

られるオリゴペプチド、およびフルサイズの組換えタンパクを作成し、それぞれの反応の特異性を検討している。

・研究分担者(山本 明彦)

(1) 関東および関西地区の継続調査では、野外活動の多いイヌ及びネコから当該菌を分離し、新規に調査を開始した四国でも分離した。しかし、すべての調査県で分離されていないので、地域による当該菌の分布の偏りがあるかどうかは、はっきりしない。

(2) 滋賀県で発生した当該菌を分離した患者 1 例の環境調査では、同居家族、飼いイヌおよびネコから、*Corynebacterium* 属菌は分離されたが、原因菌の分離には至らなかった。

(3) 限られた地域(岡山県)の畜産動物からは当該菌は分離されていない。

(4) 九州南部及び沖縄地域の離島に生息する猟犬の血清抗体価が 6%前後陽性の調査結果から、これらの環境でも当該菌による汚染が疑われる。

・研究分担者(柳井 徳磨)

(1) 南西諸島を中心とした島嶼部(種子島, 屋久島, 奄美大島, 沖縄本島および石垣島)ならびに佐渡島, 対馬, 大隅半島および渥美半島の島嶼および半島部で飼育されている猟犬計 196 頭で、各種人獣共通感染症(ジフテリア, 破傷風, トキソプラズマ, ライム病ボレリア, ブルセラ)に対する抗体調査を行った。抗トキソプラズマ抗体は全調査地で比較的高頻度に検出された。抗レプトスピラ抗体は渥美半島以外の地域でしばしば検出された。ジフテリア抗毒素は佐渡島, 大隅半島, 奄美大島, 沖縄本島および石垣島で、抗ブルセラ抗体は佐渡島, 種子島, 奄美大島, 沖縄本島および石垣島で少数例検出された。破傷風抗毒素は検出されなかった。ボレリアは現在調査中である。

(2) 人獣共通感染症の可能性の考えられるウマヘルペスウイルス EHV-9 の動物体内における病態と伝播様式の解明のための動物モデルの開発を試み、乳のみげっ歯類の有用性を示した。

・研究分担者(森嶋 康之)

(1) 公共データベース上にあるエキノコックス遺伝子データについて、発現候補領域を検出するための遺伝子予測を行い、その結果にもとづいてマイクロアレイに搭載するプローブの設計と選別を行った。

(2) エキノコックス幼虫の人工培養系について、成虫型への分化が効率よく誘導されるよう改良した。

(3) 成虫型へ分化誘導したエキノコックス幼虫についてマイクロアレイ解析を行い、変動遺伝子を抽出した。

・研究分担者(菅沼 明彦)

(1) ヒト狂犬病症例に対する治療法に関する文献収集とその検討を行った。

(2) 狂犬病曝露前免疫の曝露後発症予防に対する効果を検討した。

(3) 狂犬病曝露後免疫における接種回数を減じた接種方法の有効性を検討した。

・研究分担者(井上 智)

(1) 昨年度行った「犬猫飼育率全国調査」の推計値補正のための統計数理的手法について①より正確な飼育頭数を把握するために必要な追加調査(国勢調査基本集計を利用した数値更新)②ペットフード協会の研究協力を得て世帯数推計に関する飼育犬推定法の検討③統計関連学会連合大会での研究発表による関連専門家からの助言と意見集約による推計法の改良を行った。

(2) 土壌から効率よく *Bacillus cereus* group の菌種を分離するための方法の検討を行い、約 250mg の土壌を生理食塩水に 500 μ L に懸濁して得られた 100 μ L を *Bacillus cereus* 選択培地に塗抹、卵黄反応陽性コロニーを羊血液寒天培地に純培養する方法が最も効率が良いことを明らかにした。

(3) 昨年度作製した抗体様分子(scFv) 4 種について、ビオチン標識抗体を大腸菌発現系で作成するために当該分子の遺伝子を大腸菌に組み換えた。現在、大腸菌発現系で当該分子(scFv) に高率な標識を可能にするための諸条件を検討している。

IV. 平成 24 年度の課題

(1) ボレリアでは MLST データベース構築を継続しその精度向上をはかる。イヌを歩哨動物としたライム病の環境モニタリングの継続と、抗体調査用抗原の評価を行う。また地域毎の流行ボレリア型の同定も試みる。

(2) コクシエラの高濃度汚染地域と考えられる北海道の野生動物について検討する。また本邦における宿主としてのマダニ種など、不明な点が多く存在しており、来年度の課題である。

(3) 野兎病関連では競合 ELISA 法により陽性となった野生動物検体の他の検出方法と相関を検証し、さらに野生動物での調査を行うとともに、マダニや環境中での野兎病菌の存在について調査を実施する。また、野

兔病菌感染における宿主での原因菌の動態や宿主応答など病理発現機構をさらに解析する。

(4)ブルセラに関しては特異的抗原の組換えタンパクを作成し、オリゴペプチドとともにその特異性の検証を行う。また、それら抗原を用いた ELISA や ICA などの検査法を開発する。また、国内野生イノシシにおける抗体保有状況調査を継続する。また、イノシシで検出されている犬ブルセラに対する抗体について、その真偽を確定する。また、その際、新たな検査法も活用し検証する。

(5)コリネバクテリウムでは犬・猫及び人の周りにいる動物について、本菌の分布状況を血清抗体価も含めて全国的に調査するとともに人および環境の本菌の分布状況を調査する

(6)エキノコックスについてはマイクロアレイで観察された発現変化を qRT-PCR を用いて検証するとともに幼虫型へ分化を誘導した系について同様の検討を行う。

(7)狂犬病の予防・治療に関しては様々なワクチン及び接種法による狂犬病曝露後免疫における 4 回接種法の有効性について症例を集積し検討を行うとともにヒト狂犬病報告例の集積を継続し、ヒト狂犬病治療法の検討を継続する。

(8)イヌの頭数については作製した統計数理的手法による推計値補正の実際を「犬猫飼育率全国調査」に提供して補正の効果を検証することが新たな課題と考えられる。

(9) *Bacillus cereus* 選択培地を使用して効率に分離可能となった *Bacillus cereus* group 菌種の生化学的・遺伝学的な簡易同定・検出法の確立が新たな課題と考えられる。

(10)狂犬病抗体測定における ELISA 系の構築に成功したが、特異性の向上が今後考えられる新たな課題である。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) (1)本研究で得られる成績の多くはサーベイランスを中心とする今後の動物由来感染症対策に資するところが大きく、感染症対策行政に貢献すると考えられる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.

