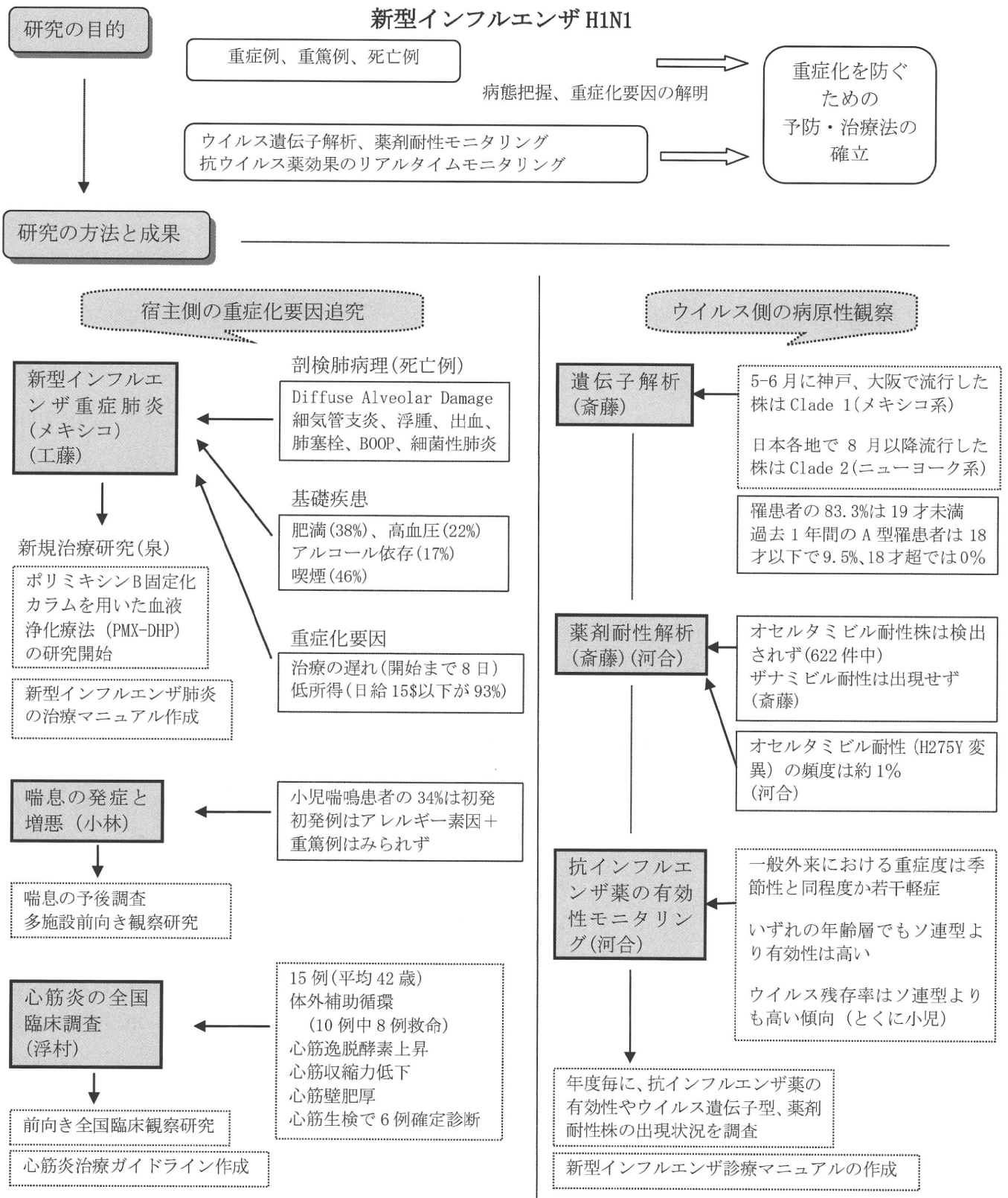


Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

新型インフルエンザ H1N1 の病態把握、重症化の要因の解明に関する研究



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 1983-1984 国立相模原病院リウマチ科
- 1985-1989 東京大学医学部物療内科
- 1989-1993 米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch
- 1994-2010 国立国際医療センター呼吸器科
- 2010- 国立国際医療研究センター病院呼吸器内科（改称）

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 吉澤久嘉（国立相模原病院リウマチ科）
- 宮本昭正（東京大学医学部物療内科）
- Ronald G Crystal（米国 NIH、NHLBI、Pulmonary Branch）
- 工藤宏一郎（国立国際医療センター呼吸器科）
- 慶長直人（国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部）
- 切替照雄（国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部）
- 溝上哲也（国立国際医療センター研究所 国際保健医療研究部）
- 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター）
- 大田 健（帝京大学医学部内科）

・主な研究課題

- Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam.
- 成人喘息の寛解を目指した治療薬の減量・中止に関する研究（研究代表者）
- 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子変異解析研究
- 気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究
- アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析

・これまでの研究実績

1. Goto Y, Hojo M, Takeda Y, Kobayashi N, Kudo K. Gefitinib-induced interstitial lung disease-addition of intravenous cyclophosphamide to corticosteroids is a valuable treatment option: A case report. Med Oncol 27(3):753-755, 2010.
2. Lien LT, Hang NT, Kobayashi N, Yanai H, Toyota E, Sakurada S, Huu Thuong P, Cuong VC, Nanri A, Mizoue T, Matsushita I, Harada N, Higuchi K, Tuan le A, Keicho N. Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Viet Nam. PLoS One. 2009 Aug;4(8):e6798.
3. Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki

- T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection. *J Infect Dis.* 2009 Jun;199(11):1707-15.
4. Suzuki M, Hirano S, Ito H, Matsubara D, Kubota K, Takeda Y, Sugiyama H, Kobayashi N, Kudo K. Pulmonary lymphoma developed during long-term methotrexate therapy for psoriasis. *Respirology.* 2007 Sep; 12(5):774-6.
 5. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 Jul; 11(7):808-13.
 6. Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Nagai H, Kurashima A, Nakata K, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K, Keicho N. Pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms. *Eur Respir J.* 2007 Jul; 30(1):90-6.

