

- Kirikae, F., Eiraku, N., Morioka, H., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takashige, K., Moriya, Y., Kusumoto, S., Suda, Y.: Evidence of immunostimulating lipoprotein co-existing in natural lipoteichoic acid fraction. *Infect. Immun.* 75:1926-1932, 2007.
- 14) Zhao, J., Hayashi, T., Saarinen, S., Papageorgiou, A.C., Kato, H., Imanishi, K., Kirikae, T., Abe, R., Uchiyama, T., Miyoshi-Akiyama, T.: Cloning, expression and characterization of the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin-G from *Streptococcus dysgalactiae*. *Infect. Immun.* 75: 1721-1729, 2007.
  - 15) Huang, Q., Tonge, P.J., Slayden, R.A., Kirikae, T., Ojima, I.: FtsZ: a novel target for Tuberculosis drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 7: 527-543, 2007.
  - 16) Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P.K., Kotani, S., Sasakawa, C.: A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell* 130(4) 611-623, 2007.
  - 17) Sekiguchi, J., Nakamura, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kirikae, F., Kobayashi, I., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Morita, K., Suetake, T., Yoshida, H., Kato, S., Mori, T., Kirikae, T.: Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 45:2802-2807, 2007.
  - 18) Sekiguchi, J., Teruya, K., Horii, K., Kuroda, E., Konosaki, H., Mizuguchi, Y., Araake, M., Kawana, A., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Miyazaki, H., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. *J. Infect. Chemother.* 13:418-422, 2007.
  - 19) Obata, S., Zwolska, Z., Toyota, E., Kudo, K., Nakamura, A., Sawai, T., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Association of rpoB mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27(1): 32-39, 2006.
  - 20) Huang, Q., Kirikae, F., Kirikae, T., Pepe, A., Amin, A., Respcio, L., Slayden, R.A., Tonge, P.J., Ojima, I.: Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: nontoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J. Med Chem.* 49: 463-466, 2006.
  - 21) Toyooka, K., Liu, F., Ishii, M., Saito, S., Kirikae, T., Asano, Y., Shinomiya, H.: Generation and characterization of monoclonal antibodies that specifically recognize p65/L-Plastin isoform but not T-Plastin isoform. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1402-1407, 2006
  - 22) Hashimoto, M., Tawaratsumida, K., Kariya, H., Kiyohara, A., Suda, Y., Kirikae, F., Kirikae, T., Gotz, F.: Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 177: 3162-3169, 2006.
  - 23) Sekiguchi, J., Fujino, T., Araake, M., Toyota, E., Kudo, K., Saruta, K., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Emergence of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tuberculosis wards. *J. Infect. Chemother.* 12: 47-50, 2006.
  - 24) Kawana, A., Teruya, K., Kirikae, T., Sekiguchi, J., Kato, E., Kuroda, E., Horii, K., Saito, S., Ohara, H., Kuratsuji, Y., Kimura, S., Kudo, K.: "Syndromic surveillance within a hospital" for the early detection of a nosocomial outbreak of acute respiratory infection. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:377-379, 2006.
  - 25) Itoyama, S., Keicho, N., Hijikata, M., Quy, T., Phi, N.-C., Long H.T., Ha, Le D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T.: Identification of an alternative 5'-untranslated exon and new polymorphism of angiotensin-converting enzyme 2 gene: lack of association with SARS in the Vietnamese population. *Am. J. Med. Genet. A.* 136: 52-57, 2005.
  - 26) Hamano, E., Hijikata, M., Itoyama, S., Quy, T., Phi, N.-C., Long, T.-H., Ha, le-D., Ban, V.-V., Matsushita, I., Yanai, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Sasazuki, T., Keicho, N.: Polymorphisms of interferon-inducible genes OAS-1 and MxA associated with SARS in the Vietnamese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 1234-1239, 2005.
  - 27) Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Fujino, T., Kobayashi, I., Morita, K., Kikuchi, Y., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Characterization of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain caused an outbreak in a neurosurgery ward and its integron-located *aac(6)-Iae* gene cassette encoding a new aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3734-3742, 2005.
  - 28) Sekiguchi, J., Tharavichitkul, P., Miyoshi-Akiyama, T., Chupia, V., Fujino, T., Araake, M., Irie, A., Morita, K., Kuratsuji, Kirikae, T.: Cloning and characterization of a novel trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase from a nosocomial isolate of *Staphylococcus aureus* CM.S2 (IMCJ1454). *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3948-3951, 2005.
  - 29) Kawana, A., Teruya, K., Hama, T., Kuroda, E., Sekiguchi, J., Kirikae, T., Naka, G., Kimura, S., Kuratsuji, T., Ohara, H., Kudo, K.: Trial surveillance of cases with acute respiratory symptoms at IMCJ hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58: 241-243, 2005.
  - 30) Xiao, W., Hsu, Y-P., Ishizaka, A., Kirikae, T., Moss, R.B.: Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD and asthma inflammation. *Chest.* 128:2316-2326, 2005.
  - 31) Otsuka, Y., Fujino, T., Mori, N., Sekiguchi, J., Toyota, E., Saruta, K., Kikuchi, Y., Sasaki, Y., Ajisawa, A., Otsuka, Y., Nagai, H., Takahara, M., Saka, H., Shirasaka, T., Yamashita, Y., Kiyosuke, M., Koga, H., Oka, S., Kimura, S., Mori, T., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Survey of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive patients with mycobacterial infection in Japan. *J. Infect.* 51: 364-374, 2005.
  - 32) Nishimura, H., Kuratsuji, T., Quy, T., Phi, N.C., Ban, V.V., Ha, L.D., Long, H.T., Yanai, H., Keicho, N., Kirikae, T., Sasazuki, T., Anderson, R.M.: Rapid awareness and transmission of severe acute respiratory syndrome in Hanoi French Hospital, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 17-25, 2005.
  - 33) van Klink, J.B., Larson, L., Perry, N.B., Weavers, R.T., Cook, G.M., Bremer, P.J., Mackenzie, A.D., Kirikae, T.: Triketones active against antibiotic-resistant bacteria: synthesis, structure-activity relationships, and mode of action. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 6651-6662, 2005.
  - 34) Toyooka, K., Takai, S., Kirikae, T.: *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. *J. Med. Microbiol.* 54: 1007-1015, 2005.

平成21年度 新興・再興感染症研究事業

### 医療機関における感染症伝播に関する研究

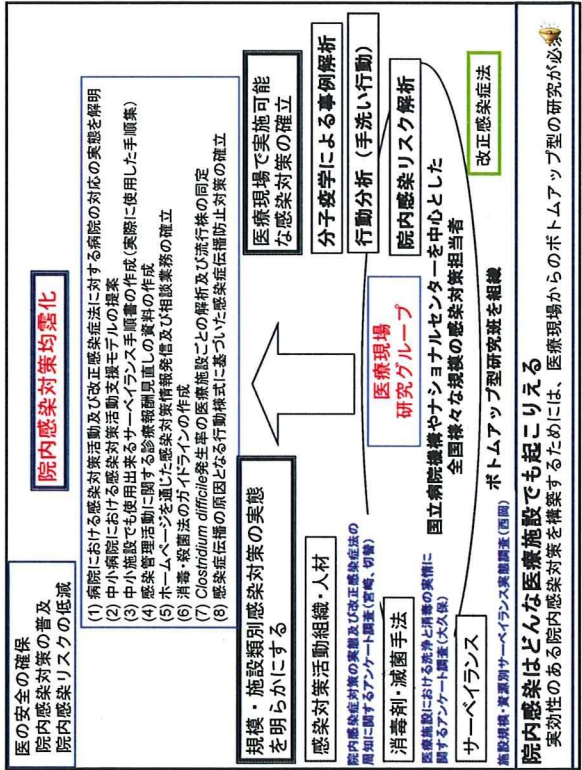
#### H19-新興一般-001

研究代表者

国立国際医療センター  
切替 照雄

### 研究の背景

- 院内感染を極力防止することは、医療施設の本来の機能を発揮する環境を整えるばかりでなく、患者・国民に安全な医療を提供することであり、更には医療経済的にも無駄な医療費の前減に繋がる経済効果もある
- 院内感染はどんな医療施設でも起こりえる医療事故であり、院内感染対策の均霑化が必要
- 中小病院における感染対策活動が把握出来ていない
- 最新の消毒と滅菌に関するガイドラインがない
- 感染症伝播の原因となる医療行動や遵守率の向上に有効な制御法は確立されていない
- 日本の医療施設におけるClostridium difficile感染症の実態が不明である



