

季節性ウイルスよりは若干病原性が強く、多くのトリ型ウイルスの性状を保持し、未だ十分にヒト型には変化していないことを解明した。これらに基づき、健康被害と社会的影響に対するリスク評価と診断キットの開発、新型ワクチン開発を行った。

・分担研究者(喜田宏)

(1) 渡りガモおよびハクチョウの糞便材料から多数のインフルエンザAウイルスを分離同定した。また、平成20年5月に北海道の野生オオハクチョウの斃死体から、H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを分離同定した。高病原性鳥インフルエンザウイルスA/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) 株の豚における増殖にPB2タンパクが関与することがわかった。

・分担研究者(河岡義裕)

(1) 鳥ウイルスのヒト型への変身要因として、HA 蛋白レセプター認識部位の変異とRNAポリメラーゼ変異による低温の増殖性が示された。遺伝子解析から、H5N1 型はヒト型へ、さらに上気道で効率よく増殖するようになってきている。またウイルス継代によりヒト型への変異が生じて蓄積することが示された。

(2) トリ(及びヒト)への強毒性は、ヒト型への変異要因とは異なる数カ所の遺伝子部位が規定している。流行中の H5N1 ウイルスでは弱毒化の傾向は無く、H5N1 新型ウイルスには、強毒性が維持される可能性が高い。

(3) ブタ由来H1N1の分子病態解析および動物感染実験を行い、病原性、伝播性、薬剤耐性等に関する分子基盤を解明し、これらに基づいたリスク評価と予測を行った。

(4) インドネシア・中国で鳥型 H5N1 ウイルスがブタに不顕性感染しており、ヒト型への変化が危惧される。

・分担研究者(小田切孝人)

(1) H5N1 およびH1N1pdmウイルス感染診断系を開発し、リアルタイム RT-PCR による診断を可能にした。これらを検疫所、地方衛生研究所へ技術移転し、統一された最新版マニュアルを用いた診断検査が可能となった。

(2) オセルタミビル耐性ウイルスの全国緊急調査を行った。H20年には季節性H1N1ウイルスの2.6%が耐性で、海外より低頻度であったが、H21年シーズンには99%が耐性となった。耐性株はザナミビル感受性、抗原性はワクチン株類似であった。H1N1パンデミックウイルスについては70株の耐性株を同定したが、いずれも散発的なものであり、拡大傾向はなかった。

・分担研究者(高橋宜聖)

(1) マウスでプレパンデミックワクチン(NIBRG-14、Anhui 株)の感染防御機構を解析した。H5N1 ワクチンはH1N1 ワクチンに比べ抗 NA 抗体の惹起能が高く、これが抗 HA 抗体と協調的に感染防御に寄与していた。

・分担研究者(長谷川秀樹)

(1) 新型ワクチンには強い交叉防御効果が望まれ、経鼻ワクチンが期待される。安全・有効な天然物由来粘膜アジュバントを探索し、2重鎖 RNA および4種類のキノコ菌糸体抽出物の有効性が確認された。マウスとサルにおいて、A/Vietnam/1194/2004(H5N1)全粒子軽鼻アジュバント不活化ワクチンは、異なる clade の A/Indonesia/6 感染に対し交差性の防御効果が示された。

・分担研究者(西藤岳彦)

(1) 2007/08年の北海道、群馬、新潟、京都、兵庫、長崎でのA/H1N1の耐性変異(H275Y)は0.4%と低かったが、その後増加し、08-09年にはほぼ100%となった。

(2) H1N1pdm ウイルスのブタへの感染を確認した。

(3) 2010年鳥根県のH5N1ウイルスを分離固定し、その起源を検討した。

・分担研究者(押谷仁)

(1) H1N1パンデミックの国内外での流行実態把握、予健康被害のリスク評価を行い、緊急対応方策を

提言した。

・分担研究者(鈴木康夫)

- (1) H5N1 およびH1N1pdmウイルスがヒトへ伝播可能とするレセプター認識変異を簡便に測定する基本技術を開発し、パンデミック発生を分子レベルで事前に監視できる可能性を得た。生体中のトリおよびヒトのインフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖分子群の定量的測定技術を開発した。

#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

H5N1による最悪のシナリオから H1N1pdm の軽微なパンデミックなど様々なシナリオにおけるリスク評価と、科学的な健康被害および社会機能の低下を最小限に留めるための具体的な方策の検討。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

国のパンデミック事前準備と緊急対策の行動計画の策定および実施に必要な理論的、技術的な基盤を提供し、危機管理体制の確立に貢献できる。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

- 1 Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M., Kageyama, T.:Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. J. Med. Virol. 83:10–15, 2011.
- 2 Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. :Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan PLoS ONE 5(6): e11057. 2010
- 3 Ikeno, D., Kimachi, K., Kino, Y., Harada, S., Yoshida, K., Tochihara, 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. 54: 81–88, 2010
- 4 Takahashi, Y., Hasegawa, H., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M.: Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) – inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. J. Infect. Dis.199;1629–1637 2009
- 5 Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y.:The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model Vaccine: 27, 3121–3125, 2009.
- 6 Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. PolyI:PolyC<sub>12</sub>U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against H5N1 influenza virus variants. Vaccine 27;6276–6279 2009
- 7 Watanabe T, Watanabe S, Hatta M, Kawaoka Y. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: M2 cytoplasmic tail mutants. J Virol 82:2486–2492, 2008.
- 8 Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y., Takeuchi Y, Kida H., Ogasawara K. Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. Immunology 124:155–165, 2008.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

本研究成果



行政施策へのフィードバック

(1) 新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発

- ・H5N1・H1N1ウイルスの伝播と遺伝子・抗原変異のモニター
- ・流行予測とプレパンデミックワクチン株の選定
- ・備蓄用ワクチン株の更新とワクチン備蓄戦略の検討
- ・初期封じ込め戦略の検討
- ・行動制限等の公衆衛生上の介入政策
- ・抗ウイルス剤の活用

(2) 新型インフルエンザ出現の予想方法と病原性、流行規模、健康被害、社会的影響等のリスク評価方法の確立

- ・早期検知する監視体制の確立
- サーベイランス
- 症候群サーベイランス
- 検疫
- ・ウイルスサーベイランス体制の確立
- ・情報提供、共有
- ・リスク評価と緊急対応

(3) 迅速診断キットの開発・改良・普及

H5N1ウイルス診断ガイドライン  
PCRプライマー分与、標準化、地方衛生研究所に配布  
RT-PCRの実用化、市販

(4) 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立  
H5N1ワクチン製造株の開発(リバーシジェネティクス)  
弱毒性の検証

試験ワクチン製造  
前臨床試験実施  
臨床第1相試験実施  
第2+3相試験実施  
製造承認申請

新型ワクチンの品質基準、品質管理方法

特別審査実施

プレパンデミックワクチンの開発

備蓄用ワクチンの製造と国家備蓄

(5) 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の検討

国家備蓄  
使用方法の策定  
有効性の推定と評価  
耐性ウイルスのモニター(NA活性と塩基配列)

新型インフルエンザ対策行動計画

新型インフルエンザ対策ガイドライン

(6) 感染病理機構の解明に基づく  
経鼻投与ワクチン、組織培養ワクチンの開発  
免疫応答調整因子を用いた新規経鼻接種ワクチン開発  
マウスおよびサル感染防御実験  
実用化に向けた基礎研究

組織培養ワクチン

高交差免疫性経鼻ワクチン

5年以内に実用化・製造開始

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

- 1969-1977 東北大学医学部医学科  
 1977-1984 山形大学医学部細菌学講座助手  
 1984-1987 ドイツ・ギーセン大学ウイルス学研究所研究員  
 1987-1993 自治医科大学医学部ウイルス学講座助教授  
 1993-2009 国立予研ウイルス第1部長/国立感研ウイルス製剤部長/ウイルス第3部長  
 2001- WHOインフルエンザ協力センター長  
 2003- WHO SARS研究ネットワーク、WHO H5インフルエンザ診断研究ネットワーク  
 2004-2009 WHO 麻疹風疹世界特別研究施設長  
 2009- 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長

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- 東北大学/山形大学/神戸大学 石田名香雄教授、本間守男教授  
 ギーセン大学/マールブルク大学教授 Rudolf Rott, Hans-Dieter Klenk, Christoph Scholtissek  
 英国国立医学研究所長 Alan Hey, John Skehel  
 ケンブリッジ大学/ロッテルダム大学教授 Abraham Osterhaus, Derek Smith, Collins Russell  
 米国CDC Nancy Cox  
 香港大学医学部教授 Marik Peiris