(2) A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses and Public Health* (印刷中)

(3) Nomura, A., Imaoka, K., Imanishi, H., Shimizu, H., Nagura, F., Maeda, K., Tomino, T., Fujita, Y., Kimura, M. and Stein, G. H. Human *Bruceella canis* infection diagnosed by blood culture. *Emerg. Inf. Dis.*, 16(7):1183-1185, 2010

(4) Chihiro Katsukawa, Takako Komiya, Hiroaki Yamagishi, Atsushi Ishii, Shunji Nishino, Shinya Nagahama, Masaaki Iwaki, Akihoko Yamamoto, Motohide Takahashi: Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* among dogs in Osaka, Japan. *J. Medical Microbiology*. (in press)

(5) El-Habashi, N., Murakami, M., EL-Nahass, E., Hibi, D., Sakai, H., Fukushi, H., Sasseville, V. and Yanai, T.: Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. *Vet. Pathol.* 47: 1-7, 2011

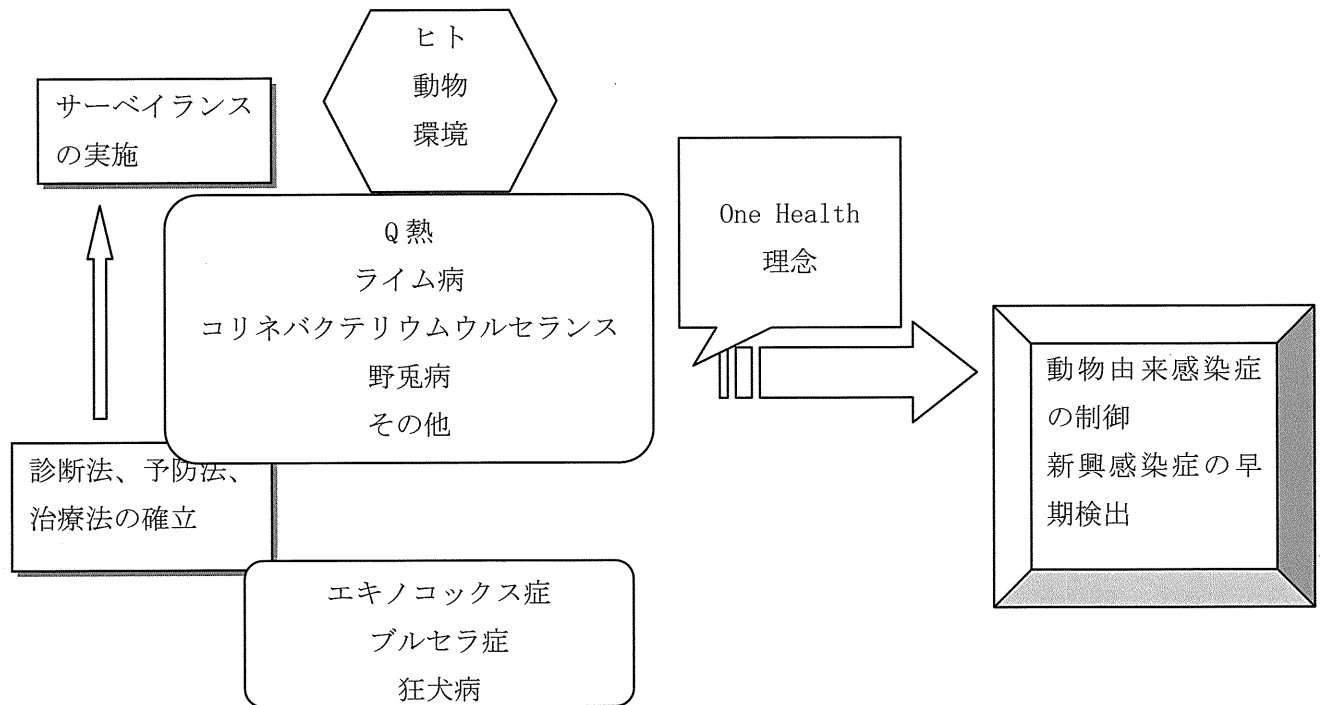
(6) El-Habashi, N., EL-Nahass, E., Fukushi, H., Hibi, D., Sakai, H. and Yanai, T.: Effect of equine herpesvirus 9 (EHV-9) infection in pregnant mice and hamsters. *J. Comp. Pathol.* 144: 103-112, 2011

(7) 菅沼明彦、高山直秀、柳澤如樹、西村昌晃. 狂犬病曝露前免疫の曝露発症予防に対する効果. *感染症学雑誌*. 第 84 巻. 第 4 号

(8) Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B., Yamada A., Tserennorov D., Otgonchimeg I., Erdenebat A., Otgonbaatar D., and Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2011;4:345-348

Ⅶ. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

国立予防衛生研究所
 マサチューセッツ大学メディカルセンター
 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)

伊藤康彦
 杉浦昭
 Francis A Ennis

・主な研究課題

インフルエンザウイルス感染における細胞性免疫に関する研究
 ムンプスウイルスのウイルス学的研究
 カニクイザルのクラス IMHC に関する研究
 B ウイルス診断法に関する研究
 動物由来感染症の診断、病原性に関する研究

・これまでの研究実績

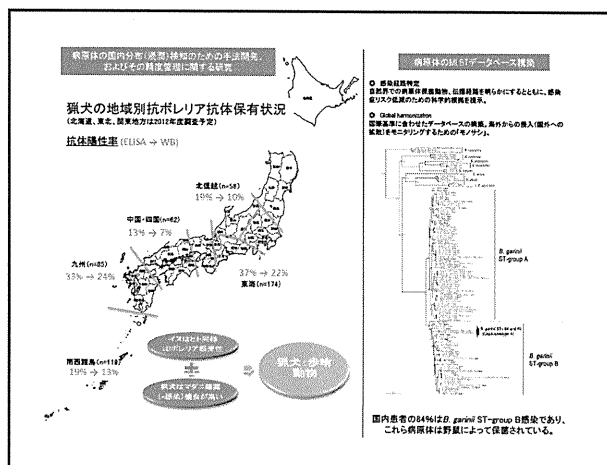
1. Yurie MOTOI, Kozue SATO, Hajime HATTA, Kinjiro MORIMOTO, Satoshi INOUE and Akio YAMADA Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. Vaccine 23, 3026-3032, 2005.
2. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Keiji Terao, and Akio Yamada. Identification of MHC Class I B Locus in cynomolgus monkeys. Immunogenetics, 57, 189-197, 2005
3. Yurie MOTOI, Satoshi INOUE, Hajime HATTA, Kozue SATO, Kinjiro MORIMOTO, and Akio YAMADA. Detection of Rabies-Specific Antigens by Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Rabies Virus Proteins Produced in *Escherichia coli*. Jap. J. Infect. Dis.58, 115-118, 2005.
4. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. Jpn J Infect Dis. 2006 Feb;59(1):46-51.
5. Park CH, Kondo M, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T, Yoshikawa H, Yamada A. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. J Vet Med Sci. 2006 Jun;68(6):589-95
6. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, Kurahashi H, Tanabayashi K, Hotta A, Saito T, Yamada A, Kobayashi M. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. Am J Trop Med Hyg. 2006 Aug;75(2):327-332.
7. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. Jpn. J. Inf. Dis.60, 137-139, 2007
8. Akitoyo Hotta, Akihiko Uda, Osamu Fujita, Kiyoshi Tanabayashi and Akio Yamada Preparation of Monoclonal Antibodies for Detection and Identification of *Francisella tularensis*. Clinical and Vaccine Immunology, 14, 81-84, 2007.
9. Kozue Hotta, Yurie Motoi, Akiko Okutani, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Satoshi Inoue and Akio Yamada. Role of GPI-anchored NCAM-120 in rabies virus infection. Microbes and Infection. 9(2):167-74, 2007.
10. Akihiko Uda, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray Jpn. J. Infect. Dis. 60, 355-361, 2007
11. Masanobu Kimura, Tsutomu Tanikawa, Michio Suzuki, Nobuo Koizumi, Tsuneo Kamiyama, Koichi Imaoka and Akio Yamada Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. Microbiol. Immunol. 52, 1-7, 2008.
12. Masanobu Kimura, Koichi Imaoka, Michio Suzuki, Tsuneo Kamiyama and Akio Yamada Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci, 70, 707-709, 2008.
13. Kozue Hotta, Boldbarrtar Bazartserena, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Akiko Okutani, Satoshi Inoue, Akio Yamada. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. Virus Research, in press.
14. Yamada A. Emergence and spread of infectious diseases. Global Environ. Res. 12, 3-7, 2008
15. O. Fujita, A. Uda, A. Hotta, A. Okutani, S. Inoue, K. Tanabayashi and A. Yamada Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Microbiol Immunol 52: 270-276 (2008)
16. KYEONG SOON KIM, YOSHIO TSUDA, AND AKIO YAMADA Bloodmeal Identification and Detection of Avian Malaria Parasite from Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Inhabiting Coastal Areas of Tokyo Bay, Japan. J. Med. Entomol., 46, 1230-1234, 2009
17. Akiko Okutani, Tsuyoshi Sekizuka, Bazartseren Boldbaatar1, Akio Yamada, Makoto Kuroda, Satoshi Inoue. Phylogenetic typing of Japanese *Bacillus anthracis* strains by multiple locus variable-number tandem repeats analysis and comprehensive single nucleotide polymorphism. Journal of Veterinary Medical Science (in press)
18. Sawabe K, Tanabayashi K, Hotta A, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Yamada A, Kurahashi H, Shudo C, Kobayashi M. Survival of avian H5N1 influenza A viruses in *Calliphora nigribarbis* (Diptera:

- Calliphoridae). *J Med Entomol.* 2009 Jul;46(4):852-5.
19. Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Glenn A Marsh, Jennifer A McEachern, Akiko Okutani, Kozue Hotta, Boldbaatar Bazartseren, Shuetsu Fukushi, Christopher C Broder, Akio Yamada, Satoshi Inoue, Lin-Fa Wang. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescentprotein. *J. Virol. Methods Sep*;160(1-2):7-13. Epub 2009 May 9
 20. Bazartseren Boldbaatar, Satoshi Inoue, Naoko Sugiura, Akira Noguchi, Jun Ryan C. Orbina, Catalino Demetria, Mary Elizabeth Miranda, and Akio Yamada. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 187-191, 2009.
 21. Nobuo Koizumi, Maki Muto, Akio Yamada, and Haruo Watanabe Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan *J. Vet. Med. Sci.* 2009 Jun;71(6):797-9
 22. Kozue Hotta, Boldbaatar Bazartseren, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Akiko Okutani, Satoshi Inoue, Akio Yamada. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. *Virus Res.* 139, 85-90, 2009
 23. Michio SUZUKI, Masanobu KIMURA, Koichi IMAOKA, Akio YAMADA Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 144, 172-176, 2010
 24. Bazartseren Boldbaatar, Satoshi Inoue, Nasan Tuya, Purevtseren Dulam, Damdinjav Batchuluun, Naoko Sugiura, Akiko Okutani, Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Akira Kotaki and Akio Yamada Molecular epidemiology of rabies virus in Mongolia, 2005-2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 358-363, 2010
 25. Yoshihiro Kaku, Akira Noguchi, Kozue Hotta, Akio Yamada, Satoshi Inoue Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an intrabody against the viral phosphoprotein. *Antiviral Research* (in press, 2011)
 26. Anh K.T. Nguye, Dong V. Nguyen, Giang C. Ngo, Thu T. Nguyen, Satoshi Inoue, Akio Yamada, Xuyen D. Kim, Dung V. Nguyen, Thao X. Phan, Bao Q. Pham, Hien T. Nguyen, and Hanh T. H. Nguyen MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF RABIES VIRUS IN VIETNAM (2006 – 2009) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 391-396, 2011
 27. Akitoyo Hotta, Kiyoshi Tanabayashi, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Toshio Mizoguchi, Akio Yamada Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses and Public Health* (in press)
 28. Toshiyuki Masuzawa , Yoshiyuki Uchishima , Takashi Fukui, Yoshihiro Okamoto , Maki Muto, Nobuo Koizumi, and Akio Yamada Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 333-336
 29. Akiko Okutani, Hurelsukh Tungalag, Bazartseren Boldbaatar, Akio Yamada, Damdindorj Tserennorov, Ishtsog Otgonchimeg, Adiya Erdenebat, Dashdavaa Otgonbaatar, and Satoshi Inoue Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 345-348

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

ワンヘルス理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究

- 岸本寿男 岡山県環境保健センター所長
- 菅沼明彦 駒込病院小児科医長
- 川端寛樹 国立感染症研究所細菌第1部室長
- 山本明彦 国立感染症研究所細菌第2部
- 今岡浩一 国立感染症研究所獣医学部室長
- 木村昌伸 国立感染症研究所獣医学部
- 柳井徳磨 岐阜大学農学部教授
- 井上 智 国立感染症研究所獣医学部室長
- 棚林 清 国立感染症研究所獣医学部室長
- 山田章雄 国立感染症研究所獣医学部部長



Q熱コキシエラの生態系における感染リスク評価 (岡山県環境保健センター 岸本寿男)

目的 *Coxiella burnetii* のヒトへの感染リスクを評価するため、ヒト、ペット、野生動物、家畜、ダニ等で、遺伝子検出と抗体保有率を調査検討する。

成果 (本年度実施項目を黄セルで示した)

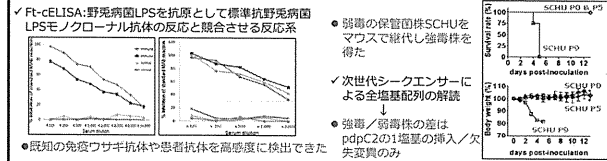
	動物病院従事者	イヌ	ネコ	北海道牧場ウシ	食肉ウシ (全国)	マダニ
抗体陽性率 (国内)	本研究 (2/304)	2.1% (23/1098)	6.2% (36/582)	10.9% (45/430)	0% (0/266)	
	既報 (67/181) 石原ら(1998)	16.6% (50/301) 神田ら(1996)	18.8% (57/304) 神田ら(1996)		46.6% (262/562) Htwe5(1992)	
遺伝子検出率 (国内)	本研究	0% (0/896)	0% (0/1762)	0% (0/456)	0% (0/393) 本年度127頭	0% (0/622) 本年度127頭
	既報			18.8% (21/60) 生乳 松岡ら(1996)	26.7% (4/15) 岐阜 To Hoら(1995)	

まとめ 抗体陽性率、遺伝子検出率とも1990年代の報告と比較して低く、現状では感染リスクは低いと考えられる。

今後の課題 野生動物の保菌状況、抗体保有率と本邦における宿主(マダニ?)の特定。H24は岡山県のヌートリア、野鼠及びマダニ、北海道のウマなどを調査予定。

野兔病に関する研究 研究分担者 棚林 清 (感染研)

