

研究分担者(安藤秀二)

(1) Q熱コクシエラの迅速検査法を確立した。

研究分担者(宮崎義継)

(1) ヒストプラスマ属の特異的な遺伝子診断系を構築し、当該真菌が環境中に生息している可能性が高い東南アジアの土壌を採取して、検査系プロトコルの有効性を確認した。

研究分担者(堀野敦子)

(1) 検討中の類鼻疽菌の LAMP 法について、国内では使用できない類鼻疽の臨床検体による検出系の検討をタイで行った。

(2) 鼻疽菌の LAMP 法のプライマーを検討し、候補となるプライマー群について性能を検討中。

(3) 類鼻疽・鼻疽の病原体検出マニュアルを作成。

研究分担者(黒田誠)

(1) 独自に構築した網羅病原体検出法にて、不明感染症の腋窩膿瘍から野兔病菌を同定および病原生の評価に成功した。

研究分担者(佐多徹太郎)

(1) 腸管出血性大腸菌感染症の剖検例について、その細菌の電顕、病理組織とベロ毒素の病理組織学的検出法の検討を行った。

研究分担者(永田典代)

(1) バイオテロに用いられる可能性のある各種細菌のレファレンス標本を作製した。

(2) ウイルス検出の精度向上を目指し、免疫電顕の基礎検討のためモノクローナル抗体を作製した。

研究分担者(倉園久生)

(1) コレラ毒素 (CT) 及び腸炎ビブリオの TDH に対する免疫学的同定法 (ELISA) を構築した。

(2) 黄色ブドウ球菌の ETA および ETB の精製を行った。

研究分担者(田中智之)

(1) バイオテロ特定真菌迅速診断キットの評価を行った。

研究分担者(岩本愛吉)

(1) バイオテロに対する臨床診断支援として、バイオテロ対応ホームページと維持、診断アルゴリズムの高度化、臨床診断支援ネットワークの確立を行った。

研究分担者(松本哲哉)

(1) 各医療機関の感染対策に従事するスタッフ向けに、院内でバイオテロ対策に利用できる資料を作成した。

#### IV. 平成 24~25 年度の課題

(1) 電顕用レファレンス標本の作製を継続する。

(2) ウイルス検出精度向上のための免疫電顕法を確立する。

(3) 免疫組織化学法を中心とする感染病理診断法を確立する。

(4) ヒストプラスマ症とコクシジオイデス症に関して、環境ならびに臨床検体を用いた検査プロトコルのうち、特異遺伝子検出のステップの簡易化を図る。

(5) 鼻疽菌の LAMP 法による検出系を完成させ、類鼻疽菌、鼻疽菌の LAMP プライマーセットとする。

- (6) 炭疽菌分離株のゲノム解析を利用し新検査系を確立する。
- (7) バイオテロの危険性のあるリケッチア属のゲノム解読および公開情報を合わせたデータベースを作成する。
- (8) CT および TDH に対する IC を構築すると共に両毒素に対する ELISA 系の感度を向上させる。
- (9) ボツリヌス毒素の免疫学的同定法の構築を行なう。
- (10) バイオテロ対象の他の特定病原体について、迅速診断キットの評価を地方衛生研究所を対象に行なう。
- (11) バイオテロ模擬訓練等を行い、危機管理意識を高める。
- (12) 各医療機関で参照可能なバイオテロ対策のガイドラインやマニュアル作成を行う。
- (13) バイオテロの教育用資材を充実させ、院内での教育に活発に活用してもらう。
- (14) インターネットによる新たな啓発活動の可能性を検討し、実施する。

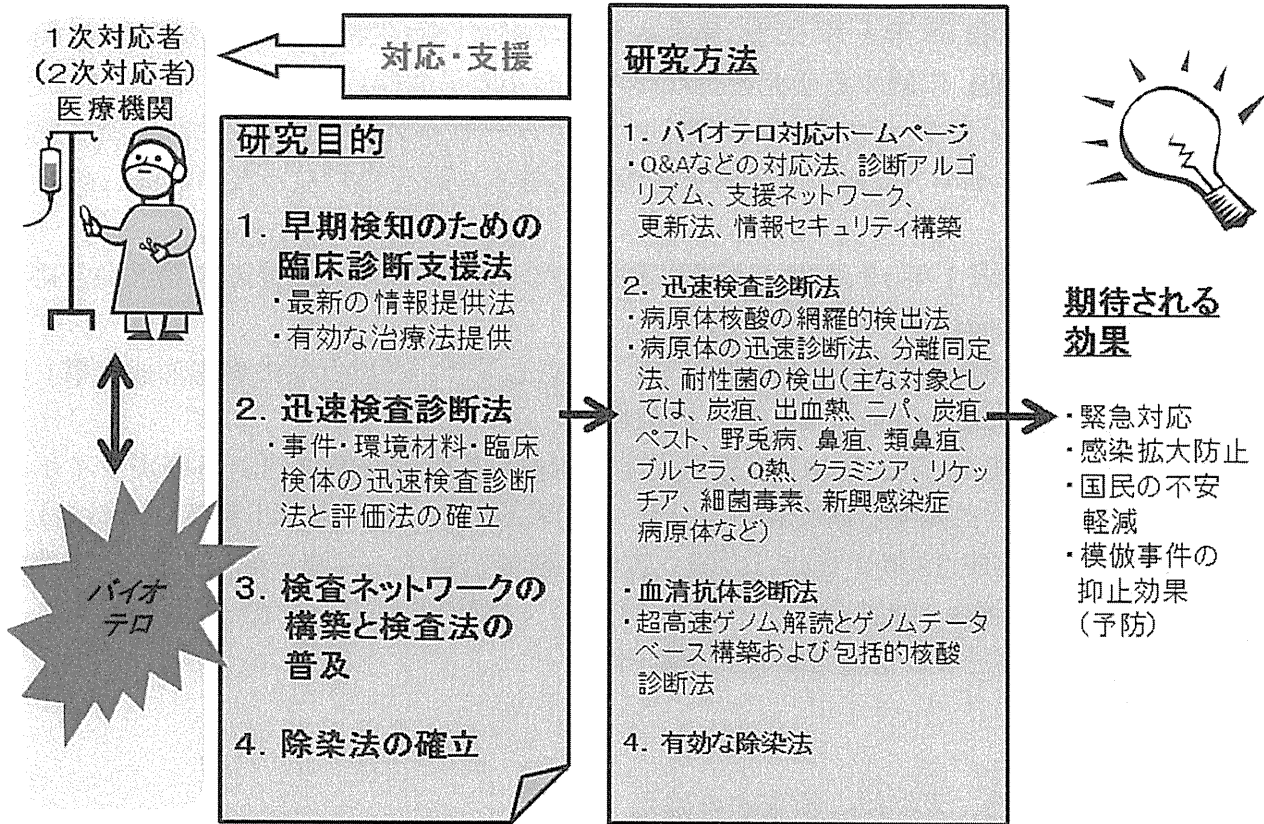
## V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) バイオテロの迅速な検出が可能となり、感染防止策等の迅速な対応策の策定が可能となる。
- (2) 国民のバイオテロに対する不安が軽減され、バイオテロ事件および模倣事件に対する抑止効果も期待できる。
- (3) バイオテロ対策の必要性について、各医療機関の認識を高めることができる。
- (4) 国内の状況を考慮した、実践的なガイドラインやマニュアルを作成することで、バイオテロ対策をより充実させることができる。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. J Inf Dis 201, 204(9):1395-402
- (2) Taniguchi S, Watanabe S, Masangkay JS, Omatsu T, Ikegami T, Alviola P, Ueda N, Iha K, Fujii H, Ishii Y, Fukushi, S Saijo M, Kurane, I, Kyuwa S, Akashi H, Yoshikawa Y, Shigeru Morikawa, S. Reston Ebola Virus Antibodies in Bats, the Philippines. Emerg Infect Dis, 2011 17(8):1559-60
- (3) Saijo M, Morikawa S, Kurane I. Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. Future Virology, 2010, 5(6): 801-809
- (4) 亀井克彦・渋谷和俊・宮崎義継. 輸入真菌症の診断・治療指針. 2011年, 協和企画, 東京.
- (5) 倉田 季代子, 貫井 義久, 島田 裕之, 井上 幸久, 吉村 信行, 堀野 敦子: ベトナムから帰国後空洞病変で発症し, 再燃時多発肺結節を認めたメリオイドーシスの 1 例. 日呼吸会誌, 49(6): 443-448, 2011

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等



本年度の成果

- 1) 特定病原体等に対する遺伝子検出法、抗原抗体検出法の基盤確立
- 2) 毒素迅速検出法等の迅速診断法の基盤確立
- 3) 網羅的ウイルス検出法、網羅的細菌検出法、超高速ゲノム解読法の確立
- 4) 未知の病原体等検出法、病原体のデータベース等の基盤確立
- 5) 電子顕微鏡を用いた検出法、免疫組織化学的検出法の基盤確立
- 6) 検体調整法とスクリーニング法の普及
- 7) 地方衛生研究所や検査機関での対応と検査ネットワークの整備
- 8) 診断検査支援のため、関係機関との情報交換を密にするシステムの確立

## ●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)

昭和 53 年東北大学医学部卒業

昭和 53 年 4 月 1 日ー昭和 55 年 3 月 31 日:東北大学医学部附属脳疾患研究施設脳神経内科研修医;  
神経内科の研修ともに「ウイルス性脳炎の免疫機序」の研究を行なった(板原克哉教授)

昭和 55 年 4 月 1 日ー昭和 58 年 1 月 12 日:東北大学歯学部口腔微生物学講座、医員;「単純ヘルペスウイルスの潜伏感染」に関する研究を行なった(熊谷勝男教授)

昭和 58 年 1 月 12 日ー昭和 60 年 4 月 30 日:米国マサチューセッツ大学医学部内科感染症免疫学部門、講師;「デングウイルスに対する非特異的免疫応答」の研究を行なった(Francis A. Ennis 教授)

昭和 60 年 5 月 1 日ー平成 1 年 12 月 31 日:同助教授;「デングウイルスに対する細胞性免疫応答」の研究を行なった(Francis A. Ennis 教授)

平成 2 年 1 月 1 日ー平成 7 年 5 月 31 日:同准教授;独立し「デング出血熱の病態形成機構」の研究を行なった(共同研究者 Francis A. Ennis 教授)

平成 7 年 6 月 1 日ー平成 10 年 3 月 31 日:近畿大学医学部細菌学講座教授;「日本脳炎ウイルスに対する細胞性免疫応答」に関する研究を行なった(共同研究者、神戸大学小西英二助教授)

平成 10 年 4 月 1 日ー平成 22 年 9 月 30 日:国立感染症研究所ウイルス第一部、部長;「天然痘・サル痘、ウイルス性出血熱、蚊媒介性ウイルス感染症」に関する研究を行なっている。

平成 22 年 4 月 1 日ー現在:国立感染症研究所副所長

### ・主な研究課題

- 1) ウイルス性出血熱、天然痘の検査法の確立
- 2) 蚊媒介性ウイルス感染症(デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス)の検査法の確立
- 3) デングウイルスに対するヒト免疫応答とデング出血熱の病態形成期所の解明

### ・これまでの研究実績

英文査読論文: 322 編、英文著書等: 23 編、和文論文: 109 編、和文著書等: 43 編

#### 2011 年度の主な論文

1) Moi, M. L., Lim, C. K., Kotaki, A., Takasaki, T. and Kurane, I.: Detection of higher levels of dengue viremia using Fc $\gamma$ R-expressing BHK-21 cells than Fc $\gamma$ R-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 203: 1405-1414, 2011.

2) Omatsu, T., Moi, M. L., Hirayama, T., Takasaki, T., Nakamura, S., Tajima, S., Ito, M., Yoshida, T., Saito, A., Katakai, Y., Akari, H. and Kurane, I.: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *Journal of General Virology*. 92:2272-2280, 2011.

3) Kitaura, K., Fujii, Y., Hayasaka, D., Matsutani, T., Shirai, K., Nagata, N., Lim, C. K., Suzuki, S., Takasak, T., Suzuki, R. and Kurane, I.: High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *Journal of Immunology*. 187:3919-3930, 2011.

## 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 『成果概要』

研究課題：潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明及び診断・治療・予防に関する研究  
課題番号：H23-新興-一般-008  
予定期間：平成 23 年度から平成 25 年度まで  
研究代表者：小林 和夫  
所属研究機関：国立感染症研究所  
所属部局：免疫部  
職名：部長

## 年次別研究費（交付決定額）：

1 年目 23,750,000 円

## I. 研究の意義

- (1) 世界人類の約 1/3 (20 億人) が結核菌に無症候潜在性感染 (日本: 2,500 万人) しているが、その細胞・分子機構 (休眠菌及び宿主因子) は不明である。
- (2) 潜在性結核菌感染から内因性再燃機序により多くの成人結核を発症するが、その対策 (病態の解明や診断・治療・予防) は不十分である。
- (3) 非結核性抗酸菌 (*Mycobacterium avium* complex: MAC など) も潜在性感染をするが、その分子機構は不明である。

## II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 潜在性結核菌・抗酸菌感染の分子機構を明らかにすることは病態解明を推進する。
- (2) 潜在性結核菌・抗酸菌の発現分子や宿主要因を明らかにすることにより、菌や宿主を標的とした診断 (免疫学的診断)・治療 (抗微生物薬)・予防 (ワクチン) 方法の開発が期待される。
- (3) 新規診断・治療・予防方法の研究開発は産官学連携を促進し、経済振興にも寄与する。

## III. 1 年間の研究成果

## ・研究代表者 (小林 和夫)

- (1) 結核菌や抗酸菌に特徴的な糖脂質と宿主免疫応答について総括した。
- (2) 抗酸菌細胞壁糖ペプチド脂質 (GPL) 代謝経路を明らかにし、血清型 (13 型) の起源を解明した。
- (3) BCG 亜型の脂質分析と亜型のワクチン効果を解明した。

## ・研究分担者 (御手洗 聡)

- (1) Sauton 培地に低酸素状態・37°C で培養されている結核菌 H37Rv 4 株 (No.4: 1964 年、No.15-17: 1968 年培養開始) について、1) RNA 抽出、cDNA の作製、2) 2 コロニーを回収、3) 低酸素培養系を作成、4) 1964 年保存 (凍結) の H37Rv を回復している。
- (2) 長期低酸素培養菌の急速凍結法による電子顕微鏡観察では生菌と死菌が混在し、形態的にも明確な差が認められた。

## ・研究分担者 (松本 壮吉)

- (1) 結核菌の細胞内増殖を抑制する宿主因子の一つを同定した。
- (2) 潜在性結核から活動性結核の再燃リスクとヒト血清抗体の出現は関連し、すなわち潜在性結核のバイオマーカー候補となる、結核菌抗原を同定した。

## ・研究分担者 (杉田 昌彦)

- (1) 休眠抗酸菌が産生すると考えられる脂質 (グリセロールモノミコール酸) を同定、精製した。

(2) 上記脂質に対する宿主応答の実態を、BCG 接種モルモットを用いて解明した。

**・研究分担者 (小出 幸夫)**

(1) 休眠期結核菌が発現する DosR 蛋白質群 (48 種類中 33 種類) に対する T 細胞応答を、結核患者 / 潜伏感染者 / 健常者で比較検討した。マウス感染実験結果から上記抗原で T 細胞応答が誘導できることを証明した。

(2) (1)の解析により、潜伏感染者の Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c に対する T 細胞応答が、結核患者や健常者と比較して上昇していることを明らかにした。

**・研究分担者 (前倉 亮治)**

(1) 結核菌糖脂質抗原による血清診断やインターフェロン- $\gamma$ 遊離試験 (Quantiferon) を用い、潜在性結核菌感染者 (32 例) を登録した。

(2) アメリカ合衆国において、多人種 (白人、アジア、黒人系) を対象として MAC 感染症の血清迅速・簡便診断キットの有用性 (感度: 77%、特異度: 94%) を確認した。

(3) 気管支内視鏡的に診断された肺 MAC 感染症における血清診断の感度: 79%、特異度: 96% であり、血清迅速診断キットの臨床的有用性を証明した。

(4) MAC 感染症迅速免疫診断キット (キャピリア MAC 抗体-ELISA、株式会社タウンズ) は体外診断用医薬品として、製造販売承認、保険医療 (保険点数: 120 点) として認められた。

(5) MAC 疾患活動性 (菌量、画像所見、炎症反応: 赤沈、CRP など) と血清抗体価の推移の関連性を解析したが、有意な相関を認めなかった。

#### IV. 今後考えられる新たな課題

(1) 潜在性抗酸菌感染の小動物実験モデルを確立し、診断・治療・予防方法の開発研究を推進する。

(2) 潜在性感染  $\rightarrow$  活動性結核・抗酸菌感染症への発病予知因子を探索する。

(3) 休眠期抗酸菌の発現遺伝子・蛋白質・脂質を同定し、診断抗原や薬剤標的候補を探索する。

(4) 休眠期抗酸菌に発現する遺伝子・蛋白質・脂質を同定し、それらに対する宿主免疫応答を解析し、ワクチン開発に基盤を提供する。

(5) 潜在性結核菌感染者を登録し、新規診断抗原を用いて、血清抗体価を測定する。

(6) 潜在性 MAC 感染症の診断系の開発を進める。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 潜在性結核菌・抗酸菌感染診断キットの開発により、診断基準の作成・提案

(2) 潜在性結核菌・抗酸菌感染に対する抗微生物薬の開発

(3) 現行 BCG (潜在性結核菌感染に無効) を凌駕する潜在性結核ワクチンの創製

#### IV. 平成 24~25 年度の課題

(1) 低酸素条件で誘導した休眠結核菌の性状 (形態や遺伝子発現) を解析する。

(2) 休眠抗酸菌が産生すると考えられる脂質 (グリセロールモノミコール酸) に対する自然及び獲得免疫応答を解析する。

(3) 潜在性結核のバイオマーカー候補抗原の探索や候補抗原群の抗原決定基を同定する。

(4) 候補抗原を用いたワクチンの防御効果を結核菌潜在性感染マウスモデルで検証する。

(5) 休眠結核菌に対する薬剤標的を探索する。

(6) MAC-GPL 診断キット (キャピリア<sup>®</sup> MAC 抗体 ELISA) の市販後調査、適応拡大 (肺外 MAC 感染症、MAC による過敏性肺炎や潜在性 MAC 感染症の診断) を図る。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 潜在性結核菌・抗酸菌感染診断キットの開発により、診断基準の作成・提案

(2) 非侵襲性、迅速・簡便な MAC 血清診断キット (約 3 時間、従来法: 1 か月) は MAC 感染症の診療に寄与

- (3) 潜在性結核菌・抗酸菌感染に対する抗微生物薬の開発
- (4) 現行 BCG (潜在性結核菌感染に無効) を凌駕する潜在性結核ワクチンの創製

## 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 (小林 和夫)

- (1) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi**, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 193: 5766-5774.
- (2) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto**. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One* 6: e20985.
- (3) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Vaccine* 29: 6881-6887.
- (4) **Kobayashi, K.**, M. Ato, and **S. Matsumoto**. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Disaster Res.* 6: 443-450.

### ・研究分担者 (松本 壮吉)

- (1) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E.F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto**. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One* 6: e20985.
- (2) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Vaccine* 29: 6881-6887.
- (3) Kasahara, E., A. Sekiyama, M. Hori, K. Hara, N. Takahashi, M. Konishi, E.F. Sato, **S. Matsumoto**, H. Okamura, and M. Inoue. 2011. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. *FEBS Lett.* 585: 2263-2268.
- (4) Niki M and **Matsumoto S**. 2011. Host and bacterial factors that regulate *Mycobacterium tuberculosis* infection and persistence. Yamamoto S, Maeyama J, and Takii T editors. BCG vaccine and adjuvant, Japan anti-tuberculosis association, Tokyo, 215-238.
- (5) **Kobayashi, K.**, M. Ato, and **S. Matsumoto**. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Disaster Res.* 6: 443-450.

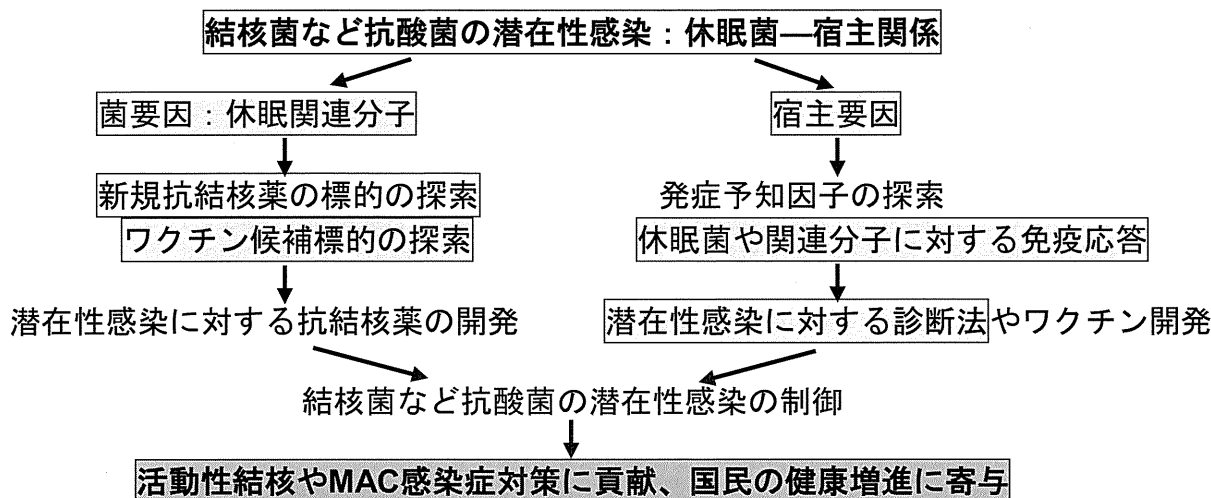
### ・研究分担者 (杉田 昌彦)

- (1) Hattori Y, Matsunaga I, Komori T, Urakawa T, Nakamura T, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, **Sugita M**. 2011. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409: 304-307.

### ・研究分担者 (小出 幸夫)

- (1) Sugaya K, Seto S, Tsujimura K, **Koide Y**. 2011. Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410: 371-375.
- (2) Kato M, Nakamura Y, Suda T, Ozawa Y, Inui N, Seo N, Nagata T, **Koide Y**, Kalinski P, Nakamura H, Chida K. 2011. Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 60: 1029-1038.
- (3) Seto S, Tsujimura K, **Koide Y**. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* 12: 407-420.
- (4) Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, **Koide Y**. 2011. A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61: 189-196.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



潜在性感染は結核菌—宿主関係を基盤とし、結核菌は代謝の低下した休眠状態、宿主は防御免疫を誘導することにより、成立していることが考えられる。従来の結核対策（感染症法：2類）は活動性患者の早期発見や治療など、増殖期結核菌感染による活動性結核に対する抗微生物化学療法を中心に構築されてきた。結核発病の多くが無症候性潜在性感染からの内因性再燃に起因（約70%）していることから、潜在性結核菌感染の細胞・分子機序の解明は診断、治療：新規抗結核薬や予防：ワクチン研究開発を推進し、結核対策に基盤を提供することが期待される。また、結核近縁MAC感染症は近年増加傾向、かつ、薬剤耐性であることから、対応に苦慮している。本研究の成果はMAC感染症対策にも寄与することが期待される。

1年間の研究成果として、1) 菌要因：休眠関連分子、2) 宿主要因、3) 新規抗結核薬の標的の探索、4) ワクチン候補標的の探索が挙げられる。

今年度の特記事項として、下記の2点が挙げられる。

1. 基礎的研究

平成23年 小林 六造 記念賞（日本細菌学会）

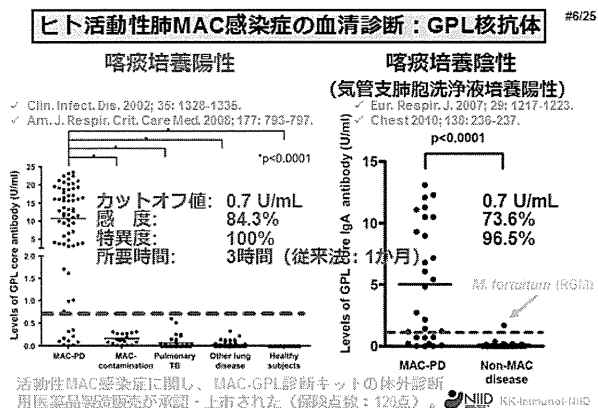
受賞者：研究分担者 松本 壮吉 准教授（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学）

研究課題：結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究

結核菌の増殖制御機構を解析し、潜在性結核菌感染における休眠菌の解明に寄与した。

2. 橋渡し医学研究

2011（平成23）年8月22日、活動性 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症に関し、MAC-GPL診断キット（キャピリア® MAC抗体ELISA タウンズ）の体外診断用医薬品製造販売が承認・上市（保険点数：120点）され、保険医療として、臨床使用を開始した。この診断キットの感度：84%、特異度：100%、所要時間の大幅短縮：3時間（従来法：約1か月）、かつ、非侵襲性であり、今後、MAC感染症の診療に威力を発揮することが期待される。





## ●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

1982 年 09 月-1985 年 08 月	アメリカ合衆国コネチカット大学医学部病理学博士研究員
1985 年 09 月-1995 年 06 月	昭和大学助手・専任講師・助教授・医学部・第 1 内科学・細菌学
1997 年 04 月-1999 年 06 月	国立感染症研究所ハンセン病研究センター-生体防御部長
1999 年 07 月-2006 年 06 月	大阪市立大学大学院教授・医学研究科感染防御学分野
2006 年 07 月-現在	国立感染症研究所免疫部長 (厚生労働技官)

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

コネチカット大学 :	吉田 彪 博士	肉芽腫炎症の細胞・分子機構、免疫病理学
	Stanley Cohen 博士	サイトカイン生物学
昭和大学医学部 :	笠間 毅 博士	リウマチ性疾患の炎症機序
	笠原 慶太 博士	肉芽腫炎症とサイトカイン
大阪市立大学大学院医学研究科 :		
	前田 伸司 博士	結核の分子疫学、薬剤耐性機構
	藤原 永年 博士	結核菌糖脂質の病原性や血清診断
	松本 壮吉 博士	結核菌蛋白質の病原性やワクチン開発

・ 主な研究課題

抗酸菌感染症の戦略的制圧研究  
肉芽腫炎症の細胞・分子機構  
自己免疫およびアレルギー-疾患の分子医学

・ これまでの研究実績

1. 活動性 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症に関し、MAC-GPL 診断キット (キヤピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ) の体外診断用医薬品製造販売が承認・上市 (保険点数 : 120 点) され、保険医療として、臨床使用を開始した (2011 年 8 月 22 日)。
2. **Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.**
3. **Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193: 5766-5774.**
4. **Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*. Vaccine 29: 6881-6887.**
5. **Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, K. Kobayashi, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.**
6. Terahara, K., T. Nochi, M. Yoshida, Y. Takahashi, Y. Goto, H. Hatai, S. Kurokawa, M. H. Jang, M.-N. Kweon, S. E. Steven, T. Hiroi, Y. Yuki, Y. Tsunetsugu-Yokota, **K. Kobayashi**, and H. Kiyono. 2011. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 822-828.

7. Kasama, T., M. Sato, T. Odai, T. Isozaki, and **K. Kobayashi**. 2010. The CX3CL1/CX3CR1 axis is a sensitive marker of the response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol. Musculoskel. Med.* 1: 19-25.
8. Kasama, T., K. Ohtsuka, M. Sato, R. Takahashi, K. Wakabayashi, and **K. Kobayashi**. 2010. Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases. *Arthritis* 2010: article ID 106202.
9. Tomizawa, K., T. Nagao, R. Kusunoki, K. Saiga, M. Oshima, **K. Kobayashi**, T. Nakayama, M. Tanokura, and K. Suzuki. 2010. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. *Rheumatology* 49: 1245-1256.
10. Sena, C.B.C., T. Fukuda, K. Miyanagi, S. Matsumoto, **K. Kobayashi**, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, and Y.S. Morita. 2010. Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285: 13326-13336.
11. Ikebe, T., M. Ato, T. Matsumura, H. Hasegawa, T. Sata, **K. Kobayashi**, and H. Watanabe. 2010. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog.* 6: e1000832.
12. Kitada, S., **K. Kobayashi**, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M. Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and R. Maekura. 2010. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. *Chest* 138: 236-237.
13. Ozeki Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2010. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int. Immunol.* 22: 179-189.
14. Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog.* 5: e1000643.
15. Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.* 46: 6-12.
16. Yamamoto, T., Y. Tsunetsugu-Yokota, Y.-y. Mitsuki, F. Mizukoshi, T. Tsuchiya, K. Terahara, Y. Inagaki, N. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and J.-i. Inoue. 2009. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog.* 5: e1000279.
17. Takahashi, Y., H. Hasegawa, Y. Hara, M. Ato, A. Ninomiya, H. Takagi, T. Odagiri, T. Sata, M. Tashiro, and **K. Kobayashi**. 2009. Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199: 1629-1637.
18. Mizukoshi, F., T. Yamamoto, Y.-y. Mitsuki, K. Terahara, A. Kawana-Tachikawa, **K. Kobayashi**, A. Iwamoto, Y. Morikawa, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2009. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* 11: 191-197.
19. Fujiwara, N., and **K. Kobayashi**. 2008. Chapter IV. Mycobacterial glycolipids and host responses. *Glycolipids: New Research*. Sasaki, D., editor. Nova Science Publishers: New York/USA. 99-116. ISBN: 978-60456-216-3
20. Kitada, S., **K. Kobayashi**, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. 2008. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit.*

- Care Med. 177: 793-797.
21. Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, **K. Kobayashi**, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 190: 1064-1071.
  22. Mitsuki, Y.-y., K. Ohnishi, H. Takagi, M. Oshima, T. Yamamoto, F. Mizukoshi, K. Terahara, **K. Kobayashi**, N. Yamamoto, S. Yamaoka, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2008. A single amino acid substitution in the S1 and S2 Spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. Microbes Infect. 10: 908-915.
  23. Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and **K. Kobayashi**. 2007. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. J. Bacteriol. 189: 8241-8249.
  24. Bhatt, A., N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S. A. Porcelli, **K. Kobayashi**, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 5157-5162.
  25. Kitada, S., Y. Nishiuchi, T. Hiraga, N. Naka, H. Hashimoto, K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki, M. Motone, T. Fujikawa, **K. Kobayashi**, I. Yano, and R. Maekura. 2007. Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. Eur. Respir. J. 29: 1217-1223.
  26. Fujiwara, N., N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano, and **K. Kobayashi**. 2007. Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. J. Bacteriol. 189: 1099-1108.
  27. Wada, T., S. Maeda, A. Hase, and **K. Kobayashi**. 2007. Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J. Med. Microbiol. 56: 1052-1057.
  28. Matsumoto, S., M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, and **K. Kobayashi**. 2005. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J. Immunol. 175: 441-449.
  29. Maekura, R., Y. Okuda, A. Hirotani, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, I. Yano, **K. Kobayashi**, and M. Ito. 2005. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J. Clin. Microbiol. 43: 3150-3158.
  30. Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and **K. Kobayashi**. 2005. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 44-51.
  31. Fujiwara, N., and **K. Kobayashi**. 2005. Macrophages in inflammation. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 4: 281-286.
  32. Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and **K. Kobayashi**. 2004. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J. Biol. Chem. 279: 39798-39806.
  33. Wada, T., S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, A. Hase, and **K. Kobayashi**. 2004. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42: 5277-5285.
  34. Kitada, S., R. Maekura, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and **K. Kobayashi**. 2002.

- Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. Clin. Infect. Dis. 35: 1328-1335.
35. Maeda, S., M. Matsuoka, N. Nakata, M. Kai, Y. Maeda, K. Hashimoto, H. Kimura, **K. Kobayashi**, and Y. Kashiwabara. 2001. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3635-3639.
  36. Kasama, T., F. Shiozawa, **K. Kobayashi**, N. Yajima, M. Hanyuda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2001. Vascular endothelial growth factor expression by activated synovial leukocytes in rheumatoid arthritis. Critical involvement of the interaction with synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 44: 2512-2524.
  37. Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and **K. Kobayashi**. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. Infect. Immun. 69: 810-815.
  38. **Kobayashi, K.**, K. Kaneda, and T. Kasama. 2001. The immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. Microsc. Res. Tech. 53: 241-245.
  39. Lu, J., T. Kasama, **K. Kobayashi**, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. J. Immunol. 164: 5922-5927.
  40. Kasama, T., **K. Kobayashi**, N. Yajima, F. Shiozawa, Y. Yoda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis (RA). Clin. Exp. Immunol. 121: 533-538.
  41. Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, **K. Kobayashi**, and I. Yano. 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. Infect. Immun. 68: 3704-3709.
  42. Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and **K. Kobayashi**. 2000. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. Infect. Immun. 68: 5991-5997.

## 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 『成果概要』

研究課題：国際的なバイオリスク管理の基準に基づく病原体取扱いと管理のモデル  
総合システムの構築と検証に関する研究

課題番号：H23-新興-一般-009

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：杉山 和良

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：バイオセーフティ管理室

職名：室長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 27,636,000 円

**I. 研究の意義**

- (1) 本邦では感染症法に規定されている病原体取扱い施設の施設要件の達成が先行し、バイオセーフティリスクとバイオセキュリティリスクに対して総合的に緩和を図り、バイオリスク管理強化をするための取り組みは始まったばかりで基準、ロールモデル、評価対照、方法論が確立していない。
- (2) 特に、バイオリスク管理手法の実効性検証データが不足し、科学的根拠に基づく系統的リスク評価が実施されていない。
- (3) 法規に規定された施設以外で事故やニアミスが多く、法規制の趣旨が理解されておらず、直近の事故からもハード・ソフトの複数の方法を組み合わせた安全ネットを何重かに張って行く、バイオリスクが適正に管理された実験室業務の在り方の普及が必要である。
- (4) バイオリスク管理の教育を提言してきたが、日常への導入に際してバリアが存在しており、実運用例がない。
- (5) 人材、施設・設備、労働環境、教育・訓練、必要経費のいずれが欠損しても事故・事件が発生する可能性があるが、法規制依存から脱却した、人材育成、バイオリスク緩和志向の文化の確立に向けた積極的かつ総合的アプローチの提案はこれまでにない。
- (7) 対テロ対策、新興感染症対策として、国際的連携と協調を保った国内のバイオリスク対応の実現が必要である。
- (8) バイオリスク管理は長期的に費用対効果が高く、組織・施設の存続に効果的であることが知られていない。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 既存のバイオリスク管理基準と、欧米各国の指針、WHO の参考意見を分析検討し、バイオリスク委員会の役割の設定、試料管理を含むバイオリスクの管理運用の仕組みの構築、バイオリスク評価の導入、教育研修プログラム導入の総合モデルを実験室、実験棟、施設、機関の単位で提案。
- (2) 前出の国際基準等を踏まえた実験室をモデルとして実際に既存施設を活用し作成提示。
- (3) 国際基準のバイオリスク管理の導入前後の効果を検討。
- (4) 病原体取扱い施設や指導者の認証の国際的な仕組み作りに協力。

- (5) これまでに作製した教育訓練プログラムの実践、モジュールの数と利用者の拡大を期待。
- (6) 根絶を目指す病原体などの管理基準の順守状況の調査、分析。
- (7) 病原体等取扱い施設のバイオリスク管理体制の確立に有用な指標の提示。
- (8) 科学的検証を行い、バイオリスク管理を円滑に実施するために必要な知見の入手。
- (9) 設備と機器導入に偏ったバイオリスク管理から脱却し、様々な不測の事態へ対応できる人材養成と、リスク評価に基づく臨機応変な対応を可能とするバイオリスクの管理体制の仕組みへ改善するし、国民及び環境の保護と社会の安全確保の貢献を期待。

### Ⅲ. 1年間の研究成果

※本研究班は、各研究分担者の異なる背景知識及び技能を持ち寄り協力することで、成果を得ているため、個別ではなく、小グループでの成果となる。

- 研究代表者（杉山）、研究分担者（佐多、御手洗、藤本、安藤、重松）
  - (1) モデル化が可能な既存実験室への説明、協力呼びかけを行い、対象を検討した。
- 研究代表者（杉山）、研究分担者（佐多、重松）
  - (1) 病原体輸送容器の爆発、熱、圧力等に対する耐用性の検討実験を計画し、一部実施した。
  - (2) 一般市民の病原体輸送への理解促進を目的としたコミュニケーション手法を検討するためのWEB調査の設計、実施および量的解析を継続実施中。
- 研究分担者（清水）
  - (1) WHO/WPRO バイオセーフティトレーニングワークショップに参加し、WHO ポリオウイルス実験室ネットワークで用いられている標準的なバイオセーフティ教育訓練を体験し、実効性について検討した。
- 研究分担者（重松）
  - (1) 指導者と研修時間の不足を補う interactive webbased training の複数の資料入手、体験、教育効果と内容の分析を行い、効果評価の方法と導入の可能性について検討した。
  - (2) CWA15793 あるいは NIH のバイオリスク管理基準が現場導入された際の解釈に関する調査と情報収集を実施した。
- 研究分担者（藤本、重松）
  - (1) 演習用 3D プラットフォームの改良のための複数プラットフォームを比較分析した。
  - (2) 既存大学実験室を国際基準に準じたモデル実験室へ改良するための現状分析を行った（必要機材、利用者プロファイル、可動式設備、デザイン変更の可能性、セキュリティ要求等）。
- 研究分担者（御手洗、安藤、重松）
  - (1) 教育用安全キャビネットを活用した結核菌取り扱い研修の改善（より視覚的に）
  - (2) 病原体輸送中の事故における輸送容器の耐用性実証実験の結果を教材として整理
- 研究分担者（安藤、佐多、重松）
  - (1) 各地方衛生研究所の現状調査のための質問票を作成

#### **IV. 平成 24～25 年度の課題**

- (1) モデル化改良が可能な実験施設等の特性の異なるものを対象に協力範囲を拡大する  
(臨床研究施設、遺伝子操作等が主体で BSL レベルが低い施設、学生実習を行う実験室環境、動物を取扱う施設等、現在 1～2 大学研究室が協力)
- (2) 欧州各国の国際基準を受けて作成されたバイオリスク管理基準の普及状況、解釈についての情報収集と整理
- (3) WHO バイオセーフティトレーニングワークショップで使用した教材(DVD 等)から我が国の実態を考慮した教育訓練資料の作成。
- (4) 基準導入効果の評価項目の決定と、評価手法の検討
- (5) 演習用 3D プラットフォーム上のバーチャル空間の設計とシナリオのプログラミング、実験室運用の項目としての実用と有効性評価
- (6) 各国のバイオテロ対策および生物材料等の取扱いに関する改訂規定の比較調査と分析
- (7) 地方衛生研究所の緊急及び災害時の各種状況を想定した BM 教育の強化。特に今年度発生した検体輸送中の事故を受けた厚生労働省通知による研修強化への継続的支援の実施。
- (8) 基準導入効果の評価
- (9) 各施設での導入に際しての手引き様の参考資料の作成
- (10) バイオリスク評価に基づいた管理の理論についてのまとめの作成 (教科書あるいは総説)

