

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

| | | |
|---------|---------------|-------------------------|
| 昭和63年4月 | 慶應義塾大学医学部 | 熱帯医学・寄生虫学教室 |
| 平成4年4月 | 米国国立衛生研究所 | 国立アレルギー・感染症研究所 寄生虫病研究部門 |
| 平成6年3月 | 米国ニューヨーク大学医学部 | 医寄生虫学教室 |
| 平成9年1月 | 順天堂大学医学部 | 寄生虫学講座 |
| 平成16年4月 | 順天堂大学大学院 | アトピー疾患研究センター 兼務 |
| 平成18年4月 | 防衛医科大学校 | 国際感染症学講座 (現職) |

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

| | |
|-------------------------|------------------|
| 竹内 勤 博士 | (慶應義塾大学医学部) |
| Dr. James A. Dvorak | (米国国立衛生研究所) (物故) |
| Dr. Fidel Zavala | (米国ニューヨーク大学医学部) |
| Dr. Ruth S. Nussenzweig | (米国ニューヨーク大学医学部) |
| 奥村 康 博士 | (順天堂大学医学部) |
| 小川 秀興 博士 | (順天堂大学医学部) |

・主な研究課題

1. ニューモシスチス・カリニの培養法の開発
2. 赤痢アメーバ症の疫学的研究
3. キネトプラスト属原虫における遊離ミトコンドリア DNA の解析
4. マラリア感染制御機構の解析、マラリアワクチンの開発研究
5. トリパノソーマ感染モデルを用いた T 細胞免疫応答誘導手法の開発研究

・これまでの研究実績

1. Miyahira Y.: *Trypanosoma cruzi* infection from the view of CD8⁺ T cell immunity - An infection model for developing T cell vaccine. *Parasitol Int.*, 57, 38-48, 2008.
2. Miyahira Y., Takashima Y., Kobayashi S., et al.: Immune responses against a single CD8⁺-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.*, 73, 7356-7365, 2005.
3. Miyahira Y., Akiba H., Katae M., et al.: A potent adjuvant effect of ligand to receptor activator of NF- κ B gene for inducing antigen-specific CD8⁺ T cell response by DNA and viral vector vaccination. *J. Immunol.*, 171, 6344-6348, 2003.
4. Miyahira Y., Akiba H., Ogawa S., et al.: Involvement of ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in the regulation of immune responses to *Leishmania major* and *Nippostrongylus brasiliensis* infections. *Immunol. Lett.*, 89, 193-199, 2003.
5. Miyahira Y., Katae M., Kobayashi S., et al.: Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.*, 71, 3131-3137, 2003.
6. Miyahira Y., Katae M., Takeda K., et al.: Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide impairs DNA vaccine-induced protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, 71, 1234-1241, 2003.
7. Katae M., Miyahira Y., Takeda K., et al.: Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infect. Immun.*, 70, 4833-4840, 2002.
8. Oliveira-Ferreira J., Miyahira Y., Layton G.T., et al.: Immunogenicity of Ty-VLP bearing a CD8⁺ T cell epitope of the CS protein of *P. yoelii*: enhanced memory response by boosting with recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 18, 1863-1869, 2000.
9. Akiba H., Miyahira Y., Atsuta M., et al.: Critical contribution of OX40 ligand to T helper 2 cell differentiation in experimental leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, 191, 375-380, 2000.
10. Miyahira Y., Kobayashi S., Takeuchi T., et al.: Induction of CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Int. Immunol.*, 11, 133-141, 1999.
11. Miyahira Y., Garcia-Sastre A., Rodriguez D., et al.: Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8⁺ responses in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 3954-3959, 1998.
12. Tsuji M., Miyahira Y., Nussenzweig R.S., et al.: Development of anti-malaria immunity in mice lacking interferon- γ receptor. *J. Immunol.*, 154, 5338-5344, 1995.
13. Miyahira Y., Murata K., Rodriguez D., et al.: Quantification of antigen specific CD8⁺ T cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods*, 181, 45-54, 1995.
14. Miyahira Y. and Dvorak J.A.: *Kinetoplastidae* display naturally-occurring ancillary DNA-containing structures. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 65, 339-349, 1994.
15. Miyahira Y. and Takeuchi T.: Application of ATP measurement to evaluation of the growth of parasitic protozoa *in vitro* with a special reference to *Pneumocystis carinii*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 100, 1031-1034, 1991.

平成19/20年度 厚生労働科学研究費補助金による
新興・再興感染症研究事業
慢性寄生虫感染症の侵入監視
及びその健康管理体制の確立
(H19-新興-一般-007)

研究の背景

急増する在留外国人の出国では、日本国内では発生が無いまたは撲滅された感染症が流行している可能性がある。その中で、慢性感染する感染症の国内流入の可能性が指摘されているが詳細は明らかではない。本研究では慢性感染する寄生虫/原虫の在留外国人における罹患状況の把握とその監視体制の確立、迅速診断/治療法の開発や健康管理/教育体制の整備、地方自治体と協働し本健康事業に対するガイドライン作成を行い厚生労働行政への一助とする。

平成20年度 慢性寄生虫感染症 研究班 体制

| 研究班 | 研究班長 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
|-----|------------------------------|------|------|------|------|
| 班長 | 山本 浩一 国立感染症研究所 慢性感染症科長 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
| 班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
| 班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
| 班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
| 班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |
| 班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 | 研究班員 |

研究の意義

- (1) 在留外国人の慢性寄生虫/原虫罹患状況について十分な調査が行われたことがなく、その実態が把握されていない。したがって、その対策手法、監視体制は十分に整備されていない。
- (2) 慢性寄生虫/原虫は、特にシヤーガス病、リウマチ性関節炎の血清学的免疫診断法、DNA診断法は、迅速性、簡便性、特異性、信頼性、感度等の面で、新規開発、改善の余地が考えられている。
- (3) マラリア、シヤーガス病、リウマチ性関節炎、住血吸虫症等に対し、これまでに報告されている予防的治療的免疫療法では、感染制御手法としては不十分である。

研究の目的、期待される成果

- (1) 在留外国人の慢性寄生虫/原虫罹患状況の実態を把握し、その監視体制の確立を目的とする。
- (2) 輸血行政等に対する国民の先入観や根拠の無い不安の払拭に寄与することが期待される。
- (3) 健康診断/教育体制の整備は予病の感染事例の可能性を未然に防ぎ、作成ガイドラインは本事業に対する先駆的な対策マニュアルとなる成果が期待される。
- (4) 新規診断、治療法の開発研究では、わが国には流行していない感染症という理由によって研究資金不足により進捗している本研究領域の発展に寄与すると期待される。
- (5) 新規予防/治療的免疫療法の開発研究は、本領域に留まらない、ウイルス、細菌感染症や腫瘍のような他領域への応用される成果が期待される。

本研究推進上の潜在的な問題-在留外国人不法就労問題-

在留外国人には不法就労という法的問題の可能性が常に絡んでいる。不法就労者の存在を知りえた場合には法的手続きを取らなければならない。法を前面に出した対応は在留外国人の警戒感を高め、受診者数の獲得が期待できなくなる可能性を招くと言及する事象が存在している。
本研究事業では、在留のための法的手続きを終えた方々では慢性寄生虫感染症に罹患している可能性は低く、むしろ不法就労者の方々にその罹患の可能性が高いと言及する必要がある。
ぎりぎりの在留条件で就労している方々こそ、まさに本調査研究の対象とされるべきである。法を露骨に前面に出した建前スタイルでは、こういった背景を持つ方々の交流は期待できないと考えられた。
各研究機関では厳正な審査の結果、法令順守を確認した上で、しかし研究班員の職務の限界点また、不法就労者であることを知りえた場合の厳正な通報を確認し、厳しい倫理審査を経て承認された。

研究計画

対象地域：神奈川県

問診：慢性感染する寄生虫/原虫に着手し、在留外国人の方々を対象に生活歴、家族歴、病歴調査を行う。
情報収集：出身地ごとに現地で上記寄生虫/原虫の流行現況に類似した疫学データを収集。

対象者：調査研究の意義と必要性を十分に説明し十分な質保証等を重ね、インフォームド・コンセントの下に調査研究への参加協力を得ている。

留意事項：研究対象者に対する人権擁護上の配慮に努め、個人情報等の管理については遺漏の無きよう周知徹底を図り、個人情報の守秘義務の遵守を確認し作業を進めている。

検査項目：採血(抗体検査、DNA検査等)および検便、検尿(寄生虫、原虫糞子等の検査)を実施し、慢性寄生虫/原虫の罹患率を確定すると共に、必要に応じて超音波検査や心電図などの簡便な画像・機能検査も行って病態の把握にも努める。

新規技術の開発：検便、検尿に関しては、古典的な診断手法がゴールドスタンダードであり、一方、血清を用いた抗体検査、DNA検査では、新規迅速診断手法の開発も視野に入れた技術革新を模索する。

新規治療法の開発研究：既存薬療法の投与プロトコルの改良等結果重視の観点からアプローチし、一方、予防的/治療的免疫療法の開発研究では従来の治療法の殻を打ち破る新規感染制御手法の開発を目指す。

地方自治体との協力：在留外国人の転入転出等について随時把握に努め、上記検査の実施マニュアルを策定しインフォームド・コンセントに基づいた監視体制を構築する。また、感染個体の入国により国内へ持ち込まれた慢性寄生虫/原虫が、日本の感染症の動向、疫学にどのような影響、インパクトをもたらすのか、科学的分析に努める。

教育・啓蒙：在留外国人の方々への継続的な健康管理体制を構築し、在留外国人の方々の本健康事業である慢性感染症に対する知識と意識を、教育を通し高めてゆく。これらを通して、安全・安心な社会、コミュニティーの形成への一助とする。

対象とする慢性寄生虫/原虫感染症：マラリア、シヤーガス病、リウマチ性関節炎、トキソプラズマ症、土壌伝播寄生虫症、住血吸虫症

研究計画の流れ



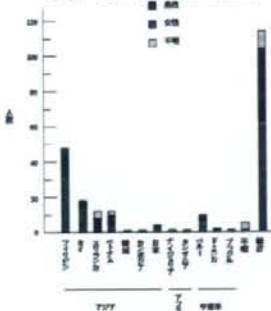
受診者獲得、研究推進に向けたアプローチ

- (1) 在留外国人の診察を行う医療機関を中心とする健診の実施。**
在留外国人が多く存在する地域では、口コミで彼らが信頼し受診する医療機関が固定されていることがしばしば見受けられるという。在留外国人と本研究班との信頼関係の醸成が十分ではない現状では、信頼関係を築いて構築している医療機関での健診は、本研究への受診者獲得の上で有効であると判断された。神奈川県では、大和市の小林国際クリニック、小林大幸院長が適任の方であった。しかし、このアプローチの課題は、本研究の最終目的である本健康事業に対する対策マニュアルを策定した上でそれをセルフ自治体である神奈川県以外の他40都道府県へ配布し、在留外国人の慢性非感染性疾患罹患状況の実態調査を行ううえで、在留外国人の信頼を勝ち得ている医療機関が存在しない地方自治体が存在しうる点にある。
- (2) キリスト教信託在留外国人対象の、キリスト教会での健診実施。**
キリスト教の教会は、各地方自治体にある程度存在することが期待できる。最初のトライアルでは、大和市のカトリック大和教会を健診場所として設定し健診を行った。教会では日本人牧師と信徒代表者と十分な話し合いを持ち、健診の目的と意義、期待される結果について納得いただくことに成功し、定期的に健診を実施することが可能となった。このアプローチは、後に福音教会、平塚教会においても実施された。
- (3) コミュニティ・リーダーを介した健診実施。**
在留外国人のコミュニティでは、異国下で助け合っている事例も多く、そのリーダーに健診実施の仲介の働きを依頼することで受診者が獲得出来ることと考えられた。このアプローチは、平塚教会でのボリビアコミュニティ対象の健診においてその有効性が実証された。
- (4) 在留外国人への健康手帳の配布。**
在留外国人のコミュニティへの本健康事業に関する啓発活動が重要であることは言うまでもない。これら慢性非感染性疾患の問題を、在留外国人の方々へ理解していただくことで、不慮の感染拡大が予防できる可能性が高まるものと考えられる。この目的達成の一助として、研究班では「在留外国人の方々の健康手帳」を日本語、英語、スペイン語、中国語の4ヶ国語で策定し、本健康事業の重要性と健診実施の目的、意義をわかりやすい言葉で説明し、さらに各慢性非感染性疾患の実体を平易な言葉で解説を加えた。これを健診受診者へ無料配布した。
- (5) 特殊健診項目の選別。**
在留外国人の方々の受診意欲を刺激するために、一般健診には通常含まれない特定の健診項目を加えることを考えた。この一例が、腹部超音波検査、胸部超音波検査の実施である。特に計測の超音波検査上での異常発見に努められた。この試みは、健診受診者らの受診意欲を高めたと思われる言動がしばしば聞かれたことからも、有効であったと判断された。
- (6) 神奈川県庁の訪問と職場健診への参加の可能性の構築。**
行政機との共同作業によるマニュアル作成は、本健康事業の解決に向けて重要な情報になるものと考えられる。平成19年12月下旬に神奈川県庁を訪れ、関連すると思われる部署の方々と本件に関し協議する機会があった。この在留外国人の事業への行政側の参画は、彼らの警戒感を高め実質不可能との回答があった。職場健診への参加については、極めて意図的であったことであった。しかし、職場健診参入の可能性を探る努力を重ねることを今後の課題とした。

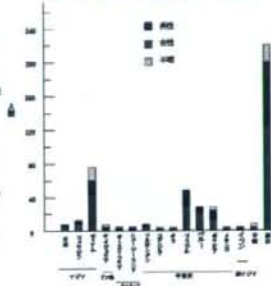
在留外国人健診の概要

| | |
|--|--|
| 調査1 在留外国人健診 | 調査2 在留外国人健診 |
| 日時: 平成19年12月20日(土) 所: 小林国際クリニック 大和市 受診者総数: 51名 男性: 17名 女性: 32名 不明: 2名 | 日時: 平成20年1月6日(日) 所: カトリック大和教会 受診者総数: 43名 男性: 24名 女性: 20名 不明: 0名 |
| 平成19年度受診者健診 | 平成20年度受診者健診 |
| 受診者総数: 134名 男性: 43名 女性: 84名 不明: 18名 | 受診者総数: 134名 男性: 43名 女性: 84名 不明: 18名 |

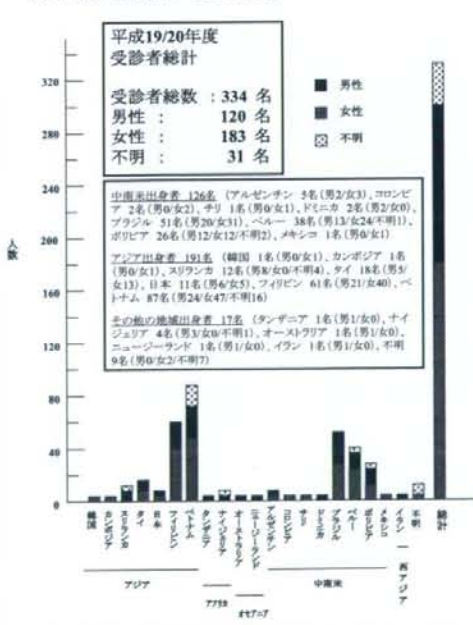
総計 健診(地域別) (H19)



総計 健診(地域別) (H20)



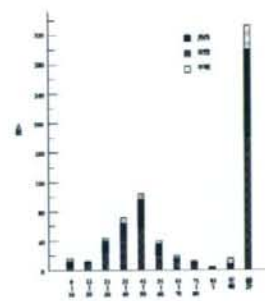
総計 健診(地域別) (H19-H20)



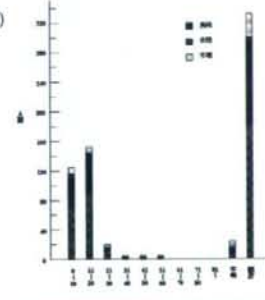
総計 健診(年齢別)

平成19/20年度 受診者総計

受診者総数: 334名
 男性: 120名
 女性: 183名
 不明: 31名



総計 健診(訪日後年数別)



**慢性寄生虫/原虫症罹患可能性が疑われる在留外国人
受診者総数:334名(男性:120名、女性:183名、不明:31名)**

中南米出身者 126名 (アルゼンチン 5名(男3女2)、コロンビア 2名(男0女2)、チリ 1名(男0女1)、ドミニカ 2名(男0女2)、ブラジル 31名(男20女11)、ペルー 38名(男13女24(不明1)、ポリア 2名(男12女1(不明2)、メキシコ 1名(男0女1))
アジア出身者 191名 (韓国 1名(男0女1)、カンボジア 1名(男0女1)、スリランカ 12名(男8女0(不明4)、タイ 18名(男5女13)、日本 11名(男6女5)、フィリピン 41名(男21女20)、ベトナム 87名(男24女47(不明16))
その他の地域出身者 17名 (タンザニア 1名(男1女0)、ナイジェリア 4名(男3女0(不明1))、モースタガア 1名(男1女0)、ニューージーランド 1名(男1女0)、イラン 1名(男1女0)、不明 9名(男6女2(不明7))

免疫学的血清診断陽性 のべ90名 (返送検体数:306名 (男111/女122/不明73))

- 抗内臓リーシマニア症抗体 ベトナム 2名
- 抗シヤーガス病抗体 ポリア 1名
- 抗トキソカラ症抗体 17名(ベトナム6名、フィリピン5名、タイ3名、ポリア2名、韓国1名)
- 抗顎口虫抗体 5名(ポリア3名、フィリピン1名、不明1名)
- 抗赤痢アメーバ症抗体 ベトナム 1名
- 抗旋毛虫抗体 ポリア 1名
- 抗住血吸虫抗体 ナイジェリア 1名
- 抗多包虫抗体 フィリピン 1名
- 抗トキソプラズマ抗体 61名(ブラジル20名、ポリア20名、ペルー9名、コロンビア1名、アルゼンチン1名、ベトナム4名、フィリピン2名、日本1名、ナイジェリア2名、不明1名)

糞便検査陽性 14名(1名は3種混合感染) (糞便検体数:147名 (男54/女60/不明33))

- Entamoeba属感染症 (E. histolyticaか E. disparは未確定) 6名(ブラジル3名(1名は3種混合感染)、ペルー1名、ポリア1名、ベトナム1名)
- ランブル鞭毛虫 3名(ブラジル1名、ペルー1名、ポリア1名)
- クリアストポリウム 6名(ブラジル1名、ベトナム5名)
- 鉤虫 1名

健診実施上、明らかにされた課題

- (1) 超音波検査では時間がゆり過ぎる傾向があって、限られたマンパワーでは手技実施継続に課題を残した。
- (2) 検便で問題になったことは、糞便検体回収方法である。検体郵送に関しては、食品衛生法で定める飲食店従業員の方々の糞便定期検査では郵送と言う手順を採用しており当初郵送による回収を考慮したが、感染可能性がある検体郵送に関しては厳しい制限が加えられるようになっており、議論が分かれたが不可能との結論に至った。したがって、事前に糞便採取容器を配布し、健診当日に持参いただく手順をとることとした。しかしながら、糞便検体の回収率は非常に低い割合に留まっている。
- (3) 健診結果を受け取りに来ない方々の存在一引越し？不発就労者？時間外労働？結果説明会の周知不十分？

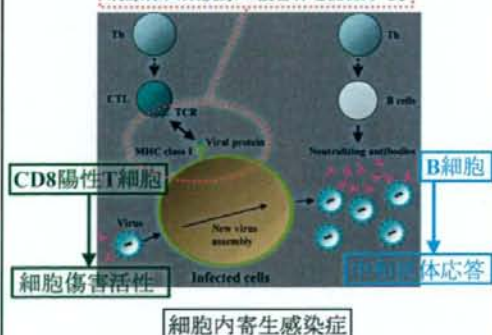
| 検査項目 | 検査回数 | 陽性率 | 検査項目 | 検査回数 | 陽性率 |
|--------------|------|-----|------------|------|-----|
| 抗内臓リーシマニア症抗体 | 206 | 0% | 抗トキソカラ症抗体 | 206 | 8% |
| 抗シヤーガス病抗体 | 206 | 0% | 抗顎口虫抗体 | 206 | 2% |
| 抗旋毛虫抗体 | 206 | 0% | 抗赤痢アメーバ症抗体 | 206 | 0% |
| 抗住血吸虫抗体 | 206 | 0% | 抗多包虫抗体 | 206 | 3% |
| 抗トキソプラズマ抗体 | 206 | 30% | 糞便検査 | 147 | 10% |
| 合計 | 1030 | 33% | 合計 | 1030 | 10% |

- (4) 最大の在留外国人と言われる中国国籍の方の受診が皆無であった。これは、コミュニティーリーダーとの調整で解決可能であると考えている。
- (5) 寄生虫/原虫症罹患の可能性が高い場合でも、治療については診療機関等の「紹介」、「提言」することしか、フォローアップが出来なかったこと。

**細胞内寄生病原体に対する
感染制御手法の開発**

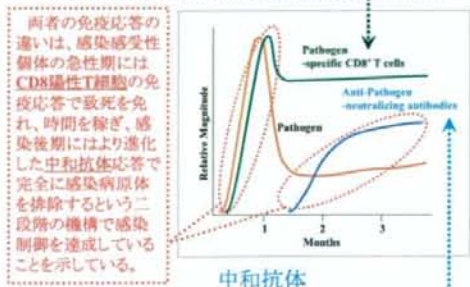
**新規感染制御手法の開発研究
ー獲得免疫応答機構を利用してー**

**CD8⁺ T細胞は、MHCクラスI分子と
病原体由来抗原の複合体を認識する。**



CD8陽性T細胞

- * CD8陽性T細胞の免疫応答は、中和抗体応答に比べて非常に速い。これはCD8陽性T細胞の特長である。
- * 感染またはワクチン接種後数日で形成されるCD8陽性T細胞の免疫応答および免疫記憶は、予期しない感染症の流行に対して迅速に感染抵抗力を付与するという観点で、緊急事態に対応した免疫応答と言える。



- * 両者の免疫応答の違いは、感染感受性個体の急性期にはCD8陽性T細胞の免疫応答で致死を免れ、時間を稼ぎ、感染後期にはより進化した中和抗体応答で完全に感染病原体を排除するという二段階の機構で感染制御を達成していることを示している。
- * 中和抗体応答は、最も進化した、効果的な感染制御機構である。
- * 現在までに人類が手にした感染症ワクチンは、全て例外なくこの中和抗体応答誘導により効果を発揮している。
- * 中和抗体応答の最大の問題点は、効果的なレベルにまで立ち上がるのに月単位の時間がかかることである。

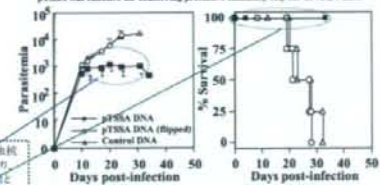
T. cruzi infection is a useful infection model aiming for developing T cell vaccination strategies against intracellular infectious agents.

Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*



Division of Parasitic Diseases-CDC, U.S.A.

pTSSA was effective for conferring protective immunity only for CSTBA mice.



Kato M, Miyahira Y, et al. Construction of an immunization 27 gene and a Trypanosoma cruzi gene expression vector library. Infect Immun. 70, 4033-4040, 2002.

Schematic view of the primary structure of *T. cruzi* trans-sialidase surface antigen (TSSA)

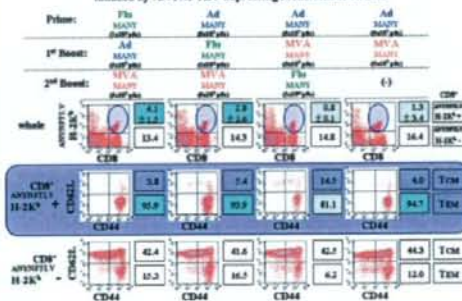


Vaccination regimen against *T. cruzi* by the combination of three different recombinant viruses expressing ANYNFTLV



Fli MANTV (recombinant master adenovirus vector expressing H.2K^b-restricted ANYNFTLV)
Ad MANTV (recombinant replication-deficient adenovirus expressing H.2K^b-restricted ANYNFTLV)
MVVA MANTV (recombinant highly attenuated vaccinia virus expressing H.2K^b-restricted ANYNFTLV)

Phenotypes of antigen-specific TCR-bearing CD8⁺ cells induced by ANYNFTLV-expressing recombinant viruses



まとめ

- (1) 在留外国人の慢性寄生虫/原虫感染症の実態把握のため、地方自治体で在留外国人対象の健康診断を企画、実施し、334名(男性120名、女性183名、性別不明31名)の受診者を得た。
- (2) 健診時に日本語/英語/中国語/ベトナム語並書の健康管理手帳を独自に作成し配布した。
- (3) 健診受診者の出身国、出身地での感染症情報、感染症罹患歴、家族歴、現病歴等の情報を得た。
- (4) 調査研究へ同意された方を対象に、問診、採血、検便、超音波検査(肝エコー、心エコー)による健診を計7回実施し、健診受診者から検体および超音波画像を得た。
- (5) 血清検体を用いて血清学的免疫診断法を行い、ベトナム国籍の受診者2名が抗内臓リーシスマニウム抗体陽性、シネガズ病については、中南米出身者126名(アルゼンチン2名、コロンビア2名、チリ1名、ドミニカ2名、ブラジル51名、ペルー3名、ボリビア26名、メキシコ1名)のうち、ボリビア人1名の抗体陽性者を見出した。マリア原虫検査では、迅速診断キット(OptiMalTM)1名の抗体陽性者を見出したが、最終的に陽性として判定した。トキソプラズマ抗体陽性者は、平成20年度で61名(ブラジル20名、ボリビア20名、ペルー9名、コロンビア1名、アルゼンチン1名、ベトナム4名、フィリピン2名、日本1名、タイ/ジャバ2名、不明1名)であった。嚙虫症では、平成19年度は1キソカク抗体陽性者(フィリピン4名、タイ3名、ベトナム1名、韓国1名)、多包虫症1名(フィリピン)を確認し、平成20年度は1キソカク抗体陽性者(ベトナム5名、ボリビア2名、フィリピン1名)、嚙虫抗体陽性者5名(ボリビア3名、フィリピン1名、不明1名)、赤痢アメーバ抗体陽性者1名(ベトナム)、変毛虫抗体陽性者1名(ボリビア)、1名に抗住糸虫抗体陽性者(国産マイジリア)を見出した。
- (6) 糞便検査陽性者は、平成19年度には1名(フィリピン)を見出し、平成20年度には計13名(うちブラジル人1名は、3種混合感染)であり、Entamoeba (E. histolytica/E. dispar)は未確定)感染症罹患患者計6名(ブラジル人3名、うち1名は3種混合感染、ペルー人1名、ボリビア人1名、ベトナム人(血液診断陽性)1名)、ラブラ毛虫症患者は計9名(ブラジル人1名は3種混合感染、ペルー人1名、ボリビア人1名)、ラブラ毛虫症/ラブラ毛虫症患者は計6名(ブラジル人1名は3種混合感染、ベトナム人5名)であった。
- (7) マリア、シネガズ病に対する診断検査手帳の開発研究では、特にCD8陽性T細胞の免疫応答誘導を念頭に置いた新規免疫療法の開発を寄生虫感染症モデルを用いて行っており、今回は3種類の組織炎ウイルスベクターを用いた手法がより高いレベルの抗原特異的CD8陽性T細胞の誘導能を示し、感染制御にも向上することを明らかにし有望な結果を得た。
- (8) 地方自治体(神奈川県)の行政担当者らとマニュアルの作成等を前提にした協議を開始した。

平成20年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：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、並びに病原因子の
解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

課題番号：H19-新興-一般-008

研究代表者：新見昌一

I. 研究の意義

- (1) 輸入真菌症等真菌症の発生動向が正確に把握されていない
- (2) 信頼性が高く、簡便な真菌症診断・検査法がない
- (3) 輸入真菌症に関しては、診断及び治療の指針がない
- (4) 真菌症克服のための基盤的研究が不十分

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 輸入真菌症等真菌症患者の発生動向調査、潜在的ヒストプラズマ症患者の抗体調査
- (2) 簡便にして信頼性が高い輸入真菌症等真菌症の臨床的・検査室的診断検査法の確立
- (3) 本邦の現状に即した実用的輸入真菌症診断及び治療指針の作成
- (4) ポストゲノムの基盤的研究により真菌症発症機序の遺伝子レベルでの解明

III. 2年間の研究成果

- (1) 輸入真菌症の発生動向調査を引き続き行っており、肺線維症疑診例の疫学的、血清学的検討を行い、1例のサルコイドーシス疑診例から潜在的ヒストプラズマ症を発見した。（亀井）
- (2) *In situ hybridization*法のプローブとして、Peptide Nucleic Acidを新たに導入し、*C. albicans*, *Histoplasma* など深在性真菌症に対する遺伝子診断法としてその有用性を検証した。（渋谷）
- (3) LAMP法による*Pneumocystis*肺炎の新規遺伝子診断法を開発し、また*Candida*属および*Sporobolomyces*属新種酵母を発見した。（横村）
- (4) 全国の30以上の医療施設より無菌部位から検出された真菌約1200株を収集し、遺伝子同定および感受性試験を施行し、従来報告例が少なかった菌種や新菌種と思われるものも見いだした。（菊池）
- (5) アスペルギルス属菌の菌体外分泌蛋白質を標的とする早期診断への応用を検討し、75種類の遺伝子を同定した。その多くが分泌あるいは細胞表層に存在する蛋白質をコードする遺伝子であった。（大野）
- (6) 新規抗真菌薬のリード化合物を海生菌二次代謝産物よりスクリーニングし、アゾール耐性株にも抗真菌効果を示す化合物を見出した。トリコスポロン症についてタイ国患者での疫学調査を行い、独自の菌学的な分布を示すことを明らかにした。（杉田）
- (7) 微生物由来の化合物ライブラリーの中に探索を行い、真菌のABCトランスポーターを阻害する新規物質を見出した。また、カンジダ・アルビカンスの病原性に関与するタンパク質リン酸化酵素、及びタンパク質脱リン酸化酵素の探索を行い、それぞれ候補の酵素を見出した。（上原、新見）
- (8) 実験的マウスカンジダ感染症モデルにかかわるカイコ感染実験モデルを確立し、未知遺伝子の病原性への関与を明らかにした。（上原、新見）
- (9) 患者側の真菌症に対する認知度が低いことが分かり、医学雑誌などのメディアを用いることが認知度向上のために有効であると思われた。（上）
- (10) 外科領域における真菌症治療開始基準の指針のエビデンスを収集した。（三嶋）

IV. 21年度の課題

- (1) 「輸入真菌症講習会」の開催、真菌症疫学情報をウェブサイト等で公開。
- (2) ヒストプラズマ症の血清診断法を開発し、潜在的ヒストプラズマ症の実態調査を行う。
- (3) 深在性真菌症遺伝子診断法の研究評価を継続し、有用性を臨床現場で検証する。
- (4) 臨床医の真菌感染症に対する認識調査を行い、診断方法・新規抗真菌剤に関連する情報を収集。
- (5) 真菌症克服につながる基盤的研究の更なる充実。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 輸入真菌症等真菌症に対する簡便なキットの作製
- (2) 輸入真菌症等真菌症アウトブレイク情報の提供と本疾患の啓発
- (3) 真菌症の診断・治療法および知識の普及、レファレンスシステムの確立

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Yamada T, Makimura K, Hisajima T, Ito M, Umeda Y, Abe S. Genetic transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, based on the use of G418 resistance as a dominant selectable marker. *Journal of Dermatological Science*, 49, 53-61, 2008
- (2) Toyotome T, Adachi Y, Watanabe A, Ochiai E, Ohno N, Kamei K. Activator protein 1 is triggered by *Aspergillus fumigatus* beta-glucans surface-exposed during specific growth stages. *Microb Pathog*, 44, 141-150, 2008
- (3) Sugino K, Hasegawa C, Sano G, Shibuya K, Homma S. Pathophysiological study of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 61, 450-453, 2008
- (4) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S. Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *Journal of Medical Mycology* 57, 50-57, 2008
- (5) Ochiai E, Kamei E, Watanabe A, Nagayoshi M, Tada Y, Nagaoka T, Sato K, Sato A, Shibuya K. Inhalation of *Stachybotrys chartarum* causes pulmonary arterial hypertension in mice. *International Journal of Experiment Pathology*, 89, 201-208, 2008
- (6) Kikuchi K, Sugita T, Makimura K, Urata K, Someya T, Sasaki T, Kamei K, Niimi M, Hiramatsu K, Uehara Y. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? *Microbiol Immunol* 52, 455-459, 2008
- (7) Nakajima M, Sugita T, Mikami Y. Granuloma associated with *Trichosporon asahii* infection in the lung: Unusual pathological findings and PCR detection of *Trichosporon* DNA. *Med Mycol*, 45, 641-644, 2007
- (8) Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y, Niimi M. Identification of the putative protein phosphatase gene *PTC1* as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryotic Cell*, 7, 1640-1648, 2008
- (9) Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, Cannon RD. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae* *Eukaryotic Cell*, 6, 1150-1165, 2007
- (10) Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M, Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 990-995, 2007
- (11) 三嶋廣繁、山岸由佳：深在性真菌症～新ガイドラインと最新知見 外科領域の深在性真菌症、医学のあゆみ 225(3):237-242, 2008.

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 53 年～55 年：九州歯科大学細菌学教室
 昭和 55 年～平成 3 年：鹿児島大学歯学部口腔細菌学講座
 平成 3 年～12 年：オタゴ大学歯学部分子微生物学研究室 (New Zealand)
 平成 12 年～現在：国立感染症研究所生物活性物質部

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

九州歯科大学および鹿児島大学では秋貞泰輔教授、徳永純一教授の指導を受け、病原真菌の微細構造に関する研究を行った。またこの間、九州大学中山宏明教授の指導により病原真菌の生理・生化学的研究を行った。オタゴ大学においては病原真菌の分子遺伝学的研究に着手し、国立感染症研究所に赴任後も、オタゴ大学 Cannon 教授と真菌の薬剤耐性機構に関する広範な共同研究を進めている。

・主な研究課題

電子顕微鏡による真菌の微細構造、カンジダの細胞生理学的研究 (九州歯科大学および鹿児島大学)
 病原真菌の病原因子に関するプロテオーム解析、抗真菌薬耐性機構の解析と薬剤排出ポンプ阻害剤の探索、
 真菌の形態変換に関わるシグナル伝達と病原性 (オタゴ大学および国立感染症研究所)
 輸入真菌症等真菌症の診断・治療法の開発と発生病動向調査に関する研究 (国立感染症研究所)

・これまでの研究実績

Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Niimi K, Holmes AR, Niimi M, Cannon RD. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favour of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, In press.

Ann R Holmes, Ya-Hsun Lin, Kyoko Niimi, Erwin Lamping, Mikhail Keniya, Masakazu Niimi, Koichi Tanabe, Brian C Monk and Richard D Cannon. ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p to fluconazole efflux in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3851-3862, 2008.

Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Hodgson W, Wu S, Takemori D, Aoyama T, Kumaraswami N, Metzler L, Takano Y, Chibana H, Niimi M. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1264-1272, 2007.

Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, Niimi M and Uehara Y. Inhibition of fungal ABC transporters by unarmycin A and unarmycin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *BBRC*, 364, 990-995, 2007.

Lamping E, Monk BC, Niimi K, Holmes AR, Tsao S, Tanabe K, Niimi M, Uehara Y, and Cannon RD. Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 6, 1150-1165, 2007.

Holmes AR, Tsao S, Ong S-W, Lamping E, Niimi K, Monk BC, Niimi M, Kaneko A, and Cannon RD. Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes *CDR1* and *CDR2*. *Mol Microbiology*, 62, 170-186, 2006.

Umeyama T, Kaneko A, Nagai Y, Hanaoka N, Tanabe K, Takano Y, Niimi M, Uehara Y. *Candida albicans* protein kinase CaHsl1p regulates cell elongation and virulence. *Molecular Microbiology*, 55, 381-395, 2005.

Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, Niimi M, Uehara Y, Niimi K, Lamping E, Cannon RD, Monk BC. Phosphorylation of *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 94-103, 2005.

Niimi M, Niimi K, Takano Y, Holmes AR, Fischer FJ, Uehara Y, Cannon RD. Regulated overexpression of *CDR1* in *Candida albicans* confers multidrug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 999-1006, 2004.

特許

Monk, B.C., Cannon R.D., Nakamura, K., Niimi, M., Niimi, K., Harding, D.R.K., Holmes, A.R., Lamping, E., Goffeau, A. and Decottignies, A. Membrane protein expression system and its application in drug screening. International Patent PCT/NZ02/00163 filed August 23rd 2002 (World Intellectual Property Organization, International publication number 03/018817 A1 published June 2003).

上原至雅、梅山 隆、新見昌一、西村和子、亀井克彦、佐野文子 コクシジオイデス症病原体検出のためのプライマー 平成 16 年 12 月申請中

ガイドライン

輸入真菌症診断・治療ガイドライン 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業) 主任研究者上原至雅 1-56, 2006

輸入真菌症診断ハンドブック 平成 13 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業) 主任研究者上原至雅 pp 1-14, 2002

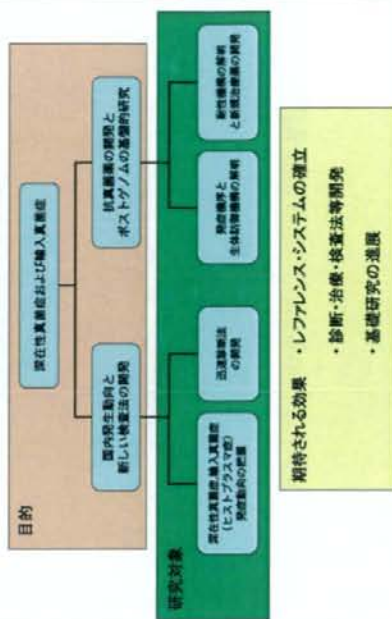
平成20年度厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

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、並びに病原因子の 解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

主任研究者・新見昌一
(国立感染症研究所 生物活性物質部)

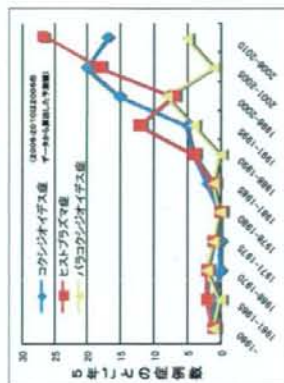
- 輸入真菌症の発生动向とヒストプラズマ症について
- *Aspergillus fumigatus* の新規抗原検査と診断への応用
- 病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究

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、並びに
病原因子の解明に向けたポストゲノムの基盤的研究



輸入真菌症の発生动向(2008年)

・コクシジオイデス属 3種 (H53例) ・ヒストプラズマ属 6種 (H63例)
・クリプトコッカ属 1種 (H1例) ・アスペルギルス属 1種 (H1例) (集団感染)
・カンジダ属 (プラズマ1, カリフォルニア1) 菌株2例 (プラズマ1, 4例-1)



ヒストプラズマ症の国内感染の可能性

経過と目的

- わが国におけるヒストプラズマ症の約18%は海外渡航歴なし、自然治癒する例があり、特徴的な臨床所見に乏しい、
→ 看過された症例が存在する可能性？
- 肺結核症疑診症例および肺線維症症例は、ヒストプラズマ症と臨床像が近似する、
- その中にヒストプラズマ症が存在するかどうかを検討した、

方法

- 被検者：
肺結核症疑診症例 110名
肺線維症症例 42名
- 抗体検出法：
被検者より血清を分離・保存
免疫拡散法、ラテックス凝集法等にて抗体をチェック

結果

- 肺結核症疑診症例：免疫拡散法による陽性者は9名(8.2%)、疑陽性者は5名(4.5%)
陽性者9名のうち1名は、病理学的にヒストプラズマ症と確認

- 肺線維症症例：
(42例)
LA法陽性2例は経過観察中
(陽陽性とと思われる)

今後

- ヒストプラズマ抗体陽性例の詳細な検討
特に面白い症例については、画像その他の所見を交えて専門医と検討、結果により診断的治療を実施
- 協力病院を拡大し、検体数を増やす
- 改良した抗体検出法を用いて再検討
- わが国におけるヒストプラズマ症の実数把握と、その対策の策定

国内での原因菌の分離の試み

ヒストプラズマ属の生息が予想される地域を調べたが、
(17都道府県、67調査中のコウモリの糞187検体)
今のところ分離されていない

Received November 2005, 32, 454-459
doi:10.1111/j.1365-2214.2005.01202.x

NOTE

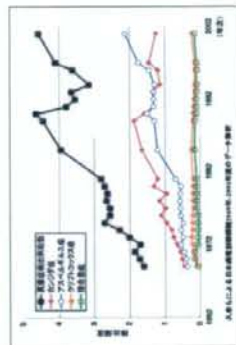
Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan?

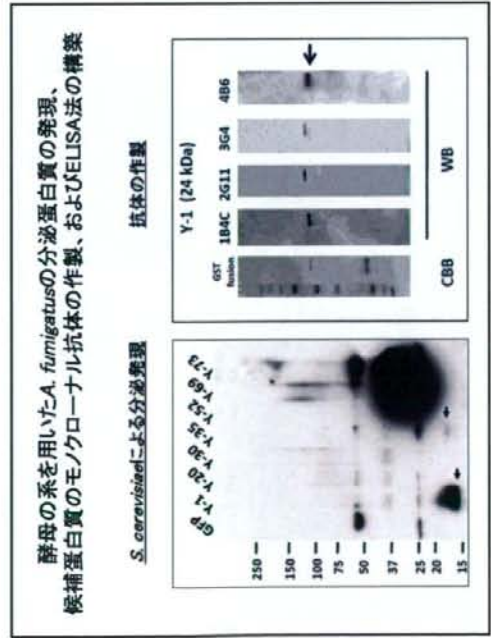
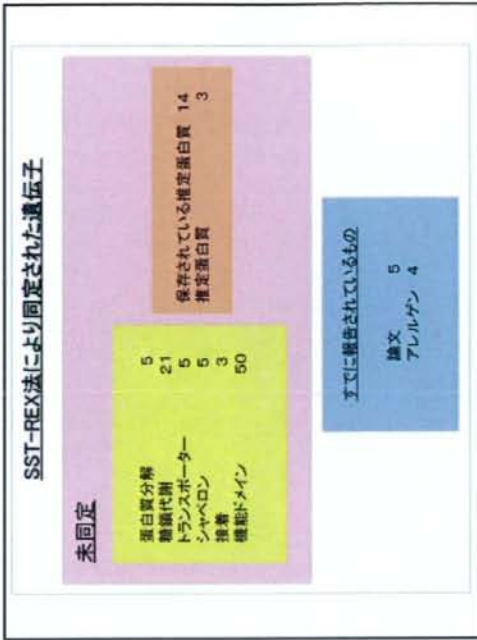
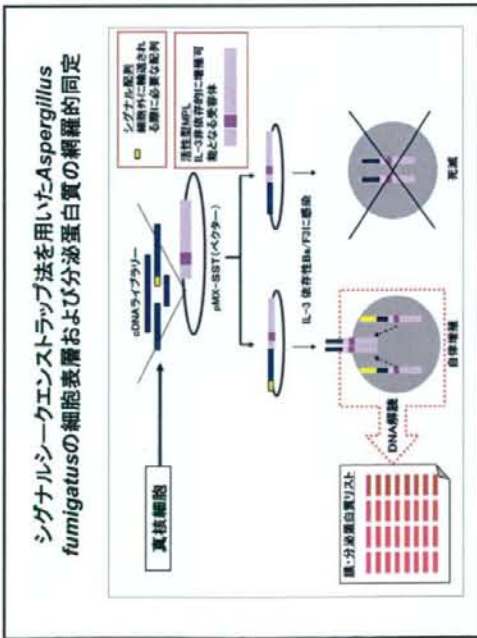
Ken Kouchi¹, Yasuaki Sogata², Koichi Ishikawa³, Kenzaku Urae⁴, Takashi Soroyama⁵, Takashi Sasaki⁶, Kazuhiko Kami⁷, Masakazu Hama⁸, Kenichi Hirayama⁹ and Nobuhisa Ueyama⁹

ABSTRACT

Histoplasmosis is an infectious disease caused by inhaling spores of the fungal pathogen *H. capsulatum* and in Japan is considered an imported mycosis. However, some points in Japan with histoplasmosis have no history of travelling overseas nor of risk of occupational exposure to *Histoplasma*. To investigate the possibility of a native distribution of *Histoplasma* in Japan, 67 bat guano samples from 47 localities were cultured for *H. capsulatum* and other fungi. The results are reported here. No *H. capsulatum* was detected by either *Histoplasma* specific PCR in these independent laboratories. No *H. capsulatum* was detected by either method, therefore *H. capsulatum* is unlikely to be present in bat guano in Japanese caves.

Aspergillus fumigatus の新規抗原検索と診断への応用





病原因子の解明に向けたポストゲノムの
基盤的研究

カイクを用いた病原真菌の感染実験モデル



マウス感染実験モデル

欠点

- スレードに欠け、高コスト
- 動物実験室の必要性
- 熟練を必要とする手技
- 厳しい倫理問題

利点

- 迅速で低コスト
- 特別な施設が不要
- 簡易な実験手技
- 倫理問題が回避できる



カイク感染実験モデル

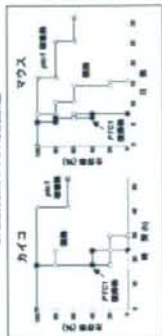
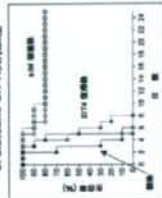
まとめ

- ★ 輸入真菌症の発生前向き調査を行い、ヒストプラズマ症の増加を認めた
- ★ ヒストプラズマ症の院内感染の可能性（結核症例、肺結核菌症例）を模った
- ★ アスペルギルス属の菌体分泌蛋白質を標的とする早期診断への応用を検討
- ★ カイクを用いたカンジダ感染実験モデルを確立
- ★ 深在性真菌症に対する遺伝子診断法（*In situ hybridization*法）の有用性を検証
- ★ *Pneumocystis* 肺炎の新規遺伝子診断法（LAMP法）を開発
- ★ 新規抗真菌薬のリード化合物を探索
- ★ 外科領域における真菌症治療開始基準の指針を構築中

カイク感染モデルを用いて *C. albicans* プロテイン
フォスファターゼ遺伝子と病原性との関連を調査

| <i>C. albicans</i> SIT4a phosphatase 欠損株 | 発酵後24時間後の カイクの生存率(%) |
|--|-------------------------|
| 菌株 | 0 |
| ΔSH 破壊株 | 100 |
| ΔYPT 破壊株 | 96.7±5.8 |
| ΔCAF 破壊株 | 76.7±11.5 |
| ΔPC7 破壊株 | 83.3±20.3 |

マウス感染モデルを用いた
C. albicans SIT4aの病原性
カイクおよびマウス感染モデルを用いた
C. albicans PTC16の病原性



Med Microbiol 11, 2004.

Eukaryotic Cell 7, 2008.

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究

課題番号：H19-新興一般-009

研究代表者：山田章雄

I. 研究の意義

- (1) ヒトにおける動物由来感染症の発生の多くは感染症法によるサーベイランス対象になっているが、発生が稀少であるものに関しては、動物における実際の発生頻度や、病原体の生態系における存在様式などについて不明な点が多い。また、Q熱のように国内での報告例が持つ意味の不明瞭な疾患が存在する一方、国内で感染者が確認できている *Corynebacterium ulcerans* の動物における国内分布調査報告はない。さらにブルセラ症、野兔病など国内の野生動物における保有状況に関する情報が限られている疾患が存在する
- (2) 国内野生動物が保有する動物由来感染症や媒介ベクターであるダニに関する基礎的情報が少ない。
- (3) 国内侵入が懸念される狂犬病について、診断技術の継承が進んでいない。
- (4) 以上の問題点を解析し、動物由来感染症のリスクを改めて評価することは、今後の対策の策定・推進において極めて有意義である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ブルセラ症、野兔病、Q熱、*Corynebacterium ulcerans* 等国内での発生が稀ではあるがその存在が知られている動物由来感染症に関して、その生態系での存在の実態を明らかにする。
 - (2) ボレリアをモデルとし、ダニの棲息域拡大における野生鳥類の役割を明らかにする。
 - (3) 狂犬病の迅速診断のために必要な頭部の解剖研修用教材を開発する。
- これらにより、動物由来感染症対策に必要なリスク評価が可能になること、また、狂犬病侵入時の危機管理体制の一助となることが期待される。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 全体の統括と分担研究者個々の実情に合わせたサポートを行った。

・研究分担者(川端寛樹)

- (1) 我が国における、野鳥類によって分布域が変動する可能性の高いマダニ類を同定し、野鳥類の中でも *Turdus* 属、*Emberiza* 属がライム病拡散に関与していることを明らかにした。
- (2) 未知の回帰熱群ボレリアおよび米国で報告された南部ダニ紅班病に類似の病原体ボレリアを発見した。

・研究分担者(棚林 清)

- (1) ノウサギに付着したダニや自由生活ダニから、野兔病菌に非常に類似した共生菌を検出した。
- (2) ヒトの野兔病患者の感染原となったノウサギの生息地の野鼠、ダニ、環境水や土壌について野兔病菌またはゲノムDNAの検出を試みている。土壌、環境水に疑われる検体があったが確定には至っていない。

・研究分担者(高橋元秀)

- (1) 大阪府の犬から国内で初めて *C. ulcerans* を検出し、近隣地域の飼い犬からの菌分離調査を実施したが陰性であった。また本菌の犬一犬感染を証明した。しかし、他3県の犬および牛・豚も陰性であった。

・研究分担者(今岡浩一・木村昌伸・鈴木道雄)

- (1) 日本各地から得た野生イノシシおよび日本シカの血液について MAT により抗体保有の有無を調査したところ、家畜ブルセラ菌に対する抗体の保有は確認できなかった。
- (2) カモ類のウエストナイルウイルスに対する抗体保有状況を計画し、現在、サンプルの収集中である。
- (3) 鼠咬症が疑われた患者から *S. moniliformis* 検出に成功し、クマネズミが原因であること示した

・研究分担者(岸本寿男)

- (1) ヒトのQ熱抗体価測定法としてのELISA法と、われわれの開発した非特異反応除去処理をしたIFA法との比較を行なったところ、ELISA法によって判定保留や陽性となった検体について、すべて判定保留以下となり陽性例は認めなかった。

- (2) Q熱 Real time PCR を用いたスクリーニングで陽性あるいは非特異反応を呈したイヌの血液DNAサンプルに

ついて Nested PCR で確認したところ、*C. burnetii* の DNA はいずれからも検出されなかった。一方、イヌにおいては、IFA で 1098 検体中 22 検体 (2%) が 1 : 64 ~ 512 の抗体を保有することが明らかとなった。

・研究分担者 (柳井 徳磨)

(1) 日本産野生動物、野鳥における人獣共通感染症のリスク評価を幾つかの動物種で行った。

(2) 動物園水族館における展示動物の死亡例における人獣共通感染症のリスク評価。

・研究分担者 (井上 智)

(1) 狂犬病の検査に必要な頭部解剖モデル教材のプロトタイプとして、解剖手順習得モデル (頭部の構造と解剖手順を理解するモデル)、実技習得モデル (頭骨の切断実技モデル)、脳モデル (検査に必要な脳の部位を理解するモデル) を制作した。

(2) 解剖学および病理学的に正確かつ精密な犬の頭部解剖モデルの鋳型の試験的な 3D 画像化を行った。

IV. 21 年度の課題

(1) 未知の回帰熱群ボレリアおよび南部ダニ紅班病類似ボレリアの分離および病原性の確認

(2) 野兎病菌と類似菌との鑑別可能な手法の確立。

(3) コリネバクテリウムに関しては、調査対象動物種を拡大する。

(4) 野生動物におけるブルセラ症の調査を継続する。また、従来法よりも特異性の高い検出方法を開発する。

(5) 家畜における Q 熱リケッチアの保有状況を血清学的、分子生物学的に明らかにする。

(6) 狂犬の血清を用いた人獣共通感染症の野外感染のリスク評価を実施する。

(7) 狂犬病診断モデルに関しては、作成したプロトタイプについて自治体の担当者等から受けた種々の課題点を改良して現場で使用できる完成モデルとする。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 未知の回帰熱群ボレリアおよび南部ダニ紅班病類似ボレリアの診断法の開発を可能にするとともに環境変化 (温暖化等) に伴った感染症リスク変動の予測が可能となる。

(2) 自然界における野兎病菌、*C. ulcerans*、ブルセラ症、Q 熱、その他の感染症の存在状況を明らかにすることは、これらの疾患のヒトへの感染リスク評価の基礎資料となり動物由来感染症対策に貢献できると考えられる。

(3) 狂犬病対策において困難と考えられていた犬の解剖と検査材料の採材の提供を可能とする。

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) Uda, A., Tanabayashi, K., Fujita, O., Hotta, A., Yamamoto, Y., and Yamada, A. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 355-361 (2007)

(2) Fujita O, Uda A, Hotta A, Okutani A, Inoue S, Tanabayashi K and Yamada A. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holartctica* strains isolated in Japan. *Microbiol Immunol* 52: 270-276 (2008)

(3) Seto Y, Komiya T, Iwaki M, Kohda T, Mukamoto M, Takahashi M, and Kozaki S. : Properties of corynebacterium attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *Jpn J Infect Dis.* Mar;61(2):116-22. 2008

(4) Kubo, M., Uni, S., Agatsuma, T., Nagataki, M., Panciera, R. J., Tsubota, T., Nakamura, S., Sakai, H., Masegi, T., Yanai, T. *Hepatozoon ursi* n. sp (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *Parasitol. Internat.* 57: 287-294, 2008

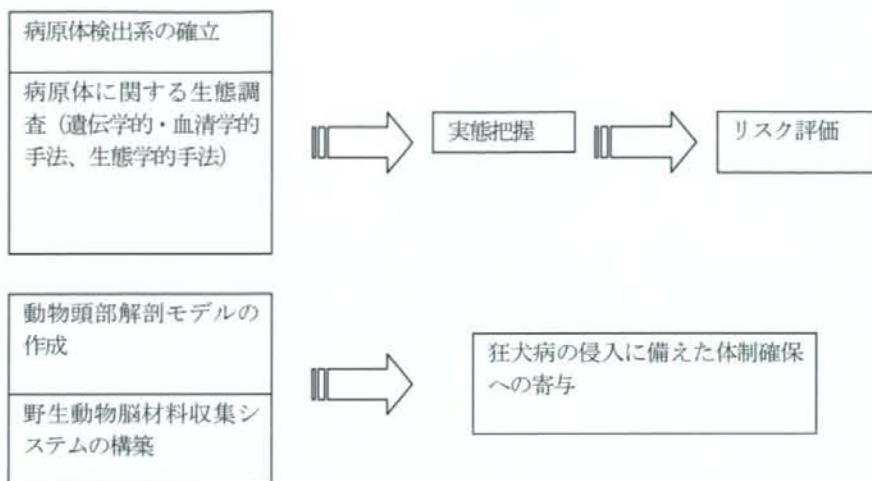
(5) Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. *J. Vet. Med. Sci.*, 70:707-709, 2008

(6) Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K. and Yamada, A. Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, 52:9-15, 2008

(7) Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Simultaneous detection of the genus *Bruceella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Inf. Dis.*, 60:137-139, 2007

(8) 井上 智. 狂犬病の診断技術向上のためのイヌの頭部解剖手技の習得モデルと教材開発の紹介。ラボテック (技術紹介)。LABIO 21. 34 : 33-35, 2008

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

国立予防衛生研究所

マサチューセッツ大学メディカルセンター

国立感染症研究所

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

伊藤康彦

杉浦昭

Francis A Ennis

・主な研究課題

インフルエンザウイルス感染における細胞性免疫に関する研究

ムンプスウイルスのウイルス学的研究

Bウイルス診断法に関する研究

動物由来感染症の診断、病原性に関する研究

・これまでの研究実績

1. Yurie MOTOI, Kozue SATO, Hajime HATTA, Kinjiro MORIMOTO, Satoshi INOUE and Akio YAMADA Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. Vaccine 23, 3026-3032, 2005.
2. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Keiji Terao, and Akio Yamada. Identification of MHC Class I B Locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics, 57, 189-197, 2005
3. Yurie MOTOI, Satoshi INOUE, Hajime HATTA, Kozue SATO, Kinjiro MORIMOTO, and Akio YAMADA. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. Jap. J. Infect. Dis. 58, 115-118, 2005.
4. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis. 2006 Feb;59(1):46-51.
5. Park CH, Kondo M, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T, Yoshikawa H, Yamada A. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. J Vet Med Sci. 2006 Jun;68(6):589-95
6. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, Kurahashi H, Tanabayashi K, Hotta A, Saito T, Yamada A, Kobayashi M. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Am J Trop Med Hyg. 2006 Aug;75(2):327-332.
7. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis. 60 137-139, 2007
8. Akitoyo Hotta, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clinical and Vaccine Immunology, 14, 81-84, 2007.
9. Kozue Hotta, Yurie Motoi, Akiko Okutani, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Satoshi Inoue and Akio Yamada. Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. Microbes and Infection. 9(2):167-74, 2007.
10. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray Jpn. J. Infect. Dis. 60, 355-361, 2007
11. Masanobu Kimura, Tsutomu Tanikawa, Michio Suzuki, Nobuo Koizumi, Tsuneo Kamiyama, Koichi Imaoka and Akio Yamada Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. 52, 1-7, 2008.
12. Masanobu Kimura, Koichi Imaoka, Michio Suzuki, Tsuneo Kamiyama and Akio Yamada Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci, 70, 707-709, 2008.
13. Kozue Hotta, Boldbarrtar Bazartserena, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Akiko Okutani, Satoshi Inoue, Akio Yamada. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. Virus Research, in press.
14. Yamada A. Emergence and spread of infectious diseases. Global Environ. Res. 12, 3-7, 2008
15. O. Fujita, A. Uda, A. Hotta, A. Okutani, S. Inoue, K. Tanabayashi and A. Yamada Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Microbiol Immunol 52: 270-276 (2008)

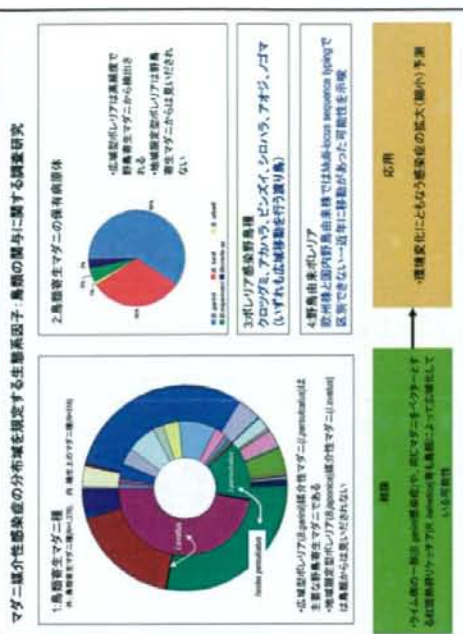
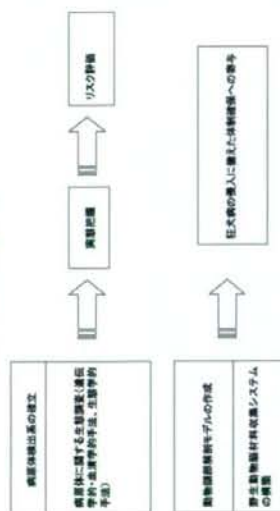
平成20年度新興・再興感染症研究 事業 成果概要

- 研究課題: 動物由来感染症の生態学的ア
プローチによるリスク評価等に関する研究
- 課題番号: H19-新興-一般-009
- 研究代表者: 山田章雄

研究組織

- 山田章雄 国立感染症研究所獣医学部部長
- 岸本寿男 国立感染症研究所ウイルス第1部室長
- 川端寛樹 国立感染症研究所細菌第1部室長
- 高橋元秀 国立感染症研究所細菌第2部室長
- 柳井徳磨 岐阜大学農学部教授
- 今岡浩一 国立感染症研究所獣医学部室長
- 井上 智 国立感染症研究所獣医学部室長
- 棚林 清 国立感染症研究所獣医学部室長
- 木村昌伸 国立感染症研究所獣医学部
(鈴木道雄 国立感染症研究所獣医学部)

研究の概要



生態系における野兔病原菌の維持構式に関する研究

- ◆1924年以降約1400例(主に東北、関東地方)。近年は稀。
- ◆2008年千葉、福島、青森、和歌山で9年ぶりに患者報告
⇒現在も国内の自然界には野兔病原菌が存在する。
- ◆感染経路: 94%はノウサギの頭皮や調理

野兔病原菌は自然界でどこで、どのように維持されているのか?

1. ノウサギ
全国の捕獲ノウサギの野兔病原菌抗体 → 検出されない

2. マダニ
ノウサギ付着ダニ → *F. tularensis* (op A gene): 20.8~92.5%
高頻度
過去の野兔病原菌非発生地
宿主上のダニ

ダニ寄生の野兔病原菌
菌または類似菌の存在?
⇒類似菌を区別して検出する手法の確立が必要

二年間の調査研究の成果

- (1)国内で初めて大阪府の野外収容犬からジフテリア毒素原性 *C. ulcerans* を分離、同定した。
- (2)菌は調査地域内において継続的に複数の場所から収集した外見上は異常は認められなかったイヌから分離された。
- (3)菌の分離時期は冬場は検出されず、3-7月が中心であった。
- (4)分離した菌は分子生物学的、遺伝学的解析で3グループに分類された。
- (5)解析結果と収容所内での管理状況調査により、イヌからイヌへの伝播は容易であることが明らかとなった。
- (6)過去にジフテリア様症状の人から分離された株の比較では、相同性において類似性も確認された。
- (7)3県で実施した畜産動物(牛:700頭、豚:100頭)の調査では、本菌は検出していない。

3. 野兔病原菌感染致死ノウサギの発見(免疫牧野での調査)

(1)野生げっ歯類

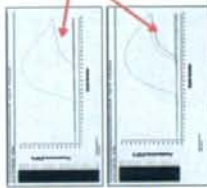


ハクネスミ、アカネズミなど55匹
⇒部分腫、ゲノム、抗体検出されず

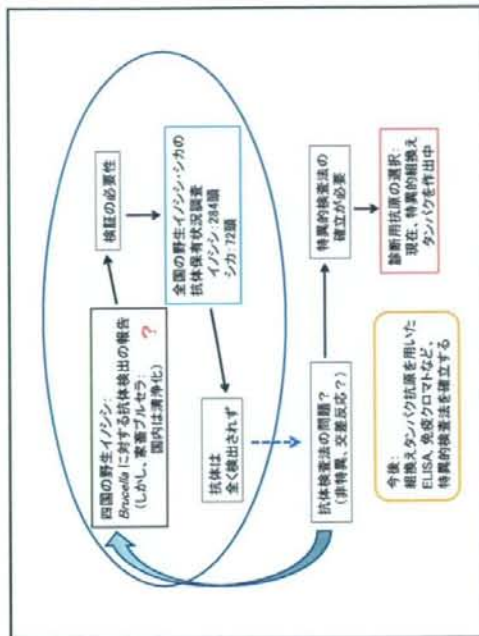
(2)泥、水(アメーバ)



微量のゲノム検出
⇒類似菌?の検証



- ◆ダニの採取や追加検体での野兔病原菌検出の継続
- ◆野兔病原菌のアメーバでの生存増殖の検証
- ◆野兔病原菌類似菌の解析など



Q熱コクシエラの生態系における感染リスク評価
(H19-20年度・研究分担者 岸本寿男)

目的: *Coxiella burnetii* の生態系におけるヒトへの感染リスクを評価するため、ヒト、ペット、野生動物、家畜、タニ等、運送子検出と抗体保有率を調査検討する。

材料 H19年度 [ヒト] 健康な動物病院従事者の血清304検体
H20年度 [イヌ] 血清1098検体、DNA966検体(28都道府県で採取)
[ネコ] 血清582検体(24都道府県で採取)

方法 [DNA検出]: Real time PCR, Nested PCR
[血清抗体測定]: ELISA, JFA, Western Blottingでの確認

結果 [ヒト] 血清(n=304)では抗体保有例を認めず、保有率は0%。(19年度)
[イヌ] PCRではすべて陰性。血清では2.1%の抗体保有率。
[ネコ] 血清では6.2%の抗体保有率。

まとめ 異常な動物病院従事者では抗体保有例はなく、過去の報告(罹患で13.5%、一般健康者で3.6%)とは大きく異なる結果であった(19年度)。
イヌからの *C. burnetii* 検出はすべて陰性で、抗体保有率2.1%も過去の報告(10-15%)に比べて低く、現状の感染リスクは高くないと思われた。
・ネコの抗体保有率6.2%は、過去の報告(14-16%)の1/2以下と低値。今後ネコでの運送子検出や、出産、流産等との関連を検討し、リスクを評価する必要がある。

今後の課題 21年度に家畜、野生動物又はタニ等の保菌状況、抗体保有率の調査を予定。

野生動物由来の感染症 2007-2008年度

研究内容

1) 日本産野生動物における人獣共通感染症:
野鳥・野生哺乳類の背景感染症調査; 人獣共通感染症の検出/
AIやウエストナイル熱との鑑別のための背景データ収集
野生哺乳類・猟犬の血清抗体・タニ寄生調査

2) 動物園・水族館における展示動物の人獣共通感染症:
鳥類の抗酸菌症、ペンギン類の感染症

3) 野生動物由来感染症研究ネットワーク化
国内・国外の野生動物研究者との人獣共通感染症ネットワーク形成

巨大頭の新技術向上のための解剖手法習熟モデル・教材作成に關わる研究

平成19年度

解剖モデルの形状等素案作成を関係自治体担当者といっしょに検査資料等を収集

目的: 解剖モデルの形状等素案作成を関係自治体担当者といっしょに検査資料等を収集
方法: 関係自治体担当者から解剖モデルの形状等素案を作成し、検査資料等を収集する。

1. 形状等素案を作成する (1) 解剖モデルの形状等素案を作成する (2) 検査資料等を収集する

2. 巨大頭の新技術向上に關する研究 (1) 巨大頭の新技術向上に關する研究 (2) 巨大頭の新技術向上に關する研究

3. 巨大頭の新技術向上に關する研究 (1) 巨大頭の新技術向上に關する研究 (2) 巨大頭の新技術向上に關する研究

平成20年度

解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出

目的: 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出
方法: 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出

1. 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (1) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (2) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出

2. 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (1) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (2) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出

3. 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (1) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出 (2) 解剖モデルのプロトタイプ3体と教材資料の製作と完成版にむけての課題抽出

次年度の課題

- 未知の回帰熱群ボレリアおよび南部タニニ紅斑病類似ボレリアの分離および病原性の確認
- 野免疫菌と類似菌との鑑別可能な手法の確立。
- コリネバクテリウムに關しては、調査対象動物種を拡大する。
- 野生動物におけるブルセラ症の調査を継続する。また、従来法よりも特異性の高い検出方法を開発する。
- 家畜におけるQ熱リケッチアの保有状況を血清学的、分子生物学的に明らかにする。
- 猟犬の血清を用いた人獣共通感染症の野外感染のリスク評価を実施する。
- 狂犬病診断モデルに關しては、作成したプロトタイプについて自治体の担当者等から受けた種々の課題点を改良して現場で使用できる完成モデルとする。

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：我が国における動物由来感染症の感染実態把握に資する研究

課題番号：H19-新興一般-08060629

研究代表者：多田有希

I. 研究の意義

- (1) 動物由来感染症については、診断・治療に関する情報が少ない、検査体制の確立が立ち遅れている、発生状況の把握が不十分などの状況がみられている。
- (2) 狂犬病については、人のみならず動物も含め、診断・治療の情報が不十分な状況にある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 各種文献の検索、感染症発生動向調査データの解析を行い、動物由来感染症の診療に貢献する。
- (2) 濾紙血検体による検査を実施・検討し、該当疾患の診断に資する。
- (3) 国内外を問わず狂犬病の症例に関する情報を集積し、診断法・治療法を検討して、狂犬病診療に資する。狂犬病ワクチン接種量を減量した場合の効果を検討し、ワクチン不足の事態に備える。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者 (多田有希)

- (1) 感染症法の届出患者の調査のデータから、動物由来感染症 5 疾患について、発生状況 [発生地、患者の性・年齢、症状、診断法 (検査法)、感染原因 (行動) など] について集計・解析した。

・研究分担者 (高山直秀)

- (1) 2004-2007 年に公表された動物由来感染症症例報告を検索して、文献を入手し、患者の主訴、主要症状、検査、治療、発生地などに関する集計を行っている。
- (2) 昨年度に引き続き、狂犬病ワクチンの接種方法の検討を行い、新たに 0-7-28 日に狂犬病ワクチンを皮内接種する方式の検討を行っている。
- (3) 昨年度に検索収集したヒト狂犬病症例報告を翻訳し、症例集を作成する準備を進めている。

・研究分担者 (道長麻里) および研究分担者 (川島龍一)

- (1) 所属医師会員の協力のもと、担当の研究分担者に濾紙血検体採取・送付した。

・研究分担者 (菅沼明彦)

- (1) 今後発生の可能性がある国内狂犬病治療への資料として、これまで報告されている狂犬病治療の収集・整理を行った。

・研究分担者 (佐藤 克)

- (1) 動物の狂犬病の症状について検討を進めている。