### 研究組織と協力施設

- 切替 照雄** 国立国際医療センター研究所  
総括および分子疫学による感染伝播リスクの評価
- 工藤 圭一郎** 同センター 国際疾病センター  
感染制御法の普及に関する研究
- 加藤 はる** 国立感染症研究所  
Clostridium difficileが我が国の医療現場で伝播・増殖するリスク因子に関する解析
- 中村 浩幸** 国立成育医療センター  
医療行為と感染伝播リスクの解明
- 大久保 憲** 東京医療保健大学  
消毒・滅菌ガイドラインの作成
- 河野 文夫** 国立病院機構熊本医療センター  
医療現場における感染対策実態に関する研究
- 西岡みどり** 国立看護大学校  
病院施設の種類の別感染対策の実態調査
- 協力施設:**
- 国立病院機構 札幌南病院
  - 国立病院機構 仙台医療センター
  - 国立病院機構 西埼玉病院
  - 国立がんセンター
  - 国立国際医療センター
  - 国立成育医療センター
  - 国立病院機構 長野病院
  - 国立長寿医療センター
  - 名古屋大学医学部附属病院
  - 国立病院機構 和歌山病院
  - 国立病院機構 大阪医療センター
  - 国立病院機構 神戸医療センター
  - 神戸大学医学部附属病院
  - 陰下内科医院 (神戸市)
  - 国立病院機構 香川小児病院
  - 国立病院機構 関門医療センター
  - 国立病院機構 熊本医療センター
  - 国立病院機構 宮崎東病院
  - 山鹿市立病院

### 医療現場研究グループによる提案

#### インフルエンザ流行期にむけての準備(案)

#### 1. 情報の共有化

・地域における双方向性感染症情報ネットワークの構築

1. 情報の共有化  
 ・地域における双方向性感染症情報ネットワークの構築

2. 感染症の発生に際しては、関係機関間で対応する  
 3. 承認外薬に際しては、一般医療機関で対応する  
 4. 患者の発生  
 5. 関係機関  
 6. 関係機関への最新の感染予防方法や地域での対応に関する情報提供

#### 8月提案

#### 10月提案

#### インフルエンザ流行期における医療現場の対応(案)

#### 1. 情報の共有化

・地域における双方向性感染症情報ネットワークの構築

1. 情報の共有化  
 ・地域における双方向性感染症情報ネットワークの構築

2. 医療機関間で双方向性感染症情報ネットワークを構築する  
 3. 感染症の発生に際しては、関係機関間で対応する  
 4. 承認外薬に際しては、一般医療機関で対応する  
 5. 患者の発生  
 6. 関係機関への最新の感染予防方法や地域での対応に関する情報提供

● 感染症発生時の対応  
 ● 承認外薬の対応  
 ● 患者の発生  
 ● 関係機関への最新の感染予防方法や地域での対応に関する情報提供

### 医療施設における感染症対策及び改正感染症法の周知に関するアンケート調査(宮崎、切替)

院内感染対策として院内感染防止委員会活動や院内感染防止のための講習会開催等の活動が大多数の病院で実施されており、院内感染対策活動が全国の医療機関で実施されている実態が明らかとなった。

医療機関が今後改善すべき点

- ICDやICNなどの資格をもった専門の医療従事者のさらなる普及
- 院内感染等のための専従時間を有する職員およびICTのさらなる導入
- 特定感染症患者が発生した場合の対応マニュアルのさらなる普及
- 結核検査室での安全対策のさらなる普及等

特に中規模・小規模病院では、院内感染等のための専従時間を有する職員がおらず、ICTがない病院の割合が有意に高く、このような施設で可能な院内感染対策活動のあり方を議論する必要がある

施設規模	実施している	していない	不明
感染症指定医療機関	78	22	0
300床以上の病院	60	40	0
300床未満の病院	13	87	0

施設規模	実施している	していない	不明
感染症指定医療機関	20	80	0
300床以上の病院	23	77	0
300床未満の病院	10	90	0

施設規模	実施している	していない	不明
感染症指定医療機関	43	57	0
300床以上の病院	72	28	0
300床未満の病院	31	69	0

### 消毒・滅菌法ガイドライン作成 (大久保)

1999年の「感染症法」の施行に伴い「消毒と滅菌のガイドライン」が発行されたが、2007年4月1日に結核予防法が統合され、さらにノロウイルス、クロストリジウム、ディフィシル、新型インフルエンザウイルスなどによる感染症が問題となってきた。これに伴い、我が国の感染制御の現状をアンケート調査し、それを基にして現場に必要な「改訂版 消毒と滅菌のガイドライン」を発行することを目的に研究した

- 器械の洗浄・滅菌、手指衛生(手指消毒・手洗い)、手術時手洗い、術野の消毒方法、環境消毒、消化器内視鏡の処理などについて、アンケート形式にて調査を実施し、現時点における我が国の「医療関連感染対策の実態」を明らかにした
- 5年ごと(初版1999年、第2版2004年)に改定している本ガイドラインは、2009年度の第3改訂版を纏めた。具体的には、2004年版「消毒と滅菌のガイドライン」において、結核、新型インフルエンザ(鳥インフルエンザを含む)、ノロウイルス、クロストリジウム、ディフィシル、クロイツフェルト・ヤコブ病プリオン、軟性内視鏡の洗浄と消毒の項目を新たに追加した
- 感染症法における「新類型分類」に基づいて記載した
- 滅菌の項目に、低温滅菌法の中で新たに国内販売承認を取得したホルムアルデヒドガス滅菌器、過酸化水素蒸気滅菌器についての項目を追加した
- その他、新たなエビデンスに基づく内容に改訂した

### 感染症法新類型分類に基づく記載(例)

#### 消毒法概要(二類感染症)

微生物名	消毒のポイント	消毒法
結核	主な感染経路は空気であるが、患者が用いた物品や患者環境の消毒を行う	●80℃・10分間の熱水 ●抗ウイルス作用の強い消毒薬 ●0.05~0.5%(500~5,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムで清拭、または30分間浸漬 ●アルコール(消毒用エタノール、70vol%-インプロパノール)で清拭、または30分間浸漬 ●2~3.5%グルタルアルデヒドに30分間浸漬
鳥インフルエンザ(H5N1)	主な感染経路は飛沫であるが、患者が用いた物品や患者環境の消毒を行う	●80℃・10分間の熱水 ●0.1%第四級アンモニウム塩や両性界面活性剤に30分間浸漬 ●0.2%第四級アンモニウム塩や両性界面活性剤で清拭 ●0.01~0.1%(100~1,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムに30~60分間浸漬 ●アルコールで清拭
重症急性呼吸器症候群(SARSコロナウイルス)	患者の糞便で汚染された可能性のある箇所を消毒する	●80℃・10分間の熱水 ●消毒薬
急性灰白髄炎(ポリオ)	皮膚・ソフテリヤなどを除き飛沫感染であるが、患者が用いた機器や患者環境を消毒する	●80℃・10分間の熱水 ●0.1%第四級アンモニウム塩や両性界面活性剤に30分間浸漬 ●0.2%第四級アンモニウム塩や両性界面活性剤で清拭 ●0.01~0.1%(100~1,000 ppm)次亜塩素酸ナトリウムに30~60分間浸漬 ●アルコールで清拭
ジフテリア		

## 環境消毒の是非について

・ 今回の改訂版「消毒と滅菌のガイドライン2010」において、病室の床などの環境表面の消毒を否定する理由

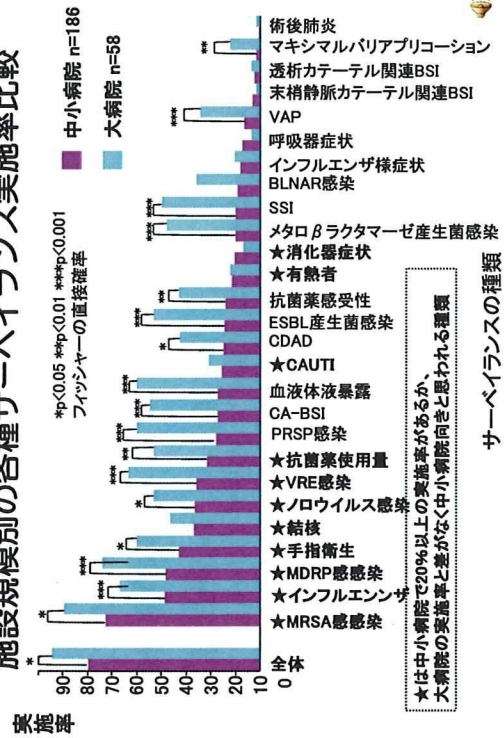
- アンクアテリカル環境表面の汚染菌が医療関連感染にほとんど関与していない
- 床の洗浄と消毒で医療関連感染の発生率に差がない
- 洗浄剤は廃棄しても水や土壌への残留汚染が発生しない
- 洗浄剤は職業曝露による労働安全衛生上の問題がない
- 消毒剤の方が費用がより安価
- 消毒薬の使用で耐性菌が選択される可能性がある
- 洗浄剤の方が見た目に綺麗になる

