

平成20年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

課題番号：H18-新興一般-009

研究代表者：小林 睦生

I. 研究の意義

- (1) デング熱、マラリア、日本脳炎等の蚊媒介性感染症の迅速診断法の開発と技術移転
- (2) 媒介蚊の我が国における発生状況調査および効果的な幼虫防除法の開発
- (3) 日本脳炎、デング熱、ウエストナイル熱に対する DNA ワクチン開発に関する基礎的研究
- (4) フラビウイルス感染症に関する感染小動物モデルの開発
- (5) 媒介蚊の飛翔範囲の推定による防除対象地域選定への提言
- (6) マラリアの重症化機構の実験モデルによる解析と臨床応用

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) フラビウイルス感染症の診断における PCR 法、IgA 抗体の検出の技術開発と地研への技術移転
- (2) 媒介蚊の都市部での発生状況の把握、種類、発生源の特定による効果的な防除戦略の構築
- (3) DNA ワクチンと蛋白ワクチンとの混合ワクチンの開発による DNA 投与量の低減化とコスト低減
- (4) 日本脳炎、デング熱などの重症化の機構を解明する動物モデルの開発によるウイルス遺伝子の変異の関与の証明
- (5) 脳性マラリアの重症化の機構解明によるバイオマーカーの検察による重症化の予測

III. 3年間の研究成果

- ・研究代表者：小林睦生 (1)アカイエカの標識・放逐・再捕獲法による飛翔距離の推定と緊急時の防除対象地域の選定 (2)ヒトスジシマカの幼虫発生源調査、成虫発生密度推定による緊急な防除対策地域の推定
- ・研究分担者(倉根一郎)我が国の最近の分離株を用いて、日本脳炎ウイルス(JEV)のマウスに対する病原性を規定する塩基配列部位を同定した。また、京都府で分離された日本脳炎ウイルスの遺伝子解析を実施した。
- ・研究分担者(高崎智彦)デング熱患者の尿中からウイルス遺伝子を検出する症例があることを見いだした。また、スリランカからのチングニヤ輸入症例を確定診断し、ウイルスを分離した。
- ・研究分担者(澤辺京子)各地で捕集したコガタアカイエカから JEV を分離し、1 型ウイルスの活動が活発であることを確認した。2005 年分離株 3 株の全塩基配列を決定し、比較検討した。ヤブカ属蚊からの新規フラビウイルス(AEFV)の全塩基配列を決定し、イエカ属由来の CXFV と系統学的比較を行った。
- ・研究分担者(富田隆史)2006～2008 年に 28 都道府県より収集した 412 コロニーのアタマジラミの 8.4%のコロニーに抵抗性遺伝子が検出され、全ての遺伝子が世界共通のアミノ酸置換であった。
- ・研究分担者(江下優樹)ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス、アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性を検討した。蚊採集数は前年と比較して 2008 年は少なかった。タイの患者宅の採集蚊からデングウイルスを、また、新規ウイルスを分離した。
- ・研究分担者(當間孝子)沖縄の 3 島と奄美大島の水田、休耕田や田芋畑などで、日本脳炎媒介蚊 3 種幼虫の生息調査を行った。コガタアカイエカはいずれの島でも高頻度に生息していたが、ウシシニエカはこれまで同様奄美大島、伊平屋島での生息を確認することはできなかった。
- ・研究分担者(小西英二)デング、ウエストナイル及び日本脳炎 DNA ワクチンのドーズが、蛋白ワクチンとの同時投与により、格段に低減できることを証明した。特に日本脳炎の系では大動物(ブタ)で示した。メカニズムとして交差免疫原性が考えられた
- ・研究分担者(名和 優)デング熱患者の尿中に存在する IgA 抗体の検出により、診断が可能と考えられた。また、JEV の C6/36 培養細胞への感染は、pH が弱酸性になると増強されることが示された。
- ・研究分担者(狩野繁之)マラリア予防ガイドラインの改訂と評価研究、b)アーテミスニン混合療法 (ACT: artemisinin-derivatives combination therapy) の有用性に関する臨床研究を行った。
- ・研究分担者(松本芳嗣)マラリアの重症化を評価するためのバイオマーカーの検索し、尿中の hL-FABP がマラリア重症化の早期予知に有用であることが明らかとなった。
- ・研究分担者(高木正洋)中国雲南省のマラリア媒介蚊の調査で、*An. dirus* に強いヒト嗜好性が認められ、*An. minimus*, *An. maculatus* に中庸のヒト嗜好性が観察された。また、ハマダラカの分子分類を COI で行った。
- ・研究分担者(小林 潤)現在 ACT による早期診断早期治療が多くの国の治療政策にもりこまれている。現在薬剤耐性の出現は報告されていないが、その普及率が悪いとかえって出現の可能性を増強させると報告された。さらに貧困僻地への確実な普及が最後の課題であることがわかった。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 媒介蚊の防除対策に関してパイロット地区における効果、コストパフォーマンス等の評価を行う。
- (2) 実用化に向けた安価で効果的なDNAワクチンを開発する。
- (3) ウエストナイル熱、チクングニヤ熱、日本脳炎などのアルボウイルス感染症のモニタリング体制を患者および媒介蚊側から構築する。媒介蚊の長距離飛行の可能性を微量元素解析で行う。
- (4) 日本脳炎ウイルスのマウスへの病原性を規定する部位のヒトにおける関連性を解明する。
- (5) 輸入症例から分離したチクングニヤウイルスを用いて、より高感度な診断法を開発する。
- (6) アタマジラミの駆除剤抵抗性の発達状況を全国的に調査し、駆除指針を構築する。
- (7) アジアでは今後の問題となる三日熱マalaria対策への検討が必要である。