多様な野生動物に適用可能な検査系の開発改良【競合ELISAの開発】

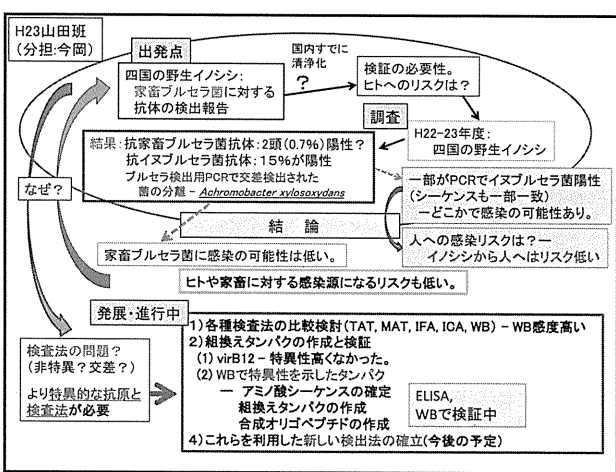
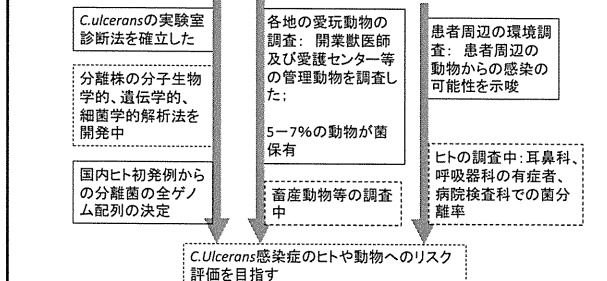


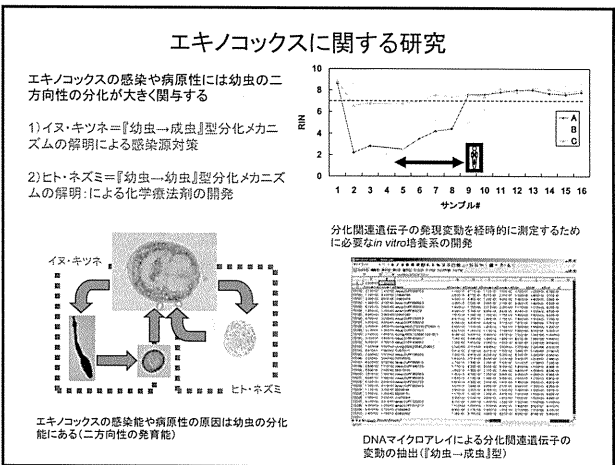
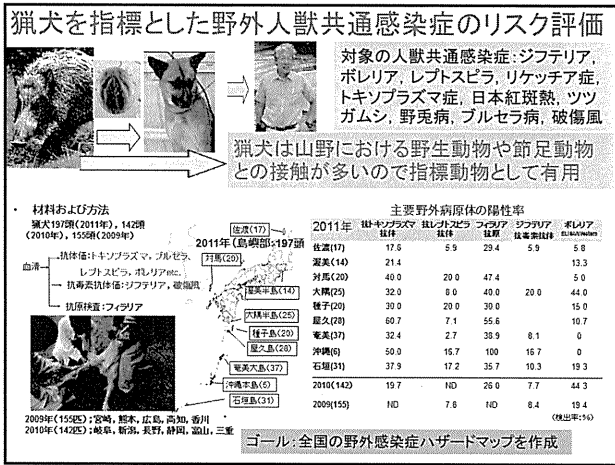
動物種別等	No. of samples	No. of positive	MA
アライグマ	142	0	0
ツシギ	28	4	4
ニホンザル	26	1	0
ホシタテハ	21	3	2
ハクビシン	20	0	0
ホンドコウネ	3	0	0
野鳥合計	212	2	1
マウジ	97	0	0
豚	53	0	0
豚合計	53	0	0
合計	510	10	7

野兔病に関する研究 研究分担者 棚林 清 (感染研)

コリネバクテリウムに関する研究

現在までに国内9名のジフテリア様患者からジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* が分離され、その多くで飼育動物中に皮膚炎、病的な犬、猫が確認された





狂犬病の診断法、治療法に関する調査研究

- ヒト狂犬病治療に関する研究
 - ヒト狂犬病治療法を検討し、治療の現状を示す
 - 救命への有効性が示された治療法は確立されていない
- ヒト狂犬病症例の収集・分析
 - ヒト狂犬病症例を収集しその臨床像を明らかにする
 - 狂犬病の臨床診断に役立つ手引きを作成している
- 国産狂犬病ワクチンの接種法に関する研究

狂犬病暴露前接種の効果

 - 5例の検討ではあるが、暴露前接種を行ったものは、暴露後発症予防実施後にきわめて高い抗体価を示し暴露前接種の効果が示された。
 - 国産ワクチン4回接種法による暴露後発症予防の効果の検討を開始した。

H23 厚労科研山田班 中間評価用スライド 研究分担者: 井上 智、研究協力者: 奥谷晶子、加来義浩

(1) 土壌中のBacillus属菌の分離・同定法の確立: 土壌から効率よくBacillus cereus groupの菌種を分離するための方法を検討を行った結果、約250mgの土壌を生理食塩水に500μlに懸濁して得られた100μlをBacillus cereus選択培地に塗抹して卵黄反応陽性コロニーを羊血液寒天培地に純培養することでBacillus cereus group菌種を効率よく分離することを可能とした。

(2) 狂犬病ウイルス抗原に結合するscFv (single chain variable fragment) を用いた、DRIT法 (Direct, rapid immunohistochemical test) 法の確立を行った。

現在までに

- ベクターへのscFv遺伝子クローニング終了
- 大腸菌での発現を確認中

1st International One Health Congress
 Summary
 14 - 16 February 2011

Key messages arising from the inaugural International One Health Congress:

The One Health approach

- Recognises the interdependence of, and seeks to improve human, animal and environmental health
- Recognises that communication, collaboration and trust between human and animal health practitioners is at the heart of the One Health concept
- Has a broad vision and includes other disciplines such as economics and social behavior that are essential to success
- Needs to promote the 'double' such as improving surveillance and response for emerging infectious diseases while developing the broader approach
- Emphasises community participation and development of community capacity, and especially, an open transparent dialogue
- Requires both 'ground up' and 'top down' action
- Recognises that understanding ecosystems, including molecular ecology, are an essential part of One Health.
- Recognises that One Health is a major component of food security and safety

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 : 重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究
課題番号 : H22-新興-一般-011
予定期間 : H22 年度から H24 年度まで
研究代表者 : 木村 博一
所属研究機関 : 国立感染症研究所
所属部局 : 感染症情報センター第六室
職名 : 室 長
年次別研究費(交付決定額) : 1年目 34,650,000円 2年目 30,492,000円