- ・ 米国CDC「消毒と滅菌のガイドライン2008」: 病室の床などの環境表面の消毒を推奨
- ◆ 環境表面は疫学的に重要な微生物(VRE, MRSAなど)の伝播に因与する可能性がある
- ◆ 感染性物質(血液)によって汚染した環境表面は消毒が必要である
- ◆ 床の微生物数の減少は洗浄剤よりも消毒薬の方が有効
- ◆ 洗浄剤は微生物の汚染を受け、温床となり得る
- ◆ いくつかの新しい消毒薬は持続的抗菌効果がある

## 中小病院向けサーベイランス手順書作成(西岡みどり)

1. 『施設規模・資源別サーベイランス実施状況調査』実施  
全国無作為抽出1000施設に質問紙調査を実施  
244施設(回収率24%)の回答結果の報告書\*1を作成  
1) 感染管理活動に関する資源の詳細と実施状況  
2) サーベイランス活動に関する資源の詳細と実施状況  
3) 感染管理およびサーベイランス活動の概算人件費  
\*1 [http://www.dcc.go.jp/nosocomial\\_infection/pdf/surveillance.pdf](http://www.dcc.go.jp/nosocomial_infection/pdf/surveillance.pdf) で公開
2. 『中小病院向けサーベイランス手順書案(6種)』\*2作成&試行  
1) 中小病院のサーベイランス推進に向け手順書案作成  
2) 埼玉県の数施設で試行&意見収集  
\*2 <http://www.ncc.ac.jp/img/survey-all.pdf> で公開
3. 『中小病院の耐性菌感染伝播防止活動』実践  
A施設(100床規模)でのMRSA多発事例の紹介  
1) 臨床株の遺伝子解析結果の検討  
2) 臨床視察と改善提案

## 『施設規模・資源別サーベイランス実施状況調査』 施設規模別の各種サーベイランス実施率比較



## 『施設規模・資源別サーベイランス実施状況調査』 感染管理活動&サーベイランス概算人件費

活動	中小病院 n=186	大病院 n=58
感染管理活動(千円)		
月間総人件費*	37	127
月間100床あたり	31	31
患者100日あたり	1.28	1.26
サーベイランス活動(千円)		
月間総人件費*	7	26
月間100床あたり	6	6
患者100日あたり	0.21	0.24

\*p<0.001, ウィルコクソンの順位和検定  
数値は中央値  
人件費は人事院「平成19年国家公務員給与等実態調査報告書」平均給与月額より週40時間労働とした職種別時給(賞与、法定福利費の事業主負担分、退職給付金の月額換算分は含まず)に職種別の活動時間を乗じ算出



## 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 成果概要

研究課題：新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と診断・治療法に関する研究

課題番号：H19-新興-一般-002

研究代表者：砂川 慶介

### I. 研究の意義

- (1)  $\beta$  溶血性レンサ球菌や肺炎球菌による侵襲性重症感染症の実態が把握されていない。
- (2) それら原因菌について全国規模の正確な分子疫学解析がなされていない。
- (3) 予後不良例(死亡+後遺症(+))における宿主側因子の解明が現状ではなされていない。
- (4) 近年, 増加傾向にある新規レンサ球菌(SDSE)感染症の病態が解析されていない。
- (5) 欧米の成績との比較がなされていない。

### II. 研究の目的(課題), 期待される成果

- (1) 収集菌株について分子レベルでの疫学解析を行い, 欧米のそれと比較する。
- (2) 我が国におけるレンサ球菌・肺炎球菌による市中型劇症・侵襲性重症感染症の実態について, 宿主と細菌の両方から解析する。
- (3) 劇症化, 重篤化に至る菌側因子について, ゲノム解析, 動物モデルから明らかにする。
- (4)  $\beta$  溶血性レンサ球菌, 肺炎球菌の迅速診断を確立する。
- (5) 事業成果を関連学会との共催シンポジウムにおいて公表, 医療関係者の啓発活動を行う。

### III. 3年間の研究成果

#### ・研究代表者

- (1) 日本感染症学会東日本支部総会・日本化学療法学会東日本支部総会の合同学会, および日本臨床微生物学会と本研究事業との共催シンポジウムを企画し, 医療関係者に対する啓発活動を行った。

#### ・研究分担者(生方公子, 岩田 敏, 坂田 宏)

- (1) 研究代表者とともに収集した菌株うち, *S. equisimilis* (SDSE)について同様の疾患から分離されたCDCの成績(Broyles et al, 2009)と比較し, 疫学的に明らかに異なることを見出した。
- (2) 侵襲性感染症由来の肺炎球菌をワクチンカバー率に影響する莢膜型について解析し, 成人では欧米で極めてまれな 12F 型が突出して多いことを遺伝子から明らかにした。
- (3) 新生児に重篤な感染症を惹起する B 群レンサ球菌(GBS)を含む 8 菌種の迅速診断法を構築した。

#### ・研究分担者(渡邊治雄, 池辺忠義, 阿戸 学)

- (1) A 群レンサ球菌(GAS)では特定の *emm* 遺伝子保持株で, 病原遺伝子を制御する新たな遺伝子 *rgg* 遺伝子に変異の認められる株が劇症型発症に関与していることが示唆された。
- (2) 劇症レンサ球菌例における好中球障害機構の解析, 炎症性サイトカインの役割を明らかにした。

#### ・研究分担者(藤島清太郎, 吉田 敦)

- (1) GAS, GBS, SDSE 菌による侵襲性感染症例は SIRS 基準の白血球数異常を 100%満たし, 肺炎球菌では 40%と低値であった。SDSE で PLT 値の異常低値が多く認められた。
- (2) UMIN と敗血症例の Web 登録システムを共同開発した。

#### ・研究分担者(坂田 宏, 岩田 敏)

- (1) 小児の侵襲性肺炎球菌感染症由来株について莢膜型と耐性遺伝子を解析し, 治療薬と予後との関係を明らかにした。

#### ・研究分担者(秋山 徹, 生方公子)

- (1) SDSE による劇症型感染を解析するため II 型糖尿病マウスモデルを構築した。また, 本菌 2 株の全ゲノム解析を行い, GAS の病原性遺伝子との比較を行った。

・研究分担者(松井 英則)

(1) ヒト CD46 発現トランスジェニックマウスを用い、GAS による劇症型感染を惹起させ、その病態を明らかにした。

・研究分担者(大石和徳)

(1) ブタレンサ球菌について、菌の遺伝子レベルでの解析と発症者の疾患、致死率を解析した。

IV. 今後考えられる新たな課題

(1) 救命救急医学会と連携し、UMIN と共同開発した敗血症登録 Web サイトによる症例の集積ならびに分離菌の解析。

(2) 新たに構築した無菌検査材料を対象とした迅速診断法を使用したデータの集積。

(3) 最も症例の多い SDSE 菌のさらなる動物モデルを構築しての病態解析。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 早期診断と治療に関するガイドラインの作成。

(2) 関連学会からアクセス可能なホームページの構築。

(3) 早期診断・治療法の確立による医療費削減への貢献。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 砂川 慶介(研究代表者)

・ Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, **Sunakawa K**, Ubukata K.: CD46 Transgenic Mouse Model of Necrotizing Fasciitis Caused by *Streptococcus pyogenes* Infection. *Infect Immun* **2009**

・ Takahashi T, Sunaoshi K, **Sunakawa K**, Fujishima S, Watanabe H, and Ubukata K.: Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. *Clin Microbiol Infect* DOI: 10. 1111/j.1469-0691. 2009.03047.x

・ Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, **Sunakawa K**, Ubukata K. and the Invasive Streptococcal Disease Working Group: Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from Newborns to the Elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**

・ Chiba N, Morozumi M, Sunaoshi K, Takahashi S, Takano M, Komori T, **Sunakawa K**, Ubukata K, and the IPD surveillance Study Group: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiol Infect* **2010**.

・ Chiba N, Murayama SY, Morozumi M, Nakayama E, Okada T, Iwata S, **Sunakawa K**, and Ubukata K.: Rapid detection of causative eight pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother* **2009**. (生方, 岩田は上記論文の共同が多いため省略)

(2) 渡邊治雄, 阿戸学, 池辺忠義(研究分担者)

**Ato M, Ikebe T**, Kawabata H, Takemori T, **Watanabe H**. Incompetence of neutrophils to severe invasive group A streptococcus isolates is attributed to enhancing expression of plural virulence factors by null-function of a regulatory gene. *PLoS ONE*. **2008**;3(10):e3455.

(3) 藤島清太郎(研究分担者)

・ Sekine K, **Fujishima S**, Sasaki J, Ishizaka A, Aiso S, Aikawa N. In vivo IL-18 supplementation ameliorates lethal acute lung injury in burn-primed endotoxemic mice: a novel anti-inflammatory role of IL-18. *Shock* **2009**

・ Shimizu M, Hasegawa N, Nishimura T, Endo Y, Shiraiishi Y, Yamasawa W, Koh H, Tasaka S, Shimada H, Nakano Y, **Fujishima S**, Yamaguchi K, Ishizaka A. Effects of TNF-alpha-converting enzyme inhibition on acute lung injury induced by endotoxin in the rat. *Shock* **2009**

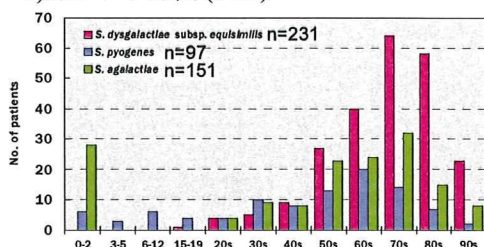
(4) 松井英則(研究分担者)

・ **Matsui H**, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, Sunakawa K, and Ubukata K. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infection and Immunity*, **2009**.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

**課題1：菌株の分子疫学解析**  
(生方, 岩田, 坂田, 藤島, 砂川)

- 1)全国規模の菌株収集  
GAS, GBS, SDSE(下図) 肺炎球菌(n=496)
- 2)病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子・分子疫学解析
- 3)豚レンサ球菌 (大石)



**課題2：症例の背景因子と予後の解析**  
(岩田, 坂田, 藤島, 吉田, 生方, 砂川)

- 1)成人での菌種別予後の特徴(下図)
- 2)基礎疾患保有率高い。
- 3)発症から2-3日での死亡多い。
- 4)予後不良例は血液検査値異常を示す場合が多い。

菌種	死亡	後遺症(+)	後遺症(-)	不明	基礎疾患(+)
GAS (n=97)	14.0	8.1	72.1	5.8	56.4
SDSE (n=231)	14.3	6.6	76.4	3.7	75.0
GBS (n=151)	9.7	3.2	78.5	8.6	87.4
肺炎球菌 (n=496)	19.6	24.5	28.0	28.0	56.1

**課題5：啓発活動**

冊子作成と配布, 共催シンポジウム開催

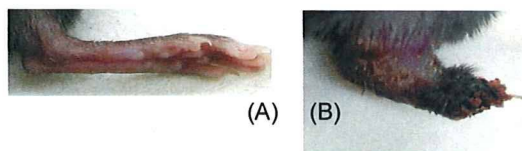
- 1)日本感染症学会との共催シンポジウム(2009.10.30)  
座長：砂川慶介, 渡邊治雄
- 2)日本臨床微生物学会との共催シンポジウム(2010.1.30予定)  
座長：砂川慶介, 藤島清太郎

**課題3：基礎的病態解析,およびゲノム解析からの病原遺伝子の解明**

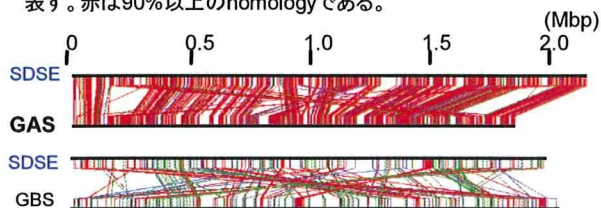
(阿戸, 池辺, 渡邊, 秋山, 松井, 生方)

- 1) GAS病原性の制御機構
- 2) トランスジェニックマウスでのGAS病態解析
- 3) 糖尿病モデルマウスでのSDSEの病態解析
- 4) 劇症例由来SDSE 2株の全ゲノム解析

動物感染モデル：WildマウスのGAS感染(A),  
トランスジェニックマウスのGAS感染(B)



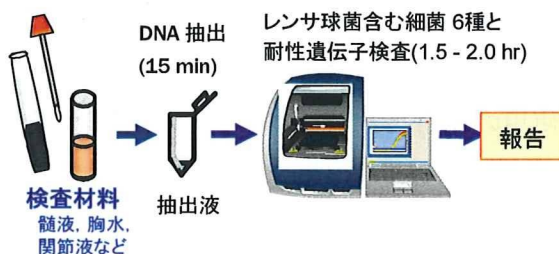
ゲノム再配置マップ (ひとつのラインがひとつの遺伝子を表す。赤は90%以上のhomologyである。)



**課題4：Real-time PCR 法によるレンサ球菌の迅速診断法の構築**

(生方, 坂田, 大石)

- 1) GAS, GBS, SDSE, 肺炎球菌の迅速検索
- 2) 肺炎球菌の耐性遺伝子迅速検索
- 3) GAS, GBS, SDSEのマクロライド耐性遺伝子迅速検索





## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1972年1月～慶應義塾大学医学部小児科学教室

1983年2月～1998年9月 国立東京第二病院(現(独)国立病院機構東京医療センター)臨床研究部

1998年10月～2006年3月 北里大学医学部

2002年4月～現在 北里大学大学院感染制御科学府・北里生命科学研究所

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

坂内久一 杏林大学保健学部 教授

岩田 敏 国立病院東京医療センター 統括診療部長

佐藤吉壮 富士重工業太田総合病院 副院長

紺野昌俊 帝京大学名誉教授

生方公子 北里生命科学研究所 教授

### ・主な研究課題

小児呼吸器感染症の診断・治療に関する研究

小児細菌性髄膜炎の全国疫学調査

小児用抗菌薬の臨床評価

抗菌薬が腸内細菌叢に及ぼす影響

### ・これまでの研究実績

#### 1. ガイドライン

- ・肺炎球菌ワクチン再接種に関するガイドライン(案) 2009((社)日本感染症学会 肺炎球菌ワクチン再接種問題検討委員会(大石和徳, 砂川慶介, 他))
- ・小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2007(日本小児感染症学会・日本小児呼吸器疾患学会) 協和企画 2007年4月 監修
- ・細菌性髄膜炎の診療ガイドライン(日本神経治療学会・日本神経学会・日本神経感染症学会) 医学書院 2007年4月 編集委員
- ・抗菌薬使用のガイドライン(日本感染症学会・日本化学療法学会) 協和企画 2005年10月編集委員

#### 2. 論文

- 1) Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, Sunakawa K, Ubukata K.: CD46 Transgenic Mouse Model of Necrotizing Fasciitis Caused by *Streptococcus pyogenes* Infection. *Infect Immun* 2009; 11: 4806-4814.
- 2) Takahashi T, Sunaoshi K, Sunakawa K, Fujishima S, Watanabe H, and Ubukata K.: Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. *Clin Microbiol Infect* DOI: 10. 1111/j.1469-0691.

2009.03047.x

- 3) Murayama SY, Seki C, Sakata H, Sunaoshi K, Nakayama E, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K, and the Invasive Streptococcal Disease Working Group: Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from Newborns to the Elderly, with invasive infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2650-2653.
- 4) Chiba N, Morozumi M, Sunaoshi K, Takahashi S, Takano M, Komori T, Sunakawa K, Ubukata K, and the IPD surveillance Study Group: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiol Infect* 2010; 138:61-68.
- 5) Chiba N, Murayama SY, Morozumi M, Nakayama E, Okada T, Iwata S, Sunakawa K, and Ubukata K.: Rapid detection of causative eight pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother* 2009; 15: 92-98
- 6) Yamaguchi Y, Hanaki H, Yanagisawa C, Ikeda-Dantsuji Y, Hashimoto T, Yazaki H, Sugahara K, Yanagisawa T, Kawajiri H, Sato S, Ishizaki A, Tachihara-Sato R, Takahashi Y, Ono T, Kageyama Y, Kawaguchi T, Tamura A, Hagane K and Sunakawa K: Characterization of  $\beta$ -lactam antibiotic-induced vancomycin-resistant MRSA (BIVR) in a patient with septicemia during long-term vancomycin administration. *J Infect Chemother* 2009; 15: 274-278
- 7) 砂川慶介:薬物療法—抗菌薬投与の基本. 小児科学 第3版(総監修 大関武彦, 近藤直美). 医学書院, 2008
- 8) 尾内一信, 石和田稔彦, 岩田 敏, 岡田賢司, 黒崎知道, 坂田 宏, 鈴木 宏, 砂川慶介, 堤 裕幸, 春田恒和, 満田年宏, 山崎勉:小児呼吸器感染症治療の現状把握に関する検討(第1報) 小児呼吸器感染症治療ガイドライン2004について. 日本小児学会雑誌, 2008
- 9) 尾内一信, 石和田稔彦, 岩田 敏, 岡田賢司, 黒崎知道, 坂田 宏, 鈴木 宏, 砂川慶介, 堤 裕幸, 春田恒和, 満田年宏, 山崎勉:小児呼吸器感染症治療の現状把握に関する検討(第2報)小児呼吸器感染症における抗菌薬使用実態. 日本小児学会雑誌, 2008
- 10) Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Chiba N, Murayama SY, Takayanagi R, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K, and ARD study group: Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 2008; 14: 424-432.
- 11) Wajima T, Murayama SY, Sunaoshi K, Nakayama E, Sunakawa K, and Ubukata K.: Distribution of emm type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive disease. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1383-1388.
- 12) Barada K, Hanaki H, Ikeda S, Yamaguchi Y, Akama H, Nakae T, Inamatsu T, and Sunakawa K: Trends in the gentamicin and arbekacin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *J Infect Chemother*. 2007
- 13) Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, Taiji Nakae and Sunakawa K: Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother*. 2007
- 14) Hanaki H, Hososaka Y, Yanagisawa C, Otsuka Y, Nagasawa Z, Nakae T, and Sunakawa K: Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *J Infect Chemother*. 2007
- 15) 二本柳伸, 小幡 進, 中崎信彦, 平井 誠, 平田泰良, 高山陽子, 大谷慎一, 狩野有作, 赤星 透, 砂川慶介, 井上松久:A 群連鎖球菌集団感染における迅速検出用キットの有用性評価. 感染症誌, 2007
- 16) Sunakawa K, and D J Farrell: Mechanisms, Molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007

・平成22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

※申請している場合は、申請課題名を記載してください。

課題名：重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析，その診断・治療に関する研究(22181401) (研究代表者を研究分担者の生方へ変更)

平成24年度 厚生労働省科学研究費補助金  
課題番号：H19-新興一般-002(研究報告)

## 新規に発生しているレンサ球菌による 劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と 診断・治療法に関する研究

研究代表者：砂川 慶介  
北里大学大学院感染制御科学府 & 北里生命科学研究所

発表代理：同上 研究分担者 生方 公子

## 研究班の目的

- 【背景】・急速な少子・高齢化社会を迎えた我が国では、市中型感染症も変貌しつつある。  
・劇症型あるいは侵襲性β溶血性レンサ球菌例(ISD)、肺炎球菌例(IPD)が増加しつつある。

【目的】本研究班は当該感染症に着目し、基礎と臨床系研究者とが横断的に連携し、次の6項目を3カ年計画で研究する。

### 【解析項目】

- 1) 全国規模の菌株の分子疫学解析と宿主側の要因解析。
- 2) 動物モデルの構築による病態解析、重症化メカニズムの解明。
- 3) 発症例が増加しているSDSEのゲノム解析。
- 4) 迅速診断法ならびに発症予防対策。
- 5) 発症例に対する適切な治療法の確立。
- 6) 啓発活動とガイドライン作成。



SDSE: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*

## 研究分担者一覧

研究分担者	所属
生方 公子	北里大学大学院感染制御科学府 (教授)
渡邊 治雄	国立感染症研究所細菌第一部 (副所長)
池辺 忠義	国立感染症研究所細菌学第一部 (主任研究官)
阿戸 宇	国立感染症研究所免疫部第二室 (室長)
松井 英則	北里大学大学院感染制御科学府 (講師)
秋山 徹	国立国際医療センター 感染症制御研究部 (室長)
大石 和徳	大阪大学微生物研究所 感染症国際研究センター 高病原性感染症研究部門 (特任教授)
吉田 敦	獨協医科大学病院, 臨床検査医学講座 (准教授)
藤島 清太郎	慶應義塾大学医学部救急部 (診療科副部長)
坂田 宏	旭川厚生病院小児科 (主任部長)
岩田 敏	(独)国立病院機構 東京医療センター— 小児科(統括診療部長)

## 【疫学】β溶血性レンサ球菌例(ISD)の臨床的特徴

解析項目	GAS(A群)	SDSE	GBS(B群)
集積症例数 (n)	135	309	183
平均年齢 (y)	60	75	68
死亡率 (%)	16.7	12.7	10.8
後遺症残存率 (%)	26.4	18.0	14.9
	9.7	5.3	4.1
死亡例の在院日数	1	3	7
救命救急受診 (時間外)(%)	26.8	19.3	18.0
基礎疾患 (+)(%)	60.3	78.8	88.2
予後不良と関係する検査値			
WBC: < 5,000/μl (%)	38.9	27.3	10.0
PLT: < 13 × 10 <sup>4</sup> /μl (%)	61.1	66.7	55.6

注: 慶應大学病院のレンサ球菌感染事例では、SIRS基準の白血球数異常を100%満たし、特にSDSEでPLT値異常が多く認められている(研究分担者 藤島)。

**【疫学】 菌の病原因子: Mタンパクと荚膜**

**【Mタンパク】**  
 遺伝子解析data → CDC data baseとmatching  
 欧米と同じ

1) GAS  
 - emm1型が優位(33%)  
 - 死亡率も同型が有意に「欧米と異なる」

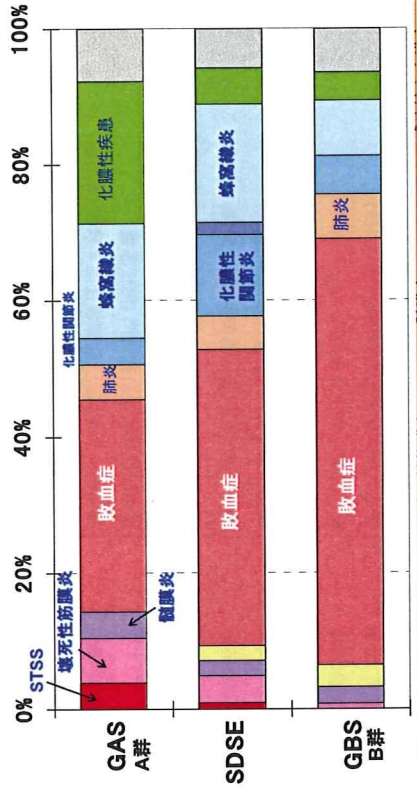
2) SDSE  
 - stG6792型が優位(25%)  
 - 死亡率も同型が有意に高い。

1) GBS  
 - 新生児: III, Ia, Ib型  
 - 成人: Ib, V型

2) 肺炎球菌  
 - 小児: 6B > 19F > 14 > 23F  
 - 成人: 12F > 3 > 14 = 4

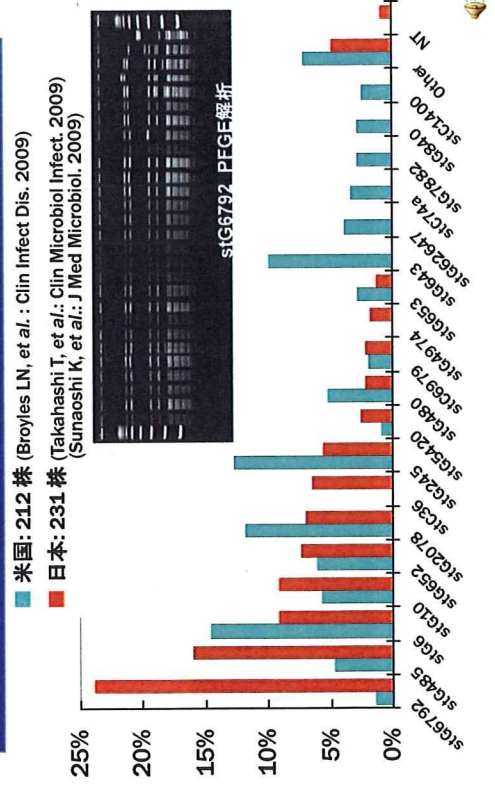
**【英膜】**  
 成人でいずれも欧米と異なる

**【疫学】 3菌種別にみた感染症の特徴**



GASとSDSEによる侵襲性感染症疾患は同じ傾向, GBSとは異なる

**【疫学】 SDSE株のemm型別: 米国との比較**



**【疫学】 示唆に富む将来懸念されるISD疾患**

**【症例-1】SDSEによる産道感染(新生児例: STSS+化膿性髄膜炎)**

呼吸障害  
 血圧低下  
 日齢 0 産後発症

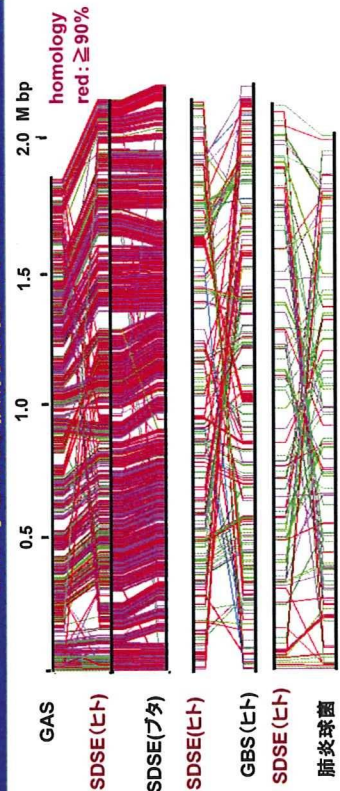
CAZ 11460  
 ABPC 300mg/kg/day 29680  
 IPM/CS 5 0.9  
 GLDM 3.6 46.4

WBC (μl) 980 1160  
 CRP (mg/dl) 10 12  
 PLT(10<sup>4</sup>/μl) 2.5 0.9

**【症例-2】 S. suis による化膿性髄膜炎例: 食肉卸業者**  
 【現病歴】 2週間前, 手掌を小切創 → 素手で仕事をこなう  
 ・嘔吐, 意識混濁, 不穏 → 救急搬送  
 ・WBC: 17,500↑ CRP: 11.4 ↑ 肝・腎は正常  
 ・髄液細胞数: 11,792/μl ↑ タンパク: 557 mg/dL ↑ 糖: <1mg/dL ↓  
 【治療経過】 人工呼吸管理, MEPM+VCM併用 → PCGへ変更  
 【起炎菌】 16S rRNA解析により S. suis と確定

### 【ゲノム解析】ヒトおよびブタ由来SDSE株のゲノム解析

— GAS等との比較(再配置マップ) —



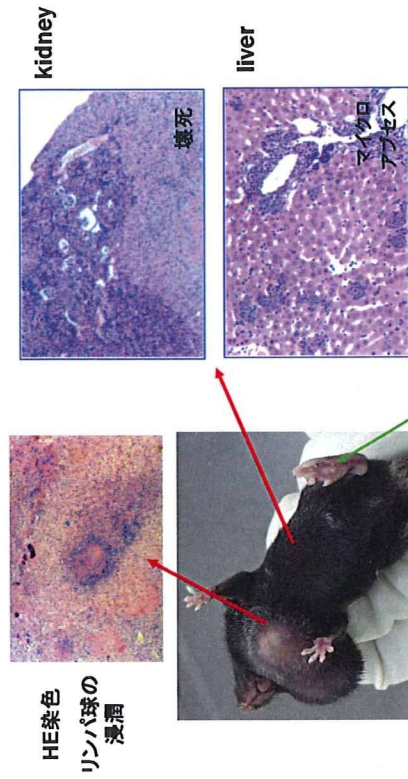
結論: SDSE株同士のhomologyは85%, GASとは61-63%, GBSとは15%,  
肺炎球菌とは9%, S. suis(ブタレンサ球菌)とは9%

研究分担者(国立国際医療センター 秋山 敏) 研究協力者(北里大学 村山 泰明)

### 【ゲノム解析】病原性関連遺伝子の保有状況

GAS(+)		SDSE(+)		GAS(+)		SDSE(-)	
Virulence class	Function	Gene	Function	Virulence class	Function	Gene	
付着因子・免疫回避	1)Fibronectin binding protein 2)Collagen binding protein 3)Laminin binding protein 4)M protein 5)Streptococcal C5a peptidase 6)C3-degrading proteinase 7)Streptokinase A 8)hyaluronidase	fbp lmb emm scpA ska hyl	1)Extracellular matrix-binding protein 2)Hyaluronate synthetase 3)Erythrogenic toxin B/ Cysteine proteinase 4)Inhibitor of complement mediated lysis 5)Collagen-like protein	付着因子・免疫回避	1)Mitogenic Factor MF1, MF2, MF3 2)Erythrogenic toxin I 3)Erythrogenic toxin H 4)Mitogenic exotoxin Z 5)Streptococcal pyrogenic exotoxin type G	epf hasA, hasB speB sic	
毒素プロテアーゼ	1)Streptolysin O 2)Streptolysin S 3)Hemolysin	slo sagA hlyIII, heA1		毒素プロテアーゼ		mif, mif2, mif3 speI speH smez speG	
調節因子	1)M protein transacting positive regulation 2)CovR 3)CovS 4)Regulatory component of protein F	mga covR covS rofa		調節因子		ropB	

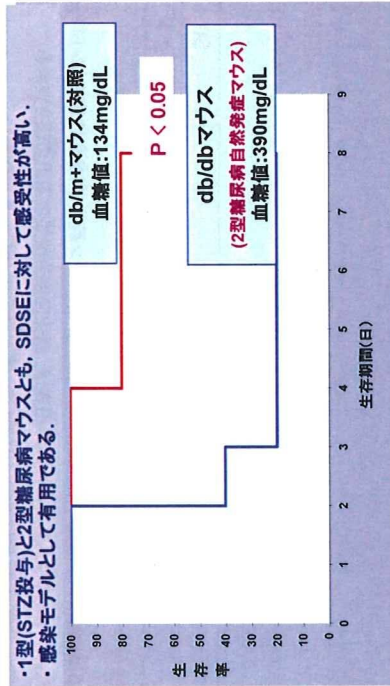
### 【動物モデル】SDSEによる播種性感染症のモデル構築



SDSE #124株を  
10<sup>7</sup>/CFU皮下投与

研究分担者(北里生命科学研究所 松井)

### 【動物モデル】SDSEによる劇症型感染症のモデル構築



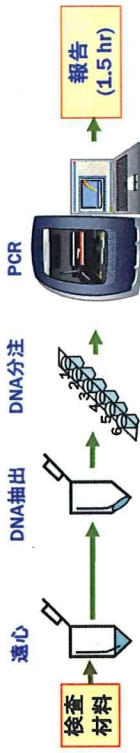
・1型(STZ投与)と2型糖尿病マウスとも、SDSEに対して感受性が高い。  
・感染モデルとして有用である。

2型糖尿病マウス: SDSEによる敗血症時のHost側遺伝子の発現解析  
ヒトの診断に使えそうな炎症関連遺伝子があると思われる。

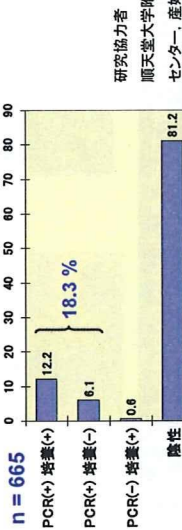
研究分担者(国立国際医療センター 秋山)

## 【迅速診断】Real-time PCRのレンサ球菌検査への応用

【迅速診断】無菌的材料: GAS, SDSE, GBS, 肺炎球菌 → 網羅的検索



### 【予防検査】新生児GBS感染症予防の妊婦保菌検査



## 【治療薬】薬剤耐性菌の増加への対応

抗菌薬	耐性率(%)		
	GAS(A群)	SDSE	GBS(B群) 肺炎球菌(成人)
ペニシリン系薬	-	-	<1
セフェム系薬	-	-	<1
カルバペネム系薬	-	-	-
マクロライド系薬	24	10	15
ニューキノロン系薬	<1	1	27

### 留意すべきこと

- ①β溶血性レンサ球菌: マクロライド系薬とニューキノロン系薬・高度耐性菌のコントロール。
- ②GBS: β-ラクタム系薬耐性菌の出現は、新生児用治療薬の選択の幅を決める。
- ③肺炎球菌: 耐性化はプラトーンに達した、宿主側のコントロールが課題。

## 【啓発活動】学会との共催によるシンポジウム

【学会】日本感染症学会・日本化学療法学会東日本合同学会 (2009年10月30日)

【対象】医師、薬剤師など

【タイトル】再び問題化したある優襲性レンサ球菌感染症

- その社会的背景、基礎、および臨床像 -

【座長】渡邊 治雄(国立感染症研) 生方 公子(北里大学)

【演者】秋山 徹, 生方公子, 阿戸 学, 坂田 宏, 吉田 敦, 大石和徳

【学会参加者(聴講者)】1,500名(400名)

【学会】日本臨床微生物学会 (2010年1月31日)

【対象】細菌検査技師, 医師など

【タイトル】世界的にクローズアップされつつある優襲性レンサ球菌感染症

- その社会的背景から基礎, および臨床まで -

【座長】砂川 慶介(北里大学) 藤島 清太郎(慶應大学)

【演者】生方公子, 村山 諒明, 池辺 忠義, 佐藤 吉社, 藤島 清太郎, 矢越 美智子

【学会参加者】1,500名

## 【自己評価】初期目標6項目に対する達成度

解析項目	到達度(%)	残された課題
1 全国規模での菌株の分子疫学解析と宿主側の要因解析	90% (欧文:4編)	-経年的変化の把握
2 動物モデルの構築による病態解析, 重症化メカニズムの解明	75% (欧文:2編)	-ヒトとブタのSDSEの病態比較
3 発症例が増加しているSDSEのゲノム解析	80% (投稿中)	-DDBJへの登録と詳細解析
4 迅速診断法ならびに発症予防対策	80% (欧文:1編)	-迅速診断法の実習を含めた啓発活動
5 発症例に対する適切な治療法の確立	60%	-補助療法を含めた治療法の確立
6 啓発活動とガイドライン作成 冊子作成(配布済み)とシンポジウム開催	60%	-ガイドラインの作成

## 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 成果概要

研究課題：防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の確立及び予防・治療法の開発に関する研究課題番号：H19-新興-一般-003研究代表者：森川 茂**I. 研究の意義**

- (1) 日本では取扱えない BSL4 のウイルスの代替え法による診断・治療法・予防法の開発を行なう
- (2) 南米出血熱・ニパウイルス脳炎・ハンタウイルス肺症候群・リフトバレー熱等の診断法の整備
- (3) エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱等の診断系の改良と充実
- (4) 新興ウイルス感染症発生時、新種エボラウイルス出現時等に対応可能な遺伝子検出同定法の開発
- (5) 予防・治療に繋がる基礎的研究の充実
- (6)

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 診断体制未整備の輸入ウイルス感染症の診断法の確立
- (2) エボラ出血熱、マールブルグ病、ラッサ熱、クリミア・コンゴ出血熱等の診断系の改良・充実
- (3) 新興感染症、新種のエボラ出血熱発生時のウイルス検出・同定法の開発
- (4) 上記の成果に基づく疑い患者の迅速・正確な診断体制の整備
- (5) 予防・治療法の開発に繋がる基礎的知見の取得
- (6)

**III. 3年間の研究成果**・研究代表者(森川茂)：南米出血熱ウイルスの診断法

- (1) 南米出血熱患者の抗体検出 IgG-ELISA 法の確立
- (2) 南米アレナウイルス抗原検出及び南米アレナウイルス種を鑑別可能な抗原補足 ELISA 法の開発
- (3) 南米アレナウイルスのシュードタイプによる代替えウイルス中和試験法の開発
- (4) サルの致死性ジステンパーウイルス感染症の同定

・研究分担者(甲斐知恵子)：ニパウイルスの診断法とウイルスの弱毒化と応用

- (1) 組換え N, P, M, G 蛋白抗原の抗体の作製と感染細胞の抗原検出
- (2) RT-PCR 法の開発と感染動物検体によるバリデーション
- (3) アクセサリー蛋白遺伝子を欠損した、弱毒化ウイルスを作製

・研究分担者(高田礼人・安田二郎)：エボラウイルスの診断法と抗ウイルス薬の検討

- (1) 高感度なウイルス遺伝子検出 RT-PCR 法、RT-LAMP 法の確立(高田・安田)
- (2) フィロウイルスの表面糖蛋白質の分泌型組換え蛋白を用いた IgG 抗体検出 ELISA 法の開発(高田)
- (3) エボラウイルスの表面糖蛋白質に対する単クローン抗体や C 型レクチンによる感染防御効果(高田)
- (4) フィロウイルス出芽に関わる宿主因子(Tsg101, NEDD4, Vps4)の解明と、ドミナントネガティブ蛋白や si-RNA による出芽抑制効果の確認。Tetherin の粒子産生阻害効果の確認(安田)

・研究分担者(有川二郎)：HPS ウイルス(ハンタウイルス)の診断法と分子疫学

- (1) ネズミ亜科由来、ハタネズミ亜科由来、アメリカネズミ亜科由来ウイルス特異的 RT-PCR の開発
- (2) ハタネズミ由来ハンタウイルス(Puumala と Tula) 感染を鑑別する迅速 ELISA 法の開発
- (3) HPS 原因ウイルスの特異的抗原部位による 5 グループ化と鑑別血清診断法の開発

・研究分担者(林昌宏)：チクングニヤウイルスの診断法と治療法の検討

- (1) 不活化ウイルス抗原を用いた IgM 抗体検出系と中和試験法の確立と輸入症例 13 例の診断
- (2) リアルタイム RT-PCR 法の確立と関係機関へのキットの配布
- (3) チクングニヤ熱輸入症例からのウイルス分離と遺伝子解析

・研究分担者(福士秀悦)：リフトバレーウイルス(RVFL)の診断法

- (1) 組換え NP を抗原とした抗体測定 ELISA の開発
- (2) 抗原捕捉 ELISA 法の開発
- (3) ウイルスの L 遺伝子を標的とするリアルタイム RT-PCR 法の開発と評価

・研究分担者(西條政幸)：クリミア・コンゴ出血熱、サル痘の診断法とワクチン、抗ウイルス薬の検討

- (1) サル痘ウイルスの感染経路別症状の検討とウイルス型による病原性の相違の解明。
- (2) ナイジェリア北部での血清疫学調査によりラッサ、クリミア・コンゴ出血熱、RVF の抗体保有率を解明  
・研究分担者(田口文広)：重症急性呼吸器症候群の発症モデル動物系による発症機構とワクチン、治療法

- (1) LPS 投与後のマウス馴化 SARS-CoV 感染によるマウス SARS モデルの開発
- (2) マウス SARS モデルで、エラストラーゼ、TMPRSS2 の重症化に与えることを解明
- (3) 微弱肺炎マウスで継代した SARS-CoV は、人体内で増殖したウイルスと S 遺伝子の類似性が高く、マウスやハムスターに対する病原性も高いことを確認

・研究分担者(遠藤大二、水谷哲也)：新興ウイルスが出現した場合の迅速なウイルス同定法の開発

- (1) 新規アルゴリズムによる degenerated プライマー設計プログラムを開発し、ラッサウイルスを含む高感度な degenerated プライマーを設計、*in silico* でこれらの多くが新種の Lujo ウイルスにも適用可能であった。
- (2) 本プログラムによるプライマー設計を HP で試験的に公開。
- (3) プライマー非依存性ウイルス遺伝子増幅法の改良と適用。

#### IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 開発したキットをナイジェリアなどの流行地で使用し、知見の収集を行う。
- (2) 宿主域を拡大し人への感染の可能性が強いウイルスや新種の出血熱ウイルス等への対応。
- (3) 豚のエボラウイルス感染症等、これまで想定していなかった宿主動物の実験室診断法の対応

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 1 類感染症や新種のウイルス性出血熱などの感染症疑い患者の迅速・正確な実験室診断
- (2) 新興ウイルス感染症発生時の迅速な病原の同定
- (3) 患者の隔離、二次感染防止対策の有効な実施
- (4) これら重要なウイルス感染症の予防・治療法の開発に寄与

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 (森川 茂)

1. 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. Clin Vaccine Immunol. 16(8):1132-8, 2009
2. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V.: Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. J Med Virol. 80: 2127-33, 2008
3. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 30(5-6):391-8, 2007

研究分担者 (甲斐知恵子)

1. Yoneda M, Fujita K, Sato H, Kai C. Reverse genetics of Nipah virus to probe viral pathogenicity. Methods Mol Biol. 515: 329-37, 2009
2. Terao-Muto Y, Yoneda M, Seki T, Watanabe A, Tsukiyama-Kohara K, Fujita K, Kai C. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. Antiviral Res. 80: 370-6, 2008
3. Fujita, K., Miura, R., Yoneda, M., Shimizu, F., Sato, H., Muto, Y., Endo, Y., Tsukiyama-Kohara, K. and Kai, C. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: involvement heparin-like molecule in CDV infection. Virology, 359, 324-335, 2007.

研究分担者 (高田礼人)

1. Matsuno, K., Kishida, N., Usami, K., Igarashi, M., Shimojima, M., Feldmann, H., Irimura, T., Kawaoka, Y., and Takada, A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. J. Virol. (Under revision)
2. Takada, A., Ebihara, H., Jones, S., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. Vaccine 25:993-999, 2007.
3. Takada, A., Ebihara, H., Feldmann, H., Geisbert, T.W., and Kawaoka, Y. Epitopes required for antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. J. Infect. Dis. 196 Suppl 2:S347-356, 2007.

研究分担者 (安田二郎)

1. Sakuma T, Sakurai A, Yasuda J. Dimerization of tetherin is not essential for its antiviral activity against Lassa and Marburg viruses. PLoS One. 4: e6934, 2009



2. Sakuma T, Noda T, Urata S, Kawaoka Y, Yasuda J. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol*. 83:2382-5, 2009
3. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J.: Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J. Virol*. 81, 4895-4899, 2007
4. Kurosaki, Y., Takada, A., Ebihara, H., Grolla, A., Kamo, N., Feldmann, H., Kawaoka, Y., and Yasuda, J.: Rapid and Simple Detection of Ebola Virus by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Virol. Methods*. 141, 78-83, 2007.

研究分担者 (有川二郎)

1. Truong TT, Yoshimatsu K, Araki K, Lee BH, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong UN, Arikawa J. Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in northern Vietnam. *J Vet Med Sci*. 71: 1357-63, 2009
2. Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, Kang HJ, MocZ G, Arikawa J, Okabe N, Yanagihara R. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16296-301, 2008
3. Taruishi, M., K. Yoshimatsu, R. Hatsuse, M. Okumura, I. Nakamura, and J. Arikawa. Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. *Arch Virol* 153:1605-9, 2008.

研究分担者 (西條政幸)

1. 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*. 90: 2266-71, 2009
2. Saijo M, Morikawa S, Kurane I: Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opinion on Medical Diagnostics* 2:1155-1171, 2008.
3. Saijo M, Georges-Courbot MC, Marianneau P, Romanowski V, Fukushi S, Mizutani T, Georges AJ, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever. *Clin Vaccine Immunol*. 14:1182-9, 2007

研究分担者 (水谷哲也)

1. 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 in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol*. 154 :153-8, 2009
2. 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. *Vet Microbiol*. 134: 227-32, 2009
3. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis*. 14: 347-9, 2008

研究分担者 (遠藤大二)

1. Yoshino T, Nakamura S, Endoh D, Onuma M, Osa Y, Teraoka H, Kuwana T, Asakawa M. Helminthological survey of four families of waterfowl (Ardeidae, Rallidae, Scolopacidae and Phalaropodidae) from Hokkaido, Japan. *J. Yamashina Inst. Ornithol.*, 41: 42-54, 2009.
2. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis*. 14(2):347-9, 2008.

研究分担者 (福士秀悦)

1. Kaku Y, Noguchi A, Marsh GA, McEachern JA, Okutani A, Hotta K, Bazartseren B, Fukushi S, Broder CC, Yamada A, Inoue S, Wang LF. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J Virol Methods*. 160(1-2):7-13, 2009
2. Fukushi S, Watanabe R, Taguchi F. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for analysis of virus entry mediated by SARS coronavirus spike proteins. *Methods Mol Biol*. 454: 331-8, 2008

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

・南米出血熱、ニパ脳炎、フィロ、ハンタ、リフトバレー熱、チクングニア熱の抗体検出系 (ELISA, IF 等の開発)

・南米出血熱、リフトバレー熱の代替え中和試験法の開発

南米出血熱、ニパ脳炎、フィロ、ハンタ、リフトバレー熱、チクングニアウイルスの遺伝子検出系の開発

・南米アレナ、ハタネズミ由来ハンタウイルス感染の鑑別 ELISA の開発

・遺伝的多様性の多いアレナウイルス検出用 **degenerated primer** のデザインアルゴリズムの開発

・アクセサリー遺伝子欠損弱毒ニパウイルスの作製

・フィロウイルス出芽に関する細胞因子の解明

・SARS 発症モデルの重症課機構の解明

・サル痘感染サルの重症化機構の解明

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する病原体診断法の整備と新種ウイルス同定法の開発

防疫上緊急を要するウイルス性出血熱等に対する予防・治療法の開発につながる成果

## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1983-1988 : 国立予防衛生研究所

1989-1991 : 英国 NERC Institute of Virology and Environmental Microbiology

1991-現在 : 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)

1983-1988 : 国立予防衛生研究所 (北村敬) 東大医科学研究所 (速水正憲)

1989-1991 : 英国 NERC Inst. Virology and Environmental Microbiology (David HL Bishop)

1991-現在 : 国立感染症研究所 (倉根一郎) 北海道大学 (有川二郎) 中国 CDC (唐青) 米国 CDC (CJ Peters)

アルゼンチン (V Romanowski) 他

### ・主な研究課題

ウイルス性出血熱の実験室診断と分子疫学に関する研究

天然痘、サル痘の迅速診断法に関する研究

SARS の実験室診断とウイルス学的研究

新興ウイルス感染症の迅速同定法に関する研究

### ・これまでの研究実績

1. 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. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1132-8.
2. 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. *Vet Microbiol.* 2009 Mar 2;134(3-4):227-32.
3. 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.
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, 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
5. Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. *JAMA.* 301(10):1025-33, 2009.
6. 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 in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Arch Virol.* 2009;154(1):153-8.
7. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V. Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol.* 80(12):2127-33, 2008
8. Saijo M, Morikawa S, and Kurane I. : Real-time quantitative polymerase chain reaction for virus infection diagnostics. *Expert Opin. Med. Diagn.* 2(10): 1151-1171, 2008
9. Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F. : Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. *J Virol.* 82(23):11985-91, 2008.
10. Takimoto K, Taharaguchi M, Morikawa S, Ike F, Yamada YK. : Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Exp Anim.* 57(4):357-65, 2008
11. Watanabe S, Mizutani T, Sakai K, Kato K, Tohya Y, Fukushi S, Saijo M, Yoshikawa Y, Kurane I, Morikawa S, Akashi H. : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J Clin Virol.* 43(1):56-9, 2008.
12. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. : Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol.* 172(6):1625-37, 2008.
13. Ami Y, Nagata N, Shirato K, Watanabe R, Iwata N, Nakagaki K, Fukushi S, Saijo M, Morikawa S,

- Taguchi F. : Co-infection of respiratory bacterium with severe acute respiratory syndrome coronavirus induces an exacerbated pneumonia in mice. *Microbiol Immunol.* 52(2):118-27, 2008.
14. Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi N, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. : Isolation of novel adenovirus from fruit bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*). *Emerg Infect Dis.* 14(2):347-9, 2008.
  15. Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Fukushi, S., Yokoyama, M., Harashima, A., Sato, Y., Saijo, M., Morikawa, S., and Sata, T. : Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome in F344 rats infected with SARS coronavirus, *J. Virol.*, 81(4):1848-57, 2007
  16. Yu, F., Le, M.Q., Inoue, S., Hasebe, F., Parquet, M.D., Morikawa, S., and Morita K. : Development of immunoglobulin m capture enzyme-linked immunosorbent assay ststem for severe acute respiratory syndrom coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid proteion as antigen. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(2):146-149, 2007.
  17. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. : *Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP.* *J. Virol.* 81(9):4895-9, 2007.
  18. Saijo, M., George-Corbot, M., Philippe, M., Victor, R., Fukushi, S., Mizutani, T., George, A., Kurata, T., Kurane, I. and Morikawa, S. : *Development of recombinant nucleoprotein-based diagnostic systems for Lassa fever.* *Clin Vaccine Immunol.* 14(9):1182-9, 2007
  19. Ike, F., Bourgade, F., Ohsawa, K., Sato, H., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Takimoto, K., Yamada, Y.K., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura, A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., and Montagnetelli, X. : *LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer.* *Comp. Med.*, 57(3): 272-281, 2007.
  20. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : *Current knowledge on lower virulence of Reston Ebola virus.* *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):391-8, 2007
  21. Morikawa, S., Saijo, M. and Kurane, I. : *Recent progress in molecular biology of Crimean-Congo hemorrhagic fever.* *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30(5-6):375-89, 2007
  22. Fukushi, S., Mizutani, T., Sakai, K., Saijo, M., Taguchi, F., Yokoyama, M., Kurane, I., and Morikawa, S. : *Amino acid substitutions in S2 region enhance SARS-CoV infectivity in rat ACE2-expressing cells.* *J. Virol.* 81(19):10831-4, 2007

・平成 22 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

現在、国内で分離・同定できないウイルス性出血熱等の診断等の対応方法に関する研究(22180601)