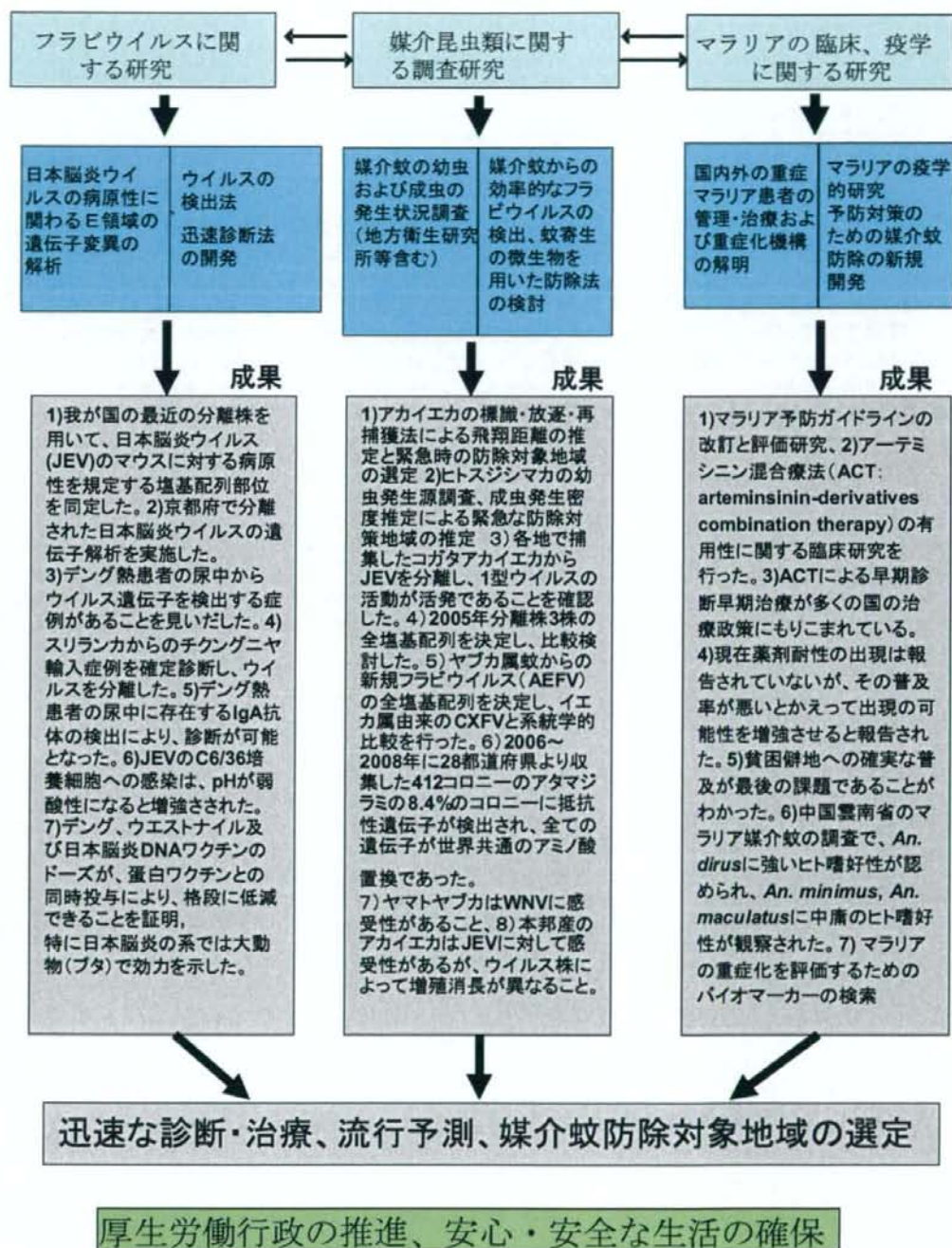
V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 各地方自治体でのアカイエカ、ヒトスジシマカ等媒介蚊の防除対策立案に貢献する。
- (2) デング熱患者の診断に尿中のIgA抗体検出が有用であり、診断法の確立に寄与する。
- (3) DNAワクチン及び蛋白同時投与法は、国際的に普及できる感染症予防戦略と考えられる。
- (4) アタマジラミ駆除剤抵抗性のより迅速な検出が、効果的なシラミ対策に貢献する。
- (5) 最近の日本脳炎ウイルスの生態に関する情報は、日本脳炎予防接種行政に寄与する。
- (6) デング熱、チクングニヤ熱の診断法の開発は、我が国の防疫体制の充実に寄与する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- Kobayashi M., Kasai S., Sawabe K., Tsuda Y. Distribution and ecology of potential vector mosquitoes of West Nile fever in Japan. *Global Environmental Research*, 12:27-33, 2008.
- Tsuda Y, O Komagata, S Kasai, T Hayashi, N Nihei, K Saito, M Mizutani, M Kunida, M Yoshida and M Kobayashi. A mark-release-recapture study on dispersal and flight distance of *Culex pipiens pallens* in an urban area of Japan. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 339-343, 2008.
- Kasai S., O Komagata, T Tomita, K Sawabe, Y Tsuda, H Kurahashi, T Ishikawa, M Motoki, T Takahashi, T Tanikawa, M Yoshida, G Shinjo, T Hashimoto, Y Higa and M Kobayashi. 2008. PCR-based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 184-191, 2008.
- Kasai S, Ishii N, Natsuaki M, Fukutomi H, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T (2009) Prevalence of *kdr*-like mutations associated with pyrethroid resistance in human head louse populations in Japan. *J. Med. Entomol.* 46 (in press).
- Tomohiro Ishikawa, Douglas G. Widman, Nigel Bourne, Eiji Konishi, Peter W. Mason: Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Vaccine* 26, 2772-2781, 2008.
- Teiichi Matsunaga, Mizue Shoda, Eiji Konishi: Japanese encephalitis remains common in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* 27, 769-770, 2008.
- Nonaka D, Kobayashi J, Jimba M, Vilaysouk B, Tsukamoto K, Kano S, Phommasack B, Singhasivanon P, Waikagul J, Tateno S, Takeuchi T. Malaria education from school to community in Oudomxay province, Lao PDR. *Parasitol Int.* 2008 Mar;57(1):76-82.
- Tangpukdee N, Yew H-S, Krudsood S, Punyapradit N, Somwong W, Looareesuwan S, Kano S, Wilairatana S: Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Parasitol Int.* 57(4), 490-494, 2008
- Takasaki T, Kotaki A, Nishimura K, Sato Y, Tokuda A, Lim C-K, Ito M, Tajima S, Nerome R, Kurane I. Dengue virus type 2 isolated from an imported dengue patients in Japan: First isolation of dengue virus from Nepal. *J Travel Med.* 2008 15:46-49.
- Pandey BD, Morita K, Khanal SR, Takasaki T, Miyazaki I, Ogawa T, Inoue S, Kurane I. Dengue virus, Nepal. *Emerg Infect Dis.* 2008 Mar;14(3):514-515
- Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I. and Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiol. Infect.* 135: 974-977. 2007.
- Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M., Sawabe K.: Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359(2):405-414, 2007.
- Nawa M., Machida S., Takasaki T., Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007 60: 118-120.
- Tajima S, Nukui Y, Takasaki T, Kurane I. Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue type 1 virus. *J Gen Virol.* 2007 Aug;88(8):2214-22.
- 日本の旅行者のためのマalaria予防ガイドライン (第2版). マalaria予防専門家会議編、フリープレス、東京、2009 (in press)
- 澤辺京子, 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 江下優樹, 小林 睦生. 日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討. *Med. Entomol. Zool.*, 57:279-286, 2006

VII. III (3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

獨協医科大学 医動物学教室 1977-1993年

ウプサラ大学理学部 (スウェーデン国) 1988-1989年

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

向山文雄(東京農工大学 農学部 教授)

Kenneth Soderhall(University of Uppsala, Sweden, BMC, Professor)

山本 久(獨協医科大学 医動物学教室 教授)

小倉信夫(明治大学 農学部 教授)

安居院宣昭(国立感染症研究所 名誉所員)

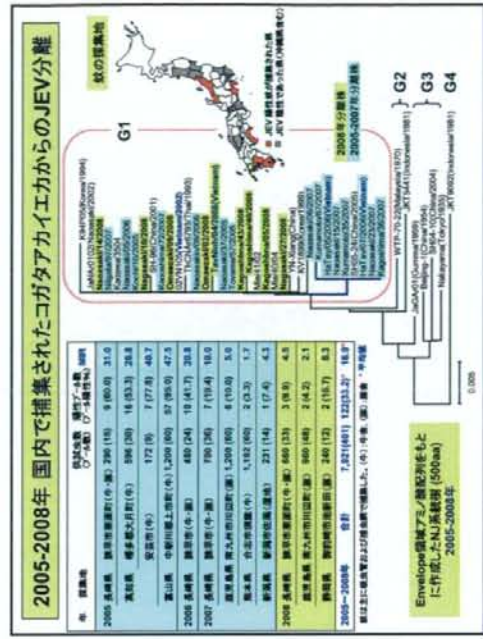
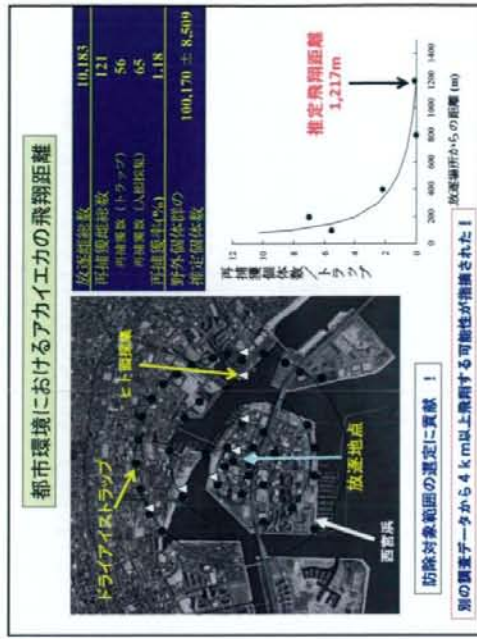
・主な研究課題