### ・主な研究課題

- パラミクソウイルスの構造と病原性発現機序の分子基盤  
 麻疹ウイルスの分子病理学、分子病態機構および麻疹ワクチンの有効性と安全性に関する科学的基盤  
 インフルエンザウイルスの病原性発現の分子機構・インフルエンザの分子疫学および流行疫学  
 インフルエンザの感染防御免疫およびワクチンの開発研究・新型インフルエンザ対策の科学的基盤

### ・これまでの研究実績

- 1 Nakauchi, M., Yoshikawa, T., Nakai, H., Sugata, K., Yoshikawa, A., Asano, Y., Ihira, M., Tashiro, M., Kageyama, T.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J. Med. Virol.* **83**:10-15, 2011.
- 2 Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Nakauchi, M., Obuchi, M., Ujike, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M. :Establishment of a diagnostic system for the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in Japan using conventional and real-time RT-PCR assays. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press, 2010)
- 3 The WHO-ECDC writing committee :Public health implications of oseltamivir resistance emergence in pre-pandemic influenza A(H1N1) viruses during the 2007-2009 seasons *J. Influenza. Resp. Viral Infect* (submitted, 2010)
- 4 Nakauchi, M., Ujike, M., Obuchi, M., Takashita, E., Takayama, I., Ohba, K., Konomi, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T., and the working group for influenza virus surveillance in Japan :Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -sensitive 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* (in press, 2010)



- 5 Ichinohe, T., Aina, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., 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: 128–137, 2010.
- 6 Writing Committee of WHO 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* 28: 1156–1167, 2010.
- 7 Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T.: First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan : Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63; 2010–2015, 2010.
- 8 Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., The working group of influenza virus surveillance in Japan. :Detection of oseltamivir-resistant influenza viruses in Japan during the 2007–2009 influenza seasons *Emerg. Infect. Dis.* 16; 926–935, 2010
- 9 **Shiino, T., Okabe, N., Yasui, Y., Sunagawa, A., Ujike, M., Obuchi, M., Kishida, N., Xu, H., Takashita, E., Anraku, A., Ito, R., Doi, T., Ejima, M., Sugawara, H., Horikawa, H., Yamazaki, S., Kato, Y., Fujita, N., Odagiri, T., Tashiro, M., Watanabe, H. :Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm viruses, May–September, 2009: Temporal and spatial spreading profile of viral isolates in Japan *PLoS ONE* 5(6): e11057. 2010**
- 10 Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. :Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007–2008 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83–86, 2009.
- 11 **Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M. :Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) – inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199; 1629–1637, 2009**
- 12 Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. :Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol. Immunol.* 53: 83–88, 2009
- 13 **Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. :The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model *Vaccine*: 27, 3121–3125, 2009.**
- 14 Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato, K., Suzuki, Y. :Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Open Glycoscience* , 2: 28–36, 2009.

- 15 Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H.: PolyI:PolyC<sub>12</sub>U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009
- 16 Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F.: Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* 14: 751-761, 2009
- 17 WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group; Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.
- 18 Sriwilajaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y.: Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian I influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology J.* 6:124, 2009
- 19 Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P.: Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461; 20-21, 2009
- 20 Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A.M., Smith, D. J. : The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses *Science* 320: 340-346, 2008

**・平成23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**

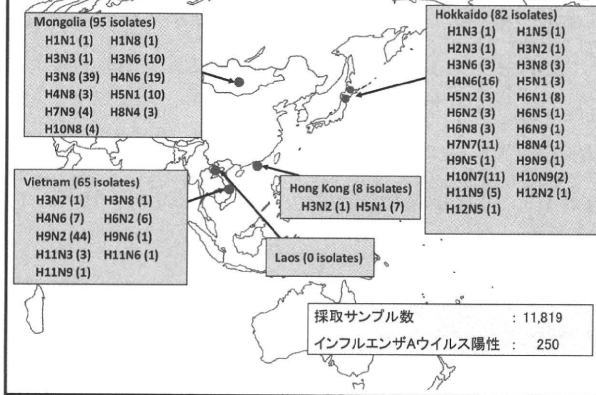
高病原性の新型インフルエンザ発生に対する事前準備及び、緊急対応に関する研究

## II. 研究の目的

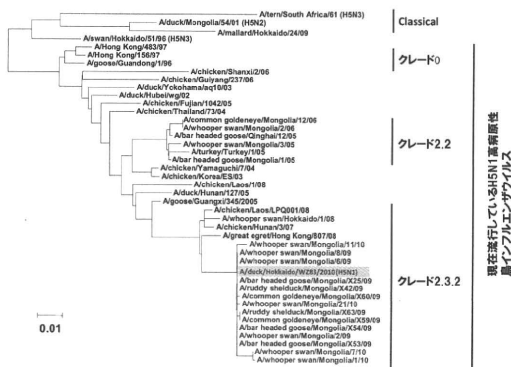
- 様々なシナリオにおける新型インフルエンザ出現機序の解明とそれに基づく出現予測方法の開発
- 新型インフルエンザ出現を早期検知監視体制と様々なシナリオにおけるリスク評価方法の確立
- 新型ウイルス迅速診断キットの開発・改良・実用化
- 新型ワクチンの緊急開発・増産・供給・接種体制の確立
- 抗ウイルス剤の有効な備蓄方法と使用方法の確立
- 感染病理機構の解明に基づき経鼻投与ワクチン、組織培養ワクチンの開発

これらの成果を活用して、健康危機管理、社会危機管理体制の整備が進み、最悪のシナリオにおける新型インフルエンザ大流行による健康被害の最小化と、社会・経済機能の崩壊を防止することが期待される。

## 鳥インフルエンザのグローバルサーベイランス (2008-2010年)



## 分離されたH5ウイルスのHA遺伝子性状

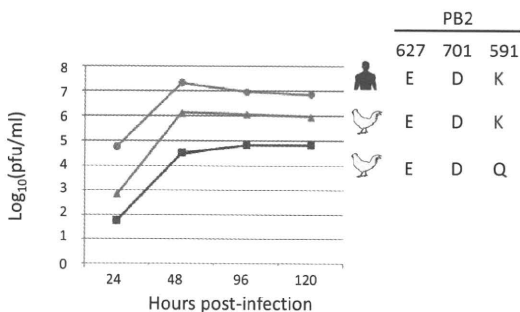


## 目的

パンデミック(H1N1)2009ウイルスのPB2たんぱく質は、元々は鳥インフルエンザウイルス由来であるが、哺乳動物で効率良く増殖するのに必要な627番目と701番目のアミノ酸変異が認められない。

本研究は、これまでに知られていない、哺乳動物で効率良く増殖するのに必要なPB2たんぱく質のアミノ酸変異を同定することを目的とする

## H5N1ウイルスのヒト気管上皮細胞での増殖性



PB2の591番目のアミノ酸がリシンの場合、ヒト気管上皮細胞での増殖能が高くなる。

## ○ 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)の受容体認識変異機構の解明と変異監視技術の開発および関連成果(2008-2010):

2008年度の主な成果:

- 高病原性鳥インフルエンザウイルスおよびそのヒト型適応変異を監視する新しい手法(受容体疑似糖鎖を用いる方法、*Exp. Glycosci.*, 2008; 鳥型受容体シアロ糖鎖水分解素、2,3シリアリダーゼを用いる方法、*J. Clin. Virol.*, 2008)を開発した。
- 鳥およびヒトインフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)のアミノ酸置換によるセブター認識変異機構を物理化学的手法により明らかにした(*J. Mol. Genet. Med.*, 2008; *Glycoconjugate J.*, 2008)。
- 臨床適用されている抗インフルエンザノイラミニダーゼ阻害薬(タミフル、リレンザ)のヒトシアリダーゼ、4種類、Neu1-Neu4)の阻害の有無を検証した。その結果、タミフルのヒトシアリダーゼに対するKiはウイルスに対する値の約100万分の1オーダーであり、ヒトシアリダーゼ活性に対する阻害副作用は高くないものと推定された(*Antimicrobial Agents and Chemother.*, 2008)。

2009年度の主な成果:

- H5N1感受性宿主動物(ネコ、イヌ、ブタ 他)肺、発育鶏卵しょう尿膜・羊膜、赤血球膜(ニフトリ)の受容体シアロ糖鎖(N-結合型)解析技術の開発と構造解析を報告した(*Open Glycoscience*, 2009, *Glycoconjugate J.*, 2009; *J. gen. Virol.*, 2010)
- レセプターシアロ糖鎖におけるシアル酸分子種(Neu5Ac, Neu5Gc)の認識特異性を決定するHA分子内アミノ酸の同定(*FEBS Lett.*, 2009); H5N1ウイルスの鳥型レセプター(α2-3)からヒト型(α2-6)レセプターシアロ糖鎖認識変異を簡易・高感度に検知する監視・検査キットの基盤技術(イムノクロマト法)を開発した。

2010年度の主な成果:

- インドネシアではブタにH5N1ウイルスが伝播している事実、ブタから分離されたH5N1に

ヒト型レセプター(Neu5Aca2-6)への結合性を獲得した株を見出した。ブタの監視が重要である (Emerging Infect. Dis., 2010)。  
 ② 1918年スペインインフルエンザウイルスの病原性発現にウイルスノイラミニダーゼスパイクの細胞内エンドソーム・リソソームにおける弱酸性安定性が関わることを発見 (PLoS ONE, 2010)。

○ 抗インフルエンザ創薬(2008-2010):

2008年度の主な成果:

① 抗炎症作用をもつ抗生物質、クラリスロマイシンに抗インフルエンザ活性を見出した。この安全性は確認されているので、今後の新治療への道が拓けた (Biol. Pharm. Bull., 2008)。  
 ② 宿主細胞膜の硫酸化糖脂質(スルファチド)は、インフルエンザウイルスの増殖を促進すること、その機構は、ウイルスのヌクレオプロテインの核外移送の亢進にあることを明らかにした。新しい抗インフルエンザ薬創成の基盤を創成した (J. Virol., 2008)。

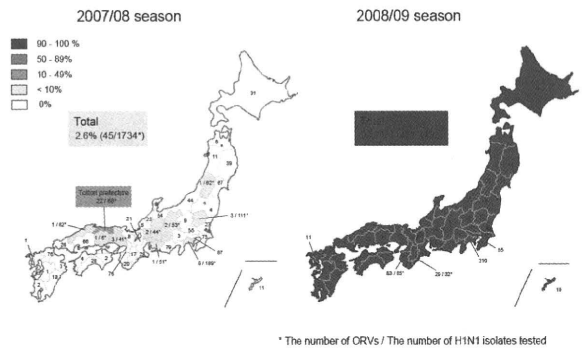
2009年度の主な成果

① PVP-I (ポリビニルピロリドンイオン)は、うがい用濃度よりも低濃度でインフルエンザウイルスHA、NAおよびウイルス増殖を多機能的に阻害することを見出した (Virology, J. 2009); 天然および化学合成シクロ糖鎖分子の抗インフルエンザウイルス活性を見出した (Bioorg. Med. Chem., 2009)。  
 ② シクロ分子とヘマグルチニン分子内ポケットとの分子相関を新規なフラグメント分子軌道法により明らかにした (J. Mol. Genet. Med., 2009)。

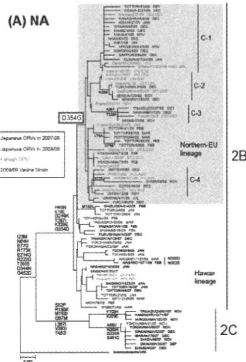
2010年度の主な成果

① 新しい構造(シアル酸誘導体)を持つインフルエンザウイルスノイラミニダーゼ機能阻害分子を見出した (Int. J. Med. Chem., 2010)。  
 ② 日本古来の自然食品梅肉エキスに含まれるムメフラールにインフルエンザウイルスのヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、感染性(PFU)を阻害する活性を見出した (Food Chem., 2010)。

H20年度 オセルタミビル耐性季節性H1N1ウイルスの検出とその性状解析



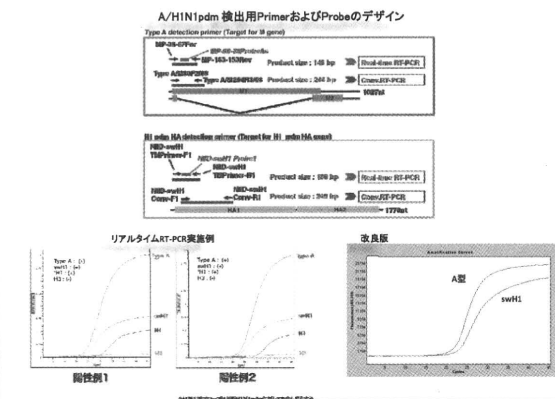
耐性株NA遺伝子の系統樹解析



要約

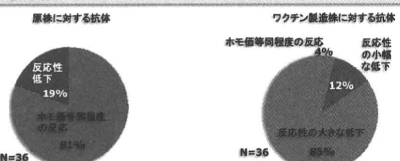
- 2008/09シーズンの耐性株の全ては、流行株の主流の Clade 2BのD354Gグループに分類された。
- 抗原性解析から、耐性株の全ては、ワクチン株 A/Brisbane/59類似していた。

H21年度 リアルタイムRT-PCRによるパンデミックA/H1N1ウイルス検査系の緊急構築と全国各地電研への技術移転

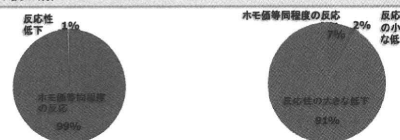


H22年度 インフルエンザワクチンにより誘導されるヒト免疫抗体の流行株に対する交叉反応性の評価

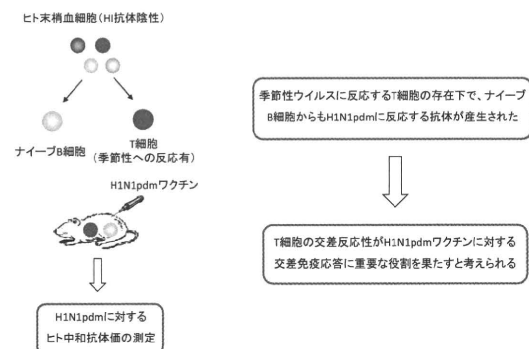
A/Victoria/210 (H3N2) ワクチン原株および製造株に対する抗体と流行株との反応性の評価 (フェレット抗血清)

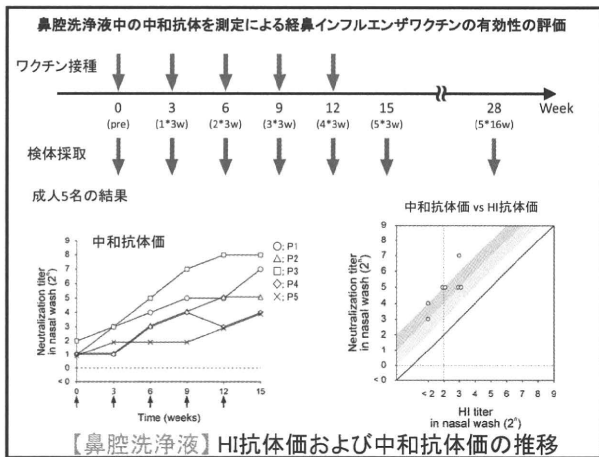
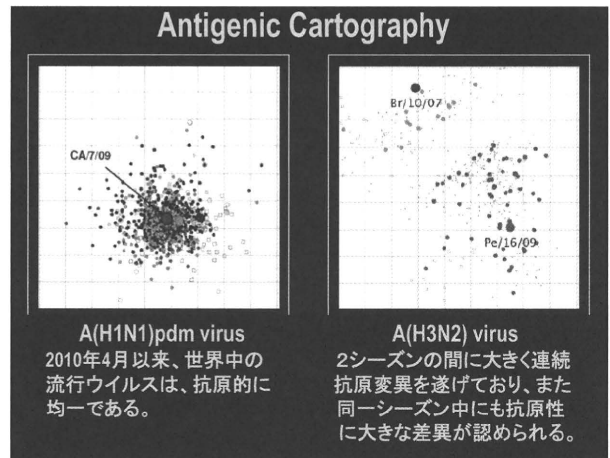
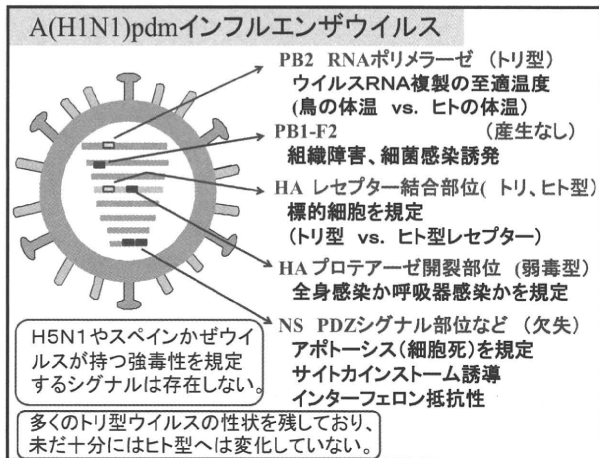


B/Brisbane/60 ワクチン原株および製造株に対する抗体と流行株との反応性の評価 (フェレット抗血清)



パンデミックワクチン(H1N1pdm)が惹起する交差免疫記憶の解析





### 結果と課題

**結語**

- ✓ 鼻腔洗浄液を用いた機能的抗体を評価することができた。
- ✓ 現行の評価基準を当てはめた場合、血清では4回目の接種で基準を超え、鼻腔洗浄液では二回目の接種で基準を超えることが示された。
- ✓ 鼻腔洗浄液中で中和活性を示すのは、主にIgA抗体である。

**課題**

- 統計的な優位性を示すためには、より規模の大きい試験を実施する必要がある。(鼻腔洗浄液回収の簡便法の確立、中和抗体価測定の効率化が必要)

## 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：テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発とその評価法の確立に関わる研究

課題番号：H20-新興-一般-006

予定期間：H20 年度から H22 年度まで

研究代表者：佐多 徹太郎

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：感染病理部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 90,000 千円 2 年目 81,000 千円 3 年目 72,900 千円

### I. 研究の意義

- (1) バイオテロに関わる病原体等の迅速検査診断法を開発してきたが、より迅速で正確な検査法を開発する必要があるとともに、病原体が手に入らない場合は特異性の点で問題を残している。
- (2) スクリーニング法としての網羅的診断法の開発が未だ不十分で、有事に検査の中心となる地衛研への普及と検査に係わる地衛研と感染研の役割分担等の対応が不十分である。
- (3) 未知および病原体等の由来を知るため、病原体等の塩基配列情報がとくにわが国では乏しい。
- (4) 一次対応者や機関等へのバイオテロ診断支援システムとしての情報提供 HP のさらなる充実を図る必要性が指摘された。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 新たな迅速診断法および病原体検出法を開発し、研究班で開発され地衛研で使用可能なものは普及を図ることおよび地衛研と感染研等で検査対応の連携の形成を図る。
- (2) 病原体の塩基配列情報を迅速に解析することおよび病原体の由来を明らかにするべくデータベースを作成する。
- (3) バイオテロ関連疾患の臨床診断を行う一次対応者への支援を目的とした HP の一層の充実を図る。

### III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(佐多)

- (1) ウイルス遺伝子を検出する網羅的 PCR 法の対象ウイルスを 163 種類に拡充し、うちテロの可能性の高いウイルスを選択し試作キットを作製し地衛研で評価の後、完成品を地衛研に配布した。
- (2) 使い捨て携帯用カイロを用いた LAMP 法により、炭疽菌、新型インフルエンザをバイオテロの現場で検出できる系を開発した。また、飲料物に混入されたウイルス核酸を検出する系を立ち上げた。
- (3) 野兎病のヒト皮膚およびリンパ節生検組織を用いて抗原検出系とゲノム検出系により、皮膚には 2 週間程度、所属リンパ節には一月程度、壊死組織に菌が存在することを明かにした。

・研究分担者(森川)

- (1) 新種のブンディブージュヨを含め 5 種類のエボラウイルスを検出できる qRT-PCR 法を開発した。5 種類のレストンエボラウイルス血清診断法を開発した。天然痘を含むポックスウイルス共通遺伝子検出法をキット化し、地衛研に配布して評価を行った。使用機器の差異による問題があった。

・研究分担者(加来)

- (1) ニパウイルス(NiV)-G 蛋白抗体を用いた抗原 capture ELISA 系および狂犬病ウイルス(RABV)-N 抗体を用いた抗原検出 ELISA 系を構築し、検出限界を測定した。

・研究分担者(高橋英)

- (1) 蛍光抗体法に適したペスト菌に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を選定・作製し、標識抗体を作成し、ペスト菌のタンパク迅速検出が可能となった。

・研究分担者(堀野)

- (1) 類鼻疽菌特異的な LAMP 法のプライマー群を作製した。検出感度も良好で、臨床検体で検討している。また、菌のタイピング法を検討し、菌の由来についての情報が得ることが可能となった。

・研究分担者(牧野)

- (1) カクテル PCR と蛍光ビーズ法を組み合わせた迅速検出法の構築に成功し、病原体や毒素が検出可能となった。野兎病菌に対する免疫学的迅速同定法と ELISA 系を構築した。

・研究分担者(安藤)

- (1) リケッチア、クラミジアおよびコクシエラ等の迅速検出法の開発を目的として、PCR、Realtime PCR、Lamp 法の開発を行った。Lamp 法について地衛研とともに評価を行っている。



・研究分担者(高橋元)

- (1) ボツリヌス毒素を型特異的に検出できる A 型毒素検出系イムノクロマトキットを作製し、15ヶ所の地衛研に配布し検討した。またボツリヌス菌の実験室診断に妨げとなる *C.septicum*、*C.perfringens* および *C.oedematiens* の産生毒素に対する抗毒素血清を作成して、地衛研に配布した。
- (2) 国内のボツリヌス症患者から分離された 6 菌株を定法であるパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) で分析した結果、2 株ずつ 3 つのグループ(I,IIA,II B)に分類された。

・研究分担者(黒田)

- (1) バイオテロ関連病原細菌のうち日本固有株の全ゲノム配列を次世代シーケンサで解読、公開ゲノム配列との比較データベースを構築した。そして炭疽菌・キノロン耐性における薬剤排泄系の関与をゲノムレベルで解明した。
- (2) 2009 A/H1N1pdm インフルエンザウイルス感染症例の剖検組織から直接ウイルス配列を検出し、バイオテロを含む様々な感染症対策に対応できることを示した。

・研究分担者(尾家)

- (1) 芽胞の消毒薬抵抗性の大きい順は、枯草菌≧炭疽菌>ボツリヌス菌であった。次亜塩素酸ナトリウムと酢との混合液が、炭疽菌を含むバイオテロ関連微生物に有効であった。

・研究分担者(田中)

- (1) 過去のバイオテロ関連事例「白い粉事件」を地衛研で評価し、危機管理要領等を改善した。
- (2) 10 地衛研の参加者を得て 3 種の迅速検査キットを評価し、地衛研と感染研の連携における問題点を把握した。完成キットは地衛研に配布し、バイオテロ関連病原体迅速検査体制の一助とした。

・研究分担者(岩本、松本)

- (1) インфекションコントロールドクターICD に HP についてのアンケート調査を実施し、ホームページ HP の改訂充実に生かした。
- (2) 改訂専用ホームページを立ち上げ、本研究の感染症専門家を研究協力者とし内容の訂正やあらたに 23 疾患の追加を依頼した。
- (3) 改訂ホームページの内容をもとに CD-ROM を作成し、全国約 1,200 の主要医療機関に配布した。

・研究分担者(中村)

- (1) Contents management system を用いた効率的な情報更新手法を開発し、研究班員から集められた情報を改訂し、充実した情報公開システムを構築することができた。
- (2) 有事の際の堅牢な情報公開手法を検討し、いくつかの提言にまとめ、感染研情報公開サイトへの移行と継続的運用方法を検討した。

#### IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 新たな病原体についても早期検知のための迅速検査法の開発を継続していく。
- (2) 次世代シーケンサによるゲノムデータベース構築とシステム評価、未知病原体検出法の開発。
- (3) 地衛研で対応可能な検出法を決定し、迅速検査の対応分担などの構築を図る。
- (4) ホームページと臨床診断支援法の充実とともに、機能評価し、支援ネットワークを構築する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 早期検知と患者の治療対応で感染拡大防止、国民の不安軽減、バイオテロ事件等への抑止効果が期待できる。

#### VI. 本研究の成果

- (1) バイオテロ対応ホームページ 2008 の作製とその CDROM 版を作成しおよそ 80 地研に配布した。2009 年度は感染症専門医を研究協力者に加えて内容を改訂・充実し、およそ 1,200 病院等へ CDROM を配布し評価を得た。首脳会議が行われた際に対応チームに配布した。
- (2) 迅速診断法の普及を目的とした機器等の調査及びウイルス検査 2 キット(2009 年)と 1 キット(2010 年)に配布し地衛研での評価を行った。評価をもとに改善し配布した。
- (3) 環境検体由来のバイオテロ関連病原体検出イムノクロマトキット市販品の評価を行ない、使用には注意が必要であることがわかった。報告書に記載した。

発表論文等

研究代表者 (佐多徹太郎)

- (1) Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol*:(in press), 2010.
- (2) Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagsawa K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue S, Sata T, Katano H: LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism. *Jpn J Infect Dis* 63:36-40, 2010.

(3) Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H: Virus detection using viro-adembads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. **Jpn J Infect Dis** 63:52-54, 2010.

分担研究者 (森川 茂)

(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. **J Virol Methods**. 2010 in press.

(2) 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.

(3) Saijo M, Ami Y, Suzuki 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**. 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71.

(4) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzuki 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.

分担研究者 (高橋英之)

Matsuura M, Takahashi H, Watanabe H, Saito S, Kawahara K. Immunomodulatory effects of Yersinia pestis lipopolysaccharides on human macrophages. **Clin Vaccine Immunol**. 2010 Jan;17(1):49-55.

分担研究者 (堀野敦子)

Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. **Intern Med**. 2010;49(5):491-5.

分担研究者 (牧野壮一)

(1) Thanongsaksrikul J, Srimanote P, Maneewatch S, Choowongkamon K, Tapchaisri P, Makino S-I, Kurazono H, Chaicumpa W.: A VHH that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. **J Biol Chem** 285: 9657-9666, 2010.

(2) Matsui T, Takita E, Sato T, Aizawa M, Ki M, Kadoyama Y, Hirano K, Kinjo S, Asao H, Kawamoto K, Kariya H, Makino SI, Hamabata T, Sawada K, Kato K.: Production of double repeated B subunit of Shiga toxin 2e at high levels in transgenic lettuce plants as vaccine material for porcine edema disease. **Transgenic Res**. 2010 Oct 24. [Epub ahead of print]

分担研究者 (高橋元秀)

(1) 高橋元秀, 鎌田洋一: ポツリヌス菌と神経毒素、食中毒における毒素産生細菌とその毒素6, 食品衛生研究、2. 7-14、2010

分担研究者 (黒田 誠)

(1) Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S.: Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of Bacillus anthracis species and strains among B. cereus group species. **J Clin Microbiol**. 2010 Aug;48(8):2821-9.

(2) Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T.: Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. **PLoS One**. 2010 Apr 23;5(4):e10256.

(3) Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M.: Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in Bacillus anthracis. **Antimicrob Agents Chemother**. 2010 Jul;54(7):2787-92.

(4) Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T.: The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. **Jpn J Infect Dis**. 2010 Jan;63(1):67-71.

(5) Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S.: Phylogenetic typing of Bacillus anthracis isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. **J Vet Med Sci**. 2010 Jan;72(1):93-7.

分担研究者 (田中智之)

Nakauchi M, Yasui Y, Miyoshi T, Minagawa H, Tanaka T, Tashiro M, Kageyama T.: One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. **J Virol Methods**. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

分担研究者 (岩本愛吉, 松本哲哉, 中村 修)

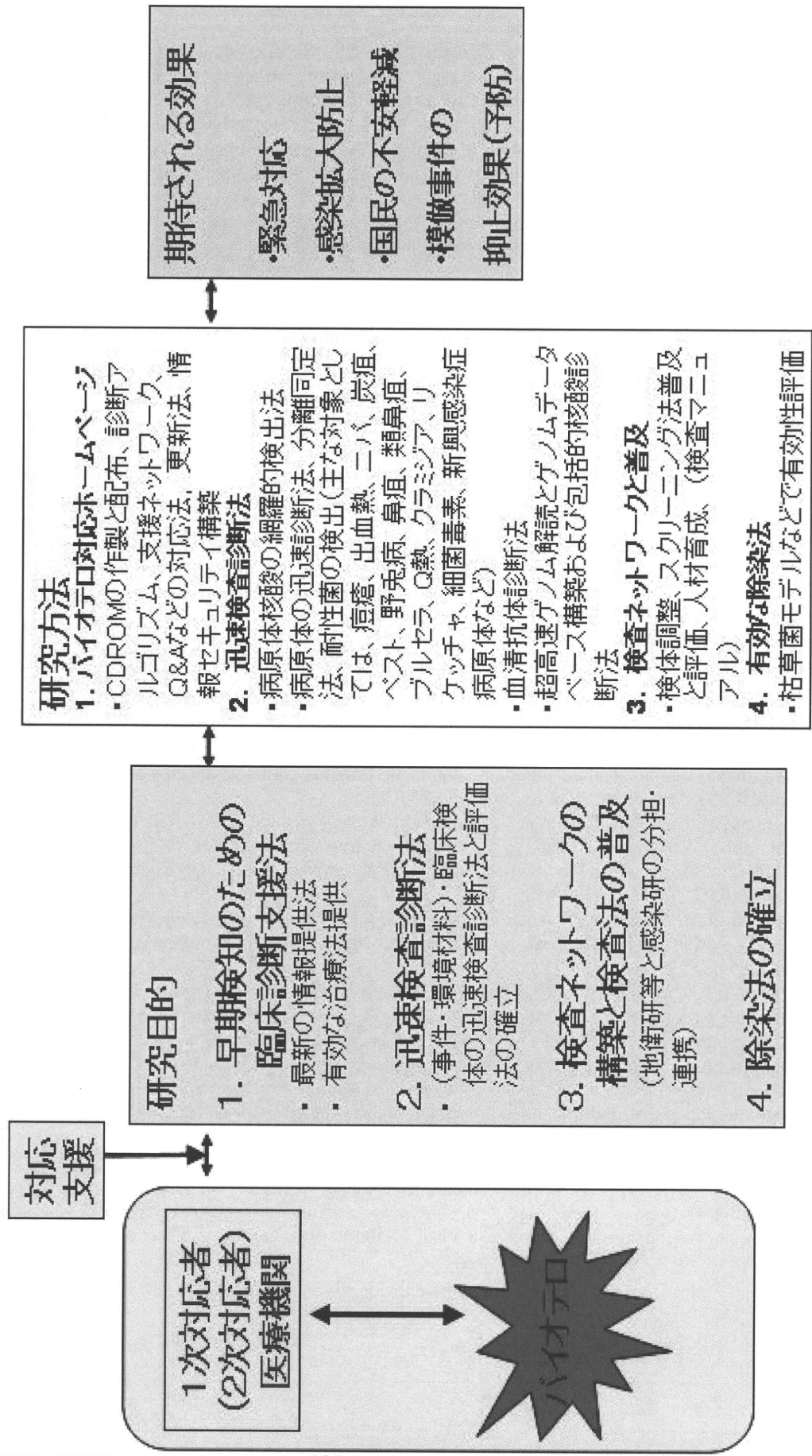
(1) バイオテロ対応ホームページ (<http://bt.sfc.wide.ad.jp/>) の立ち上げと同内容の CD-ROM 作成と地衛研および病院等への配布

(2) 松本哲哉. 新・隔離予防策とバイオテロ対策—日本における対策の現況. 感染対策 ICT ジャーナル. 3:201-206, 2008

Ⅶ. Ⅲ(3年間の研究成果)の概要図解

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 H20-新興・一般-006

テロの可能性のある病原体等の早期検知・迅速診断法の開発と評価法の確立に係わる研究―研究者代表者:佐多徹太郎(国立感染症研)



## ○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年～ 東京大学医科学研究所病理学研究部助手  
 1986年～ 国立予防衛生研究所・病理部（現国立感染症研究所感染病理部）主任研究官  
 1988年～ 同・エイズ研究センター感染病理室長  
 2000年～ 同・感染病理部・部長

### ・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

青山友三教授および倉田 毅助教授（東京大学医科学研究所病理学研究部）  
 倉田 毅部長（国立予防衛生研究所および国立感染症研究所）

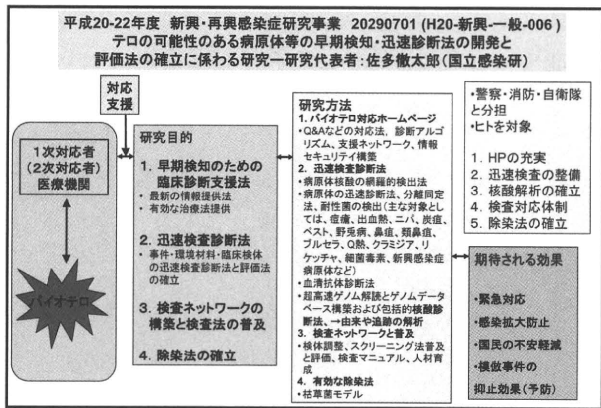
### ・主な研究課題

ウイルス感染症の病理学（感染病理学）

### ・これまでの研究実績

1. Takahashi RH, Tobiume M, Sato Y, Sata T, Gouras GK, Takahashi H. Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in Alzheimer's disease brain. **Neuropathology**, in press (Pub Med ID: 21062360)
2. Sato Y, Shimonohara N, Hanaki K, Goto M, Yamakawa Y, Horiuchi M, Takahashi H, Sata T, Nakajima N. ImmunoAT method: An initial assessment for the detection of abnormal isoforms of prion protein in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **J Virol Methods**. 165:261-267, 2010
3. **Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T.: Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. PLoS One. 2010 Apr 23;5(4):e10256.**
4. **Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M.: Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in Bacillus anthracis. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jul;54(7):2787-92.**
5. Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, Masujin K, Shimizu Y, Shu Y, Kurachi M, Kasai K, Murayama Y, Fukuda S, Onoe S, Hagiwara K, Yamakawa Y, Sata T, Mohri S, Okada H, Yokoyama T. Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. **Emerg Infect Dis**. 2010 Jul;16(7):1151-4.
6. **Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):67-71.**
7. **Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H. Virus detection using viro-adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):52-4.**
8. **Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagsisawa K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue S, Sata T, Katano H. LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism. Jpn J Infect Dis. 2010 Jan;63(1):36-40.**
9. Nakamura T, Sato Y, Watanabe D, Ito H, Shimonohara N, Tsuji T, Nakajima N, Suzuki Y, Matsuo K, Nakagawa H, Sata T, Katano H. Nuclear localization of Merkel cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. **Virology** 2010, 398: 273-279
10. Katano H, Kano M, Nakamura T, Kanno T, Asanuma H, Sata T: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. **J Med Virol**:(in press), 2010.
11. **Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa Y, Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, Sata T: Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry, Pathol Int 2009, 59:555-566**
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**. 2008 Jun;172(6):1625-37

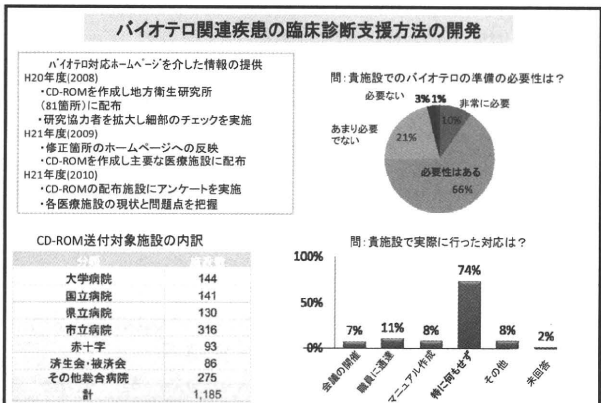




**研究内容**

1. バイオテロ対応ホームページ (研究分担者と多数のICD等研究協力者)
  - Q&Aなどの対応法、診断アルゴリズム、支援ネットワーク、情報セキュリティ構築
  - HP改訂法の進捗、CD-ROMの作成と配布 (地衛研等-80と病院-1200で、インターネット使用できない環境にあるところ)、さらに23疾患の追加中
2. 迅速検査診断法 (検査法開発の研究分担者)
  - 病原体等の迅速診断法 (抗原、ゲノム)、血清抗体診断法の開発等 (主な対象: 痘毒、出血熱、ニバ、炭疽、ペスト、野馬病、鼻疽、類鼻疽、ブルセラ、Q熱、クラミジア、リケッチャ、細菌毒素、新興感染症病原体など)
  - 超高速ゲノム解読とゲノムデータベース構築および包括的核酸診断法 (黒田)
3. 検査ネットワークと普及 (検査対応体制関連研究分担者)
  - 白い粉事件の経験から危機管理、検体調整・スクリーニング法の評価、キットの配布、検査マニュアル、人材育成に役立てた。
  - 検査ネットワーク (地衛研と感染症研) における病原体等迅速検査・スクリーニング検査法の開発・評価・配布 (病原体の核酸の網羅的検出法: ウイルス検出用2種と細菌1種類)
4. 有効な除染法
  - 枯草菌モデル
  - HPの改訂に利用

ヒト由来検体 (理療由来検体)



**生物テロ対策用ウイルス網羅的検出リアルタイムPCRキット**

**概要**

生物テロに使用される可能性のあるウイルスの検出を簡易・迅速に検出することを目的としたキット

**特徴**

- FAM-およびFRET-検出プロブにより一つのウェルで2種類のウイルスを検出。
- 3時間で29種類のウイルスの検出が可能 (右表)。
- Multiplex one step-real time RT-PCRによりDNAウイルスもRNAウイルスも同時検出可能。

**外部評価、頒布**

- 平成21年度に地衛研10施設で外部評価。
- 平成22年11月に最終版を8施設に頒布。

DNAウイルス (8)	
炭疽ヘルペスウイルス1型	水痘帯状疱疹ウイルス
3 サル痘ウイルス	1 天然痘ウイルス
3 Bウイルス	
RNAウイルス (24)	
1 エボラウイルス	1 マールブルグ
4 デングウイルス1型	1 クリミアコン出血熱ウイルス
3 腎臓性出血熱ウイルス プーブラ	3 腎臓性出血熱ウイルス ドブバ
3 リフトバレーウイルス	3 腎臓性出血熱ウイルス ソウル
1 ラッサウイルス	3 ハンタウイルス肺症候群ウイルス (S in number)
1 麻疹出血熱ウイルス ガナリト	1 麻疹出血熱ウイルス フニン
1 麻疹出血熱ウイルス サビア	1 麻疹出血熱ウイルス マチウボ
3 東部鳥類ウイルス	3 ベネズエラ鳥類ウイルス
3 巨大顆粒ウイルス	3 西部鳥類ウイルス
4 インフルエンザA	2 SARSコロナウイルス
3 ギニニ媒介性鳥類ウイルス	4 高病原性インフルエンザウイルス (H5N1)
3 ニバウイルス	3 ヘンドラウイルス
コントロール (4)	
Beta-in	1 HMPN-DNA
HMPN-RNA	Beta-2-microglobulin

**定量的PCR法を用いたオルソポックスウイルスの検出法**

**概要**

生物テロに使用される可能性のある天然痘を含むオルソポックスウイルス遺伝子を簡易・迅速に検出することを目的としたキット

**特徴**

- SYBR Green Assayによる定量的なオルソポックスウイルス遺伝子共通検出法 (2種類)
- 天然痘ウイルスを含むオルソポックスウイルス特異的な遺伝子検出が可能 (リゾデント誘起)
- 2種類とも数〜10コピーの検出感度

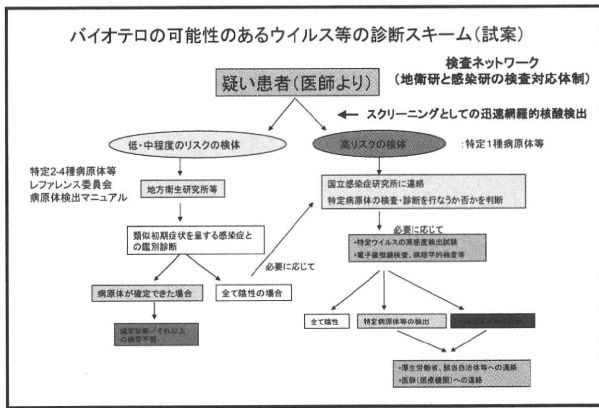
ウイルス	株
天然痘	India 1964
	Bangladesh 1975
	Sumatra 1970
	Nepal 1973
Monkeypox	Zr-599
Vaccinia	Lister
	WR
	IHDW
Cowpox	Brighton Red
Camelpox	J1
Ectromelia	Hamstead

HSV-1は検出されない

**H20〜22年度の成果と課題**

1. 網羅的病原細菌迅速検出系の確立—特にバイオテロ関連病原体—
  - ① 網羅的遺伝子検出系の開発 (地衛研等への配布のためのキット化)
    - カテコラムの細菌感染症のリアルタイムPCR法によるキット化
  - ② カクテルPCR法による網羅的病原体検出法の作成
  - ③ 網羅的抗原・抗体検出系 (右図)
    - a. 毒素検出系の確立
      - ヘリコバクターおよびネisseria毒素のiM/クオットキット完成→実証試験へ
      - リソ毒素に対する抗体検出済み→キット化のための実証試験が必要
    - b. 菌体検出・増殖用の網羅的検出系
      - 非特異反応を低減するための陽性抗体作成: プレセラ、野馬病のマチカラム作成
      - 野馬病と類鼻疽の組織表層抗原精製と抗体作成: サンドイッチELISA作成
    - c. 血清抗体検出用網羅的検出系: ワクチン効果の検証や感染歴の把握→炭疽菌の検出系完成し、他の抗原をマテキット化が課題
  - ④ 迅速な野外検体処理法 (白い粉、土壌、水、食品etc)
    - FTAカードによるDNA検出
    - ✓ 液体をスポイトするだけでDNA抽出可能で、多くの病原体に使用可能で、長期保存と輸送可能

ほか、ボツリヌス毒素やリケッチャの検出系は、ほかの研究分担者と地衛研の研究協力者とともに開発中



### ヒト野兔病生検組織(1951-1963年)の免疫組織化学とゲノム検出

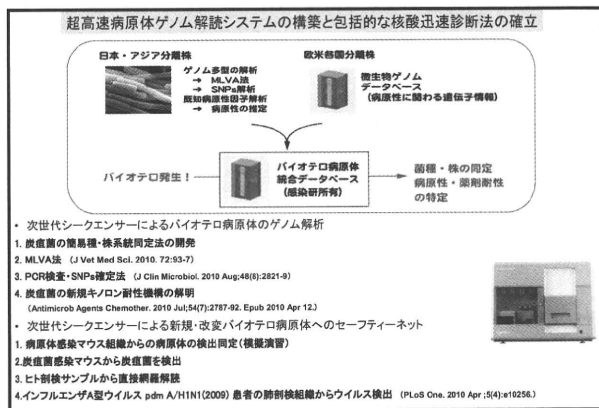
四類感染症

- 皮膚19症例(M:15例, F:4例), リンパ節54症例(57検体;M:43例, F:11例)。  
1) HE染色による形態観察(太原研究所の標本)
- 免疫組織化学(ウサギポリクローナル抗体とモノクローナル抗体)  
皮膚とリンパ節の9検体を発症からの日数で選択
- 皮膚およびリンパ節切片でのPCR法によるゲノム検出

TABLE 1. *F. tularensis* TmMan primers and probes

Gene target	Primer or probe <sup>a</sup>	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
ISFtu2	ISFtu2F	TTGGTAGAATCACTTGGTGGGATAAC	97
	ISFtu2R	TGGTTTTAACTTGGACACAAATATTC	
	ISFtu2P	AAAAATCAATGCTATGACATGATCTTTAGGTAATCCA	
	ISFtu2B	TGGGATATATACAGACACAGAGTAAACA	
23kDa	23kDaF	GGATGAGAACTATATATGACACTAGG	84
	23kDaR	TCAGTCTCATATAAATGCTCCGCA	
	23kDaP	ATTACAAATGGACGGCTCCAGA	
	23kDaB	TGCCCAAGTTTATCTTCTCT	
nif	Tu48F	TTCTAAGTGGCTATATACAGGCTTCCCAATTAAG	91
	Tu48R	ATCTAGCAGGCTCAGCAACACGT	
	Tu48P	GTCACAGCTTCTGGACATTTAGATA	
	Tu48B	CAAACTTAAGCACCCACCAATCCAAA	
p64	FopAF		87
	FopAR		
	FopAP		

<sup>a</sup> F, forward primer; R, reverse primer; P, probe.



### 迅速検査診断法等の開発状況のまとめ-1

- ウイルス遺伝子を検出する網羅的PCR法の対象ウイルスを163種類に拡充し、うち可能性の高いウイルスを選択し試作キットを製作し、地研に配布し、評価を行った。
- 環境検体からの核酸抽出法として磁気ビーズを用いて回収し検出する方法およびLAMP法を応用して携帯型炭疽菌核酸検出法を開発した。
- 新規エボラウイルスであるブンディージョ種を検出できるqRT-PCR法を開発した。天然痘を含むポックスウイルス共通遺伝子検出法をキット化し、地研に配布して評価を行った。
- ニパウイルスのantigen capture ELISA、狂犬病ウイルスの抗原検出ELISAを開発した。
- ペスト菌の抗原検出を目的とした蛍光抗体法を製作した。
- B. pseudomallei*と*B. mallei*の菌株コレクションを増強し、*B. pseudomallei*のLAMP法の検討を行い、感度の高いprimer群を設計できた。タイで検出中。
- カクテルPCRと蛍光ビーズ法を組み合わせた迅速検出法の構築に成功した。
- 野兔病菌に対する免疫学的迅速同定法ELISA系を構築した。
- ヒト病理検体における野兔病菌の抗原、核酸の検出

### 迅速検査診断法等の開発状況のまとめ-2

- リケッチア、クラミジアおよびコクシエラ等の迅速検出法の開発を目的として、PCR、Realtime PCR、Lamp法の開発を行い、地方衛生研究所で評価している。
- ボツリヌス毒素を型特異的に検出できるA型毒素検出系イヌノクマトキットを製作し、15ヶ所の地方衛生研究所に配布し検討した。
- サンドイッチ型/PCRによるA型毒素検出系を開発し、B型毒素についても開発し評価検討している。
- 炭疽菌・日本分離株の全ゲノム解析を行い、株固有のSNPsを同定し、迅速系統分類法を開発した。
- 炭疽菌キノロン耐性株の全ゲノム上の低感受性化に関与する薬剤排泄系の変異部位を同定した。
- 感染実験動物およびヒト検体から直接網羅配列解読を行い、病態に関連する病原体候補を包括的に同定するシステムを確立した。
- 芽胞の消毒薬抵抗性の大きい順は、枯草菌 ≧ 炭疽菌 > ボツリヌス菌であった。
- 次亜塩素酸ナトリウムと酢との混合液が、すみやかな殺芽胞効果を示すことが判明した。



## 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大流行時の公衆衛生対策に関する研究

課題番号：H20-新興-一般-007

予定期間：H20年度からH22年度まで

研究代表者：押谷 仁

所属研究機関：東北大学

所属部局：大学院医学系研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 12,000,000円 2年目 7,000,000円 3年目 6,300,000円 計 25,300,000円

### I. 研究の意義

インフルエンザによるパンデミックが発生した際には甚大な健康被害が起こるだけでなく、その影響は社会全体に及ぶと考えられる。その対策としてワクチンや抗ウイルス薬といった薬物的対応とともに様々な公衆衛生対応を同時に行ない、被害を最小限に抑えることが重要である。2009年には新型インフルエンザ(A/H1N1)によるパンデミックが発生して世界中で被害が拡大したが学校における休業措置などの公衆衛生対応による被害軽減が進められた。本研究では公衆衛生対応を中心とした地域におけるパンデミックに対する効果的な対応について研究を行う。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 我が国での新型インフルエンザのパンデミック時における公衆衛生対策の実施に関する課題点が明らかになる。
- (2) 実際に公衆衛生対策を実施するために必要なインフルエンザの疫学的知見を集めることで多角的に検討することができる。
- (3) 地域レベルでの公衆衛生対応を含めた包括的な新型インフルエンザ対策について推進することが期待される。

### III. 3年間の研究成果

#### 研究代表者(押谷仁)

- (1) 地域(特に地方自治体)における新型インフルエンザ対策準備の状況および課題点についてアンケート調査による情報収集を行った。
- (2) ニュージーランドでの新型インフルエンザ対策準備の状況に関して国レベル、地方自治体レベル、医療施設レベルの視察を通して情報収集を行った。
- (3) インフルエンザに関する(とくにインフルエンザの伝播経路)文献調査を行った。
- (4) パンデミック(H1N1)2009の発生をうけて世界保健機関(WHO)での対策の基本方針作成に参加した。
- (5) パンデミック(H1N1)2009の流行疫学像に関してデータ解析を定期的実施して情報発信を行った。
- (6) 学校閉鎖の戦略を考えるための基本方針を平成20年度にまとめた学校閉鎖に関するエビデンスのまとめを改変して作成した。
- (7) パンデミック時の医療体制を考える上で2008/09インフルエンザシーズンの医療機関での推定外来受

診数を推定して季節性インフルエンザによる医療機関への負荷を検討した。

(8) パンデミック(H1N1)2009 流行時の学校の臨時休業措置に関するデータを収集して後ろ向きに解析を行っている。

(9) 2010/2011 シーズンにおける学校の休業措置のインフルエンザの流行拡大への影響に関する前向き研究を行っている。

#### 研究分担者(森兼啓太)

(1) 米国における新型インフルエンザ対策の事前準備及び対応について情報収集を行った。健康危機管理としての新型インフルエンザの位置づけや演習を通しての対策の推進などが共通していることが明らかとなった。

(2) パンデミック(H1N1)2009 の流行疫学像に関してデータ解析を定期的実施して情報発信を行った。

(3) パンデミック(H1N1)2009 の流行を先に経験したオーストラリアでの対応および課題点について情報収集を行い、わが国へフィードバックを行った。

(4) パンデミック(H1N1)2009 の流行後での新型インフルエンザ対策の総括および今後の課題に関して米国およびカナダでの情報収集を行う。

#### 研究分担者(神垣太郎)

(1) インフルエンザにおける公衆衛生対策（とくに学校の休業措置）に関する文献調査を行った。

(2) パンデミック時の医療体制を考える上で 2008/09 インフルエンザシーズンの医療機関での推定外来受診数を推定して季節性インフルエンザによる医療機関への負荷を検討した。

(3) 市町村レベルでの超過死亡数の把握のためのモデルを研究協力者とともに構築した。

(4) 学校閉鎖の戦略を考えるための基本方針を平成20年度にまとめた学校閉鎖に関するエビデンスのまとめを改変して、厚生労働省から発行されたガイダンスとして配布されている。

(5) 公衆衛生対策（とくにインフルエンザの伝播経路）に関する文献調査を行った。

(6) パンデミック(H1N1)2009 流行時の学校の臨時休業措置に関するデータを収集して後ろ向きに解析を実施している。

(7) 2010/2011 シーズンにおける学校の休業措置のインフルエンザの流行拡大への影響に関する前向き研究を行っている。

#### 研究分担者(小坂健)

(1) 1188 の市町村を対象に新型インフルエンザ対策の現状についてアンケート調査を実施し、対策委員会は88.4%で設置されておらず、65%で行動計画が未作成であることを明らかにした。

(2) 全国の介護老人福祉施設（特養）を対象に、今回の新型インフルエンザの流行状況、併設サービス停止などの基準の設定、ワクチン接種における課題、医療との連携、施設のBCPの対応状況などに関する調査を実施した。

#### 研究分担者(和田耕治、平成20年度のみ)

(1) N95 マスク着用に関する啓発ビデオを作製した。

(2) 医療施設におけるまんえん期の事業継続計画ガイダンスを作成した。

#### IV. 今後考えられる新たな課題

(1) パンデミック(H1N1)2009 流行時に実施された公衆衛生対策に関する知見の集約

(2) インフルエンザ流行時における公衆衛生対応の効果および限界に関する疫学的評価研究

## V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 地域での事前準備の状況および課題点に関してまとめ、医療施設のBCPガイドラインを策定した。
- (2) パンデミック(H1N1)2009 流行時の疫学像に関する定期的な情報発信および学校の休業措置に関する科学的根拠の提示

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

### ガイドライン・マニュアル (3編)

神垣太郎、押谷仁. 新型インフルエンザ流行時における学校閉鎖に関する基本的考え方. 厚生労働省事務連絡. 平成21年9月24日発

神垣太郎、押谷仁. 新型インフルエンザ A(H1N1)の世界と日本の現状と課題. 全国保健所長会ウェブサイト ([http://www.phcd.jp/shiryu/shin\\_influ.html](http://www.phcd.jp/shiryu/shin_influ.html)) 平成21年9月24日掲載

押谷仁. 新型インフルエンザ A(H1N1)総論: 世界の状況とわが国の対応. 全国保健所長会ウェブサイト ([http://www.phcd.jp/shiryu/shin\\_influ.html](http://www.phcd.jp/shiryu/shin_influ.html)) 平成21年10月23日掲載

和田耕治. 新型インフルエンザまん延期の診療継続計画作り. 平成21年4月30日.

### 発表論文 (英文3編、和文2編、総説(抜粋)15編)

Nukiwa N, Kamigaki T, Oshitani H. Fatal cases of pandemic (H1N1) 2009 influenza despite their early antiviral treatment in Japan. *Clin Infect Dis*. 2010 Oct 15;51(8):993-4.

Kamigaki T, Oshitani H. Epidemiological characteristics and low case fatality rate of pandemic (H1N1) 2009 in Japan. *PLoS Curr*. 2009 Dec 20;RRN1139.

河村真人, 神垣太郎, 貫和奈央, 橋本亜希子, 玉記雷太, 押谷仁. 拡大サーベイランスに基づく長野県佐久地域の2008/09シーズンにおけるインフルエンザ様患者数に関する検討 *感染症学雑誌* (0387-5911)84 巻5号 Page575-582, 2010

貫和奈央, 神垣太郎, 橋本亜希子, 河村真人, 玉記雷太, 押谷仁. 2008~2009シーズンの庄内地域におけるインフルエンザ外来患者からみた医療施設への負荷の検討 *新型インフルエンザ A(H1N1)を視野に入れて 感染症学雑誌* (0387-5911)84 巻1号 Page52-58, 2010

押谷仁 【検証「パンデミックインフルエンザ2009」】 パンデミックインフルエンザ(H1N1)2009の流行の疫学的特徴. *公衆衛生* (0368-5187)74 巻8号 Page647-651, 2010

押谷仁【新型インフルエンザ・パンデミック 予測と対策】 WHOの新型インフルエンザ対策. *日本医師会雑誌* (0021-4493)137 巻10号 Page2091-2095

神垣太郎, 玉記雷太, 押谷仁. 【パンデミックインフルエンザ 最新の知見と今後の展望】 世界と我が国の新型インフルエンザ(H1N1)2009の教訓 *日本臨床* (0047-1852)68 巻9号 Page1605-1610, 2010

神垣太郎, 押谷仁. 【どうする今冬のインフルエンザ】 新型インフルエンザ A(H1N1)の世界動向 *臨床とウイルス* (0303-8092)38 巻1号 Page130-135, 2010

玉記雷太, 神垣太郎, 押谷仁. 公衆衛生: NPI(non-pharmaceutical intervention). *インフルエンザ* (1345-8345)10 巻4号 Page315-321, 2009

神垣太郎, 橋本亜希子, 押谷仁. 医療機関におけるインフルエンザ感染の拡大について新型インフルエンザ大流行時における医療対応に関する疫学研究. *化学療法の領域* (0913-2384)25 巻8号 Page1755-1760.

Ebihara S, Aida J, Freeman S, Osaka K. Infection and its control in group homes for the elderly in Japan. *J Hosp Infect*. 2008 Feb;68(2):185-6.

小坂健 市町村でのパンデミックへの備えは? 肥満と糖尿病 8 巻 564-565, 2009

小坂健 市町村におけるパンデミックへの備え 2008年8月に実施した市町村アンケート調査結果から *週刊医学界新聞* 第2812号 2009年1月1日

森兼啓太 海外感染対策事情 オーストラリアにおける新型インフルエンザ対応 *感染制御* 6 巻1号 Page7-10, 2010

森兼啓太 変わりゆく新型インフルエンザ対策 *臨床病理* (0047-1860)58 巻3号 Page254-262, 2010

森兼啓太 新型インフルエンザを取り巻く現在の動向と個人防護具の使用 *Nonwovens Review* 19(4):29-33, 2009

森兼啓太 医療従事者のための新型インフルエンザへの具体的な対応 *INFECTION CONTROL* 18(7):642-646, 2009

森兼啓太 新型インフルエンザに関する国の行動計画とその運用指針の変更 *感染対策 ICTジャーナル* 2009; 4(Supp. 1):35-42

森兼啓太 医療従事者のための新型インフルエンザへの具体的な対応: 本格的な流行へ向けて *INFECTION CONTROL* 18(10):964-966, 2009

和田耕治 【新型インフルエンザの対応策について】 一般企業における新型インフルエンザ対策としての感染防護具の基礎知識 *産業保健* 2114 巻4号 Page10-11

**Ⅶ. Ⅲ (3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。

