

## 結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究

【目的】これまで実施されてきた対策の再評価を行うとともに、感染診断、菌検査、新抗結核薬を含めた治療法などの新しい技術の開発及びその評価を行う

課題名	所属	研究者
薬剤耐性全国調査	国立病院機構千葉東病院	山岸文雄
IGRAの免疫脆弱者における評価	結核予防会結核研究所	原田登之
小児結核の全数調査及びBCGの副反応調査	国立病院機構京都病棟	徳永 修
コッホ現象報告の分析	結核予防会結核研究所	加藤誠也
地域DOTSの質向上のための検討	結核予防会結核研究所	小林典子
院内DOTS業務量調査	結核予防会結核研究所	加藤誠也
結核病巣調査	結核予防会結核研究所	伊藤邦彦
新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価	国立病院機構近畿中央胸部疾患センター	岡田全司
結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発	結核予防会結核研究所	御手洗聡
遺伝子タイピングの自動化・省力化を目的した分析システムの構築	結核予防会結核研究所	前田伸司
結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価	国立国際医療センター	切替照雄

## 結核対策の評価と新たな診断・治療技術の開発・実用化に関する研究

研究課題 期待される効果

<p>1. 薬剤耐性全国調査</p> <p>2. IGRAの免疫脆弱者における評価</p> <p>3. 小児結核の全数調査及びBCGの副反応調査</p> <p>4. コッホ現象報告の分析</p> <p>5. 地域DOTSの質向上のための検討</p> <p>6. 院内DOTS業務量調査</p> <p>7. 結核病巣調査</p>	<p>1. 薬剤耐性結核対策の評価</p> <p>2. 免疫脆弱者へのIGRA診断精度向上、適切な適用法の策定</p> <p>3. 小児結核治療の質の維持、BCG副作用の実態解明と対策</p> <p>4. コッホ現象への対応改善</p> <p>5. 地域DOTSの質の向上</p> <p>6. 院内DOTS実施、診療報酬評価</p> <p>7. 医療提供体制構築の資料</p>	<p>効果的・効率的な対策のため技術革新・改良</p> <p>耐性結核防止・医療水準向上・低まん延化促進・医療費削減</p>
<p>8. 新化学療法剤を含めた治療方式の開発・評価</p> <p>9. 結核菌の病原性・感染性の評価方法の開発</p> <p>10. 遺伝子タイピングの自動化・省力化</p> <p>11. 結核菌検出・薬剤感受性検査の迅速遺伝子診断法の開発・評価</p>	<p>8. より短期の治療、多剤耐性等の治療困難な患者の治療開発</p> <p>9. 感染実態の解明及び効果的・効率的な接触者健診の実施</p> <p>10. 遺伝子型別「サーベイランス」構築の技術基盤開発</p> <p>11. 結核菌の迅速な検出、薬剤耐性結核の迅速な診断</p>	

## 薬剤耐性の実態調査

日本における結核菌の薬剤耐性に関する全国調査を2007年から実施し、最終結果を得た。

- 2,292名の結核患者（男性1,573/女性719：平均年齢64.8±19.7）から結核菌を収集
- 各薬剤に対する耐性率（表1）は漸減傾向であるが、イソニアジドの未治療耐性率のみやや増加。2002年：2.8%→2007年：3.1%。
- イソニアジドに匹敵するレボフロキサシン耐性が認められ、多くは単剤耐性であった。一般細菌治療の影響と思われる。
- 多剤耐性結核菌（MDR）は未治療患者の0.4%、既治療患者の4.1%で、2002年から半減した（統計的に有意）。ただしMDRの多くは二次抗結核薬にも耐性であった（図1）。
- これにより、MDR中のXDR割合は15.4%となった。また、10.7%の株が遺伝子タイピングで一致した。これは2002年のクラスター形成率（29%）に比べて大きく減少していた。
- 精度保証された耐性情報がアップデートされたものと考えられる。

表1 薬剤別・治療歴別耐性率

	未治療 (%)	既治療 (%)	全体 (%)
All Susceptible	89.9	69.7	88.2
Any Resistance	10.1	30.3	11.8
INH	3.1	12.3	3.8
RFP	0.7	6.7	1.2
SM	5.6	12.3	9.2
EB	1.3	2.6	1.4
LVFX (n=852)	3.2	6.1	3.4
MDR	0.4	4.1	0.7
INH + RFP	0.1	1.5	0.2
INH + RFP + EB	0.1	0.5	0.2
INH + RFP + SM	0	0.1	0.1
INH + RFP + EB + SM	0.1	1.0	0.2

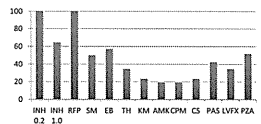


図1 多剤耐性結核の二次薬剤耐性

## 免疫脆弱集団における感染診断の評価

【目的】

免疫学的結核感染診断法であるインターフェロン-ガンマ放出試験（IGRA）の免疫脆弱集団における診断性能を評価し、このような集団における診断基準を確立することを目的とする。また、高齢者における休眠期の結核感染を診断する方法を開発する。