I. 研究の意義

- (1)我が国の重症呼吸器ウイルス感染症の疫学及び実態が明らかになる。
- (2)呼吸器ウイルス検査診断法の標準化及び普及が可能になる。
- (3)呼吸器ウイルス感染症の重症化のメカニズム(サイトカインストーム等)が明らかになる。
- (4)主要呼吸器ウイルス(ワクチン未開発)のワクチン開発が可能になる。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1)重症呼吸器ウイルス感染症の実態及び病態が本研究により明らかになる。
- (2)呼吸器ウイルス検査法の標準化及び次世代シーケンサーの *de novo sequencing* 法により、重症呼吸器ウイルス感染症の起因ウイルスの網羅的な解析が可能になる。
- (3)サイトカインストーム及びウイルス増殖の機構解明により、呼吸器ウイルス感染症の重症化のメカニズムが明らかになる。
- (4)主要呼吸器ウイルス(ヒトパラインフルエンザウイルス,RS ウイルス:ワクチン未開発)のワクチン開発が期待できる。
- (5)RS ウイルスなどによる重症呼吸器感染症の公衆衛生学的負荷の推定が可能になる。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者(木村博一)

- (1)ヒトライノウイルス(HRV)及び RS ウイルス(RSV)感染細胞のサイトカインプロファイルを明らかにした。その結果、HRV と RSV 感染細胞においては、炎症性サイトカイン(IL-1 β など)や Th2 サイトカイン(GM-CSF など)の産生量が異なることが示唆された。
- (2)ヒトパラインフルエンザウイルス(HPIV)及び RSV の主要ゲノムの分子進化に関する詳細な検討を行った。その結果、各々の主要ゲノムの進化速度や各遺伝子型のウイルスの分岐年代は異なることが示唆された。

・研究分担者(小澤邦壽)

- (1)感染症発生動向調査を基とし、全国地方衛生研究所における重症呼吸器ウイルス感染症(気管支炎・肺炎等)の患者報告及び検査診断に関する実態調査を行った。その結果、本疾患は、2007 年度および 2008 年度ともに全国で 2000 例以上報告され、起因ウイルスとしてインフルエンザウイルスや RS ウイルスが多く検出されていた。臨床症状では気管支炎や肺炎と診断された例が多いことが明らかとなった。

・研究分担者(調 恒明)

- (1)エンテロウイルス 68 型(EV68) 感染が小児気管支喘息発作増悪への関与している可能性があることを明らかにしてきた。ヒト気道上皮細胞に H1N12009 および EV68 を感染させ、その上清中のサイトカインを測定したところ、H1N1 2009 感染後では有意に多量の IL-6, IL-8 の産生がみられたが、EV68 感染後には IL-6, IL-8 産生はみられなかった。ウイルス感染による小児気管支喘息発作増悪は一見同様の病態のように考えられるが、ウイルスにより異なる機序で気管支喘息発作が誘発されている可能性が示唆され、予防方法確立のために今後更なる病態解明が必要である。

・研究分担者(竹田 誠)

- (1)膜蛋白セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が、ヒトインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、SARS ウイルスのみならず、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型を活性化することを明らかにした。
- (2)膜蛋白セリンプロテアーゼ TMPRSS2 が、ヒト、鳥の様々な亜型のインフルエンザウイルスを活性化することを明らかにした。すなわち、P3 位、P2 位のアミノ酸残基は、必ずしもヒトインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルスで高度に保存されている、それぞれ Q (又は E)、S (又は T) でなくとも良いことが分かった。
- (3)膜蛋白セリンプロテアーゼ TMPRSS2 のパラインフルエンザウイルス膜融合蛋白質 (F 蛋白質) の基質特異性決定には、F 蛋白質の P3 位、P2 位のアミノ酸が重要な意義をもつことを明らかにした。

・研究分担者(野田雅博)

地方衛生研究所と連携し、HPIV、RSV、ヒトメタニューモウイルス(HMPV)、HRV などの呼吸器ウイルスサーベイランスを主体とした研究を行い、以下の成果が得られた。

- (1)山形県における HPIV-1 及び 3 型のサーベイランスを長期間 (2002-2009 年) にわたり継続し、その疫学が明らかになった。
- (2)沖縄県における下気道炎患者の主要原因ウイルスの一つは RSV であり、その流行は国内の他地域の流行様相とは大きく異なり通年性であることを明らかにした。
- (3)青森県、群馬県および熊本県において分離・検出された RSV について分子疫学解析を実施した。
- (4)急性下気道感染児からのウイルス検索を実施し、RSV、HRV 等の多種、多数の ARI ウイルスが分離・検出された。
- (5)福井県において 2005-2011 年の間に検出された HMPV の分子疫学解析を実施した。その結果、検出された HMPV の遺伝子型は A2 及び B2 が主体であることが明らかになった。
- (6)栃木県および山口県において 2009-2010 年の間に検出された HRV の分子疫学解析を実施した。その結果、遺伝学的に多様な speciesA 及び C の HRV が流行していたことが明らかになった。

・研究分担者(松山 州徳)

- (1) 様々な肺胞上皮由来の細胞株に SARS コロナウイルスを感染させたところ、Calu-3 細胞にのみ感染することがわかった。また SARS コロナウイルスは Calu-3 細胞への感染に膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)を利用することと、TMPRSS2 を siRNA や特異的阻害剤で抑えることにより感染を抑制できることを明らかにした。

・研究分担者(水谷 哲也)

(1)ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) を用いて不明検体から新規・稀少ウイルスを検出する手法を確立した。また、新規ウイルスから PCR などの検出法を確立し、以降のウイルス検出業務に役立てることが可能になった。

・研究分担者(黒田 誠)

(1)咽頭炎・下痢・神経痛を訴える地域流行症例の咽頭・便検体から、ピコルナウイルス科のヒトパレコウイルスを同定した。既存の抗体検査法では検出できない血清型であった。臨床検体の網羅解読法により、特徴的なウイルス配列の検出に成功した。今年度、新たに発生した集団感染の呼吸器剖検組織から病原体の同定を試みたが、死因に関連する病原体候補を見出すことが出来なかった。

・研究分担者(梁 明秀)

(1)コムギ無細胞系を用いた新規ワクチンおよび中和抗体の開発

抗原として用いる PIV-3HN 全長タンパク質の合成には、コムギ無細胞系を用いた。コムギ胚芽抽出液には翻訳阻害因子が含まれず、正しくフォールディングされたタンパクを安定に *in vitro* 合成することができる。コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN を構築しコムギ無細胞系を用い、PIV-3-HN タンパク質全長タンパク質の合成に成功した。MCL 経鼻ワクチンとしてマウスに投与する。また、同タンパク質にキャリアタンパク質をコンジュゲートし、現在 BALB/c マウスに免疫中である。3 回抗原投与後に、血清中の中和抗体の存在を確認後、ハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体産生を試みる予定である。

(2)PIV-3-HN コドン最適化遺伝子を用いた DNA ワクチンの開発

PIV-3-HN の哺乳動物へのコドン最適化 cDNA を合成、CAG プロモータによる発現ベクターを構築した。細胞株における発現を確認した。今後は BALB/c マウスにエレクトロポレーションを用いて導入し、自然免疫の活性化や抗原特異的免疫応答の有無について考察する予定である。

(3)MRC-5 細胞不死化

正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクター、pLenti6_TERT_shp16 を作成した。作成したベクターを用い、ヒト胎児肺線維芽細胞である MRC-5 細胞に不死化誘導因子を導入した。現在のところ少なくとも 20 回以上の分裂が可能な MRC-5/hTERT_shp16 を確認した。現在これらの細胞のウイルス感染感受性や CPE の有無について確認中である。