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) 病原体等取扱い施設のバイオリスク管理体制の査察等に有用な評価指標の提供が期待される。
- (2) 感染症法が目指す病原体等の適正な取扱いについての具体像の、研究者および関係施設への浸透に貢献することが期待される。
- (3) 野性株ポリオウイルス実験室封じ込め調査を継続することにより、WHO ポリオ根絶認定委員会年次報告書等に必要な病原体管理情報を提供する。
- (4) 地方衛生研究所を代表とする公衆衛生機関の病原体管理の強化、また、間接的には発生動向調査の運用継続に必要な資料を提供することが期待される。
- (5) バイオリスク管理分野の項目についての実験データの提供により、指針、実施要領等に科学的根拠を付与することが期待される。
- (6) 世界保健機関「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2011-2012 版」日本語翻訳の作成により、感染症法下での病原体輸送の改訂に際しての資料を提供する。

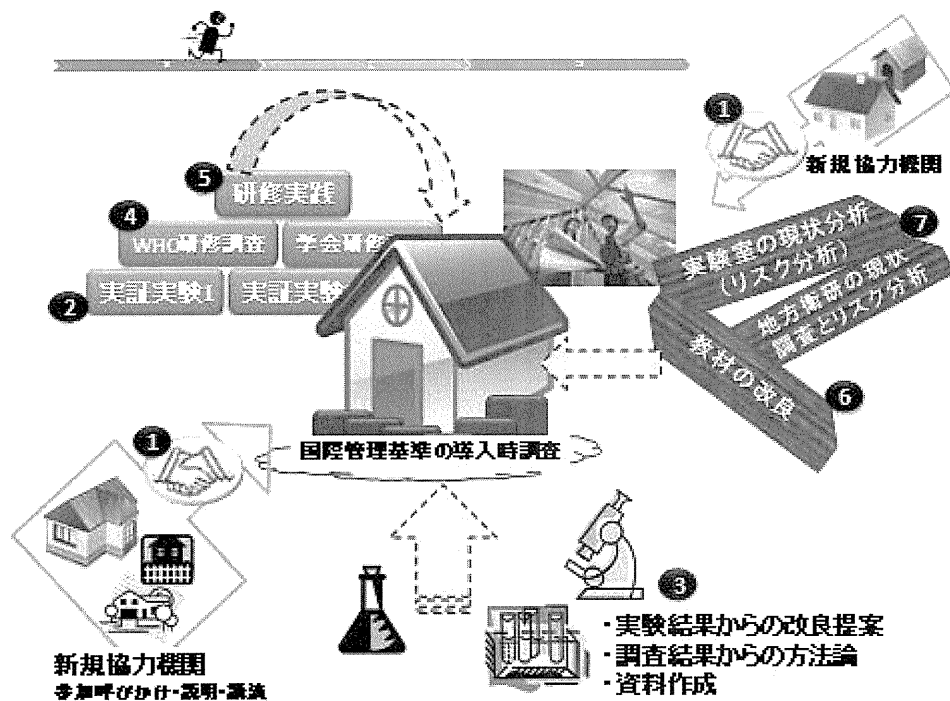
#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

- (1) 杉山和良：実験室におけるバイオハザード、リスク評価、病原微生物のリスク分類、組織管理と健康管理 バイオセーフティの原理と実践 39-45, 50- 54, 54-58, 73-85, 2011.
- (2) 安藤秀二. 病原体等の保存・保管と輸送, バイオメディカルサイエンス研究会編, バイオセーフティの原理と実際、みみずく社/医学評論社
- (3) 重松美加、安藤秀二、佐多徹太郎. 世界保健機関「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2011-2012 版」日本語翻訳。(WHO 出版物翻訳・監修)

### 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。

初年度は、震災等により各方面種々の影響を受け、フィールドの確保に予定より困難が見られた。その結果、データや情報の収集と分析、整理などとモデルとして国際基準のバイオリスク管理を導入する施設での影響を検討するなどの構築の基礎となる材料や設計を中心に活動を行った。





## ●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

昭和 53 年－56 年 株式会社三菱油化メディカルサイエンス研究所

昭和 56 年－現在 国立予防衛生研究所（現：国立感染症研究所）

昭和 61 年－63 年 英国自然環境研究院ウイルス研究所

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

北村敬（国立予防衛生研究所）、梁川良（北海道大学）、

Dr. D. Bishop（英国自然環境研究院ウイルス研究所）、

小野悌二（三菱油化メディカルサイエンス研究所）、小松俊彦、森田千春、有川二郎、松浦善治、

森川茂（国立感染症研究所）

### ・主な研究課題

- ・腎症候性出血熱ウイルスの疫学、性状、診断法の開発に関わる研究
- ・バキュロウイルスを用いた腎症候性出血熱ウイルスの構造タンパクの発現
- ・安全キャビネットの経過観察と保守プログラムに関する研究
- ・感染研バイオリスク管理講習会の強化に関する研究
- ・病原微生物の取扱におけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究
- ・バイオリスク管理の包括的強化及び必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究

### ・これまでの研究実績

1. 杉山和良：実験室におけるバイオハザード、リスク評価、病原微生物のリスク分類、組織管理と健康管理 バイオセーフティの原理と実践 39-45, 50- 54, 54-58, 73-85, 2011.
2. 杉山和良：病原体の適正管理 取扱施設における管理システム. 病原体の適正管理と輸送の現状と課題. 化学療法の領域. 105-109, 2011.
3. 高木弘隆、杉山和良：新規技術により作成した二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)不織布の光触媒反応によるウイルス不活性化効果についての検討. 感染症学雑誌. 85(3)：244-249, 2011.
4. 杉山和良：実験室のバイオセーフティ. 必携 バイオセーフティ指針. 岡田淳編集. 39-67, 2010
5. 杉山和良：バイオセキュリティの国際基準と日本 感染症 Vol. 39, No. 6, 9-18, 2009
6. 杉山和良：ズーノーシスハンドブック 岸本寿男、山田章雄監修 バイオリスク管理 (マネジメント) 20-22, 2009
7. 杉山和良：食品微生物学用語辞典 バイオセーフティ、バイオハザード他 2009
8. 杉山和良：注意すべきウイルス感染症 アウト・ブレイクにどう対応するのか 診断と治療 Vol. 97, No. 3, 165-171, 2009

