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

研究代表者：森川 茂（感染研）

研究分担者：高田礼人（北大）、有川二郎（北大）、遠藤大二（酪農大）、甲斐知恵子（東大）、西條 政幸、新井智（感染研）、水谷 哲也（東京農工大）、安田二朗（長崎大）

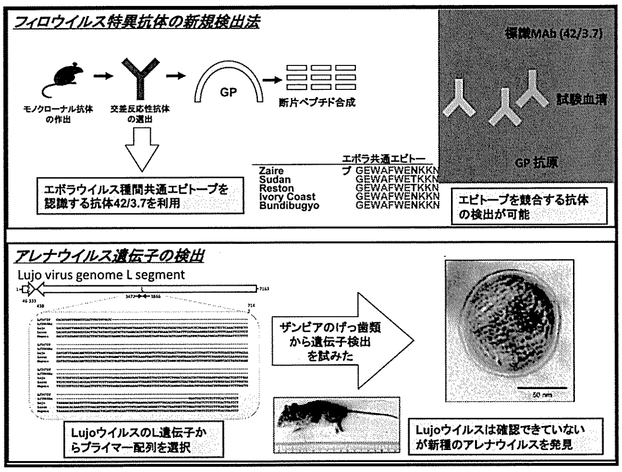
研究概要

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

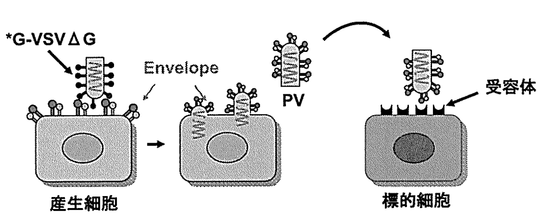
宿主域拡大・病原性獲得のメカニズムの解明
1) サルのモルビリウイルス (CDV) のサルへの宿主域拡大の分子機構の解明
2) ニパウイルスの病原性の分子機構の解明
3) 出血熱ウイルス等の粒子形成・出芽機構の解析とその阻害法開発の基礎研究
4) アレナウイルスのレセプターの解析
5) ハンタウイルス肺症候群の動物モデル系

最近のウイルス性出血熱等

- 新型・新種のウイルスによるウイルス性出血熱等の発生
  - 新種の旧世界アレナウイルスによるウイルス性出血熱の発生（ザンビア・南ア2008 / Lujo virus）
  - 新種の新世界アレナウイルスによる南米出血熱の発生（ボリビア2007、Chapare virus）
  - 新世界アレナウイルスの異なるcladeのウイルス間でのS-segment RNA内のNP 遺伝子末端での組換えによる新型アレナウイルスの発生(カリフォルニア1999/2000 / Whitewater Arroyo virus)
  - 新型（新種）のエボラウイルスの出現（ウガンダ2007-8、Bundibugyo ebolavirus）
  - 新種のフィロウイルスがユビナガコウモリから発見（スペイン2011、Lloviu virus）
  - ヒトのサル痘の流行(DRC)、新種牛痘ウイルスによるヒトの牛痘（独仏2008-9）
- 想定されない動物からの危険なウイルスの検出
  - 輸入齧歯類からのサル痘患者発生（米国2003、約70名）
  - ブタからエボラウイルス感染が証明
  - アジア諸国やアフリカでオオコウモリに広くヘニパウイルスが検出された
  - サルのジステンパーウイルス感染症が発生した（日本、2008）
  - 多くの食虫類からのハンタウイルスの検出



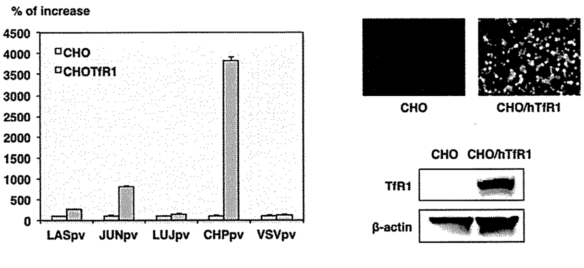
VSVシュードタイプウイルス (pseudotype virus; PV)



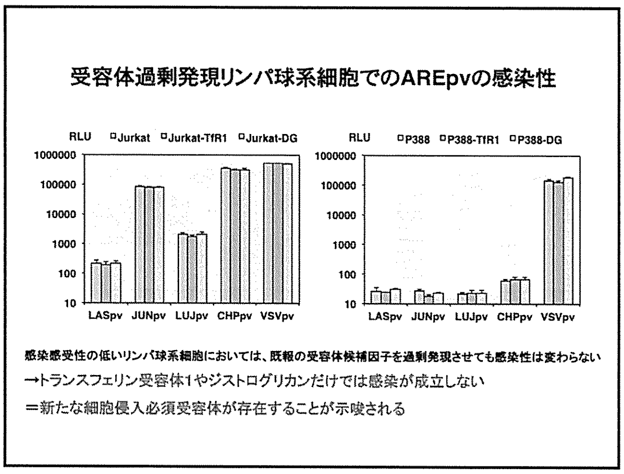
特徴

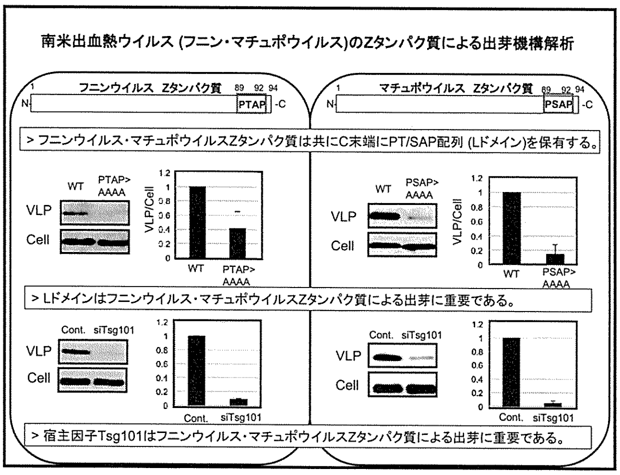
- 一過性の感染のため、細胞侵入に特化した観察ができる
- ウイルス作製が比較的容易
- 操作においても安全性が高い
- トランスフェクション効率の高い細胞でのみ作製可能

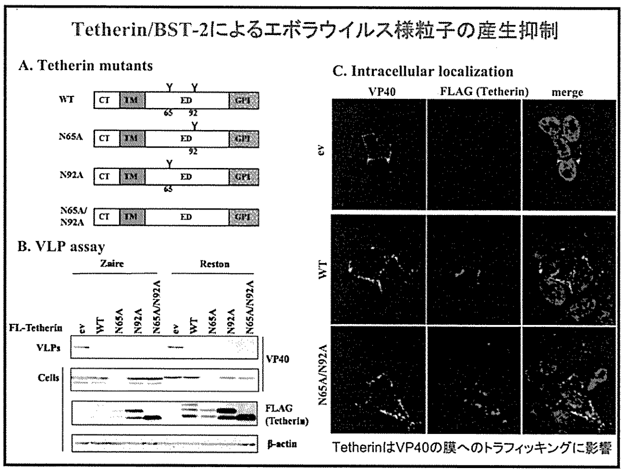
TfR1発現CHO細胞でのAREpvの感染性

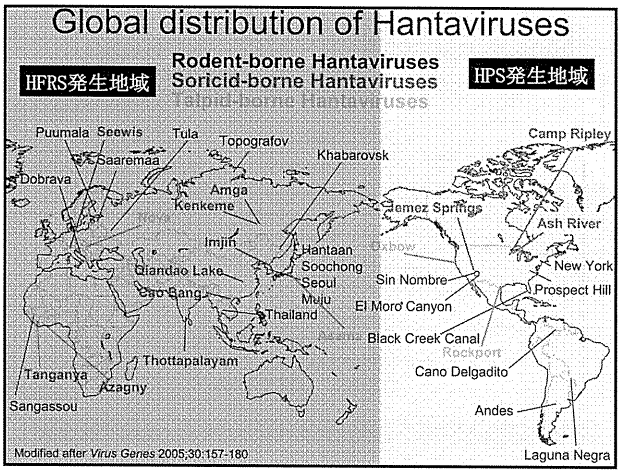


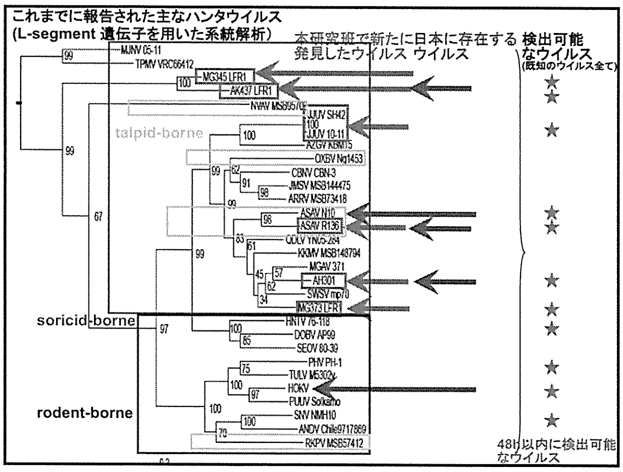
CHO細胞においては、hTfR1を過剰発現させると南米アレナウイルスの感染性が増強される
→CHO細胞においてはhTfR1は感染増大因子の一つであると考えられる

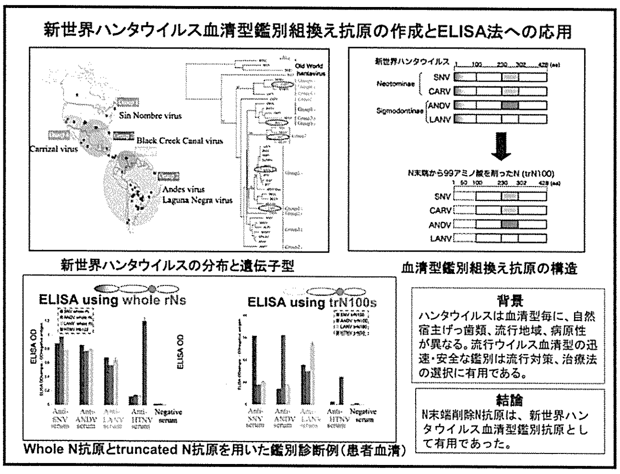

受容体過剰発現リンパ球系細胞でのAREpvの感染性
RLU □Jurkat □Jurkat-TfR1 □Jurkat-DG
RLU □P388 □P388-TfR1 □P388-DG
LASpv JUNpv LUJpv CHPpv VSVpv
感染感受性の低いリンパ球系細胞においては、既報の受容体候補因子を過剰発現させても感染性は変わらない
→トランスフェリン受容体1やジストログリカンだけでは感染が成立しない
＝新たな細胞侵入必須受容体が存在することが示唆される

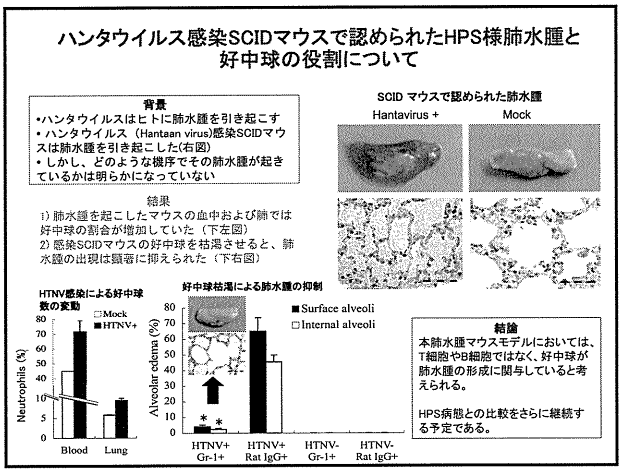

南米出血熱ウイルス (フニン・マチュポウイルス)のZタンパク質による出芽機構解析
フニンウイルス Zタンパク質
PTAP
マチュポウイルス Zタンパク質
PSAP
> フニンウイルス・マチュポウイルスZタンパク質は共にC末端にPT/SAP配列 (Lドメイン)を保有する。
WT PTAP> AAAA
VLP
Cell
VLP/Cell
WT PSAP> AAAA
> Lドメインはフニンウイルス・マチュポウイルスZタンパク質による出芽に重要である。
Cont. siTsg101
> 宿主因子Tsg101はフニンウイルス・マチュポウイルスZタンパク質による出芽に重要である。

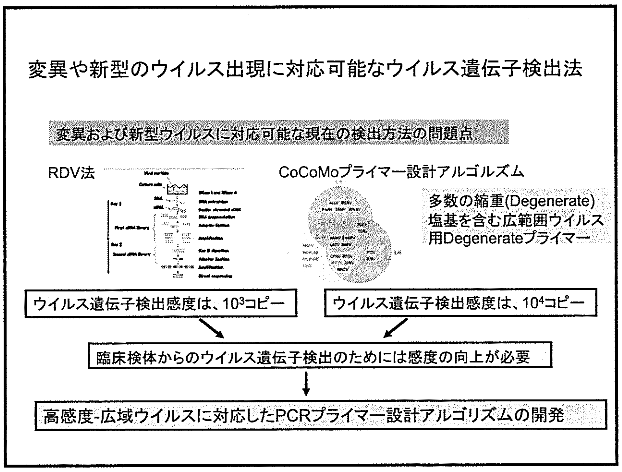

Tetherin/BST-2によるエボラウイルス様粒子の産生抑制
A. Tetherin mutants
WT
N65A
N92A
N65A/N92A
CT TM ED GPI
B. VLP assay
Zaire
Reston
FL-Tetherin
VLPs
Cells
VP40
FLAG (Tetherin)
β-actin
C. Intracellular localization
VP40
FLAG (Tetherin)
merge
ev
WT
N65A/N92A
TetherinはVP40の膜へのトラフィッキングに影響

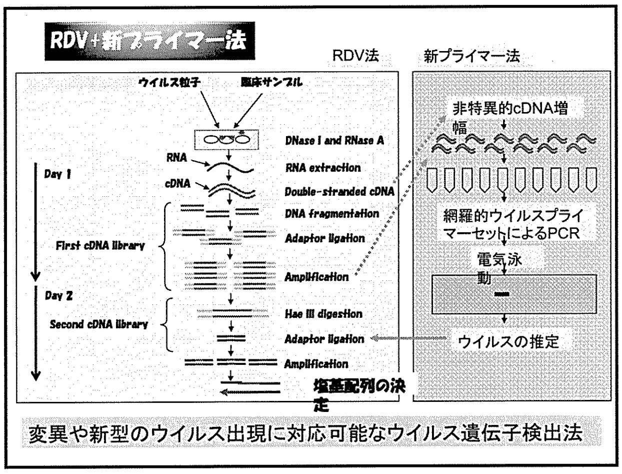

Global distribution of Hantaviruses
HFRS発生地域
Rodent-borne Hantaviruses
Soricid-borne Hantaviruses
Talpid-borne Hantaviruses
HPS発生地域
Puumala
Seewis
Saaremaa
Tula
Topografov
Khabarovsk
Dobrava
Amga
Kenkeme
Imjin
Hantaan
Soochong
Seoul
Muju
Qiandao Lake
Cao Bang
Thailand
Thottapalayam
Tanganya
Azagny
Sangassou
Camp Ripley
Jemez Springs
Ash River
Oxbow
New York
Sin Nombre
Prospect Hill
El Moro Canyon
Black Creek Canal
Rockport
Cano Delgadito
Andes
Laguna Negra
Modified after Virus Genes 2005;30:157-180


これまでに報告された主なハンタウイルス
(L-segment 遺伝子を用いた系統解析)
本研究班で新たに日本に存在する発見したウイルス ウイルス
検出可能なウイルス
(既知のウイルス全て)
talpid-borne
soricid-borne
rodent-borne
48h以内に検出可能なウイルス


新世界ハンタウイルス血清型鑑別組換え抗原の作成とELISA法への応用
Sin Nombre virus
Black Creek Canal virus
Carrizal virus
Andes virus
Laguna Negra virus
新世界ハンタウイルスの分布と遺伝子型
SNV
CARV
ANDV
LANV
N末端から99アミノ酸を削ったN (trN100)
血清型鑑別組換え抗原の構造
ELISA using whole rNs
ELISA using trN100s
Whole N抗原とtruncated N抗原を用いた鑑別診断例(患者血清)
背景
ハンタウイルスは血清型毎に、自然宿主げっ歯類、流行地域、病原性が異なる。流行ウイルス血清型の迅速・安全な鑑別は流行対策、治療法の選択に有用である。
結論
N末端削除N抗原は、新世界ハンタウイルス血清型鑑別抗原として有用であった。