IV. 平成 24 年度の課題

(1)呼吸器ウイルスによって生じるサイトカインストームの抑制に関与するシグナル伝達機構の解明及び治療薬の有用性に関する評価が必要である。

(2)小児における RSV などによる重症呼吸器感染症の医学的負荷に関する評価検討が必要である。

(3)国内における重症呼吸器ウイルスサーベイランスの継続実施と充実を図り、わが国における各ウイルスに関する疫学知見を集積する。

(4)重症呼吸器ウイルス感染症に対応可能な病原体検査マニュアル各 ARI ウイルス編改訂版を作成する必要がある。

(5)膜蛋白セリンプロテアーゼ TMPRSS2 の呼吸器ウイルス病原性発現における *in vivo* での重要性を解析する必要がある。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1)自治体における重症呼吸器ウイルス感染症の検査診断が容易になる。
- (2)重症呼吸器ウイルス感染症のリスクファクター(サイトカインストーム等)を提示可能になる。
- (3)RSV は HPIV などのワクチン導入が期待される。
- (4)インフルエンザウイルスを含む多くの呼吸器ウイルスの病原性発現機構の一端が明らかになるとともに、ヒトや鳥などの宿主特異性決定機序の一部が明らかになる可能性が高い。特に鳥インフルエンザウイルスの行政上の対策に貢献できると考えている。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者(木村博一)

- 1.Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virol J*. in press.
- 2.Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Micrbiol Immunol*. in press.
- 3.Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol*. in press.
- 4.Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus Retinitis During Maintenance Therapy for T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. in press.
- 5.Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol*. in press.
- 6.Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and the similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 30(8):680-683, 2011.
- 7.Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. 43(8):669-671, 2011.
- 8.Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*. 11:168, 2011.
- 9.Nishi M, Akutsu M, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Sam W. Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in

- the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem.* 286(13):11593-11603, 2011.
10. Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 Pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):87-89, 2011.
 11. Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of human metapneumovirus (HMPV) genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in an old-age home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):85-87, 2011.
 12. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol.* 22(1 Pt 2): e87-94, 2011.
 13. Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int.* 35:467-474, 2011.
 14. Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Ryo A, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol.* 1:Article 124, 1-7, 2010.
 15. Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, Saito Y, Okabe N, Tashiro M, Kozawa K, Tanaka R, Morita Y, Nishina A, Kimura H. Genotyping and phylogenetic analyses of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63(6):393-400, 2010.
 16. Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63(5):378-380, 2010.
 17. Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Itagaki T, Katsushima N, Matsuzaki Y, Hongo S, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Endemicity of human metapneumovirus subgenogroups A2 and B2 in Yamagata, Japan between 2004 and 2009. *Microbiol Immunol.* 54(10):634-638, 2010.
 18. Nakamura M, Itokazu K, Taira K, Kawaki T, Kudaka J, Nidaira M, Okano S, Kimura H, Noda M. Detection and phylogenetic analysis of human rhinoviruses from Okinawa, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63(3):221-223, 2010.
 19. Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Detection and phylogenetic analysis of Saffold cardiovirus (SAFV) from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 42:950-952, 2010.
 20. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. *Jpn J Infect Dis.* 63(2):139-140, 2010.

• 研究分担者(小澤邦壽)

1. Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. *Virology*. in press.
2. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H, Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol*. in press.
3. Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus Retinitis During Maintenance Therapy for T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. in press.
5. Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S, A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. *Toxicol Appl Pharmacol*. in press.
6. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. 43(8):669-671, 2011.
7. Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol*. 22(1 Pt 2): e87-94, 2011.
8. Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int*. 35:467-474, 2011.
9. Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Ryo A, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol*. 1:Article 124, 1-7, 2010.
10. Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, Saito Y, Okabe N, Tashiro M, Kozawa K, Tanaka R, Morita Y, Nishina A, Kimura H. Genotyping and phylogenetic analyses of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(6):393-400, 2010.
11. Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(5):378-380, 2010.

• 研究分担者(調 恒明)

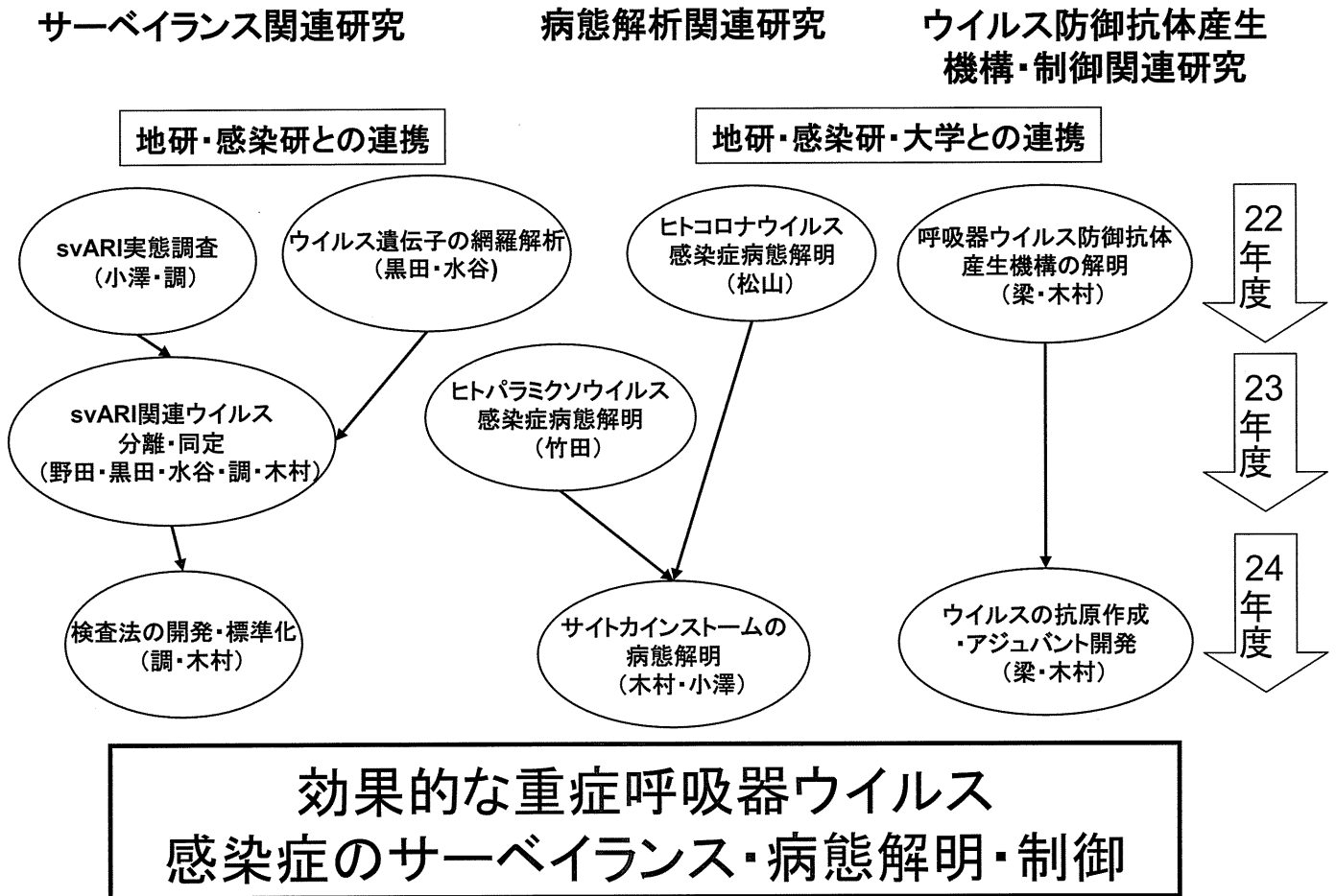
1. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K.

- Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan, during summer 2009. *Jpn J Infect Dis.* 2010 ;63(2):139-40.
2. Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 ;22, 119-23.
 3. Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T. Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy. *Cytokine.* 2011 ;54(2):167-72.
 4. Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol.* 2011 in press
 5. Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K . Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children *Allergy* 2011; 66(12) 1618-1620
 • 研究分担者(野田雅博)
1. Mizuta K, Hirata A., Suto A., Aoki Y., Ahiko T., Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M., Akiyama M., Okabe N., Noda M, Tashiro M., and Kimura H: Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res* 147:265-274,2010.
 2. Toda S., Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T., Suzuki E., Shirabe K.: Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan during summer 2009. *Jpn. J. Infect. Dis. J. Infect. Dis.* 63:130-140,2010
 3. Mizuta K, Abiko C., Aoki Y., Ikeda T., Itagaki T, Katsushima N., Matsuzaki Y., Hongo S., Noda M, Kimura H and Ahiko T.: Endemicity of human metapneumovirus sub genogroups A2 and B2 in Yamagata, Japan, between 2004 and 2009. *Microbiol. Immunol.* 54:634-638,2010.
 4. Itagaki T, Abiko C., Ikeda T., Aoki Y., Seto J., Mizuta K., Ahiko T., Tsukagoshi H, Nagano M., Noda M, Mizutani T., and Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand. J. Infect. Dis.* 42:950-952,2010
 5. Tsukagoshi H, Masuda Y., Mizutani T., Mizuta K, Saitoh M., Morita Y, Nishina A., Kozawa K., Noda M, Ryo A., and Kimura H: Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:378-380,2010
 6. Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai M, Saito Y., Okabe N., Tashiro M., Kozawa K., Tanaka R., Morita Y, Nishina A., and Kimura H: Genotyping and phylogenetic analyses of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:393-400,2010.
 7. Omura T., Iizuka S., Tabara K., Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, and Kimura H: Detection of human metapneumovirus (HMPV) genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in an old-age home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64:85-86,2011

8. Itagaki T., Abiko C., Aoki Y., Ikeda T., Mizuta K., Noda M., Kimura H., and Matsuzaki Y.: Saffold coronavirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 30:680-683,2011
9. Tsukagoshi H., Mizuta K., Abiko C., Itagaki T., Yoshizumi M., Kobayashi M., Kuroda M., Kozawa K., Noda N., Ryo A., and Kimura H.: The impact of saffold coronavirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand.J.Infect.Dis.* 43:669-671,2011
10. Fujitsuka A., Tsukagoshi H., Arakawa M., Goto-Sugai K., Ryo A., Okayama Y., Mizuta K., Nishina A., Yoshizumi M., Kaburagi Y., Noda M., Tashiro M., Okabe N., Mori M., Yokota S. and Kimura H.: A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infectious Diseases* 11:168,2011
11. Hasegawa S., Hirano R., Okamoto-Nakagawa R., Ichiyama T., Shirabe K. and Ichiyama T. : Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: Virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy*,2011 Dec;66(12):1618-20. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02725.x. Epub 2011 Sep 29
12. Arakawa M., Okamoto-Nakagawa R., Toda S., Tsukagoshi H., Kobayashi M., Ryo A., Mizuta K., Hasegawa S., Hirano R., Wakiguchi H., Kudo K., Tanaka R., Morita Y., Noda M., Kozawa K., Ichiyama T., Shirabe K. and Kimura H.: Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J.Med.Microbiol.* 2011 Oct 20. [Epub ahead of print]
13. 板垣勉, 松寄葉子 : ヒトメタニューモウイルス感染症の臨床経過とウイルス排泄期間の検討、*日本小児科学会雑誌* 115 : (4) 782-787、2011
1. 板垣 勉 : パラインフルエンザウイルス、*小児科臨床ピクシス* 20、かぜ症候群と合併症、中山書店、2010年8月27日 94-96頁
2. 板垣 勉 : ヒトメタニューモウイルス、*小児科臨床ピクシス* 20、かぜ症候群と合併症、中山書店、2010年8月27日 100-103頁
1. 田代真人, 牛島廣治編 (共同執筆 : 木村博一, 野田雅博, 水田克巳, 塚越博之, ほか) : ウイルス感染症の検査・診断スタンダード、*羊土社*, 2011年5月
- マニュアル :
1. 水田克巳, ほか : 病原体検出マニュアル「パラインフルエンザウイルス編」改訂版
- 水田克巳, ほか : 病原体検出マニュアル「ヒトメタニューモウイルス編」改訂版
- ・ 研究分担者(松山 州徳)
1. Matsuyama S. Protease dependent cell entry mechanism of coronaviruses. *Uirusu.* 2011 Jun;61(1):109-16.
2. Shirato K., Matsuyama S., Ujike M., Taguchi F. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells. *J Virol.* 2011 Aug;85(15):7872-80.
- ・ 研究分担者(梁 明秀)
1. Yoshizaki S., Nishi M., Kondo A., Kojima Y., Yamamoto N., Ryo A. Vaccination with human induced pluripotent stem cells creates an antigen-specific immune response against HIV-1 gp160. *Frontiers in Microbiology*, 2011 Feb 22;2:27.
2. Nishi M., Akutsu H., Masui S., Kondo A., Nagashima Y., Kimura H., Perrem K., Shigeri Y., Toyoda M., Okayama A., Hirano H., Umezawa A., Yamamoto N., Lee SW., Ryo A. A distinct role for Pin1 in the

- induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*, 2011 Feb 4;286(13):11593-603.
3. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scandinavian Journal of Infections Diseases*. 2011 Feb
 4. Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2010 Sep;63(5):378-80.
 5. Kojima Y, Ryo A. Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Frontiers in MICROBIOLOGY*. 2010 Sep 9;1:107
 6. Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K. DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine*. 2010 Jul 12;28(31):4920-7.
 7. Yashima S, Yoshizaki S, Shinoda K, Yoshida A, Kondo A, Mizuguchi H, Ryo A, Okuda K, Shimada M. Co-administration of viral vector-based vaccines suppresses antigen-specific effector CD8 T cells. *Vaccine*. 2010 Apr 19;28(18):3257-64.

