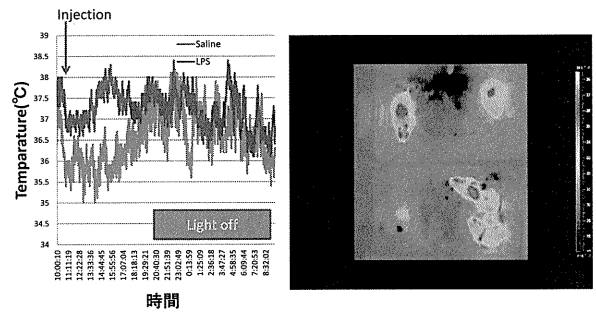


全粒子+アラムアジュバントによる  
 プレパデミックワクチン小児治験における発熱(副反応)  
 <その作用機序と免疫原性(有効性)との関連性>

		1回目接種後		2回目接種後	
		発現例数	発現率(%)	発現例数	発現率(%)
BK-PIFA	小児 ※1 (6か月以上 20歳未満)	109/187	58.3	20/184	10.9
	成人 ※2 (20歳以上 65歳未満)	3/150	2.0	1/148	0.7
KIB-PIA	小児 ※1 (6か月以上 20歳未満)	83/187	44.4	13/183	7.1
	成人 ※3 (20歳以上 65歳未満)	0/150	0.0	1/149	0.7

※1 無作為に割りつけられた用法(IM又はSC)、用量(0.3µgHA/回、7.5µgHA/回、15µgHA/回)  
 ※2 15µgHA/回(SC)  
 ※3 15µgHA/回(IM)

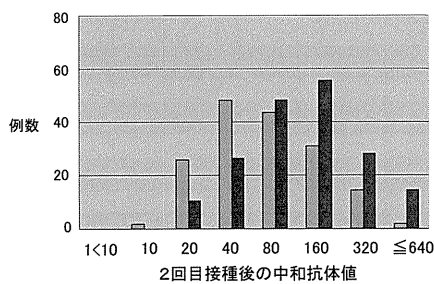
成果5; マウスを用いた発熱の解析システムの構築



特願2011-102045 「実験用小動物のための体温測定装置および体温測定方法」

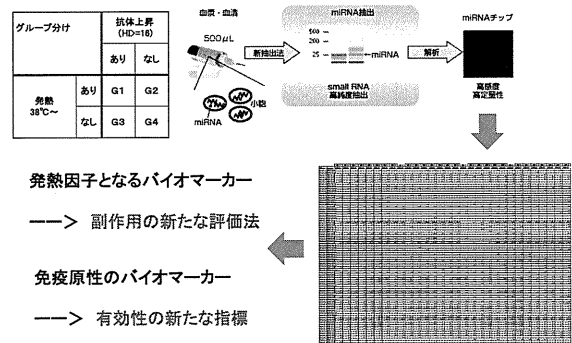
成果6: 発熱がある子供のほうが中和抗体価が高い傾向にある

■ 1回目2回目ともに発熱なし    ■ 1回目ないし2回目で発熱



血清中のIgGアイソタイプ、サイトカイン、ケモカインを解析中

成果8: 血清バイオマーカーとしてのマイクロRNA解析



• 本研究内容の「議論を深め」、「啓蒙を図る」一環として

- ワクチンフォーラム2010を開催し、本研究班主催のアジュバントワークショップにてアジュバント開発研究の新展開や審査行政への提言を行った。
- また、本研究班を中心に「次世代アジュバント研究会」を発足させ、アカデミアのアジュバント研究者、企業の開発担当者、PMDAの審査担当者を招き相互の意見交換を行った。
- またアジュバント研究のアウトリーチ活動も積極的に行い、研究室の一般公開、アジュバントに特化した専門書の発行、アジュバントに関する講演会などを行った。
- 平成23年度のワクチン学会にて本研究内容を主としたシンポジウムも開催し、インフルエンザワクチンをはじめとした作用機序の解明、臨床研究成果の発表、議論を行った。

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

課題番号：H22-新興-一般-005

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：小田切 孝人

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：インフルエンザウイルス研究センター

職名：室長

年次別研究費(交付決定額)：1 年目 24,500,000 円 2 年目 21,560,000 円

### I. 研究の意義

2009 年にパンデミックを起こしたブタ由来の A/H1N1 (A/H1N1pdm09) ウイルスは、低病原性であり、健康被害も小さかったことから、パンデミック終息後は新型インフルエンザに対する警戒感が一気に緩み始めている。一方、エジプト、インドネシアではパンデミック後も高病原性 H5N1 ウイルスのヒト感染例は依然として続いており、新型としてパンデミックを起こすリスクはもち続けている。従って、H5N1 を含むハイリスクウイルスの出現監視を地方自治体と一体となって強化し、精度をさらに向上させる必要がある。また、重要な変異株が認められた場合には、8 分節の全ゲノム解析を実施し、病原性等に関係する遺伝的因子の解析によるリスク評価を速やかに実施する必要がある。さらに、ワクチン接種者の血清抗体調査によるインフルエンザワクチンの免疫原性、効果の評価を行う必要がある。

### II. 研究の目的：

初年度に組織化に成功した 6 地方ブロック代表の 11 地衛研からなるコア・サポート地衛研と感染研（本研究班）との連携と共同研究により、1)サーベイランスに用いる遺伝子変異検出手法や精度管理(EQA)手法の開発・改良により、わが国におけるインフルエンザウイルス検出精度の向上を図るとともに、効果的なサーベイランスを実施する。2)薬剤耐性株、ハイリスク変異株等を早期に発見し対策をとるためには、大量遺伝子レベルでのサーベイランス体制を維持する。3)蛋白質の構造・機能情報は、変異ウイルスのリスクを判定するための重要な補完情報となることから、コンピュータ科学、計算科学、情報科学解析技術(*in silico*)を導入した変異蛋白質の構造・機能変化を調べる。4)ワクチン接種前後の血清の HI 抗体価を成人層、高齢者層で調査を行い、ワクチンの有効性の指標の 1 つとする。

### 期待される成果：

コア・サポート地衛研による試験的な EQA を実施することにより、EQA を全国地衛研へ拡大して実施するための問題点の把握、およびそれに沿った戦略策定が可能となる。これにより、わが国におけるインフルエンザウイルス検出精度の向上、重大な変異（例：抗原性、薬剤耐性）を迅速・正確に把握することが可能になる。2)8 分節遺伝子全てを検証することによって、新たなリスク因子の発見や評価ができる。3)ウイルスゲノム情報からウイルスの性質変化の情報を迅速に抽出する方法の開発が進む。これにより、未報告のウイルス変異が検出されたとき、そのリスクを迅速に予測する *in silico* 技術の基盤が作られる。4)ヒト血清抗体応答、流行株との交叉反応を基にしてワクチンの有効性の評価ができる。

### III. 2 年間の研究成果

・研究代表者

● 小田切孝人（研究統括）

- (1) 6 地方ブロック代表の 11 地衛研からなるコア・サポート地衛研と感染研（本研究班）との共同研究体制の構築。Real-time PCR 法による簡便な薬剤耐性変異検出系の共同開発と全国地衛研への技術移転、それを用いての耐性株検出サーベイランスの実施と週ごとの情報発信。
  - (2) コア・サポート地衛研と感染研との円滑な意思疎通、問題点の共有、改善の指針提示。
  - (3) コア・サポート地衛研と共同でインフルエンザ検査診断マニュアルの改訂を実施。
- 研究分担者
  - 皆川洋子（地方衛生研究所連携網の構築とそれを駆使した薬剤耐性株、変異株の早期検出）
    - (1) 感染研・コア・サポート地衛研のインフルエンザ連携検査研究体制整備、導入をはかった。2010/11 シーズンにおける鳥インフルエンザ関連遺伝子検査においては、検出法改良等に関わる情報伝達を円滑に実施した。
    - (2) コア・サポート地衛研と感染研(高下、影山)が開発したリアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異(H275Y) 検出システムの実地検証の実施。ブロック内他地衛研への情報提供を通じて 2010/11 シーズンにおける同システムによる耐性サーベイランスを実現した。
    - (3) コア・サポート地衛研と感染研の共同による精度管理(EQA)法開発を行い、実地データを提供した。
    - (4) 地衛研における鳥インフルエンザ検査体制に関する調査を研究協力地衛研間で実施した。
  - 藤田信之（遺伝子解析によるウイルス変異検出・進化系統樹解析）
    - (1) 2010 年 7 月から 2011 年 9 月までの間に、計 500 株余りについて重要分節の塩基配列を決定した（2010 年度は NA, M を、2011 年度は NA, HA2, M を解析）。3 月末までにさらに 100-150 株の解析を予定。
    - (2) A/H1N1pdm の 2 株について全ゲノム解析を実施。
    - (3) すでに実績がある A/H1N1pdm に加えて、A/H3N2 の全分節のプライマーセットを開発し、必要時に全ゲノム解析を実施するための準備を完了した。
  - 佐藤裕徳（ウイルス蛋白の機能的構造変化解析系の構築と変化予測）
    - (1) 初年度は、研究代表者らと共同で、ワクチン株製造過程で生じる HA 蛋白質の抗原性変化を解析し、2009 年 A 香港型と B 型のワクチン原株は、鶏卵培養での馴化の過程で受容体結合ポケット周辺の変異を獲得して抗原性が変化するリスクがあることを示した。
    - (2) 2年目は、B型NA蛋白質の四量体境界面に生じる変異により、タミフル、ペラミビル、ザナミビルに対して高度耐性を獲得するリスクがあることを示した。
  - 齋藤玲子（新型インフルエンザ流行株に対するヒト血清抗体の保有解析とワクチン効果の評価）
    - (1) 平成22年度には、新潟県内の介護施設にて職員層（成人）約100名、病院職員（成人）500名、介護施設入所者層（高齢者）約50名の血清を採取し、ワクチン接種前後でHI抗体価の上昇を調査した。
    - (2) 各年齢層での感染リスク低下の指標である40倍以上のHI抗体価保有率をA/H1N1pdm09、H3N2およびB型ウイルスについて調べた。成人層、介護施設職員、病院職員では、抗体応答があることが分かったが、介護施設入所者（高齢者）では、全般的にワクチン接種後の抗体価上昇が悪いことを示した。
  - 影山 努（新型インフルエンザ変異株、高病原性株診断検査系構築と改良、精度管理試験）
    - (1) 新型インフルエンザ変異株、高病原性株診断検査系構築と改良の研究。TaqManプローブを用いたRT-PCR法による2009年新型インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性株検出系の構築に成功し、全国地衛研へ技術移転した。
    - (2) この新検査系で全国レベルでの薬剤耐性株検出サーベイランスを実施した。
    - (3) PCR検査系の精度向上のために、EQA試験系および参照・試験サンプルパネルの準備、および評価システムの構築を行った。
    - (4) 第1弾としてコア・サポート地衛研にEQAを実施した。問題点や解決法を検討し、全国地衛研を対象としたEQA実施へ展開するための戦略を検討した。

- 高下恵美（新型インフルエンザ変異株のin vitro、in vivoでのリスク評価）
  - (1) 2009/10シーズン、2010/11シーズンと薬剤耐性株サーベイランスを実施。
  - (2) 4種類の抗インフルエンザ薬に対する感受性試験系の新規構築および改良に成功した。
  - (3) 国内における耐性株の発生頻度は1%～2%程度であることを把握した。また、耐性株は年々増加傾向にあり、多くは薬剤治療または予防投与例からの発生であることを指摘した。

#### IV. 平成 24 年度の課題

- (1) オセルトアミビル耐性変異(H275Y)サーベイランスの継続、新規薬剤の感受性試験系の構築および EQA の第 2 弾の実施。
- (2) 地衛研における鳥インフルエンザ検査体制に関する調査を全国規模で実施・解析する。
- (3) B 型の全ゲノム解析のためのプライマーセットの開発をする。
- (4) 分子動力学法を用いた *in silico* 構造機能解析を試みる。より精度の高い構造・機能変化の情報の入手が期待されるが、解析に時間がかかるため、緊急度と必要性に応じて柔軟に対応する。
- (5) 平成 24 年度にも各年齢層から採集したワクチン接種前後の血清抗体の抗体価調査を行い、日本のワクチンの免疫原性を引き続き調査する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

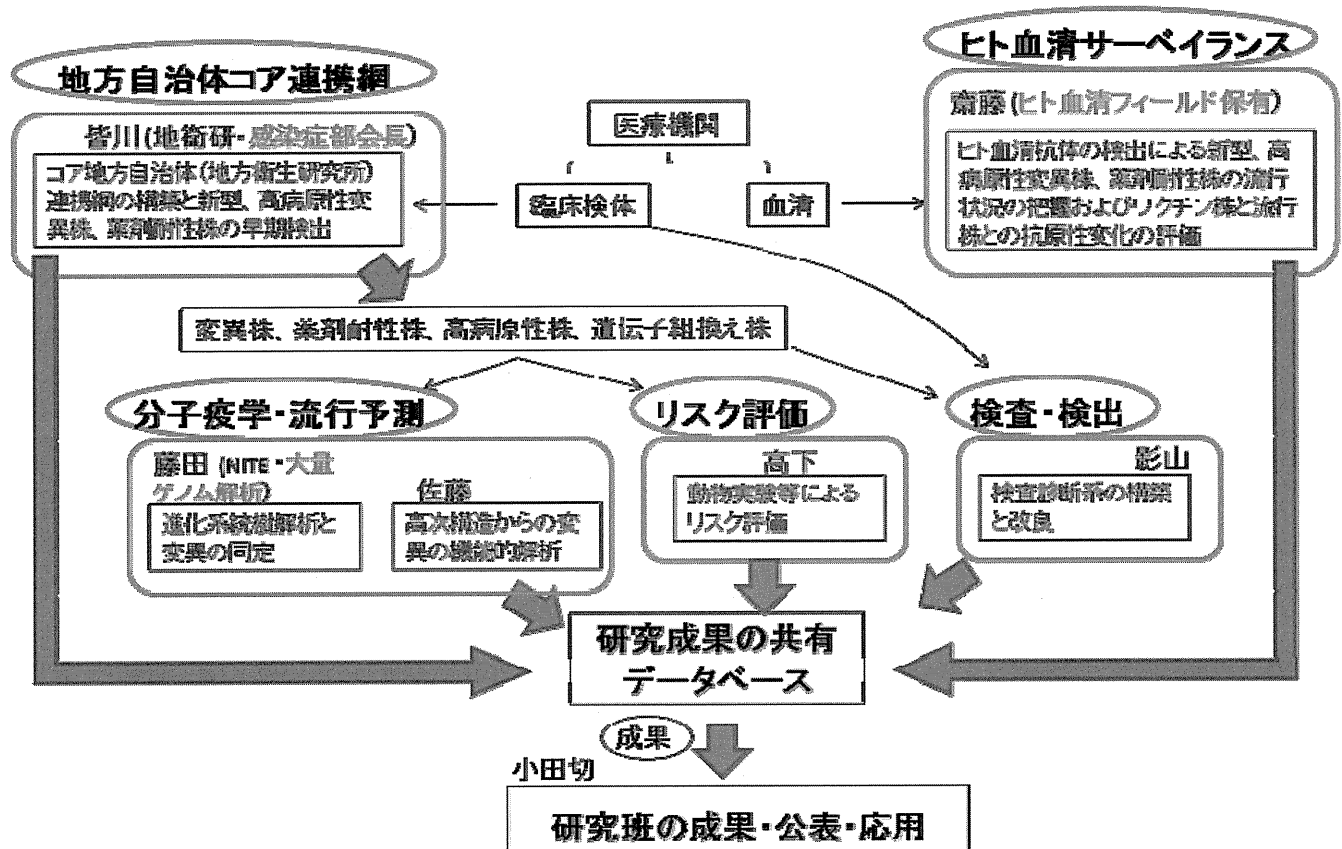
本研究班には、全国地研協議会感染症部会が関与しており、地方ブロックごとのコア地衛研を参画させたサーベイランスに有用な技術開発研究グループが完成し、より強固な地衛研との連携網ができた。本研究では、コア・サポート地衛研と共同開発した、PCR による薬剤耐性株検出サーベイランスおよびハイリスク変異株をタイムリーに捉える株サーベイランスを全国規模で実施している。これによって、国と地方自治体が一体となった模範的なサーベイランスを進めている。これは、新型インフルエンザおよび季節性インフルエンザ株サーベイランスへの強化と質の向上が期待でき、厚生労働行政に直結している。

#### 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, Miho Ejima, Akane Anraku, Kozue Shimabukuro, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Xu Hong, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009–2010 Emerging Infect Dis.: 17, 470-479, 2011
- Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1121-1127
- Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1121-1127.
- Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. Vaccine. 2011 Oct 26;29(46):8330-8337
- 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

**Ⅶ. Ⅲ (2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. Nongluk Sriwilajaroena, Akio Kadowaki, Yuriko Onishi, Nobuki Gato, Makoto Ujike, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yasuo Suzuki. Mumefuralandrelated HMF derivatives from Japanese apricot fruitjuice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A(H1N1) virus. *FoodChemistry* 127, 1-9, 2011
2. Makoto Ujike, Miho Ejima, Akane Anraku, Kozue Shimabukuro, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Xu Hong, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. *Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Japan, 2009–2010 Emerging Infect Dis.: 17, 470-479, 2011*
3. Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. *Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1121-1127*
4. Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. *Vaccine. :29: 4156-4161, 2011*
5. Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; influenza virus surveillance group of Japan. *Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1121-1127.*
6. Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. *Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. Vaccine. 2011 Oct 26;29(46):8330-8337*
7. Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis.*

- 2011;64(3):237-41.
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.* 2010 Jan;82(1):128-37.
  9. 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.
  10. 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
  11. **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](http://www.cdc.gov/eid) • Vol. 16, No. 6, 926-935, 2010
  12. Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara 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.
  13. 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
  14. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* 2010 Oct;82(10):1754-61.
  15. Yuma Iwai, Hitoshi Takahashi, Dai Hatakeyama, Kazunori Motoshima, Minoru Ishikawa, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoshihisa Sei, Kentaro Yamaguchi and Takashi Kuzuhara. Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from thalidomide *Bioorganic & Medicinal Chemistry* Volume 18, Issue 14, 15 July 2010, Pages 5379-5390
  16. 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)
  17. 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 .
  18. 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

19. 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
20. 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
21. 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

上記を含むその他の研究実績（英文原著論文 81編、和文原著論文 4編）

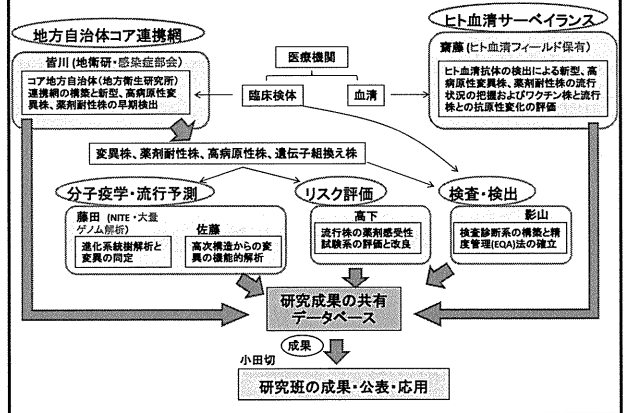


厚生労働科学研究(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
**地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究(H22-新興一般-005)**

研究代表者 小田切孝人(感染研インフルエンザウイルス研究センター)  
 研究分担者 皆川 洋子(愛知県衛生研究所、地全協感染症対策部会)  
 藤田 信之(独立行政法人製品評価技術基盤機構)  
 齋藤 玲子(新潟大学医学部国際保健学講座)  
 佐藤 裕徳(感染研病原体ゲノム解析研究センター)  
 影山 努(感染研インフルエンザウイルス研究センター)  
 高下 恵美(感染研インフルエンザウイルス研究センター)

研究協力者  
 (コア地衛研)  
 池田辰也、水田克己(山形県衛生研究所)、長島真美、新開敬行、林志直(東京都健康安全研究センター)、加瀬哲男、高橋和郎(大阪府立公衆衛生研究所)、戸田昌一、岡恒明(山口県環境保健センター)、吉富秀亮、千々和勝己(福岡県保健環境研究所)、安井善宏(愛知県衛生研究所)  
 (サポート地衛研)  
 駒込理佳、長野秀樹(北海道衛生研究所)、川上千春(横浜市衛生研究所)、小淵正次、滝澤剛則(富山県衛生研究所)、内野清子、田中智之(堺市衛生研究所)、平良勝也(沖縄県衛生環境研究所)、小口晃夫(独立行政法人製品評価技術基盤機構)、高瀬川由郎(新潟大学医学部国際保健学講座)、横山勝、本村和嗣(感染研病原体ゲノム解析研究センター)、山下和予(感染研感染症情報センター)、中内美名、高山郁代、江島美穂(感染研インフルエンザウイルス研究センター)

**研究体制と各研究分担者の役割**



**インフルエンザフェレンスセンター  
 地方ブロックコア地衛研研究班メンバー**

コア地衛研(ブロック毎計6機関) = 班研究+ブロック内連絡  
 サポート地衛研(5機関) = 班研究+ノウハウ・フィールドを生かした研究  
 メーリングリストの活用等により地研相互及び感染研との連携研究体制を構築  
 (研究協力者)  
 池田辰也、水田克己 山形県衛生研究所(コア地衛研)  
 長島真美、新開敬行、林 志直 東京都健康安全研究センター(コア地衛研)  
 加瀬哲男、高橋和郎 大阪府立公衆衛生研究所(コア地衛研)  
 戸田昌一、岡 恒明\* 山口県環境保健センター(コア地衛研)  
 吉富秀亮、千々和勝己 福岡県保健環境研究所(コア地衛研)  
 駒込理佳、長野秀樹 北海道衛生研究所  
 川上千春 横浜市衛生研究所  
 小淵正次、滝澤剛則 富山県衛生研究所  
 内野清子、田中智之 堺市衛生研究所  
 平良勝也 沖縄県衛生環境研究所  
 山下和予 国立感染症研究所 感染症情報センター  
 安井善宏 愛知県衛生研究所(コア地衛研)  
 \* 地方衛生研究所全国協議会(地全協) 感染症対策部会長  
 (分担研究者)  
 皆川洋子 愛知県衛生研究所、地全協感染症対策部会

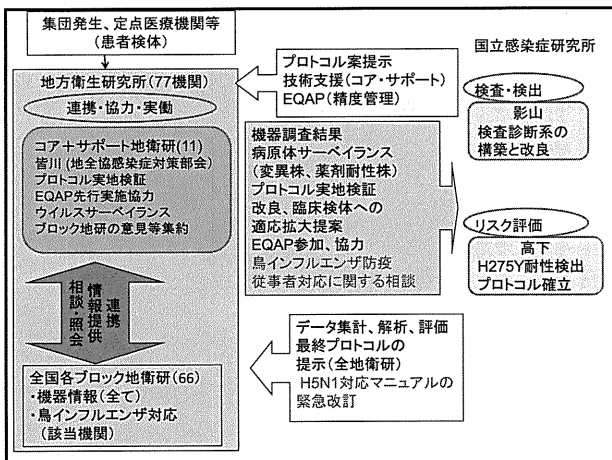
**平成22~23年度協力地衛研の活動**

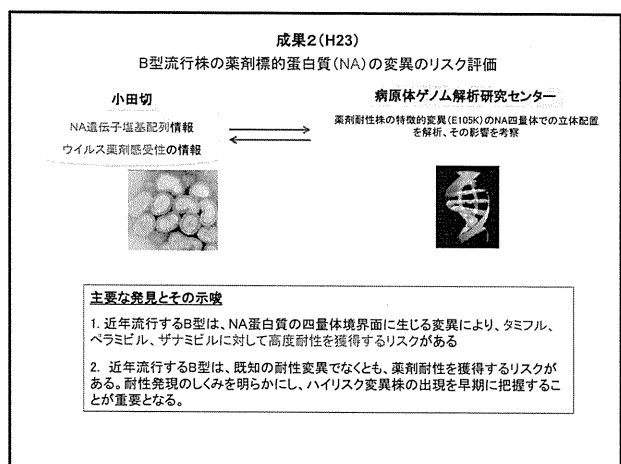
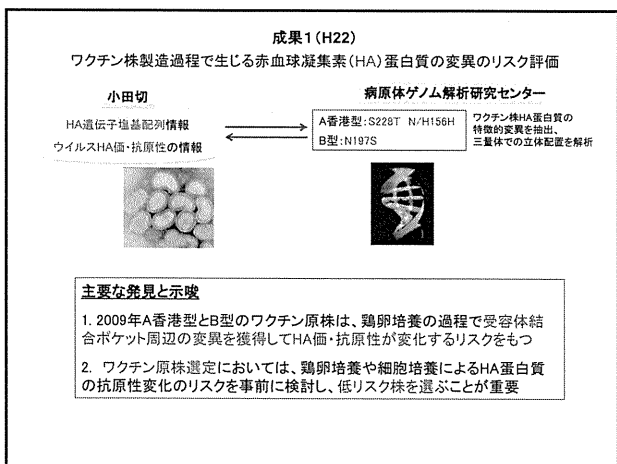
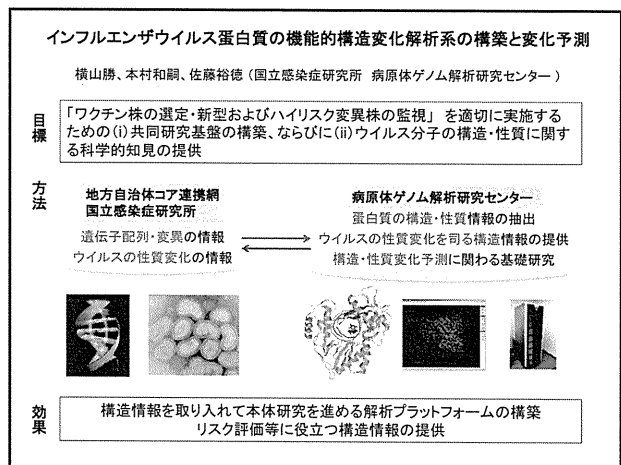
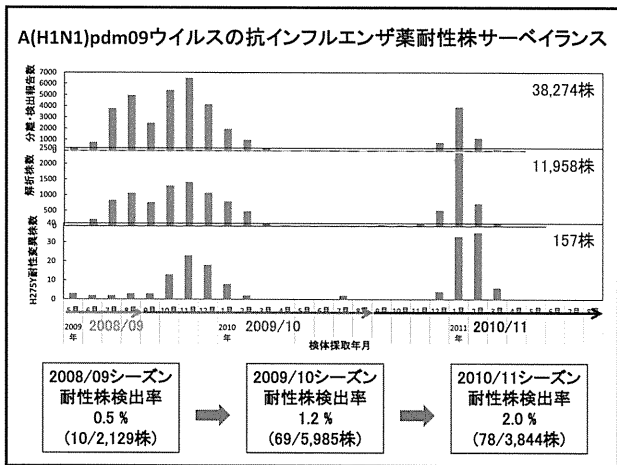
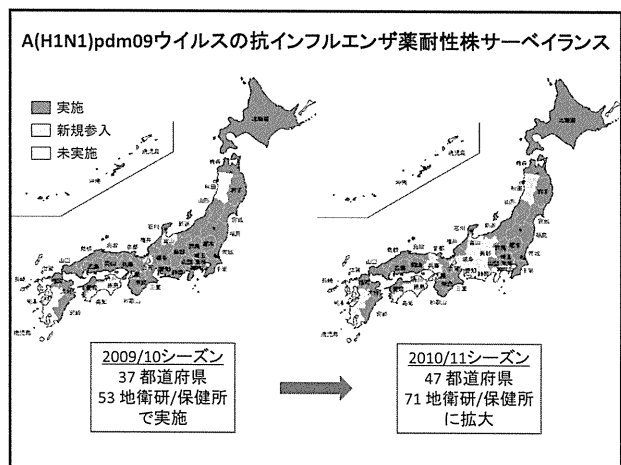
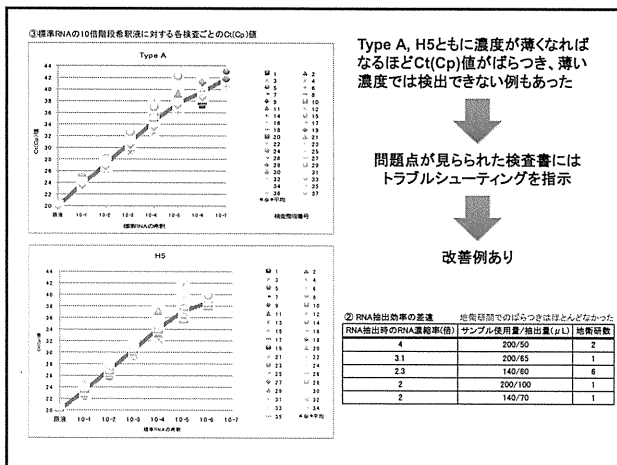
- 1) 感染研・地衛研間のインフルエンザ連携研究体制整備
- 2) オセルタミビル耐性サーベイランスの全国実施に協力
  - ・リアルタイムPCR機器を用いたH275Y検出システムの全国導入にあたり協力地衛研がマニュアルを含む先行実地検証を実施
  - ・各ブロック内全地衛研リアルタイムPCR機種情報更新調査
  - ・臨床検体を用いて耐性株検出系の事前評価、最適化検討
- 3) 2011年高病原性鳥インフルエンザ国内発生に伴い、コア地衛研がブロック内関係地衛研(農家、防疫作業者等のウイルス検査を担当)と連携既存H5検出プロトコルが鳥において流行中のH5に適合しているか、感染研に照会→検出プロトコル緊急改訂の契機に
- 4) 感染研によるインフルエンザウイルス検出系の精度管理に協力
- 5) インフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供
  - ・地域流行株の探知及び型別・解析
  - ・ペラムビル単独投与後生じた275Y変異株報告
- 6) 大学・地域医療機関等との連携研究

**インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイムRT-PCR法)の外部精度管理(EQA)実施**

**実施方法**

- ① (未知濃度のウイルスRNA 7検体)に対する亜型同定検査を各地衛研のSOPに従って実施し、各検体のCt(Cp)値の算出し、亜型同定を行う。
- ② (不活化ウイルス)より、各地衛研のSOPに従ってRNAの抽出を行い、抽出したRNAを用いて、Type A(M遺伝子)およびH1pdm09 (HA遺伝子)のCt(Cp)値の算出を行う。
- ③ (標準RNA)より10倍段階希釈液の作製を行い、各地衛研のSOPに従ってType A(M遺伝子)およびH5亜型(HA遺伝子)の検出を行い、各希釈液のCt(Cp)値の算出を行う。





NITEにおける遺伝子解析の実績(2012年1月24日現在)

A型のNA, M, HA2<sup>a)</sup>セグメントおよびB型のNA, HA2<sup>a)</sup>セグメントを解析

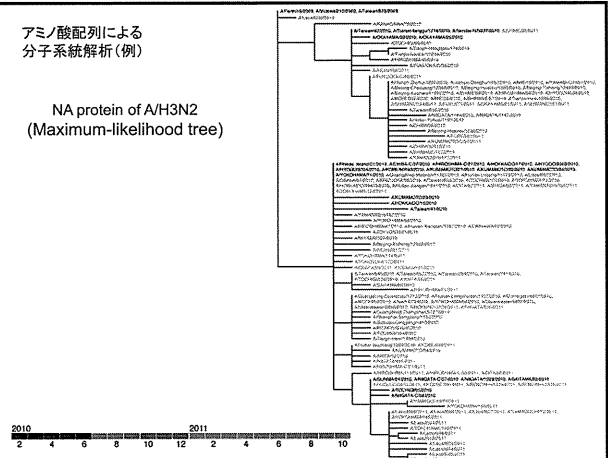
シーズン	型・亜型	受入数	成功数
2009/2010	A/H1N1pdm	73	71
	A/H3N2	38	37
	B	105	101 <sup>b)</sup>
2010/2011	A/H1N1pdm	75	73
	A/H3N2	99	99
	B	130	126 <sup>b)</sup>
2011/2012	A/H1N1pdm	1	1
	A/H3N2	22	22
	B	30	28 <sup>b)</sup>
合計		573	558

a) HA2セグメントは2011年度より追加。  
b) B型の失敗例はいずれもNAセグメント。プライマー配列への適合率が低下している傾向が見られる。

薬剤耐性変異、その他のハイリスク変異の増加は認められない。

アミノ酸配列による分子系統解析(例)

NA protein of A/H3N2 (Maximum-likelihood tree)



全セグメント解析のためのプロトコルの整備

A/H1N1pdm

- 2009年のパンデミック発生時にプロトコルを作成済み。
- 2011年度に2株の全セグメント解析を行い、最新流行株でのプロトコルの有効性を確認。

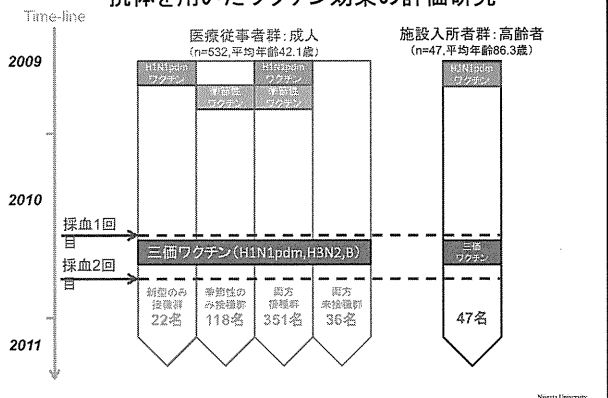
A/H3N2

- 2010年度にプロトコルを作成。
- 8株の全セグメント解析を行い、プロトコルの有効性を確認

B

- 2011年度にプロトコルを作成(年度末達成見込み)

インフルエンザワクチン接種者および未接種者の血清抗体を用いたワクチン効果の評価研究



2010-11シーズンワクチン接種前後血清抗体価の評価(成人と高齢者)

○ ワクチン効果の評価法

抗体価の評価にはワクチン接種前後の有意抗体保有率(40倍以上HI抗体保有率)、幾何平均抗体価を用いた。接種後の抗体価の上昇幅の評価は抗体有意上昇率(ワクチン接種前後で4倍以上の抗体価上昇があった人の割合)を用いた。

○ 結果

- A(H1N1)pdmに対する抗体は1シーズン目を経てなお接種前30%未満と低い
- A(H1N1)pdmワクチン接種後、抗体価の上昇が認められたことから、今後もワクチン接種は必要である
- 季節性A(H1N1)に対する記憶免疫が存在すると仮定される高齢者では新型ワクチン接種によるブースター効果と考えられる抗体価上昇が認められた
- A(H3N2)、B型では接種後でおおむね70%に達する有効抗体保有率を達成したが、高齢者ではやや反応が悪く、特にA(H3N2)では接種後も38.3%と低かった

最終年度(H24年度)の課題

- コア・サポート地衛研によるインフルエンザPCR検査の外部精度管理試験(EQA)法の再検討と実施要綱の見直し
- 全国地衛研でのEQAの実施戦略の検討
- インフルエンザ薬剤耐性ウイルスの監視、リスク評価の継続
- A,B型ウイルス全ゲノムシーケンス用プライマーセットの構築と精度試験の実施
- Bioinformaticによるインフルエンザウイルスゲノムの機能的解析と変異予測系の構築
- インフルエンザワクチン接種者、未接種者の血清抗体を用いたワクチン効果の評価の継続

## 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：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 2年目 35,200,000円

### I. 研究の意義

(1) 診断法の開発・改良と疫学的解析

- 1) 新種のエボラウイルスと新種のアレナウイルスの診断法の整備
- 2) 南米ハンタウイルス、食虫目ハンタウイルスの診断法の整備
- 3) 新興ポックスウイルス、食虫目ハンタウイルスの国内の動物の感染の実態解明
- 4) 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

- 1) サルのモルビリウイルス (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) 診断体制未整備の新種のエボラウイルスやアレナウイルス感染症の血清診断法の確立
- (2) ウイルス性出血熱の新種ウイルスに対応可能な遺伝子検出診断法の改良
- (3) 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
- (4) 宿主域拡大・病原性獲得機構から、ヒトへの感染拡大のリスク評価

### III. 2年間の研究成果

・研究代表者（森川茂）：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) 南米出血熱患者の抗体検出間接蛍光抗体法、ELISA法の確立
- (2) 南米アレナウイルスのシェードタイプによる代替えウイルス中和試験法の確立と感染におけるレセプターの解析

- (3) 新種アレナウイルス (ルジョ) とラッサ、LCM ウイルスを鑑別可能な単特異抗体の作製とルジョウイルス特異的抗原検出法の開発
- (4) サルの致死性ジステンパーウイルスのサル、イヌでの病原性解析
- (5) 牛痘ウイルスの血清疫学調査で国内のドブネズミ 500 匹全て陰性 (森川、西條、有川)  
 ・研究分担者 (甲斐知恵子): ニパウイルスの病原性の分子機構の解明
- (1) マレーシア株ゲノム cDNA の G, P 遺伝子をヒト-ヒト感染するバングラディッシュ株に組換えたキメラニパウイルスゲノム cDNA クローンの作製
- (2) SmartAmp 法によるニパウイルス特異的な簡易迅速検出法の開発  
 ・研究分担者 (高田礼人、安田二郎): 新種エボラウイルスや新種アレナウイルス等の診断法
- (1) 新種のブンディブギョエボラウイルスの NP 遺伝子も検出可能なフィロウイルス共通遺伝子検出 RT-PCR 法の確立・評価 (高田・森川)  
 フィロウイルスの表面糖蛋白質の分泌型組換え蛋白を用いた IgM, IgG 抗体検出 ELISA 法の評価 (高田・西條): ザンビアの野生霊長類の血清を用いて評価し、IgG および IgM の両方が検出可能であった。
- (2) マールブルグ、ラッサウイルスの RT-LAMP 法の開発・評価 (安田)  
 ・研究分担者 (安田二郎): 出血熱ウイルスの粒子形成、出芽機構の解析
- (1) 細胞因子 Tetherin によるナイロウイルス (クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近年なハザラウイルス)、エボラウイルスの粒子形成の抑制効果の解析  
 ・研究分担者 (有川二郎): 南米ハンタウイルス肺症候群(HPS)ウイルスの診断法・分子疫学と病原性
- (1) 南米 HPS の診断系の改良と疫学調査
- (2) HPS モデル動物の免疫細胞移入スキッドマウスを用いた開発  
 ・研究分担者 (新井智): 食虫目のハンタウイルスの診断系確立と国内の感染状況の把握
- (1) 三重・新潟のヒミズからの Asama ウイルスの検出
- (2) 北海道のバイカルトガリネズミから新種のハンタウイルス(Mukawa)の検出  
 ・研究分担者 (西條政幸): ナイジェリア等でのウイルス性出血熱の血清疫学調査
- (1) ナイジェリア・カメルーン国境近くの Gashaka Gumti National Park の霊長類におけるエボラウイルスとリフトバレー熱ウイルスに対する抗体保有状況の調査  
 ・研究分担者(遠藤大二、水谷哲也): 新種ウイルスや新興ウイルス出現時の迅速なウイルス同定法の開発
- (1) CoCoMo アルゴリズムによるアレナ、ハンタウイルスの degenerated プライマー設計と検証
- (2) rRNA を priming しない hexamer primer の設計とウイルス遺伝子の priming 率の検証
- (3) ウイルスの網羅的検出(RDV)法の臨床検体への適用のための検体前処理法の検討

#### IV. 24年度の課題

(1) 診断法の開発・改良と疫学的解析：チャパレウイルス（ボリビア）、ルジョウイルス（ザンビア・南ア）、ブンディブージョエボラウイルス、ラッサウイルスの診断法の改良と開発を行った（森川、高田、安田）。国内の食虫類からハンタウイルスを検出した（新井、有川）。国内のドブネズミの牛痘ウイルス抗体調査を行なった結果、陽性個体は検出されなかった（森川、西條）。ウイルス遺伝子検出法の改良、至適化を検討した（水谷、遠藤）。

B. ウイルス学的、分子生物学的解析：サルのイヌジステンパーウイルス感染症から分離された CDV のサルに対する病原性に SLAM 指向性の馴化が不要であった（森川）。ニパウウイルスのバングラディッシュ株型 G 及び P 遺伝子をマレーシア型全長 cDNA クローンに入替えて、リバーシジェネティクスによるウイルス作製を可能にした（甲斐）。細胞性因子テザーリンがアレナ、フィロウイルス以外にもナイロウイルス（ブニヤ）の粒子産生を抑制することを明らかにした（安田）。このように当初計画に照らしてほぼ順調に進捗している。

(2) 宿主域を拡大し人への感染の可能性が強いウイルスや新種の出血熱ウイルス等への対応：最近、スペインで発見された新種のフィロウイルスにも対応できる遺伝子検出法を開発。新種のフィロウイルスのシュードタイプウイルスの作出。フィロウイルス特異的モノクローナル抗体の新種のフィロウイルスに対する反応性の検討。開発されたアレナウイルス抗体検出系によるアフリカ等の齧歯類の血清疫学の実施。

(3) 豚のエボラウイルス感染症、ユビナガコウモリから検出された新種のフィロウイルス等、これまで想定していなかった宿主動物の実験室診断法の対応と、中国で新興した重症発熱性血小板減少症候群等への対応

#### V. 行政施策への貢献の可能性

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

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者（森川 茂）

1. 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

## 研究分担者

研究分担者 (甲斐知恵子)

1. Huang M, Sato H, Hagiwara K, Watanabe A, Sugai A, Ikeda F, Kozuka-Hata H, Oyama M, Yoneda M, Kai C. Determination of a phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in virus transcription. *J Gen Virol*. 2011 Sep;92(Pt 9):2133-41.
2. Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, Sugai A, Sato H, Kai C. Peroxiredoxin 1 is required for efficient transcription and replication of measles virus. *J Virol*. 2011 Mar;85(5):2247-53.
3. Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild TF, Kai C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS One*. 2010 Sep 15;5(9):e12709.

研究分担者 (高田礼人)

1. Ishii, A., Thomas, Y., Moonga, L., Nakamura, I., Ohnuma, A., Hang'ombe, B., Takada, A., Mweene, A., and Sawa, H. (2011) Novel arenavirus, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 17(10):1921-1924.
2. Ogawa, H., Miyamoto, H., Ebihara, H., Ito, K., Morikawa, S., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) 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* 171(1):310-313.
3. Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matsuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., Takada, A. (2010) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(11):1723-1728.

研究分担者 (安田二朗)

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. *Microbiology and Immunology*, **55**, 44-50, 2011.
2. \*Yasuda, J.: Marburg virus budding: ESCRT of progeny virion to the outside of the cell. *Future Virology*, **5**, 627-637, 2010.
3. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 2330-2336, 2010.

研究分担者 (有川二郎)

1. Tegshduure E, Yoshimatsu K, Taruishi M, Endo R, Shimizu K, Koma T, Yasuda P S, Kariwa H, Arikawa J, Ishihara C : Different cross-reactivity of human and rodent sera to Tula virus and Puumala virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33, e67-e73, 2010
2. Koma T, Yoshimatsu K, Pini N, Safronetz D, Taruishi M, Levis S, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Ebihara H, Feldmann H, Enria D and Arikawa J : Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping sin nombre, Andes, and Laguna Negra hantavirus infections in Humans and Rodents. *Journal of clinical microbiology* Vol.48, No.5, 1635-1642, 2010
3. Yasuda SP, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Endo R, Isozumi R, Arikawa J : Application of Truncated Nucleocapsid Protein (N) for Serotyping ELISA of Murinae-Associated Hantavirus Infection in Rats. *J Vet Med Sci.* in press, 2011

研究分担者 (西條 政幸)

1. Kato F, Kotaki A, Yamaguchi Y, Shiba H, Hosono K, Harada S, Saijo M, Kurane I, Takasaki T, Tajima S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR.

Virus Genes. 2011 Nov 6. [Epub ahead of print]

2. Shiota T, Lixin W, Takayama-Ito M, Iizuka I, Ogata M, Tsuji M, Nishimura H, Taniguchi S, Morikawa S, Kurane I, Mizuguchi M, Saijo M. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and its application to a rapid antiviral sensitivity assay. *Antiviral Res.* 2011 Aug;91(2):142-9.
3. 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, Greenberg RN. Safety and immunogenicity of LC16m8, an attenuated smallpox vaccine in vaccinia-naive adults. *J Infect Dis.* 2011 Nov;204(9):1395-402

研究分担者 (新井 智)

1. S. Arai, S. H. Gu, L. J. Baek, K. Tabara, S. Bennett, H.-S. Oh, N. Takada, H. J. Kang, K. Tanaka-Taya, S. Morikawa, N. Okabe, R. Yanagihara, J.-W. Song. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology. In press*
2. H. J. Kang, S. Arai, A. G. Hope, J. A. Cook, R. Yanagihara. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector-borne and zoonotic diseases.* 10: 593-597. 2010.

研究分担者 (水谷哲也)

1. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes.* 2011 Aug 30. [Epub ahead of print]
2. Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes.* 2011 Oct;43(2):243-8.
3. Mizutani T, Sayama Y, Nakanishi A, Ochiai H, Sakai K, Wakabayashi K, Tanaka N, Miura E, Oba M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Ono S. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology.* 2011 Mar 30;412(1):179-87.

研究分担者 (遠藤大二)

1. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kiwi S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes.* 2011 Aug 30.
2. Jimba M, Takeshima SN, Matoba K, Endoh D, Aida Y. BLV-CoCoMo-qPCR : Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm. *Retrovirology.* 2010 Nov 2;7:91.
3. Teraoka H, Ito S, Ikeda H, Kubota A, Elmagd M M A, Kitazawa T, Kim EY, Iwata H and Endoh D. Differential Display System with Vertebrate-Common Degenerate Oligonucleotide Primers: Uncovering Genes Responsive to Dioxin in Avian Embryonic Liver. *Environ Sci Technol.* 2011



Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

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

・ 南米出血熱、リフトバレー熱の代替え中和試験法の開発

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

・ 南米アレナ、ハタネズミ由来ハンタウイルス感染の鑑別 ELISA の開発

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

・ アクセサリー遺伝子欠損弱毒ニパウイルスの作製

・ フィロウイルス出芽に關与する細胞因子の解明

・ SARS 発症モデルの重症化機構の解明

・ サル痘感染サルの重症化機構の解明

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

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

## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1983-1988：国立予防衛生研究所

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

1991-現在：国立感染症研究所

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

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

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

1991-現在：国立感染症研究所(倉根一郎、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. 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. Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2011, Aug 30. [Epub ahead of print]
3. 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
4. Abe M, Ito N, Sakai K, Kaku Y, Oba M, Nishimura M, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Sugiyama M, Mizutani T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. *Virus Genes*. 2011, 43(2):243-8.
5. 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.
6. 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*. 2011 171(1):310-313.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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 nonhuman primates. *J Gen Virol.* 2009 Sep;90(Pt 9):2266-71
  12. 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.
  13. 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.
  14. Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V.: Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junín virus N protein. *J Med Virol.* 80(12):2127-33, 2008
  15. 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
  16. 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.
  17. 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
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. 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
  23. 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.
  24. 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.
  25. 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
  26. Ike, F., Bourgade, F., Ohsawa, K., Sato, H., Morikawa, S., Saijo, M., Kurane, I., Takimoto, K., Yamada, Y.K., Jaubert, J., Berard, M., Nakata, H., Hiraiwa, N., Mekada, K., Takakura,

- A., Itoh, T., Obata, Y., Yoshiki, A., and Montagnetelli, X. : LCMV infection in a wild-derived mouse inbred strain undetected by dirty bedding sentinel health monitoring and revealed after embryo transfer. *Comp. Med.*, 57(3): 272-281, 2007.
27. 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
28. 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
29. 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

知的財産取得取得等

Unite States Patent No.: US 8,030,020 B2

Date of Patent: Oct 4 2011

Process for preparing live smallpox vaccine

Inventors: Tomomi Kanehara, Hiroyuki Yokote, Kunio Ohkuma,

Masahiko Kuranaga (MKumamoto, JP), Shigeru Morikawa (Musashimurayama, JP)