9. 杉山和良：バイオセーフティからバイオセキュリティ 感染・炎症・免疫 Vol. 38, No. 4, 345-357, 2008
10. 杉山和良：感染症法における病原体の分類と管理体制. 化学療法の領域 Vol. 24, No. 4, 547-552, 2008
11. 杉山和良：V 病原体の輸送;病原体等安全取扱・管理指針 日本細菌学会 85-100, 2008
12. 杉山和良：第4章バイオセーフティの組織体制と活動、第7章病原体の取扱い; バイオメディカルサイエンス研究会編集, バイオセーフティの事典 みみずく舎/医学評論社, 2008
13. 宮村達男、杉山和良、佐多徹太郎、安藤秀二、重松美加：感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2007-2008 版 WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2007
14. 杉山和良：改正感染症法と CDC ガイドラインについて 月刊薬事 Vol. 49, No. 11, 1699-1704, 2007
15. 杉山和良：病原微生物等の適正管理の実際 公衆衛生 Vol. 71, No. 10, 841-844, 2007
16. 安藤秀二、佐多徹太郎、重松美加、杉山和良、倉田毅、中嶋建介：バイオリスクマネジメント 実験施設バイオセキュリティガイダンス WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2006
17. 北村敬、小松俊彦、杉山和良、森川茂 (北村敬、小松俊彦監修)：実験室バイオセーフティ指針 3 版 WHO (翻訳) バイオメディカルサイエンス研究会 2006
18. 杉山和良：B ウイルス感染症 獣医感染症カラーアトラス, 325-326, 文永堂出版, 2006
19. 倉田毅、杉山和良、安藤秀二、重松美加、篠原克明、高木弘隆、富田康浩：感染性物質の輸送規則に関するガイダンス WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2005
20. 杉山和良：バイオハザード対策用クラス II キャビネット キャビネットの使い方 空気清浄 Vol. 43, No. 2, 51-58, 2005
21. 杉山和良：バイオセーフティのあり方 汚染時の対応 臨床と微生物 Vol. 32, 増刊号, 575-579, 2005
22. 杉山和良：医学研究におけるバイオセーフティとバイオセキュリティ Mebio (メジカルビュー社) 73, 2005
23. 杉山和良：バイオセーフティの考え方と実践 静電気学会誌 Vol. 28, No. 3, 220-224, 2004
24. 杉山和良：バイオハザード病原体 ファルマシア Vol. 40, No. 3, 220-224, 2004
25. 杉山和良：SARSの実験室感染とその対策 感染症と化学療法 37 日経 大阪 2004
26. 杉山和良：実験動物施設におけるバイオセキュリティ 実験動物と環境 Vol. 11, No. 2, 105-109, 2003
27. 杉山和良：腎症候性出血熱 動物由来感染症その診断と対策 92 真興交易(株) 東京 2003

## 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 『成果概要』

研究課題：我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染に対する総合的対策の確立に関する研究

課題番号：H23-新興-一般-010

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：高 崎 智 彦

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：室長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 24,948,000 円

### I. 研究の意義

- (1) デング熱の流行は拡大し、海外からの輸入症例も増加しているが、有効なワクチンや治療薬はいまだ実用化されていない。
- (2) デング出血熱の病態解析はまだ明らかになっておらず、迅速診断法の開発は治療上重要である。
- (3) デング熱と類似の症状を呈するチクングニア熱の鑑別診断は重要であり、より迅速な実験室診断法の開発が急がれる。
- (4) ヒト-蚊-ヒトの感染環で流行するデング熱やチクングニア熱の流行拡大を防ぐためには、媒介蚊に関する研究および媒介蚊サーベイランス・対策は有効である。

：

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) デング熱、チクングニア熱の迅速診断法を開発し、地方衛生研究所等に普及させることにより輸入症例からの国内発生を予防する。
- (2) 日本脳炎ワクチン、ウエストナイルワクチン同様デング熱ワクチン、チクングニア熱ワクチンの開発をめざし実用化への基礎を作る。
- (3) ワクチンおよび抗ウイルス薬評価のための霊長類モデルを確立し、有効性および安全性評価系を確立する。
- (4) 抗体依存性感染増強効果を考慮したデングワクチン防御能を評価し、遅々として進まないデング熱ワクチンの開発を促進する。
- (5) デング熱、チクングニア熱の媒介蚊であるヒトスジシマカ対策の基礎的データを得て、有効な媒介蚊対策を確立する。媒介蚊対策により国内発生した蚊媒介性ウイルス感染症の拡大を最小限に食い止めることができる。

：

### III. 1 年間の研究成果

- ・ 研究代表者

- (1) デングウイルス分離に際して Fc $\gamma$  レセプター発現細胞を用いて、感染増強抗体を添加することによりウイルス分離効率が上がることを確認した。
- (2) チクングニア熱がフィリピンミンダナオ島に侵入したことを確認した。
- (3) デング熱患者の眼底出血を画像でとらえ、眼底出血をきたす場合があることを確認した。
- (4) 日本脳炎抗体がデングウイルスに感染増強現象を引き起こし、デング熱重症化を引き起こすことを確認した。

- ・ 研究分担者(小西英二)

チクングニアウイルスの E1-E3 遺伝子に基づく DNA ワクチンを作製、*in vitro* 発現を確認した。

- ・ 研究分担者(森田公一)

LAMP 法を改良したデングウイルス、チクングニアウイルス遺伝子検出法を開発した。

- ・ 研究分担者(高橋和郎)

(1) 迅速で高感度な日本脳炎ウイルスの RT-PCR 法の改良に成功した(東洋紡、GeneCube 使用)。所要時間は 1 時間で従来法より高感度である。デングウイルス、ウエストナイルウイルスの PCR 法も同様な成果が得られつつある。

(2) 細胞培養日本脳炎ワクチン接種により 88% の健常成人(対象者 272 名)において感染防御を示す有意な抗体上昇がみられた。また、接種前抗体陰性者でワクチン接種により陽転したのは 168 名中 135 名(80%)であったが、20%は依然として陰性であった。

- ・ 研究分担者(高橋秀宗)

- (1) フラビウイルス抗原鑑別 ELISA 系の構築
- (2) デングウイルス-ウイルス様粒子の発現ベクターの構築

- ・ 研究分担者(澤辺京子)

- (1) 我国への輸入症例の多いフィリピンの都市部においてウイルス分離を実施するための媒介蚊調査を行った。
- (2) 国内産ヒトスジシマカを用いたデングウイルスの経口感染実験ならびにウイルス検出系を確立した。
- (3) 国内産ヒトスジシマカの卵越冬評価のための実験系を検討した。

- ・ 研究分担者(江下優樹)

- (1) RT-LAMP 法の簡便化を検討して、未精製の感染蚊乳剤では本反応を阻止する要因が認められたので、より簡便な精製キットの検討を行っている。
- (2) デングウイルス血症を短時間起こしたマウスから、血液を満腹に吸った蚊を多数作製する方法を確立した。また、チクングニアウイルスと蚊でも検討を始めた。
- (3) デングウイルス感染後の蚊のトランスクリプトーム解析の結果から、感染蚊と未感染蚊の遺伝子発現プロフィールが相違することがわかった。
- (4) タイ国のデング熱流行地域における感染蚊および薬剤抵抗性蚊の動態を調査した。

- ・ 研究分担者(濱田篤郎)

- (1) ホームページの開設

デング熱など海外渡航に関連する病気の情報を提供するホームページ「海外旅行と病気」