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 成果概要

研究課題：新型インフルエンザ等の院内感染制御に関する研究

課題番号 : H22-新興-一般-003

予定期間 : H22 年度から H24 年度まで

研究代表者 : 切替 照雄

所属研究機関 : 独立行政法人国立国際医療研究センター

所属部局 : 研究所 感染症制御研究部

職名 : 部長

年次別研究費(交付決定額) : 1 年目 29,585,000 円

I. 研究の意義

- (1) 平成 17 年厚生省医政局指導課長通知「医療施設における院内感染（病院感染）の防止について」に示されている院内感染防止のための基本的推奨事項を再検討が必要である。
- (2) 最新の消毒と滅菌に関するガイドラインがない。
- (3) 新型インフルエンザ流行では臨床現場への大きな負荷が発生したが、各医療機関における個々の問題点については十分解析されていない。
- (4) 新興・再興感染症の脅威が現実となっている中、感染症危機管理システムの構築が切望されているものの、いまだモデルとなる危機管理システムの構築がなされていない。
- (5) NICU における MRSA 伝播を防止できていない。
- (6) 欧米において大きな問題となっている *Clostridium difficile* 菌株に関して、日本の医療機関においては明らかではなく、高病原性菌株の迅速・簡便に同定する方法もない。
- (7) 中小規模医療施設における院内感染サーベイランスが十分に実施されていない

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 上記通知「医療施設における院内感染の防止について」における基本的推奨事項についての全国調査して補填が必要な項目を抽出し、新たな院内感染防止の指針を作成する。
- (2) 全国調査を基にして、現場で必要な「新版 消毒と滅菌のガイドライン」を発行する。
- (3) 新型インフルエンザ流行期間中の各医療機関レベル（病院、小児科、感染看護管理師）での対応と問題点を明らかにし、新型インフルエンザ対策行動計画やガイドライン策定に貢献する。
- (4) 宮城県・東北地域において、我が国初となる感染症危機管理地域ネットワークモデルの構築を試みる。IT などの利用により、新興・再興感染症に関するリアルタイムな情報の共有化かつ双方向性の情報伝達がなされ、地域医療機関における感染制御の連携・協力を推進する。フォーラムの開催や講習会の共同開催により地域全体の人材育成、感染制御のレベルアップがはかれる。
- (5) NICU における感染対策の実際と感染防止策の手順書を作成する。
- (6) 医療機関での *Clostridium difficile* 流行株を同定し、高病原性菌株の迅速同定法を開発する。
- (7) 中小規模医療施設でできるサーベイランス手法を開発・普及する。

Ⅲ. 1年間の研究成果

本研究事業の成果は、第26回日本環境感染学会総会（2011年2月18日、会長：大久保憲）におけるシンポジウム「新興・再興感染症クライシスで提起された新たな院内感染対策の視点」で研究代表者（切替照雄）及び分担研究者（川名明彦、齋藤昭彦、賀来満夫）によって発表する。

- ・研究代表者（切替照雄）
 - (1) NICU や一般病棟で分子疫学調査、感染対策に関する介入を実施
 - (2) 消毒剤耐性 MRSA の検出法（LAMP 法）を開発
- ・研究分担者（大久保憲）
 - (1) 「院内感染の防止について」の基本的推奨事項を改訂案を作成
 - (2) 「消毒と滅菌のガイドライン」に「薬剤耐性アネトバクター感染症」と「チクングニア熱」など9感染症及び軟性内視鏡の洗浄と消毒の項目などを新たに加えて発行（予定）
- ・研究分担者（賀来満夫）
 - (1) 東北感染制御ネットワークフォーラム開催し、最新情報の共有化した。
 - (1) 宮城県内7か所で病棟ラウンドの実践を含む新たなスタイルの講習会の共同開催をした。
 - (2) ウェブ情報ネットワークシステムを新たに構築し、新型インフルエンザ対策に関する情報取得
 - (3) 英国における2009年新型インフルエンザ感染症のマネージメントに関する情報収集
- ・研究分担者（河野文夫）
 - (1) 全入院患者を対象とする包括的院内感染サーベイランスの有用性を検証
- ・研究分担者（川名明彦）
 - (1) パンデミック（H1N1）2009 流行期間中の施設内感染対策に関する調査を実施、結果を公表
- ・研究分担者（齋藤昭彦）
 - (1) 新型インフルエンザ流行期の小児医療機関における対応に関する調査を実施、結果を公表
- ・研究分担者（加藤はる）
 - (1) *Clostridium difficile* 菌分離に関する参加協力施設を設定、実習を含めた研修講義開催
 - (2) 高病原性株の特異的な表面タンパクを標的とする PCR を構築
- ・研究分担者（西岡みどり）
 - (1) 新生児集中治療室における擦式アルコール製剤使用量と手指衛生遵守状況および微生物伝播の関連に関する調査を年度内に開始
 - (2) 感染管理看護師と病院職員とのリスクコミュニケーションに関する調査研究を年度内に開始

Ⅳ. 23～24年度の課題

- (1) 「院内感染の防止について」で示された基本的推奨事項について全国調査することを掲げていた。平成22年に診療報酬点数上「感染防止対策加算（入院初日100点）」が算定できることになった。新しい算定が医療機関における経済評価にどの程度影響しているかについても調査したいと考え、調査を診療報酬点数の改定後一年経過した平成23年度に実施することとした。
- (2) 感染症危機管理地域ネットワーク構築モデル化についてのさらなる推進（ウェブ情報ネットワークシステムの改善（最新情報の提供、ウェブ会議、ウェブコンサルテーション、市民向けのリスクコミュニケーションシステム、人材育成支援システム、感染症情報フォーラム及び感染症対策研修会の継続的な開催）

- (3) 新型インフルエンザ対策の地域モデルの調査研究。地域感染対策ネットワークのモデルとなっている施設や地域を訪問し、情報の収集に努める。
- (4) 新型インフルエンザ感染対策に関する基礎的・臨床的研究（インフルエンザ肺炎について国内における実態調査、インフルエンザ肺炎の重症度を評価する方法の確立を含める）
- (5) 薬剤耐性菌の感染制御に関する基礎的・臨床的研究
- (6) 参加協力機関より *Clostridium difficile* 感染症例から分離された菌株を収集
- (7) 高病原性 *Clostridium difficile* 株の迅速・簡便な同定法を開発し臨床応用する。
- (8) NICU における感染対策の実際と感染防止策の手順書を作成する
- (9) 調査結果を基に『中小規模の医療施設向けサーベイランス手順書（案）改訂 4 版』を改訂

