

(1) 薬剤耐性株のリスク評価研究。2009年4月下旬の新型インフルエンザA/H1N1pdmの発生以来、日本国内においては76株の抗インフルエンザ薬耐性株が検出されており、検出率は1.1%であった。

(2) ハイリスク変異株のリスク評価研究。A/H1N1pdm 国内分離株について、ワクチン株 A/California/7/2009 抗血清に対する 8 倍以上の抗原変異株は現在までに 4 株検出され、検出率は 0.4%であった。抗原変異株の出現はいずれも散発的で、2010 年に入ってから 1 株も検出されておらず、これらの抗原変異株が増える傾向は見られていない。

#### IV. 23~24 年度の課題

(1) 改良型 PCR による薬剤耐性株検出サーベイランスの実施。耐性株のリスク評価研究。評価法の検討。耐性株検出系のさらなる改良。

(2) 遺伝子構造変化から変異株出現機序の解析。変化予測モデルの構築とワクチン株選定への応用。

(3) ワクチン接種前後の抗体測定と新型インフルエンザ感染リスク評価、およびワクチンの交叉反応性の評価。

#### V. 行政施策への貢献の可能性：

本研究では、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衛研を参画させたサーベイランスに有用な技術開発研究グループが結成され、より強固な地衛研との連携網が完成した。これは、新型インフルエンザおよび季節性インフルエンザ株サーベイランスへの長期的な対応課題に即応しており、厚生労働行政に直結している。

- 1) パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施要綱 (2009/10 シーズン)、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス N1NA 遺伝子解析実験プロトコール(2009年7月 ver)
- 2) パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施要綱 (2010/11 シーズン)、H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法 実験プロトコール (2010年11月 ver.1)

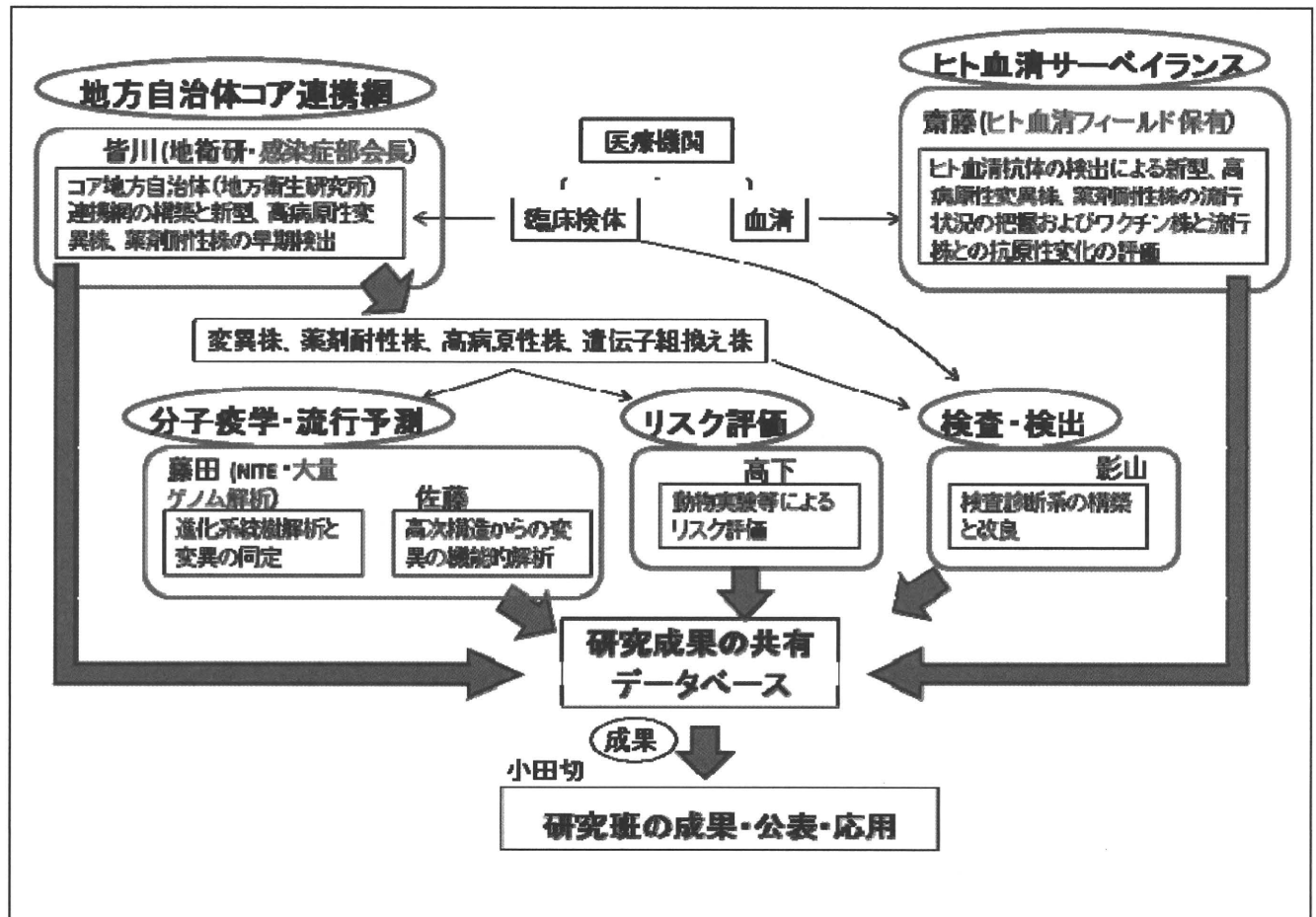
#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- Makoto Ujike, Kozue Shimabukuro, Kiku Mochizuki, Masatsugu Obuchi, Tsutomu Kageyama, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Working Group for Infl uenza Virus Surveillance in Japan Oseltamivir-Resistant Infl uenza Viruses A (H1N1) during 2007–2009 Infl uenza Seasons, Japan Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 6, 926-935, 2010
- Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. Virol J. 2010 Mar 5;7(1):53
- Teiichiro Shiino, Nobuhiko Okabe, Yoshinori Yasui, Tomimasa Sunagawa, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Hong Xu, Emi Takashita, Akane Anraku, Reiko Ito, Teruko Doi, Miho Ejima, Hiromi Sugawara, Hiroshi Horikawa, Shuji Yamazaki, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruo Watanabe. Molecular Evolutionary Analysis of the Influenza A(H1N1)pdm, May–September, 2009: Temporal and Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan. PLoS ONE volume 5 | Issue 6 | e11057-e11067, 2010

**Ⅶ. III (1年間の研究成果)の概要図等**

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

研究代表者および研究分担者の役割とそれに応じた今年度の成果の概要



## ●研究代表者の研究歴等

### ・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**
- ・昭和52年～59年 東北大学医学部細菌学教室 (石田名香雄 教授)
  - 鳥およびブタインフルエンザウイルスの生態学的研究
- ・昭和54年～56年 米国ミシガン大学公衆衛生学部疫学教室 (Prof. Dr H.F. Maassab)
  - 弱毒化インフルエンザ経鼻ワクチンの研究開発、病原性の遺伝学的研究
- ・昭和59年 学位(医学博士)取得。
- ・昭和60年～平成10年 自治医科大学医学部ウイルス学教室 (飛田清毅 教授)
  - インフルエンザ弱毒ワクチンの研究開発、インフルエンザウイルス増殖機構の研究
- ・平成10年～12年 金沢医科大学医学部微生物学教室 (大原義朗 教授)
  - インフルエンザウイルス粒子形成機構の研究
- ・平成12年～21年 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 (倉根一郎部長、田代真人部長)
  - インフルエンザ株サーベイランス、インフルエンザ診断系開発・分子疫学、
  - 新型ワクチン株開発研究、ワクチン品質管理
- ・平成21年国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第1室 (田代真人部長)
  - インフルエンザ株サーベイランス、分子疫学、インフルエンザ診断系開発

### ・これまでの研究実績

1. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 2010 Jan;82(1):128-37.
2. Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, Grohmann G, Hay A, Kelso A, Klimov A, Odagiri T, Smith D, Russell C, Tashiro M, Webby R, Wood J, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009-2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine.* 2010 Feb 3;28(5):1156-67. Epub 2009 Dec 9.
3. *Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M. A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. Virol J. 2010 Mar 5;7(1):53*
4. *Makoto Ujike, Kozue Shimabukuro, Kiku Mochizuki, Masatsugu Obuchi, Tsutomu Kageyama, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A (H1N1) during 2007–2009 Influenza Seasons, Japan Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 16, No. 6, 926-935, 2010*
5. Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiyama S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K. Immunogenicity of an inactivated adjuvanted

whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. *Microbiol Immunol.* 2010 Feb;54(2):81-8.

6. ***Teiichiro Shiino, Nobuhiko Okabe, Yoshinori Yasui, Tomimasa Sunagawa, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Hong Xu, Emi Takashita, Akane Anraku, Reiko Ito, Teruko Doi, Miho Ejima, Hiromi Sugawara, Hiroshi Horikawa, Shuji Yamazaki, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruo Watanabe.***  
***Molecular Evolutionary Analysis of the Influenza A (H1N1) pdm, May–September, 2009: Temporal and Spatial Spreading Profile of the Viruses in Japan. PLoS ONE Volume 5 / Issue 6 / e11057-e11067, 2010***
7. Ikeno D., Kimachi K., Kudo Y., Goto S., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M., Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 27, 3121-3125 (2009)
8. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama JI, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura SI, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82(1):128-137, 2009
9. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 199(11):1629-37, 2009 .
10. ***Kawakami C, Obuchi M, Saikusa M, Noguchi Y, Ujike M, Odagiri T, Iwata M, Toyozawa T, Tashiro M. Isolation of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus of different origins in Yokohama City, Japan, during the 2007-2008 influenza season. Jpn J Infect Dis. 62(1):83-6, 2009***
11. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Prophylactic effects of chitin microparticles on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-9, 2007.
12. Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri. Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. *J. Virol.* 82, 728-739, 2008
13. H Kamijuku, Y Nagata, X Jiang, T Ichinohe, T Tashiro, K Mori, M Taniguchi, K Hase, H Ohno, T Shimaoka, S Yonehara, T Odagiri, M Tashiro, T Sata, H Hasegawa and K-iSeino. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 1, 208–218 (2008).
14. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ. The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science.* 18:320(5874):340-6, 2008
15. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kielso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RA, Smith DJ. Influenza vaccine strain selection and recent

studies on the global migration of seasonal influenza viruses. **Vaccine** 26 Suppl 4:D31-4. Review. 2008

16. Keiichi Makizumi, Kazuhiko Kimachi, Katsuhiko Fukada, Tomohiro Nishimura, Yasuhiro Kudo, Shuro Goto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoichiro Kino Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003–2004 epidemic strain may have been possible using Madin–Darby canine kidney cells. **Vaccine**, 26, 6852-6858, 2008
17. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. **Mucosal Immunol.** 1(3):208-18, 2008

上記を含むその他の研究実績（英文原著論文 67編、和文原著論文 4編）

## 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：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する研究

課題番号：H22-新興-一般-006

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：森川 茂

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第一部

職名：第一室 室長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 40,000,000 円

### I. 研究の意義

- (1) 診断法の開発・改良と疫学的解析
  - 1) 新種の出血熱ウイルスの診断法の整備
  - 2) 新興ポックスウイルス、食虫目ハンタウイルス等の国内の動物の感染の実態解明
  - 3) 変異ウイルス・新種ウイルス・新興ウイルスに対応可能な遺伝子検出法の改良
- (2) 宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明とリスク評価
  - 1) モルビリウイルス (CDV) のサルへの宿主域拡大の分子機構の解明
  - 2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明
  - 3) 出血熱ウイルス等の粒子形成・出芽機構の解析とその阻害法開発の基礎研究

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新種のエボラ、アレナウイルス感染症の血清診断法、病原診断法の確立・改良
- (2) 変異ウイルス・新種ウイルス・新興ウイルス発生時の迅速な対応が可能
- (3) 宿主域拡大・病原性獲得機構の解析から、ヒトへの感染拡大のリスク評価

### III. 1 年間の研究成果

・研究代表者：新種アレナウイルス性出血熱の診断法、モルビリウイルス、ポックスウイルスの宿主域拡大の解析

- (1) 新種アレナウイルス (ルジヨ) の血清・病原診断法の開発
- (2) モルビリウイルス (CDV) のサルへの宿主域拡大とレセプター結合能の解析
- (3) 国内のドブネズミの牛痘ウイルスの血清疫学調査

・研究分担者：

- (1) 新種エボラ、アレナウイルスの診断法の開発と評価 (高田、西條、安田、森川)、新興ウイルス感染症の病原迅速同定法 (水谷、遠藤)
- (2) 南米 HPS ウイルスの診断法・分子疫学と発症動物モデル系の開発 (有川)、ナイジェリアの霊長類の出血熱ウイルス疫学調査 (西條)
- (3) 国内の食虫類からの新種のハンタウイルスの検出 (新井)
- (4) ニパウイルスのマレーシア株とヒト→ヒト感染するバングラディッシュ株間のキメラウイルスゲノムの作製 (甲斐)
- (5) 細胞因子 Tetherin による出血熱ウイルス粒子形成の抑制効果の解析 (安田)

### IV. 23～24 年度の課題

- (1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：一種病原体に新規指定されたチャパレウイルス、ブンディブギョエボラウイルス及び新興ルジヨウイルスの診断法の充実化。食虫類ハンタウ

イルス、新興ウイルス性出血熱（中国河南省）の診断系開発と調査。レストンエボラウイルスのフィリピンの豚への浸淫状況の調査。

(2) 宿主域拡大・病原性獲得機構の解析：CDVのサルへの病原性獲得機構の解明。ニパウイルスのヒト-ヒト感染能獲得機構の解明。テザーリン等の細胞性ウイルス抵抗性因子からのアレナ、ブニヤウイルスの回避機構。アレナウイルスのレセプター解析。

## 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、新興ウイルス感染症発生時の迅速な病原の同定により、患者の隔離、二次感染防止対策の有効な実施

(2) 宿主域拡大しているウイルスのヒトへのリスク評価とその予防・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. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* (in press)
2. Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J Virol Methods* (in press)
3. Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):1217-23.

研究分担者 (甲斐知恵子)

1. Omi-Furutani M, Yoneda M, Fujita K, Ikeda F and Kai C Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. *J. Virol.* (in press)
2. Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Georges-Courbot, M-C., Ikeda, F., Omi, M., Muto-Terao, Y., Wild, F. and Kai, C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in vivo. *PLoS ONE*, (in press)

研究分担者 (高田礼人)

1. Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. (in press)
2. Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17(11):1723-8.

研究分担者 (安田二郎)

1. Fukuma A, Kurosaki Y, Morikawa Y, Grolla A, Feldmann H, and Yasuda J. Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription – loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol* (in press)
2. Kurosaki Y, Grolla A, Fukuma A, Feldmann H, and Yasuda J. Development and evaluation of the simple diagnostic assay for Marburgvirus using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 2330-2336
3. Urata S, Yasuda J. Regulation of Marburg virus budding by Nedd4.1; a different WW domain of Nedd4.1 is critical for the binding to Marburg and Ebola virus VP40. *J Gen Virol*. 2010, 91:228-34

研究分担者 (有川二郎)

1. Schmidt-Chanasit J, Essbauer S, Petraityte R, Yoshimatsu K, Tackmann K, Conraths FJ, Sasnauskas K, Arikawa J, Thomas A, Pfeffer M, Scharninghausen JJ, Spletstoesser W, Wenk M, Heckel G, Ulrich R G. Extensive host sharing of Central European Tula virus. *J Virol.* in press
2. Tegshduuren E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Kariwa H., Arikawa, J., and Ishihara, C. Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010, 33:e67-73.
3. Huong, V. T., Yoshimatsu, K., Luan, V. D., Tuan le, V., Nhi, L., Arikawa, J., and Nguyen, T. M. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2010, 16:363-365

研究分担者 (西條政幸)

1. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* (in press)
2. Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kisida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010, 17:1723-1728

研究分担者 (水谷哲也)

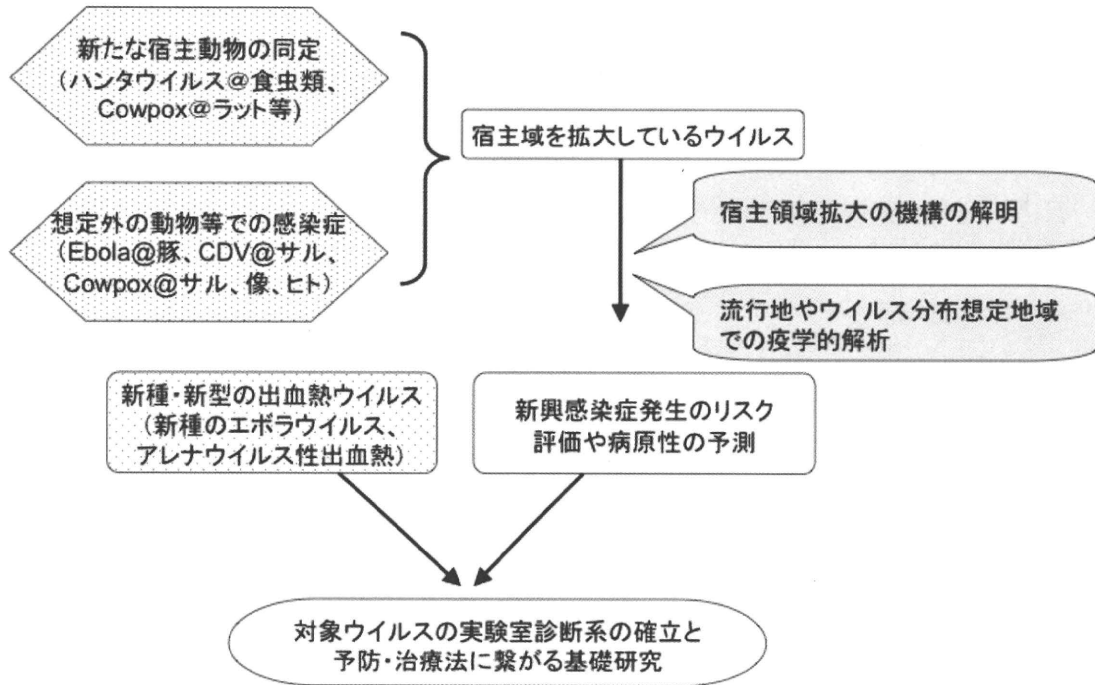
1. Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Novel betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jun;16(6):986-8.
2. Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(8):1217-23.

研究分担者 (新井智)

1. Kang HJ, Arai S, Hope AG, Cook JA, Yanagihara R. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(6):593-7.



Ⅶ. Ⅲ (1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**

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、西條政幸) 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(Victor Romanowski) 英国 (Roger Hewson) 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

アレナウイルスのレセプターに関する研究

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. Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* (in press)
2. Ogawa H, Miyamoto H, Ebihara H, Ito K, Morikawa S, Feldmann H, Takada A. Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J Virol Methods*. (in press)
3. Watanabe S, Masangkay JS, Nagata N, Morikawa S, Mizutani T, Fukushi S, Alviola P, Omatsu T, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Fujii H, Tsuda S, Endoh M, Kato K, Tohya Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y, Akashi H. Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis*. 2010 Aug;16(8):1217-23.
4. 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;16(8):1132-8.
5. 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.
6. 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.
7. Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *J Gen Virol*. 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71
8. 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.
9. 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.
10. 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

11. 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
12. 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.
13. 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
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. 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 system for severe acute respiratory syndrome coronavirus by using recombinant truncated nucleocapsid protein as antigen. *Clin. Vaccine Immunol.* 14(2):146-149, 2007.
20. 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.
21. 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
22. 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 Montagutelli, 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.
23. 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
24. 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
25. 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 成果概要

研究課題：結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

課題番号：H22-新興-一般-007

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：牧野正彦

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：感染制御部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 48,000,000 円

### I. 研究の意義

- (1) 結核菌感染後の感染防御誘導機序及び結核菌の宿主反応抵抗性機構は不明な点が多い
- (2) PD-1 を介した抑制性シグナルが宿主と結核菌の相互作用に与える効果は不明
- (3) BCG ワクチンを受けた結核患者の早期診断法が確立されていない。BCG と結核菌の識別方法がない
- (4) 結核発症の可能性が高い潜伏感染者（活動性潜在感染）と非活動性既感染者（非活動性潜在感染）を区別する診断法がない
- (5) ワクチン開発に資する結核菌特異的抗原によるタイプ 1 T 細胞選択的活性化機構が不明
- (6) 成人肺結核を含む結核等病原性抗酸菌感染症を的確に予防する方策・ワクチンがない
- (7) 長時間作用し、成人肺結核の発症を的確に予防する BCG 非依存性ワクチンが存在しない
- (8) 自然免疫系の活性制御による結核菌感染制御法が確立されていない
- (9) 多剤耐性結核菌及び非結核性抗酸菌に対する新規抗結核薬の開発が求められている

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 高齢化社会に伴い増加が予想される活動性潜在感染者を識別する診断法を新たに開発。予防的治療を要す高リスク患者を同定
- (2) 未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を同時に活性化し、記憶型 T 細胞及び抗酸菌殺戮を誘導する実効型 T 細胞を効率的に産生し、初回免疫ワクチンとして大きな成果が期待できる BCG の作製
- (3) 結核菌分泌蛋白由来 Th1 ペプチドによる CTL 産生分子機構を解明し、選択的・効率的に結核反応性 CD8 記憶 T 細胞を産生・維持する新規結核追加免疫ワクチン開発戦略を樹立。個体の免疫学的背景に依存しないユニバーサルワクチンを開発
- (4) PD-1 を介した免疫抑制シグナルの結核菌感染防御反応に与える影響を分子レベルで解析し、結核の新たな治療・予防法開発に貢献
- (5) 自然免疫系を有効に活性化し、新規結核感染制御法を確立。迅速な結核菌生体外排除を誘導
- (6) 新規抗結核薬の標的候補結核菌蛋白質の構造機能相関解析から新規治療薬の開発に資する

### Ⅲ. 1年間の研究成果

- 研究代表者（牧野正彦）

- (1) 結核菌の抗原性に富んだ主要抗原として MMP-II 蛋白を新たに同定
- (2) MMP-II を HSP70 遺伝子に連結してウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に導入

- 研究分担者（荒川宜親）

- (1) 結核菌由来の新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の立体構造を決定
- (2) 本新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素の基質結合部位は、結核菌に特異的な構造であることを発見

- 研究分担者(田村 敏生)

- (1) 抗結核獲得免疫活性化に必須な樹状細胞の活性化を誘導する必須因子として IL-17F を同定
- (2) IL-17F の産生には Th1 ペプチド刺激によりヘルパーT 細胞に発現する *ifn-r* 遺伝子の活性化転写因子 TAF7 の発現と IL-12 受容体  $\beta 2$  鎖発現を誘導する ZAP-70/ERK/STAT4 の活性化が必須であった

- 研究分担者(星野仁彦)

- (1) 結核菌感染者を高確率で診断し得る IFN- $\gamma$  リリースアッセイ法に改良を加えるため、結核菌特異的抗原からペプチドを作製し、タイプ 1 T 細胞に対する抗原決定基を同定

- 研究分担者(河村伊久雄)

- (1) 正常マウスに比し PD-1 欠損マウスでは結核菌抵抗性が著しく減弱していた
- (2) PD-1 欠損マウスに結核菌を感染させると肺胞免疫担当細胞の細胞死を伴う強い炎症と結核菌の著明な増加を誘導した。PD-1 シグナル経路は感染初期の結核菌制御に重要であった

- 研究分担者（竹田潔）

- (1) 結核菌の感染に際し、発現が誘導される遺伝子群(GBP family, HAS1, AIM2)の機能解析のために、遺伝子欠損マウスの作製に成功

### Ⅳ. 23~24年度の課題

- (1) 結核菌特異的抗原の抗原決定基に対するテトラマーを作製し、活動性潜在感染者と非活動性潜在感染者を的確に診断し得るか前向きコホートスタディを行う
- (2) PD-1 欠損マウスの過度な抗結核炎症反応を誘導する免疫担当細胞の特定とその役割解析
- (3) ウレアーゼ欠損 HSP70-MMP-II 導入 BCG の免疫原性と結核予防効果の検討
- (4) ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II に加え ESAT6 を導入した 2 段ロケット様新規 BCG の作製
- (5) IL-17F をヘルパーT 細胞・樹状細胞・CTL に強制発現または発現抑制し、その機構を評価。IL-17F の受容体を同定し、受容体発現誘導機構を解析し、ワクチン投与の目的であるメモリーT 細胞の産生に及ぼす IL-17F とその受容体強発現の効果を試験管内及びマウスを用いて検証
- (6) GBP family, HAS1, AIM2 欠損マウスでの、結核菌感染感受性の変化を解析
- (7) 新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素構造機能相関解析に基づきドラッグデザインを行い、新規抗結核薬を開発

## V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 潜在性結核菌感染者集団から活動性結核発症高リスク感染者を同定し、予防的治療を可能とする。高齢者にとって結核の恐怖から逃れることが可能となり社会福祉に大きな貢献となる
- (2) 結核感染初期の宿主結核菌生体防御反応を制御する方策を樹立し、新たな結核の治療法及び予防法の開発の指針を提供する
- (3) 新規 BCG 作出による抗酸菌感染症、特に成人肺結核の発症予防方策の確立
- (4) 強い効果と作用期間が長い BCG に代わる結核ワクチンの開発が可能となる
- (5) 結核感染に対する自然免疫を標的とした新規治療指針の作製
- (6) 新規抗結核薬の開発により、多剤耐性結核及び非結核性抗酸菌感染症の対策に貢献

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 (牧野正彦)

- (1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.

研究分担者 (田村敏生)

- (1) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M.D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 2010. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. Int. Immunol., 22:307-318.
- (2) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.

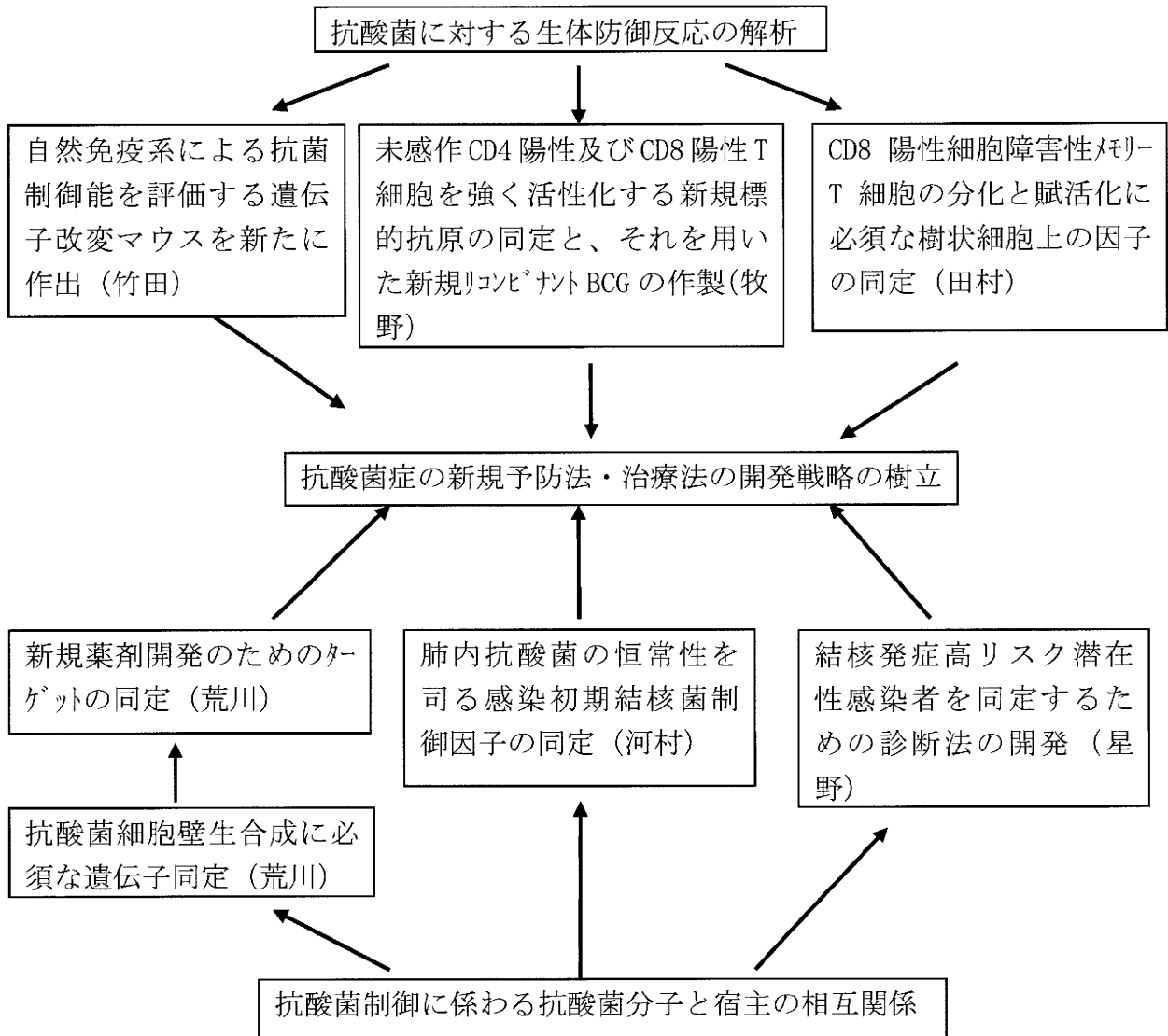
研究分担者 (星野仁彦)

- (1) Kobayashi, H., A. Nolan, B. Naveed, Y. Hoshino, L. Segal, Y. Fujita, W. N. Rom, and M. D. Weiden. 2010. Neutrophils Activate Alveolar Macrophages by producing Caspase-6 Mediated Cleavage of Interleukin-1 Associated Kinase-M (IRAK-M). J. Immunol., in press.

研究分担者 (河村伊久雄)

- (1) Sakai, S., I. Kawamura, T. Okazaki, K. Tsuchiya, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. 2010. PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Int. Immunol., in press.

**Ⅶ. Ⅲ(1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

- 1987年9月～1990年11月 アメリカ合衆国 National Institutes of Health (Visiting fellow)  
 1991年4月～1994年12月 国立予防衛生研究所、細菌・血液製剤部(研究員)  
 1995年1月～2000年3月 鹿児島大学医学部附属難治性ウイルス疾患研究センター(助教授)  
 2000年4月～2009年3月 国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部(部長)  
 2009年4月～ 現職

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・ 藤原道夫(新潟大学教授)
- ・ 馬場昌範(鹿児島大学教授)
- ・ 園田俊郎(鹿児島大学教授)
- ・ 渡部久実(琉球大学教授)
- ・ 矢野郁也(日本 BCG 中央研究所所長)
- ・ 高津聖志(東京大学教授)
- ・ Herbert C. Morse III (NIH, Laboratory Chief)
- ・ Patrick J. Brennan (Colorado State University, Professor)
- ・ Stefan H. E. Kaufmann (Max-Planck-Institute for Infection Biology, Director)

### ・主な研究課題

- ・ マウスエイズの発症機構の解明と免疫療法の開発
- ・ HAM/TSP 及び ATL の発症機構の解明と免疫療法の開発
- ・ 抗酸菌感染症の発症機構の解明、生体防御機構の解析並びに診断法・予防法及び免疫療法に関する開発研究

### ・これまでの研究実績

- 1) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. 2010. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. *Clinical Infectious Diseases*, in press.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 192: 5700-5708.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 185: 6234-6243.
- 4) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 306: 103-109.
- 5) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Lepr. Rev.*, 80: 402-409.



- 6) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. *J. Immunol.*, 183: 6561-6568.
- 7) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 55: 39-46.
- 8) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Inhibition of the Multiplication of *Mycobacterium leprae* by Vaccination with a Recombinant *M. bovis* BCG Strain that Secretes Major Membrane Protein-II in Mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16: 1399-1404.
- 9) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. 2008. CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53: 96-106.
- 10) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2008. The *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, 190: 7918-7924.
- 11) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. *Clin. Vaccine Immunol.*, 15: 1755-1759.
- 12) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190:3613-3621.
- 13) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. 2007. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes and Infect.*, 9: 70-77.
- 14) 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. 2007. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 272: 202-205.
- 15) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2007. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.*, 189: 5515-5522.
- 16) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. 2007. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. *FEBS Lett.*, 581: 3345-3350.
- 17) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2006. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188: 86-95.
- 18) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. 2006. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 254: 232-239.

- 19) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. 2006. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1 $\beta$ . *Eur. J. Immunol.*, 36: 1443-1452.
- 20) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. 2006. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 74: 6264-6271.
- 21) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. 2005. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 73: 2744-2750.
- 22) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. 2005. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.*, 233: 53-60.
- 23) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino. 2004. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand. J. Immunol.*, 60: 278-286.
- 24) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. 2004. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell. Immunol.*, 229: 13-20.
- 25) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. 2003. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell. Immunol.*, 222:69-77.
- 26) Maeda, Y., M. Makino, D. C. Crick, S. Mahapatra, S. Srisunnam, T. Takii, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. 2002. Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 70: 4106-4111.
- 27) Shimokubo, S., S. Wakamatsu, Y. Maeda, M. Baba, and M. Makino. 2002. Fusion of mature dendritic cells and human T-lymphotropic virus type-I-infected T cells: its efficiency as an antigen-presenting cell. *Virology*, 301: 13-20.
- 28) Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2002. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect. Immunity*, 70: 5167-5176.
- 29) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. 2001. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, 54: 574-58.
- 30) Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, N. Arima, and M. Baba. 2000. Production of Functionally Deficient Dendritic Cells from HTLV-I-Infected Monocytes: Implication for the Dendritic Cell Defect in Adult T Cell Leukemia. *Virology*, 274: 140-148.
- 31) Makino, M., M. Azuma, S. Wakamatsu, Y. Suruga, S. Izumo, M. M. Yokoyama, and M. Baba. 1999. Marked suppression of T cells by a benzothiophene derivative in patients with Human T-lymphotropic virus type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 6: 316-322.
- 32) Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. 1999. The role of HTLV-I-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 73: 4575-4581.
- 33) Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. 1999. Monocyte-Driven Activation-Induced Apoptotic

- Cell Death of Human T-Lymphotropic Virus Type I-Infected T Cells. *J. Immunol.*, 163: 3914–3919.
- 34) Makino, M., S. Yashiki, T. Fujiyoshi, M. Baba, and S. Sonoda. 1998. An expression of anaplastic large cell lymphoma associated antigens on HTLV-I-infected CD4<sup>+</sup> T cells. *Ann. Hematol.*, 76: 31–35.
- 35) Suruga, Y., M. Makino, Y. Okada, H. Tanaka, E. De Clercq, and M. Baba. 1998. Marked suppression of murine AIDS development by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *J. AIDS and Hum. Retrovirol.*, 18: 316–322.
- 36) Makino, M., and M. Baba. 1997. Establishment of a cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. *Scan. J. Immunol.*, 45: 618–622.
- 37) Takamoto, T., M. Makino, M. Azuma, A. Tanaka, T. Kanzaki, M. Baba, and S. Sonoda. 1997. HTLV-I-infected T cells activate autologous CD4<sup>+</sup> T cells susceptible to HTLV-I infection in a costimulatory molecule-dependent fashion. *Eur. J. Immunol.*, 27: 1427–1432.
- 38) Makino, M., K. Yoshimatsu, M. Azuma, Y. Okada, Y. Hitoshi, H. Yagita, K. Takatsu, and K. Komuro. 1995. Rapid development of murine AIDS is dependent on signals provided by CD54 and CD11a. *J. Immunol.*, 155: 974–981.
- 39) Makino, M., D. B. Murphy, R. W. Melvold, J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1995. Impact of MHC class I gene on resistance to murine AIDS. *Scand. J. Immunol.*, 42: 368–372.
- 40) Makino, M., Y. Tang, T. N. Fredrickson, Y. Okada, D. B. Murphy, M. Fujiwara, T. Mizuochi, K. Komuro, H. C. Morse III, and J. W. Hartley. 1994. Influence of H-2 class II antigens on the development of Murine AIDS (MAIDS). *J. Immunol.*, 152: 4157–4164.
- 41) Makino, M., G. Ishikawa, K. Yamaguchi, Y. Okada, K. Watanabe, Y. Sasaki-Iwaki, S. Manabe, M. Honda, and K. Komuro. 1994. Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow fiber, BMM®. *Archives Virol.*, 139: 87–96.
- 42) Makino, M., D. F. Winkler, J. Wunderlich, J. W. Hartley, H. C. Morse III, and K. L. Holmes. 1993. High expression of NK-1.1 antigen is induced by infection with murine AIDS virus. *Immunology*, 80: 319–325.
- 43) Suzuki, K., M. Makino, Y. Okada, J. Kinoshita, R. Yui, H. Kanazawa, H. Asakura, M. Fujiwara, T. Mizuochi, and K. Komuro. 1993. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome induced by a murine retrovirus. *Laboratory Invest.*, 69: 430–435.
- 44) Gazzinelli, R. T., M. Makino, S. K. Chattopadhyay, C. M. Snapper, A. Sher, A. W. Hugin, and H. C. Morse III. 1992. CD4<sup>+</sup> subset regulation in viral infection. Preferential activation of Th2 cells during progression of retrovirus-induced immunodeficiency in mice. *J. Immunol.*, 148: 182–188.
- 45) Makino, M., S. K. Chattopadhyay, J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1992. Analysis of role of CD8<sup>+</sup> T cells in resistance to murine AIDS in A/J mice. *J. Immunol.*, 149: 1702–1706.
- 46) Makino, M., Y. Sei, P. K. Arora, H. C. Morse III, and J. W. Hartley. 1992. Impaired calcium mobilization in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, murine AIDS. *J. Immunol.*, 149: 1707–1713.
- 47) Makino, M., W. F. Davidson, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1991. Effects of non-MHC loci on resistance to retrovirus-induced immunodeficiency in mice. *Immunogenetics*, 33:

345-351.

- 48) Cerny, A., A. W. Hugin, R. R. Hardy, K. Hayakawa, R. M. Zingernagel, M. Makino, and H. C. Morse III. 1990. B cells are required for induction of T cell abnormalities in a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *J. Exp. Med.*, 171: 315-320.
- 49) Makino, M., H. C. Morse III, T. N. Fredrickson, and J. W. Hartley. 1990. H-2-associated and background genes influence the development of a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, MAIDS. *J. Immunol.*, 144: 4347-4355.
- 50) Makino, M., T. Morita, and M. Fujiwara. 1988. Histopathological characteristics of the kidney of recombinant inbred mice established from MRL/lpr x AKR crossing. Dissociation of severity of lupus nephritis from the degree of lymphadenopathy. *Virchows Archiv. B. Cell Pathol.*, 56: 59-65.
- 51) Makino, M., M. Fujiwara, and H. Watanabe. 1988. Studies on the mechanisms of the development of lupus nephritis in BXSB mice. II. Comparative studies between male BXSB and MRL/lpr mice at the onset period. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 25: 83-88.
- 52) Makino, M., M. Fujiwara, and H. Watanabe. 1987. Studies on the mechanisms of the development of lupus nephritis in BXSB mice. I. Analyses of immunological abnormalities at the onset period. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 22: 127-131.
- 53) Makino, M., M. Fujiwara, T. Aoyagi, and H. Umezawa. 1987. Immunosuppressive activities of deoxyspergualin. I. Effect of the long term administration of the drug on the development of murine lupus. *Immunopharmacology*, 14: 107-114.
- 54) Makino, M., M. Fujiwara, H. Watanabe, T. Aoyagi, and H. Umezawa. 1987. Immunosuppressive activities of deoxyspergualin. II. The effect on the antibody response. *Immunopharmacology*, 14: 115-122.
- 55) Makino, M., M. Fujiwara, H. Watanabe, H. Sugano, and M. Arakawa. 1986. Evaluation of different preparations of aggregated human IgG for use as a standard in the assays of circulating immune complexes. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 21: 151-157.