ハンタウイルス感染SCIDマウスで認められたHPS様肺水腫と
好中球の役割について
背景
•ハンタウイルスはヒトに肺水腫を引き起こす
• ハンタウイルス (Hantaan virus)感染SCIDマウスは肺水腫を引き起こした(右図)
• しかし、どのような機序でその肺水腫が起きているかは明らかになっていない
結果
1) 肺水腫を起こしたマウスの血中および肺では好中球の割合が増加していた（下左図）
2) 感染SCIDマウスの好中球を枯渇させると、肺水腫の出現は顕著に抑えられた（下右図）
SCID マウスで認められた肺水腫
Hantavirus +
Mock
HTNV感染による好中球数の変動
□Mock
■HTNV+
Neutrophils (%)
80
70
60
50
40
10
5
0
Blood
Lung
好中球枯渇による肺水腫の抑制
■Surface alveoli
□Internal alveoli
Alveolar edema (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HTNV+ Gr-1+
HTNV+ Rat IgG+
HTNV- Gr-1+
HTNV- Rat IgG+
結論
本肺水腫マウスモデルにおいては、T細胞やB細胞ではなく、好中球が肺水腫の形成に関与していると考えられる。
HPS病態との比較をさらに継続する予定である。


変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法
変異および新型ウイルスに対応可能な現在の検出方法の問題点
RDV法
CoCoMoプライマー設計アルゴルズム
多数の縮重(Degenerate)塩基を含む広範囲ウイルス用Degenerateプライマー
ウイルス遺伝子検出感度は、10³コピー
ウイルス遺伝子検出感度は、10⁴コピー
臨床検体からのウイルス遺伝子検出のためには感度の向上が必要
高感度-広域ウイルスに対応したPCRプライマー設計アルゴリズムの開発


RDV+新プライマー法
RDV法
新プライマー法
ウイルス粒子
臨床サンプル
DNase I and RNase A
RNA
RNA extraction
cDNA
Double-stranded cDNA
Day 1
DNA fragmentation
First cDNA library
Adaptor ligation
Amplification
Day 2
Hae III digestion
Second cDNA library
Adaptor ligation
Amplification
塩基配列の決定
非特異的cDNA増幅
網羅的ウイルスプライマーセットによるPCR
電気泳動
ウイルスの推定
変異や新型のウイルス出現に対応可能なウイルス遺伝子検出法

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：結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略
課題番号 ：H22-新興--一般-007
予定期間 ：H22年度からH24年度まで
研究代表者 ：牧野正彦
所属研究機関：国立感染症研究所
所属部局 ：感染制御部
職名 ：部長
年次別研究費(交付決定額)：1年目 48,000,000 円 2年目 43,680,000 円

Ⅰ．研究の意義

(1) 結核菌感染後の生体防御誘導機序及び結核菌に対する反応抵抗性機構は不明な点が多い
(2) 潜伏感染した結核菌の再活性化を診断するバイオマーカーが存在しない
(3) アウトブレイクを引き起こす臨床分離株の予測ができない
(4) 成人肺結核を含む結核等病原性抗酸菌感染症を的確に予防する方策・ワクチンがない
(5) 長時間作用し、成人肺結核の発症を的確に予防するBCG非依存性ワクチンが存在しない
(6) 新規結核ワクチンの開発に必須な長期生存型CTL分化誘導機序が未解明
(7) 多剤耐性結核菌の急速な広がりから、新規抗結核薬の開発が求められている
(8) 多剤耐性菌に対する対処法として、抗結核剤以外による治療法が開発されていない
(9) 自然免疫系の活性制御による結核菌感染制御法が確立されていない

Ⅱ．研究の目的、期待される成果

(1) 抗結核新規治療法・予防法の開発に資する免疫学的肺内結核菌排除方法を明らかにする
(2) 宿主由来miRNAを使用した潜伏感染者の再燃型結核菌の迅速診断法の開発
(3) 結核菌由来miRNAを使用したアウトブレイク株の迅速予測法の開発
(4) 結核菌Th1ペプチドによるCTL産生分子機構を解明し、選択的・効率的に結核菌反応性CD8記憶T細胞を産生・維持する新規結核追加免疫ワクチン開発戦略を樹立。個体の免疫学的背景に依存しないユニバーサルワクチンを開発
(5) 未感作CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞を同時に活性化し、記憶型T細胞及び抗酸菌殺戮性実効型T細胞を効率的に産生し肺結核を的確に予防する初回免疫ワクチンの開発
(6) 標的タンパク質の機能構造相関解析より新規抗結核薬の開発
(7) 自然免疫系を有効に活性化し、新規結核感染制御法を確立。迅速な結核菌生体外排除を誘導

Ⅲ．2年間の研究成果

・研究代表者（牧野正彦）
(1) 抗原性に富み結核ワクチン候補となる主要抗原としてMMP-II蛋白を新たに同定
(2) MMP-II-HSP70連結遺伝子をウレアーゼ欠損リコンビナントBCGに導入した新規リコンビナントBCGはメモリーT細胞を効率的に産生し、親BCGに比し効率的に結核菌の肺内増殖を抑制
・研究分担者（荒川宜親）

(1) 新規抗結核薬の標的タンパク質として結核菌由来新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素を選択
(2) 本酵素の機能と構造を明らかにし、活性を特異的に阻害するリード化合物を探索

・研究分担者(田村　敏生)

(1) CTLの活性化にはTh1ペプチドは必須であり、CTLの活性化誘導性IFN-γを産生するヘルパーT細胞と樹状細胞活性化を誘導するIL-17F産生性ヘルパーT細胞の2亜集団への分化を誘導

・研究分担者(星野仁彦)

(1) 肺結核発症患者に有意に上昇するmiRNAを同定
(2) 結核菌由来のmiRNAを同定する定量的PCR診断法の確立

・研究分担者(河村伊久雄)

(1) PD-1欠損マウスは、BCG接種で誘導される防御免疫応答を亢進
(2) PD-1による抑制性シグナルは結核菌感染後の過剰な免疫応答を抑制し感染防御反応を正常化

・研究分担者 (竹田潔)

(1) 結核感染で発現が誘導されるAIM2を欠損するマウスは結核菌感染に高感受性となる
(2) 結核菌細胞膜の透過性亢進を誘導するSLPIは結核菌感染初期に働き結核菌を殺戮。SLPIは自然免疫を介した免疫療法剤となる

Ⅳ. 24年度の課題

(1) ウレアーゼ欠損BCGにHSP70-MMP-IIに加えCFT10を導入した2段ロケット様新規BCGの作製
(2) 新規リコンビナントBCGのワクチン効果をマウス及びサルを用いて検討
(3) AIM2による結核菌感染制御機構の解析
(4) BCGワクチン効果へのPD-1シグナル経路の影響解析。PD-1を制御する免疫療法剤の開発
(5) 新規抗結核薬の開発に向けて、リード化合物の構造を決定し、その最適化を行う
(6) Th1ペプチド刺激によるIL-17F産生細胞分化誘導機序の解析
(7) Th1ペプチド及びIL-17FによるCTL分化誘導のワクチン効果の検証
(8) アウトブレイクに関与するmiRNAの同定と再燃に関与するmiRNAの同定

Ⅴ. 行政施策への貢献の可能性

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

Ⅵ. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 (牧野正彦)

(1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2010. Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant Bacillus Calmette-Guérin producing heat shock

protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 185: 6234-6243.

(2) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.

(3) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, in press.

研究分担者 (荒川宜親)

(1) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. Structural insights into the novel diadenosine 5′,5‴-P^1,P^4-tetraphosphate phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. J. Mol. Biol., 410: 93-104

研究分担者 (田村敏生)

(1) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, A. Kariyone, M. D. Begum, K. Kawakami, Y. Okamoto, S. Hamada, K. Oshiro, H. Kohama, T. Arakawa, N. Ohara, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 2010. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type $CD4^+$ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. Int. Immunol., 22: 307-318.

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

(3) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.

研究分担者 (星野仁彦)

(1) Kobayashi, H., A. Nolan, B. Naveed, Y. Hoshino, L. Segal, Y. Fujita, W. N. Rom, and M. D. Weiden. 2011. Neutrophils Activate Alveolar Macrophages by producing Caspase-6 Mediated Cleavage of Interleukin-1 Associated Kinase-M (IRAK-M). J. Immunol., 186: 403-410.