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 平成 17 年厚生省医政局指導課長通知「医療施設における院内感染（病院感染）の防止について」の改訂を提案する。
- (2) 新興・再興感染症に対する感染症危機管理システム構築の推進がなされることで、地域医療機関における感染制御のレベルアップがなされ、医療の質向上、安心・安全の医療のいっそうの進展に寄与する。
- (3) 研究代表者（切替）と院内感染中央会議の構成員（大久保、賀来）は厚生労働省の院内感染中央会議の構成員であり、分担研究者（川名）は同省新型インフルエンザ対策専門家会議医療部門の委員であるため、本研究で明らかとなった医療現場の問題点はただちに建設的な施策への提言として活用できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 粕田晴之、尾澤芳子、三宅 智、大久保憲. 麻酔器および麻酔器具の清潔度. 麻酔 2010; 59(5): 564-570.
- (2) Arai K, Hirakata Y, Yano H, Kanamori H, Endo S, Hirotani A, Abe Y, Nagasawa M, Kitagawa M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Nishimaki K, Takayama Y, Yamamoto N, Kunishima H, **Kaku M**: Emergence of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan by a point mutation leading to a new amino acid substitution. J Antimicrob Chemother. in press
- (3) Hanaki K, Sekiguchi J, Shimad K, Sato A, Watari H, Kojima T, Miyoshi-Akiyam T, **Kirika T**.: Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Microbiol Methods** (in press)
- (4) M Nishiyama, Y Yoshida, M Sato, M Nishioka, T Kato, T Kanai, T Ishiwata, H Wakamatsu, S Nakagawa, A Kawana, S Nonoyama. Characteristics of paediatric patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) and severe, oxygen-requiring pneumonia in the Tokyo region, 1 September-31 October 2009. Eurosurveillance. 2010. Vol.15(36), p1-8
- (5) **Haru Kato**, Hideaki Kato, Yoichiro Ito, Takayuki Akahane, Sayuri Izumida, Toshiyuki Yokoyama, Chiharu Kaji, Yoshichika Arakawa. Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing *slpA* and application to direct typing. **J Med Microbiol** 59: 556-562. 2010.
- (6) Ogimi C, Tanaka R, **Saitoh A**, Oh-ishi T. Immunogenicity of Influenza Vaccine in Children with Pediatric Rheumatic Diseases Receiving Immunosuppressive Agents. **Pediatr Infect Dis J** (accepted)

(流れ図)

新型インフルエンザを含む院内の感染制御の向上 「全員参加型」院内感染対策の普及および均霑化

全ての医療施設が医療法における院内感染対策に関する 基本全ての義務を円滑に行えるようにする

厚生省健康政策局指導課長通知「医療施設における院内感染(病院感染)の防止
について」に示されている院内感染対策活動の項目のアップデート

指針策定

- ・標準予防策/経路別予防策
- ・手洗いおよび手指消毒
- ・器材の洗浄・消毒・滅菌
- ・感染性廃棄物処理
- ・手術と感染防止
- ・カテーテル感染対策
- ・NICUでの対応

3 院内感染防止に関する 留意事項を再検討

職員研修

委員会設置

- ・環境整備
- ・抗菌薬対策
- ・職業感染防止

・感染制御の組織化

感染症発生報告と 院内感染対策の推進を 目的とした改善

- ・サーベイランスの実施と
アウトブレイクの察知
- ・環境微生物調査
- ・行政への報告

1

全職員参加の院内感染対策に 必要な手法の開発

- ①医療現場で実践可能な手法
- ②中小規模医療施設でできる
サーベイランス手法
- ②感染症病棟等の適切な運用
方法
- ③感染制御手順の改訂

2

全ての医療施設が実施できる 院内感染対策を支援し かつ感染症危機管理も可能な 双方向性の情報発信型の 地域感染症(危機)管理ネット ワークモデルの構築

病院

開業医

開業医

病院協会・医師会
自治体・保健所
ネットワーク協議会

病院

地域住民
学校・会社
消防署など

<ネットワーク例>

←→ 常時連携

←.....→ 必要時連携

- ①情報の共有化
- ②アウトブレイク対策支援
- ③研修/人材育成支援
- ④分子疫学を用いた地域
アンチバイオグラム監視と
伝播リスク評価
- ⑤感染症患者(MRSA等)
トレース
- ⑥在宅感染防止相談
- ⑦感染制御に関する調査・
研究・情報提供
などを行う

○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 57 年	岩手医科大学医学部卒業
昭和 57 年	岩手医科大学医学部大学院（病理系、細菌学）入学
昭和 62 年 4 月	日本学術振興会特別研究員（平成元年 3 月まで）
平成元年 4 月	アレキサンダー・フォン・フンボルト財団奨学研究員（ボルステル研究所、ドイツ）
平成 3 年 9 月	カンザス大学医学部 博士研究員
平成 4 年 10 月	自治医科大学微生物学教室助手、同講師
平成 11 年 6 月	国立国際医療センター研究所部長、現在に至る。

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大学院では、岩手医大の川名林治教授に院内感染制御について指導を受ける。その後、新興・再興感染症 研究事業では「院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発等に関する研究（平成 11-13 年度）」（主任研究者：吉倉 廣）、「同（平成 14-16 年度）」（主任研究者：倉辻忠俊）「医療機関における感染症伝播に関する研究（平成 19-21 年度）」（主任研究者：宮崎久義、平成 21 年より研究代表者）の分担研究者として院内感染対策に関する研究を実施してきた。

・主な研究課題

- (1) 院内感染対策に関する研究：分子疫学と薬剤耐性機序に関する研究
- (2) 薬剤耐性結核の疫学と耐性機序に関する研究

・これまでの研究実績(2005 年以降の英文原著論文)

- 1) Hanaki K, Sekiguchi J, Shimada K, Sato A, Watari H, Kojima T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.: Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of antiseptic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* (in press)
- 2) Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T.: Evaluation of a line probe assay for rapid detection of gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* (in press)
- 3) Miyoshi-Akiyama T, Ishida I, Fukushi M, Yamaguchi K, Matsuoka Y, Ishihara T, Tsukahara M, Hatakeyama S, Itoh N, Morisawa A, Yoshinaka Y, Yamamoto N, Lianfeng Z, Chuan Q, Kirikae T, Sasazuki T: Fully human monoclonal antibody directed to proteolytic cleavage site in SARS coronavirus S protein neutralizes the virus in a Rhesus macaque SARS model. *J Infect Dis* (in press)
- 4) Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Sekiguchi J, Kato S, Mori T, Kirikae T.: Pyrazinamide resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect* 54:1793-1799, 2010
- 5) Miyoshi-Akiyama T, Narahara K, Mori S, Kitajima H, Kase T, Morikawa S, Kirikae T: Development of an immunochromatographic assay specifically detecting pandemic H1N1 (2009) influenza virus. *J Clin Microbiol* 48:703-708, 2010
- 6) Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T.: Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents and Chemother* 54:1793-1799, 2010
- 7) Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tanaka M, Narahara K, Saito N, Kirikae T.: Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of AAC(6)-Ia-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 65:1382-1386, 2010
- 8) Goto M, Shimada K, Sato A, Takahashi E, Fukasawa T, Takahashi T, Ohka S, Taniguchi T, Honda E, Nomoto A, Ogura A, Kirikae T, Hanaki K. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol Methods* 81:247-252, 2010
- 9) 宮崎久義, 切替照雄: 医療施設における感染制御の組織化の現状. 日本医事新報4440: 85-88, 2009
- 10) Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T.: AAC(6)-Iaf, a novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 6:2327-2334. 2009.
- 11) Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Uchiyama T, Yagi J, Kirikae T.: Positive correlation between low adhesion of group A *Streptococcus* to mammalian cells and virulence in a mouse model. *FEMS Microbiol Lett*. 293:107-114, 2009.
- 12) Patrick M.S., Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H.: Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 16345-16350. 2009.
- 13) 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*. 61: 612- 615. 2008.
- 14) Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T.: KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-β-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 52:4194-4197, 2008.

- 15) Xu, H., Sullivan, T.J., Sekiguchi, J., Kirikae, T., Ojima, I., Stratton, C.F., Mao, W., Rock, F.L., Alley, M.R., Johnson, F., Walker, S.G., Tonge, P.J.: Mechanism and inhibition of saFabI, the enoyl reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 47: 4228-4236, 2008.
- 16) Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yasumoto, K., Kusumi, T., Okumura, K., Kirikae, T.: New Sulfoalkylresorcinol from Marine-derived Fungus, *Zygosporium* sp. KNC52. *J. Antibiotics* 61: 192-194, 2008.
- 17) Nishiyama, A., Wakasugi, N., Kirikae, T., Quy, T., Ha, le D., Ban, V.V., Long, H.T., Keicho, N., Sasazuki, T., Kuratsuji, T.: Risk factors for SARS infection within hospitals in Hanoi, Vietnam. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61: 388-390, 2008.
- 18) Hatakeyama, S., Matsuoka, Y., Ueshiba, H., Komatsu, N., Itoh, K., Shichijo, S., Kanai, T., Fukushi, M., Ishida, I., Kirikae, T., Sasazuki, T., Miyoshi-Akiyama, T.: Dissection and identification of regions required to form pseudoparticles by the interaction between the nucleocapsid (N) and membrane (M) proteins of SARS coronavirus. *Virology* 380: 99-108, 2008.
- 19) Sekiguchi, J., Asagi, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kasai, A., Mizuguchi, Y., Araake, M., Fujino, T., Kikuchi, H., Sasaki, S., Watarai, H., Kojima, T., Miki, H., Kanemitsu, K., Kunishima, H., Kikuchi, Y., Kaku, M., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Outbreaks of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45: 979-989, 2007.
- 20) Sekiguchi, J., Miyoshi-Akiyama, T., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Kirikae, F., Toyota, E., Kobayashi, I., Morita, K., Kudo, K., Kato, S., Kuratsuji, T., Mori, T., Kirikae, T.: Detection of multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 45: 179-192, 2007.
- 21) Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Kaseya, R., Fukada, Y., Akimaru, M., Aoyama, K., Okuno, T., Tamura, T., Kirikae, T., 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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 *pnxA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 45:2802-2807, 2007.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Huang, Q., Kirikae, F., Kirikae, T., Pepe, A., Amin, A., Respicio, L., Slayden, R.A., Tonge, P.J., Ojima, I.: Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: noncytotoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J. Med Chem.* 49: 463-466, 2006.
- 29) 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
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Sekiguchi, J., Tharavichitkul, P., Miyoshi-Akiyama, T., Chupia, V., Fujino, T., Araake, M., Irie, A., Morita, K., Kuratsuji, T., 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.
- 37) 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.
- 38) 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.

- 39) 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.
- 40) 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. Trp. Med. Hyg.* 73: 17-25, 2005.
- 41) 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.
- 42) 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.

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

・主な研究課題

・これまでの研究実績

※本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

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 成果概要

研究課題：インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築

課題番号：H22-新興-一般-004

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：石井 健

所属研究機関：独立行政法人 医薬基盤研究所

所属部局：創薬基盤研究部アジュバント開発プロジェクト

職名：プロジェクトリーダー

年次別研究費(交付決定額)：1年目 32,500,000 円

I. 研究の意義

(1) インフルエンザワクチンは作用機序に基づいた有効性、安全性の判断基準となるような理論基盤が非常に脆弱である。

(2) インフルエンザワクチンの作用機序を分子、生体のレベルで解明することは、すなわちワクチンそのものの有効性、安全性の理論基盤になりうる。

(3) 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における判断基準の相違を知る必要がある。

(4) ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果の科学的根拠を示す必要がある。

(5) ワクチンの「真」の有用性を示すため、ヒト検体を用いた臨床研究で証明する必要がある。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 本研究は、多岐にわたるインフルエンザワクチンの種類、投与方法、アジュバントによる免疫原性誘導のメカニズムの相違点や、副反応および副作用と呼ばれる現象の作用機序を解明することにより、より安全で有効性の高いインフルエンザワクチン開発に必須な生物学的、医学的理論基盤を構築することを目的とする。

(2) 関連する世界的な先端研究を推進している免疫学、ワクチン学、感染症学、小児科学専門家がマトリックス状に研究を展開するテーマを核として、他の厚労科研関連研究班や異分野の研究者とも積極的交流を図る。その結果、次世代型インフルエンザワクチン開発研究者クラスターが形成され、新たなワクチン研究のブレイクスルーと効率のよいワクチン開発が期待される。

(3) 本研究で得られた知見や知識を、定例の報告だけでなく、公開討論やワークショップなどを科学者、一般向けに開催して議論を深めるとともに啓蒙を図る。その結果として国民に対し、インフルエンザワクチンによる国の感染対策を「基礎と臨床のエビデンス」に基づいた理論基盤に基づいて提供することが可能になると期待される。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(石井 健)

(1) 各種インフルエンザワクチンの免疫学的機序を生体レベルで証明し、ヒトでの現象との関連性を示した (Koyama S et al Science Translational Medicine 2010, 図1参照)。

(3) 本研究内容の「議論を深め」、「啓蒙を図る」一環として、ワクチンフォーラム2010を開催し、本研究班主催のアジュバントワークショップにてアジュバント開発研究の新展開や審査行政への提言を行い、また、本研究班を中心に「次世代アジュバント研究会」を発足させた。

・研究分担者(神谷齊、中山哲夫、熊谷卓司、石井健)

(1) ワクチン接種後の小児の発熱の疫学的解析を行う目的で先の研究(BK-PIFA/KIB-PIA)の健康小児を対象とした臨床試験(代表研究者 神谷齊)で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン等の検討をするための臨床研究の開始準備が完了した。

(2) 上記のH5N1全粒子ウイルスおよびアラムアジュバントによる小児のみ、かつ1回目免疫のみでの発熱に関し、マウスでの再現実験を行うため新たにマウス体温と行動を計時的に記録する装置を開発した(特許申請準備中)。

・研究分担者(清野 宏)

(1) ナノゲル型デリバリーシステムを用いて、インジュウム標識¹¹¹Inワクチンやアジュバントのマウス鼻腔上皮細胞等への挙動を検討したところ、マウス鼻腔上皮細胞上へのワクチンの保持時間の大幅延長という点で、CTと同様の効果が認められた。

・研究分担者(長谷川秀樹)

(1) 経鼻ワクチン接種において初回免疫と抗原性の異なるワクチン株で追加免疫した場合の免疫応答について検討し、抗原性の異なる不活化全粒子ワクチン接種による免疫履歴がある場合には、全粒子ワクチンの一回経鼻接種で、新規ウイルスの感染を防御する事が明らかとなった。

・研究分担者(迫田 義博)

(1) H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原変異株が、鶏にワクチンを接種している国で出現しているが、現在国内に備蓄されているH5亜型鳥インフルエンザワクチンの発症防御効果が十分でないことを明らかにした。

IV. 23~24年度の課題

<課題1: ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築>

生体、特に経鼻的に免疫した際のワクチンを取り込む細胞はなにか、アジュバントの自然免疫シグナルを伝える細胞がなにかを同定し、また、どのようなエフェクター因子(液性因子、細胞間相互作用を含む)が関与しているか、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。

<課題2: 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築 >

マウスとヒトの鼻腔、口腔のワクチン免疫機能の相違点や上気道、下気道の感染免疫、ワクチン免疫機構の解明を分子生物学的手法、細胞免疫学的手法なども用い行う。具体的には インジュウム標識¹¹¹Inと¹⁸F蛋白PETを併用して、最初にマウスを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験するほか、上記試験系を駆使して、ヒトに近いサルを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験する。

<課題3: ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用>

H5N1のワクチンにおいてCladeの異なるワクチンの接種順序により交叉防御能が変わるかどうかといった問題に対し、マウスを用いた実験系で接種順序による交叉防御能の違いを皮下接種及び経鼻接種を比較する事により検討を行う。

<課題4: ワクチンアジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索>

H5N1のワクチンの小児臨床試験で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン、miRNA等の解析を開始する。

<課題5: ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究>

種々のH5N1ワクチンの形態（全粒子不活化、全粒子不活化+アルミアジュバント、スプリット、その他）を作製し各年齢層のヒト末梢リンパ球を培養しワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインを網羅的に解析する。

V. 行政施策への貢献の可能性

本研究の期待される成果として、ワクチン臨床試験、審査、行政を含めたインフルエンザ感染対策の判断に「基礎と臨床のエビデンス」に基づいた理論基盤を提供することが可能になると期待される。

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（石井 健）

1. ○Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, **Ishii KJ**. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra24.
2. Coban C, **Ishii KJ**, Akira S. Immune interventions of human diseases through toll-like receptors. *Adv Exp Med Biol*. 2009;655:63-80.
3. ○Koyama S, Coban C, Aoshi T, Horii T, Akira S, **Ishii KJ**. Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2009 Aug;8(8):1099-107.
1. ○青枝大貴、**石井健**。ワクチンを考えるうえで必要な免疫の知識。臨床検査(2010) 54(11):1220-1229.
2. ○小檜山康司、**石井健**。DNA センサーとその生理的意義。細胞工学(2010) 29(10):1004-1013.
3. ○小山正平、**石井健**。ワクチンアジュバントの必要性と安全性。医学のあゆみ(2010) 234(3):217-221.
4. ○小檜山康司、**石井健**。自然免疫とワクチン開発。医学のあゆみ(2010) 234(5):608-614.
5. ○小檜山康司、**石井健**。新しいワクチン開発 アジュバントに関する最新の話。臨床と微生物(2010)37(3):187-194.
6. ○小山正平、貫和敏博、**石井健**。インフルエンザウイルスワクチンの考え方と自然免疫。分子呼吸器病(2010)14(1):42-45.

【著書】 Koyama,S. Akira,S. **Ishii,KJ**.“Extracellular Nucleic Acids” edited by Kikuchi and Ryokova *Springer* , 2010

分担研究者（中山哲夫）

1. ○Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, **Nakayama T**. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. *J Med Virol* 2009; 81: 1094-1101.
2. ○Nakamura A, Sakano T, **Nakayama T**, Shimoda H, Okada Y, Hanayama R, Nomoto K, Suto T, Kinoshita Y, Furue T, Ono H, Ohta T. Neonatal pertussis presenting as acute bronchitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* using loop-mediated isothermal amplification. *Europ J Ped* 2009; 168(3) 347-349.
3. ○Sakata M, Komase K, **Nakayama T**. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 2009; 27: 234-242
4. ○Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, **Nakayama T**. Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation. *Vaccine* 2008; 26: 9859-9863
5. ○Yoshida N, Fujino M, Miyata A, Nagai T, Kamada M, Sakiyama H, Ihara T, Kumagai T, Okafuji T, **Nakayama T**. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Med Virol* 2008; 80: 517-523

研究分担者（清野 宏）

1. Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, **Kiyono H**. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater*. 2010 9:572-8.
2. Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, **Kiyono H**. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 107:8794-9.
3. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, **Kiyono H**, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda SI

Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus...*J Virol.* 2010 84(24):12703-12.

- Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiya Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y, **Kiyono H**. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 20;107:7419-24.

研究分担者 (長谷川 秀樹)

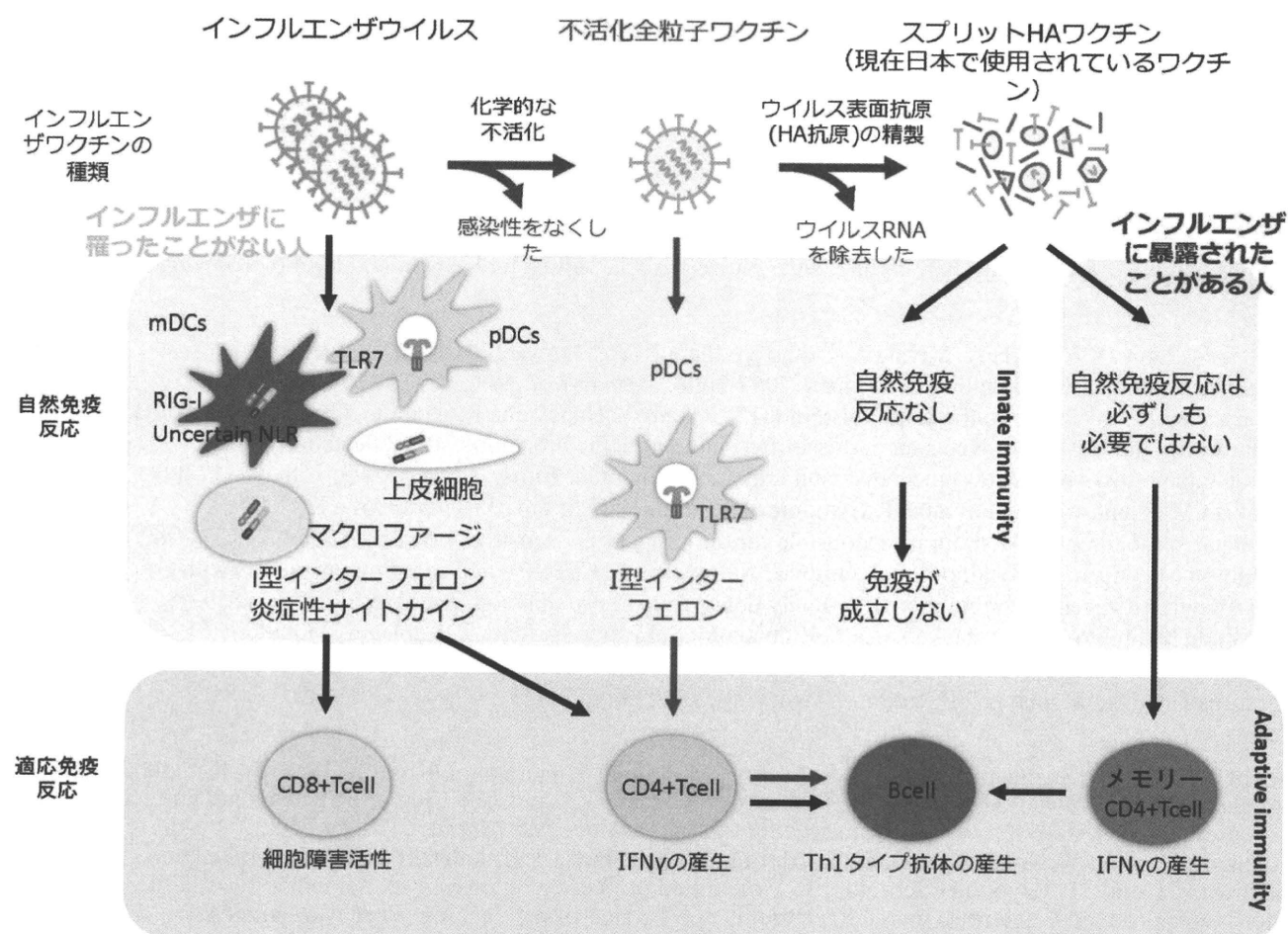
- Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, **Hasegawa H** Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus *Journal of Medical Virology*, 2010 Oct;82(10):1754-61

研究分担者 (迫田 義博)

- Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, **Sakoda Y**, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T, Kida H. Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes*, 41. 351-357. 2010
- Sakoda Y**, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R, Kida H. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology*, 406. 88-94. 2010

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

図1. インフルエンザワクチンの免疫学的機序の解明：研究代表者 石井健



●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

平成 8-12 年 米国連邦政府保健省食品薬品局 (FDA) 生物製剤ワクチン部門
 平成 12-15 年 米国連邦政府保健省食品薬品局 (FDA) 生物製剤ワクチン部門
 平成 15-20 年 科学技術振興機構 ERATO 審良自然免疫プロジェクト (大阪大学微生物病研究所)
 平成 18-22 年 大阪大学微生物病研究所難治感染症対策研究センター 分子原虫学分野
 平成 19-22 年 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 自然免疫学
 平成 22 年-現在 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター・主任研究者 (招へい教授)
 平成 22 年-現在 (独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト・リーダー

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 拠点長 審良静男教授
 大阪大学微生物病研究所難治感染症対策研究センター 堀井俊宏教授
 大阪大学蛋白質研究所 教授 中川敦史教授

・主な研究課題

- 1) 文部科学省・科研費・基盤B ワクチントラフィックとシグナル伝達 (代表) H21-23
- 2) 文部科学省・地域科学技術振興施策・知的クラスター創成事業
ワクチン臨床開発へ向けた基盤組織の構築 (分担) H19-23
- 3) 文部科学省・ターゲットタンパク研究プログラム・課題A
「自然免疫システムにおける病原体認識に関わる分子群の構造解析」(代表) H19-23
- 4) 科学技術振興機構・戦略的創造研究事業・CREST・研究領域「ナノ界面技術の基盤構築」
「DDS 粒子のナノ界面と鳥インフルエンザワクチン等への応用」(分担) H21-26

・これまでの研究実績

【原著論文】

1. Kobiyama K, Jounai N, Ishii KJ, Horii T, Suzuki K, Ryo A, Takeshita F. Modulation of Intracellular Signaling Using Protein-Transduction Technology. *Crit Rev Immunol*. 2010;30(5):395-421.
2. Yamaguchi T, Kawabata K, Kouyama E, Ishii KJ, Katayama K, Suzuki T, Kurachi S, Sakurai F, Akira S, Mizuguchi H. Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5;107(40):17286-91. Epub 2010 Sep 20.
3. Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. TLR9 and endogenous adjuvants of the whole blood-stage malaria vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Jul;9(7):775-84.
4. Horii T, Shirai H, Jie L, Ishii KJ, Palacpac NQ, Tougan T, Hato M, Ohta N, Bobogare A, Arakaki N, Matsumoto Y, Namazue J, Ishikawa T, Ueda S, Takahashi M. Evidences of protection against blood-stage infection of Plasmodium falciparum by the novel protein vaccine SE36. *Parasitol Int*. 2010 Sep;59(3):380-6. Epub 2010 May 20.
5. ○Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med*. 2010 Mar 31;2(25):25ra24.

6. Coban C, Yagi M, Ohata K, Igari Y, Tsukui T, Horii T, **Ishii KJ**, Akira S. The malarial metabolite hemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. *Allergol Int.* 2010 Jun;59(2):115-24. Epub 2010 Apr 24.
7. Coban C, Igari Y, Yagi M, Reimer T, Koyama S, Aoshi T, Ohata K, Tsukui T, Takeshita F, Sakurai K, Ikegami T, Nakagawa A, Horii T, Nuñez G, **Ishii KJ**, Akira S. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against Plasmodium falciparum involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe.* 2010 Jan 21;7(1):50-61.
8. Coban C, **Ishii KJ**, Akira S. *Immune interventions of human diseases through toll-like receptors.* *Adv Exp Med Biol.* 2009;655:63-80.
9. Reimer T, Shaw MH, Franchi L, Coban C, **Ishii KJ**, Akira S, Horii T, Rodriguez A, Nuñez G. Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):764-9.
10. Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, **Ishii KJ**, Kawai T, Sasaki S, Hirano H, Ishii N, Okuda K, Suzuki K. Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol.* 2010 Jan;84(2):822-32. Epub 2009 Nov 11.
11. McWhirter SM, Barbalat R, Monroe KM, Fontana MF, Hyodo M, Joncker NT, **Ishii KJ**, Akira S, Colonna M, Chen ZJ, Fitzgerald KA, Hayakawa Y, Vance RE. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med.* 2009 Aug 31;206(9):1899-911. Epub 2009 Aug 3.
12. Koyama S, Coban C, Aoshi T, Horii T, Akira S, **Ishii KJ**. *Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity.* *Expert Rev Vaccines.* 2009 Aug;8(8):1099-107.
13. Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, **Ishii KJ**, Kawai T, Akira S, Matsuura Y. Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner. *J Virol.* 2009 Aug;83(15):7629-40. Epub 2009 May 27.
14. Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, **Ishii KJ**, Kataoka K, Oishi K. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine.* 2009 May 21;27(24):3181-8. Epub 2009 Apr 8.
15. Kobiyama K, Takeshita F, **Ishii KJ**, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1593-601.
16. Ishii, KJ., Akira, S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. *Curr. Opin. Immunol.* (2008) 20(5):524-529.
17. Ishii, KJ., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., Akira, S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe.* (2008) 3(6):352-363.
18. Uematsu, S.,(他 11 名), Ishii, KJ., Akira, S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by LPDCs expressing TLR5. *Nat. Immunol.* (2008) 9(7):769-776.
19. Ishii, KJ.,(他 9 名), Akira, S. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* (2008) 451(7179):725-729.

【総説】

1. 青枝大貴、石井健。ワクチンを考えるうえで必要な免疫の知識。臨床検査 (2010) 54(11):1220-1229.
2. 小檜山康司、石井健。DNA センサーとその生理的意義。細胞工学 (2010) 29(10):1004-1013.
3. 小山正平、石井健。ワクチンアジュバントの必要性和安全性。医学のあゆみ (2010) 234(3):217-221.
4. 小檜山康司、石井健。自然免疫とワクチン開発。医学のあゆみ (2010) 234(5):608-614.
5. 小檜山康司、石井健。新しいワクチン開発 アジュバントに関する最新の話。臨床と微生物

(2010)37(3):187-194.

6. 小山正平、貫和敏博、石井健。インフルエンザウイルスワクチンの考え方と自然免疫。分子呼吸器病(2010)14(1):42-45.

7. 小山正平、河越龍方、審良静男、石井健。DNA ワクチンの作用機序。蛋白質・核酸・酵素(2009)54(8):1096-1100.

8. 青枝大貴、石井健。DNA ワクチンの基礎と作用機序。ファルマシア(2009)45(6):531-535.

9. 小山正平、石井健。核酸による免疫制御を活用したワクチン開発。化学療法の領域(2009)25(6):1362-1368.

10. 小山正平、審良静男、石井健。細胞内 DNA 受容体。Medical Science Digest(2009)35(1):2-4.

11. 小山正平、審良静男、石井健。ウイルス感染防御における TLR と RLR の役割。臨床免疫・アレルギー科(2008)50(6):715-720.

12. 青枝大貴、小山正平、チョバン・ジェヴァイア、石井健。DNA ワクチンのあらたな免疫学的作用機序。医学のあゆみ(2008)227(5):387-392.

13. 小山正平、石井健、審良静男。ワクチンとアジュバント。インフルエンザ(2008)9(4):283-291.

14. 小山正平、ジェバイア・チョバン、審良静男、堀井俊宏、石井健。ウイルスワクチン用のアジュバント。Virus Report(2008)5(1):74-81.

15. 小山正平、審良静男、石井健。核酸による自然免疫制御とワクチン開発。小児感染免疫(2008)20(1):33-41.

【著書】

1. Koyama, S., Akira, S., Ishii, K.J. "Extracellular Nucleic Acids" edited by Kikuchi and Ryokova Springer 2010

2. Ishii, K.J., Akira, S. "Nucleic Acids in Innate Immunity" Editor in chief. CRC press, 2008

3. Ishii, K.J., Koyama, S., Akira, S. "Overview: Innate immune response to nucleic acids." Immune response to gene therapy, edited by Roland Herzog, Willey Publisher, 2008

4. Ishii, K.J., Akira, S. "Innate Immunity" Clinical Immunology 3rd Ed. Edited by Rich, Shearer, Fleisher, Schroeder, Weyand, Flew. 2008

【特許権等知的財産権の取得及び申請状況】

1) 「免疫活性を有する DNA の同定」(国際特許 W00015768)

2) 「ヒト型 CpG DNA の同定」(国際特許 W00151500)

3) 「CpG DNA 輸送リポソームの開発」(国際特許 W003040308)

4) 特許の名称: 「新規アジュバント」出願番号: PCT/JP2008/69919 (特願 2007-285737) 出願人: 国立大学法人大阪大学、日本全薬工業 発明者: 審良静男、石井 健、チョバン ジェヴァイア、津久井利広

5) 特許の名称: 「Zc3ch12 機能抑制物質および自然免疫賦活剤を用いた新規アジュバント」出願番号: 特願 2009-46990 出願人: 国立大学法人大阪大学、 発明者: 審良静男、竹内理、松下一史、石井 健

6) 特許の名称: 「新規マラリアワクチン及びアジュバント」出願番号: 特願 2009-111967 出願人: 国立大学法人大阪大学 発明者: 堀井俊宏; 石井健; 東岸任弘

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 成果概要

研究課題：地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究

課題番号：H22-新興-一般-005

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：小田切 孝人

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：インフルエンザウイルス研究センター

職名：室長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 24,500,000 円

I. 研究の意義：

2009年4月に米国・メキシコを起点として新型A/H1N1インフルエンザが発生し、瞬く間に世界的大流行となった。本ウイルスは、当初警戒されていた高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスとは異なるブタ由来の低病原性ウイルスであったことから、これまで事前準備を最高レベルで進めてきた警戒態勢が一気に緩み、高病原性ウイルスや重篤な変異株の出現、それによる大流行への警戒感が薄れ始めている。エジプトや東南アジア諸国では、高病原性H5N1ウイルスのヒトへの感染は依然として続いており、これとの遺伝子再集合で高病原性新型A/H1N1ウイルスへ変化する可能性は否定できない。さらに、オセルタミビル、ペラミビル耐性の新型A/H1N1ウイルスが散発的に検出されており、耐性株や高病原性変異株の発生状況は、国家レベルで継続監視が必要である。このため、地方自治体と連携したより効率的な検出系の研究開発およびサーベイランスの実施が必要である。一方、適切なワクチン株の検索には、ウイルス抗原性の変化を遺伝子構造変化から捉える解析モデルの開発、さらには変化予測できる解析系の構築が必要となる。また、ワクチン接種後に獲得される抗体と流行株との交叉反応性からワクチン効果の評価も継続的に進める必要がある。本研究事業では、これらの課題に取り組む。

II. 研究の目的：

本研究では、全国地方衛生研究所(地研)感染症部会と連携し、1)各地方ブロックのコア地研を基軸とした研究開発グループの構築およびサーベイランス連携網の強化を行ない、ハイリスク変異株を迅速に捉える全国的株サーベイランス体制を作る。2)ハイリスク変異株を確実に捉える検査系の構築と改訂を進め、その流行拡大時には、速やかに全国一斉に検査が開始できる準備をする。3)ハイリスク変異株の遺伝子、蛋白構造レベルおよび実験動物等によるリスク評価などの基礎研究により、より適切なワクチン株の選定と供給を実現する。4)新型およびハイリスク変異株に対する国民の抗体保有状況を把握し、流行状況およびワクチンの有効性を的確に評価する。

期待される成果：

本研究班には、全国地研協議会感染症部会長が参画しており、地方ブロックごとのコア地研の連携網を構築でき、地方レベルでも高精度で簡便な検査ができる系を共同開発し、サーベイランスへ応用する。これによって、ハイリスク変異株や薬剤耐性株をタイムリーに捉える全国的な株サーベイランスの実施が期待できる。一方、ワクチン接種前後のヒト血清抗体を調べることで、新型インフルエンザやハイリスク変異株等の流行状況を的確に把握でき、今後の感染リスクやワクチン効果の評価およびワクチン株の適正な選択に重要な情報提供が期待できる。

Ⅲ. 1年間の研究成果：

・ 研究代表者

● 小田切孝人（研究統括）

(1) 全国6地方ブロック代表のコア地衛研6ヶ所およびそれらを補佐するサポート地衛研5ヶ所からなる、研究開発チーム（コア地衛研）の結成完了。

(2) コア地衛研との共同研究でPCR法による薬剤耐性株検出系の評価の実施と全国地衛研への技術移転、試薬の配布完了。

・ 研究分担者

● 皆川洋子（地方衛生研究所連携網の構築とそれを駆使した薬剤耐性株、変異株の早期検出）

(1) 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制整備。全国のブロックごとのコア地衛研、さらにインフルエンザ研究を長年実施している若しくは地域の特徴を有するサポート地衛研を研究協力者として、感染研との迅速な連携体制の導入をはかった。

(2) オセルタミビル耐性サーベイランス体制の構築。感染研が開発中のリアルタイム RT-PCR で耐性変異(H275Y)検出システムを、上記コア及びサポート地衛研とともに実地検証を行った。これをブロックごとにコア地衛研を中心として他地衛研へ普及させた。

● 藤田信之（遺伝子解析によるウイルス変異検出・進化系統樹解析）

感染研で収集したウイルス株のHA遺伝子（188株）、NA遺伝子（96株）塩基配列を決定し進化系統樹解析を実施した。これらを遺伝子データベースへ登録した。

● 佐藤裕徳（ウイルス蛋白の機能的構造変化解析系の構築と変化予測）

(1) A/H3N2 HA蛋白質の変異による構造と性質変化の研究。ワクチン原株と孵化鶏卵培養ワクチン株との抗原性の変化をHAの配列と構造の解析情報を基に推察した。

(2) *in silico*構造解析により、H3N2のHAの結晶構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により原株とワクチン株のHAの分子モデルを構築した。(1)で見出された変異は、感染受容体結合部位であった。

(3) B-HA蛋白質の変異による構造と性質変化の研究。BのHAの結晶構造情報を基に、ホモロジーモデリング法により原株とワクチン株のHAの分子モデルを構築した。変異によるアミノ酸主鎖の構造変化は認められなかったが、糖鎖の有無による構造変化を明らかにした。

● 齋藤玲子（新型インフルエンザ流行株に対するヒト血清抗体の保有解析と流行把握）

(1) 新型インフルエンザH1N1pdm血清疫学調査とワクチン抗体価の評価研究。一般病院の医療従事者約400名、高齢者施設の医療従事者100名、高齢者施設の入所者100名の季節性インフルエンザワクチン接種前後の血清を確保した。

(2) 昨年度からの抗体価の推移、年齢別の抗体保有率など、より詳細な血清疫学解析を、もう1施設の結果とあわせて行った。

● 影山 努（新型インフルエンザ変異株、高病原性株診断検査系構築と改良）

(1) 新型インフルエンザ変異株、高病原性株診断検査系構築と改良の研究。TaqManプローブを用いたRT-PCR法による2009年新型インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性株検出系の構築に成功した。この検出系では核酸のシーケンス解析法などと比べると、より簡便かつ正確にこれらの検出が可能であった。分離したウイルスより核酸抽出が不要で一度に大量のウイルス株解析が可能。

● 高下恵美（新型インフルエンザ変異株のin vitro、in vivoでのリスク評価）