研究代表者は一貫して病原体と媒介昆虫との関係に関して研究を行ってきた。蚊とフィリア幼虫との関係、蚊の生体防御機構、甲殻類の生体防御機構の研究を行った。国立感染症研究所では、腸管出血性大腸菌O157:H7に関して、イエバエが単なる機械的伝播者ではないことを明らかにした。ヒトスジシマカの東北地方における分布要因解析で年平均気温 11°Cが分布規定要因となっていること、米国における同蚊の分布拡大の将来予測を行った。また、オオクロバエから高病原性鳥インフルエンザウイルスの分離に成功し、鶏舎周辺でのハエ類の防除対策の重要性を喚起した。最近、我が国のホームレス由来コロモジラミから壱塚熱の病原体遺伝子を検出し、ネパールのストリートチルドレン由来のアタマジラミからも病原体遺伝子を検出し、再興感染症の疫学的調査の重要性を指摘した。

- 1) Kobayashi M., Komagata O., Nihei N. Global warming and vector-borne infectious diseases. *J. of Disas. Res.* 3(2):105-112, 2008.
- 2) Kobayashi M., Kasai S., Sawabe K., Tsuda Y. Distribution and ecology of potential vector mosquitoes of West Nile fever in Japan. *Glob. Environ. Res.*, 12:27-33, 2008.
- 3) Komagata O, Kasai S, Obara I, Motoyama N, Tanaka I, Kobayashi M, Tomita T. Concomitant identification of subspecies of subspecies and insecticide resistance-associated mutations in the mosquito *Culex pipiens* complex by primer extension-based genotyping. *Med. Entomol. and Zool.*, 59(2): 33-46, 2008.
- 4) Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Yano K., Sasaki T., Yuda M., Takasaki T., Kobayashi M., Sawabe K.: Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359(2):405-414, 2007.
- 5) Seki N., Kasai S., Saito N., Komagata O., Mihara M., Sasaki T., Tomita T., Sasaki T., Kobayashi M. Quantitative analysis of proliferation and excretion of *Bartonella quintana* in body lice, *Pediculus humanus* L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(3):562-566, 2007.
- 6) Kasai, S., T. Shono, O. Komagata, Y. Tsuda, M. Kobayashi, M. Motoki, I. Kashima, T. Tanikawa, M. Yoshida, I. Tanaka, G. Shinjo, T. Hashimoto, T. Ishikawa, Y. Higa, T. Tomita. Insecticide resistance in potential vector mosquitoes for West Nile virus in Japan. *J. Med. Entomol.*, 44(5): 822-829, 2007.
- 7) 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 H5N1 avian influenza A virus from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(2):327-332, 2006.
- 8) Roychoudhury S., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Saito N., Sawabe K., Kobayashi M.: Comparison of the morphology of oocysts and the phylogenetic analysis of four *Ascogregarina* species (Eugregarinidae : Lecudinidae) has inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. *Parasitol. Int.* 56(2):113-118, 2006.
- 9) Roychoudhury S. & Kobayashi M. New finding on the developmental process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 22:29-36, 2006
- 10) Sasaki T., Poudel S.K., Isawa H., Hayashi T., Seki N., Tomita T., Sawabe, K., Kobayashi M.: First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. *J. Med. Entomol.* 43(1):110-112, 2006.

・平成21年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題

節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究 (21260801)



本邦産ヒトシジマカ由来新規フラボウイルスの性状解析

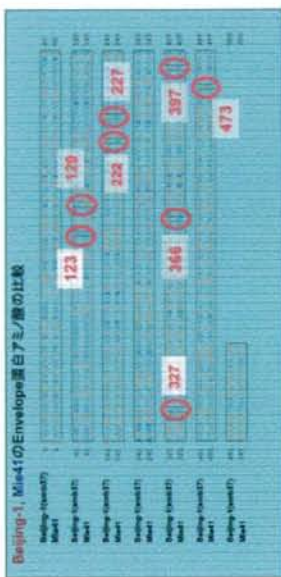
ヒトシジマカ *Aedes albopictus* から分離、*Aedes flavivirus* (AEFV)と命名
5分離株:ヒトシジマカ(千葉県、富山県、長崎県)、ヤマダシジマカ(千葉県)



日本における2種の軟特異的フラボウイルスの存在を確認
AEFVはヤブカに高い特異性(CXFXとの相同性は38.8%)
AEFV, CXFXがアルボウイルスの感受性に影響を与える可能性

日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究

- ・日本国内のブタからウイルスを分離し、遺伝子解析した。
- ・マウスに対して病原性の異なる日本脳炎ウイルスの遺伝子解析を実施し、E領域123番目のアミノ酸が病原性と関連を示すことを明らかにした。
- ・日本脳炎ウイルス非構造タンパクNS4Aの3番目のアミノ酸も病原性に関連する可能性を提示した。



関連トピックス:
デング熱ウイルスの実験室診断法を確立し我が国第1例目、2例目の輸入症例を診断、確定した。

デング熱実験室診断法の開発

デング熱患者の尿中、唾液中のウイルス遺伝子をリアルタイムPCRにより検出した。
53症例中23例の尿中から遺伝子が検出された。唾液は18検体中5検体で検出された。

図1
尿中からデングウイルス遺伝子が検出され遺伝子の部分配列も決定できた。

<結果>尿中デングウイルス遺伝子の解析にいたった症例6例のウイルス型別は、1型1例、2型1例、3型2例であった。血液からのウイルス遺伝子も検出できた症例が、4例あり、いずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は100%一致した。

デングウイルス感染の抗体検査に関する研究

- 抗デングIgA抗体検出 (IgA 捕捉ELISA法)
- 1. デング疑い患者(IgM抗体陽性)を血清診断で判定可能
 - 2. 尿や唾液のサンプルでも抗体検出でき、診断の可能性

- 平成18年度の成果 日本人輸入デング熱症例の尿からIgA抗体を検出
血清以外での抗体検出の可能性を示唆
- 平成19年度の成果 台湾デング熱症例とデング疑い症例からIgA抗体を検出
流行地でもIgA抗体検出が診断に寄与
- 平成20年度の成果 日本人輸入デング熱症例の尿と唾液からIgA抗体を検出
痛みを伴わない診断(抗体検出)の可能性

節足動物媒介感染症の予防

DNAワクチン

⇒ 種々の利点を持つ次世代ワクチン

問題点 ⇒ 遺伝子組換え動物に対する懸念

解決法 ⇒ ドーズの低減

⇒ DNAドーズの低減を達成

ウエストナイル及び日本脳炎の動物モデルにおいて

{ タンパク混合疫与 ⇒ DNAドーズの低減を達成

{ 針無注射法

平成19年度の成果

デングのマウスモデルにおいて

・4種DNAワクチンのドーズ低減を達成 ⇒ 人々に容認されるように

・混合疫与するタンバクの生産を昆虫細胞で成功 ⇒ さらに安価に

平成20年度の成果

デングのマウスモデルにおいて

・DNAドーズ低減を可能にするメカニズム ⇒ 交差免疫原性

・流行地における4種DNAワクチン ⇒ さらにドーズ低減可能に

動物モデルを用いたマツリヤ重症化機構の解明 (研究分担者: 松本芳嗣)

平成18年度: 慢性マツリヤおよび急性脾腫の発症機序の解明

- ・慢性マツリヤにおける非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の血管外漏出を証明
- ・脾腫における炎症性サイトカイン-MRP8およびCMRP14産生マクロファージの増加を証明

平成19-20年度: 熱帯熱マツリヤ重症化の指標となる新たなバイオマーカーの探索

血中 ・タイマツリヤ患者における血中MRP8/MRP14濃度がマツリヤ重症度に相関して上昇することを証明(平成19年度)

尿中

・ヒト型L-FABP-T_Hマウスにおいて尿中L-FABP/FABP(ヒト肝臓型脂肪結合タンパク)レベルがマツリヤ感染赤血球率に相関することを証明(平成20年度)

・Proteinase 3は型L-FABP-T_Hマウスにおける尿中L-FABP排泄の経路変化



(掲載:2009-236680J)

アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

抵抗性アタマジラミのDNAマイクロアレイを
構築されたアタマジラミ

駆除剤抵抗性アタマジラミ



駆除剤抵抗性アタマジラミを抽出した駆除剤

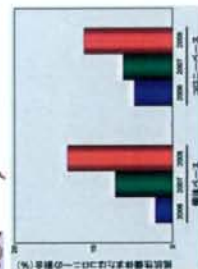


過去3年間のピレスロイド抵抗性遺伝子検出率

年	検出率 (%)	検出遺伝子数	検出率 (%)	
2006年	92	2	2.2	42
2007年	448	30	7.2	178
2008年	465	62	13.3	187
総計	1,005	94	9.4	407

アタマジラミの集団を調べる

駆除剤抵抗性シラミの存在および専用薬による物理的な駆除法の啓発



平成20年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：ハンセン病の啓発と難治症例に対する予防・診断・治療に関する研究課題番号：H18-新興・一般-010研究代表者：向井 徹**I. 研究の意義**

- (1)ハンセン病の感染経路および世界的伝播経路は不明
- (2)難治性ハンセン病の治療薬および治療法がない
- (3)らい菌特異的免疫機能低下を示す患者の抗らい菌免疫応答を賦活する有効な標的分子が不明
- (4)難治性ハンセン病を予防し、同時に免疫療法剤として使用可能な予防的・治療的ワクチンがない
- (5)ワクチンの有効性を評価する有効な再現性の高い霊長類感染モデルがない
- (6)皮膚科医などのハンセン病に関する知識がない
- (7)ハンセン病の疫学統計がない

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)感染原、感染経路の解明は、抜本的感染防止策の構築が可能
- (2)薬剤耐性菌対策のための新規抗らい菌薬の開発を目的
- (3)らい菌由来リポペプチド LipoK を用い、自然免疫及び獲得免疫を介し、菌の細胞内殺戮法を開発
- (4)ヒト T 細胞を活性化し、ハンセン病の予防及び免疫療法に必須な IFN- γ を大量に産生する BCG の作製
- (5)霊長類感染モデルは、有効な新規ワクチンの実用化を促進
- (6)皮膚科医へのハンセン病の知識普及およびハンセン病診療ネットワークの構築
- (7)ハンセン病疫学から、ハンセン病対策の構築

III. 3年間の研究成果**・研究代表者**

向井：BCG urease 遺伝子破壊株を作成し、hsp70-MMP II 融合蛋白発現リコンビナント BCG を構築

・研究分担者

松岡：流行地では生きたらい菌が環境中に存在し、感染源となることを示唆

メキシコ国内には地域により各遺伝子型のらい菌の偏在があり、異なるハンセン病の伝来を示す

儀同：新規ニューキノロン系薬の DC-159a と moxifloxacin は、sparfloxacin と同等であり、また副作用の少ない garenoxacin は evofloxacin と同等であることを証明

新規リファマイシン系抗菌薬 rifabutin は、rifampicin より強い抗らい菌活性を示すことを明らかにした

福富：IFN- γ 存在下で培養した M-CSF 誘導マクロファージに抗らい菌活性が誘導され、この時スーパーオキシドや過酸化水素を産生する NADPH オキシダーゼの発現が増強していることが判明

前田：LipoK は、CD8 陽性 T 細胞からのパーフォリン産生増強を明かに

LipoK はらい菌感染マクロファージを活性化し、抗らい菌生体防御反応増進を証明

牧野：ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70 遺伝子を導入株は、IFN- γ を産生する CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞の

両者を強く活性化することが判明

寺尾: 手根部接種カニクイザルで、3年以上にわたり細胞性免疫応答が持続検出されることから、らい菌の持続感染モデルが確立できる可能性を示唆

石井: 皮膚科医のハンセン病の知識が向上し、ハンセン病診療ネットワークの構築が進んできた
日本におけるハンセン病新規患者は7-11名で、半数以上は外国人であった。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 感染源と目される環境中の菌と住民から得られた菌の遺伝子型の比較による関連性の解明
- (2) 新規抗らい菌薬の開発と免疫調節薬との併用療法および多剤併用療法の開発と臨床応用
- (3) LipoKで活性化した樹状細胞から分泌されるエキソゾームの機能解析による、らい菌由来物質の同定
- (4) ウレアーゼ欠損 HSP70 導入 BCG のワクチン効果の検定とその作用機序の解析および改良
- (5) 新生仔カニクイザルを用いた感染実験による再現性の高い感染・発症モデルの確立
- (6) 皮膚科医を含めた医師全体へのハンセン病についての最低限の知識の普及
- (7) ハンセン病回復者への医療サービスのためにハンセン病診療ネットワークの活用
- (8) ハンセン病再発患者の疫学調査

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 流行地における新たな感染者発生の防止
- (2) 難治性ハンセン病の治療薬と治療法の開発は、ハンセン病対策に貢献
- (3) 若年層患者の発症並びに菌抗原の残存に伴う慢性進行性末梢神経障害の予防は、生産的社会的復帰に寄与
- (4) 有効かつ安全なワクチンは、発展途上国でのハンセン病対策に有効であり、我が国の国際貢献に寄与
- (5) ハンセン病の偏見・差別の解消および一般医療への統合およびハンセン病医療の現状把握

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

向井: Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53:96-106, 2008.

松岡: Matsuoka M., Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Jap. J. Lepr.* 78,1 2009(in press)

儀同: 儀同政一, キノロン系抗菌薬の構造式と抗らい菌活性の相関. *日本ハンセン病学会雑誌* 78:13-19, 2009.

福富: Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infect.*, 9:70-77, 2007.

前田: Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272:202-205, 2007.

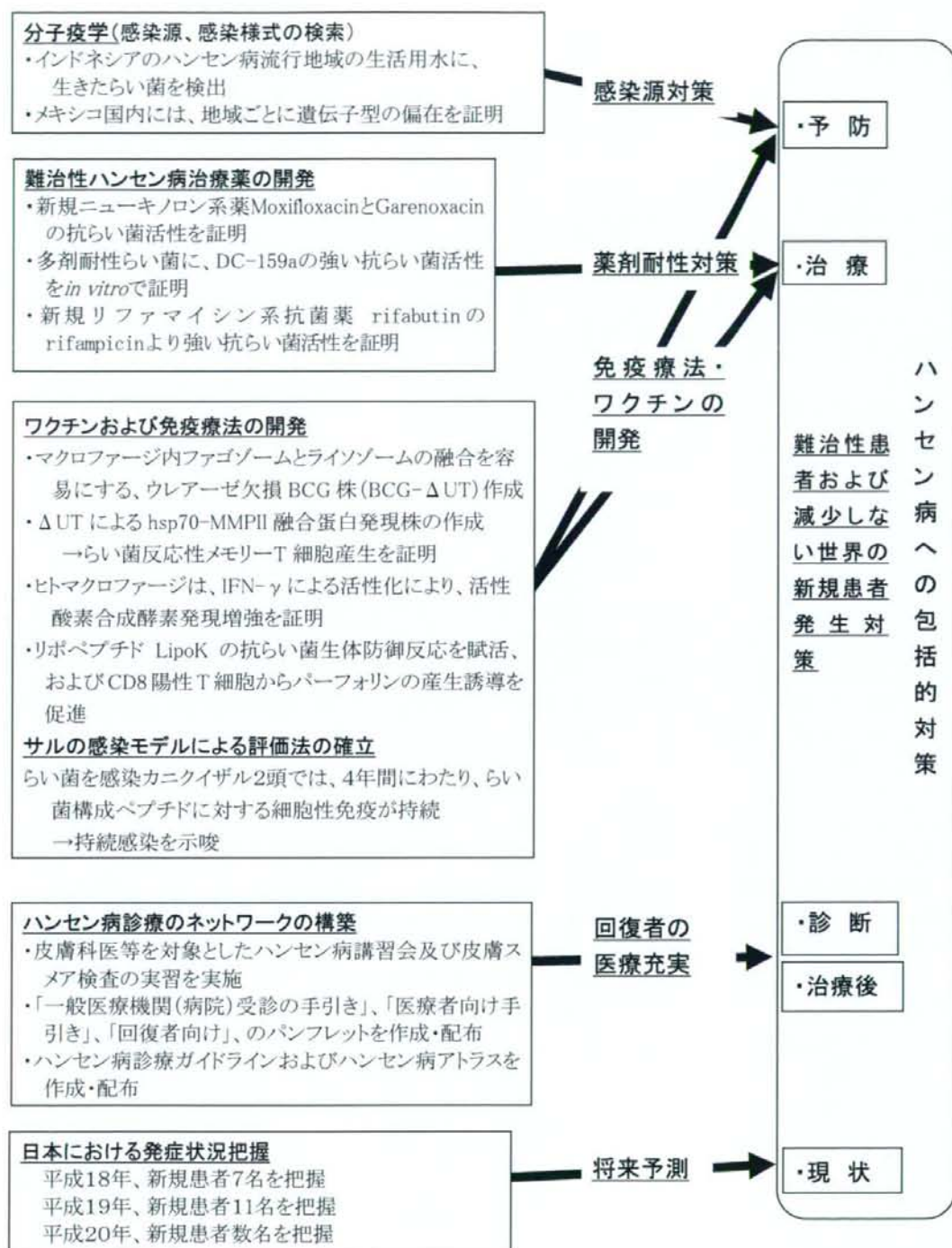
牧野: Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2008 in press.

石井: 石井則久 ハンセン病. *家庭の医学*, p1079, 保健同人社

・石井則久, 関根万里, 渡辺朋美, 朝比奈昭彦: 輸入皮膚感染症. *臨床皮膚科* 62(増刊号):22-26, 2008.

・加藤知子, 柳田敦美, 松本義也, 杉田泰之, 石井則久, 富田 靖: ハンセン病. *皮膚科の臨床* 50(suppl):192-193, 2008.

VII. III (3年間の研究成果)の概要図等



○主任研究者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

大阪大学歯学部口腔細菌学講座	昭和63年4月～平成2年3月
大阪大学微生物病研究所麻疹部門	平成2年4月～平成8年2月
米国カリフォルニア大学サンディエゴ校医科学部	平成8年3月～平成10年7月
北海道大学免疫科学研究所血清学部門	平成10年7月～平成11年2月
大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野 (教授転任の為)	平成11年2月～平成13年3月
国立感染症研究所ハンセン病研究センター	平成13年4月～現在

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

浜田茂幸
山西弘一
Flossie Wang-Staal
生田和良
牧野正彦

・主な研究課題

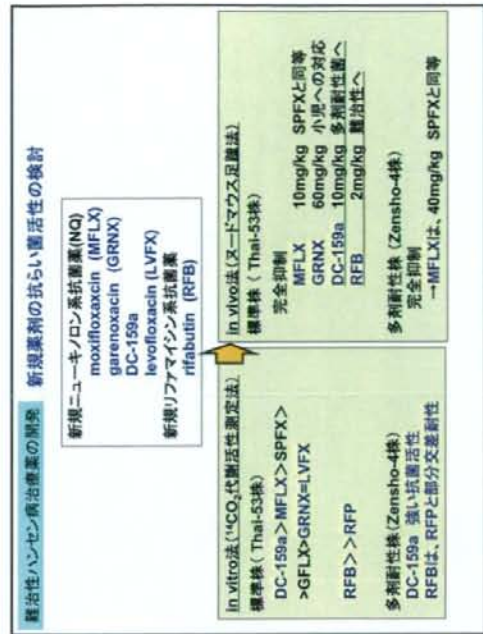
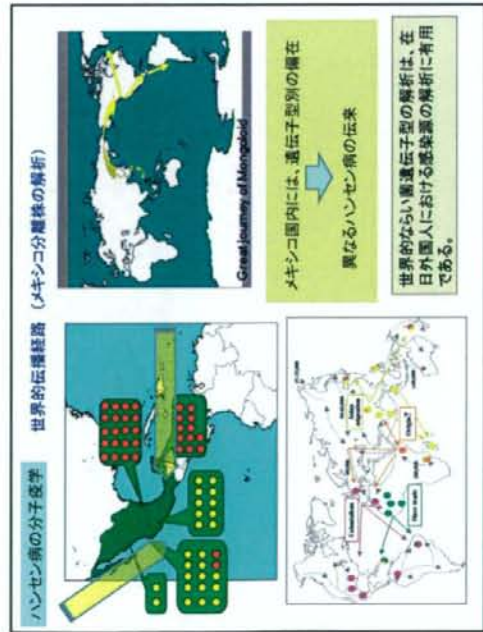
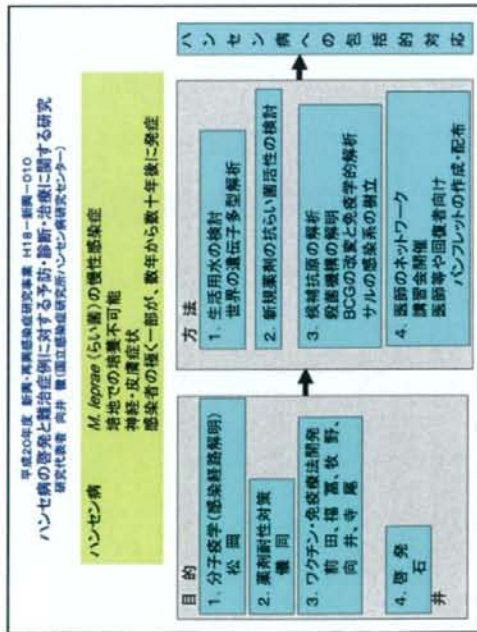
ヒトヘルペスウイルス6型、7型 (HHV-6, 7) に関する研究
HIV-1に関する研究
ハンセン病ワクチンに関する研究 (現在)
非結核性抗酸菌に関する研究 (現在)

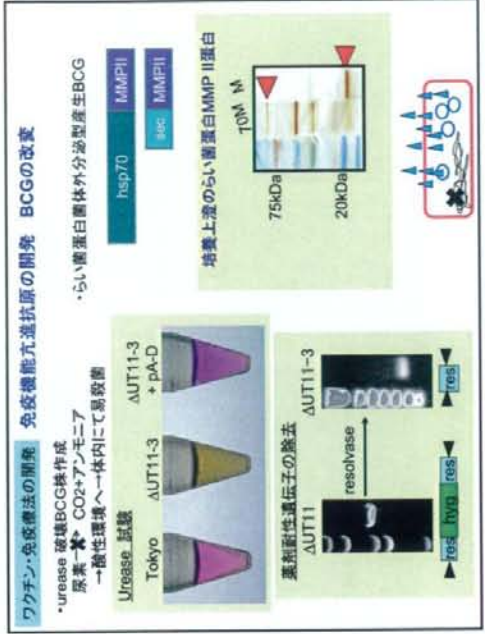
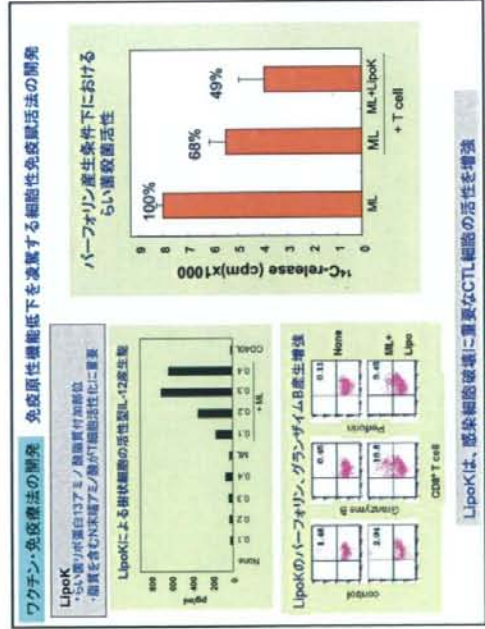
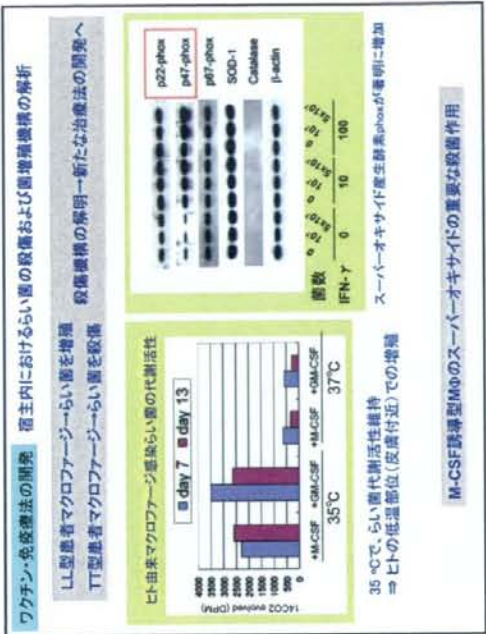
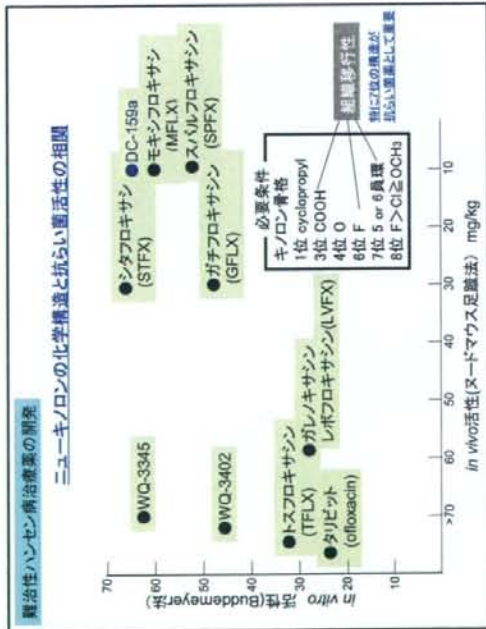
・これまでの研究実績

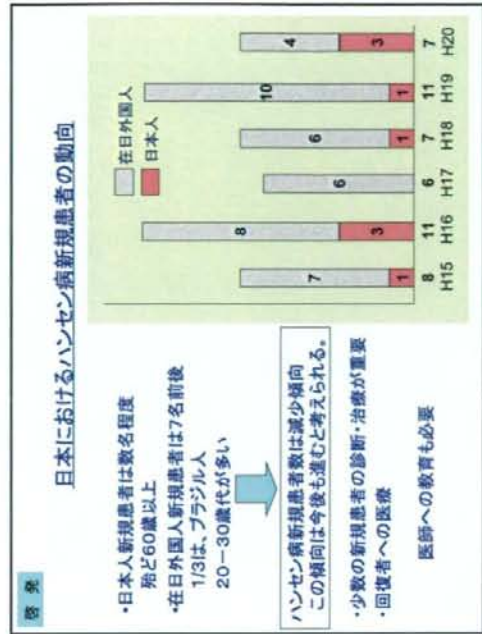
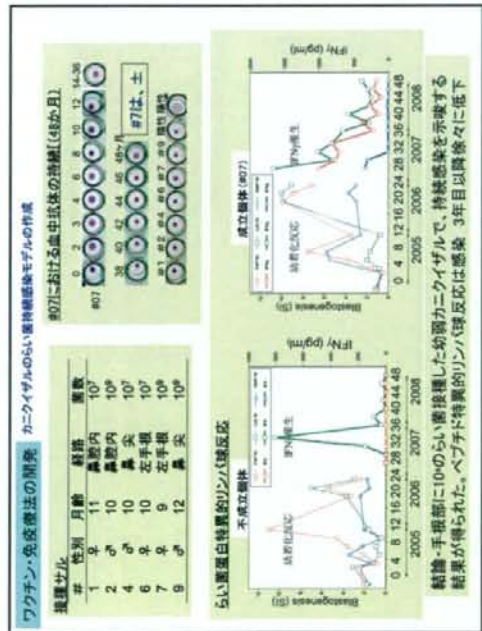
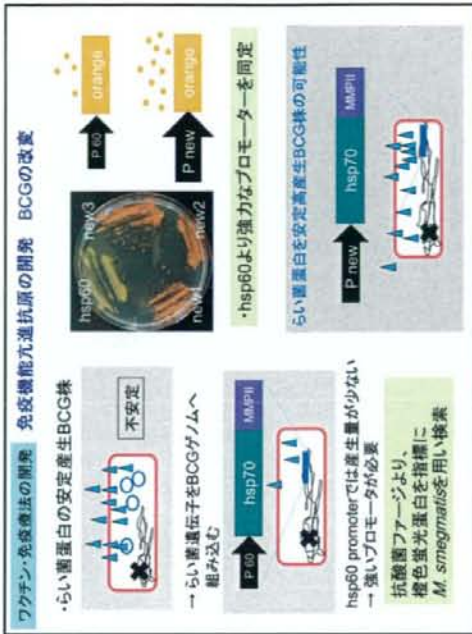
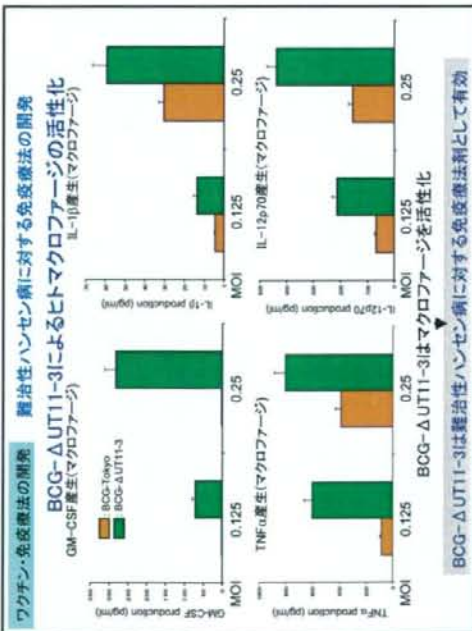
1. Makino M, Maeda Y, Kai M, Tamura T, Mukai T. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 in press
2. Kai M, Nguyen Phuc NH, Hoang Thi TH, Nguyen AH, Fukutomi Y, Maeda Y, Miyamoto Y, Mukai T, Fujiwara T, Nguyen TT, Makino M. Serological diagnosis of leprosy in patients in vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II. *Clin Vaccine Immunol*. 2008 15:1755-9.
3. Miyamoto Y, Mukai T, Maeda Y, Kai M, Naka T, Yano I, Makino M. The *Mycobacterium avium* complex *gtTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J Bacteriol*. 2008, 190:7918-24.
4. Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Miyamoto Y, Makino M. CD4+ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008, 53:96-106.
5. Miyamoto Y, Mukai T, Maeda Y, Nakata N, Kai M, Naka T, Yano I, Makino M. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol*. 2007, 189:5515-22.
6. Maeda Y, Mukai T, Kai M, Fukutomi Y, Nomaguchi H, Abe C, Kobayashi K, Kitada S, Maekura R, Yano I, Ishii N, Mori T, Makino M. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 ;272:202-5.
7. Mukai T, Miyamoto Y, Yamazaki T, Makino M. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 ;254:232-9.

・平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

申請課題名 ハンセン病の再発・再燃、難治症例に対する予防・診断・治療とハンセン病の啓発に関する研究







啓 発

「ハンセン病診療ネットワーク構築」のための皮膚科医向けのハンセン病講習会と表彰

毎年開催（東京、名古屋、大阪）
参加者：144名
皮膚科医 127名
他科医師 3名
回復者 9名
その他5名

内 容

- ・ハンセン病講義
- ・回復者による講義
- ・皮膚スミア検査実習
- ・末梢神経の検査実習
- ・標本実習



啓 発

ハンセン病治療指針(第2版)



医療従事者向けハンフレット



改訂版作成中

ハンセン病アトラス



回復者向けハンフレット



改訂版作成中

平成 20 年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：薬剤耐性菌等に関する研究課題番号：H18-新興一般-011研究代表者：荒川宜親**I. 研究の意義**

- (1) MRSA、VRE、多剤耐性緑膿菌など種々の薬剤耐性菌が臨床現場で蔓延あるいは増加している。
- (2) 上記の既存の耐性菌に加え、各種の新型耐性菌が新たに出現しつつある。
- (3) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症は、医療現場での診療において大きな障害となっている。
- (4) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生を低減化させるための研究が不可欠。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生動向を把握する体制の整備と強化
- (2) 既存および新型の薬剤耐性菌の迅速かつ簡便な検査法の確立
- (3) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生を減少させるためのマニュアル等の作成の推進

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 汎アミノ配糖体超高度耐性菌機構、プラスミド媒介性の新型フルオロキノロン排出機構の解明
- (2) ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌を世界ではじめて確認し警告 (CDC のグループも追認)

・研究分担者 (鈴木里和、藤本修平、山口恵三、松本哲哉、森兼啓太、武澤純、土手健太郎、宮崎久義、河野文夫、小西敏郎、北島博之、畝博、吉田勝美)

- (1) 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業の改善を達成した。
- (2) 「医療機関における院内感染対策マニュアル作成のための手引き」を作成した。

・研究分担者 (池康嘉、山本友子、黒崎博雅、切替照雄、和田昭仁、一山智、小崎繁昭、後藤直正)

- (1) VRE、ケトライド耐性肺炎球菌、メタロ-β-ラクタマーゼ、多剤耐性緑膿菌などの研究に従事。

・研究分担者 (倉田毅)

- (1) 地方衛生研究所における薬剤耐性菌の技術向上のための体制を整備しつつある。

・研究分担者 (牧野正彦、柴山恵吾、松本智成、小林和夫、近藤信哉)

- (1) 多剤耐性を獲得した抗酸菌における耐性機構などについて研究を行なった。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 新型の薬剤耐性菌の発生動向を把握するためのサーベイランス体制の強化と充実
- (2) 既存および新型の薬剤耐性菌を病院の検査室で識別できる簡便かつ迅速な検査法の開発と確立
- (3) 地方自治体の職員が耐性菌やそれらによる感染症発生時に対応する際のマニュアル等の整備

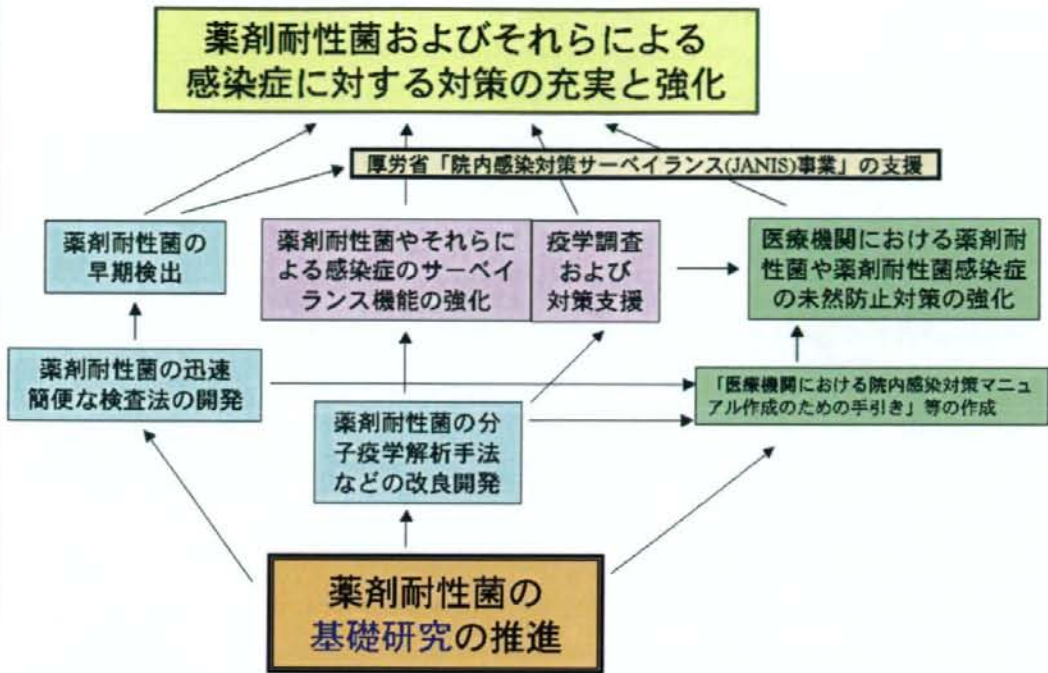
V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 「医療機関における院内感染対策マニュアル作成のための手引き」の作成と改訂
- (2) 既存および新型の薬剤耐性菌の出現や蔓延の状況、それらによる感染症の発生動向を把握
- (3) 新型耐性菌などを迅速、簡便に検出する試験法などを開発し、耐性菌の検査精度の向上

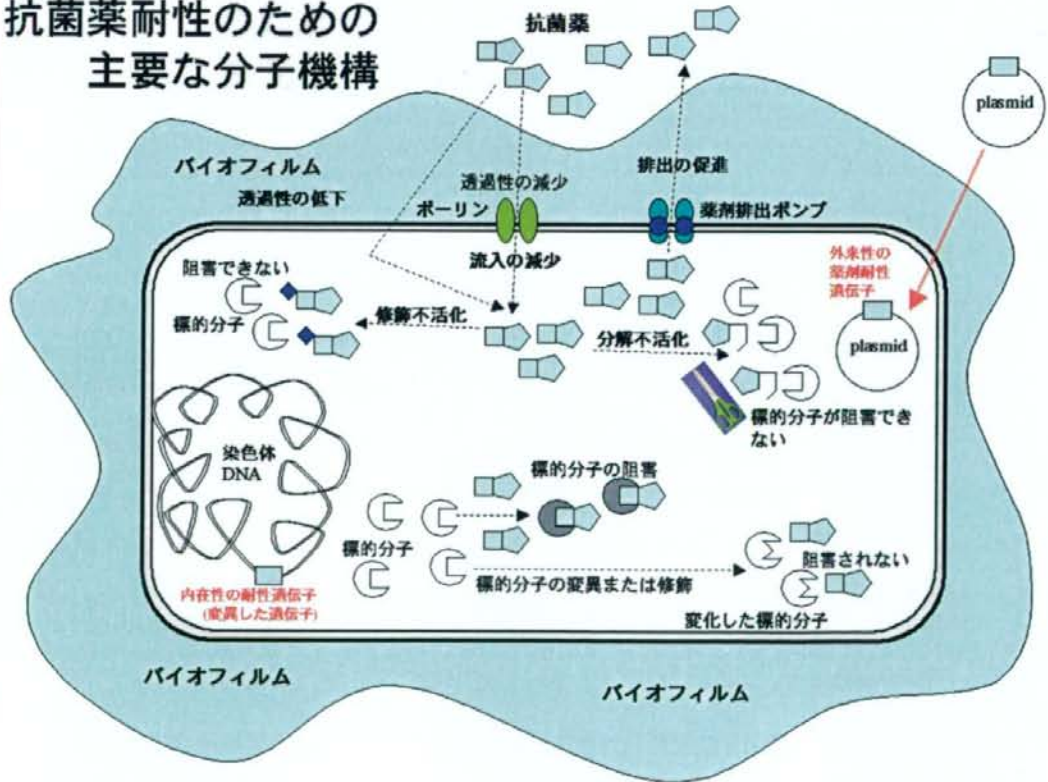
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 「医療機関における院内感染対策マニュアル作成のための手引き」、H18年、武澤純、荒川宜親
- (2) Nagano Y, Nagano N, Wachino J, Ishikawa K, Arakawa Y. Novel Chimeric β -Lactamase CTX-M-64, a Hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14, Found in *Shigella sonnei* Resistant to Various Oxyimino-Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: in press, 2009.
- (3) Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J, Ito K, Arakawa Y. Including Ceftazidime. Rapid change in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov 11.
- (4) Nagano N, Nagano Y, Kimura K, Tamai K, Yanagisawa H, Arakawa Y. Genetic Heterogeneity in *pbp* Genes among Clinically Isolated Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4258-67, 2008.
- (5) Kimura K, Suzuki S, Wachino J, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Nagano N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2890-7, 2008.
- (6) Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Nomenclature of plasmid-mediated 16S rRNA methylases responsible for panaminoglycoside resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:2287-8, 2008.
- (7) Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:1564-6, 2008.
- (8) Kirikae T, Mizuguchi Y, Arakawa Y. Investigation of isolation rates of *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance in medical facilities and clinical laboratories in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar;61(3):612-5.
- (9) Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter species* in the presence of organic material. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar;61(3):568-76.
- (10) Tanimoto K, Nomura T, Maruyama H, Tomita H, Shibata N, Arakawa Y, Ike Y. First VanD-Type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3966-7, 2006.
- (11) Wachino J, Yamane K, Kimura K, Shibata N, Suzuki S, Ike Y, Arakawa Y. Mode of transposition and expression of 16S rRNA methyltransferase gene *rmtC* accompanied by *ISEcp1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50:3212-5, 2006.
- (12) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y. PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Feb;50(2):791-5.
- (13) Kurosaki H, Yamaguchi Y, Yasuzawa H, Jin W, Yamagata Y, Arakawa Y. Probing, inhibition, and crystallographic characterization of metallo- β -lactamase (IMP-1) with fluorescent agents containing dansyl and thiol groups. *Chem. Med. Chem.* 2006 Sep;1(9):969-72.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



抗菌薬耐性のための主要な分子機構



○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59年～平成元年：名古屋大学大学院医学研究科

平成元年から平成8年：名古屋大学医学部細菌学講座（助手、助教授）

平成8年～：国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）

・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

名古屋大学在籍中：加藤延夫（元 名古屋大学医学部細菌学教授、前 名古屋大学総長、現 愛知医科大学理事長）、伊藤秀郎（前 名古屋大学医学部保健学科教授）、太田美智男（現 名古屋大学医学部細菌学教授）

・主な研究課題

- 肺炎桿菌の荚膜多糖体の生合成に関与する遺伝子領域の解析（平成5年度日本細菌学会黒屋奨学賞受賞）
- グラム陰性桿菌における広域β-ラクタム薬耐性の分子機構に関する研究
- 新型の多剤耐性グラム陰性桿菌などにおける分子機構の解明
- 細菌性急性呼吸器感染症、嫌気性菌感染症などに関する研究

・これまでの研究実績

- Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2992-3.
- Nagano N, Isomine S, Kato H, Sasaki Y, Takahashi M, Sakaida K, Nagano Y, Arakawa Y. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei*. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1545-7.
- Han HJ, Kamachi K, Okada K, Toyozumi-Ajisaka H, Sasaki Y, Arakawa Y. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. *Vaccine* 2008 Mar 17;26(12):1530-4.
- Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo GJ, Lee K, Arakawa Y. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum β-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother*. 2006 Oct;58(4):907-8.
- Iwaki M, Arakawa Y. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya. *Lett. Appl. Microbiol*. 2006 Aug;43(2):215-21.
- Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2006 Nov;56(3):305-12.
- Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006 Jan;50(1):178-84.
- Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M. Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? *Lancet* 363(9418):1401, 2004.
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362(9399):1888-93, 2003.
- Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* 354(9182):955, 1999.

・平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

「新型薬剤耐性菌等に関する研究」（公募課題番号：21261101）

厚生労働科学研究費補助会
(新興・再興感染症研究事業)
H18-新興一般-011

薬剤耐性菌等に関する研究班

研究代表者 荒川直規

研究班の目的

1. 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業の改善に関する研究
2. 既存、および新型の薬剤耐性菌の分子機構の解析
3. 結核菌、非結核性抗酸菌に関する研究

感染症法に基づいて報告された感染症の件数



I. 研究の意義

- (1) MRSA, VRE, 多剤耐性緑膿菌など種々の薬剤耐性菌が臨床現場で蔓延あるいは増加している。
- (2) 上記の既存の耐性菌に加え、各種の新型耐性菌が新たに出現しつつある。
- (3) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症は、医療現場での診療において大きな障害となっている。
- (4) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生を低減化させるための研究が不可欠。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生動向を把握する体制の整備と強化
- (2) 既存および新型の薬剤耐性菌の迅速かつ簡便な検査法の確立
- (3) 薬剤耐性菌やそれらによる感染症の発生を減少させるためのマニュアル等の作成の推進

III. 研究のグループと3年間の研究成果

研究代表者 (荒川、研究協力者)

- (1) 汎アミノ配糖体超高度耐性菌機構、プラスミド媒介性の新型フルオロキノロン排出機構の解明
 - (2) ペニシリン低感受性B群連鎖球菌を世界ではじめて確認し警告 (CDCのグループも追認)
- 研究分担者 (鈴木和里、藤本修平、山口憲三、松本哲哉、森康啓太、武澤純、土手龍太郎、宮崎久雄、河野文夫、小西俊郎、北島博之、畠 博、吉田勝美)
- (1) 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業の改善を達成した。
 - (2) 「医療機関における院内感染対策マニュアル作成のための手引き」を作成した。
- 研究分担者 (池藤基、山本友子、黒崎博輝、切替源雄、和田昭仁、一山智、小崎繁昭、後藤直正)
- (1) VRE, ケトラライド耐性肺炎球菌, メタロ-β-ラクタマーゼ, 多剤耐性緑膿菌などの研究に従事。
- 研究分担者 (金田敏)
- (1) 地方衛生研究所における薬剤耐性菌の技術向上のための体制を整備しつつある。

研究分担者 (牧野正彦、柴山成彦、松本哲哉、小柱和夫、近藤信哉)