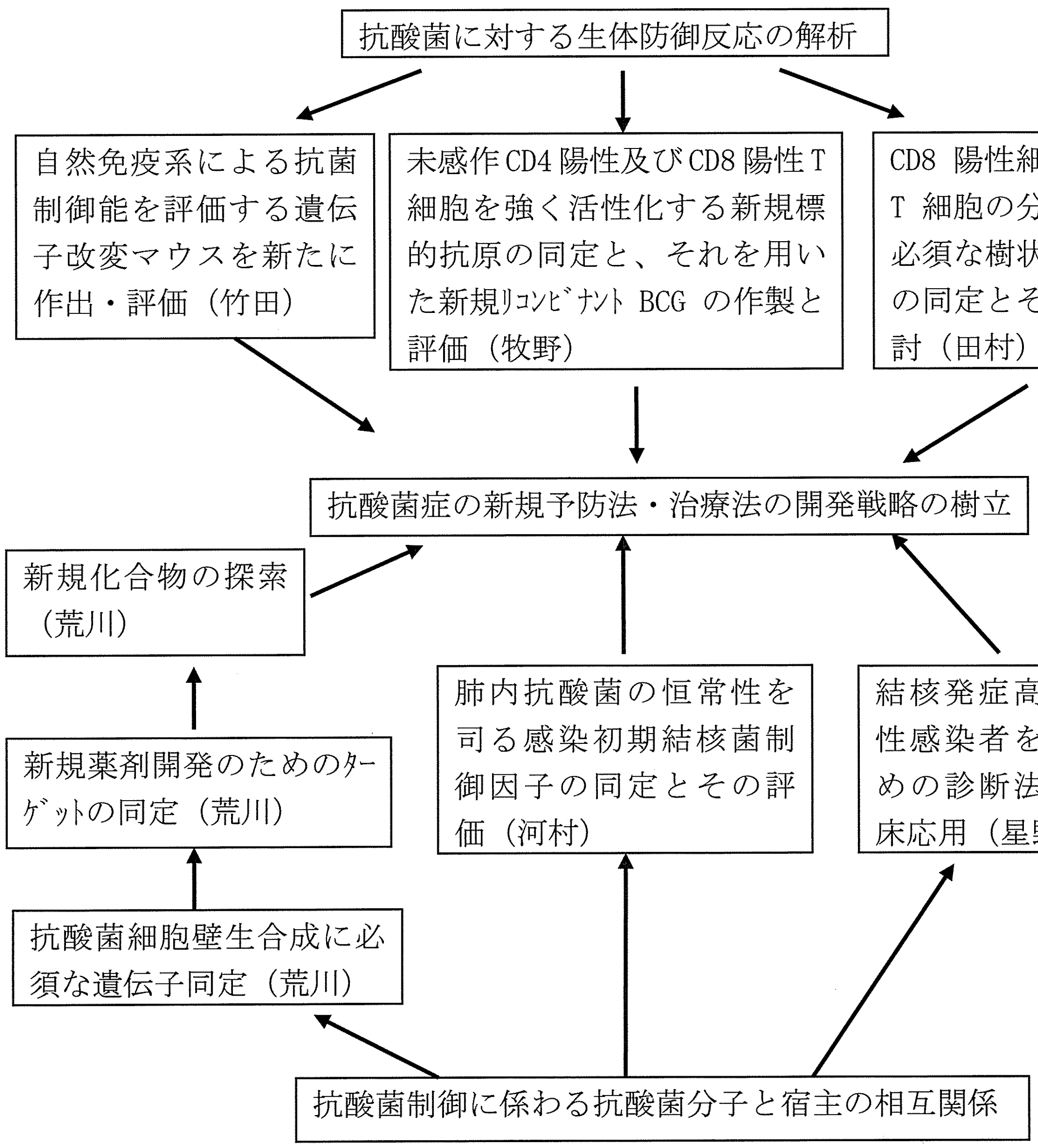
(2) Ariga H, H. Nagai, A. Kurashima, Y. Hoshino, S. Shoji, and Y. Nakajima. 2011. Stratified Threshold Values of QuantiFERON Assay for Diagnosing Tuberculosis Infection in Immunocompromised Populations. Tuberculosis Research and Treatment. in press.

研究分担者 (河村伊久雄)

(1) Sakai S, I. Kawamura, T. Okazaki, K. Tsuchiya, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. 2010. PD-1-PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Int. Immunol., 22: 915-925.

(2) Daim S, I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Kurenuma, Y. Shen, S. R. Dewamitta, S. Sakai, T. Nomura, H. Qu, and M. Mitsuyama. 2011. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. J. Med. Microbiol., 60: 582-591.

Ⅶ. Ⅲ(2 年間の研究成果)の概要図等



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

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

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

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

・主な研究課題

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

・これまでの研究実績

1) ***Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011.*** A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, in press.
2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980 – 2010. (JCM00783-11 Version 2). J. Clin. Microbiol., in press.
3) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. J. Dermatol., in press.
4) ***Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011.*** Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 18: 235-242.
5) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae folP1* gene and Dapsone resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 762-766.
6) Kai, M., N. P. N. Ha, N. H. An, P. T. H. B. Diu, N. K. Hoa, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and N. T. Tan. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium*

leprae in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis., 52: e127–e132.

7) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. J. Clin. Microbiol., 49: 613—617.

8) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2011. Apoptosis–inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 4000–4005.

9) 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.

10) Miyamoto, Y., T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4–specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700–5708.

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

12) Hayashi, D., T. Takii, T. Mukai, M. Makino, E. Yasuda, Y. Horita, R. Yamamoto, A. Fujiwara, K. Kanai, M. Kondo, A. Kawarazaki, I. Yano, S. Yamamoto, and K. Onozaki. 2010. Biochemical characteristics among *Mycobacterium bovis* BCG substrains. FEMS Microbiol. Lett., 306: 103–109.

13) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein–II in leprosy patients from Indonesia. Lepr. Rev., 80: 402–409.

14) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2009. Induction of cross–priming of naïve $CD8^+$ T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette–Guérin that secretes heat shock protein 70–major membrane protein–II fusion protein. J. Immunol., 183: 6561–6568.

15) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. GM–CSF–mediated T–cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein–II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 55: 39–46.

16) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Inhibition of the Multiplication of *Mycobacterium leprae* by Vaccination with a Recombinant *M. bovis* BCG Strain that Secretes Major Membrane Protein–II in Mice. Clin. Vaccine Immunol., 16: 1399–1404.

17) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. 2008. $CD4^+$ T cell activation by antigen–presenting cells infected with urease–deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53: 96–106.

18) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2008. The *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8–specific glycopeptidolipid. J. Bacteriol., 190: 7918–7924.

19) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by

enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. Clin. Vaccine Immunol., 15: 1755-1759.

20) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 190:3613-3621.

21) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. 2007. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Microbes and Infect., 9: 70-77.

22) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi , C. Abe , K. Kobayashi, S. Kitada, R, Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. 2007. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. FEMS Microbiol. Lett., 272: 202-205.

23) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2007. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 189: 5515-5522.

24) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. 2007. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. FEBS Lett., 581: 3345-3350.

25) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2006. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. J. Bacteriol., 188: 86-95.

26) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. 2006. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. FEMS Microbiol. Lett., 254: 232-239.

27) Makino, M., Y. Maeda, T. Mukai, and S. H. E. Kaufmann. 2006. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1β . Eur. J. Immunol., 36: 1443-1452.

28) Makino, M., Y. Maeda, and K. Inagaki. 2006. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes Major Membrane Protein II of *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 74: 6264-6271.

29) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. 2005. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae.* Infect. Immunity, 73: 2744-2750.

30) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. 2005. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. Cell. Immunol., 233: 53-60.

31) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino. 2004. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. Scand. J. Immunol., 60: 278-286.

32) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. 2004. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. Cell. Immunol., 229: 13-20.

33) Maeda Y., M. Gidoh, N. Ishii, C. Mukai, and M. Makino. 2003. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. Cell. Immunol., 222:69-77.

34) Maeda, Y., M. Makino, D. C. Crick, S. Mahapatra, S. Srisungnam, T. Takii, Y. Kashiwabara, and P. J. Brennan. 2002. Novel 33-Kilodalton Lipoprotein from *Mycobacterium leprae*. Infect. Immunity, 70:

4106-4111.

35) Shimokubo, S., S. Wakamatsu, Y. Maeda, M. Baba, and M. Makino. 2002. Fusion of mature dendritic cells and human T-lymphotropic virus type-I-infected T cells: its efficiency as an antigen-presenting cell. Virology, 301: 13-20.

36) Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2002. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. Infect. Immunity, 70: 5167-5176.

37) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. 2001. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. Scand. J. Immunol., 54: 574-58.

38) Makino, M., S. Wakamatsu, S. Shimokubo, N. Arima, and M. Baba. 2000. Production of Functionally Deficient Dendritic Cells from HTLV-I-Infected Monocytes: Implication for the Dendritic Cell Defect in Adult T Cell Leukemia. Virology, 274: 140-148.

39) Makino, M., M. Azuma, S. Wakamatsu, Y. Suruga, S. Izumo, M. M. Yokoyama, and M. Baba. 1999. Marked suppression of T cells by a benzothiophene derivative in patients with Human T-lymphotropic virus type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. Clin. Diag. Lab. Immunol., 6: 316-322.

40) Makino, M., S. Shimokubo, S. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. 1999. The role of HTLV-I-infected dendritic cells in the development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J. Virol., 73: 4575-4581.

41) Wakamatsu, S., M. Makino, C. Tei, and M. Baba. 1999. Monocyte-Driven Activation-Induced Apoptotic Cell Death of Human T-Lymphotropic Virus Type I-Infected T Cells. J. Immunol., 163: 3914-3919.

42) Makino, M., S. Yashiki, T, Fujiyoshi, M, Baba, and S. Sonoda. 1998. An expression of anaplastic large cell lymphoma associated antigens on HTLV-I-infected $CD4^+$ T cells. Ann. Hematol., 76: 31-35.

43) Suruga, Y., M. Makino, Y. Okada, H. Tanaka, E. De Clercq, and M. Baba. 1998. Marked suppression of murine AIDS development by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. J. AIDS and Hum. Retrovirol., 18: 316-322.

44) Makino, M., and M. Baba. 1997. Establishment of a cryopreservation method of human peripheral blood mononuclear cells for efficient production of dendritic cells. Scan. J. Immunol., 45: 618-622.

45) Takamoto, T., M. Makino, M. Azuma, A. Tanaka, T. Kanzaki, M. Baba, and S. Sonoda. 1997. HTLV-I-infected T cells activate autologous $CD4^+$ T cells susceptible to HTLV-I infection in a costimulatory molecule-dependent fashion. Eur. J. Immunol., 27: 1427-1432.

46) Makino, M., K. Yoshimatsu, M. Azuma, Y. Okada, Y. Hitoshi, H. Yagita, K. Takatsu, and K. Komuro. 1995. Rapid development of murine AIDS is dependent on signals provided by CD54 and CD11a. J. Immunol., 155: 974-981.

47) Makino, M., D. B. Murphy, R. W. Melvold , J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1995. Impact of MHC class I gene on resistance to murine AIDS. Scand. J. Immunol., 42: 368-372.

48) Makino, M., Y. Tang, T. N. Fredrickson, Y. Okada, D. B. Murphy, M. Fujiwara, T. Mizuochi, K. Komuro, H.

C. Morse III, and J. W. Hartley. 1994. Influence of H-2 class II antigens on the development of Murine AIDS (MAIDS). J. Immunol., 152: 4157-4164.

49) Makino, M., G. Ishikawa, K. Yamaguchi, Y. Okada, K. Watanabe, Y. Sasaki-Iwaki, S. Manabe, M. Honda, and K. Komuro. 1994. Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow fiber, BMM@. Archives Virol., 139: 87-96.

50) Makino, M., D. F. Winkler, J. Wunderlich, J. W. Hartley, H. C. Morse III, and K. L. Holmes. 1993. High expression of NK-1.1 antigen is induced by infection with murine AIDS virus. Immunology, 80: 319-325.

51) Suzuki, K., M. Makino, Y. Okada, J. Kinoshita, R. Yui, H. Kanazawa, H. Asakura, M. Fujiwara, T. Mizuochi, and K. Komuro. 1993. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome induced by a murine retrovirus. Laboratory Invest., 69: 430-435.

52) Gazzinelli, R. T., M. Makino, S. K. Chattopadhyay, C. M. Snapper, A. Sher, A. W. Hugin, and H. C. Morse III. 1992. $CD4^+$ subset regulation in viral infection. Preferential activation of Th2 cells during progression of retrovirus-induced immunodeficiency in mice. J. Immunol., 148: 182-188.

53) Makino, M., S. K. Chattopadhyay, J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1992. Analysis of role of $CD8^+$ T cells in resistance to murine AIDS in A/J mice. J. Immunol., 149: 1702-1706.

54) Makino, M., Y. Sei, P. K. Arora, H. C. Morse III, and J. W. Hartley. 1992. Impaired calcium morbilization in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, murine AIDS. J. Immunol., 149: 1707-1713.

55) Makino, M., W. F. Davidson, T. N. Fredrickson, J. W. Hartley, and H. C. Morse III. 1991. Effects of non-MHC loci on resistance to retrovirus-induced immunodeficiency in mice. Immunogenetics, 33: 345-351.

56) Cerny, A., A. W. Hugin, R. R. Hardy, K. Hayakawa, R. M. Zingernagel, M. Makino, and H. C. Morse III. 1990. B cells are required for induction of T cell abnormalities in a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. J. Exp. Med., 171: 315-320.

57) Makino, M., H. C. Morse III, T. N. Fredrickson, and J. W. Hartley. 1990. H-2-associated and background genes influence the development of a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome, MAIDS. J. Immunol., 144: 4347-4355.

58) Makino, M., T. Morita, and M. Fujiwara. 1988. Histopathological characteristics of the kidney of recombinant inbred mice established from MRL/lpr x AKR crossing. Dissociation of severity of lupus nephritis from the degree of lymphadenopathy. Virchous Archiv. B. Cell Pathol., 56: 59-65.

59) Makino, M., M. Fujiwara, and H. Watanabe. 1988. Studies on the mechanisms of the development of lupus nephritis in BXSB mice. II. Comparative studies between male BXSB and MRL/lpr mice at the onset period. J. Clin. Lab. Immunol., 25: 83-88.

60) Makino, M., M. Fujiwara, and H. Watanabe. 1987. Studies on the mechanisms of the development of lupus nephritis in BXSB mice. I. Analyses of immunological abnormalities at the onset period. J. Clin. Lab. Immunol., 22: 127-131.

61) Makino, M., M. Fujiwara, T. Aoyagi, and H. Umezawa. 1987. Immunosuppressive activities of

deoxyspergualin. I. Effect of the long term administration of the drug on the development of murine lupus. Immunopharmacology, 14: 107–114.

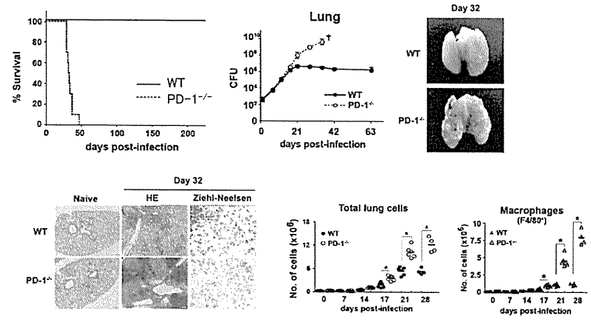
62) Makino, M., M. Fujiwara, H. Watanabe. T. Aoyagi, and H. Umezawa. 1987. Immunosuppressive activities of deoxyspergualin. II. The effect on the antibody response. Immunopharmacology, 14: 115–122.

63) Makino, M., M. Fujiwara, H. Watanabe, H. Sugano, and M. Arakawa. 1986. Evaluation of different preparations of aggregated human IgG for use as a standard in the assays of circulating immune complexes. J. Clin. Lab. Immunol., 21: 151–157.

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

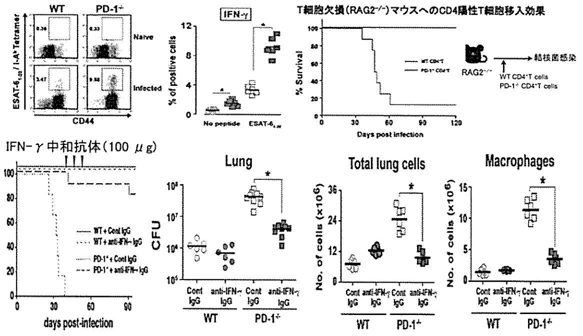
研究代表者：牧野　正彦　（国立感染症研究所・部長）
研究分担者：田村　敏生　（国立感染症研究所・室長）
星野　仁彦　（国立感染症研究所・室長）
荒川　宜親　（名古屋大学・教授）
竹田　潔　（大阪大学・教授）
河村　伊久雄　（京都大学・准教授）

結核菌潜伏感染者の再燃機構の解析
—活性化CD4陽性T細胞に発現する免疫抑制性シグナル(PD-1)欠損マウスの利用—



結核菌感染＝H37Rv(210 CFU／lung)の経鼻感染
予想に反し、PD-1欠損マウスでは結核菌の異常増殖と早期個体死を誘導

PD-1欠損マウスでの結核菌増殖を誘導する責任因子の解析



ESAT6特異的CD4陽性T細胞の異常活性化が結核菌の増殖・組織破壊・個体死を誘導
→ 高齢 → CD4陽性T細胞の不十分な活性化 → PD-1の発現低下 → 結核菌増殖 → 結核再燃（仮説）

M. bovis BCGの結核ワクチンとしての問題点と改良戦略

○ 成人肺結核の発症予防：不可
↓
ヒト未感作CD4陽性T細胞の活性化（±）
ヒト未感作CD8陽性T細胞の活性化（－）
マクロファージを介したT細胞活性化（－）
↑
BCGのプロセッシング（－）
BCG抗原の発現（－）
↑
BCGのライソゾームへの非効率的移行

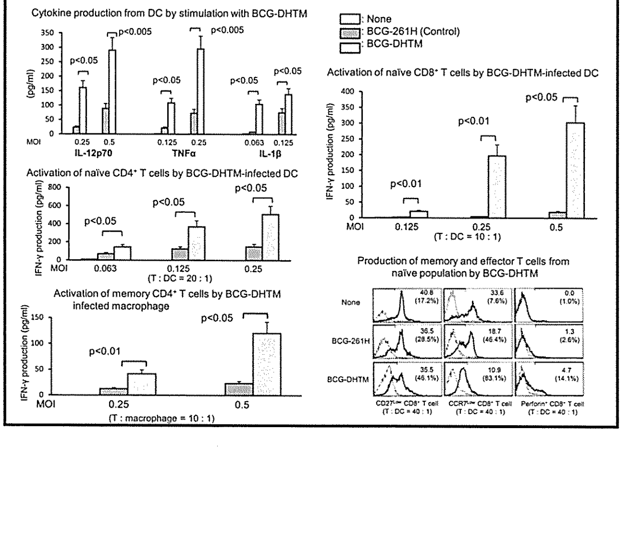
○ 改良戦略：ライソゾームへの抗原移行の促進
1）ファゴゾームの酸性化促進：CD4陽性T細胞の活性化
2）主要抗原の細胞内分泌促進：未感作T細胞の活性化
↓
1）と2）を組み合わせライソゾームで抗原分泌

○ 分泌させる主要抗原の同定：MMP-II
MMP-II：TLR2に結合しDC・T細胞を活性化
↓
新規リコンビナントBCG（BCG-DHTM）の作製

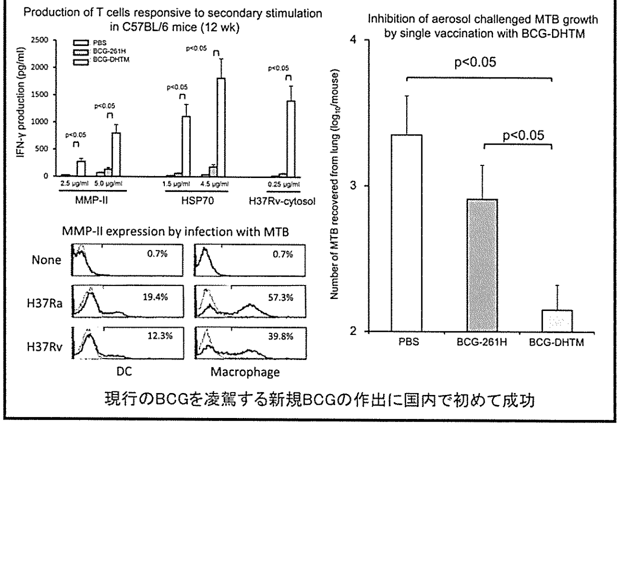
BCG-DHTM　Ure C　HSP70　MMP-II

Ure C ↓ アンモニア産生（－） ↓ ライソゾームへの移行 ↓ CD4陽性T細胞の活性化
MMP-II ↓ HSP70-MMP-II融合蛋白の分泌（HSP70：シャペロン効果） ↓ CD8陽性T細胞の活性化（及び CD4陽性T細胞の活性化）

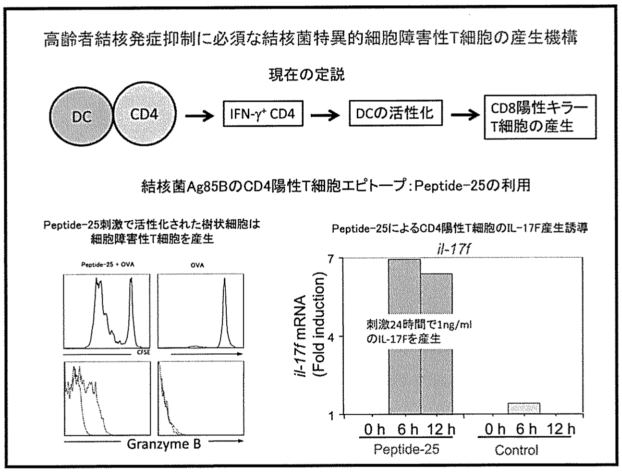
新規リコンビナントBCG(BCG-DHTM)のT細胞活性化能の評価

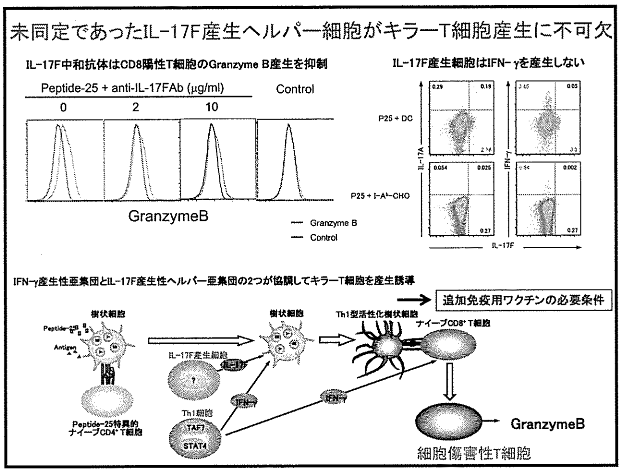


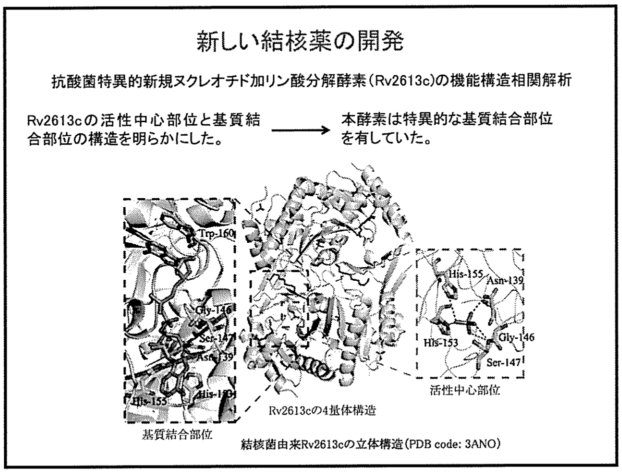
BCG-DHTMのワクチン効果

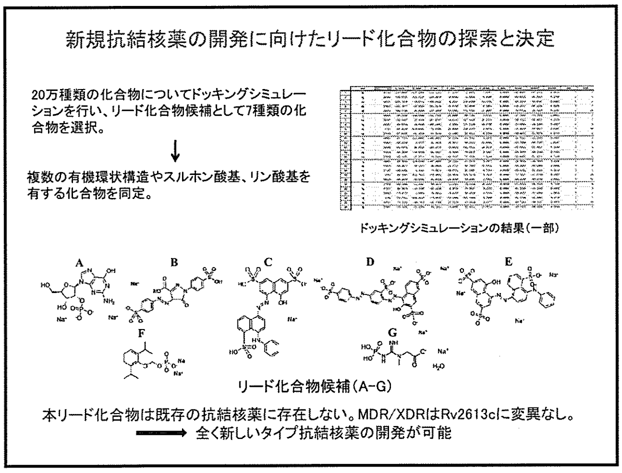


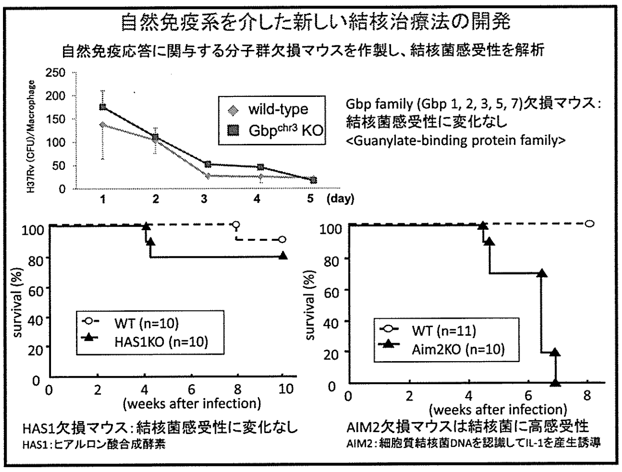
現行のBCGを凌駕する新規BCGの作出に国内で初めて成功

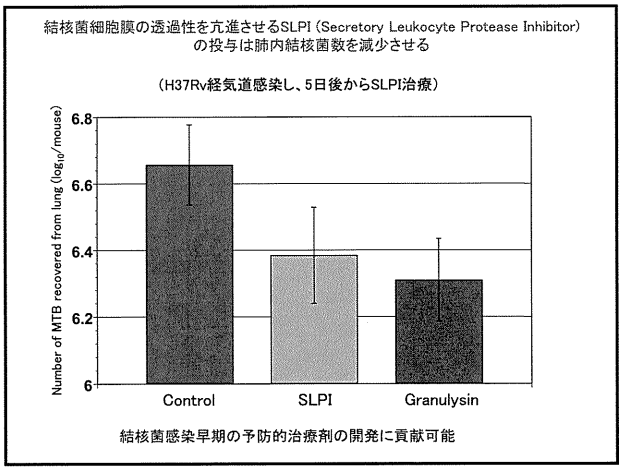

高齢者結核発症抑制に必須な結核菌特異的細胞障害性T細胞の産生機構
現在の定説
DC
CD4
IFN-γ+ CD4
DCの活性化
CD8陽性キラーT細胞の産生
結核菌Ag85BのCD4陽性T細胞エピトープ：Peptide-25の利用
Peptide-25刺激で活性化された樹状細胞は細胞障害性T細胞を産生
Granzyme B
Peptide-25によるCD4陽性T細胞のIL-17F産生誘導
il-17f
il-17f mRNA (Fold induction)
刺激24時間で1ng/mlのIL-17Fを産生
0 h 6 h 12 h
0 h 6 h 12 h
Peptide-25
Control


未同定であったIL-17F産生ヘルパー細胞がキラーT細胞産生に不可欠
IL-17F中和抗体はCD8陽性T細胞のGranzyme B産生を抑制
Peptide-25 + anti-IL-17FAb (μg/ml)
0
2
10
Control
GranzymeB
IL-17F産生細胞はIFN-γを産生しない
IFN-γ産生性亜集団とIL-17F産生性ヘルパー亜集団の2つが協調してキラーT細胞を産生誘導
追加免疫用ワクチンの必要条件
樹状細胞
Th1細胞
IFN-γ
GranzymeB
細胞傷害性T細胞


新しい結核薬の開発
抗酸菌特異的新規ヌクレオチド加リン酸分解酵素（Rv2613c）の機能構造相関解析
Rv2613cの活性中心部位と基質結合部位の構造を明らかにした。
本酵素は特異的な基質結合部位を有していた。
Trp-160
Gly-146
Asn-139
His-155
His-155
Asn-139
His-153
Gly-146
Ser-147
基質結合部位
Rv2613cの4量体構造
活性中心部位
結核菌由来Rv2613cの立体構造（PDB code: 3ANO）


新規抗結核薬の開発に向けたリード化合物の探索と決定
20万種類の化合物についてドッキングシミュレーションを行い、リード化合物候補として7種類の化合物を選択。
複数の有機環状構造やスルホン酸基、リン酸基を有する化合物を同定。
ドッキングシミュレーションの結果（一部）
A
B
C
D
E
F
G
リード化合物候補（A-G）
本リード化合物は既存の抗結核薬に存在しない。MDR/XDRはRv2613cに変異なし。
全く新しいタイプ抗結核薬の開発が可能


自然免疫系を介した新しい結核治療法の開発
自然免疫応答に関与する分子群欠損マウスを作製し、結核菌感受性を解析
H37Rv (CFU)/Macrophage
wild-type
Gbpchr3 KO
(day)
Gbp family (Gbp 1, 2, 3, 5, 7)欠損マウス：結核菌感受性に変化なし
<Guanylate-binding protein family>
survival (%)
WT (n=10)
HAS1KO (n=10)
(weeks after infection)
WT (n=11)
Aim2KO (n=10)
(weeks after infection)
HAS1欠損マウス：結核菌感受性に変化なし
HAS1：ヒアルロン酸合成酵素
AIM2欠損マウスは結核菌に高感受性
AIM2：細胞質結核菌DNAを認識してIL-1を産生誘導


結核菌細胞膜の透過性を亢進させるSLPI（Secretory Leukocyte Protease Inhibitor）の投与は肺内結核菌数を減少させる
（H37Rv経気道感染し、5日後からSLPI治療）
Number of MTB recovered from lung (log10/mouse)
Control
SLPI
Granulysin
結核菌感染早期の予防的治療剤の開発に貢献可能

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：真菌感染症の病態解明に基づく検査・治療法の確立と国内診断・治療ネットワークの構築に関する研究

課題番号　：H22-新興--一般-008

予定期間　：H22年度からH24年度まで

研究代表者　：河野　茂

所属研究機関：長崎大学

所属部局　：医歯薬学総合研究科

職名　：教授・病院長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 31,655,000　円　　2年目　22,499,000　円

Ⅰ．研究の意義

(1)　真菌症診断治療のガイドラインが不十分

(2)　真菌症のレファレンスラボの全国ネットワークが現在、ない

(3)　接合菌症、アスペルギルス症やカンジダ症の適切な診断法がない

(4)　病理組織からの病原真菌同定法が確立していない

(5)　旅行者真菌症（輸入真菌症）の疫学調査活動はコクシジオイデス以外行われていない

(6)　難治性真菌症の宿主免疫には不明な点が多い

Ⅱ．研究の目的、期待される成果

(1)　臨床現場がコンサルトできる真菌症診断支援のネットワークを構築

(2)　疑い患者の迅速な診断を期待

(3)　病理組織からの同定を期待

(4)　重症な真菌症に関するわが国の疫学が明らかになる

(5)　頻度の高い難治の真菌症の病態解明を期待

Ⅲ．2年間の研究成果

※この期間にどのような成果があったか、研究代表者、研究分担者毎に、できるだけわかりやすく具体的に記述してください。

・研究代表者　河野　茂

（１）　内科領域と皮膚科領域でガイドラインすり合わせを行った

（２）　アスペルギルス症のアゾール系抗真菌薬耐性化を明らかにした

（３）　カンジダ属の薬剤耐性化機構の一つとしてストレス応答因子CRZ1等の関与を示した

（４）　世界初の慢性アスペルギルス症に対する薬効の無作為化臨床試験の成果を発表した

・研究分担者(宮崎　義継)
（1）　アスペルギルスの新規抗原Y1のELISA検査系を構築し特許申請した
（2）　不明真菌症の診断支援を行い3件の症例報告を行った
（3）　地方衛生研究所と感染研の真菌症ネットワークをH23年度に構築した
（4）　カンジダのバイオフィルムに対する抗真菌薬の効果を発表した

・研究分担者　（谷口　修一）　研究協力者　荒岡秀樹
（1）　最終的に、全国39施設から計758件造血幹細胞移植症例の登録があった。
（2）　これまでにProven fungal disease 5例、Probable fungal disease　20例、Possible fungal disease　26例（EORTC/MSGの基準）の侵襲性糸状菌感染症が発症した。
（3）　菌種が特定されたものが8例あり、Aspergillus属が4例、Fusarium属が4例であった。

・研究分担者（渋谷　和俊）
(1)　剖検症例のホルマリン固定パラフィンブロックに対する核酸の保存性の評価法を確立し、ヒトβグロビンPCR法とPanfungal ISH法との間で、関連性がみられた（P<0.01)。
(2)　*Aspergillus*属の18S rRNA遺伝子を標的としたnested PCR法と*Aspergillus fumigatus*のalkaline proteinase遺伝子を標的としたISH法で、両者の間には関連性が認められた。
(3)　これまで遂行された後方視的疫学観察研究において、特に*Aspergillus*属と接合菌、*Candida*属と*Trichosporon*属の間で乖離を見出し、真菌症の病理診断における菌種の判断に関する問題点を明らかにした。
(4)　*Trichosporon*属を標的としたPNAプローブ設計し特異性の検証を行った。

・研究分担者（比留間　政太郎）研究協力者(小川祐美、旧姓・白木)
（1）　トンズランス感染症対策のためにガイドラインを改定・発刊
（2）　トンズランス感染症対策のためにホームページを作成
（3）　トンズランス感染症対策のために、集団検診を施行、臨床症状について解析
（4）　トンズランス感染症の発症機序に関する各種サイトカインの動態を解明

・研究分担者（望月　隆）研究協力者　安澤数史
（1）　2006年から2010年末に分離された*T. tonsurans* 263株に対して種内変異の鑑別が可能な分子マーカー(ribosomal DNA領域のNTSの制限酵素分析)を検証し、4タイプの種内変異型に分類し、柔道界、レスリング界、相撲界で分布が異なっていた。
（2）　抗真菌薬TBF,ITCZ,FCZ,GRFに対する最少発育阻止濃度（MIC）は、分子型によるMICの差は見られなかった。
（3）　本菌の迅速同定に有用と考えられる硬膜胞子様構造を明らかにすべく、顕微鏡下で観察した結果、25度で培養開始4日目からこのような構造が培地内に生じることが明らかになった。次いで液体培地内で6日間震盪培養したコロニーについて電子顕微鏡的観察を試み、通常の硬膜胞子と異なる構造であることをみいだした。

（4） 白癬菌検出キットは頭部白癬／頭部のキャリアーの検出には感度上の問題があり、有用でない可能性を示した。

・研究分担者(亀井克彦)

（1） 新規抗原２種を含む *Histoplasma* 抗原４種について、エピトープ部位を明らかにした。更にこの知見を応用し，これらの組み合わせによる新規抗体検出法について一部で実際の測定を開始するとともに，感度や特異度の向上を目指した検討を開始した。

（2） 上記の新規抗原に基づいた遺伝子検出法を開発するために，これらを標的に新規のサイクリングプローブとプライマーの設計を行い、real time PCR 法にて共試菌としたすべての *H. capsulatum* 株の検出に成功した。

・研究分担者（川上和義）

（1） 宿主免疫によるクリプトコックス感染認識におけるパターン認識受容体の役割の解明

（2） クリプトコックス DNA からの CpG とは異なる免疫活性化新規モチーフの発見

（3） コンプロマイズドホストにおける Th1、Th2、Th17、Treg 応答性の評価法の確立

・研究分担者（掛屋　弘）

（1） 新規蛋白研究法であるシグナルシークエンストラップ法を用いて接合菌症の代表菌種である *Rhizopus oryzae* から膜蛋白質および分泌蛋白質を網羅的に同定した。その結果より、検査キット開発に向けての標的蛋白抗原の候補（A, B）を選出した（国立感染症研究所との共同研究）。

（2） 最も多く得られたクローン（候補 A）と次に多かったクローン（候補 B）のアミノ酸配列を確認し、シグナルシークエンスを有する目的の抗原であることを確認した。

（3） 現在、候補 A に関しては蛋白の精製に成功し、ポリクローナル抗体精製を精製中。候補 B はクローニングが終了し、蛋白精製の準備中。

・研究分担者（山越　智）

（1） *Aspergillus fumigatus* より分泌される B11 蛋白質の抗体を複数作製し、抗体価、特異性、エピトープ解析をした。さらに、それに基づき B11 蛋白質を検出するプロトタイプのサンドイッチ ELISA 系を構築した。

・研究分担者(三鴨廣繁)

（1） 注射用抗真菌薬イトラコナゾール、ボリコナゾール、アムホテリシン B 脂質製剤の pharmacokinetics/pharmacodynamics を解析し、適正投与法を明らかにした。

（2） トリコスポロンの分離頻度が、キャンディン系抗菌薬の絶対的使用量と相関することを明らかにした。

・研究分担者(槇村　浩一)

（1） リアルタイムPCRを用いた*C. neoformans*と*C. gattii*を各々検出・同定するキットを開発。
（2） *Malassezia slooffiae*の体内リザーバとしての外耳道の意義を明らかにした。
（3） *Malassezia furfur*のカテーテル関連真菌血症起因菌としての意義を明らかにした。
（4） *Trichophyton tonsurans*感症起因菌のLAMP法による遺伝子検出系を開発した。

Ⅳ. 平成24年度の課題

（1） 研究成果としてトリコフィトン感染症のガイドラインを配布する
（2） 開発した新規検査系の臨床評価と改良を行う
（3） 得られた基盤研究の成果を患者検体で検証する

Ⅴ. 行政施策への貢献の可能性

（1） トリコフィトン・トンズランス対策のためのガイドラインを作成
（2） 厚生労働省の検討会において新興・再興感染症対策のための資料となることが期待される

Ⅵ. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。
※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。
※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

研究代表者　河野　茂

1. Nakamura S, Yanagihara K, Araki N, Yamada K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. High-dose tobramycin inhibits lipopolysaccharide-induced MUC5AC production in human lung epithelial cells. Eur J Pharmacol. 2011 659:67-71.
2. Kohno S, Seki M, Watanabe A; the CAP Study Group. Evaluation of an Assessment System for the JRS 2005: A-DROP for the Management of CAP in Adults. Intern Med.2011 50:1183-1191.
3. Araki N, Yanagihara K, Morinaga Y, Yamada K, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo efficacy of doripenem (DRPM) against Pseudomonas aeruginosa in murine chronic respiratory tract infection model. J Infect Chemother. 2011 17:318-321.
4. Kobayashi T, Kakeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic Antifungal Effect of Lactoferrin with Azole Antifungals against Candida albicans and a Proposal for a New Treatment Method for Invasive Candidiasis. Jpn J Infect Dis. 2011 64:292-296.
5. Kohno S, Izumikawa K, Kakeya H, Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R, Niki Y, Kurashima A. Clinical efficacy and safety of micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study. Med Mycol. 2011 49:688-693.
6. Kohno S, Yen MY, Cheong HJ, Hirotsu N, Ishida T, Kadota J, Mizuguchi M, Kida H, Shimada J; S-021812 Clinical Study Group. Phase III randomized, double-blind study comparing single-dose intravenous peramivir

with oral oseltamivir in patients with seasonal influenza virus infection. Antimicrob Agents Chemother. 2011 56:2887-2894.

7. Tashiro M, Kimura S, Tateda K, Saga T, Ohno A, Ishii Y, Izumikawa K, Tashiro T, Kohno S, Yamaguchi K. Pravastatin inhibits farnesol production in Candida albicans and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis. Med Mycol 2011.

・研究分担者 (宮崎 義継)

特許

アスペルギルスフミガーツス感染症の検査、予防及び治療のための方法並びに組成物. 平成 23 年 8 月 21 日. 出願番号 PCT/JP2011/068454

1. Kaneko Y, Obata Y, Nishino T, Kakeya H, Miyazaki Y, Hayasaka T, Setou M, Furusu A, Kohno S. Imaging mass spectrometry analysis reveals an altered lipid distribution pattern in the tubular areas of hyper-IgA murine kidneys. Exp Mol Pathol. 91:614-621, 2011.

2. Miyazaki T, Izumikawa K, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Yasuoka A, Kohno S. The glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease Yps1 is transcriptionally regulated by the calcineurin-Crz1 and Slt2 MAPK pathways in *Candida glabrata*. FEMS Yeast Res. 11:449-456, 2011.

3. Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Kakeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucormycosis. Clin Exp Dermatol. 36:312-314, 2011.

4. 堀内一宏, 山田萌美, 白井慎一, 高橋育子, 加納崇裕, 金子幸弘, 秋沢宏次, 梅山 隆, 宮﨑義継, 矢部一郎, 佐々木秀直. 脳室内抗真菌薬投与が奏効した Cryptococcus gattii による脳および肺クリプトコックス症の 1 例. 臨床神経学 in press.

・研究分担者 (谷口 修一)

1. H. Yamamoto, D. Kato, N. Uchida, K. Ishiwata, H. Araoka, S. Takagi, N. Nakano, M. Tsuji, Y. Asano-Mori, N. Matsuno, K. Masuoka, K. Izutsu, A. Wake, A. Yoneyama, S. Makino and S. Taniguchi. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. Blood 117: 3240-2, 2011

2. N. Uchida, A. Wake, N. Nakano, K. Ishiwata, S. Takagi, M. Tsuji, H. Yamamoto, D. Kato, N. Matsuno, K. Masuoka, H. Araoka, Y. Asano-Mori, K. Izutsu, S. Makino, A. Yoneyama and S. Taniguchi. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. Transplantation 92: 366-71, 2011

3. M. Kimura, H. Araoka, N. Uchida, H. Ohno, Y. Miyazaki, T. Fujii, A. Nishida, K. Izutsu, A. Wake, S. Taniguchi and A. Yoneyama. Cunninghamella bertholletiae pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. Med Mycol Epub Date: 2011/11/23

・研究分担者 (渋谷 和俊)

1. Nagayoshi M, Tada Y, West J, Ochiai E, Watanabe A, Toyotome T, Tanabe N, Takiguchi Y, Shigeta A, Yasuda T, Shibuya K, Kamei K, Tatsumi K. Inhalation of Stachybotrys chartarum Evokes Pulmonary Arterial Remodeling in Mice, Attenuated by Rho-Kinase Inhibitor. Mycopathologia, (DOI:10.1007/s11046-011-9400-3), 2011

2. Shimamura T, Kubota N, Nagasaka S, Suzuki T, Mukai H, Shibuya K. Establishment of a Novel Model of