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

- ・1984～1995年：群馬大学医療技術短期大学及び医学部保健学科生化学教室
- ・1995～2000年：群馬大学工学部及び同大学院工学研究科
- ・1991～2006年：群馬県衛生環境研究所
- ・2006年～：国立感染症研究所感染症情報センター

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

群馬県衛生環境研究所：小澤邦壽所長

群馬大学：中野稔名誉教授、池康嘉教授、倉林正彦教授、森川昭廣名誉教授、荘司顕教授

北海道大学：水上尚典教授

横浜市立大学：梁明秀教授

国立感染症研究所：岡部信彦感染症情報センター長 竹田誠ウイルス第三部長

田代真人インフルエンザウイルス研究センター長

・ 主な研究課題

- ・ 呼吸器感染症の重症化機構解明に関する研究
- ・ RNA ウイルスの進化に関する研究
- ・ サイトカインストームの機構解明に関する研究

・ これまでの研究実績

- (1) Kimura H, Tsukagoshi H, Aoyama Y, Nishina A, Yamaguchi T, Iijima A, Kato M, Kozawa K. Relationships between cellular events and signaling pathways in various pesticide-affected neural cells (Original Research). *Toxin Rev.* 29(2):43-50, 2010.
- (2) Akiyama M*, Kimura H*, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, Tashiro M. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (*N*) gene using real-time reverse transcriptase PCR. *J Med Microbiol.* 58(5):638-643, 2009. *Contributed equally
- (3) Kimura H, Kato K, Ikeda M, Nagai A, Okada Y, Naito S, Oshima S, Taniguchi K, Kozawa K, Morikawa A. Sulfonated human immunoglobulin enhances CD16-linked CD11b expression on human polymorphonucleic leukocytes. *Cell Biol Int.* 27(11):913-919, 2003.
- (4) Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato K, Nagai A, Kozawa K. Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J.* 22(8):758-759, 2003.
- (5) Kimura H, Minakami H, Shoji A. Ultraviolet B irradiation modulates susceptibility to TNF α -induced apoptosis through inducing death receptors in murine fibroblasts. *Cell Biol Int.* 25(12):1221-1228, 2001.
- (6) Kimura H, Shibata Y, Minakami H, Hashizume S, Oba H, Sakaguchi M, Otsuki K, Kato M. Release of IL-4 and IL-5 from human peripheral blood mononuclear cells cocultured with Japanese cedar pollen antigen *in vitro*. *Cell Biol Int.* 25 (8):841-844, 2001.
- (7) Kimura H, Minakami H, Otsuki K, Shoji A. Cu-Zn superoxide dismutase inhibits lactate dehydrogenase release and protects against cell death in murine fibroblasts pretreated with ultraviolet radiation. *Cell Biol Int.* 24(7):459-465, 2000.
- (8) Kimura H, Minakami H, Sekiguchi I, Otsuki K, Shoji A. Phorbol ester facilitates apoptosis in murine fibroblasts pretreated by mild ultraviolet radiation. *J Biochem.* 126(2):340-346, 1999.
- (9) Kimura H, Minakami H, Harigaya A, Takeuchi H, Tachibana A, Otsuki K. Treatment of neonatal infection caused by coxsackievirus B3. *J Perinatol.* 19(5):388-390, 1999.
- (10) Kimura H, Minakami H, Ohbuchi M, Tsuchida S, Hara Y, Asahina J, Abe O, Ike Y, Kurashige S, Otsuki K. Release of superoxide anion from polymorphonuclear leukocytes stimulated by rubella viral antigen-antibody complex *in vitro*. *Acta Virol.* 41:329-332, 1997.
- (11) Kimura H, Minakami H, Sakae K, Ohbuchi M, Kuwashima M, Otsuki K. Outbreak of echovirus type 33 infection in Japanese school children. *Pediatr Infect Dis J.* 16(1):83-84, 1997.
- (12) Kimura H, Minakami H, Sakurai T, Otsuki K, Nakano M. Release of superoxide radicals from

- macrophages stimulated by variously oxidized low density lipoproteins. *Photomed Photobiol.* 18:59-60, 1996.
- (13) Kimura H, Minakami H, Kimura S, Sakurai T, Nakamura T, Kurashige S, Nakano M, Shoji A. Release of superoxide radicals by mouse macrophages stimulated by oxidative modification of glycated low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 118:1-8, 1995.
- (14) Kimura H, Nakano M. Highly sensitive and reliable chemiluminescence method for the assay of superoxide dismutase in human erythrocytes. *FEBS Lett.* 239(2):347- 350, 1988.
- (15) *Mizuta K, Saitoh M, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Katsushima N, Itagaki T, Noda M, Kozawa K, Ahiko T, Kimura H. Detailed genetic analysis of hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein gene in human parainfluenza virus type 1 isolates from patients with acute respiratory infection between 2002 and 2009 in Yamagata prefecture, Japan. Virol J. in press.*
- (16) *Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Matsuzaki Y, Fuji N, Imamura T, Oshitani H, Noda M, Kimura H, Ahiko T. Acute respiratory infections due to enterovirus 68, in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. Microbiol Immunol. in press.*
- (17) *Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H, Molecular epidemiological study of human rhinovirus species ABCs from patients with acute respiratory illnesses in Japan. J Med Microbiol. in press.*
- (18) Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y. Cytomegalovirus Retinitis During Maintenance Therapy for T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* in press.
- (19) *Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Nakamura T, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S, A superoxide anion-scavenger, 1,3-selenazolidin-4-one suppresses serum deprivation-induced apoptosis in PC12 cells by activating MAP kinase. Toxicol Appl Pharmacol. in press.*
- (20) Sakano C, Morita Y, Goto K, Yokota Y, Annaka H, Fujita M, Kobatake S, Ishioka T, Hoshino T, Boonmar S, Pulsrikarn C, Nishina A, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H. Prevalence and genotype of Salmonella Choleraesuis in Gunma Prefecture, Japan. *Thai J Vet Med.* 41(3):321-326, 2011.
- (21) Nishina A, Kimura H, Kozawa K, Sommen G, Favero F, Heimgartner H, Koketsu M, Furukawa S. 3-(2,6-Dimethylphenyl)-2-selenoxo-1,3-thiazolidin-4-one suppresses hydrogen peroxide-induced cytotoxicity on PC12 cells via activation of MAPK. *Int J Toxicol.* in press.
- (22) *Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and the similarity to coxsackievirus infection. Pediatr Infect Dis J. 30(8):680-683, 2011.*

- (23) Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. The impact of saffold cardiovirus (SAFV) in patients with acute respiratory infection in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis*. 43(8):669-671, 2011.
- (24) Tazaki E, Shimizu N, Tanaka R, Yoshizumi M, Kamma H, Imoto S, Goya T, Kozawa K, Nishina A, Kimura H. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp Ther Med*. 2(5):887-891, 2011.
- (25) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*. 11:168, 2011.
- (26) Nishi M, Akutsu M, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Sam W. Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *J Biol Chem*. 286(13):11593-11603, 2011.
- (27) Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of various respiratory viruses in patients with influenza-like illness before and after emergence of the 2009 Pandemic H1N1 influenza virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis*. 64(1):87-89, 2011.
- (28) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of human metapneumovirus (HMPV) genomes during an outbreak of bronchitis and pneumonia in an old-age home in Shimane, Japan, in autumn 2009. *Jpn J Infect Dis*. 64(1):85-87, 2011.
- (29) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol*. 22(1 Pt 2):e87-94, 2011.
- (30) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int*. 35:467-474, 2011.
- (31) Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Ryo A, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol*. 1:Article 124, 1-7, 2010.
- (32) Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, Saito Y, Okabe N, Tashiro M, Kozawa K, Tanaka R, Morita Y, Nishina A, Kimura H. Genotyping and phylogenetic analyses of major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 63(6):393-400, 2010.
- (33) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus