病院機構名古屋医療センターで 2009 年 1 月～12 月までに回収された新規未治療 HIV/AIDS 症例 98 例(Subtype B 93 症例、CRF01_AE 5 症例)を解析した結果、ダイレクトシーケンス法(従来法)では検出できなかった minority population として患者血漿中に存在する K65R、K70R、K103N、T215L を 1 例ずつ検出した。薬剤耐性変異の検出率は従来法のみで薬剤耐性検査を行った場合の 5.4%から 9.7%に上昇した。T215L の定量 PCR amplicon のシーケンスを解析した結果、T215L にリンクした薬剤耐性変異は認められなかった。

[西澤雅子、服部純子(名古屋医療センター)、Jeffrey Johnson(米国疾病対策局)、Walid Heneine(米国疾病対策局)、杉浦 亙]

9. 高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微少集族薬剤耐性 HIV の動態と HAART 治療効果との相関についての研究

薬剤治療を受け、多剤耐性に陥った HIV/AIDS 症例のサンプル中に minority population として存在する薬剤耐性変異を高感度法によって解析した。ダイレクトシーケンシング法（従来法）で複数のクラスの抗 HIV 薬剤にたいする耐性変異が複数確認され多剤耐性と判定された 13 サンプル(サブタイプ B 10 サンプル、CRF01_AE 3 サンプル)について、minority population の薬剤耐性 HIV の検出を試みた。その結果サブタイプ B 10 サンプル中 2 サンプルから従来法では検出できない minority population として存在していた T215Y を、CRF01_AE 3 サンプル中 1 サンプルから K70R を検出した。また 1 年以上の長期に渡って HAART を受けていた HIV/AIDS 3 症例について、各薬剤耐性検査ポイントの解析を行い minority population の薬剤耐性 HIV の経時的動向について調査した。その結果、3 症例中 2 症例から高感度法のみで検出される minority population の薬剤耐性 HIV(Y181C、K103N)が検出された。うち 1 症例では Y181C が minority population として 1 年以上存在していた。

[西澤雅子、Jeffrey Johnson(米国疾病対策局)、Walid Heneine(米国疾病対策局)、杉浦 亙]

10. HIV-1の逆転写酵素が持つRNase H活性に対する特異的阻害剤の開発

HIV-1が持つ酵素の中で阻害剤が開発されていない唯一の酵素活性として、逆転写酵素に内在するRNaseH活性がある。我々はHIV-1の逆転写酵素が持つRNase H活性を特異的に阻害する小分子化合物の開発を試み、これまでにRNase H活性を特異的に阻害する小分子化合物の基本化学構造として 5-Nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester (NACME)を同定した。電算機的解析を行ったところ、NACME誘導体がRNase Hの活性中心に位置する保存されたヒスチジン593残基、2 つのマグネシウムイオン、セリン499残基の側鎖水酸基、グルタミン475残基のアミド基に配位することにより酵素活性を阻害すると推測された。中でもセリンとグルタミン残基との相互作用による薬剤−酵素相互作用の安定化はこれまでに報告されているRNase H阻害剤と異なることから、NACME誘導体を改変することにより優れたRNase H阻害剤を開発し次世代抗エイズ薬として供する事ができるかもしれない。

[駒野 淳、浦野恵美子、市川玲子、村上 努、柳田浩志(千

葉大学)、松元輝礁(千葉大学)、星野忠次(千葉大学)、山本直樹]

11. HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgMクローンの分離

CD4分子を認識する自己反応性抗体が健常人の約0.5%やHIV-1感染者の10-30%に検出されることが報告されている。CD4はHIV-1受容体であるため、CD4反応性抗体はHIV-1感染を抑制し、HIV-1感染抵抗性やHIV-1感染症の病期遅延に関与すると考えられている。しかし、ヒト由来CD4反応性抗体クローンによるHIV-1複製抑制能はこれまで検証されていない。我々はHIV-1非感染健常人ドナーの末梢血単核球からEBVで不死化したB-LCLを樹立し、その中からCD4反応性IgMクローンを分離した。末梢血B細胞に占めるCD4反応性抗体産生細胞の占める割合は約0.0013%(1/7.7x10e5)であった。遺伝子解析の結果、抗体はいずれもIgMクラスで、VHとVL遺伝子はそれぞれ生殖細胞のVH3-33/L6, VH3-33/L12, VH4-4/L12に相当し、いずれも体細胞超変異を伴っていた。H0538-213クローンは末梢血単核球におけるHIV-1 JR-FL株の複製を1-2.5μg/mlで抑制した。(本研究はヒト由来CD4反応性抗体をクローニングしたと同時に、IgM抗体クローンが抗HIV-1活性を持つことを実証した世界初の報告でもある。)ヒトCD4反応性自然抗体の一部がHIV-1感染抵抗性およびHIV-1感染症の病期進行を規定する要因となる可能性が示唆された。H0538-213によるHIV-1感染阻害機構を明らかにすることによりウイルス侵入時における未知のウイルス—宿主相互作用を明らかにできる可能性がある。健常人由来CD4反応性抗体はHIV-1感染症の治療用抗体医薬としても有用かもしれない。

[駒野 淳、浦野恵美子、濱武牧子、前田史子(東海大学)、長塚靖子(理化学研究所)、竹腰正隆(東海大学)]

12. エイズウイルスのコレセプターCXCRの細胞表面発現制御に関する研究

HIV-1の細胞侵入を媒介する受容体はCD4とCXCR4またはCCR5である。我々はCXCR4の細胞表面発現がどのように制御されているかを遺伝的に解析した。CXCR4のC末端細胞質側ドメインのC末端側から10番目までのアミノ酸を欠落させることにより、細胞表面に発現するCXCR4のレベルが増大することを見出した。しかし、6番目のアミノ酸を欠落させても細胞表面の発現レベルは野生型と同様であった。さらに10番目までのアミノ酸欠損により、CXCR4のhomotypic相互作用が減弱した。恒常的細胞表面レベルだけでなく、リガント依存的な細胞表面レベルの減少効率も低下した。この現象はT細胞を用いた一過性の発現システム及び、恒常的な発現システムにて同様に観察された。近年、免疫学的異常を示す遺伝性疾患として知られるWHIM症候群の原因がCXCR4の細胞質側ドメインの欠落であることがわかってきた。WHIM症候群のリンパ球はCXCR4のリガンドに対する反応性が昂進しており、細胞表面のCXCR4レベルも増加していることが報告されている。我々の研究により、WHIM形質を規定している遺伝的要素がCXCR4のC末端の特定の4アミノ酸であることが示唆された。この遺伝子的要素が機能するメカニズムを明らかにすれば、HIV感染症だけでなく、WHIM症候群の治療法を開発することも可能になるかもしれない。

[駒野 淳、宮内浩典、浦野恵美子、二橋悠子、青木 徹、濱武牧子、山本直樹]

13. 経口投与可能な CXCR4 阻害剤の研究・開発

CXCR4 は HIV-1 の主要なコレセプターの一つであり、そのアンタゴニストは新しい作用機序を有する抗 HIV-1 剤の候補として期待されている。私達は、新規 CXCR4 アンタゴニスト KRH-3955 が経口投与可能で、in vitro、hu-PBL-SCID マウスモデルの両方で高い抗 HIV-1 活性を示すことを見出した。平成 21 年度は、CXCR4 阻害剤 KRH-3955 を用いて異なる Donor からの PBMC への感染防御活性の比較、その持続的阻害活性について検討した。また、平成 18 年秋に開始した KRH-3955 と KRH-3148 を用いた PM1/CCR5-NL4-3 の感染系による薬剤耐性誘導実験はそれぞれ培養開始時の約５倍、約３５倍の薬剤耐性ウイルスが得られており、それらの Env 領域に蓄積された変異を解析中である。

[村上 努、竹村太地郎、冨田香織、熊倉 成(クレハ)、山崎 徹(クレハ)、前田洋助(熊本大学)、山本直樹]

14. HIV-1 マトリックスタンパク質（MA）を標的としたペプチド阻害剤の開発

HIV-1Gag 蛋白質の構成成分であるマトリックス蛋白質（MA）の部分ペプチドに細胞膜透過性を付与して細胞内に導入することにより、HIV-1 のウイルス蛋白質同士やウイルス蛋白質と宿主因子の相互作用に影響を与え、その結果 HIV-1 の複製を阻害できるか否かを検討した。HIV-1NL4-3 の MA 全長の 132 アミノ酸について、５残基ずつオーバーラップさせながら 15 残基の部分ペプチドライブラリーを設計した。細胞膜透過性を付与するため、膜透過性配列であるオクタアルギニン配列を各ペプチドの C 末端に付加した。コントロールペプチドとして

C 末端のシステインをキャッピングした部分ペプチドライブラリーも同時に作製した。これら計 26 種の部分ペプチドライブラリーについて細胞毒性（MTT 試験）と抗 HIV-1 活性（MTT 試験または培養上清中の HIV-1CA(p24)ELISA）を評価した。X4HIV-1 である NL4-3 を MT-4 細胞に感染させる試験、R5HIV-1 である NL(AD8) または JR-CSF を PM1/CCR5 細胞に感染させる試験の両方において micro M のオーダーでウイルス複製を顕著に阻害する部分ペプチドを見出した。現在、ウイルス複製阻害の作用機序を解析中である。また、細胞膜透過性を付与したペプチドが実際に細胞内に導入されたか否かもペプチドに蛍光色素を付加して検証予定である。今後は、活性を示した配列を基にペプチドライブラリーを再構築し、より高活性なペプチドの構築を目指したい。

［村上 努、小森谷真央（東京医科歯科大学）、野村 渉（東京医科歯科大学）、鳴海哲夫（東京医科歯科大学）、玉村啓和（東京医科歯科大学）、山本直樹］

III. HIV の分子疫学ならびにウイルス学的研究

1. 我が国における MSM 流行の比較分子疫学

わが国における新規感染者の 70%近くが同性間性接触(MSM)によるものと推定され、わが国における HIV-1 感染症拡大の最も重要な動因となっている。われわれは、わが国における MSM 流行が世界とりわけ近隣アジア地域の流行と比較して、どのような特徴と差異があるのかに関して、分子疫学的視点からの分析を試みた。その結果、わが国における MSM 流行は基本的に欧米由来の HIV-1 サブタイプ B によるものであるが、このような特徴は予測に反して、アジアの多くの先進工業国とも異なり、1980 年代に欧米の MSM 感染者から流入したと推定されるサブタイプ B が、わが国においては依然として強いファウンダーとなって流行が進行していることが見出された。同様な特徴をもつのは近隣では韓国のみで、その他の地域では、地域（の異性間感染者）の流行を大きく反映する形となっている。今後、ボーダーレス化がさらに進む現在、わが国においても流行像が急変する可能性がありうると考えられる。

［長谷彩希、上西理恵、廖 華南、草川 茂、武部 豊、高山義浩（長野県エイズ拠点病院ネットワーク）、四本美保子（長野県エイズ拠点病院ネットワーク）、高橋 央（長野県エイズ拠点病院ネットワーク）、斎藤 博（長野県エイズ拠点病院ネットワーク）、人見重美（筑波大学附属病院感染症科）、Chin-Yih Ou（Global AIDS Program-China,米国 CDC-北京）］

2. アジアにおける第 4 の CRF01_AE およびサブタイプ B'間の新規組換え型流行株(circulating recombinant form, CRF) の同定とその解析

HIV-1 サブタイプ B' と CRF01_AE は、タイを中心とする東南アジア地域の流行形成に重要な役割をもっている。両ウイルスは 90 年代初め以来、20 年近くにわたってこれら地域に流布しており、両ウイルス間の組換えによる 3 種の組換え型流行株 (CRF) ［CRF15_01B, CRF34_01B（タイ）および CRF33_01B（マレーシア）］が見出されている。われわれは、マラヤ大学エイズ研究 COE (CERiA)との共同研究によって、マレーシア東部の IDU から得た検体 から新しいタイプの CRF48_01B を見出した。CRF48_01B は、先に同定されていた CRF33_01B と極めて近縁な組換え構造をもち、組換え点の 1 個を共有しており、また系統関係および共通祖先年代 (time of the most recent common ancestor, tMRCA) (CRF33_01B=~1993; CRF48_01B=~2001) の解析から、CRF48_01B は CRF33_01B を直接の祖先とする第 2 世代の CRF であることが推論された。このような ancestor-progenitor 関係がさまざまな角度から確証されたはじめての例と考えられる。われわれの解析結果は、またマレーシアがミャンマー、中国雲南省西部地域と並んで、サブタイプ間の様々な組換えウイルスが新生している新たな geographic recombination hotspot であることを示唆する。

［Yue Li, Kok Keng Tee、廖 華南、上西理恵、長谷彩希、Xiaojie Li、草川 茂、Adeeba Kamarulzamen（マラヤ大学医学部）、武部 豊］

3. HIV-1 サブタイプ B'の起源とその伝播の時間的・空間的ダイナミックスに関する研究

HIV-1 サブタイプ B'は東南アジア地域の経血液流行の原因ウイルスとして重要なサブタイプ B の地域ヴァリアントである。B'はタイついで近隣の東南アジア諸国の注射薬物乱用者 (IDU)に流布するウイルス株として見出されたが、ついで 1990 年代はじめから中頃に起こった中国内陸部のプラズマ供血経験者 (FPD)間の爆発的エイズ流行の引き金となったことが明らかにされている。われわれは、最新のデータ解析技術を用いて、東南・東アジア地域におけるサブタイプ B'播種の集団別特徴に関する解析を行った結果、FPD 間に流布する B'流行株 (B'-FPD)は、東南アジア地域の IDU 流行形成に係った B'流行株 (B'-IDU)とは明確に区別されるクラスターを作り、共通祖先年代はそれぞれ 1991 年、1985 年と推定されることを明らかにした。このことは、FPD 流行は、先行する東南アジア地域の IDU

間の流行株に起源をもつことを強く示唆するものである。ある流行株が、異なる地域の異なる（あるいは同一の）リスク集団に播種する場合、複数種のウイルス株が時間を違えて多重に新しい集団に流入することが期待されるが、現実にはほとんど単一種のウイルスが流行のファウンディング株となる場合が多い。B'-FPD 播種は、そのような典型的な例と考えられる。その選択が、単に偶然（疫学的因子）によるのか、生物学的要因（例えば感染性の違いによる選択）によるのかは、今後の解析課題の一つである。
［Yue Li, 上西理恵、長谷彩希、Kok Keng Tee、廖 華南、Xiaojie Li、Oliver Pybus(英国オックスフォード大学)、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 CRF33_01B 感染性分子クローンの樹立

これまでアジアに地域において見出されたCRF01_AEとサブタイプB'の間の遺伝子組換えによって生起した4種の組換え型流行株 (CRF)の中で、様々な集団内に極めて広範に播種していることが明確に証明されているのは、われわれが2005年にマレーシアで見出したCRF33_01Bのみであり、その意味で重要性が高い。われわれは、CRF33_01B分離株を出発材料としてはじめて感染性分子クローンを樹立することに成功した。マレーシアはこの他、多様な組み換え株が新生しつつあることが見出されており、新規の研究ツールの整備・拡充を目指して、系統的な感染性クローンの分離・樹立を進めている。
［Kok Keng Tee、草川 茂、長谷彩希、上西理恵、廖 華南、Xiaojie Li、Adeeba Kamarulzamen（マラヤ大学医学部）、武部 豊］

2．感染性クローンの樹立と方法論の改良

著しい多様性を示す HIV-1 において分離ウイルスから迅速に感染性分子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。HIV-1 全長ゲノム増幅に用いる PCR 酵素及び Primer 設計をさらに考慮したところ従来よりも迅速に多数の感染性分子クローンを樹立することが可能になった。本年度はこの方法論をセンター第２研究グループで収集している薬剤耐性ウイルス、日赤から感染研 HIV パネル作成のため提供を受けた献血陽性検体由来分離ウイルス及び BBI 社より購入した HIV Subtype Infectivity Panel (PRD320)由来ウイルスに応用して感染性分子クローンを樹立した。
［巽 正志］

(1) In-Fusion 酵素による One-Step HIV-1 Cloning Strategy の改良

当室では現在 HIV-1 ゲノムを上流、下流に区分し One Cut 制限酵素サイトを含む Primer で増幅した後繋ぎ合わせる Half & Half 戦略による「HIV Trapping System」を用いて感染性分子クローンを樹立している。しかしながらこの戦略は One –Cut 制限酵素を見出す過程で難儀する検体も希ながら存在する。より効率的で汎用性のある樹立法を確立するため制限酵素による繋ぎ合わせを必要としない方法論として Vaccinia Virus 由来の相同組換え酵素を用いた In-Fusion Cloning 系の感染性分子クローン作成への応用を試みている。この酵素は Vector と組込む Insert に 15 塩基の相同性を認識して末端同士を結合する。HIV-1 の PBS 領域と 3’LTR の PolyA Signal 下流領域の塩基配列は多くの HIV-1 Group M で保存されている。これらの特徴を利用して作成したい HIV-1 の subtype/CRF が判明すれば、現在まで作成した感染性分子クローンから同じ subtype/CRF のクローンを選別し、Vector 側を pMT1/pMT4 の Not I サイト側を含む Primer と PBS 側で 5’LTR を含む Vector 片を用意し、標的の HIV-1 プロウィルスを 15 塩基配列が重複した PBS 領域配列と PolyA 下流領域と Vector Not I サイト領域を含んだ Primer Set で増幅し、両者を相同組換え酵素存在下で反応させる事で全長 HIV-1 クローンを樹立する方法論である。昨年度はその樹立効率は実用にはまだ低かったが、Primer 設計の改善と組換え酵素の安定性が向上したことにより樹立効率が向上した。今後さらに Primer 設計などの実験条件を精査し、HIV-2/SIV にも応用を目指す。
［巽 正志］

(2) 邦人感染者由来薬剤耐性ウイルス subtype B 感染性分子クローンの樹立と解析

昨年度まで本邦で流行している主要なウイルス株である HIV-1 subtype B と CRF01_AE 組換体の Naïve ウイルス由来感染性分子クローンの標準株を整備した。本年度は様々な薬剤耐性プロファイルを呈する耐性ウイルスの感染性分子クローンを整備する目的で、治療中の患者由来で典型的な各種薬剤耐性プロフィールを呈する薬剤耐性ウイルスから引続き標準株クローン樹立を継続している。特に新しいプロテアーゼ阻害剤として治療に用いられつつある Darnavir に対する耐性ウイルス株を含めて感染性分子クローンを作成している。これらのクローンは薬剤耐性 subtype B の解析と耐性試験標準化に有用であることが期待される。
［平野梨恵、西澤雅子、杉浦 亙、巽 正志］

(3) 未整備の subtype/CRF HIV 感染性分子クローンの樹立と解析

これまで第２室では国内で流通する HIV 感染診断キットの性能試験に資するため、著しい多様性を呈する HIV-1 グループ M の様々な subtype/CRF ウイルスの感染性分子クローンを整備してきた。国内外で流行する主要な subtype/CRF ウイルスに関しては薬剤耐性ウイルスも含めて複数クローンの樹立が成功しほぼ整備出来た状況であるが、国際交流が益々盛んになるにつれて現在では流行する HIV-1 ウイルスに国境はない。そこで未だ整備されていない subtype/CRF ウイルスの感染性分子クローンを樹立するため、欧米先進国において第４世代抗原・抗体同時測定系 HIV 感染診断キットの抗原検出性能試験に subtype/CRF の抗原標準株として頻繁に用いられているウイルス株を含む Boston Biomedica Inc.の HIV Subtype Infectivity Panel PRD320 を購入し、未だ整備されていない subtype/CRF と欧米で標準株として用いられているウイルス由来の感染性分子クローンパネルを整備することを一昨年度から開始した。PRD320 Panel member 20 株のウイルス全てについて感染性分子クローンを樹立した。全ゲノムの塩基配列決定によりその帰属を確認したところ、subtype A 2 クローン、subtype B　4 クローン、subtype C 4 クローン、subtype D　4 クローン、subtype F　4 クローン, subtype G　2 クローン、CRF01__AE 4 クローン、 CRF02__AG 4 クローン、グループ O 4 クローン及び HIV-2　2 クローンが樹立された。

［竹川奈穂、武田 哲、巽 正志］

(4) PRD320 Panel における標記 subtype/CRF と異なる組換体の検出

subtype/CRF の標準株として用いられている PRD320 Panel のウイルス 20 株について全て感染性分子クローンを樹立したが、このうち３株のウイルスは標記の subtype/CRF と異なることが示された。 PRD320-02 の Ghana 由来 I__2496 株は subtype A ではなく subtype A1 と subtype G のユニークな組換体であり、現在ガーナを含む西及び中央アフリカで蔓延する CRF02__AG とは異なる Breakpoint を示していた。このウイルス株は流行早期に分離されていることから当地では流行早期に既に様々な subtype A と subtype G の間で組換体ウイルスが生成していたことを示している。

次に PRD320-15 の Zaire 由来 BCF-DIOUM 株は subtype G ではなく subtype A1, C, G, K, 及び J の Mosaic 構造を示し CRF06__cpx の K 領域に C が組み込まれたユニークなゲノム構造を示していた。最後に PRD320-17 の Zaire 由来 BCF-KITA 株は数少ない subtype H の参照株として用いられてきたが、そのゲノム構造は subtype A1, C, G, H 及び J の複雑な Mosaic 構造を示し、subtype H に帰属する領域は僅かに vpu から env　C1/V1 領域と env C3/V4 領域のみであった。これらのウイルス株も流行早期に Zaire で分離されていることから当地では予想以上に様々な subtype/CRF が混在流行して組換体ウイルスの生成の Hot-spot であったことが示された。

［竹川奈穂、巽 正志］

3. 亜鉛フィンガー―LEDGF 融合タンパクを用いたＬＶベクターの配列特異的挿入法の開発の試み

レンチウイルス（LV）ベクターは、分裂細胞および非分裂細胞に対して高効率な遺伝子導入が可能であるが、その遺伝子発現には染色体への挿入が不可欠である。我々は LEDGF の IN 結合ドメイン（IBD）と塩基配列特異的な DNA 結合ドメインである亜鉛フィンガー（ZFP）の融合タンパク質を作製することで染色体の標的配列特異的に LV ベクターを挿入し、かつターゲット遺伝子をノックアウト可能な手法の開発を試みた。今回は CCR5 遺伝子を認識する ZFP と IBD の複合タンパク質を作製した。高感度分子間結合解析システムであるアルファスクリーン法を使用した解析系を新規に構築し、上記解析系で結合活性を検討した結果、標的配列で signal/background（S/B）比約 50 と強い結合がみられ、一塩基置換したオリゴ DNA においてはバックグラウンドとほぼ同程度のシグナルが検出されるにとどまった。次に核移行シグナルを付与した IBD-ZFP を培養細胞で発現させ、HIV IN との核内での共局在を蛍光抗体染色で確認した。本手法を応用し、HIV ゲノムを宿主染色体の致死遺伝子を標的として挿入させるなど、新規抗 HIV 療法として発展させることも可能であると考えられる。

［近藤麻美（横浜市立大学）、山本直樹、梁 明秀］

V．HIV ライフサイクルと宿主因子の研究

1. 包括的キノーム解析による HIV-1 Vpu のリン酸化調節機構の解明

今回我々は、HIV-1 の効率的な粒子産生に関与するウイルスタンパク質 Vpu について包括的キノーム解析を行い、Vpu のリン酸化の調節、および BST-2/Tetherin 依存的なウイルス粒子産生に関与する新規宿主因子の探索を行った。ヒトタンパク質キナーゼ約 400 種類を無細胞蛋白質合成系にて同時に作製し、Vpu との相互作用の有無を蛍光で検出可能な一次スクリーニング系を新規に確立した。一次スクリーニングの結果、Vpu と結合親和性を

もつ宿主キナーゼ 45 種類を同定した。二次スクリーニングにより、HIV-1 の複製を負に制御しうるキナーゼ A を同定した。Vpu とキナーゼ A は、細胞内の核近傍で共局在し、in vitro で直接的に結合した。また、キナーゼ A を過剰発現したウイルス感染細胞では、Vpu が核近傍の CD63 陽性の構造体に蓄積し、ウイルス粒子の産生が顕著に減少した。以上により、キナーゼ A は Vpu の機能的リン酸化を阻害し、BST-2/Tetherin を介した抗ウイルス活性を亢進させると考えられる。

［宮川 敬、澤崎達也（愛媛大学）、松永智子（愛媛大学）、山本直樹、梁 明秀］

2．HIV-1 Gagを遺伝的改変に根ざしたレンチウイルスベクターの改良

レトロウイルスGagタンパク質のミリストイル化はGagの細胞膜targeting・Gag集合・細胞表面への輸送・budding・感染初期過程に重要な機能を持つ。我々はGag本来のミリストイル化シグナルを失活させ、N末端にいくつかの異なる細胞膜移行シグナルタンパク質を融合させた。異種のタンパク質やGagのN末端に由来するミリストイル化シグナルをGagのN末端に融合させて、本来ミリストイル基が付加される位置よりも22アミノ酸上流部位にミリストイル化を受ける改変を施すと、ウイルスベクターの産生効率が最大10倍に増加した。改変型のGagは分子間の相互作用が強くなっていることがBRET解析により明らかになった。ウイルスプロテアーゼによるGagの限定分解が亢進していることからもGag間の相互作用が強くなったことが示される。一方、ウイルス粒子内のGag-polの取り込み効率は野生型とほぼ同じであり、ウイルス出芽におけるVPS4依存性にも変化がなかった。以上よりミリストイル化の部位を変化させることにより、Gag間の相互作用を強め、出芽と成熟効率を上げることを通じてレンチウイルスによる遺伝子導入効率を増大させることが示された。レンチウイルスベクターはヒト遺伝子治療に今後広く使用されることが期待される。ウイルスベクターの工業的産生に際し、ウイルスベクターの産生量を増大させる本技術は、治療にかかる費用と時間を大幅に減らすために役立つと期待される。

［駒野 淳、青木 徹、浦野恵美子、二橋悠子、濱武牧子、清水佐紀、村上 努、山本直樹、玉村啓和（東京医科歯科大学）］

3．T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング – SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析

HIV-1複製は多くの宿主−ウイルス相互作用のうえに成立している。HIV-1複製を制御する宿主因子の同定と作用機序の解明はウイルス学・細胞生物学的観点からも意義深い。我々はこれまでにT細胞を用いたHIV-1抵抗性遺伝子の機能的スクリーニング系を樹立し、HIV-1複製制御メカニズムに関する解析を行ってきた。我々はhPBLとRK13細胞cDNAライブラリーからウイルス複製後期過程を標的とする新たな宿主因子としてSEC14-like 1a (SEC14L1a)のC末端側を同定した。 MT-4とSupT1細胞にC末領域 (CTD1, aa642-715)を恒常的に発現させるとHIV-1複製抵抗性が再現された。SEC14L1aのC末端領域に存在するGOLDドメイン全領域を含む変異体CTD2 (aa493-715)もHIV-1複製抵抗性を示したが、全長 (FL)は抗ウイルス活性を示さなかった。FL, CTD1, 2の発現はHIV-1の感染初期過程及びLTR転写に影響を与えなかった。FLはウイルス産生効率を低下させたがCTD1, 2はウイルス産生効率を低下させなかった。CTD1, 2はウイルス様粒子へのEnv取り込み効率を減少させたがFLは増大させた。以上より、SEC14L1a CTD1, 2はウイルス粒子へのEnv取り込み効率を低下させることによりHIV-1増殖を阻害することが示唆された。一方、FLがHIV-1増殖に対する影響を示さなかった原因はウイルス産生抑制能とウイルス粒子へのEnv取り込み増加による相殺効果と推測される。SEC14L1aによるHIV-1複製制御メカニズムの解明は宿主−ウイルス相互作用の理解を深めるだけでなく新たな抗HIV-1戦略の開発にも役立つと期待される。

［駒野 淳、浦野恵美子、市川玲子、森川裕子（北里大学）、山本直樹、芳田 剛（京都大学）、小柳義夫（京都大学）］

4．Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割

HIV-1 の粒子形成に関与する宿主因子に関して最近その出芽・放出に ESCRT 蛋白質複合体が関与することが明らかになり、その詳細が解明されつつある。一方、Gag蛋白質のウイルス形成部位への輸送がどのような宿主因子によって制御されているかについては不明な点が多い。そこで私達は細胞内小胞輸送を担う Rab 蛋白質に着目し、本発表では主に Rab7 とそのエフェクター蛋白質の HIV-1 粒子形成における役割について検討した結果を報告する。

Rab7 とそのエフェクター蛋白質の一つ Rab7-interacting protein (RILP)を HeLa または 293T 細胞で過剰発現させた条件下で同時に細胞に導入した pNL4-3 の細胞内発現量やウイルス放出量をウエスタン・ブロッティングによって解析した。放出されたウイルス量はまた p24ELISA 法により、その感染価は TZM-bl 細胞を標

的細胞として測定した。Rab7 と RILP のドミナントネガティブ（DN）変異体を過剰発現させると、細胞内ウイルス蛋白質レベルとウイルス放出量（感染価）の増加が HeLa、 293T 細胞のどちらにおいても観察されたが、このウイルス蛋白質レベルの増加はGag蛋白質と比較してEnv 蛋白質でより顕著であった。これらの DN 変異体の過剰発現が Tat に依存した HIV-1LTR からの転写・翻訳の活性化を通してウイルス蛋白質レベルの増加に寄与している可能性は低いと考えられた。また、Gag 蛋白質の免疫沈降によって弱いながら RILP の共沈が観察され、これらの蛋白質間の物理的相互作用が示唆された。以上の結果は、Rab7 とそのエフェクター蛋白質 RILP が HIV-1 粒子形成に関与していることを示唆している。現在、内因性の Rab7 または RILP のノックダウンや Rab5 の HIV-1 粒子形成への影響を検討中である。

［村上 努、竹村太地郎、冨田香織、伯川冬美、駒野 淳、山本直樹］

VI. HIV 感染動物モデルの開発に関する研究

1. サル・エイズモデルを用いた抗HIV候補薬のスクリーニング

ヒト/HIV感染症の動物モデルとしてこれまでに確立したサル・エイズモデルを用いて治療候補薬剤のスクリーニングを行っている。過去２年にわたり検討してきた候補薬剤の最終評価を行った。HIV予防ワクチン戦略の次善の戦略としてPrEP (pre-exposure prophylaxis)が近年急速に検討されているが、本実験では、単回の事前内服により数週間の感染予防効果が期待できる実用的な薬剤開発を目指して、候補薬剤のサル・エイズモデルによる評価を行った。方法として感染予防内服候補薬剤としてCXCR4 拮抗剤 KRH-3955 を、陽性対照薬剤としてFTC/TDFを、評価系としてSHIV-KS661c/サル感染発症モデル系を用いた。感染陽性対照群、候補薬剤前日投与群、候補薬剤２週前投与群、対照薬剤前日及び直前投与群、対照薬剤２週前投与群、以上５群(各群３頭、薬剤は全て経口投与)に対してSHIV-KS661cを経直腸的に攻撃接種した。血中CD4細胞数と血中ウイルス量、攻撃接種３ヶ月以降の各種リンパ組織中のCD4細胞数を検討することにより、各薬剤の感染予防内服効果を評価した。その結果、KRH-3955前日投与群では感染防御は達成されなかったが全頭で血中CD4細胞消失を防いだ。２週前投与では１頭のみでCD4細胞消失を防いだ。対照群に比べて、前日投与及び２週前投与のいずれの群でも、各種リンパ組織中CD4細胞数が有意に保持されていた。興味深いことに、FTC/ TDF前日及び直前投与群の２頭において完全な感染防御が達成された。以上、KRH-3955は単回の２週間前投与で感染防御は達成できなかったが体内の総CD4細胞消失を防いだ。小動物モデルにおける同等以上の効果（既報）を併せて考慮すると、KRH-3955はweekly PrEPの有望な候補薬剤と考えられる。これまでの臨床試験の結果から単剤でのPrEPは効果的ではないことが示唆されている。FTC/ TDFの予想外の効果を勘案すると、KRH-3955とFTC/ TDFを含めた複数薬剤によるPrEPの必要性が示唆された。いわゆるHAARP (Highly Active Anti-Retrovirus Prevention)である。

［仲宗根正、熊倉 成（クレハ）、村上 努、山本直樹］

2. Cell-associated virus経粘膜感染によるサル・エイズモデル開発（ウイルス曝露非感染モデル）

ウイルス曝露非感染サルモデルの重要性は次のようにまとめられる。人類の中にはHIVに濃厚に曝露されるも感染しないヒトが存在する。いわゆるウイルス曝露非感染者である。彼らは理想的な抗HIV免疫を獲得していると考えられているため、特にその粘膜免疫の解析はワクチン開発の重要課題となっている。しかしながら、症例の発掘が困難であり、なおかつ粘膜面の解析にはサンプリング量・回数ともに制限が大きい。また、チャレンジ実験が不可能なことから、その症例が真に抗HIV免疫を獲得しているのかという確認も不可能である。ウイルス曝露非感染サルモデルはそれらの問題を解決し、HIV防御免疫本態の詳細情報を提供すると考えられる。昨年度に得られたウイルス曝露非感染サルモデルと思われる２頭に加えて、今年度新たに１頭を得ることができた。今年度は、この３頭について頻回のウイルス低量曝露と攻撃曝露を再度繰り返したが、２頭でCD4細胞数が保持された。すなわち感染防御免疫あるいは発症予防免疫等が誘導されている可能性を再確認した。現在、その防御免疫について解析中である。

［仲宗根正、梁 明秀、山本直樹］

3. 長期感染における糖鎖欠失変異SIVの病原性

HIV の病原性の本質は持続性の慢性感染と高い変異性にある。慢性感染において多様な変異ウイルスの産生と宿主免疫、抗ウイルス治療薬に抵抗性のウイルスの選択的増殖が起こり、免疫細胞の減少等により免疫機能不全に陥る。我々は SIV エイズ動物モデルを用いてエイズウイルスの糖鎖修飾の減少は、慢性期におけるウイルス感染を顕著に減少させることを報告した。本研究では糖鎖変異ウイルスの長期感染でのウイルス変異、宿主応答の解析を行い、糖鎖修飾のエイズウイルスの病原性への影

響の機序について解析した。SIVmac239 gp120 の 5 カ所の N 型糖鎖付加部位を欠失した変異株：Δ5G に感染した 5 頭アカゲザルについて、10 年間のウイルス感染と獲得免疫について解析した。Δ5G 感染の特徴を確認するために野生株 SIVmac239 感染、低病原性変異株 Nef 遺伝子欠損株感染と比較した。血中ウイルス RNA 量の測定によりウイルス感染について調べた。Δ5G のウイルス増殖性感染は初期感染期に限局され、感染後 20 週以降では、血中ウイルス量はほぼ検出限界以下であった。末梢単核球のウイルス DNA 量は初期感染後減少を続け、感染後 200 週には 10^6 細胞当たり 10 コピー以下となった。50 週頃からウイルスゲノムには、休止コドンを伴う多数の G → A 変異 SIV が検出され、感染後 200 週までには大勢を占めるようになっていた。対照的に SIVmac239 感染、Nef 遺伝子変異株感染では獲得免疫に対するエスケープ変異等がほとんどであり defective なウイルスゲノムは極めて頻度は低かった。ウイルス結合抗体測定による液性免疫、ELISPOT による細胞性免疫の解析からはΔ5G 感染では獲得免疫が経時的に低下していた。対照的に SIVmac239 感染、Nef 遺伝子変異株感染では獲得免疫は高いレベルが維持されていた。これらの結果は、Δ5G 感染は SIVmac239 感染、Nef 遺伝子変異株感染とは異なり、慢性期においてウイルス複製が非常に低レベルに抑制されていたことを示す。

［佐藤洋隆、森 一泰］

VII. その他

1. iPS 細胞のレトロウイルス研究への応用

(1) ヒト腎上皮細胞からの iPS 細胞の作製

エイズの遺伝子治療において、患者より採取した HIV の標的細胞の前駆幹細胞に遺伝子操作により HIV 抵抗性を付与し患者体内に戻す方法は、HIV 非感染幹細胞の量的確保等の技術的な困難を伴っている。ところが、2007 年に京都大学の山中らによってヒト体細胞からの人工多能性幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS 細胞)の作製法が開発されたことにより、患者の HIV 非感染体細胞を初期化・遺伝子操作した幹細胞を大量調製できる可能性が開けてきた。

本研究では、iPS 細胞作製技術の確立と併せてその遺伝子操作法を開発するために、まず、ヒト腎上皮初代培養細胞からの iPS 細胞樹立を試みた。その結果、形態的にヒト皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞に酷似した複数の細胞株の樹立に成功した。それらの細胞株はアルカリホスファターゼ染色陽性であること、免疫蛍光染色により未分化細胞特異的抗原が検出できること、また、RT-PCR により未分化細胞特異的遺伝子の発現が検出できることより、その未分化性が確認できた。更に、免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成実験により *in vivo* での 3 胚葉への分化能が、また、培養細胞で *in vitro* での分化能が確認され、多能性を有する iPS 細胞であることが証明できた。

［阪井弘治、武田 哲、梁 明秀、山本直樹、網 康至(動物管理室)、須﨑百合子(動物管理室)、松村隆紀(首都大学東京)、宮本寛治(首都大学東京)］

(2) iPS 細胞を用いたマウスモデルの開発

NOD/SCID/gamma(c)(null)マウス（NOG マウス）は、ヒト造血幹細胞の生着に優れ、ヒト T、B、NK、DC 細胞などの増殖分化も認められることから理想的な HIV-1 感染マウスモデル系として貢献できると期待される。今回我々は、昨年度大量培養に成功した iPS 細胞を NOG マウスに移植することによりヒト造血幹細胞を移植した場合と同様に、マウスモデルを構築できるかどうかの検討を行った。現在、iPS 細胞をフィーダー細胞と共に静注により移植を行ったところであり、今後経時的に採血を行い、上記のようなヒトの細胞の増殖分化が認められるかどうか検討する。また、移植する細胞の数、フィーダー細胞の有無、移植経路、また、iPS 細胞を in vitro にてヒト造血幹細胞まで分化させた後に移植するなど、条件検討を行っていく予定である。

［武田 哲、渡辺 哲、西澤雅子、山本直樹］

(3) iPS 細胞からヒト造血幹細胞への分化

NOG マウスにヒト造血幹細胞を移植することによりヒト T、B、NK、DC 細胞などの増殖分化も認められる。iPS 細胞もヒト造血幹細胞へ in vitro で分化させることができれば、HIV-1 感染マウスモデル系の構築が可能となる。そのため、ES 細胞では報告のあるヒト造血幹細胞への分化プロトコールを用い、iPS 細胞もヒト造血幹細胞へ分化させることが可能かどうか検討を行った。iPS 細胞をコンフレント状態にした OP9 フィーダー細胞上で約 2 週間程度培養した後、CD34+細胞 isolation kit を用い AUTO MACS により CD34+細胞を回収した。Anti-CD34 抗体により染色し FACS により解析を行ったところ、CD34+細胞が確認された。今後再現性の確認を行い、十分量の CD34+細胞が回収できた場合、マウスに移植し HIV-1 感染マウスモデルの構築を試みる予定である。

［武田 哲、山本直樹］

(4) HIV-1 抵抗性遺伝子を導入した iPS 細胞の樹立

iPS 細胞はその名の通り、多能性を持っており免疫系

の細胞へも分化が可能である。HIV 感染の治療には免疫系の再構築が重要であるが、現行の HAART ではこれを期待することは難しい。そのため、HIV 感染者・エイズ患者の HIV 非感染の自己組織より iPS 細胞を樹立する。つぎに、iPS 細胞の遺伝子を改変、あるいは新規遺伝子を導入することで HIV に対する抵抗性を付与し、感染者・患者に自家移植することを最終目的として実験を開始した。今回は変異型 APOBEC3G 遺伝子の導入を行うために、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターの作製を開始した。今後、iPS 細胞に変異型 APOBEC3G 遺伝子を導入し、HIV-1 の感染する細胞に分化させ感染実験を行い、実際に HIV-1 に対して抵抗性を示すかどうか確認する予定である。
［武田 哲、山本直樹］

(5) HIV-1 感染抵抗性多能性幹細胞作製の試み

iPS 細胞を利用した新規のエイズ予防法および治療法の開発を行うため、HIV-1 感染に対する抵抗性を獲得した多能性幹細胞の創出を試みた。ヒト胎児肺線維芽細胞からレトロウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4、c-MYC の４因子を導入し、複数の iPS コロニーを得た。このうち、アルカリフォスファターゼ染色陽性かつ形態学的に ES 細胞に類似したクローンについては、免疫不全マウスに移入し、テラトーマの作製を確認した。次にこれらの iPS 細胞にエレクトロポレーション法を用いて HIV 感染抵抗性遺伝子組み込んだ iPS 細胞を樹立した。今後はこれらの細胞の血球系細胞への分化誘導能や抗 HIV 活性について検討を行う予定である。
［西真由子、阿久津英憲（国立成育医療センター研究所）、梅澤明弘（国立成育医療センター研究所）、梁 明秀、山本直樹］

(6) コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた新たな iPS 細胞誘導の試み

iPS 細胞を利用した新規のエイズ予防法および治療法の開発を行うため、遺伝子導入に依らない新規の iPS 細胞作製法の開発を試みた。コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、C 末にアルギニンを 11 個付加したリプログラミングタンパク質を合成後、1×10^6 個の神経幹細胞およびヒト胎児肺線維芽細胞に１日おきに３回添加した。その後、ES 培地にて培養し、iPS 様コロニーを単離した。これらのクローンは Nanog や OCT4 などの後期リプログラミングマーカーの発現はみられなかったが、FGF-4 陽性 ES 様コロニーの形成と単離に成功した。これらの結果は遺伝子導入に依らない新たな iPS 細胞作製法の可能性を示唆するものである。今後さらなる検討を行う予定である。
［西真由子、阿久津英憲（国立成育医療センター研究所）、梅澤明弘（国立成育医療センター研究所）、梁 明秀、山本直樹］

2. エイズおよびエイズ関連疾患に対する創薬シーズ探索

わが国の HIV 感染血友病患者では HCV 共感染率は 97%を超えている。1996 年に HAART が導入されて以来、血友病患者の死亡率は激減しているが、近年共感染した HCV による重篤な肝障害により死亡数が急増している。そこで、われわれは、エイズおよびエイズ関連疾患に対する創薬シーズ探索の一環として HIV-1, HCV の双方に活性をもつ生物活性物質の探索を進め、その結果、4 種のヒットを見出した。うち２種は分子量 500 未満の低分子量化合物であり、残り２種は分子量約 10,000 前後のペプチド性分子であった。共に HIV-1, HCV 双方に対して low あるいは sub-nM の強力な抗ウイルス活性を示した。後者はマンノース特異糖鎖結合タンパク質であり、高度の糖鎖修飾を受けているウイルスエンベロープタンパク質を標的として、ウイルス感染の最初期過程である吸着段階の阻害剤であることが明らかにされた。一方前２者の作用機構は現時点では明確ではないが、ウイルスエントリー及び後期過程に標的とするものと推定される。現在、作用機構の詳細の解析と創薬展開に向けた前臨床研究が進行中である。
［上西理恵、長谷彩希、Yue Li, 土浦貴代、廖 華南、加藤佳代子、武部 豊、Kirk Gustafson（米国がん研究所（NCI-Frederick））、James B. McMahon（NCI-Frederick）、Barry G. O’Keefe（NCI-Frederick）、鈴木哲朗（ウイルス第二部）、鈴木亮介（ウイルス第二部）、脇田隆字（ウイルス第二部）］

3. 新型インフルエンザ対応に関する研究

(1) インフルエンザA/H1N1pdmを認識するヒトモノクローナル抗体の作出と医用応用

エイズウイルスに対するヒトモノクローナル中和抗体作出に関する技術を応用して、2009 年度に世界的流行を見せたインフルエンザ A/H1N1pdm（ブタ由来、新型インフルエンザ）に対して診断及び治療に応用できる可能性のあるヒトモノクローナル抗体の作出を行った。新型インフルエンザ感染既往のある健康な日本人ボランティアから末梢血単核球を分離し持続的かつ安定に A/H1N1pdm 抗原に反応する抗体を産生したクローンを 10 個樹立した。10 検体のうち特異的に A/H1N1pdm 抗原

に反応する検体は 6 個、A/H1N1pdm 以外の季節性インフルエンザウイルス抗原にも反応する検体が 4 個あった。A/H1N1pdm 抗原に反応する 2 検体のハイブリドーマクローンについてさらに詳細な検討を加えたところ、Baculovirus/Sf9 系で発現させ精製した A/California/04/2009 (H1N1)由来リコンビナント HA1 を認識したことから、ウイルス表面の HA 分子と反応していた事が示唆された。抗体の中にはインフルエンザ A/H1N1pdm に結合するだけでなく、ウイルス感染能力を無力化する抗体（中和抗体）も存在する事が明らかとなり、迅速検査・診断法の開発だけでなく、抗体医薬による治療法への応用も期待できる。今後タミフル耐性問題などで新規治療法の社会的要請が高まった際に社会への高い貢献が期待できる。本技術はインフルエンザウイルス感染症だけにとどまらず、今後勃興すると危惧される種々の感染症に対応するための基幹技術として応用可能である。本技術の潜在的問題点を洗い出し、新興再興感染症勃興に際して迅速な対応がとれるように研究手法の更なる改善を進める。

［駒野 淳、久原基樹（医学生物学研究所）、山本正雅（奥羽大学）］

4. エイズリンパ腫の予防法開発に関する研究

HIV-1 感染者やエイズ患者における死因の上位に位置するエイズリンパ腫の約半数が EBV 陽性であるため、リンパ腫の原因となるエプスタイン-バーウイルス(EBV)に対して特異的な分子治療標的の同定は HIV 感染者の予後を改善するために非常に重要である。潜伏感染細胞での EBV ゲノム維持にはウイルスタンパク質 EBNA1 が必須である。EBNA1 は EBV ゲノムの oriP に結合して、EBV ゲノム複製を誘導し娘細胞に分配させると同時に、W プロモーターを活性化して癌化に密接に関与する転写活性化因子 EBNA1/-2/-3s/-LP などを発現させる。dominant-negative EBNA1(dnE1)は核移行シグナルと DNA 結合／二量体化ドメインのみをコードした EBNA1 変異体である。dnE1 は潜伏感染を樹立した腫瘍細胞に導入すると細胞増殖を抑制することが知られている。しかし、dnE1 が新規 EBV 感染に与える影響は解析されていない。そこで我々は、EBV 陰性細胞への野生型 EBV 新規感染における dnE1 の作用について解析した。GFP-dnE1(GD)と GFP を恒常的に発現する EBV 陰性 B-ALL 細胞に EBV B95-8 株を感染させた。感染細胞から経時的に DNA と RNA を抽出した。EBV ゲノムの維持効率を定量するために BamHI W 反復配列を標的としたリアルタイム PCR、悪性形質に関わる遺伝子の発現を定量するために W プロモーター由来転写産物を標的としたリアルタイム RT-PCR を行った。その結果、GD と GFP 発現細胞において同程度の EBV ゲノムが検出され、同等の効率でゲノム脱落が観察された。以上より、本実験系では dnE1 は新規 EBV 感染を抑止せず、感染後 2 週間までモニタリングしても EBV ゲノムの脱落も促進できないことが判明した。しかし、W プロモーター由来転写産物は GFP 発現細胞にてより多く検出されたことから、dnE1 により W プロモーター活性化が抑制されていることが示唆された。以上を総合すると、dnE1 は新規野生型 EBV 感染に際し、悪性形質に関与する主な EBV 遺伝子発現を阻害することが示唆された。EBNA1 転写阻害剤は免疫抑制患者における日和見 B 細胞腫瘍を予防するために有効かもしれない。

［駒野 淳、刈屋佑美、浦野恵美子、濱武牧子、吉山裕規（北海道大学）、清水則夫（東京医科歯科大学）］

品質管理に関する業務

I. 行政検査

1. 体外診断薬承認前試験

本年度は２件の体外診断薬の承認前試験を行った。

［巽 正志］

II. HIV 感染診断のための標準品整備

1. 日赤献血由来陽性検体からなる国内感染者 HIV 感染研パネル整備

国内で市販される HIV 感染診断キットの公的性能試験を第２室は担っている。現在診断キットの性能試験に用いている陽性検体の多くは HIV-1 流行初期の米国血液銀行より入手した血漿を供試している。HIV 感染診断キットの性能も技術革新により年々改良され、現在では第 1 次スクリーニング試験として抗原・抗体同時測定系が推奨され、ウインドウ期を短縮するため HIV-1 p24 gag 抗原検出感度が更に改良された診断キットが欧米先進国において既に市場に導入されている。感染者増加が続く本邦においては、感度と特異性に優れた HIV 感染診断キットの早期の導入は感染者の早期発見と適切な治療の開始のみならず、感染者の増加に歯止めをかけるため第１義的に重要であるが、これまで国内感染者検体入手が個人情報保護の側面から困難であったため承認前試験申請に遅延をきたす例が多かった。この現状を改善するため日赤より 2004 年度から 2006 年度に亙る HIV 陽性 84 検体と陰性 50 検体の譲渡を受けた。これらの検体は全て当室で分子遺伝学的特性付けを行い、また現在 HIV 感染診断キットを販売している主要な数社の協力を得て全検体

の特性を検討した上で選別し、陽性 80 検体及び陰性 20 検体からなる感染研公的 HIV-1 パネルとして整備した。またパネル運営委員会規程など公正な運営に必要なシステムを構築した。診断キットメーカからなる臨床診断薬協会を通じた説明会などを開催し平成 22 年度内の運営実用化に向けて努めている。

［竹川奈穂、巽 正志、山本直樹、水落利明（血液・安全性研究部）、百瀬俊也（日赤血液事業本部中央研究所）、柚木久雄（日赤血液事業本部中央研究所）、日野 学（日赤血液事業本部中央研究所）、田所憲治（日赤血液事業本部中央研究所）］

2. 国内感染者由来感染研 HIV 標準パネルの特性付け

HIV 感染診断キット及び HIV-1 RNA 定量測定キットの性能も技術革新により多様性に富む様々な HIV-1/-2 株に対応すべく年々改良されている。特に HIV-1 RNA 定量測定キットはキットにより HIV-1 ゲノムの標的領域が異なることから、国内感染者由来感染研 HIV 標準パネルの全ゲノムの配列決定を試みている。今年度はパネル構成全検体の p24 gag 領域の塩基配列を決定し系統樹解析をしたところ、既にパネル整備時に行った p17 gag 及び env C2/V3 領域の系統樹解析と相同な成績が得られた。解析した p24 gag 領域は国内で広く用いられている HIV-1 RNA 定量測定キットの標的領域であることから感染研 HIV 標準パネルの標準品としての価値を高めるものと考えられる。今後は更に他のゲノム領域についても配列決定を進める予定である。

［内山知佳、竹川奈穂、巽 正志］

3. 各種 subtype/CRF 感染性分子クローンを用いた抗原・抗体同時測定系の感度試験用標準パネルの作成

現在、本邦では HIV-1/-2 感染診断の 1 次スクリーニング検査は、各保健所などで導入されている即日検査に用いられるイムノクロマト法を除いて、ウインドウ期をより短縮するため第 4 世代抗原・抗体同時測定系が導入されている。各社より各種の検査キットが市販されているが、抗体出現前の抗原陽性期を如何に感度良く検出できるかは Seroconversion Panel を購入して対応しているが、この Panel を構成する HIV-1 の subtype は限られており、その数量もまた限度があるなど、その標準抗原が国内外で依然として整備されていな状況である。我々がこれまで樹立してきた各種 subtype/CRF 感染性分子クローンが、これら抗原・抗体同時測定系における抗原検出の感度試験標準パネルとなりうるか、国内で市販されている検査キットを販売している検査会社の協力を得てその感度測定を行なっている。サーベイにおいて subtype/CRF 数を増やし、希釈抗原濃度も各診断キットが公称する感度 10 pg/mL 前後に振り、欧州で HIV-1 抗原測定のデフォルトスタンダードとされる Innotest による測定も行なった。その結果 Innotest による抗原検出は全ての感染性分子クローンで設定抗原濃度 10 pg/mL まで検出していた。この成績は当室が整備した subtype/CRF 感染性分子クローンが偏ったウイルスからなる可能性を否定するものであった。各種抗原抗体同時測定診断キットでこれらのパネルを測定したところ、診断キットにより subtype/CRF により検出感度が大きく異なることが改めて確認された。100 pg/mL の p24 gag 濃度で幾つかのクローンが検出出来ないキットについて、その責任抗原領域を分子モデリングと検出感度の相関を各クローンの p24 gag アミノ酸配列の比較をもとに解析を行ったところ、p24 gag 分子の E71D 及び H87Q 部位のアミノ酸共変異により当該キットの用いている抗原補足もしくは検出抗体の結合活性が低くなることが推測された。今後はこれらの部位特異的変異を組み合わせた感染性分子クローンを構築し、更に解析する。

［竹川奈穂、藤本浩文（放射能管理室）、浜本いつき、巽 正志］

4. 各種 subtype/CRF 感染性分子クローン由来大腸菌発現 p24 gag 抗原発現の試み

上記のように各種 subtype/CRF 感染性分子クローンを用いた抗原・抗体同時測定系の感度試験用標準パネルの可能性の目処は立ちつつあるが、これらの抗原濃度はある抗原測定系で計測した濃度であることから検出感度はあくまでも相対的な評価になる。また感染性分子クローンの発現により得られたウイルスを溶解処理してその感染性を除去しても配布に当たり取扱いは安全上配慮を要することから、大腸菌における HIV-1 p24 gag タンパク抗原の発現と精製を試みている。複数の感染性分子クローンを鋳型に HisTag を付加した p24 gag を発現精製して複数の p24 gag 検出 ELISA 測定系で解析検討をしている。今後は主要な subtype/CRF の p24 gag 精製抗原パネルを整備し、第四世代抗原・抗体同時測定系の抗原感度比較試験における標準となるべく進めていく。

［平野梨恵、永井美智、巽 正志］

5. WHO 主催 HIV-2 RNA 標準品作成への参加

本年度 WHO 主催の HIV-2 RNA 定量測定用国際標準品作成のため 14 カ国 31 機関の研究室が 2 標準品候補品（HIV-2 CAM2 株、HIV-2 ROD 株）を測定することにな

り、当室も参加し In-House Real-Time RT-PCR で測定報告した。各国からの測定値がまとめられ 2009 年 10 月 19 日から 23 日に開催された Expert Committee on Biological Standard で討議され文書 WHO/BS/09.2118 として公開された。今後改めて国際標準単位を取り決めることとなった。

［巽 正志、水澤佐衛子（血液・安全性研究部）］

国際協力関係業務

I. 平成 21 年度 JICE／JICA とエイズ研究センター共催による JICE 研修員受入事業「診断とモニタリングのための HIV 感染検査マネジメント」（平成 21 年 6 月 15 日-7 月 14 日）

現在世界的に拡大を続けているHIV-1感染、AIDS発症の予防のためには、HIV-1の蔓延状況の正確な把握が欠かせない。このためには確固とした診断技術に基づいたHIV-1感染診断が必須である。近年HIV-1の感染診断は従来の感染の有無のみを判断する血清学的診断に加えて、感染ウイルスの質、量を知ることができるPCR法に基づいた診断法が重視されるようになってきている。しかし、現在感染の中心となっている第三世界では必ずしもこれらの診断技術が確立されていないのが現状である。これらの状況に対応するため当センターではJICAとの共催により第三世界の研修員を対象にHIV-1の感染診断のための技術講習コースを毎年１回開催している。過去３フェーズ（各フェーズ５年）に渡って血清診断を中心とした研修を行ってきた。第３フェーズでは、近年の核酸に基づいた診断技術への需要に答えて「HIV感染者のケアとマネジメントのための高度診断技術」と名称を改めPCRや塩基配列解析などを含めた研修を行った。そして平成20年度から（各フェーズ３年）は、途上国のナショナルレファレンスラボ（またはそれに準ずる組織）にHIV感染・エイズの診断とモニタリングに必要な理論的背景知識およびそれらの検査技術の普及を図るため、「診断とモニタリングのためのHIV感染検査マネジメント」というコース名で研修を開始した。平成21年度は新型インフルエンザ発生の影響で例年より規模を縮小しての実施となったが、ボツワナ、カメルーン、中国、ミャンマー、ナイジェリア、セネガル、南アフリカ、ジンバブエの８カ国８名の研修員を対象に４週間半にわたって村山庁舎研修棟を中心として技術研修を行った。研修内容は診断に必要な関連分野の講義、診断技術実習、施設訪問等を組み合わせたもので、実習は４名ずつ２班に分けて行った。

［村上 努、梁 明秀、仲宗根正、西真由子、杉浦 亙、鈴木寿子、西澤雅子、武部 豊、椎野禎一郎、巽 正志、阪井弘治、武田 哲、森 一泰、駒野 淳、山本直樹、杉山和良（バイオセーフティ管理室）、横田恭子（免疫部）、岡部信彦（感染症情報センター）、俣野哲朗（東京大学医科学研究所）、Jintana Ngamvithayapong-Yanai（財団法人結核予防会結核研究所）、若杉なおみ（早稲田大学）、畢 秀瓊（国立国際医療センター）、増田道明（獨協医科大学）、小柳義夫（京都大学ウイルス研究所）、内田茂治（東京都赤十字血液センター）］

II. その他

1. 平成 21 年度 JICE／JICA と熊本医療センター共催による「AIDS の予防及び対策」コース 講師（平成 22 年 3 月 4 日）［駒野 淳］

2. 平成 21 年度 JICE／JICA と熊本医療センター共催による「AIDS の予防及び対策」コース 講師（平成 22 年 3 月 15 日）［武部 豊］

3. 日本学術振興会 論博研究者受入（平成 21 年 9 月 13 日-10 月 9 日）［杉浦 亙］

4. 日本学術振興会 論博研究者受入（平成 22 年 1 月 18 日- 1 月 21 日）［杉浦 亙］

研修業務

1. 厚生労働省による HIV 検査法、検査体制研究班による研修会「第 20 回 HIV-1,2 技術研修会」（平成 21 年 10 月 7-9 日）［杉浦 亙］

2. 医師卒後臨床研修プログラム 講師「エイズの現状と問題点」（平成 21 年 12 月 16 日）［武部 豊］

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Jeong SJ, Ryo A, Yamamoto N: The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. Biochem Biophys Res Commun 381(2): 294-299, 2009.

2) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag.

FEBS Lett 583(8): 1243-1250, 2009.

3) Ohba K, Ryo A, Dewan MD, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. J Immunol 183(1): 524-532, 2009.
4) Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M: Postinfection passive transfer of KD-247 protects against simian/human immunodeficiency virus-induced CD4+ T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS 23(12): 1485-1494, 2009.
5) Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. J Biol Chem 284(36): 23980-23988, 2009.
6) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. PLoS Pathog 5(12): e1000700, 2009.
7) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. Trends Biochem Sci 34(4): 162-165, 2009.
8) Honda M, Wang R, Kong WP, Kanekiyo M, Akahata W, Xu L, Matsuo K, Natarajan K, Robinson H, Asher TE, Price DA, Douek DC, Margulies DH, Nabel GJ: Different vaccine vectors delivering the same antigen elicit CD8+ T cell responses with distinct clonotype and epitope specificity. J Immunol 183: 2425-2434, 2009.
9) Promkhatkaew D, Matsuo K, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Leang-Aramgul P, Sawanpanyalert P, Warachit P. Prime-boost vaccination using recombinant *Mycobacterium bovis* BCG and recombinant vaccinia virus DIs harboring HIV-1 CRF01_AE gag in mice: influence of immunization routes. Southeast Asian J Trop Med Public Health 40: 273-281, 2009.
10) Land S, Cunningham P, Zhou J, Frost K, Katzenstein D, Kantor R, Chen YM, Oka S, DeLong A, Sayer D, Smith J, Dax EM, Law M; TAQAS Laboratory Network. TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. J Virol Methods 159(2): 185-193, 2009.
11) Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H: Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA. BMC Bioinformatics 10(1): 360, 2009.
12) Iwatani Y, Chan DS, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin JG, Gronenborn AM, Sugiura W: HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(46): 19539-19544, 2009.
13) Fujisaki S, Yokomaku Y, Hattori J, Ibe S, Utsumi M, Hamaguchi M, Iwatani Y Sugiura W: Molecular epidemiology of HBV-HIV-1 coinfection in Japan. Antivir Ther 14 Suppl 1: A67, 2009.
14) Hattori J, Yoshida S, Ito T, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Tanabe Y, UedaM, Shirasaka T, Mori H, Minami R, Sugiura W, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Net Work: Increasing prevalence of drug-resistance mutations among treatment-naïve HIV-infected patients in Japan from 2003 to 2008. Antivir Ther 14 Suppl 1: A78, 2009.
15) Fujino M, Miura H, Hattori J, Ibe S, Fujisaki S, Matsuda M, Nishizawa M, Iwatani Y, Sugiura W: Machanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1. Antivir Ther 14 Suppl 1: A113, 2009.
16) Kondo M, Sudo K, Tanaka R, Sano T, Sagara H, Iwamuro S, Takebe Y, Imai M, Kato S: Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. J Virol Methods 157 (2): 141-146, 2009.
17) Tee KK, Takebe Y, Kamarulzaman A: Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007. Int J Infect Dis 13(3): 307-318, 2009.
18) Tee KK, Pybus OG, Parker J, Ng KP, Kamarulzaman A, Takebe Y: Estimating the date of origin of an HIV-1 circulating recombinant form. Virology 387 (1): 229-234, 2009.
19) Tanaka R, Tsujii H, Yamada T, Kajimoto T, Amano F, Hasegawa J, Hamashima Y, Node M, Katoh K, Takebe Y: Novel 3alpha-methoxyserrat-14-en-21beta-ol (PJ-1) and 3beta-methoxyserrat-14-en-21beta-ol (PJ-2)-curcumin, kojic acid, quercetin, and baicalein conjugates as HIV agents. Bioorg Med Chem 17(14): 5238-5246, 2009.

20) Liao H, Tee KK, Hase S, Uenishi R, Li XJ, Kusagawa S, Thang PH, Hien NT, Pybus OG, Takebe Y: Phylodynamic analysis of the dissemination of HIV-1 CRF01_AE in Vietnam. Virology 391: 51-56, 2009.

21) Delviks-Frankenberry KA, Nikolenko GN, Maldarelli F, Hase S, Takebe Y, Pathak VK: Subtype-specific differences in the HIV-1 reverse transcriptase connection subdomain of CRF01_AE are associated with higher levels of resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. J Virol 83(17): 8502-8513, 2009.

22) Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, Akari H, Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S: Dys-regulated activation of a src tyroine kinase Hck at the golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms. J Cell Physiol 221(2): 458-468, 2009.

23) Tee KK, Kusagawa S, Li XJ, Onogi N, Isogai M, Hase S, Uenishi R, Liao H, Kamarulzaman A, Takebe Y: Isolation and characterization of a replication-competent molecular clone of a HIV-1 circulating recombinant form (CRF33_01B). PLoS One 4(8): e6666, 2009.

24) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N: The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. Antimicrob Agents Chemother 53(7): 2940-2948, 2009.

25) Fuji H, Urano E, Futahashi Y, Hamatake M, Tatsumi J, Hoshino T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J: Derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid carbamoylmethyl ester inhibit RNase H activity associated with HIV-1 reverse transcriptase. J Med Chem 52(5): 1380-1387, 2009.

26) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J: Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in targeted metastasis. Cancer Sci 100(1): 95-102, 2009.

27) Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, Kumakura S, Dewan Z, Yanaka M, Yamamoto N: Efficient inhibition of SDF-1α-mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. Cancer Sci 100: 778-781, 2009.

28) Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K, Ansari AA: Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti-alpha(4)beta(7) monoclonal antibody. Cell Immunol 259: 165-176, 2009.

29) Nonaka M, Uota S, Saitoh Y, Takahashi M, Sugimoto H, Amet T, Arai A, Miura O, Yamamoto N, Yamaoka S: Role for protein geranylgeranylation in adult T-cell leukemia cell survival. Exp Cell Res 315(2): 141-150, 2009.

30) Barnor JS, Habu Y, Yamamoto N, Miyano-Kurosaki N, Ishikawa K, Yamamoto N, Takaku H: Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA. Antiviral Res 83: 156-164, 2009.

31) Ono Y, Terashima K, Liu A, Yokoyama M, Yokoshima K, Mizukami M, Watanabe K, Mochimaru Y, Furusaka T, Shimizu N, Yamamoto N, Ishiwata T, Sugisaki Y, Yagi T, Naito Z: Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production in vitro. Pathol Int 59(5): 332-344, 2009.

32) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y: Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. Virology 386(1): 23-31, 2009.

33) Kobayashi S, Wada A, Shibasaki S, Annaka M, Higuchi H, Adachi K, Mori N, Ishikawa T, Masuda Y, Watanabe H, Yamamoto N, Yamaoka S, Inamatsu T: Spread of a large plasmid carrying the cpe gene and the tcp locus amongst Clostridium perfringens isolates from nosocomial outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in a geriatric hospital. Epidemiol Infect 137(1): 108-113, 2009.

34) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H: Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. Vaccine 27: 966-971, 2009.

35) Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. T-cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice. J Infect Dis 200(10): 1611-5, 2009.

36) Tomita M, Dewan MZ, Yamamoto N, Kikuchi A, Mori N. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1

activates beta-catenin signaling in B lymphocytes.Cancer Sci 100(5): 807-812, 2009.

37) Dewan MZ, Takada M, Terunuma H, Deng X, Ahmed S, Yamamoto N, Toi M. Natural killer activity of peripheral-blood mononuclear cells in breast cancer patients. Biomed Pharmacother 63(9): 703-706, 2009.

38) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. Int J Cancer 124(3): 622-629, 2009.

39) Tsutsumi H, Nomura W, Abe S, Mino T, Masuda A, Ohashi N, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Akiyoshi K, Tamamura H: Fluorogenically active leucine zipper peptides as tag-probe pairs for protein imaging in living cells. Angew Chem Int Ed Engl 48(48): 9164-9166, 2009.

40) Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S: Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. Proc Natl Acad Sci USA 106(49): 20842-20846, 2009.

41) Matsuyama S, Aydan A, Ode H, Hata M, Sugiura W, Hoshino T: Structural and energetic analysis on the complexes of clinically isolated subtype C HIV-1 proteases and approved inhibitors by molecular dynamics simulation. J Phys Chem B 114(1): 521-530, 2010.

42) Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Ohya A, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H: Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies. Bioconjugate Chem, 21(4): 709-714, 2010.

43) Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, Takebe Y, Pybus OG: Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. J Virol, 84(7): 3339-3350, 2010.

44) Han X, Dai D, Zhao B, Liu J, Ding H, Zhang M, Hu Q, Lu C, Goldin M, Takebe Y, Zhang L, Shang H: Genetic and epidemiologic characterization of HIV-1 infection In Liaoning Province, China. J Acquir Immune Defic Syndr 53 Suppl 1: S27-33, 2010.

45) Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y: TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. Antiviral Res 85(3): 551-555, 2010.

46) Li Y, Tee KK, Liao H, Hase S, Uenishi R, Li X-J, Tsuchiura T, Yang R, Govindasamy S, Yong YK, Tan HY, Pybus OG, Kamarulzaman A, Takebe, Y: Identification of a novel second-generation circulating recombinant form (CRF48_01B) in Malaysia: a descendant of the previously identified CRF33_01B. J Acquir Immune Defic Syndr, in press.

47) Li Y, Uenishi R, Hase S, Liao H, Li X-J, Tsuchiura T, Tee KK, Yang R, Pybus OG, Takebe Y: Explosive HIV-1 subtype B' epidemics in Asia driven by geographic and risk group founder events. Virology, in press.

48) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A: Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. Immunogenetics, in press.

49) Takada M, Terunuma H, Deng X, Dewan MZ, Saji S, Kuroi K, Yamamoto N, Toi M: Refractory lung metastasis from breast cancer treated with multidisciplinary therapy including an immunological approach. Breast Cancer, in press.

2．和文発表

1) 小杉伊三夫，梁 明秀：幹細胞とウイルス感染症．医学のあゆみ. 229(9): 720-725, 2009. 医歯薬出版(株)．

2) 服部純子，杉浦 亙：特集 エイズの現状；社会的影響への考察も含めて，薬剤耐性の現状． Pharma Medica. 27(4): 39-43, 2009.（株)メディカルレビュー社.

3) 杉浦 亙：エイズ（後天性免疫不全症候群）．六訂版家庭医学大全科．（株)法研．2009.

4) 杉浦 亙：特集 HIV 感染症 流行の現状と最新の治療，日本における薬剤耐性 HIV の現状と対策．日本内科学会雑誌. 98(11): 2788-2793, 2009.

5) 宮崎菜穂子，松下修三，藤井 毅，杉浦 亙：抗 HIV 療法を受けている患者における薬剤耐性 HIV の現状と問題点．日本エイズ学会誌． 11(2): 146-151, 2009.

6) 武部 豊：エイズワクチンの開発動向: アデノウイルスワクチン国際臨床治験頓挫の波紋とその意味．PHARM STAGE 8(10): 1-6, 2009.

7) 村上 努：HIV複製を制御する宿主因子の探索．日本エイズ学会誌．11(3): 205-209, 2009.
8) 山本直樹：これからのHIV/AIDSの治療について．臨床とウイルス．37(5): 393-398, 2009.
9) 山本直樹：概念と定義．（満屋裕明編）最新医学別冊 新しい診断と治療のABC 65，HIV感染症とAIDS，大阪，最新医学社，p9-p17, 2010.
10) 長谷彩希，上西理恵，武部 豊：HIV 感染症と AIDS の疫学: 世界と日本.（満屋裕明編）最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 65，HIV 感染症と AIDS，大阪，最新医学社，p18-p33, 2010.
11) 上西理恵，長谷彩希，武部 豊：特集 抗ウイルス薬物療法の現状と今後の展望，肝炎治療薬，C 型肝炎治療: 新規抗 HCV 薬の開発. 医薬ジャーナル. 46 (2): 109-123, 2010.
12) 浜本いつき，山本直樹：特集 HIV/AIDS，HIV/AIDS 基礎研究の進歩．日本臨床．68(3): 383-388, 2010.
13) 武部 豊，長谷彩希，上西理恵：特集 HIV/AIDS，HIV ワクチン開発の最新動向—開発への道程にはだかる根幹的課題— 日本臨床．68(3): 525-535, 2010.

II. 学会発表

1．国際学会

1) Watanabe S, Yajima M, Imadome K, Terashima K, Ito M, Shimizu K, Shimizu N, Fujiwara S, Yamamoto N: Study of HIV and EBV infection in the humanized NOD/SCID/IL2Rγ-/-(NOG) mice system. 2nd International Workshop on Humanized Mice 2009. Apr. 3-6, 2009, Amsterdam, Netherlands.
2) Murakami T, Miyakawa K, Bucci C, Komano J, Yamamoto N: Role of Rab7 and its effector protein in HIV-1 assembly. CSHL Meeting on Retroviruses, May 18-23, 2009, Cold Spring Harbor, NY, USA.
3) Urano E, Okunaga H, Morikawa Y, Komano J: Inhibition of HIV-1 replication by the co-chaperone DnaJ/Hsp40 protein family. CSHL Meeting on Retroviruses, May 18-23, 2009, Cold Spring Harbor, NY, USA.
4) Fujisaki S, Yokomaku Y, Hattori J, Ibe S, Utsumi M, Hamaguchi M, Iwatani Y, Sugiura W: Molecular epidemiology of HBV-HIV-1 coinfection in Japan. 18th International HIV Drug Resistance Workshop, Jun. 9-13, 2009, Fort Myers, Florida, USA.
5) Hattori J, Yoshida S, Ito T, Gatanaga H, Kondo M, Sadamasu K, Kato S, Tanabe Y, UedaM, Shirasaka T, Mori H, Minami R, Sugiura W, the Japanese Drug Resistance HIV-1 Surveillance Net Work: Increasing prevalence of drug-resistance mutations among treatment-naïve HIV-infected patients in Japan from 2003 to 2008. 18th International HIV Drug Resistance Workshop, Jun. 9-13, 2009, Fort Myers, Florida, USA.
6) Fujino M, Miura H, Hattori J, Ibe S, Fujisaki S, Matsuda M, Nishizawa M, Iwatani Y, Sugiura W: Machanism of darunavir resistance acquisition in multi-protease inhibitor resistant HIV-1. 18th International HIV Drug Resistance Workshop, Jun. 9-13, 2009, Fort Myers, Florida, USA.
7) Yamamoto N, Ryo A: Basic and Translational studies on the human retrovirus infection by HIV-1 and HTLV-I. 2nd Annual Would Summit of Antivirals, Jul. 18-20, 2009, Beijing, China.
8) Tee KK, Pybus OG, Parker J, Ng KP, Kamarulzaman A, Takebe Y: Estimating the “date of birth” of an HIV-1 CRF. IAS 2009, Jul. 19-22, 2009, Cape Town, South Africa.
9) Miyakawa K, Ryo A, Ohba K, Nishi M, Murakami T, Guatelli J, Yamamoto N: Identification of a tetherin-interacting protein that restricts HIV-1 particle production. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 8-11, 2009, Hyogo.
10) Takebe Y, Li Y, Tee KK, Liao H, Hase S, Uenishi R, Pybus OP, Lemey P: Visualization of the space-time process of the HIV-1 expansion and recombination in Asia: its biological implications. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 8-11, 2009, Hyogo.
11) Ohba K, Ryo A, Yamamoto N: HIV-1 protease cleaves forkhead box P3 (Foxp3): A possible mechanism of autoimmune condition induced in HIV-1-infected individuals. 4th Asian Congress on Autoimmunity. Sep. 11-13, 2009, Singapore.
12) Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A : Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. 10th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 28-29, 2009, Kumamoto.
13) Sugiura W, Japanese Drug resistant HIV surveillance network: Characterization and the pattern of antiretroviral resistance among HIV-1-infected patients in Japan: update from nationwide surveillance. 10th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. 28-29, 2009, Kumamoto.

14) TakebeY, Uenishi R, Hase S, Liao H, Gustafson K, McMahon JB, O'Keefe BG: Potent inhibition of HCV entry by newly identified carbohydrate binding proteins. 6th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct. 3-7, 2009, Nice, France.
15) Mori K, Sugimoto C, Shiino T, Kimura A, Miyazawa M, Hirsch V, Yamamoto N, Nagai Y: Long-term control of heterologous challenge infection in rhesus macaques vaccinated with live attenuated deglysoylated SIV by CD8+ cells mediated response. 27th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. Oct. 28-31, 2009, Boston, USA.
16) Shibata J, Ren F, Iwatani Y, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Tanaka H, Sugiura W: Within-host coevolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov.15-18, 2009, Richmond, Virginia, USA.
17) Iwatani Y, Chan D, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn A, Sugiura W: Four lysine residues in APOBEC3G C-terminal domain are critical for HIV-1 Vif mediated ubiquitination/degradation. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov.15-18, 2009, Richmond, Virginia, USA.
18) Masaoka T, Sawasaki T, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A: Development of methods for testing HIV-1 protease drug reistance based on cell-free protein production system. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov.15-18, 2009, Richmond, Virginia, USA.
19) Takebe Y, Li Y, Liao H, Hase S, Uenishi R: Unusual evolutionary characteristics of CRF15_01B: Evidence for preferred configuration of HIV-1 recombination. 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Nov. 15-18, 2009, Richmond, Virginia, USA.
20) Uenishi R, Hase S, Li Y, Liao H, Gustafson K, McMahon JB, O'Keefe BG, Suzuki T, Wakita T, Takebe, Y: Identification of novel HCV entry inhibitors using HCVcc assay as a primary screening platform. HepDART 2009, Dec. 6-10, 2009, Hawaii, USA.
21) Takebe Y: Identification of novel HCV entry inhibitor. COBRE seminar at University of Hawaii, Dec.11, 2009, Hawaii, USA.
22) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Guatelli J, Yamamoto N : BCA2/Rabring7 Promotes Tetherin-Dependent HIV-1 Restriction. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections , Feb. 16-19, 2010, San Francisco, USA.
23) Iwatani Y, Chan D, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Levin J, Gronenborn A, Sugiura W: Structure-guided mutagenesis of APOBEC3G reveals critical lysine residues for HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 16-19, 2010, San Francisco, USA.
24) Masaoka T, Sawasaki T, Matsunaga S, Sugiura W, Endo Y, Tatsumi M, Yamamoto N, Ryo A: Novel high-throughput HIV-1 protease-resistance phenotypic assay using cell-free protein production system. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 16-19, 2010, San Francisco, USA.
25) Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Kato S, Hamaguchi M, Sugiura W: HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Feb. 16-19, 2010, San Francisco, USA.

2．国内学会

1) 梁 明秀，山本直樹：HIV-1産生を制御するtetherin相互作用蛋白の同定．特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦糸研究会，2009年5月20-21日，愛知．
2) 梁 明秀：HIV-1 Gag タンパク質の細胞内ダイナミクス関連因子の同定とその制御機構の解明.第 9 回日本蛋白質科学会年会，2009 年 5 月 20-22 日，熊本．
3) 宮川 敬，梁 明秀，山本直樹：宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する.第 19 回抗ウイルス療法研究会，2009 年 6 月 4-5 日，東京．
4) 梁 明秀：The peptidyl-prolyl isomerase Pin1： A novel post-phosphorylation modifier indevelopment and diseases. 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成第 1 回公開シンポジウム「分析技術の発達により見えてきた蛋白質の翻訳後修飾とその異常」， 2009 年 6 月 19 日，神奈川．
5) 駒野 淳：ゲノムワイドなエイズウイルス複製制御因子の探索．エイズとエイズリンパ腫治療の最前線，2009エイズリンパ腫シンポジウム，2009年7月25日，東京．

6) 梁 明秀 : ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 : 疾患や分化を司る新しいリン酸化後修飾因子．日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第 7 回大会，2009 年 7 月 27-28 日，東京.

7) 山本直樹：ウイルスのライフサイクル（ターンオーバー）とプロテアーゼ．第 14 回日本病態プロテアーゼ学会，2009 年 8 月 21-22 日，大阪.

8) Liao H, Tee KK, Li Y, Hase S, Uenishi R, Pybus OP, Takebe Y: The space-time process of HIV-1 CRF01_AE dispersal in Asia. 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Tropical Medicine, Oct. 22-23, 2009, Okinawa.

9) 岩谷靖雅, 吉居廣朗, 柴田潤子, 杉浦 亙 : APOBEC3G のユビキチン化部位と抗レトロウイルス作用．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

10) 吉居廣朗，岩谷靖雅，杉浦 亙 : 抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3 ファミリーの発現調節に関する研究．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

11) 藤崎誠一郎, 横幕能行, 服部純子, 伊部史朗, 内海 眞, 濱口元洋，岩谷靖雅，杉浦 亙 : HIV/HBV 重複感染者における HBV genotype 解析．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

12) 武部 豊, 上西理恵, 長谷彩希, 廖 華南, Kirk Gustafson, James B Macmahon，Barry G O'Keefe : 新規マンノース特異糖鎖結合タンパク質による nM オーダーの強力な HCV/HIV-1 エントリー阻害．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

13) 武部 豊，廖 華南，Kok Keng Tee，上西理恵，長谷彩希，Oliver Pybus，Philippe Lemey : CRF01_AE 世界伝播の時間的・空間的ダイナミックスの可視化：Bayesian phylogeography-分子疫学研究の新しい解析ツール．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

14) Yue Li，武部 豊：第 2 世代の組換え型流行株 CRF46_01B の同定とその分子進化学的特性．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

15) 松原明弘，高村史記，加藤翔太，草川 茂，武部 豊，森 一泰, 永井美之, 保富康宏. SIV mac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響．第 57 回日本ウイルス学会学術集会，2009 年 10 月 25-27 日，東京.

16) 浦野恵美子，市川玲子，森川裕子，芳田 剛，小柳義夫, 駒野 淳 : T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング-SEC14L1a C末端ドメインの同定とその機能解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月25-27日，東京.

17) 濱武牧子, 駒野 淳, 前田史子, 長塚靖子, 竹腰正隆 : HIV-1複製抑制能を有する健常人由来CD4反応性IgM抗体クローンの分離：HIV-1に対するnatural humoral resistance．第57回日本ウイルス学会学術集会，2009年10月25-27日，東京.

18) 滝澤万里，草川 茂，北村克彦，長縄 聡，村上利夫，本多三男，山本直樹，駒野 淳 : Diversified HIV-1を利用した中和抗体KD-247感受性を規定するEnv アミノ酸残基の網羅的解析．第57回日本ウイルス学会学術集会，2009年10月25-27日，東京.

19) 村上 努, 呉 鴻規，冨田香織，伯川冬美，駒野 淳，千葉 丈，山本直樹：HIV-1粒子形成におけるRab7とそのエフェクタータンパク質の役割．第57回日本ウイルス学会学術集会，2009年10月25-27日，東京.

20) 森 一泰, 杉本智恵, 横田恭子, 鈴木康夫, 山本直樹，永井美之：糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する．第57回日本ウイルス学会学術集会，2009年10月25-27日，東京.

21) 神山陽香，吉居廣朗，田中勇悦，佐藤裕徳，山本直樹，久保嘉直．HIV-1感染における標的細胞中のエズリン・リン酸化の重要性．第57回日本ウイルス学会学術集会．2009年10月25-27日，東京.

22) 久保嘉直，吉居廣朗，神山陽香，田中勇悦，佐藤裕徳、山本直樹．カテプシン B 抑制因子による CD4 非依存性 HIV-1 感染の促進. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会．2009 年 10 月 25-27 日，東京.

23) 今留謙一，矢島美彩子，川野布由子，清水則夫，中村浩幸，渡辺 哲，寺嶋一夫，山本直樹，藤原成悦：EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会．2009年10月25-27日，東京.

24) 清水一史, 渡辺 哲, 佐々木裕, 芝田敏克, 井口晃史，下平義隆，田中寅彦，黒田和道，清水則夫，山本直樹，山本樹生．重度免疫不全NOGマウスにおけるインフルエンザウイルス感染：強毒変異ウイルスの出現．第57回日本ウイルス学会学術集会．2009年10月25-27日，東京.

25) 矢島美彩子，今留謙一，渡辺 哲，寺嶋一夫，中村浩幸，清水則夫，山本直樹，藤原成悦．EBV感染ヒト化NOGマウスモデルにおけるT細胞応答．第57回日

本ウイルス学会学術集会. 2009年10月25-27日, 東京.
26) 高濱正吉，澤崎達也，岡山明子，赤木達也，遠藤弥重太，山本直樹，梁 明秀：細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
27) 正岡崇志，梁 明秀，巽 正志，杉浦 亙，松永智子，森下 了，澤崎達也，山本直樹：酵素活性を指標とした新規の HIV プロテアーゼ阻害剤耐性検査法の基盤技術の開発. 第 23 回日本エイズ学会学術集会･総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
28) 星野忠次，藍壇 愛，原田壮一郎，杉浦 亙：ウイルス酵素の構造変形に関する系統解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
29) 柴田潤子，杉浦 亙，岩谷靖雅，Hsinyi Tsang，松田昌和，長谷川直樹，任 鳳蓉，田中 博：宿主内 HIV-1 の共進化変異の解析：Protease 阻害剤耐性変異 D30N/N88D と p1/p6 切断領域の P453L 変異の相互干渉の意義．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
30) 鈴木寿子，服部純子，村田大吾，三浦秀佳，伊部史朗，藤野真之，西澤雅子，山本直樹，杉浦 亙：インテグラーゼ阻害剤耐性化機序の分子生物学的解析．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
31) 服部純子, 潟永博之, 吉田 繁, 千葉仁志, 小池隆夫, 佐々木悟，伊藤俊広，内田和江，原 孝，佐藤武幸，上田敦久，石ヶ坪良明，近藤真規子，今井光信，長島真美，貞升健志，古賀一郎，太田康男，山元泰之，福武勝幸, 田中理恵, 加藤真吾, 宮崎菜穂子, 藤井 毅，岩本愛吉，西澤雅子，仲宗根正，巽 正志，椎野禎一郎，林田庸総，岡 慎一，伊部史朗，藤崎誠一郎，金田次弘，横幕能行，濱口元洋，上田幹夫，大家正泰，田邊嘉也，渡邊香奈子，渡邊 大，矢倉裕輝，白阪琢磨, 桒原 健, 小島洋子, 森 治代, 中桐逸博, 高田 昇，木村昭郎, 南 留美, 山本政弘, 松下修三, 藤田次郎，健山正男，堀 成美，杉浦 亙：2003-2008 年の新規 HIV/AIDS 診断症例における薬剤耐性頻度の動向. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
32) 須藤弘二，杉浦 亙，加藤真吾：PCR-MS 法を用いた新規感染者血漿中の薬剤耐性微小集団の定量．第 23 回日本エイズ学会学術集会･総会, 2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
33) 重見 麗，服部純子，保坂真澄，伊部史朗，藤崎誠一郎，横幕能行，濱口元洋，内海 眞，岩谷靖雅，杉浦 亙：BED アッセイを用いた名古屋医療センターにおける新規 HIV 感染者の動向調査．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
34) 椎野禎一郎，貞升健志，長島真美，服部純子，杉浦 亙：国内感染者集団の大規模塩基配列データから推測される HIV 集団サイズの経時的変化．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
35) 藤崎誠一郎, 横幕能行, 服部純子, 伊部史朗, 内海 眞，濱口元洋，岩谷靖雅，杉浦 亙：HIV/HBV 重複感染者における HBV genotype 解析および薬剤耐性アミノ酸変異の検出．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
36) 伊部史朗，横幕能行，椎野禎一郎，田中理恵，服部純子，藤崎誠一郎，岩谷靖雅，間宮均人，内海 眞，加藤真吾，濱口元洋，杉浦 亙：日本における HIV-2 感染症の分子疫学的解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
37) 宮崎菜穂子, 松下修三, 藤井 毅, 岩本愛吉, 杉浦 亙：多剤耐性症例治療を目的とした新規抗 HIV 薬使用症例に対する緊急全国調査. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
38) 石川晃一, 山本典生, 杉浦 亙, 服部純子, 山岡昇司：ガーナにおける抗レトロウイルス治療（ART）中 HIV 感染者のウイルス定量と薬剤耐性解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
39) 西澤雅子, Jeffery Johnson, Walid Heneine, 山本直樹，杉浦 亙：高感度薬剤耐性 HIV 検出法を用いた微小集族薬剤耐性 HIV の検出と存在比率に関する研究. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
40) 横幕能行，大出裕高，藤崎彩恵子，伊部史朗，藤崎誠一郎，服部純子，濱口元洋，杉浦 亙：HIV プロテアーゼ阻害剤耐性関連変異蓄積症例の薬剤感受性評価に対する VLP ELISA 法およびコンピューターシュミレーション法の有用性の検討. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.
41) 岩谷靖雅，吉居廣朗，柴田潤子，杉浦 亙：Vif 依存的な APOBEC3G のユビキチン化部位と抗ウイルス作用．第 23 回日本エイズ学会学術集会. 2009 年 11

月 26-28 日，名古屋

42) 吉居廣朗，岩谷靖雅，杉浦 亙：抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3 ファミリーの発現調節に関する研究．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.

43) 武部 豊，Li Yue，長谷彩希，上西理恵，廖 華南，Tee Kok Keng：CRF15_01B の起源を巡る謎：HIV-1 組換えの preferred configuration．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2009 年 11 月 26-28 日, 名古屋.

44) 駒野 淳：オーミクス解析手法が次世代エイズ治療・予防法開発に与えるインパクト．シンポジウム:これからの HIV 研究の進むべき方向．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.

45) 村上 努，呉 鴻規，冨田香織，伯川冬美，駒野 淳，千葉 丈，山本直樹：Rab蛋白質とそのエフェクター蛋白質のHIV-1粒子形成における役割（Rab7を中心に）．第23回日本エイズ学会学術集会・総会，2009年11月26-28日，名古屋.

46) 浦野恵美子, 倉持紀子, 供田 洋, 武部 豊, 駒野 淳，森川裕子：酵母の膜結合Gag-Gag反応系で同定されたHIV-1 Gagアセンブリー阻害剤．第23回日本エイズ学会学術集会・総会，2009年11月26-28日，名古屋.

47) 森 一泰，杉本智恵，渡辺 哲，佐藤洋隆，成瀬妙子，椎野禎一郎，宮澤正顯，木村彰方，山本直樹，永井美之：感染を防御する宿主応答の解析 2．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.

48) 森 一泰，杉本智恵，佐藤洋隆，渡辺 哲，山本直樹，永井美之：長期感染における糖鎖欠失変異 SIV の病原性．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会，2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.

49) 松原明弘，高村史記，草川 茂，武部 豊，森 一泰，永井美之，保富康宏．SIVmac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響．第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2009 年 11 月 26-28 日，名古屋.

50) 上原大輔，坂本真衣子，吉川治孝，泉川圭一，早川俊哉，駒野 淳，高橋信弘：Proteomic search for the function of HIV-1Rev protein in human cells．第32回日本分子生物学会年会，2009年12月9-12日，横浜.

51) 青木 徹，清水佐紀，浦野恵美子，濱武牧子，寺嶋一夫，玉村啓和，村上 努，山本直樹，駒野 淳：Development of 5th generation lentiviral vector．第32回日本分子生物学会年会，2009年12月9-12日，横浜.

52) 浦野恵美子，市川玲子，森川裕子，芳田 剛，小柳義夫，駒野 淳：SEC14-like 1a carboxy-terminal domain negatively regulates the infectivity of human immunodeficiency virus replication．第32回日本分子生物学会年会，2009年12月9-12日，横浜.

２１．病原体ゲノム解析研究センター

センター長　神 田 忠 仁

概　要

病原体ゲノム解析研究センターは、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の増殖とそれを支える細胞因子の研究ならびに遺伝子治療に使うウイルスベクターに関する研究を行った。

HPV は粘膜の微少なキズから侵入し、表皮基底細胞（幹細胞）の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程でウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗 HPV 薬の開発基盤とするため HPV 生活環の詳細な解析を続けた。

HPV は 100 以上の遺伝子型に分類されており、そのうち 15 の型（ハイリスク型）が子宮頸癌の原因となる。欧米で開発された第一世代 HPV ワクチンは、ハイリスク型 HPV のうち 2 種の感染阻止に限定した予防効果を持つ。我々は、ハイリスク HPV 群に共通の中和エピトープを見出した。このエピトープを搭載したワクチン抗原を試作した。

WHO は HPV の感染実態とワクチン導入による影響を把握するために、HPV ラボネットワークを構築している。第一室は西太平洋地域の拠点ラボに指定されているので、HPV 遺伝子型判定と抗 HPV 抗体測定方法の標準化作業に参加した。

HPV ワクチンの承認前検査、生物学的製剤基準の策定、検定項目の選定を担当した。また、実施に検定を担当した。

遺伝子治療は、マスコミの過熱報道が収まった後も着実に進歩し、先天性遺伝病の治療や末期癌患者の QOL の改善に成果を上げている。ウイルスの持つ高い感染性や標的臓器の特異性を利用するウイルスベクターが使われるが、いわば人工のウイルスを多量に、直接患者に投与することになるので、安全の確保が重要となる。海外ではアデノウイルスベクターによる患者の死亡やレトロウイルスベクターによる白血病の発症が報告されており、遺伝子治療臨床試験における安全性の評価が厚生行政の課題となっている。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。今後、臨床応用が増えると考えられるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの性能向上を目指す研究を継続した。

第二室では、バイオインフォマティクス技術と実験データ、臨床データを活用して、ウイルスの性質を解析する新しい研究戦略の開発を続けた。計算科学を駆使して、蛋白質・核酸の高次構造、酵素反応、分子間相互作用などを高精度で近似する技術が急速に進展している。この技術は、培養が困難な病原体や易変異性病原体の解析に役立つことから、ホモロジーモデリング法、分子動力学法、結合シミュレーション等の精度を検証し、抗ウイルス因子の機能、ウイルス蛋白質の構造特性、ウイルス酵素の反応機構、ウイルスの複製や免疫逃避、薬剤耐性機構などを予測する研究を進めた。これらの研究戦略を HIV が中和抗体から逃避する分子機構や薬剤耐性獲得機構の解析、ノロウイルスの分子疫学に役立てるとともに、さらに、新規抗ウイルス剤の設計に役立てる研究へと進展させている。

次世代シークエンサーを使って、C 型肝炎ウイルス慢性感染患者体内に存在するウイルス準種の包括的解析をおこない、インターフェロン治療の感受性に関わるウイルス側因子の探索を進めた。インフルエンザウイルス研究センターに協力し、分離株のシークエンシングと解析を担当した。

第三室は、次世代シークエンサーを使って、バイオテロに使われる可能性のある炭疽菌、薬剤耐性食中毒菌、口腔常在菌等のゲノム解析を行った。また患者検体に含まれる核酸の迅速で包括的なシークエンシングを行い、そこからヒトの配列を除いて、患者に感染している微生物のゲノム情報を浮かび上がらせる研究手法を開発し、川崎病の病原因子探索への応用を試みた。細菌には動物の腸管内原生動物に感染し、感染原生動物とともに他の宿主に感染を拡大するものがある。このような細菌群の

研究は殆ど無いので、牛をモデルに腸管内原生動物と細菌の研究を始めた。

業　績

調査・研究

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. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性･有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部会に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及びNature Medicine等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続して行った。(竹内隆正、森　清一郎、石井克幸、柊元　巌、神田忠仁)

2. インスレーターを用いた高発現AAVベクターの開発

(1) AAVS1インスレーター搭載AAVベクターの改良

骨格筋特異的プロモーターであるマウスMCKプロモーターを持つAAVベクターにAAVS1インスレーターを搭載し､さらにキャプシドの一部をAAV1と相同なアミノ酸配列に置換し、それとは別の領域のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した。これらの改良の組み合わせによりマウス骨格筋で200倍の発現増強効果があった。MCKプロモーターの骨格筋特異性は改良型ベクターにおいても保持されていた。治療用遺伝子を発現させる土台として有用なベクターである。(竹内隆正、村上　功、神田忠仁)

(2) AAVS1インスレーター機能の解析

マウス細胞でのAAVS1インスレーターの解析から、マウス蛋白質Zfp143がAAVS1インスレーターに結合することが示唆されたので、ヒト細胞中でのZNF143（Zfp143のヒトホモログ）の結合を調べた。クロマチン免疫沈降により、HeLa S3細胞及びヒト初代筋芽細胞において、ZNF143がAAVS1インスレーターに結合していることが分かった。HeLa S3細胞でZNF143を過剰発現させると、AAVS1インスレーターの下流にある*PPP1R12C*遺伝子のmRNAが増加し、逆にsiRNAを用いてZNF143をノックダウンすると*PPP1R12C* mRNAが減少した。ZNF143はAAVS1インスレーターに結合して*PPP1R12C*遺伝子の転写を促進していることが示された。ZNF143がAAVS1領域への遺伝子挿入効率や、挿入遺伝子の転写に及ぼす影響について研究を進める。(竹内隆正、神田忠仁)

II. HPVに関する研究

1. HPV増殖機構の研究

(1) HPV DNAのローリングサークル型複製

HPV DNAの無細胞複製系を構築し、W12細胞（HPV16 DNAを維持しているヒト子宮頸部上皮細胞)の抽出液中では、HPV DNAがローリングサークル型のDNA複製機構により複製されることが分かった。W12細胞抽出液にヒト胎児腎293細胞の抽出液を加えると、ローリングサークル型複製が抑制されたことから、293細胞にはローリングサークル型複製の抑制因子があることが示唆された。(松尾理加、柊元　巌、神田忠仁)

(2) HPVのヌクレオソーム構造の解析

HPV持続感染細胞（HPV16感染W12細胞、及びHPV31感染CIN612細胞）を用いて、HPVゲノムのヌクレオソーム構造を調べた。増殖もしくは分化する条件で細胞を培養し、NP40処理の後、MNase処理を行うことで単ヌクレオソームに相当するDNAを得た。各HPVゲノムのLCR～E6遺伝子領域にわたり30塩基ごとにPCRアンプリコンを設定し、リアルタイムPCRで定量した。どちらの細胞も培養条件により、HPVゲノム内のMNase耐性領域が変化した。HPV16とHPV31で同様の変化を示す領域があり、宿主細胞の分化と連動してヌクレオソーム構造が変化する共通機能領域の可能性がある。(村上　功、竹内隆正、柊元　巌、神田忠仁)

(3) ヒト核小体蛋白質nucleolinがHPV複製に及ぼす効果

HPV16ゲノムの特異的部位に結合するnucleolinが、HPV16の複製DNAヘリカーゼであるE1蛋白質と結合することを、Far-Western法を用いて明らかにした。293細胞抽出液を用いた無細胞HPV DNA複製系に組換えnucleolin蛋白質を加えることで、nucleolinのHPV DNA複製における役割を検討したが、効果は認められなかった。今後は細胞内でnucleolinをノックダウンした時のHPV複製への影響を検討する。(柊元　巌、松尾理加、神田忠仁)

2. HPV感染状況についての調査・研究

(1) 我が国のHPV遺伝子型分布の調査

十分な感度と特異性を持つHPVタイピング法を用いて、我が国の女性に感染しているHPV遺伝子型の調査を開始した。NTT 東日本病院婦人科を受診した女性から子宮頸管部細胞を収集し、DNAを抽出して、PGMYリバースブロッティング法を用いてHPVタイピングを行った。2010年

2 月までに 393 検体を解析し、HPV 陽性率は 50%、その内の 31%の検体から複数の HPV 型が同時に検出された。従来の成績以上に複合感染が多い HPV 感染の実態が示されつつある。(柊元　巌、松尾理加、近藤一成[NTT 東日本病院]、神田忠仁)

(2) HPV タイピング方法の再検討

HPV タイピングで汎用されている PCR システム(MY09/11、PGMY、GP5+/6+、MGP、L1C1/C2)の間で、2 種類の型の HPV DNA が混在するときの検出精度を比較した。HPV6、16、18、31、51、52、58 の全長ゲノムをクローニングしたプラスミドを用いて、6000 コピーの HPV16 DNA と 6000、600、60、6 コピーのその他の型の DNA を混合した試料を調整した。各 PCR を行い、型特異的な DNA プローブを用いたリバースブロットハイブリダイゼーション法により PCR 産物の検出・型判別を行った。全ての PCR システムで、片方の型の検出感度が低下する干渉現象が認められた。特に主に日本で使用されてきた L1C1/C2 PCR では、6000 コピーの HPV16 DNA と 600 コピーの HPV18 または HPV51 DNA が混在する条件では、HPV16 DNA が検出されなかった。L1C1/C2 PCR を用いた過去のデータは、複合感染する HPV が正確に検出されていない可能性がある。(中尾砂理、森　清一郎、柊元　巌、神田忠仁)

(3) 新しい HPV タイピング方法の開発

蛍光ビーズソーターを用いて HPV 遺伝子型を判別する新しい方法を開発した。HPV DNA の L1 遺伝子領域を MGP PCR にて増幅し、HPV 型特異的プライマー伸張反応によりビオチン付加ヌクレオチドを取り込ませる。この DNA をマイクロビーズに結合した HPV 型特異的プローブとハイブリダイゼーションさせ、蛍光ストレプトアビジンで標識した後、蛍光ビーズソーターにて検出する。この方法により、HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 を十分な感度と特異性で判別することが可能であった。また本方法は、臨床検体の HPV タイピングにも適応可能であった。(柊元　巌、松尾理加、斉藤　督[理研ジェネシス])

3. 交差性中和エピトープをもつワクチンの開発

(1) 高リスク型共通中和抗体による HPV 感染抑制機構

HPV16 キャプシド副構成蛋白質 (L2) のアミノ酸 56-75 領域には、高リスク型 HPV に共通の中和エピトープが存在する。レポータープラスミドを含む HPV16 擬似ウイルス粒子を用い、このエピトープに結合する中和抗体が、細胞内でキャプシドから DNA が遊離する脱殻過程を阻害することが分かった。L2 の 56-75 領域は脱殻過程に必要な機能を担うことが示され、この機能は全ての高リスク型 HPV に共通だと考えられる。(石井克幸、田中恵子[感染病理部]、近藤一成、竹内隆正、神田忠仁)

(2) 高リスク型共通中和抗体による HPV31 authentic virion 感染の中和

CIN612 細胞を分化させる三次元培養法を用いて、HPV31 の authentic virion を調整した。HPV16 L2 のアミノ酸 56-75 領域に対する高リスク型共通中和抗体が、この authentic virion のヒト HaCaT 細胞に対する感染を中和することが分かった。型共通中和抗体が実際の HPV 感染を、幅広く防御できることが示唆された。(石井克幸、中原知美、森　清一郎、神田忠仁)

(3) HPV51 Ma 株の L2 に結合する細胞蛋白質の同定

HPV51 プロトタイプ (Nu 株) と日本で分離された HPV51(Ma 株)の L2 は、二つの領域でアミノ酸配列が大きく異なり、Ma-L2 を持つ擬似ウイルス粒子を細胞に接種するとレポーターが発現するが、Nu-L2 を持つ擬似ウイルス粒子では発現しない。FLAG-Ma-L2 を 293FT 細胞で発現させ精製し、質量分析法により Ma-L2 に特異的に結合する細胞蛋白質を同定した。この蛋白質をノックダウンした 293FT 細胞及び HeLa S3 細胞に、Ma-L2 を持つ HPV51 擬似ウイルス粒子を接種すると、レポーターの発現が低下した。この細胞蛋白質が HPV 感染の初期過程に働くことが示唆される。(石井克幸、神田忠仁)

III.　病原性ウイルスのゲノム解析

1.RNA ウイルスゲノムの解析

(1)ノロウイルス(NoV)のゲノム解析

2006 年 5 月ー2010 年 3 月の間に全国 20 カ所の衛生研究所で収集した感染者糞便を用い、計 276 の NoV 遺伝子型 GII/4 のゲノム全長の塩基配列を得た。少なくとも 7 種の GII/4 の単系統亜株(2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008b と命名) が急性胃腸炎の集団発生に関わっていた。4 種は、進化起源の異なる配列が組み合わさって生じたモザイクゲノムをもっていた。4 種に共通するゲノム組換え点として、ORF1/ORF2 境界の高度保存領域を見いだした。この領域での組換により、別個に進化した近縁のノロウイルスの間で、複製関連遺伝子とカプシド遺伝子の変異セットを効率よく交換できる。これにより、複製能と免疫逃避能をバランスよく変化させたウイルスが迅速に発生し、ウイルスの適応変化能力を

高めている可能性がある。得られた情報は、ノロウイルスサーベランスに還元した。(本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、神田忠仁、岡智一郎[ウイルス二部]、片山和彦[ウイルス二部]、武田直和 [ウイルス二部]、佐藤裕徳)

糞便試料の収集は以下の 25 名の方々の協力による(敬称略)。田中智之 (堺市衛生研究所)、野田衛 (国立医薬品食品衛生研究所)、吉澄志磨 (北海道立衛生研究所)、三上稔之 (青森県環境保健センター)、斉藤博之 (秋田県健康環境センター)、植木洋(宮城県保健環境センター)、高橋朱実、蛇口哲夫、高橋知子 (岩手県環境保健研究センター)、篠崎邦子 (千葉県衛生研究所)、吉田徹也 (長野県環境保全研究所)、田村務 (新潟県保健環境科学研究所)、滝澤剛則 (富山県衛生研究所)、東方美保 (福井県衛生環境研究センター)、小林慎一(愛知県衛生研究所)、内野清子 (堺市衛生研究所)、入谷展弘 (大阪市立環境科学研究所)、飯塚節子 (島根県保健環境科学研究所)、福田伸治 (広島県立総合技術研究所保健環境センター)、伊藤文明 (広島市衛生研究所生物科学部)、近藤玲子、山下育孝 (愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸 (佐賀県衛生薬業センター)、松岡由美子(熊本市環境総合研究所)、岩切章 (宮崎県衛生環境研究所)

(2)インフルエンザウイルス(IFV) のゲノム解析 1

2009 年に日本国内に流行した A/H1N1pdm に罹患し重症または死亡した群 (27 症例) を対象に、全 8 分節 (計 13500bps) の配列情報 (約 3.6×10^5 塩基) を取得した。重症化とリンクする変異は特定できなかった。2009 年 9 月から 2010 年 1 月までの期間に、日本、東アジアで流行したインフルエンザウイルス-150 株の NA 遺伝子の配列情報 (約 2.3×10^5 塩基) を取得した。得られた情報は、2010 年 2 月に WHO で開催された北半球ワクチン株選定会議、ならびに国内のワクチン株選定会議の流行株遺伝子資料として活用された。(本村和嗣、佐藤彩[インフルエンザ研究センター]、中村浩美、守宏美、神田忠仁、氏家誠[インフルエンザ研究センター]、小渕正次 [インフルエンザ研究センター]、安楽茜[インフルエンザ研究センター]、小田切孝人[インフルエンザ研究センター]、佐藤裕徳)

(3)インフルエンザウイルス(IFV) のゲノム解析 2

独自に取得したインフルエンザウイルスゲノム情報、および公共データベースの配列情報を解析し、2009 年 4 月ー2010 年 1 月の間に流行した新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm 準種の相互の遺伝距離、遺伝子再集合の有無、エンベロープタンパク質の可変部位、ヒトで流行が拡大する過程で定着したアミノ酸変異に関する情報を収集した。A/H1N1pdm がブタからヒトに伝搬した際にボトルネック効果が働き、ごく少数の近縁ウイルスが選択されて世界的流行の主因となったこと、これらは HA と NA の結合ポケットの周辺に位置する特徴的変異を 3 つもつこと、HA と NA の遺伝的多様性は低いレベルで漸増したが、12 月の時点でも高い均一性を保っていたこと (HA の遺伝距離:4 月=$1.7\text{x}10^{-3}\pm3\text{x}10^{-4}$→12 月=$4.9\text{x}10^{-3}\pm7\text{x}10^{-4}$、NA の遺伝距離: 4 月=$0.9\text{x}10^{-3}\pm2\text{x}10^{-4}$→12 月=$3.4\text{x}10^{-3}\pm7\text{x}10^{-4}$)、HA、NA の可変部位は主に表面に分布していること、低頻度ではあるがタミフル耐性変異 H275Y が国内で維持されていること、等を示した。(横山勝、本村和嗣、小渕正次[インフルエンザウイルス研究センター]、氏家誠[インフルエンザウイルス研究センター]、小田切孝人[インフルエンザウイルス研究センター]、田代眞人[インフルエンザウイルス研究センター]、神田忠仁、佐藤裕徳)

(4) インフルエンザウイルス(IFV)のゲノム解析 3

国内のパンデミック・インフルエンザ A ウイルスによる死亡例の肺剖検サンプル中の全 RNA の配列を包括的に解読した。全解読リード (947 万本) のうち、インフルエンザ A ウイルス配列が約 8 万本 (0.85%) 存在した。ウイルス配列を平均 x200 以上のカバレージで解読し、ヘマグルチニン遺伝子配列 (HA, セグメント 4) の 3 箇所で塩基が混在していた。少なくとも、2 種類のヘマグルチニン配列の存在が示唆された。抗原性や肺上皮細胞のシアル酸 (α2-6 及び α2-3) への親和性の異なるウイルスが混在していた可能性がある。(黒田誠、関塚剛史、片野晴隆[感染病理部]、中島典子[感染病理部]、佐多徹太郎[感染病理部]、佐々木裕子[細菌第二部]、荒川宜親[細菌第二部]、神田忠仁)

(5)C 型肝炎ウイルス (HCV) のゲノム解析

HCV 感染者のインターフェロン治療耐性に関わるウイルス側の要因を探索する研究を進めた。FLX を用いて、HCV 感染者の血液試料中の HCV ゲノム情報を包括的に収集するシステムを作った。本来、宿主ゲノム情報を基に治療感受性と予測されながら (IL-28 に関する危険遺伝子多型をもたない患者)、PEG-IFN+RBV 治療に不応答であった患者を含む 14 名の HCV 感染者の血液中に存在する HCV ゲノムの情報を次世代シークエンサーFLX を用いて網羅的に取得した (約 4.0×10^8 塩基)。現在、治療不応

答の患者のウイルスに特徴的な塩基やアミノ酸、並びに治療後のウイルスに特徴的な塩基やアミノ酸の有無を調べている。(本村和嗣、大出裕高、杉山真也[国立国際医療センター　肝炎免疫研究センター]、中村浩美、守宏美、横山勝、田中靖人[名古屋市立大学]、神田忠仁、溝上雅史[国立国際医療センター　肝炎免疫研究センター]、佐藤裕徳)

2. 病原性ウイルスゲノムデータベースの構築

病原体ゲノムデータベースサーバおよび解析サーバの更新を行った。データベースサーバは Altix350 から Altix450 (Itanium2 1.66GHz/18MB x 6, 24GB)に、解析サーバは Altix350 から Altix XE270 (Xeon X5560 2.8GHz/8MB x 2, 24GB)に変更し、サーバの演算能力が２倍以上に向上した。引き続き、自動更新システムを用いて、８種の病原性ウイルス（インフルエンザウイルス、ウエストナイルウイルス、ノロウイルス、ブタ内在性レトロウイルス、ポリオウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、C 型肝炎ウイルス）の最新のゲノム情報を蓄積した。(横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳)

3. 病原性ウイルスの中和に関わる領域の構造解析

(1) HIV-1 の中和感受性を制御する構造要因の特定

HIV-1 エンベロープ Gp120 のコアから突出する V3 ループは、感染補受容体との結合に関わり、抗体の中和エピトープが存在する。これまでに、V3 の正電荷量が変異により低下すると、V3 の立体配置が変化し、ウイルスの抗 V3 抗体中和感受性が低下することを見出した。本年は、組換え実験と *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、V3 の電荷が V3 自身だけでなく gp120 コアの構造と中和エピトープの露出度をも制御することを見いだした。分子動力学法を用いた立体構造解析により、V3 の正電荷が低下すると gp120 のコア内に位置する CD4 結合ループの露出度が低下することがわかった。V3 組換え HIV を用いた中和試験により、V3 の正電荷が低下すると CD4 結合ループを標的とする種々の単抗体へのウイルスの中和感受性が低下することがわかった。V3 の正電荷量は、Gp120 の構造とウイルスの中和感受性の制御因子であることを明らかにした。(横山　勝、長縄　聡[横浜市大、臨床研]、松下修三[熊本大、エイズ学研究センター]、神田忠仁、佐藤裕徳)

(2) HIV/SIV の TRIM5α感受性を制御する構造要因の特定

TRIM5α は、HIV/SIV 感染の阻害活性をもつ細胞性抗ウイルス蛋白質で、ウイルスのカプシド蛋白質に作用する。塩田らは、感染阻害効果はウイルス特異的で、HIV/SIV の宿主域の決定に関与することを示した。本研究では、変異導入解析と *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、HIV-2/SIVmac239 カプシドの TRIM5α の結合に関わるアミノ酸の種類と配置を新たに特定した。これらは、すべてカプシドのコアの外表面のループまたはヘリックスに位置していた。(横山　勝, 中山英美[阪大微研], 塩田達男[阪大微研], 佐藤裕徳)

(3)サル免疫不全ウイルス（SIV）の CTL 逃避と増殖能の回復を支える構造要因の特定

俣野らは、サル感染モデル等により、SIV の CTL 逃避変異は、しばしばウイルス複製能の低下に結びつくことを示した。本研究では、CTL 逃避ウイルスの馴化実験、変異導入解析、および *in silico* 立体構造解析を組み合わせることで、SIVmac239 の CTL 逃避と増殖能の回復を支えるカプシドのアミノ酸の種類と配置を特定した。CTL 逃避と増殖能の回復に関わる３つの変異は、カプシドがその機能単位であるヘキサマー構造をとったときに互いに近接することがわかった。また隣接するカプシドモノマー間で推定結合ポケットを形成することがわかった。これらのアミノ酸は、ヘキサマーにおけるカプシド分子間の相互作用、あるいはヘキサマーと宿主因子の相互作用に重要な働きをしている可能性がある。(横山　勝, 武内寛明[東大医科研], 梁明秀[横浜市大], 俣野哲朗[東大医科研], 佐藤裕徳)

4.病原性ウイルスの薬剤設計に関する構造解析

(1)ノロウイルスの酵素の構造解析

ノロウイルスの酵素を標的とする増殖阻害薬の設計を目的する。変異導入解析、*in silico* 立体構造解析、および分子進化を組み合わせることで、ヒト由来ノロウイルス（hNoV）とマウス由来ノロウイルス（mNoV）のプロテアーゼおよびポリメラーゼの活性部位、立体構造、および保存部位と可変部位の位置を解析した。プロテアーゼの切断活性に必須のアミノ酸 (H,D/E,C,H)、ポリメラーゼの RNA 合成活性に必須の YGDD モチーフと近傍の保存モチーフ A の立体配置は、hNoV U201 株と mNoV S7-PP3 株の分子モデルでほぼ一致していた。前駆体の切断反応、および RNA 合成反応に直接、間接に関わるアミノ酸の配置は、hNoV と mNoV の間でよく保存されていることがわかった。mNoV 増殖系を用いて hNoV 増殖阻害剤候補のスクリーニングを進める予定でいる。(横山　勝、岡智一郎[ウイルス２部]、遠矢幸伸[日大] 、片山一彦[ウイルス２部] 、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 逆転写酵素 (RT) の薬剤耐性獲得機構

潟永らは、HLA B*51 拘束性 CTL を持つ患者体内で HIV-1 RT に CTL エスケープ変異 I135X(X=L,V,T,R)が出現し、定着すること、I135X が E138K と同時に生じることで、ウイルスは非核酸系 RT 阻害薬(NNRTI; EFZ、NVP、ETV)に耐性となることを見つけた。ホモロジーモデリング法を用いて RT と薬剤の複合体モデルを構築し、変薬剤耐性獲得の分子機序を調べた。I135X/E138K 変異により、EFZ、NVP、ETV が入り込むポケットの形が変化し、薬物-酵素間の親和性が低下することを見出した。原子レベルでの耐性発現機構の解明により、薬剤改変の基盤を得た。HLA 型に依存する新しい薬剤耐性変異の発見により、遺伝子検査の臨床応用性の向上に寄与した。(大出裕高、横山勝、潟永博之[国立国際医療センター]、佐藤裕徳)

(3) HIV-1 プロテアーゼ (PR) の基質特異性発現機構

HIV-1 PR は、ウイルスの Gag 蛋白質前駆体の特定箇所を順序だって切断する。*in silico* 立体構造解析と実験データを組み合わせることで、基質の切断効率を制御する基質自身の構造特性を特定した。ホモロジーモデリング法とレプリカ交換分子動力学法を用いて切断部位周辺の構造特性を明らかにし、プロテアーゼ結合効率および Gag 前駆体の切断効率と相関する構造特性が存在することを明らかにした。HIV-1 PR 活性阻害薬開発・改良の基盤情報が得られた。(大出裕高、横山勝、神田忠仁、佐藤裕徳)

IV 病原性細菌のゲノム解析

1. 病原性細菌のゲノム解析

(1)炭疽菌のゲノム解析

次世代シークエンサーを用いて、日本で分離された炭疽菌２株のゲノム解析を実施した。公開ゲノム配列を合わせた計 19 株の比較ゲノム解析で、2,965 箇所の１塩基多型 (SNP)を同定し tag-SNPs による遺伝子検査体制を整えた。この簡易検査法により、食中毒起因菌であるセレウス菌など炭疽菌近縁種との鑑別、菌株の系統関係の推定、などを実施する基盤をつくった。炭疽菌・キノロン中等度耐性株のゲノム解読により、炭疽菌感染の第一治療薬であるキノロン剤耐性に関与しうる薬剤排泄系遺伝子群を同定した。実験によりこの遺伝子群の変異で中等度耐性になることを明らかにした。従来の遺伝子検査対象 (gyrase AB, topoisomerase IV) に加え、包括的な検査体制に有用な新規遺伝子ターゲットを同定した。(芹澤昌邦、関塚剛史、黒田誠、奥谷晶子[獣医科学部]、井上智[獣医科学部]、神田忠仁)

(2) 薬剤耐性食中毒菌のゲノム解析

ヒトおよび食品由来の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Infantis, Typhimurium, およびその他血清型 (タイ分離) の薬剤耐性株を中心に計 20 株の全ゲノム配列を解読した。*S. enterica* のコアゲノムに存在する SNP を 65,844 箇所抽出した。ここ数年伝播が危惧されている Typhimurium 薬剤耐性の代表株 T000240 について、製品評価技術基盤機構との共同で全ゲノム配列を取得し、耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てとそのアイランド構造を明らかにした。(黒田誠、関塚剛史、泉谷秀昌[細菌第一部]、渡邊治雄[細菌第一部])

2. 川崎病患者の体内の微生物ゲノムの包括的解析

川崎病は、小児 (主に 6 ヶ月ー5 歳) の 200 人に１人が罹患する原因不明の難治性疾患である。次世代シークエンサーを用いて、川崎病患者の血清 (13 名)、咽頭ぬぐい液 (2 名)、およびリンパ節 (１名) 中の核酸情報を網羅的に収集した。1 検体につき 300ー900 万本のリードを収集し、相同性検索で病原体候補配列を抽出した。血清由来リードの平均 95% はヒト配列に由来し、ウイルス・細菌を含む病原体候補は全体の１％弱であった。咽頭ぬぐい液では半数が細菌由来の配列であった。リンパ節検体では、細菌群の検出率が DNA で 0.22%、RNA で 19.9%となり、腸内細菌群が多数検出され、便の構成細菌種と類似した検出プロファイルであった。咽頭由来であるインフルエンザ菌、肺炎球菌は検出されたが、A 群レンサ球菌の配列は検出されなかった。広範な細菌群の検出は全身性炎症の進行を示唆する。*Mycobacterium* 属に類似した配列を見出し、新規の *Mycobacterium* sp. がリンパ節組織に存在していた可能性が示唆された。(黒田誠、関塚剛史、水谷哲也[ウイルス第１部]、片野晴隆[感染病理部]、佐藤誠一[新潟市民病院]、大場邦弘[公立昭和病院]、森雅亮[横浜市立大]、横田俊平[横浜市立大])

3. 細菌叢の解析

(1) 動物腸管内の原生動物中の細菌叢の解析

動物の腸管内の一部の細菌は原生動物に内在し、原生動物をベクターとして別の宿主へ感染する可能性がある。牛糞便中には、*Blastocystis*属および*Balantidium*属の原虫が高頻度に検出された。検出された原虫は、これまで報告の無かった新種である事が示唆された。16S rRNA遺伝子のシークエンスおよびT-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法の解析結

果から、*Balantidium*属に内在する細菌叢は、糞便中で優勢なBacteroidetes等ではなく、偏性嫌気性細菌*Mogibacterium*, *Lactococcus*および*Turicibacter*属細菌であることが判明した。(関塚剛史、黒田誠)

(2) 口腔常在菌*Streptococcus salivarius*のゲノム解析

口腔常在菌叢のなかでも最優勢種である*S. salivarius*は、虫歯や口臭などの原因菌の口腔内バランスを調節するプロバイオティクスとして注目されている。*S. salivarius* HT9R 株の網羅配列解読を行ない、約 300 万のリード配列を得た。ABySS-pe による *de novo* assembly の結果、約 100 本の Contig 配列を得た。また、別の Euler-SR によるアセンブル結果と併せて最終的に 5 本の Super -contig にまで繋げることができた。今後、口腔内に常在する種々の *Streptococcus* 属の比較ゲノム解析を行い、*S. salivarius* のゲノム特性を解明し、実験も交えて口腔常在菌としての生理的役割を解析する予定である。(坂野聡美、関塚剛史、黒田誠、泉福英信[細菌第一部])

品質管理に関する業務

HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチンの国内承認に際して、その生物学的製剤基準案を所内で取りまとめ、検定基準を作成した。2009 年 10 月に承認された HPV ワクチンの検定を、製剤担当室として開始した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。(松尾理加、柊元　巌、神田忠仁)

国際協力関係業務

WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク(HPV ラボネット)の、西太平洋地域 Regional Reference Laboratory としての活動を行った。HPV ラボネットが主催する HPV DNA proficiency panel 及び HPV serology proficiency panel に参加し、十分な能力を持つ HPV ラボとして認定を受けた。また HPV ラボネットが主催するトレーニングワークショップに参加し、感染研での標準的 HPV アッセイの導入について講演した。(柊元　巌、松尾理加、近藤一成[NTT 東日本病院]、川名　敬[東京大学医学部産婦人科教室]、神田忠仁)

発 表 業 績 一 覧

I.　I. 誌 上 発 表

1.　欧文発表

1) Ode H, Yokoyama M, Kanda T, and Sato H. Identification of folding preferences of cleavage junctions of HIV-1 precursor proteins for regulation of cleavability. J. Mol. Model. In press (2010)

2) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, de Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotten M. HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. Vaccine. 28 Suppl 2:B60-7,2010.

3) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Takiguchi M, Oka S. Impact of human leukocyte antigen-B*51-restricted cytotoxic T-lymphocyte pressure on mutation patterns of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. AIDS. 24(5):F15-22, 2010.

4) Gatanaga H, Ode H, Hachiya A, Hayashida T, Sato H, Oka S. Combination of V106I and V179D polymorphic mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to efavirenz and nevirapine but not etravirine. Antimicrob Agents Chemother. 54:1596-602, 2010.

5)Yokoyama M, Mori H, Sato H. Allosteric regulation of HIV-1 reverse transcriptase by ATP for nucleotide selection.. PLoS One. 5:e8867, 2010.

6) Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn J Infect Dis. 63:67-71, 2010.

7) Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S. Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. J Vet Med Sci. 72: 93-97. 2010.

8) Sato, H., Kusumoto-Matsuo, R., Ishii, Y., Mori, S., Nakahara, T., Shinkai-Ouchi, F., Kawana, K., Fujii, T., Taketani, Y., Kanda, T. and Kukimoto, I. Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. Biochem Biophys

Res Commun, 387, 525-530, 2009.
9) Kondo, K, Ishii, Y, Mori, S, Shimabukuro, S, Yoshikawa, H, Kanda, T. Nuclear location of minor capsid protein L2 is required for expression of a reporter plasmid packaged in HPV51 pseudovirions. Virology, 394, 259-65, 2009.
10) McCord, RA., Michishita, E., Hong, T., Berber, E., Boxer, LD., Kusumoto, R., Guan, S., Shi, X., Gozani, O., Burlingame, AL., Bohr, VA. and Chua, KF. SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. Aging (Albany NY), 1, 109-121, 2009.
11)Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. Virology. 394:119-29. 2009.
12)Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, Motomura K, Sato H, Kitamura K, Pohan HT, Sato S. Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia.AIDS Res Hum Retroviruses. 25:637-46,2009.
13) Kamiyama H, Yoshii H, Tanaka Y, Sato H, Yamamoto N, Kubo Y. Raft localization of CXCR4 is primarily required for X4-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. Virology 386:23-31,2009.

2. 和文発表

1) 佐藤裕徳, 大出裕高, 本村和嗣, 横山勝: HIV の構造と感染・増殖の分子機構、日本臨床 67：37-42、2009.
2) 本村和嗣： Analysis of genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2、日本感染症学会誌、 83:81-93、2009.
3) 本村和嗣,横山勝,佐藤裕徳:ヒトノロウイルス 2006 年株、臨床と微生物、5：205-209、2009.

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Ishikawa J, Hoshino Y, Kuroda M, and Sekizuka T. Discovery of secondary metabolite biosynthetic genes in *Nocardia brasiliensis* by genome scanning with next generation sequencer. The 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA'15) (2009 年 8 月、中国)
2) Kukimoto, I. Genotyping of Human Papillomavirus by PGMY-reverse blot hybridization. The 6th Japan-Taiwan Symposium on 2009 Influenza Pandemic, Enteric Virus Infection and New Development for Rapid Diagnosis (2009 年 9 月、東京)
3) Kukimoto, I. Experience of setting up the PGMY-RBH assay in a regional reference laboratory. The WHO HPV LabNet Training Workshop on HPV Genotyping and HPV Serology Laboratory Performance (2010 年 3 月、ローザンヌ)
4)Yokoyama M, Naganawa S, Kitamura K, Sato H. Influence of Net Positive Charge in V3 Sequence on Conformation of HIV-1 gp120 outer domain. 5TH GERMAN-JAPANESE HIV-SYMPOSIUM、(第 5 回日独 HIV シンポジウム)、(2010 年 3 月、東京)

2. 国内学会

1)横山 勝, 長縄 聡, 北村勝彦, 佐藤裕徳：HIV-1 エンベロープ蛋白質の荷電変化によるウイルス中和感受性と細胞指向性の調節. 第 9 回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ (2009 年 5 月、熊本)
2)本村和嗣、横山勝、岡智一郎、中村浩美、守宏美、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan：2006-2008 秋冬期までに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析、第 30 回衛生微生物技術協議会、 ウイルス性下痢症 シンポジウム (2009 年 7 月、大阪)
3) 神田忠仁：次世代 HPV ワクチンの開発、第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月)
4) 森 清一郎、石井克幸、近藤一成、神田忠仁：ヒトパピローマウイルス 51 型 (HPV51) キャプシドに組み込まれたレポーターの発現と副キャプシド蛋白質 (L2) の機能、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
5) 石井克幸、田中恵子、近藤一成、竹内隆正、神田忠仁：高リスク型共通中和抗体によるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染抑制機構、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
6) 佐藤英貴、松尾理加、石井克幸、中原知美、森 清一郎、柊元 巌、神田忠仁：ヒト核小体蛋白質 nucleolin は HPV16 ゲノム DNA に結合する、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)
7) 村上 功、竹内隆正、藤井多久磨、青木大輔、神田忠仁：骨格筋特異的・高発現アデノ随伴ウイルスベクター

の開発、第57回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

8) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、Norovirus Surveillance Group、佐藤裕徳：ノロウイルスGII/4ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化、　第５７回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ（2009年10月、東京）

9) 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、Norovirus Surveillance Group、佐藤裕徳：ノロウイルスGII/4の変異、第21回　ウイルス性下痢症研究会　特別企画（2009年10月、東京）

10)横山　勝、岡　智一郎、片山　和彦、遠矢 幸伸、神田　忠仁、武田　直和、佐藤　裕徳：マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性、第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

11)横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3ループ構造の安定性を制御するアミノ酸、第５７回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ（2009年10月、東京）

12)大出裕高，横山勝，神田忠仁、佐藤裕徳：HIV-1前駆体蛋白質の切断効率を制御する構造特性、　第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

13)大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、岡慎一、神田忠仁、潟永博之、佐藤裕徳：HIV-1のEFV／NVP耐性獲得とETVの抗HIV活性維持の分子機序、第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

14)野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫：HIV-1 Envの１アミノ酸変異による増殖促進機構の解析、第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

15)久保嘉直、吉居廣朗、神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：カテプシンＢ抑制因子によるCD4非依存性HIV-1感染の促進、第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

16)神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳，山本直樹，久保嘉直：HIV-1 感染における標的細胞中のエズリン・リン酸化の重要性、第５７回日本ウイルス学会学術集会（2009年10月、東京）

17)齊藤麻理子、井上智、神垣太郎、杉浦尚子、Bazartseren Boldbaatar、野口章、関塚剛史、黒田誠、鈴木陽、押谷仁：フィリピンにおける狂犬病ウイルスの分子疫学的検討、第５７回日本ウイルス学会学術集会　（2009 年 10月、東京）

18)森雅亮、黒田誠、関塚剛史、大場邦弘、水谷哲也、横田俊平：川崎病の原因究明－III.プロテオーム解析法を用いた患者血清の網羅的解析、第29回日本川崎病研究会（2009年10月、名古屋）

19) 黒田誠、関塚剛史、佐藤誠一、大場邦弘、濱田洋通、寺井勝、緒方昌平、石井正浩、森雅亮、横田俊平、水谷哲也：川崎病の原因究明－II. 次世代シークエンサーによる網羅的解析、第29回日本川崎病研究会　（2009年10月、名古屋）

20) 水谷哲也、黒田誠、関塚剛史、大場邦弘、緒方昌平、石井正浩、森雅亮、横田俊平：川崎病の原因究明－I. ウイルスの網羅的解析、第29回日本川崎病研究会　（2009年10月、名古屋）

21) 大出裕高，横山勝，神田忠仁、佐藤裕徳：HIV-1 前駆体蛋白質切断部位の構造特性と切断効率の関連、第２３回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月、名古屋）

22)大出裕高、横山勝、蜂谷敦子、岡慎一、神田忠仁、潟永博之、佐藤裕徳：HIV-1 逆転写酵素 V106I/V179D 変異による NNRTI 活性変化の分子機序、第２３回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月、名古屋）

23)野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫：サル指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析、第２３回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月、名古屋）

24) Ivo N Sah Bandar、高橋 清実、本村 和嗣、長縄　聡、北村 勝彦，佐藤 裕徳、佐藤 成大：Near full length sequence analysis of CRF33_01B among Indonesian patients 、第２３回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月、名古屋）

25)横山勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳：HIV-1 Env V3ループ構造の安定性を制御するアミノ酸、第２３回日本エイズ学会学術集会・総会（2009年11月、名古屋）

26)黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智：全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索、第92回日本細菌学会・関東支部会（2009年11月、東京）

27)本村和嗣：ウイルス感染症の実態、平成21年度下期協同組合中央接骨師会（2009年12月、東京）

28) 黒田誠、芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、坂野聡美、井上智：全ゲノム解読による炭疽菌・キノロン耐性領域の探索、第83回日本細菌学会・総会　（2010年3月、横浜）

29) 関塚剛、黒田誠：illumina GAII による 16SrDNA 配

列を用いた網羅的且つ定量的な細菌叢解析、第83回日本細菌学会・総会　(2010年3月、横浜)
30) 坂野聡美、奥谷晶子、井上智、黒田誠：炭疽菌病原プラスミドにコードされる分泌タンパク質の培養細胞への影響、第83回日本細菌学会・総会　(2010年3月、横浜)
31) Kusumoto-Matsuo, R., Kukimoto, I. and Kanda, T. Human papillomavirus DNA replicates with rolling circle mode in a cell-free system. 第20回DNA複製・組換え・修復ワークショップ (2009年11月、彦根)
32) 松尾理加、柊元　巌、神田忠仁：無細胞系におけるヒトパピローマウイルスDNAのローリングサークル型複製、第32回日本分子生物学会 (2009年12月、横浜)

２２．インフルエンザウイルス研究センター

センター長　田 代 眞 人

概　要

当センターは、インフルエンザに関する研究・開発業務及び国の新型インフルエンザ事前準備と緊急対応体制を強化する目的で、平成21年4月1日に、6室構成、定員27名で村山支所に新設された。業務はインフルエンザの病原・病因・予防・診断・治療法等に関する研究、レファランス業務、細胞培養ワクチン及び経鼻接種方法の開発、ワクチン製剤の品質管理及び国際協力である。第1室(ウイルスサーベイランス)、第2室(診断検査、国内外研修)、第3室(ワクチン製剤品質管理、GMP管理)、第4室(季節性・新型ワクチン製造株の開発)、第5室(細胞培養ワクチン開発)、第6室(経鼻接種ワクチン開発)が業務を分担・協力しながら実施している。

平成21年4月1日付で14名がウイルス第3部からインフルエンザウイルス研究センターへ配置転換された：田代眞人（ｾﾝﾀｰ長）、小田切孝人(第1室長)、影山努(第2室長昇任)、板村繁之(第3室長)、信澤枝里(第4室長昇任)、小渕正次、徐紅、氏家誠の各主任研究官；岸田典子(第1室)、佐藤佳代子(第3室)、高橋仁(第3、5室併任)、原田勇一(第3、5室併任)、有田知子(第4室)、白倉雅之(第4室)の各研究員。また長谷川秀樹が感染病理部から配置転換された（第6室長)。さらに平成21年4月1日付で山本典生（第5室長)、浅沼秀樹（主任研究官)、相内章（第6室研究員、感染病理部併任)、平成21年5月1日付で高下恵美(主任研究官)、中内美名(第2室研究員)、嶋崎典子(第3室研究員)、平成21年11月1日付で中村一哉（主任研究官)、平成21年12月1日付で浜本いつき(第5室研究員)が採用された。

センター設立直後に始まった(H1N1)2009パンデミックに対して、緊急に遺伝子診断系を開発し、全地衛研と検疫所に配布して国内診断体制を確立、また全所各部室の協力により、全国からの検体について24時間体制で確認検査診断を行った。また速やかにウイルス性状を解析し、遺伝子解析、交叉免疫の解析、抗ウイルス剤感受性などから、ウイルスは弱毒型で健康被害は軽度とのリスク評価を行った。WHO新型ワクチン株の開発、国産ワクチン株の選定、ワクチン接種方針の策定、臨床試験、国家検定に参画・従事した。一方、ワクチン緊急輸入に関して、承認前試験、安全性・有効性の検証、評価、審査に参画、生物学的製剤規準の策定、国家検定等を行った。

また、流行動向調査（サーベイランス）事業等を地衛研、感染症情報センターと協力して進め、流行ウイルスの抗原・遺伝子解析、流行予測、薬剤耐性モニターを継続し、厚労省の依頼に応じて季節性ワクチン製造株を選定した。また、必要な抗原解析及びワクチン品質管理用の各種標準品を製造・配布及び技術支援を行った。

ワクチン品質管理業務では、国家検定（季節性、新型及び緊急輸入ワクチン)、各標準品に関するレファランス業務を担当し、生物学的製剤GMPにも協力した。またワクチン国家検定SOP改定、標準品の開発整備、GMP中心の国際的品質管理体制の確立に努め、ワクチン製剤の安全性と有効性の確保というNCLの責任を果たした。

国際協力では、WHO監視網（GISN）の基幹であるWHOインフルエンザ協力センターとして、国際サーベイランス活動及びパンデミック緊急対応への助言・提言を行った。世界各国の分離株・臨床検体の解析、流行予測及び候補ワクチンの効果予測から、WHOワクチン推奨株を選定した。またWHO世界インフルエンザ計画(GIP)に参画してWHO及び我が国のパンデミック緊急対応及びインフルエンザ計画を推進した。WHO、JICA等の依頼に応じて、周辺諸国への技術指導、研修を行った。WHO H5N1指定研究室として、世界各地の高病原性インフルエンザウイルスの診断、分離、性状解析、技術支援を実施した。また、WHO Essential Regulatory Laboratoryとして、ワクチン製造候補株及び参照品の作製、国際標準化、分与及び周辺諸国への技術研修と精度管理試験等を実施した。

国の新型インフルエンザ計画として、5年後に、半年以内により有効なワクチンを国民全員に供給できる体制の確立を

目標に、細胞培養ワクチン及び経鼻接種方式の実用化に関する開発研究を、WHO 及び国内外ワクチンメーカーと協力して推進し、細胞株の選択、ウイルス分離・継代における安定性検証などの実績を上げた。

業　績

調査・研究

1. 新型インフルエンザ発生前のヒト血清抗体と新型インフルエンザウイルスの交叉反応の評価に関する研究

国内の 2008 年度季節性インフルエンザワクチン接種者を対象とし、高齢者層と成人層のそれぞれ３０人から採取したワクチン接種前後の血清を用いて、新型インフルエンザ A/California/7/2009 (H1N1)pdm（以下 Cal/7/09）に対する中和抗体の交差反応性を調べた。その結果、75 歳以上の高齢者層では、ワクチン接種前から Cal/7/09 に対して 40 倍以上および 160 倍以上の抗体保有者はそれぞれ 40%、10%の割合で見られた。一方、成人層では Cal/7/09 に対して 40 倍以上の抗体保有者は一人（3.3%）のみであった。このことから、高齢者層の一部は過去に Cal/7/09 と抗原性が類似したウイルスに暴露された可能性が示唆された。[岸田典子、徐紅、高下恵美、小渕正次、氏家誠、齋藤玲子*、鈴木宏*、池松秀之**、小田切孝人、田代眞人：*新潟大学公衆衛生、**原土井病院臨床研究部]

2. パンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス実験室診断系の構築および診断

4 月 24 日、WHO はメキシコとアメリカの一部において従来の季節性インフルエンザウイルス A/H1N1(A ソ連型)とは異なる、ブタインフルエンザウイルス(A/H1N1)を起源とする A 型インフルエンザ(パンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザ: A/H1N1pdm)ウイルスの出現を発表した。わが国でも A/H1N1pdm ウイルスの日本への侵入あるいは流行状況を把握するために、A/H1N1pdm ウイルスの高感度遺伝子診断系の構築を行った。H1 亜型のブタインフルエンザウイルスには、北米およびユーラシアの 2 系統の古典的ブタインフルエンザウイルスが知られており、今回出現した A/H1N1pdm ウイルスは系統樹解析により、HA 遺伝子は北米系統、NA 遺伝子および M 遺伝子はユーラシア系統のブタインフルエンザウイルスに由来している事が判明していた。そこで RT-PCR 法および TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法により、北米系統の H1 亜型のブタインフルエンザウイルスおよび A/H1N1pdm ウイルスの HA 遺伝子のみを特異的に検出できる高感度遺伝子診断系の構築を行った。構築した遺伝子診断系は、A/H1N1(A ソ連型)、A/H3N2(A 香港型)や他の亜型(A/H5N1 や A/H7N7 など)の A 型インフルエンザウイルスや B 型インフルエンザウイルスとは交差せず、北米系統の H1 亜型ブタインフルエンザウイルスと A/H1N1pdm ウイルスのみを高感度に検出することが可能であった。[影山努、岸田典子、白倉雅之、中内美名、氏家誠、小渕正次、小田切孝人、田代眞人]

3. パンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス遺伝子診断検査の改良

4 月に構築した A/H1N1pdm ウイルス遺伝子診断検査系で検出できない変異株が出現したため、変異株も検出できる様にリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子診断検出系の改良を行った。また、A/H1N1pdm ウイルスとは交差反応せずに、季節性ヒトインフルエンザウイルス A/H1N1(A ソ連型)、A/H3N2(A 香港型)および B 型インフルエンザウイルスが検出できるリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子診断検出系を構築し、改良した A/H1N1pdm ウイルス遺伝子診断検査マニュアル、陽性コントロール RNA(A/H1N1pdm 由来)、プライマーおよびプローブを全国の地方衛生研究所および検疫所に配布した。[中内美名、影山努、小田切孝人、宮村達男、田代眞人]

4. RT-LAMP 法を用いたパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス診断キットの開発および評価

A/H1N1pdm ウイルスは瞬く間に世界中に広がり、日本でも秋になって流行のピークを迎えた。このウイルスは、A/H1N1(A ソ連型)、A/H3N2(A 香港型)の季節性インフルエンザウイルスに比べ、ウイルス性肺炎などの重篤な症状を引き起こす場合があったため、A/H1N1pdm ウイルス感染を迅速かつ簡便に鑑別できる A/H1N1pdm ウイルス特異的診断系が必要と考えられた。そこで本研究では、クリニックや病院等での Point of Care Testing (POCT)による遺伝子診断検査を可能にするため、RNA の精製が不要な Direct Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification 法 (Direct RT-LAMP 法)を用いた A/H1N1pdm ウイルスの遺伝子鑑別診断検査系の構築および評価を行った。今回構築した検出系は、

A/H1N1(A ソ連型)、A/H3N2(A 香港型)を含む他の亜型の A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスとは反応せず、A/H1N1pdm のみを高感度に検出できた。本検出系により検体採取から約 40 分以内で A/H1N1pdm ウイルスを鑑別診断する事が可能となった。[中内美名、影山努、田代眞人]

5. サリドマイド・アナログを用いた抗インフルエンザウイルス活性の検討

抗インフルエンザウイルス薬の開発を目的とした研究を行うために、34 種類のサリドマイド・アナログを合成し、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼに対する酵素活性阻害効果を検討した。その結果、3 つの化合物が、RNA ポリメラーゼ構成成分の一つである PA サブユニットが持つエンドヌクレアーゼ活性を阻害し、培養細胞を用いたウイルス感染実験に対してもウイルス増殖を抑制することが示された。[高橋仁、原田勇一、板村繁之、小田切孝人、田代眞人、岩井佑磨*、畠山大*、本島和典**、石川稔**、杉田和幸**、橋本祐一**、清悦久*、山口健太郎*、葛原隆*：*徳島文理大学、**東京大学分子細胞生物学研究所]

6. 新型インフルエンザワクチン候補株 (H1N1) pdm の開発、作製

2009 年 4 月以降、世界的大流行を引き起こした新型インフルエンザウイルス 2009(H1N1)に対するワクチン候補株の開発をリバースジェネティクス(RG)法を用いて、9 号棟 GMP 準拠施設において行った。候補株として、新型インフルエンザウイルス A/California/7/2009(Cal7) (鶏卵分離株) と A/PR/8/34(PR8)間の 8 種類のリアソータントウイルス (NIIDRG)を作製し、鶏卵での高増殖能を獲得する HA の配列、蛋白収量を上げる分節遺伝子の組み合わせを検討した。その結果、PR8 株をバックボーンとし HA 遺伝子のみが Cal7 に由来する NIIDRG-7 は高増殖能および抗原的安定性を示した。その蛋白収量は現行の新型ワクチン株に比し、約 1.3 倍高いが、従来の季節性インフルエンザワクチンの約 30%~50%程度にとどまる。今後、更なる改良が必須である。[白倉雅之、浅沼秀樹、有田知子、信澤枝里、田代眞人]

7. RG 法によるウイルス回収率の改善の検討

(1) 非コード領域 (NCR) の配列のウイルス増殖への影響

RG 法により新型インフルエンザワクチンを作製する際、ウイルスの増殖能に影響する因子の一つとして、ウイルスゲノムの集合シグナルとして働く非コード領域(NCR)の配列がある。RG 法によりリアソータントウイルスを作製する場合、バックボーンとなるウイルスの NCR と新型ウイルスの NCR が一致しない場合、ウイルスの成熟効率が下がる可能性がある。今回の新型ウイルスでも NCR の配列が一部異なっていたため、バックボーンウイルスの配列と新型ウイルスの配列とで、ウイルス回収率への影響があるのかを検討した。その結果、少なくとも今回の新型ウイルスの場合は、バックボーンとなる PR8 株でも Cal7 株でも増殖性に大きな差は見られなかった。[白倉雅之、浅沼秀樹、有田知子、信澤枝里、田代眞人]

(2) RG ウイルス作製時の transfection を行う細胞として、ワクチン株製造用細胞として承認されている LLCMK2 細胞を用いている。今回、新型ワクチンン候補株作製時に 293T 細胞を使用した場合と比較した結果、LLCMK2 細胞では transfection 後の上清中のウイルス量 (pfu) が、293T 細胞と比し約 10ー40 倍低かった。今後、細胞培養ワクチン製造への移行も考慮して、細胞及び遺伝子導入の方法の改善を検討する必要がある。[白倉雅之、浅沼秀樹、信澤枝里、田代眞人]

8. 新型インフルエンザウイルス 2009(H1N1)pdm 株の増殖性関連因子の解析

(1) 鶏卵もしくはマウスに馴化した A/Narita/1/2009(H1N1pdm)株の性状解析

A/Narita/1/2009 (H1N1pdm) 株を発育鶏卵で継代した結果、10 代目に高い HA 価 (512) を示し、50%卵感染価も顕著に上昇した ($10^{5.2}$→$10^{9.3}$$EID_{50}$/mL)。一方、同株をマウスで継代した結果、馴化前には致死性がほとんど認められなかったが、馴化株では高い致死性が認められた。鶏卵およびマウスで馴化した株それぞれについて遺伝子解析を行った結果、ともに部分的な遺伝子変異が認められた。またマウス血清を用いた抗原性解析では、抗原性の変異は検出できなかったが、フェレット血清を用いた場合には、馴化株に部分的な抗原変異が認められた。[浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、長谷川秀樹、相内章、田代眞人]

9. 市中分離株の鶏卵及び MDCK 細胞での増殖

発育鶏卵および MDCK 細胞を用い、臨床検体からのウイルス

分離ならびに高増殖株の性状解析を行っている。検査キットでA型陽性の検体21例についてMDCK細胞で分離を行った結果、20例にHA価が認められた（HA価：2～128）。一方、同検体を発育鶏卵（E1）で分離した結果、2例にのみHA価が認められ、他の検体のHA価は検出限界以下であった。しかし、HA価が認められなかった8例の漿尿液を鶏卵で継代（E2）したところ、5例にHA価（HA価：2～128）が認められ、E4まで継代した結果、高いHA価（512）を示した株を獲得した。現在、256以上のHA価を示す鶏卵分離株が3株得られている。［浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、中内美名、小田切孝人、許斐奈美*、田代眞人：*日大・医 ］

10. アジュバント併用経鼻接種インフルエンザワクチン開発に関する研究

マウスにインフルエンザ抗原とともに、flt-3 リガンドプラスミドとCpG-ODNをアジュバントとして経鼻接種した後、ウイルスを感染させて防御効果ならびに免疫応答を検討した。その結果、アジュバントを用いない場合には、防御効果および免疫応答の誘導がほとんど認められなかったが、アジュバントを併用した場合には、高い防御効果と免疫応答が認められた。さらにこの効果は若齢マウスだけではなく、老齢マウスにおいても同様の効果が認められた。［浅沼秀樹、佐多徹太郎、関根伸一*、藤橋浩太郎**：*大阪大学、**アラバマ大学］

11. KSHVワクチン開発に関する研究

カポジ肉腫関連ウイルス（KSHV）抗原をアジュバント（poly IC）とともに経鼻もしくは腹腔内接種し、特異抗体応答および感染阻止能について検討した。その結果、腹腔接種した群では血中に特異的IgGが、経鼻接種した群では血中に特異的IgGだけでなく、気道洗浄液に特異的IgAが誘導されていた。またここで誘導された特異抗体は、ウイルスが培養細胞に吸着・感染することを阻止することができた。［浅沼秀樹、坂本康太*、佐多徹太郎**、片野晴隆**：*東海大学、**感染病理部］

12. シードウイルス分離用候補細胞株の評価

感染研の所有する細胞株と、国内外のワクチンメーカーが持つ細胞株のうち、シードウイルス分離用候補細胞株評価の応募に応じたものについて、当該ワクチンメーカーと共同研究契約を締結し、臨床検体からのウイルス分離効率、分離ウイルスの増殖性、遺伝的安定性、抗原的安定性を調査し、候補細胞としての適性を評価した。その結果、候補細胞株の中には有用性が高いと考えられるものが存在することが明らかとなると共に、研究開始時には予期しなかった問題点等も発見することができた。[原田勇一、高橋　仁、中村一哉、浜本いつき、山本典生、田代眞人]

13. 細胞培養ワクチン実用化に際して考慮すべき事項（Points to consider）の抽出と検討

細胞培養ワクチン実用化に際して考慮すべき事項について、既存のガイドライン等を精査し抽出したところ、少なくとも以下の点が挙げられた。

(1)ウイルス増殖に使用する細胞株の腫瘍原性とがん原性について(2)細胞溶解物（ライセート・DNA）の安全性について(3)ウイルス増殖に使用する細胞のウイルスの遺伝学的・抗原的変化への影響の検討方法と認められる変化の許容範囲について(4)ウイルス増殖用細胞株の内因性感染性因子（内在性レトロウイルス等）の試験について(5)試薬を作製する過程で混入する可能性のある病原体の試験について(6)HA 量を定量するための方法について(7)効力を確認するための試験についてこれらの点について考察を行い、それらをPoints to considerとしてまとめた。この成果は厚生労働科学研究費補助金「細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究」に活用された。[山本典生、中村一哉、原田勇一、高橋仁、浜本いつき、田代眞人]

14. 迷入ウイルス検出系の確立と細胞培養系からの迷入ウイルス排除の評価

RT-PCR法を測定原理とし、インフルエンザウイルスを含む19 種類の経気道感染ウイルスを検出できるキットを用いてシードウイルス分離用候補細胞が臨床検体中のインフルエンザウイルス以外の迷入ウイルスをその継代過程で排除できるか評価した。その結果、用いた候補細胞はいずれも継代の早い時期に全ての迷入ウイルスを排除できることが明らかとなった。また、経気道感染ウイルス以外のより広範囲の迷入ウイルス検出系確立のため、対象ウイルスの選定とPCRの標的配列の検討を行なった。[中村一哉、原田勇一、高橋　仁、浜本いつき、山本典生、田代眞人]

15. 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの開発

インフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。ワクチン接種により粘膜を誘導するには粘膜投与型の経鼻ワクチンが有効である。本研究では高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の経鼻ワクチンの効果とアジュバント量や付着性等の剤形との関連を検討した。ホルマリン不活化全粒子 H5N1 ワクチンと合成二重鎖 RNA、Ampligen®(polyI:polyC$_{12}$U)を用い剤形の違いによる抗体誘導効果およびその効果の持続をヒトと同様に広い鼻腔を持つカニクイザルで検討した。H5N1 ワクチンのアジュバント併用経鼻ワクチン群では全てのカニクイザルで血中の特異的な IgG 抗体及び IgA 抗体が誘導された。粘膜への付着性を増した剤形を用いた場合付着性の低い剤形と比較し IgG 量には差がみられなかったが IgA 量が有意に高かった。ヒトと同様に広い鼻腔を持つカニクイザルにおいて高病原性鳥インフルエンザワクチン(H5N1)のアジュバント併用経鼻接種でアジュバント量および粘膜付着性が抗体応答に与える影響を調べワクチンのアジュバントの増量及び付着性が粘膜免疫応答を増強する事が明らかとなった。[長谷川秀樹、相内 章、永田典代*、岩田奈緒子*、田村慎一*、佐多徹太郎*、田代眞人：*感染病理部]

16. 新規粘膜アジュバントの開発

インフルエンザウイルスの感染防御には、気道粘膜上に分泌されるウイルス特異的な IgA 抗体が有効である。ワクチンによりこの粘膜上での免疫を誘導する為には、ワクチンの粘膜への投与とアジュバントの添加が必要である。自然免疫細胞における外来抗原認識レセプターが数多く見出され、それらは互いに作用しあい免疫系の活性化を促すことが明らかになった。本研究では新規粘膜アジュバントの開発を目的として、Poly(I:C)によるアジュバント活性の増強を期待し、C 型レクチン Dectin-1 のリガンドである β-Glucan を多量に含む酵母細胞壁成分 Zymosan の添加による効果を検討した。粘膜アジュバントとして Zymosan と Poly (I:C) を併用することで、鼻腔洗浄液中 IgA 量、血清中 IgG 量の著しい増加が観察され、ウイルスの感染を完全に抑えることができた。HI 価は、Poly (I:C) 単独使用時の 16 倍の増強が見られた。*In vitro* において、BMDC の活性化は、Zymosan と Poly (I:C) を組み合わせることにより著しく亢進することが示された。Zymosan は β-Glucan を多量に含有すると同時に TLR2 のリガンドとしても知られており、樹状細胞における Dectin-1、TLR2 および TLR3 を介した共刺激により、粘膜アジュバント活性が亢進したと考えた。[相内 章、長谷川秀樹、田村慎一*、佐多徹太郎*、田代眞人: *感染病理部]

17. インフルエンザワクチンの臨床評価に関する研究

ワクチン接種により得られるヒト血清抗体に対する流行株の交叉反応性を調べることは、インフルエンザワクチンの有効性やワクチン株の変更の必要性を検討するうえで重要である。インフルエンザウイルス研究センター第一室では成人層および老人層の各群 24 名からワクチン接種前後のペア血清検体を収集し、流行株に対する交叉反応性を評価した。英国およびオーストラリアから入手したヒト血清についても同様の評価を行った。その成績は WHO インフルエンザ協力センター間で交換され、2 月と 9 月に開催されたWHOインフルエンザワクチン推奨株選定会議で議論され、ワクチン株選定の資料として活用された。[高下恵美、岸田典子、徐紅、伊東玲子、土井輝子、菅原裕美、齋藤玲子*、鈴木宏*、池松秀之**、小田切孝人、田代眞人：*新潟大学医学部公衆衛生学、**原土井病院臨床研究部]

18. インフルエンザワクチン候補株の増殖

新型インフルエンザワクチン候補株及び季節性ワクチン候補株を輸入し、GMP 準拠施設内で増殖させ、メーカーへの交付に供した。[浅沼秀樹、白倉雅之、有田知子、信澤枝里]

レファレンス業務

1. 我が国に飛来する野生水禽における A 型鳥インフルエンザウイルスの生態調査

2003 年末から東アジアの家禽で発生した A/H5N1 高病原性鳥インフルエンザの大流行が、中近東、ヨーロッパ、アフリカへと拡大している。この感染拡大経路は渡り鳥の飛行ルートとも相関していることから、渡り鳥によって高病原性鳥インフルエンザウイルスが我が国に持ち込まれる可能性がある。そこで、高病原性鳥インフルエンザウイルスの国内侵入を監視する目的で、地方衛生研究所の協力のもと、渡り鳥における鳥インフルエンザウイルスの生態調査を行ったが、いずれの地方衛生研究所からも分離報告はなかった。本年度は、2009

年2月に愛知県のウズラ農場のウズラから分離されたH7N6亜型の鳥インフルエンザウイルスの不活化抗原と抗血清を作製し、これらはその後の血清疫学調査に役立てられた。［影山努、白倉雅之、岸田典子、田代眞人、小田切孝人］

2. 日本のブタにおける新型インフルエンザウイルスの発生の監視

新型インフルエンザ出現の中間宿主として考えられているブタにおけるインフルエンザウイルスの流行および新型インフルエンザウイルス（ヒトやブタの間でこれまでに流行していない新たな亜型のインフルエンザウイルス）発生の監視を目的として、15地区の地方衛生研究所に依頼し、ブタからのウイルス分離調査を行った。ブタの鼻腔あるいは気管から採取した拭い液をMDCK細胞に接種したところ、1検体からインフルエンザウイルスが分離された。遺伝子解析の結果、本年度ヒトで流行したA/H1N1pdmウイルスである事が判明した。ウイルスが分離されたのは2010年の冬であったため、このウイルスがもともとブタに常在していたのではなく、A/H1N1pdmウイルスに感染したヒトから持ち込まれたと考えられた。
［中内美名、影山 努、田代眞人］

3. インフルエンザHAワクチン及びA型インフルエンザHAワクチン（H1N1株）の国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

平成21年度のインフルエンザHAワクチンに使用するワクチン株であるA/Brisbane/59/2007 (IVR-148) (H1N1)、A/Uruguay/716/2007 (X-175C) (H3N2)、B/Brisbane/60/2008の3株、及び、A型インフルエンザHAワクチン（H1N1株）のワクチン株であるA/California/7/2009 (X-179A) (H1N1v)株について国家検定の力価試験に使用する参照抗インフルエンザHA抗血清と標準インフルエンザHA抗原（一元放射免疫拡散試験用）を作製した。標準インフルエンザHA抗原に含有されるHA抗原の含有量の設定を、英国、豪州、米国の生物製剤に関する国立試験研究機関であるNIBSC、TGA、CBERと共同で実施した。［嶋崎典子、河野直子、佐藤佳代子、原田勇一、高橋仁、板村繁之、田代眞人］

サーベイランス業務

1. 2009/10シーズン国内株サーベイランス

2009年4月1日から2010年3月31日までの間に、季節性A/H1N1は163株、新型A/H1N1pdmは645株、A/H3N2は116株、Bは90株について抗原性解析およびHA遺伝子解析を行った。新型A/H1N1pdm分離株のほとんどはA/California/7/2009類似株であった。季節性A/H1N1分離株のほとんどが2008/09シーズンのワクチン株 A/Brisbane/59/2007 と類似していた。A/H3 分離株の大半はワクチン株 A/Uruguay/716/2007 とは抗原性が大きく異なり、遺伝的にも異なるA/Perth/16/2009 グループに属した。B型ウイルスではVictoria系統株が9割以上を占めた。Victoria系統分離株は抗原的にも遺伝系統的にもワクチン株のB/Brisbane/60/2008と類似の株が大勢を占めた。
［岸田典子、徐紅、高下恵美、小渕正次、氏家誠、伊東玲子、土井輝子、安楽茜、江島美穂、菅原裕美、松浦純子、小田切孝人、田代眞人］

2. 2009/10 シーズンのヒトインフルエンザウイルス流行株の遺伝子解析

インフルエンザウイルスのHA及びNA遺伝子解析は、次シーズンのインフルエンザ流行予測とワクチン株選定にとって重要な役割を占めている。特に、2009/10シーズンより新たに出現したブタ由来の新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）は世界的大流行となり、A/H1N1pdmの遺伝的変化や遺伝的な安定性に関する情報は公衆衛生上きわめて重要である。これらの背景から、全国の地方衛生研究所、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）及び感染研ゲノム解析センターとの協力のもとに、2009/10シーズンのヒトインフルエンザウイルス流行株のHA及びNA遺伝子について系統樹解析を行った。A/H1N1pdm亜型のHA遺伝子の多くはS203Tのアミノ酸置換を持ち、抗原変異を伴う変異（K153E、K154R、G155E、N156D、S157T）も散見されたものの、すべての分離株がA/California/7/2009pdmに代表される一連のクレードに属した。H3N2亜型のHA遺伝子はE62K、N144K、K158、N189Kのアミノ酸置換を持つクレード（A/Perth/16 clade）または、K158N、N189K、T212Aのアミノ酸置換を持つクレード（A/Victoria/208 clade）のいずれかに属した。B型の解析数は限定的だが、山形系統は、G229Dのアミノ酸置換を持つ一群（サブクレード3）に属した。一方、ビクトリア系統ではB/Brisbane/60/2008に代表されるN75K、N146I、N165K、S172Pのアミノ酸置換を持つ一群、またはB/FujianGulou/1272/2008

に代表される一群に属した。NA 遺伝子の系統樹も HA 遺伝子の系統樹と同様であった。［氏家誠、安楽茜、小渕正次、佐藤裕徳*、本村和嗣*、横山勝*、小口晃央**、加藤裕美子**、藤田信之**、小田切孝人、田代眞人： *病原体ゲノム解析センター、**独立行政法人製品評価技術基盤機構］

3. 2009/10 シーズンにおける H275Y 耐性マーカーを持つ A/H1N1pdm インフルエンザオセルタミビル耐性株サーベイランス

2009/10 シーズンより新たに出現したブタ由来の新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）は、M2 阻害薬のアマンタジンに耐性であることから、新型インフルエンザの予防および治療には NA 阻害薬であるオセルタミビルおよびザナミビルが使用されている。一方、NA に特徴的なアミノ酸置換（H275Y）をもつオセルタミビル耐性株が、各国で散発的に検出されており、これらの耐性株の多くは NA 阻害薬の薬剤選択圧により発生していた。日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから、耐性株の発生する危険性が高くまたオセルタミビル耐性株が流行の主流になれば医療機関における治療方針の見直しが必要となる。これらの背景から、地方衛生研究所と協力して国内における A/H1N1pdm 耐性株サーベイラインスを行った。この結果、総解析数 6,089 株中 69 株（出現頻度 1.13%）のオセルタミビル耐性株が検出され、耐性株の流行は見られなかった。国内で分離された A/H1N1pdm 耐性株について薬剤感受性試験、抗原解析を行った結果、これらの耐性株は、ザナミビルに対しては感受性を保持しており、また抗原的には 2009/010 ワクチン株の A/California/7/2009pdm に類似していることから、これら耐性株に対してワクチンが有効であると考えられた。これらの調査結果は IASR を通して月ごとに情報提供し、関係者が各地における耐性株の流行状況を迅速に把握できるように努めた。［氏家誠、江島美穂、安楽茜、高下恵美、小渕正次、岸田典子、徐紅、伊東玲子、土井輝子、菅原裕美、松浦純子、小口晃央*、加藤裕美子*、藤田信之*、小田切孝人、田代眞人： *独立行政法人製品評価技術基盤機構］

4. 全国の地方衛生研究所および検疫所におけるパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス診断検査体制の構築

全国の地方衛生研究所および検疫所における A/H1N1pdm ウイルス診断検査体制を構築するため、診断マニュアル、陽性コントロール RNA(ブタインフルエンザ由来)、プライマー、プローブおよび反応試薬を緊急に開発・製造して、各所に緊急配布し、全国規模で A/H1N1pdm ウイルスの高感度遺伝子診断を行う体制を築いた。［影山努、岸田典子、白倉雅之、中内美名、氏家誠、小渕正次、小田切孝人、田代眞人］

5. 検疫所および地方衛生研究所より送付されたパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス感染疑い患者検体の確認検査

全国の検疫所および地方衛生研究所における検査で、A/H1N1pdm ウイルス感染疑いとなった患者検体の確認検査を、5 月 1 日より 24 時間体制で行った。5 月 8 日まではインフルエンザウイルス研究センターの職員が検査を行い、5 月 9 日からは他部他センター他室職員の協力を仰ぎ全所対応で検査を行った。5 月 8 日には成田空港検疫所において A/H1N1pdm ウイルス感染疑いとなった患者検体が感染研に搬入され、確認検査により A/H1N1pdm ウイルス感染であることが判明した(国内の輸入感染初発例となったケース)。また、5 月 15 日には神戸市環境保健研究所において A/H1N1pdm ウイルス感染疑いとなった海外旅行歴のない患者検体が感染研に搬入され、確認試験を行ったところ A/H1N1pdm ウイルス感染である事が判明した(国内感染初発例となったケース)。なお、5 月 18 日には厚労省健康局結核感染症課事務連絡「新型インフルエンザ患者の確定診断について」が発出され、地方衛生研究所および検疫所での検査結果をもって A/H1N1pdm 患者を確定することとし、感染研での検査はこれら機関で検査結果の判定が困難な場合等に確認検査を実施する事となった。この通達により、24 時間の全所検査対応は 5 月 19 日に凍結され、以降の検査はインフルエンザウイルス研究センターの職員が対応した。［ウイルス第一部、ウイルス第二部、ウイルス第三部、細菌第一部、細菌第二部、寄生動物部、感染病理部、免疫部、生物活性物質部、細胞化学部、昆虫医科学部、獣医科学部、血液・安全性研究部、バイオセーフティ管理室、放射能管理室、動物管理室、感染症情報センター、エイズ研究センター、病原体ゲノム解析研究センター、インフルエンザウイルス研究センター、ハンセン病研究センター、総務部の職員］

品質管理に関する業務

1. インフルエンザ HA ワクチンの力価試験の精度管理及び規格確認

インフルエンザ HA ワクチンは毎年ワクチン株が見直しされるため、ワクチンの国家検定の力価試験として実施されている一元放射免疫拡散試験の測定精度が一定の範囲内にあるように毎年確認して調整する必要がある。また、マウス白血球数減少試験や蛋白質含量試験において生物製剤基準の許容範囲の上限に近いために、毎年のワクチンが規格に適合しているのか確認する必要がある。そこで、本年も各ワクチン製造所で試作されたワクチンについて測定を実施して規格に適合していることを確認するとともに、各製造所の測定値との乖離について検討した。さらに参照インフルエンザ HA ワクチンを使用して各試験の測定精度についての検討を実施した。

［嶋崎典子、河野直子、佐藤佳代子、板村繁之、矢野茂生*、蒲地一成**、田代眞人：*血液安全性研究部、**細菌第 2 部］

2. 乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチン（H1N1 株）に対する一元放射免疫拡散試験（SRD 試験）の改良法の確立

特例承認で輸入されることになった乳濁細胞培養 A 型インフルエンザ HA ワクチンは、oil-in-water アジュバント添加型の HA ワクチンであり、HA 含量が国内ワクチンの半分しかないことやアジュバントの影響で、従来の SRD 試験では抗原抗体複合物の沈降輪形成が弱く、HA 含量の計測が困難な状況が発生した。そこで、本ワクチン製剤に対する SRD 試験の改良法として、抗原抗体複合物の沈降を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いること、及び、製剤検体からアジュバントを分離させるために超遠心処理を行う方法を検討したところ、本ワクチン製剤においても従来と同様に力価測定ができたこと、また、適切な超遠心条件によりワクチン検体中のアジュバントが再現性良く除去できたことが HPLC で確認されたので、改良法として検定時の測定方法に採用した。

［嶋崎典子、板村繁之、田中明子*、田代眞人：*血液安全性研究部］

3. ワクチンの力価試験法の代替法としての HA 含量試験法の標準化の検討

パンデミックワクチンを緊急に製造する際に、標準抗原等の準備が間に合わず従来の力価試験法である一元放射免疫拡散試験法が実施できない場合を想定して、SDS-PAGE 法による HA 含有率とたん白質含量からワクチンの有効成分である HA 含量を算出することが力価試験法として規定されている。しかしながら、SDS-PAGE 法による HA 含有率の測定は、ラボ間誤差、測定機器間誤差がある。そこで参照品を設定し、この参照品及び検体を用いて、感染研を含めて各所社の手順で 4 回測定し、ラボ間誤差等の是正が可能か検討した。参照品による補正はラボ間誤差の是正にはならず、測定機器の統一などを含めて標準化を検討する必要があることがわかった。

[佐藤佳代子、原田勇一、河野直子、板村繁之、田代眞人、細菌製剤協会パンデミックインフルエンザワクチン専門委員会]

4. 新型インフルエンザワクチン株製造のための 9 号棟施設の GMP 準拠運用

平成 21 年 4 月に発生したパンデミックをうけて、新型インフルエンザ(H1N1)のワクチン株開発を行う必要が生じたため、村山庁舎 9 号棟のワクチン株製造施設の稼働を開始した。GMP の管理手法を取り入れた運用を実施するために、設備の運用方法、入退出手順、衛生管理方法について検討し、基準書、標準手順書などの文書整備をした。より充実した品質管理を行うために必要な文書整備や設備管理について引き続き検討を行っている。［佐藤佳代子、佐々木祐子*、嶋崎典子、白倉雅之、浅沼秀樹、有田知子、原田勇一、高橋仁、篠原克明**、網　康至***、信澤枝里、板村繁之、田代眞人：*細菌第２部、**バイオセーフティ管理室、***動物管理室］

5. GMP 管理区域内における新型インフルエンザワクチン候補株作製のための文書整備

平成 21 年 4 月より、村山庁舎 9 号棟の GMP 準拠施設の稼働が開始し、新型インフルエンザワクチン株の製造およびその品質管理、安全性試験が可能になった。そのため新型ワクチン株の製造工程、品質管理方法、安全性試験に関する検討を行い、それに基づいて手順書及び指図記録書の作成を行った。新型インフルエンザワクチン候補株 2009 の作製の際は、この文書に従い、9 号棟２階 BSL3 の GMP 準拠施設で行った。

［浅沼秀樹、白倉雅之、有田知子、信澤枝里、田代眞人］

国際協力業務

1. アジア地域で分離されたインフルエンザウイルス株の解析及び国際協力

WHO インフルエンザ協力センターとして、東南アジア諸国および近隣諸国から 317 株（中国 95 株、台湾 50 株、モンゴル 35 株、ラオス 69 株、ミャンマー54 株、韓国 7 株、シリア 7 株）のインフルエンザ分離株を入手し、遺伝子解析および抗原性解析を行なった。当該国での流行の主流はわが国と同様、A/H1N1pdm ウイルスであり、遺伝的にも抗原的にもほぼ均一で、ワクチン株 A/California/07/2009 類似株であった。ラオスと中国で少数分離された季節 A/H1N1 ウイルスは A/Brisbane/59/2007 類似であった。A/H3N2 ウイルスの流行株は前シーズンから抗原性が大きく変わった A/Perth/16/2009 類似株であった。B 型ウイルスについては、世界の他の国々と同様、Victoria 系統が流行の主流であり、Yamagata 系統のウイルス株は B/Bangladesh/3333/2007 類似株であった。これら解析結果はウイルス提供国へ還元され、さらに、WHO インフルエンザワクチン推奨株選定会議の資料として活用された。

一方、WHO－GISN(Global Influenza Surveillance Network)メンバーの Cambridge 大学グループにより、ウイルス抗原性変化を２次元的に分析する Cartography 法が開発され、ワクチン株選定プロセスに導入された。このため、感染研で解析した流行株 1356 株の HI、シーケンスデータを Cambridge 大学へ送り、Cartography での解析に供した。これらの成績も WHO ワクチン株選定会議で議論され、近隣諸国の株サーベイランスへの貢献および WHO－GISN への貢献を果たした。［徐紅、岸田典子、高下恵美、氏家誠、小渕正次、伊東玲子、土井輝子、菅原裕美、江島美穂、安楽茜、松浦純子、小田切孝人、田代眞人］

2. 国際インフルエンザウイルスデーターベース(GISAID)ワーキンググループへの参画とデータベース改良への貢献

インフルエンザウイルスの国際データベース(Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data: GISAID)は、各国の研究者が無償でヒト及びトリインフルエンザウイルスについての情報を収集できることを目的に 2006 年 8 月に構築・公開されたデータベースである。当初 GISAID はスイス連邦政府の援助金によって開発されたが、財源の問題により継続が困難となり、2009 年 5 月からドイツのマックス・プランク研究所によって継続・維持されることとなった。新たに構築された GISAID の実用稼動にあたり、2009 年 10 月にドイツのザールブリュッケンにて GISAID ワークショップが開催され、WHO インフルエンザ協力センター（WHOCC）の日本代表としてワークショップに参加した。WHOCC、国際連合食糧農業機関（FAO）、中国 CDC 等の代表者 12 名が参集し、データベースに対する意見交換、情報収集、問題点・改善点の抽出を行った。上記参加者を中心に GISAID 運営ワーキンググループが結成され、定期的に GISAID システムの検証と改善を行っている。[氏家誠]

3. WHO、ASEAN Plus Three および台湾への検査マニュアル開示

RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法によるパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス検出マニュアルを作成し、WHO、ASEAN 諸国の National Influenza Center および台湾 CDC に速やかに開示した。［影山 努、田代眞人］

4. ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)における高危険度病原体の実験室診断能力強化への技術支援

ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)において国際協力機構(JICA)が実施している BSL3 実験室の供与と技術移転のプロジェクトに 3 回に渡り参加し、病原体の管理に関する技術指導および高病原性鳥インフルエンザウイルスの実験室診断を安全に且つ信頼性の高いレベルで実施するための技術支援を行った。［影山 努］

5. 新興・再興感染症研究事業の企画及び評価に関する研究

パンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルスに関するアジア地域を中心とした研究面での課題、今後の研究の必要性についての情報収集を行うため、ベトナムにおける検査診断の中心的な役割を担うベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）を訪問した。同所での A/H1N1pdm 発生時の対応および A/H1N1pdm ウイルスの検査診断体制と、流行状況把握のためのサーベイランス体制についての調査を実施した。
［影山 努］

6. パンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルスの実験室内診断と国際協力

モンゴル、ミャンマーなどの東アジアおよび東南アジア諸国からの A/H1N1pdm ウイルス感染疑い患者検体を受け入れ、リアルタイム RT-PCR 法による亜型同定などの病原学的診断を行った。[中内美名、小田切孝人、田代眞人、影山 努]

7. 高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの実験室内診断と国際協力

WHO-H5 レファレンス診断ラボとしてベトナム、ラオス、ミャンマーなどの東南アジア諸国からの H5 ウイルス感染疑い患者検体を受け入れ、培養細胞および発育鶏卵を使ったウイルス分離、リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出などの病原学的診断を行っている。これら診断結果は検体送付国と WHO に報告され、当該国での対策に役立てられる。臨床検体から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスについては、当研究室で詳細な抗原解析と遺伝子解析を行った。[影山努、中内美名、小田切孝人、田代眞人]

8. 新型インフルエンザ (H1N1) ウイルスに対する抗体価測定の標準化に使用する標準抗体選定のための国際共同研究への参加

ワクチン効果の評価のためにワクチン接種により得られる抗体価を HI 試験や中和試験によって測定されている。しかしながら、これらの試験はラボ内、ラボ間での測定値のバラツキが大きいことが知られている。そこでラボ間での抗体価測定の成績が相互比較できるように WHO の国際共同研究として、A/H1N1pdm ウイルスに対する標準抗体を作成して抗体価測定値を標準化できるのか評価する国際共同研究が組織された。我々はこの国際共同研究に参画し、得られた結果を共同研究機関内で共有してその評価に資した。[高橋仁、原田勇一、板村繁之、田代眞人]

9. JICA ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)能力強化計画プロジェクト国別研修「鳥インフルエンザ/動物実験」
[長谷川秀樹]

10. 新型インフルエンザワクチン候補株
2009(H1N1)pdm(NIIDRG-5)を WHO 推奨候補株の一つとして報告した。[信澤枝里、浅沼秀樹、白倉雅之、田代眞人]

研修業務

1. WHO ノイラミニダーゼ阻害剤耐性株検出技術研修への専門家派遣研修

WHO－GISN からの要請を受けて、平成 21 年 11 月に WHO メルボルンセンターで開催されたノイラミニダーゼ阻害剤耐性株検出技術研修会に WHO 東京センターから講師として参加した。本研修会へは WHO 西太平洋地域から 9 ヵ国が参加し、化学発光系と蛍光発光系それぞれを用いた薬剤感受性試験法の習得、問題点の協議および耐性株サーベイランス体制の構築および参加国間での相互協力と連携等について討議、研修が行われた。[小田切孝人]

2. 検疫所へのパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス実験室診断技術研修

国内における新型インフルエンザ対策の一環として、主要検疫所 13 ヶ所の検査担当職員を感染研に招聘し、リアルタイム RT-PCR 検査を中心とした A/H1N1pdm ウイルス実験室診断技術研修を行った。研修後はそれぞれの検疫所からの検査対応相談にも個別に対応し、研修成果が現場で反映されるように連携の強化が図られた。[影山 努、中内美名]

3. ASEAN 諸国への新型インフルエンザウイルス実験室診断技術研修

東南アジアにおける新型インフルエンザ対策の一環として、ASEAN 諸国(インドネシア、シンガポール、タイ、フィリピン、マレーシア、ブルネイ、ベトナム、ラオス、カンボジアが参加、ミャンマーは欠席)の National Influenza Center の職員を感染研に招聘し、リアルタイム RT-PCR 検査を中心としたパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルス実験室診断技術研修を行った。[影山 努、中内美名、相内 章、田代眞人、渡邉治雄]

4. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会においてパンデミック A/H1N1 2009 インフルエンザウイルスの診断法に関する講義を行った。[影山努]

その他

1. 全所協力体制による新型インフルエンザ検査対応と検査業務行動計画の策定

新型インフルエンザが国内外で発生すると、感染研は地方衛生研究所や検疫所から多数の確定診断検査依頼を受けることになる。このことから、感染研ではこのような緊急事態になった場合には、各部・センター一丸となって協力して検査対応することが合意されている。この全所体制による検査業務を統括し混乱なく実施できるように、戸山庁舎、村山庁舎、ハンセン研の各部・センターから代表 1 名が参加した検査対応ワーキンググループ (WG) が結成された。本 WG では、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスによる大流行を前提とした PCR 検査計画およびそれに沿った事前準備と行動計画を策定し、2009 年 4 月の部長会で承認された。

2009 年 4 月にブタ由来の H1N1pdm ウイルスによるパンデミックが発生した際には、WG 行動計画、マニュアルを H1N1pdm ウイルス用に修正して、インフルエンザウイルス研究センター、次いで全所体制という順で PCR 検査業務を実施した。また、地衛研、検疫所へは、PCR プライマー・試薬および検査マニュアルを緊急配布し、1 週間で全国規模での検査体制の構築に成功した。

感染研初の試みとなった全所横断的協力体制での検査対応については、H22 年 3 月に総括会議を開催し、問題点の抽出、今後への提言がまとめられ、それらは次年度に予定されている所内の新型インフルエンザ行動計画の改訂へ反映される。[小田切孝人、小渕正次、氏家誠、徐紅、高下恵美、岸田典子、中内美名、原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、嶋崎典子、浅沼秀樹、白倉雅之、有田知子、相内章、影山努、板村繁之、信澤枝里、山本典生、長谷川秀樹、田代眞人、森川茂、西條政幸(ウイルス 1 部)、清水博之(ウイルス 2 部)、大西真(細菌第 1 部)、柴山恵吾(細菌第 2 部)、岡田義明(血液・安全性部)、木村博一、藤本嗣人(感染症情報センター)、本村和嗣(病原体ゲノム解析センター)、梁明秀(エイズ研究センター)、高橋宜聖(免疫部)、金子幸弘(生物活性物質部)、高木弘隆、篠原克明(バイオセーフティー管理室)、前濱朝彦(細胞化学部)、澤辺京子(昆虫医科学部)、棚林清(獣医科学部)、藤本浩文(放射能管理室)、平井明香(動物管理室)、中永和枝、中田　登(ハンセン病研究センター)]

2. 将来計画：ワクチン株の増殖媒体が、(1) 孵化鶏卵 (2) 培養細胞の各場合において、高増殖能を示し、蛋白収量が高いワクチン株を作製できるシステムを構築する。

発 表 業 績 一 覧

I. 誌 上 発 表

1. 欧文発表

1) Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro,M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y.: Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. Microbiol. Immunol. 53: 83-88, 2009

2) Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H. Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato,K., Suzuki, Y. :Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). Open Glycoscience , 2:28-36, 2009.

3) Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov,A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F.:Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007.Antiviral Therapy 14: 751-761, 2009　WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution

4) Working Group; Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M. Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith,G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. :Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. J. Influenza. Resp. Viral Infect. 3: 59-62, 2009.

5) Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y.:Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza

A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. Virology Journal. 6:124, 2009

6) Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P. :Pandemic flu: from front lines. Nature 461; 20-21, 2009

7) Matsuzaki Y, Takashita E, Okamoto M, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, and Nishimura H. Evaluation of a new rapid antigen test using immunochromatography for detection of human metapneumovirus in comparison with real-time PCR assay. J Clin Microbiol. 47, 2981-2984 (2009)

8) Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Mizuta K, Itagaki T, Nishimura H, and Matsuzaki Y. Development and evaluation of a whole virus-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human metapneumovirus antibodies in human sera. J Virol Methods. 164, 24-29 (2010)

9) Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, and Hongo S. Influenza C virus NS1 protein up-regulates the splicing of viral mRNAs. J Virol. 84, 1957-1966 (2010)

10) Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, and Tashiro M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. Virol J. 7, 53 (2010)

11) Ujike M, Shimabukuro K, Mochizuki K, Obuchi M, Kageyama T, Shirakura M, Kishida N, Yamashita K, Horikawa H, Kato Y, Fujita N, Tashiro M, Odagiri T; Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan. Emerg Infect Dis. 16:926-935（2010）

12) .Ikeno D., Kimachi K., Kudo Y., Goto S., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M., Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. Vaccine 27, 3121-3125 (2009)

13) Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. J Infect Dis. 199(11):1629-37, 2009 .

14) Kawakami C, Obuchi M, Saikusa M, Noguchi Y, Ujike M, Odagiri T, Iwata M, Toyozawa T, Tashiro M. Isolation of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus of different origins in Yokohama City, Japan, during the 2007-2008 influenza season. Jpn J Infect Dis. 62(1):83-6, 2009

15) Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. J Med Virol. 2010 Jan;82(1):128-37.

16) Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, Grohmann G, Hay A, Kelso A, Klimov A, Odagiri T, Smith D, Russell C, Tashiro M, Webby R, Wood J, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009-2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. Vaccine. 2010 Feb 3;28(5):1156-67. Epub 2009 Dec 9.

17) Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochihara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K. Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. Microbiol Immunol. 2010 Feb;54(2):81-8.

18) Takahashi H, Kitagawa Y, Maeda-Satoh M, Hasegawa H, Sawa H, Sata T. Monoclonal Antibody and siRNAs for Topoisomerase ISuppress Telomerase Activity. Hybridoma (Larchmt). 2009 Feb;28(1):63-5.

19) Hasegawa H*, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. Therapeutic and Clinical Risk Management 2009 Feb;5(1):125-32.

20) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F,

Tsunetsugu-Yokota Y. Neutralizing antibody against severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. Microbiol Immunol. 2009 Feb;53(2):75-82.

21) Kataoka M, Yamamoto A, Ochiai M, Harashima A, Nagata N, Hasegawa H, Kurata T, Horiuchi Y Comparison of acellular pertussis-based combination vaccines by Japanese control tests for toxicities and laboratory models for local reaction Vaccine 2009 27,1881-1888

22) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S.Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol. 2009 Jun;81(6):1102-8.

23) Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould A E, Takashima I, Koike A Mortality following peripheral infection with Tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress response Virology 2009 Jul 20;390(1):139-50. Epub 2009 May 24.

24) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates J Gen Virol 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71. Epub 2009 May 27.

25) Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall W. W, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K Identification of Cancer Stem Cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) Mouse Model of Adult T- Cell Leukemia / lymphoma (ATL). Blood 2009 Sep 24;114(13):2709-20. Epub 2009 Jul 7.

26) Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa Y, Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, Sata T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. Pathol Int. 2009 Aug;59(8):555-66.

27) Takahashi H, Ohtaki N, Maeda-Sato M, Tanaka M, Tanaka K, Sawa H, Ishikawa T, Takamizawa A, Takasaki T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Kurata T, Kojima A. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. Microbes Infect. 2009 Nov;11(13):1019-28. Epub 2009 Aug 7.

28) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Ainai A, Sata T, Okamoto T, Hall W.W, Sawa H, Hasegawa H Inhibition of the SDF-1α-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. Blood 2009 Oct 1;114(14):2961-8. Epub 2009 Aug 5.

29) Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. Vaccine. 2009 Oct 23;27(45):6276-9.

30) Kitagawa Y, Maeda-Sato M, Tanaka K, Tobiume M, Sawa H, Hasegawa H, Kojima A, Hall WW, Kurata T, Sata T, Takahashi H. Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles. Microbiol Immunol. 2009 Nov;53(11):609-20.

31) Hayasaka D, Nagata N, Hasegawa H, Sata T, Takashima I, Koike S. Early Mortality Following Intracerebral Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus Oshima Strain in a Mouse Model. J Vet Med Sci. 2009 Dec 9.

32) Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. J Med Virol. 2010 Jan;82(1):128-37.

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターが作成に関与した WHO 文書

1) Seventh meeting of the IHR Emergency Committee 23 February 2010

2) Recommended viruses for influenza vaccines for use in the

2010-2011 northern hemisphere influenza season 11 February 2010

3) Preliminary review of D222G amino acid substitution in the haemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses 28 December 2009
4) Laboratory biorisk management for laboratories handling human specimens suspected or confirmed to contain influenza A (H1N1) causing the current international epidemics 30 November 2009
5) Sixth meeting of the IHR Emergency Committee26 November 2009
6) WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans - revised 23 November 2009
7) Summary of available potency testing reagents for Pandemic (H1N1) 2009 virus vaccines 20 November 2009
8) Fifth meeting of the IHR Emergency Committee 23 September 2009
9) Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010 southern hemisphere influenza season 23 September 2009
10) Instructions for transport of virus cultures (i.e. virus isolates) of candidate reassortant vaccine viruses of pandemic (H1N1) 2009 virus 27 July 2009
11) WHO recommendations on pandemic (H1N1) 2009 vaccines 13 July 2009
12) Fourth meeting of the IHR Emergency Committee 11 June 2009
13) Human infection with pandemic (H1N1) 2009 virus: updated interim WHO guidance on global surveillance 10 July 2009
14) Third meeting of the IHR Emergency Committee 5 June 2009
15) Consultation on potential risks of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus at the human-animal interface 3 June 2009
16) Update of WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines 28 May 2009
17) Characteristics of the emergent influenza A (H1N1) viruses and recommendations for vaccine development 26 May 2009
18) Summary report of a High-Level Consultation: new influenza A (H1N1) 22 May 2009
19) Instructions for storage and transport of suspected or confirmed human and animal specimens and virus isolates of pandemic (H1N1) 2009 20 May 2009
20) Recommendations of the Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) on Influenza A (H1N1) vaccines 19 May 2009
21) Protocol for antiviral susceptibility testing by pyrosequencing 13 May 2009
22) Sequencing primers and protocol 12 May 2009
23) Status of candidate vaccine virus development for the current Influenza A(H1N1) virus 9 May 2009
24) Countries able to perform PCR to diagnose influenza A (H1N1) virus infection in humans 7 May 2009
25) WHO Technical Consultation on the Severity of Disease Caused by the new influenza A (H1N1) virus infections 6 May 2009
26) Joint WHO-OFFLU technical teleconference to discuss human–animal interface aspects of the current influenza A (H1N1) situation 4 May 2009
27) WHO ad hoc scientific teleconference on the current influenza A(H1N1) situation 4 May 2009
28) Instructions for shipments of pandemic (H1N1) 2009 specimens and virus isolates to WHO Collaborating Centres for influenza 28 April 2009
29) Global surveillance during an influenza pandemic 28 April 2009
30) Second meeting of the IHR Emergency Committee 27 April 2009
31) Pandemic influenza preparedness and response 25 April 2009
32) First meeting of the IHR Emergency Committee 25 April 2009

2. 和文発表

1) 氏家 誠、小田切孝人 抗インフルエンザ薬耐性の出現と対応 細胞 The cell （ニュー・サイエンス社）巻41:号14：項15-18 (2009)
2) 氏家 誠、小田切孝人 オセルタミビル(タミフル)耐性インフルエンザウイルス 感染・炎症・免疫（医薬の門

社/羊土社)巻 39：号 3： 頁 267-269 (2009)

3) 影山 努, 板村繁之. 最近注目される微生物―その臨床的意義と検査法 (Part 2 ウイルス) 新型インフルエンザウイルス. 臨床と微生物 36(3):193-198(2009)

4) 緒方剛、山崎良直、岡部信彦、中村好一、田代眞人、永田紀子、板村繁之、安井良則、中島一敏、土井幹雄、泉陽子、藤枝隆、大和慎一、川田諭一、 一般住民のインフルエンザ予防接種歴と H5N2 鳥インフルエンザウイルス中和抗体 厚生の指標 56：33-38 (2009)

5) 板村繁之：インフルエンザワクチン. 化学療法の領域 25：1453-1458 (2009)

6) 板村繁之:インフルエンザワクチンの現状と課題. 診断と治療 97：2073-2077 (2009)

7) 原田勇一、田代眞人:インフルエンザ感染の疫学とワクチンの現状 細胞工学 29 (3):274-280. 2010

8) 信澤枝里：ウイルス系統樹の考え方 インフルエンザ 10 (3) :23-29. 2009.

9) 信澤枝里、板村繁之:新型インフルエンザに対するワクチン開発 呼吸器内科 17 (1) 51-57.

10) 山本典生, 田代眞人:インフルエンザ － 基礎から臨床まで － 細胞, 41(14)：2-3, 2009

11) 浜本いつき、山本直樹:HIV/AIDS の基礎研究の進歩 HIV の細胞への侵入:インフルエンザウイルスとの比較 日本臨床 第 68 巻 第 3 号 383-388. 2010

12) 長谷川秀樹 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する経鼻粘膜投与型ワクチンの開発 日本医師会雑誌 第 137 巻・第 10 号 2081－2085 2009

13) 長谷川秀樹、中島典子、佐藤由子、佐多徹太郎 社会問題となった疾患と病理学「インフルエンザ」病理と臨床 臨時増刊号 vol27 2009

Ⅱ. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Takato Odagiri Immune response to pandemic A/H1N1 virus by seasonal influenza vaccination. International Scientific Symposium on Influenza A (H1N1) pandemic response and preparedness, China, 21-23 August, 2009.

2) Takato Odagiri Update on influenza virus surveillance findings in 2008/09 season in Northern Hemisphere. Third Meeting of the National Influenza Centers in the Western Pacific and South-East Asia Region. August 18-20, 2009.

3) Takato Odagiri Antiviral resistant influenza viruses in Japan and oseltamivir-related psychological disorders found in teenagers. WHO Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Workshop, Melbourne, Australia, 9-13 November., 2009.

4) Tsutomu Kageyama. Overview of Laboratory Diagnosis Systems for 2009 Pandemic H1N1 Influenza in Japan. The Sixth JapanTaiwan Symposium on 2009 Influenza Pandemic and Enteric Virus Infection and New Development for Rapid Diagnosis. September 10, 2009, Tokyo, Japan.

5) Normaiza Zamri, H.Asanuma, S. Sekine, T.Kurata, T. Sata, S. Tamura, and K.Fujihashi. 14th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2009)、2009 July、Boston (USA)

6) Tsuji T, Kanbe M, Ainai A, Okamoto T, Sata T, Hall W.W, Hasegawa H: Therapeutic effect of novel NF-kappa B inhibitor, Bay65-1942, in mouse ATLL model 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses Jul., 2009, Salvador, Brazil

7) Kawaguchi A, Orba Y, Kimura T, Iha H, Ogata M, Tsuji T, Sata T, Okamoto T, Hall W.W., Sawa H, Hasegawa H. Inhibition of the SDF-1α-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of human ATLL cells and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice 14th International Conference of Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses Jul., 2009, Salvador, Brazil

2. 国内学会

1) 松嵜葉子、高下恵美、岡本道子、水田克巳、板垣勉、永井幸夫、西村秀一:イムノクロマトグラフィー法によるヒトメタニューモウイルス迅速診断キットの評価とウイルス分離との比較 第 83 回日本感染症学会学術講演会、東京、2009 年 4 月

2) 村木靖、高下恵美、松嵜葉子、菅原勘悦、本郷誠治：C 型インフルエンザウイルスの粒子形成機構に関する一考察 第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京、2009 年 7 月

3) 古川孝俊、村木靖、高下恵美、菅原勘悦、野田岳志、松嵜葉子、本郷誠治：C 型インフルエンザウイルスの増殖における CM2 蛋白の役割 第23回インフルエンザ研究者交流

の会シンポジウム　東京、2009 年 7 月

4) 村木靖、古川孝俊、菅原勘悦、高下恵美、松嵜葉子、本郷誠治 : C 型インフルエンザウイルスの CM2 蛋白のアシル化の意義　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京 2009 年 10 月

5) 小渕正次、氏家誠、岸田典子、徐紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、安楽茜、江島美穂、田代眞人、小田切孝人 : 2008/09 シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成 21 年度のワクチン株　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

6) 氏家誠、島袋梢、安楽茜、江島美穂、小渕正次、岸田典子、徐紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、田代眞人、堀川博司、加藤裕美子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小田切孝人 : 2008/09 シーズンにおけるインフルエンザ（A/H1N1）オセルタミビル耐性株（H275Y*）の国内発生状況　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

7) 古川孝俊、村木靖、野田岳志、菅原勘悦、高下恵美、松嵜葉子、本郷誠治 : C 型インフルエンザウイルスの増殖過程における CM2 蛋白の役割　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

8) 相内章、伊藤良、岸田典子、小渕正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村愼一、倉田毅、佐多徹太郎、田代眞人、長谷川秀樹 : 経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討　第 57 回日本ウイルス学会学術集会　東京、2009 年 10 月

9) 岸田典子、小渕正次、高下恵美、徐紅、氏家誠、永田典代、岩田奈織子、相内章、長谷川秀樹、田代眞人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人 : 季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

10) 原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代眞人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人 : 沈降 H5N1 インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価　第 57 回日本ウイルス学会東京、2009 年 10 月

11) 原田勇一、森愛、多田善一、高橋宣聖、田代眞人、小田切孝人 : 弱毒化 H5N1 インフルエンザウイルスに対する沈降 H5N1 インフルエンザワクチン(clade2.3)のマウスにおける有効性の検討　第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月

12) 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典子、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆氏、小田切孝人、田代眞人、倉田毅、佐多徹太郎 : 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討　第 13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月

13) 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代眞人 : インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散(SDR)試験法の精度評価　第 13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月

14) 池野大介、来海和彦、工藤康宏、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代眞人、城野洋一郎 : マウスを用いた H5N1 株インフルエンザワクチンのプライムーブースト効果の検討　13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月

15) 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代眞人 :　沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1 株)接種者の血清ウイルス中和抗体の交叉反応性の検討　13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月

16) 高橋宣聖、小野寺大志、阿戸学、小田切孝人、田代眞人、小林和夫 : ヒト血清移入マウスを用いたインフルエンザウイルス感染防御能の解析　13 回日本ワクチン学会、札幌、2009 年 9 月

17) 小田切孝人 : 新型インフルエンザ A/H1N1 ウイルスとワクチン製造、接種の見通し　第 58 回日本感染症学会東日本地方学術集会、東京、2009 年 10 月

18) 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代眞人 : インフルエンザワクチンの力価測定に使用する標準抗原の HA 含量決定に重要な HA 含有率のエンド

グリコシダーゼを用いた測定法の検討　第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

19) 板村繁之：シンポジウム「インフルエンザワクチン」パンデミックワクチンの現状と課題　第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

20) 片野晴隆、坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎：KSHV のワクチン開発に関する基礎研究―KSHV 粘膜ワクチン開発の可能性、第 6 回 EB ウイルス研究会、東京、2009 年 6 月

21) 坂本康太、浅沼秀樹、中村智之、菅野隆行、佐多徹太郎、片野晴隆:KSHV のワクチン開発に関する基礎研究―KSHV 粘膜ワクチン開発の可能性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

22) 白倉雅之、信澤枝里、田代眞人、新型インフルエンザ対策チーム：リバースジェネティクス（RG）法による新型インフルエンザワクチン製造株の作製　第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月

23) Shinichi Sekine, Mika Sasaki, Yoshiko Fukuyama, Ryoki Kobayashi, Hideki Asanuma, Kosuke Kataoka, Rebekah S Gilbert, Satoshi Shizukuishi, Kohtaro Fujihashi.:Antigen Presenting Cell Function of NALT DCs Is Maintained in Aged Mice. 第 39 回日本免疫学会総会、大阪、2009 年 12 月

24) 山本典生：ウイルス性呼吸器感染症に対する治療薬の開発を目指して　ーインフルエンザと重症急性呼吸器症候群(SARS)ー　第 147 回日本獣医学会学術集会シンポジウム、栃木、2009 年 4 月

25) 浜本いつき、山口展正、多屋馨子、佐藤弘、藤本嗣人、岡部信彦：インフルエンザウイルスの検出法ならびに検出部位に関する臨床的検討　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

26) 影山　努：新型インフルエンザウイルスの分子遺伝学的性状と診断　2009 年度 日本臨床検査標準協議会（JCCLS）学術集会、東京、2009 年 8 月

27) 影山 努、中内美名、田代眞人：新型インフルエンザウイルス(H1N1)核酸検出法の構築　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

28) 野島清子、影山 努、中内美名、魚住利樹、藤間昭勝、岡田清美、和山行正、田代眞人、浜口 功：非対称 PCR-核酸クロマト法による新型インフルエンザ（H1N1)pdm 簡便診断法の開発　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

29) 影山　努：新型インフルエンザウイルスの検出法について　平成 21 年度希少感染症診断技術研修会、東京、2010 年 2 月

30) 長谷川秀樹：新興感染症と病理の関わり　第 98 回日本病理学会総会、京都、2009 年 5 月

31) 辻隆裕、佐多徹太郎、長谷川秀樹：ATL マウスモデルを用いた NF-kappaB 阻害薬による新樹治療法の開発　第 98 回日本病理学会総会、京都、2009 年 5 月

32) 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐多徹太郎　重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)感染モデルを用いた SARS に対する治療法の検討　第 98 回日本病理学会総会　京都、2009 年 5 月

33) 相内章、一戸猛志、田村愼一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンによおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進　第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

34) 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村愼一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代眞人、倉田毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討　第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

35) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、新村靖彦、横手公幸、飯塚愛恵、塩田智之、佐多徹太郎、倉田毅、倉根一郎、森川茂：痘そうワクチン LC16m8 および Lister 株免疫時における IMV および EEV 蛋白に対する抗体応答とサル痘予防効果　第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

36) 酒井宏治、永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、松井珠乃、網康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎、森川茂：水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統額的解析　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

37) 原崎一浩、永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、山本直樹、高久洋、佐藤人美、山本陽子、平松啓

一、田代眞人、山本典生：免疫抑制剤の SARS コロナウイルス増殖に与える影響についての解析　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

38) 山本典生、永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐多徹太郎、松本武久、高久洋、山本陽子、佐藤人美、平松啓一、田代眞人、山本直樹：Structure-based drug design (SBDD)による SARS コロナウイルス増殖抑制薬剤の同定　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

39) 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物における宿主の Th1/Th2 バランスと重症化の関連　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月東京

40) 森川茂、福士秀悦、酒井宏治、永田典代、長谷川秀樹、松井珠乃、水谷哲也、平井明香、網康至、緒方もも子、西條政幸、山田靖子、岡部信彦、佐多徹太郎、倉根一郎：カニクイザルの致死的イヌジステンパーウイルス感染事例の解析　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

41) 西條政幸、網康至、須崎百合子、塩田智之、飯塚愛恵、永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、緒方もも子、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、佐多徹太郎、倉田毅、森川茂：コンゴ盆地型および西アフリカ型サル痘ウイルスの臓器親和性と病原性　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

42) 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小渕正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代眞人：新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

43) 川口晶、辻隆裕、大場靖子、木村享史、相内章、伊波英克、緒方正男、佐多徹太郎、澤洋文、長谷川秀樹：CXCR4 アンタゴニスト(AMD3100)を用いた SCID マウスにおける Tax トランスジェニックマウス由来腫瘍細胞の組織浸潤抑制　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

44) 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

45) 早川大輔、永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎、高島郁夫、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を脳内接種した際にみられる早い時期の致死性　第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

２３．ハンセン病研究センター

センター長　　石井　則久

概　要

ハンセン病は世界で約 25 万人の人々が新規発症し、抗菌剤による治療が行われている。しかし治癒しても後遺症や偏見・差別、さらに人権侵害にさらされている人も多数いる。その大半は貧困にあえぐ開発途上国に集中している。

ハンセン病は医療の問題も重要であるが、社会的な問題も大きな比重がある。偏見・差別、人権の問題は国連でも大きな課題となっており、日本国はもとより日本財団、笹川記念保健協力財団なども大きな関心を示している。

ハンセン病研究センターはハンセン病の診断、治療、後遺症、予防などの分野にわたりハンセン病に苦しむ人々のために研究を行っている。それにもかかわらず、この病気の病原体やそれに対する人体の反応に関してはなお未知の部分が多く、研究課題は山積している。また偏見・差別の問題などにも積極的に取り組み、啓発活動も行っている。非結核性抗酸菌の研究も行っており、ハンセン病の研究成果を発展させ、ブルーリ潰瘍や新たな抗酸菌症の検査法、治療法、予防法などの研究が進行している。

さらに平成 20 年に稼働した第二研究棟（BSL3 実験施設）では結核菌を用いた研究がスタートし、今後の研究を発展させたい。なお、第二研究棟を含めた研究センターの周辺環境に対する安全な運用について協議する「安全連絡協議会」の第 2 回協議会を平成 21 年 11 月 27 日に開催した。この協議会の委員は周辺住民・ハンセン病療養所入所者組織代表者はじめ関係自治体・行政機関の代表者、有識者などで、有意義な意見を得て、安全な運用を行っている。

ハンセン病に対する一般市民の理解を深め、啓発を行うことは当センターの重要な使命である。このための恒例の「ハンセン病医学市民公開講座」を平成２１年度科学技術週間にあわせて４月 25 日に行った。今年は例年と同様、近隣市民に「遺伝子を利用したハンセン病の予防法と診断法の研究」の題名で向井 徹室長が講演した。

第 32 回を迎えるハンセン病医学夏期大学講座（厚生労働省委託事業、(財)日本科学技術振興財団と夏期大学講座実行委員会の主催）も例年通り国立療養所多磨全生園、同入所者自治会等の協力の下に企画、実行された。医療関係の参加者 31 人を集め、所内外から招請されたハンセン病医学の専門家を講師に、講義・実習を行い、さらに療養所入所者・社会で生活するハンセン病回復者等との交流なども含めた立体的なプログラムでハンセン病にじっくり向かい合う１週間となった。参加者はすでに学校・大学で学ぶ機会がなくなっているこの問題を体系的に学び体験する希有な機会を満喫したことと思われる。

国際協力事業

1. ベトナム国：ハンセン病の早期診断技術指導及び新しい血清診断法に関する共同研究の打ち合わせと実験を実施するため、さらに薬剤耐性サーベイランスの解析結果の討議のため、職員 2 名を派遣した。
2. フランス国：パリで行われた WHO による薬剤耐性サーベイランスのワークショップに参加し、ミャンマー国及びベトナム国で得られた成果を報告した。

行政検査実績（石井則久、鈴木幸一、谷川和也）

平成 9 年 7 月から厚生省（当時）通知により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、薬剤耐性検査である。

平成 21 年度（平成 21 年 4 月ー平成 22 月 3 月）の検査件数は表のごとく 25 症例、53 検査件数であった。なお、国立ハンセン病療養所からの血清検査の依頼はなかった。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いるが、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に依頼検査項目に差異が生じている。薬剤耐性検査は平成 19 年度からは「薬剤耐性遺伝子検査」を開始した。また皮膚スメア検査のサポートも行い、31 件のスメア標本の染色、検鏡を行った。

25 症例の最終診断は、3 例は新規にハンセン病と診断、2 例は PCR 検査のみ陽性で最終診断は主治医判断とし、20 例はハンセン病でなしと診断した。

各年の検査件数は以下の通りである。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(国立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(国立ハンセン病療養所から 105 件の血清検査の依頼があった）、平成 15 年度：54 件、平成 16 年度：98 件、平成 17 年度：104 件(国立ハンセン病療養所から 52 件の血清検査の依頼があった)、平成 18 年度：62 件、平成 19 年度:163 件 (国立ハンセン病療養所から 52 件の血清検査の依頼があった)、平成 20 年度：95 件。平成 21 年度は 53 件であった。ハンセン病新規患者数は平成 21 年では２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、近年は鑑別診断のために行政検査を利用する傾向がみられる。さらに、平成 21 年度の特徴は、PCR 検査陽性例は全て薬剤耐性遺伝子検査を実施し、1 名の新規患者で DDS 耐性が認められた事である。

今後の課題として、行政検査の各医療機関へのさらなる周知徹底、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 21 年度（2009 年度）行政検査実績

受付検体数（番号）	32
総検査件数	53
病理学的検査件数	9
血清抗体価検査件数	9
PCR 検査件数	30
薬剤耐性遺伝子検査件数	5
実症例数	25

らい菌の供給（甲斐雅規、天内 肇、前田百美、谷川和也、牧野正彦）

平成21年4月より同22年3月までの1年間において、のべ36回、122匹、 5施設（国内3、国外2)、8名（国内6、国外2）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。

２４．ハンセン病研究センター

感染制御部

部長　牧 野 正 彦

概　要

平成 21 年 4 月 1 日､ハンセン病研究センターにおいては歴史的な変革が行われた。従来の 2 研究部（病原微生物部と生体防御部）8 室体制から、抗酸菌研究の横断的画一的研究の強化を図るとともに、結核の基礎研究の強化を目的として 1 部 8 室体制とし、部名を感染制御部（Department of Mycobacteriology）とした。8 室の内、第 1～3 室はらい菌に軸足を置き、第 4～6 室は結核菌を中心とした研究を行うこととし、さらに第 7 室・8 室は社会的側面の研究及び行政対応にも対処し得るハンセン病研究を行うこととした。また、病原性抗酸菌に対するワクチン開発並びに薬剤耐性菌に関する研究は、菌種の壁を越え、共通の重要研究課題との認識を持って、各研究員が情報交換を密にして部をあげての協力体制の下研究を推進させることとした。また、6 月には昨年度完成した第二研究棟の稼働整備が整い､所長許可の下 in vitro の研究が先行して実験が開始された。さらに、11 月にはカニクイザルが導入され、動物実験も開始された。

ほぼ全ての研究において､昨年度の研究が継続された。その中で、ハンセン病に対する免疫療法の開発研究とワクチンの開発研究において大きな進展があった。免疫療法の研究では、前田主任研究官を中心とした研究グループにより､らい菌のリポタンパク LpK の一部リポペプチド（LipoK）が、細胞内感染を果たしたらい菌の細胞内殺戮を誘導する上で極めて有用な役割を果たすことを明らかにした。LipoK は CD8 陽性キラーT 細胞のみならず CD4 陽性キラーT 細胞を分化誘導し、パーフォリン・グランザイム B に加え､グラニュライシンの産生を誘導し、これらが作用することによって、らい菌を殺戮することが可能であることを証明した｡ワクチン開発の研究では、改良型 BCG の作製が予定通り行われ、BCG の持つ固有の欠点、すなわちファゴゾームとライソゾームの融合を阻止することを凌駕する方策開発に進展が見られた。これまでその方策として､BCG 感染ファゴゾームの酸性化を促進する方策と、ファゴゾーム内で抗原性分子を分泌させることにより抗原提示細胞と T 細胞の両者を活性化する方策を検討してきたが、両者を組み合わせると、それぞれが相乗的に作用して強い T 細胞活性化能を有する BCG を産生することが可能であることを見い出した。さらに､改良型 BCG の作製においては､抗原性分子を BCG に組み込む手法の確立が必須であるが、従来用いられてきたプラスミド型での導入では、挿入した遺伝子が年月とともに脱落する可能性が強い。そこで、BCG の染色体に抗原性分子を導入する方策が向井室長を中心に検討され、十分量の抗原が発現するプロモーターの開発に成功した。抗酸菌ワクチンのみならず、種々の細胞内寄生性菌に対するワクチン開発への応用が可能であり、実用化が期待される。

結核の研究もワクチン開発のための基礎研究が中心に行われた。結核ワクチンの開発にあっては、抜本的対策が必要である。これまで積み上げてきたタイプ 1 T 細胞の活性化を誘導する分子機構を最大限に応用して、エピトープによる抗原刺激により、T 細胞レセプターに直結して活性化される転写因子の同定に田村室長のグループが成功した。本因子を活性化する能力を持つワクチンの開発が今後の課題となる。

また、ハンセン病に関する行政検査及び依頼検査としての希少抗酸菌の同定が従来通り行われた。

最後に人事であるが 4 月 1 日付で第 7 室長に森　修一、8 月 1 日付で第 5 室研究員に塚本裕美子､9 月 1 日付で第 6 室長に星野仁彦が採用された。また、平成 21 年 3 月 31 日に定年退官した松岡正典室長と儀同政一室長が 4 月 1 日付で再任用職員として採用された。

業　績

調査・研究

Ⅰ．抗酸菌の病原性因子と病変発症機構に関する研究

1. 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipid（GPL）に含まれる D-Rhamnose の生合成解析

Rhamnose は細菌構成成分に広く含まれる糖鎖である

が、その多くは L-rhamnose である。一方、20 型血清型 GPL には、稀有な存在である D-rhamnose が含まれる。そこで、未だ機能や生合成で不明な点が多い D-rhamnose 注目し、20 型 GPL から取得した生合成遺伝子の発現解析を行った。その結果、糖鎖に結合した状態の D-mannose に作用し D-rhamnose を産生する特徴を持つ変換酵素遺伝子の存在を同定した。
[宮本友司、向井　徹、前田百美、中　崇（MBR 社）・矢野郁也（日本 BCG 製造)、牧野正彦]

2.シュワン細胞を用いた神経障害機構の解明

らい菌のシュワン細胞への感染がヒト末梢神経障害の誘導に深く関与しているが、その障害機構は未だに不明である。これまでにカニクイサル由来シュワン細胞株を樹立し、サイトカイン産生能を検討してきた。らい菌感染後、シュワン細胞表面に MHC クラスⅠ抗原の発現が見られたことから、菌の局在を調べた結果、約半数の菌はリソゾームに局在していることが明らかとなった。精製したらい菌は半分近く死菌が混在するためだと考えられる。
[前田百美、遠藤真澄、牧野正彦]

3. ミコール酸合成系に関する研究

らい菌の糖脂質である TMM 及び TDM が持つミコール酸サブクラスが、他の抗酸菌と比べ特徴的であることからその解析を行う目的で、人工培養できないらい菌に代わり、BCG 菌を用いてミコール酸合成系の解析を行っている。これまでにミコール酸合成系のうち mma4A 及び mma2A 遺伝子の破壊株を BCG 菌コンノート株で作成し構成されるミコール酸を調べたところ mma4A 破壊株がらい菌のミコール酸と類似していることがわかった。これら変異株よりミコール酸を主要構成成分とする TMM 及び TDM を抽出し質量分析したところらい菌のそれと類似していることがわかった。そこで、それらを利用しハンセン病の血清診断抗原としての可能性を探った結果、ハンセ病患者血清は反応するが、特異性ではまだ不十分であり、今後さらに検討が必要であることがわかった。
［甲斐雅規、宮本友司、向井　徹、牧野正彦］

4. クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と小胞体ストレスタンパクの動態

ハンセン病の化学療法に用いられるクロファジミンにはらい菌に対する抗菌作用に加え、らい反応などを抑制するなど抗炎症作用が報告されている。この機序については不明な点が多い。ヒトやマウスマクロファージをクロファジミン存在下にて培養すると、小胞体ストレス関連タンパクの発現や caspase 活性化を伴った細胞死が誘導されることを見出した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、小胞体タンパクへのクロファジミンの沈着や、核内に切断されて不活性化した DNA 修復酵素 PARP もみられた。核内にはクロファジミンの沈着はみられなかった
[福富康夫、前田百美、牧野正彦]

5. らい菌感染マクロファージの脂質蓄積機構に関する研究

らい菌が感染したマクロファージのファゴゾーム内で、菌は大量の脂質とともに存在することから、この脂質が菌の増殖に重要であると考えられる。近年、細胞内脂質蓄積の分子機構として ADRP が重要な役割を果たすことが明らかになるとともに、脂質の分解に重要な酵素 HSL の存在も明らかになってきた。そこで、らい菌感染マクロファージにおける ADRP, HSL の役割について検討を行い、感染後前者の発現が亢進、後者が抑制される事を示した。
[鈴木幸一、石井則久]

II. 生体防御機構とワクチン開発に関する研究

1. らい菌感染モデルサルの樹立

ハンセン病の発症機構の解明およびワクチン開発における効果判定・安全性確認のため、サルのモデル系が必要になる。幼若および新生仔カニクイザルにらい菌を接種し、その経過解析を進めている。その結果、接種後 58, 59 カ月に 1 頭の鼻腔洗浄液よりらい菌 PCR 陽性が認められた。接種から、菌の排泄まで 5 年と長い経過を経て、感染成立を示す結果であった。
[向井　徹、松岡正典、片貝裕子（予防衛生協会)、牧野正彦]

2. 効率的な抗原提示を行う BCG の開発

M. bovis BCG を宿主としたハンセン病ワクチン開発のため、Urease C 遺伝子破壊 BCG 株を作製してきた。さらに、らい菌蛋白を BCG で高度に発現させるため、抗酸菌ファージゲノムより promoter のスクリーニングを行った。その結果、*M. smegmatis* および BCG を宿主とし、既存の hsp60 プロモーターより強い活性をもつ領域を同定した。本領域は、これまで plasmid 型による蛋白発現量を integrate 型でも十分量補え、ワクチン開発に有用と考えられた。
[向井　徹、福富康夫、宮本友司、前田百美、牧野正彦]

3.らい菌由来リポ蛋白 LpK の免疫学的な解析
らい菌由来 LpK の合成リポペプチド LipoK は、樹状細胞を成熟化し、らい菌抗原を T 細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。感染した細胞を破壊するため、CTL 細胞の果たす役割が大きい事が知られている。LipoK 存在下でらい菌感染樹状細胞は CD8 及び CD4 陽性 T 細胞を刺激しパーフォリン、グランザイム B を産生した。さらに、らい菌または LipoK で刺激した樹状細胞を用いて、T 細胞からの granulysin 産生能を調べた結果、らい菌のみでは granulysin 産生 CD8 陽性細胞はほとんど（1.67%）見られないが、らい菌存在下で LipoK をパルスした樹状細胞は CD8 陽性 T 細胞を刺激し、有意に granulysin を産生した(18.9%)。Granulysin は直接菌を殺す事が知られている、従って、LipoK はハンセン病予防に重要な分子である可能性が示唆された。
［前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦］

4. 結核菌ワクチン開発の基礎研究のための組換え BCG 作製
これまでの研究から、抗原性が高い major membrain protein Ⅱ（MMPⅡ）と HSP70 との融合蛋白質を発現させた BCG 株を作製し、従来の BCG よりも強い免疫応答を誘導できることを見出してきた。そこで、結核菌に存在するが BCG に存在しない抗原として知られる ESAT6 分子を HSP70、MMPⅡと融合させて発現させた BCG 株を新たに樹立した。この BCG 株を感染させた場合の宿主の免疫応答についての解析を開始した。
[塚本裕美子、牧野正彦]

5.ヒトマクロファージ、樹状細胞を用いた組換え BCG の細胞内局在の解析
これまでの研究から、尿素分解酵素を欠損させた BCG（BCG-△UT 株）は従来の BCG と比較して強い免疫応答を誘導できることを見出してきた。従来の BCG 株は感染マクロファージ内ではライソソーム中に取り込まれないことが知られているが、BCG-△UT 株はライソソーム中に取り込まれることが予想される。そこでヒト由来マクロファージを用いて BCG-△UT 株の細胞内局在について解析し、ライソソーム中に取り込まれていることを確認した。ヒト由来樹状細胞では従来の BCG 株でもライソソーム中に取り込まれるものが多く、BCG-△UT 株との差は見られなかった。
[塚本裕美子、牧野正彦]

6. 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導機序の解析-
結核菌分泌蛋白由来のペプチド(Peptide-25)は、Th1 分化の主要調節因子である T-bet に加え、TATA box binding protein associated factor の一種の発現を誘導することで ifn-γ遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、IL-12 などの Th1 分化誘導サイトカインや副刺激分子相互作用非依存的に Th1 分化を誘導していることを明らかにした。
[田村敏生、下袴田陽子、高津聖志(富山県薬事研究所)、牧野正彦]

7. Th1 細胞依存的機能的細胞傷害性 T 細胞の分化誘導機序の解析
ナイーブ CD8+ T 細胞からグランザイム B の発現を伴う機能的な細胞傷害性 T 細胞への分化には Th1 細胞への分化を誘導するような環境下で CD4+ T 細胞と相互作用した樹状細胞の活性化が重要であること、この活性化には IFN-γ、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用といった Th1 分化を誘導・制御する因子以外の CD4+ T 細胞が分泌する新たな液性因子によって制御されていることを明らかにした。
[田村敏生、下袴田陽子、高津聖志(富山県薬事研究所)、牧野正彦]

III. 病原性抗酸菌症の診断および治療に関する研究

1.ハンセン病の新しい血清診断の開発
これまでに血清診断用の抗原として、Major Membrane Protein-II（MMP-II）の有用性を検討してきた。ハンセン病流行地である、インドネシア（南スラウェシ島）の患者血清中の抗 MMP-II 抗体値を測定した結果、抗 MMP-II 抗体の陽性率は高く、血清診断に有用であることが示唆された。つぎに、日本の療養所入所者の血液を調べた。多菌型では 75.8%、少菌型では 47%の陽性率であり、抗 PGL-I 抗体の陽性率より高かった。多菌型ハンセン病患者では皮膚病変が広範囲であった症例で、抗 MMP-II 抗体価がより高値を示した。
［前田百美、鮫島朝之（国立療養所星塚敬愛園)、甲斐雅規、Mohammed Hatta (Hasanuddin University)、牧野正彦］

2. クロファジミンの細胞親和性に関わる分子
クロファジミンには細胞親和性があり、継続服用により組織沈着が起こる。aurintricarboxylic acid (ATA) によりクロファジミン誘導アポトーシスが抑制されたが、FACS による解析からクロファジミンの細胞への沈着が

ATA により阻害されていることが判明した。分光光度計による吸収スペクトルの解析結果からATAとクロファジミンは会合している可能性が示唆され、クロファジミンのフェナジン構造の窒素原子との間で水素結合が起こった結果、細胞への沈着が阻害された可能性が考えられた。すなわち、クロファジミンの分子中、フェナジン構造の窒素原子部分が細胞親和性に大きく関わっている可能性が示唆された。
[福富康夫、前田百美、牧野正彦]

3.ヒトとマウスマクロファージ内におけるらい菌に対する殺菌機構の違い

ハンセン病において、LL型ではらい菌がマクロファージ内で増殖しているが、TT型ではらい菌が病変部分に検出されることは稀である。TT型ではマクロファージが活性化して殺菌作用が増強しているといわれているが、ヒトマクロファージの殺菌機構について詳細は不明である。マウスマクロファージやM-CSF誘導ヒト単球由来マクロファージ（M-マクロファージ）を IFNγ存在下で培養すると抗らい菌活性（らい菌の代謝活性減少）が誘導されたが、IFNγ刺激マウスマクロファージにみられるような、誘導型酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現はなく、殺菌に酸化窒素の関わりは少ないと考えられる。
[福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦]

4.ヒトマクロファージにおける抗らい菌作用発現の仕組み

IFNγ刺激マクロファージではウエスタンブロット法によりNADPHオキシダーゼを構成するphoxタンパクの発現が著明に増強していることが判明した。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察により、IFNγ刺激したマクロファージ細胞質におけるphoxタンパクの蓄積や、貪食されたらい菌周囲へのphoxタンパクの集積が観察された。よって、スーパーオキサイド産生酵素であるNADPHオキシダーゼの発現がらい菌に対する殺菌作用を増強している可能性が示唆された。
[福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦]

5. 病原性抗酸菌の分離･同定に関する研究

培養や同定が困難な病原性抗酸菌について、1. 培養条件の検討、2. 菌の生化学的性状、3.各種遺伝子の配列解析、による分離・同定を試みた。これまでに、報告例のない皮膚疾患由来および肺疾患由来の新種抗酸菌の分離･同定に成功した。また、DDH法による同定でM. xenopi症とされる中に *M. heckeshornense* 症例が高い確率であること、あるいは *M. abscessus* とされている症例の1/3は *M. massiliense* 症であることを明らかにした。
［中永和枝、星野仁彦、牧野正彦、石井則久、岩本朋忠(神戸市環境保健研究所)、吉田志緒美（NHO近畿中央胸部疾患センター）齋藤肇(広島県環境保健協会)］

IV.薬剤耐性らい菌に関する研究

1.抗酸菌のフルオロキノロンの耐性変異に関する研究

オフロキサシンなどのフルオロキノロン系薬剤に対する抗酸菌の耐性はgyrA遺伝子の変異によって起こるが、様々な変異の影響を検証するため、迅速発育抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* のgyrA遺伝子を、らい菌、または結核菌 gyrA 遺伝子で置き換えたモデル抗酸菌株の作製を試みた。らい菌gyrA遺伝子ではインテイン部を除去しても置き換えに成功しなかったが、結核菌gyrA遺伝子ではモデル菌を得られたため、これに点変異を加えてgyrA 変異とフルオロキノロン耐性の関係について詳細に検討している。
[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

2.抗酸菌のリファンピシン耐性変異に関する研究

化学療法剤リファンピシンに対するらい菌、結核菌の耐性はrpoB遺伝子の変異によって起こり、様々な変異が報告されている。そこで、rpoB遺伝子の様々な変異がリファンピシン感受性に与える影響を詳細に検証するため、迅速発育抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* のrpoB遺伝子をらい菌 rpoB、または結核菌 rpoB 遺伝子で置き換えたモデル抗酸菌株を作製した。これを用いて、16ヶ所のコドン・30種の変異について試験した結果、8ヶ所のコドン・17種の変異で耐性化したが、他の変異では耐性化しないことが示された。
[中田登、甲斐雅規、牧野正彦]

3.らい菌量と抗菌薬の濃度による抗らい菌活性の相関に関する研究

ハンセン病の治療に用いられている抗菌薬DDS, B663, RFP, SPFX, CAM, MINOの投与量が適正かどうか、らい菌量と抗らい菌薬の濃度との相関を Buddemeyer 法を用いて調べた結果、 RFP, SPFX, MINOは、少菌型・多菌型とも標準的治療法で、DDS, B663, CAMは、少菌型では標準的治療法で、多菌型では標準的治療法より投与量を増やすことで有効血中濃度を維持し、抗らい菌活性を強め、耐性菌対策になると考えられた。
[儀同政一、牧野正彦]

4. らい菌 の薬剤耐性菌と感受性菌の混合感染に関する研究

ハンセン病治療薬、ダプソンの耐性がらい菌の葉酸合成酵素遺伝子の変異と関連することが知られており、耐性菌検出の指標となっている。しかし臨床分離株でしばしば塩基配列決定が困難な例や陰性だが、臨床上耐性が疑われる例があり、他の耐性機構の存在あるいは耐性菌と感受性菌の混在が疑われた。これまで、保存臨床検体ＤＮＡから変異領域をＰＣＲ増幅しダイレクトシークエンス及びクローニングしてシークエンスしたところ、耐性菌と感受性菌が混在していると考えられる検体を発見してきた。現在さらに治療経過と耐性菌出現との関連性等に着目して臨床材料の調査を行っている。

［甲斐雅規、松原久美子、牧野正彦］

V. らい菌の遺伝情報に関する研究

１．らい菌ゲノムの次世代シークエンス解析

当センターで維持、管理、使用されているらい菌株３株の次世代ゲノムシークエンスを行い、全ゲノムシークエンスが解明されているらい菌 TN 株、Br4923 株を含めた相互比較を行なった。特に増殖能の異なるらい菌株から、これまで知られていないらい菌の増殖に関与する遺伝子もしくは遺伝子群の検索を行っている。SNPs 解析から増殖能の低いらい菌に特有のアミノ酸変異を持つ遺伝子約 30 を同定したので、各遺伝子のアミノ酸変異による増殖能に与える影響を調査している。また、これまで同定してきた SNPs 情報および今回得られたものより、らい菌の疫学調査に有用な SNPs パターンの検討を行っている。

［甲斐雅規、宮本友司、中田　登、松岡正典、牧野正彦］

2. DNA マイクロアレイによるらい菌遺伝子発現の網羅的解析

らい菌の全遺伝子を対象とした DNA マイクロアレイを行い、遺伝子発現レベルを明らかにした。それらの遺伝子発現を機能ごとに分類を行いらい菌遺伝子の特徴を初めて明らかにするとともに、連続して発現する遺伝子から新規オペロンと考えられる領域を複数同定した。

[鈴木幸一、赤間剛、石井則久]

VI. ブルーリ潰瘍および近似疾患に関する研究

１．*Mycobacterium ulcerans* 感染症に関する研究

Mycobacterium ulcerans によるブルーリ潰瘍は難治性の皮膚疾患である。これまでに、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、マウス実験感染モデル系を確立し Rifalazil の有効性を明らかにするとともに末梢神経傷害と毒性脂質マイコラクトンの関係を明らかにした。また日本におけるブルーリ潰瘍（“*M. ulcerans* subsp. shinshuense”感染症）14 症例を収集し、*M. ulcerans* との違いを検討中である。

［中永和枝、星野仁彦、牧野正彦、石井則久、後藤正道（鹿児島大）、岩本朋忠(神戸市環境保健研究所)、齋藤肇(広島県環境保健協会)］

Ⅶ. ハンセン病回復者と家族への偏見・差別の是正に関する社会研究

１．ハンセン病回復者と家族の社会課題と共生政策に関する国際研究

ミャンマーの Mandalay 管区、東 Shan 州、西 Shan 州、Mon 州、Magwe 管区, Siggaing 管区のハンセン病患者村（コロニー）と一般社会（コミュニティー）のハンセン病患者・回復者（PAL: Person Affected by Leprosy）と家族の直面する社会課題を調査し、その対策としての有効事例を研究するなどして、PAL と家族への偏見・差別とスティグマの成立要因を分析し、それらを是正するプログラムなど研究した。その結果、回復者・患者への偏見・差別の是正には、彼らの経済的自立、教育水準の向上、アイデンデティーの確立が必要と考えられ、早期発見・早期治療、障害予防のための医療制度の改革、経済的自立のための microcredit loan や効果的な職業訓練の導入、教育水準を高めるためのファンドの設立と PAL やその子弟から教師を育成するなどが効果的であることが明らかとなった。

［森　修一、石井則久］

Ⅷ. ハンセン病の疫学に関する研究

１．日本のハンセン病の疫学の歴史的研究

日本における日本人のハンセン病患者数は、過去 1 世紀以上にわたって減少を続けており、近年は年間数人程度にとどまっている。また、沖縄を中心として、南日本に新患者発生が集中している、新患者が高齢化傾向にある。このようなハンセン病の終焉期疫学的傾向が日本固有のものなのか、それとも類字の疫学的状況にある他国にも共通の要素があるのかを明らかにするために、過去の文献や全国のサーベランスの結果をもとに、1964 年から 2008 年の 45 年間における日本の患者の地理的分布、診断時年齢、性別、病型、家族歴などについて動向を分析した。その結果、日本人ハンセン病新規患者においても、近年、罹患時年齢の上昇、男女比の増加傾向がみられた。また、ハンセン病の流行の制圧は、北部ほどより

早期に開始し、成功も早かった。これらは、ヨーロッパ等世界の他地域においても、ハンセン病の流行の終焉期に共通して見られる減少であった。

[木庭　愛（厚生労働省大臣官房統計情報部人口動態・保健統計課）、森　修一、石井則久]

国際協力関係業務

Ⅰ．ハンセン病の早期診断法と薬剤耐性らい菌に関する研究及びWHOの薬剤耐性監視事業への協力

これまで主にベトナム国とミャンマー国においてハンセン病の早期診断法に関する共同研究を実施し、PGL-I及びMMP-IIなどのらい菌抗原を利用した血清診断法の確立とその有効性を証明してきた。今年度はさらに免疫学的な診断法のハンセン病診断への応用を可能にするための実験室準備と現地担当者の教育を行った。さらにWHOより依頼を受けた薬剤耐性サーベイへの協力（ベトナム国、ミャンマー国で得られた試料を用い、薬剤耐性遺伝子変異の確認）を行い、結果をフランス国パリで行われたWHOによるワークショップに参加し報告した。

［甲斐雅規、福富康夫、向井　徹、前田百美、宮本友司、松岡正典、Nguyen Phuc Nhu Ha(Quyhoa hospital, Vietnam), Nguyen Thangh Tan(Quyhoa hospital, Vietnam), 牧野正彦］

Ⅱ．WHOによる薬剤監視事業への協力

WHOによる薬剤監視事業において耐性獲得に関与する変異検出遺伝子検索を担当する国内外の計11ヶ所のreference centerにおける技術の統一を図った。4菌株についてそれぞれ2濃度のサンプルと、Negative controlを配布した。2施設を除いてPCRによる遺伝子増幅の効率が低く、その改善が急務であった。また、1施設においてはNegative controlに非特異的PCR陽性が示され、技術の改善が望まれた。FTA® elute cardはらい菌遺伝子の保存とその後の遺伝子解析に有用であった。

［松岡正典］

らい菌の供給

平成21年4月より同22年3月までの間において、のべ36回、122匹、5施設（国内3、国外2)、8名（国内6、国外2）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。

［甲斐雅規・天内肇・前田百美・谷川和也・牧野正彦］

らい菌感染ヌードマウス足蹠の分与

（平成21年4月より平成22年3月）

Ｎｏ.	年月日	分与先		マウス匹数
１）	4.1	前田	ハンセン研	1
２）	4.1	甲斐	ハンセン研	1
３）	4.28	前田	ハンセン研	1
４）	5.22	前田	ハンセン研	1
５）	5.27	甲斐	ハンセン研	5
６）	6.2	松岡	ハンセン研	12
７）	6.3	前田	ハンセン研	1
８）	6.1	松岡	ハンセン研	4
９）	6.1	甲斐	ハンセン研	6
１０）	6.18	前田	ハンセン研	1
１１）	6.23	天児	九州大	1
１２）	7.15	儀同	ハンセン研	4
１３）	7.17	前田	ハンセン研	1
１３）	8.5	前田	ハンセン研	1
１４）	8.18	松岡	ハンセン研	1
１５）	8.26	甲斐	ハンセン研	13
１６）	8.27	甲斐	ハンセン研	18
１７）	9.3	前田	ハンセン研	1
１８）	9.1	甲斐	ハンセン研	4
１９）	9.16	(松岡)	WHO	2
２０）	10.9	前田	ハンセン研	1
２１）	11.9	向井	ハンセン研	5
２２）	12.3	向井	ハンセン研	3
２３）	12.4	前田	ハンセン研	1
２４）	12.15	増澤	北里大	2
２５）	2010.1.6	Dr Cambau (松岡)	フランス国立抗酸菌リファレンスセンター	8
２６）	1.7	前田	ハンセン研	1
２７）	1.26	前田	ハンセン研	1
２８）	1.28	甲斐	ハンセン研	1
２９）	2.1	向井	ハンセン研	5
３０）	2.1	前田	ハンセン研	1
３１）	2.17	天児	九州大	1
３２）	2.19	前田	ハンセン研	1
３３）	2.22	向井	ハンセン研	5
３４）	3.5	前田	ハンセン研	1
３５）	3.1	前田	ハンセン研	1
３６）	3.23	向井	ハンセン研	5

発　表　業　績　一　覧

Ⅰ．誌　上　発　表

1．欧文発表

1) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 55: 39-46.

2) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. Jpn. J. leprosy, 78: 7-16.

3) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino.

2009. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein-II in mice. Clin. Vaccine Immunol. 16: 1399-1404.

4) Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST. 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nat Genet. 41:1282-1289.
5) Matsuoka M, Gonzalez AV, Estrada I, Carreño-Martinez C, Fafutis-Morris M. 2009. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution. Lepr Rev. 80:322-326.
6) Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, Young S, Richardus JH, Truman R, Hall B, Brennan P; Ideal Consortium Partners. 2009. Characterisation of short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev. 80:250-60.
7) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naïve $CD8^+$ T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 183:6561-6568.
8) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. Lepr. Rev. 80: 402-409.
9) Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. 2009. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. J. Immunol 182:1593-601.
10) Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, Osana Y, Sakakibara Y and Ishii N. 2009. Whole genome tiling array analysis of Mycobacterium leprae RNA reveals high expression of pseudogenes and non-coding regions. J. Bacteriol 191:3321-3327.
11) Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N and Khang TH. 2009. Evaluation of PCR-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. J Dermatol 36:269-276.
12) Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, Kawashima A, and Ishii N. 2009. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. Clin Exp Immunol 156:495-501.
13) Nakamura K, Akama T, Pham DB, Sekimura S, Tanigawa K, Wu H, Kawashima A, Hayashi M, Suzuki K and Ishii N. 2009. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. Microb Pathog 47:183-187.
14) Koba, A. N. Ishii, S. Mori, PE. Fine. 2009. The decline of leprosy in Japan: patterns and trends 1964-2008. Lepr Rev. 80:432-40.
15) Matsuoka M. 2010. Drug resistance in leprosy. Jpn J Infect Dis. 63:1-7.

2. 和文発表

1) 田村敏生、福富康夫、牧野正彦．2009．結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線．(The forefront of vaccine development: tuberculosis and leprosy.) 日本ハンセン病学会誌 78：271-276.
2) 鈴木幸一、永岡譲、森修一、石井則久. 2009. 2008 年における世界のハンセン病の現況について．日本ハンセン病学会誌 78:25-34.
3) 赤間剛、鈴木幸一、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、石井則久. 2009．タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける発現部位の検出．日本ハンセン病学会誌 78:49-54.
4) 鈴木幸一、中村和昭、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、赤間　剛、林もゆる、関村　慎、Pham Dang Bang、石井則久．2009．らい菌ゲノム由来 RNA 発現の網羅的解析とその意味するもの．日本ハンセン病学会誌 78: 61-65.
5) 石井則久、森修一、永岡譲、鈴木幸一. 2009. WHO 第９回ハンセン病制圧のための技術勧告（Technical Advisory Group: TAG）会議報告．日本ハンセン病学会誌 78:75-88.
6) 石井則久、鈴木幸一．2009．地球温暖化に伴う輸入感染症．皮膚科の臨床 51:7-11.
7) 永岡譲、石田裕、鈴木幸一、石井則久．2009．ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事（2009）の

報告. 日本ハンセン病学会誌 78:251-253.

8) 石井則久、鈴木幸一. 2009. 抗酸菌感染症. 皮膚科の臨床 51(11):1599-1606.

9) 森　修一、鈴木幸一、スマナ　バルア、永岡　譲、石井則久. 2010. ハンセン病による負荷のさらなる軽減のための強化された世界戦略. 日本ハンセン病学会誌 79:53-73.

Ⅱ. 学　会　発　表

1. 国際学会

1) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4+ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

2) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

3) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

5) Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

6) Izumi, S., Iswahydi, I. Agusni, C. Rosita, R. Wahyuni, D. Adriaty, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. *M. leprae*-derived Major membrane Protein II (MMP-II) as A New Antigen for Serodiagnosis of Leprosy Infection. 10th Annual Meeting of Indonesian Society of Dermatology and Venereology, Bantem, Indonesia, October 29-30, 2009

7) Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N: Buruli ulcer in Japan: 14 cases of “Mycobacterium ulcerans subsp. shinshuense” infection in 1980-2009. Annual Meeting of the WHO Global Buruli Ulcer Initiative, Geneva, Switzerland, March 22-24 ,2010

8) Goto M, Junichiro En, Nakanaga K, Ishii N, Saito H, Sarfo S, Phillips RO, Wansbrough-Jones M: Comparison of murine and human histopathology after chemotherapy. Annual Meeting of the WHO Global Buruli Ulcer Initiative, Geneva, Switzerland, March 22-24, 2010

2. 国内学会

1) 赤間剛, 鈴木幸一, 谷川和也, 川島晃, Huhehasi Wu, 林もゆる, 石藤雄子, 石井則久. タイリングアレイによるらい菌ゲノム全域の網羅的発現解析. 第 3 回日本ゲノム微生物学会年会 2009 年 3 月. 東京

2) 川島晃, 谷川和也, Huhehasi Wu, 赤間剛, 石井則久, 武下文彦, 鈴木幸一. 甲状腺細胞傷害によって漏出する二本鎖 DNA が誘導する自然免疫機構の解明. 第 82 回日本内分泌学会　2009 年 4 月. 前橋

3) 中永和枝, 斎藤肇, 石井則久. 紅皮症患者より分離された遅発育性暗発色抗酸菌:主としてその細菌学的性状について. 第 83 回日本感染症学会総会 2009 年　4 月 東京

4) 大野貴司, 井形華絵, 梶田　藍, 大塚正樹, 濱田利久, 岩月啓氏, 野村知代, 片山治子, 石井則久, 中永和枝. 非結核性抗酸菌による難治性潰瘍の 3 例. 第 247 回日本皮膚科学会岡山地方会　2009 年 5 月　岡山

5) 甲斐雅規, 中田　登, 松岡正典, 椎名　隆, 猪子英俊, 牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009 年 5 月　出雲

6) 松岡正典, Mary Fafutis Morrris, Iris Estrada. メキシコにおいて分離されるらい菌の遺伝子型とその地理的分布. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009 年 5 月　出雲

7) 天児和暢, 飯田健一郎, 松岡正典, 吉田真一. らい菌の試験内培養. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009 年 5 月　出雲

8) 向井　徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. らい菌

蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

9) 前田百美，Mochammad Hatta，Ratnawati，Mashudi，Yadi，Muhammad Sabir，Nataniel Tandirogang，Luh Made Mas Rusyati，甲斐雅規，向井　徹，宮本友司，福富康夫，牧野正彦．Major membrane Protein-IIを用いた血清診断法．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

10) 田村敏生，福富康夫，牧野正彦．結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線．（シンポジウム）第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

11) 儀同政一．ハンセン病の化学療法薬（教育講演）．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

12) 赤間剛，鈴木幸一，谷川和也，川島晃，Huhehasi Wu，林もゆる，石藤雄子，石井則久，宮村達男．DNAマイクロアレイによるらい菌全遺伝子の発現解析．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

13) 谷川和也，鈴木幸一，川島晃，Huhehasi Wu，赤間剛，林もゆる，中村和昭，相沢清香，Pham Dang Bang，石藤雄子，木村博昭，生山祥一郎，武下文，石井則久．らい菌は宿主マクロファージのTLRシグナルを抑制し細胞内寄生環境を構築する．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

14) 細川篤，山口さやか，宮里仁奈，上里博，照屋操，谷川和也，鈴木幸一，松岡正典，矢島幹久，石井則久．TT ～ BT型が疑われたハンセン病の1例．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

15) 松尾英一，坂井哲夫，野間口博子，鈴木幸一，脇坂晟，藤岡保範，神谷茂．血管病変と*HI75*の神経侵入．第82回日本ハンセン病学会、シンポジウム１、ハンセン病神経障害総論と最近の知見．第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

16) 鈴木幸一．らい菌の細胞内寄生機構．第82回日本ハンセン病学会 シンポジウム２，らい菌の宿主体内での生き延び策をどう捉え、どう対処するのか．82回日本ハンセン病学会総会・学術大会　2009年5月　出雲

17) 中永和枝，吉田志緒美，岩本朋忠，山本淳，服部陽子，畑井喜司雄，石井則久，牧野正彦，斎藤肇．Mycobacterium marinumに関する研究：ヒト皮膚並びに肺疾患由来菌と魚病由来菌の比較検討．　第79回実験結核研究会　2009年　7月 札幌

18) 吉田志緒美，鈴木克洋，中永和枝，岩本朋忠，富田元久，矢木泰弘，坂谷光則，斎藤肇．わが国における Mycobacterium marinum による肺感染症の第 2 例．　第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 7 月 札幌

19) 中永和枝，斎藤肇，石井則久．紅皮症患者の生検皮膚組織より分離された遅発育暗発色性の 1 抗酸菌株．　第 84 回日本結核病学会総会　2009 年　7 月　札幌

20) 中永和枝，斎藤肇，石井則久，牧野正彦，江良悠子，松本賢太郎，丸茂健治，松本英伸，洲鎌芳美，重藤えり子，児玉朱実，小橋吉博，冨田元久，倉岡敏彦．Mycobacterium abscessus と鑑別を要する抗酸菌、なかんずくMycobacterium massiliense について．第41回非結核性抗酸菌症研究協議会　2009年　7月　札幌

21) 斎藤肇，中永和枝，石井則久．一温泉施設の垢擦りマッサージ師にみられた Mycobacterium massiliense　皮膚感染症の2例．　第79回日本感染症学会西日本地方会総会　2009年　11月　福岡

22) 斎藤肇，中永和枝，秋山也寸史，松本英伸，洲鎌芳美，重藤えり子，児玉朱実，小橋吉博．Mycobacterium abscessus とその近縁菌 Mycobacterium massiliense との鑑別同定．　第79回日本感染症学会西日本地方会総会 2009年11月 福岡

23) 斎藤肇，中永和枝，松本英伸，小橋吉博，児玉朱実，丸茂健治，江良悠子，洲鎌芳美．近縁な抗酸菌による誤診し易い感染症．　第 26 回広島感染症研究会 2009 年　11 月 広島

24) 斎藤肇，中永和枝，石井則久．Mycobacterium abscessus 類似抗酸菌 Mycobacterium massiliense による皮膚感染症の2例．　第40回結核･非定型抗酸菌症治療研究会　2009年　12月　東京

25) 斎藤肇，中永和枝，石井則久，丸茂健治，秋山也寸史，松本英伸，洲鎌芳美，小橋吉博，重藤えり子，児玉朱実，富田元久，永井英明，矢野修一，加治木章，伏脇猛司，倉岡敏彦，岡崎充宏．Mycobacterium abscessus とその近縁菌、Mycobacterium massiliense および Mycobacterium bolletii、との鑑別･同定法．第40回結核･非定型

抗酸菌症治療研究会　2009年　12月 東京

26) 斎藤肇，中永和枝，石井則久，丸茂健治，松本英伸，洲鎌芳美，重藤えり子，児玉朱実，小橋吉博. Mycobacterium abscessus と，その類似抗酸菌、Mycobacterium massiliense との鑑別・同定.　第60回日本結核病学会中国四国支部学会　　2010年2月 山口

27) 斎藤肇，中永和枝，石井則久，江良悠子，松本賢太郎，金澤裕司. Mycobacterium abscessus 類似抗酸菌 Mycobacterium massiliense　による皮膚感染症の2例.　第60回日本結核病学会中国四国支部学会　2010年　2月　山口

28) 宮本友司, 向井　徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中　崇, 藤原永年，水野淨子，矢野郁也，牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex 血清型 4 型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第 83 回日本細菌学会総会　2010年3月 横浜

29) 向井　徹，前田百美，福富康夫，宮本友司，松岡正典，牧野正彦. 抗酸菌ファージ TM4 に由来する強力な抗酸菌プロモーターの同定. 第 83 回日本細菌学会総会　2010年3月　横浜

30) 中田　登，甲斐雅規，牧野正彦. 抗酸菌 *rpoB* 遺伝子変異とリファンピシン感受性に関する解析. 第83回日本細菌学会総会　2010年3月　横浜

31) 前田百美，田村敏生，甲斐雅規，福富康夫，牧野正彦. らい菌リポ蛋白由来リポペプチドによる宿主細胞内らい菌の殺戮. 第 83 回日本細菌学会総会　2010年3月　横浜

32) 福富康夫，前田百美，牧野正彦. ヒトマクロファージの抗らい菌活性発現と phox タンパクの動態. 第83回日本細菌学会総会　2010年3月　横浜

２５．総務部総務課図書室

図書室長（総務課長併任）勝又　勝行

編集委員長　　倉根　一郎

概　要

図書室長は、山内久が前年度３月末で異動し、４月より総務課長勝又勝行が事務を取扱った。

図書室では、図書係が研究資料の収集管理提供サービス全般を、編集翻訳係が機関誌 JJID（Japanese Journal of Infectious Diseases）の編集発行を行っている。

[図書係]

平成 21 年度の受け入れ状況は、感染研全体として雑誌 326 タイトル（うち購読 238 タイトル）、単行本 205 冊（うち購入 164 冊）であった。（実績表参照）

外国雑誌の購読経費は、例年前年と比較して約 5%の値上がりを余儀なくされているが、今年度は円高の恩恵を受け、購読タイトル数は昨年度と同様であったが、前年度比約 1.5%、60 万円程度の増額で抑えることができた。（昨年度は前年度比、約 5%、200 万円増）

しかしながら次年度（平成 22 年度）は前回（平成 18 年度）の見直しから４年目となり、この間も外国雑誌の購読経費は年々増加していることから、今年度は６月に全体図書委員会を開催し、次年度契約分の見直し作業に取り掛かった。利用実績を中心に基本案を作成し、部署内の要望調査、部署間調整等を行い、10 月に次年度の購読雑誌を選定した。

また職員の発表論文が退職、雑誌の休刊など諸事情により散逸する恐れがあることから、図書室で収集保存することを検討することとなった。

所内専用の図書室ホームページのリニューアルを行い、戸山と村山の図書室ページを統合した。新ホームページの公開により、昨年度末導入された図書館システムの機能による「蔵書検索」「契約電子ジャーナルリスト」「新着雑誌到着メール」「文献・借用依頼」等、研究情報収集をサポートするサービスを一元的に管理し提供することができるようになった。

[編集翻訳係]

平成 21 年度は vol. 62 no. 1-6 を刊行し、JJID ホームページにも全論文の PDF ファイルを載せた。Supplement vol. 58 を発行し、Supplement としては初めて PDF ファイルでも公開した。

本年度の編集委員の交代は、森　亨が退官し、濱口　功が加わった。編集方針に変更はない。前年度に引き続き印刷体の発行部数の削減に努めた。

昭和 22 年の当所創立の年に編集図書委員会を設け、国内外の医学研究業績の交流・連絡の推進のために英文機関誌を発行する準備を始めたと当時の年報に記されている。翌年から Japanese Medical Journal（JMJ）の発行が開始され、昭和 27 年 Japanese Journal of Medical Science and Biology（JJMSB）と名称を変更し、現在の JJID へと続いている。この歴史ある二誌は印刷体のみである。編集委員会ではこの二誌の公開・保存を考慮し、科学技術振興機構（JST）の平成 21 年度電子アーカイブ事業に応募した。選定誌となり JST の調査・作業に協力し、現在は JST のサイトで創刊号からの全文が公開されている。

第 19 回感染研シンポジウムの演者及び 21 年３月 31 日をもって退官した方々に review を投稿して頂くようにお願いした。

今年度の概略は以下の通りである。

発行頁数（掲載論文数）　no. 1/86 頁（23 編）、2/86（21）、3/76（22）、4/81（21）、5/77（19）、6/84（20）

発行部数　750→710 部

発送先　　国内―大学、衛研等　　約 200 機関
　　海外―大学、研究所等　約 360 機関
　　（約 75 ヵ国）

投稿論文数　感染研内　26 編
　　国内　　64 編
　　海外　　150 編（35 ヵ国）

採択率　　30%

実績表

雑誌、単行本受け入れ状況

平成21年度

	戸山		村山		ハンセン	
	洋	和	洋	和	洋	和
雑誌	**191**	**31**	**52**	**36**	**7**	**9**
購読	151	12	42	17	7	9
交換	26	4	-	-	-	-
寄贈	14	15	10	19	-	-
単行本	**69**	**31**	**58**	**54**	**-**	**-**
購入	67	8	51	40	-	-
寄贈	2	23	7	14	-	-

注：1　「交換」とは、ＪＪＩＤとの交換雑誌である。
　　2　国内発行英文雑誌は、雑誌の洋へ含む。

文献相互貸借状況

平成21年度

機関名	戸山		村山		ハンセン	
	供与	依頼	供与	依頼	供与	依頼
総数	**520**	**802**	**147**	**339**	**-**	**41**
国立感染症研究所	**127**	**50**	**53**	**108**	**-**	**19**
戸山	・	・	50	108	-	19
村山	108	50	・	・	-	-
ハンセン	19	-	3	-	・	・
国立感染症研究所以外の機関	**393**	**752**	**94**	**231**	**-**	**22**
国立保健医療科学院	27	47	10	7	-	1
国立医薬品食品衛生研究所	137	4	32	21	-	-
国立国際医療センター	98	194	-	-	-	-
国立成育医療センター	-	-	-	-	-	-
(独)国立健康・栄養研究所	-	-	10	-	-	-
(独)動物衛生研究所	101	55	33	15	-	4
(独)畜産草研究所	-	6	2	9	-	-
(独)霊長類医科学研究センター	1	-	-	-	-	-
その他の国・県の機関((独)含)	-	9	-	2	-	-
地方衛生研究所	9	-	1	-	-	-
国公立病院	8	-	2	-	-	-
国公立大学図書館	5	387	1	144	-	16
国際医学情報センター	1	1	-	-	-	-
私立病院	2	-	1	-	-	-
私立大学図書館	4	42	-	30	-	1
その他	-	7	2	3	-	-

注：戸山の(独)健康・栄養研究所に対する数は把握していない。