【結果】

- HIV感染者に関して、多摩総合医療センターとの共同研究の結果、CD4+細胞数が50個/μl以上の場合QFT-2Gの診断能は損なわれていないことを報告した→下記論文。
- 小児に関しては、京都病棟の徳永分担研究員の班において、各検体のIGRA検査とIP-10のアッセイを行った。→後述
- 休眠期の結核感染診断法を確立するため、潜在性結核感染者を対象にFluorospotを用いた抗原特異的IFN-γおよびIL-2産生細胞の解析を試みた。IFN-γ単独産生細胞が約70%、IL-2単独とIFN-γおよびIL-2の両者の産生細胞がそれぞれ15%程度であった。

【考察】QFTはCD4+細胞数が50個/μl以上のHIV感染者における感染診断に適用できる。今後、活動性結核患者を含めた、より詳細な検討が必要であろう。また、新たな潜在性結核感染特異的抗原も報告されており、これらの抗原を含めた新たな診断法の確立を今後目指していく。

【成果】Performance of a Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay with Mycobacterium RD1-Specific Antigens among HIV-Infected Persons. Fujita A, Ajiwara A, Harada N, et al. Clin Dev Immunol. 2011; 2011. pii: 325295

## 小児結核対策・医療の評価及び新結核診断法の検討

### 1. 小児結核症例実態調査

【方法】結核登録情報システムから2010年登録の小児結核症例（0～14歳：89例）を抽出し、当該保健所に調査票を送付し、症例背景・属性、診断、治療等に関する情報の収集をした。

- 【結果と考察】
- 検討対象は未回答、不適格の8例を除く81例
- 東京都22例、神奈川県8例と首都圏に偏在する傾向が特に顕著であった（集団感染例も関与）。従来多発していた近畿地区の発症例は少なかった。
- 昨年の調査と同様、外国/高蔓延国での居住歴を有する発症例は17%（14例）（フィリピン5例、ペルー3例、ベトナム2例など）。
- BCGワクチン接種歴が明らかであった76例のうち未接種例は9例のみ。高いワクチン接種率の維持が発症例の減少に大きく寄与していると推測される。
- 病型・空洞を伴った例は2例のみ。髄膜炎などの重症例の発生も見られなかった。空洞を伴わない肺結核：58例、肺門リンパ節結核：11例と多数を占めた。

- 菌検査結果が把握された66例のうち、塗抹・PCR・培養何れかの陽性率は23例。QFT結果が把握できた59例中、45例（76%）が陽性。
- 診断契機は接触者健診58例、有症状受診18例、学校検診2例などであった。有症状受診のうち、肺外症例では診断に至るまで長期間（3ヶ月以上）を要する傾向が見られた。
- 治療レジメとしては小児に対する標準的治療であるHRZかHRZE/HRZsが多く選択されていたが、HRが7例、HREが4例で選択されていた。
- 発症要因：43例で「感染源の発見・治療の遅れ」、他に「BCG未接種」（8例）、「周産期の感染機会」（3例）「健診実施時期のおくれ」（2例）が挙げられていた。

【成果】本調査は我が国の小児結核症例をほぼ全網羅しており、小児結核が順調に減少してきた状況における対策の再考・診療内容の検証のために非常に有益な情報とならう。

### 2. 小児を対象とした精度の高い結核感染診断法導入への検討

2-1 低年齢小児のQFT診断特性の検討  
【方法】小児を対象としたQFT-3G適用例の集計・解析。低年齢小児（0-1歳）での判定不可の頻度や同居家族が喀痰塗抹陽性肺結核で感染リスクが高いと評価される小児を対象とした健診例における低年齢小児のQFT陽性頻度を比較した。

【結果】QFT-3GがQFT-2Gに比してより良好な感度を有していることが期待された。

2-2 小児を対象とした2種のIGRA及び結核菌特異抗原刺激により放出されるIP-10定量測定による感染診断の有用性に関する検討

【方法】結核感染も疑われた小児に対して2種のIGRA（QFT-3G及びT-SPOT）の他にQFT上清を用いてIP-10 release assayも併せて実施し、それらの反応感度を比較検討した。

【結果】活動性結核症例では3種の感染診断法の結果に不一致は見られなかった。また、活動性結核症例接触者健診例、コッホ現象例、非結核症例におけるIP-10放出量の比較より、IP-10を基にした感染診断はカットオフ値を適切に設定することによりIGRAに優る良好な感度と特異度で、有用な結核感染診断法とならう。

### 3. 小児結核症例検診会（首都圏及び近畿地区）の開催

【目的】小児結核に対する関心を喚起し、また発症に至った症例が抱える課題を検討し、今後の小児結核症例の予防、早期発見、治療支援に活かす

【結果】昨年度より首都圏でも開催しており、本年度の検討会では保健所と医療機関との連携や紹介可能な小児医療機関の乏しさを課題として挙がった。

### 4. BCG接種後の骨炎発生調査

【目的】BCGワクチン接種後骨炎/骨髄炎の発生傾向を把握する

【方法】文献調査、アンケート調査等により近年の発生例を収集した。

【結果】増加傾向を示している可能性がある。

【考察】接種時期の違い、副反応への関心の高まり、調査方法の変更、BCG菌同定技術の進歩等の可能性があり、正確な把握が必要

【成果】厚生科学審議会結核部会の参考人資料として提出

## コッホ現象報告の分析

【目的】コッホ現象報告の集計・解析を行い、BCG接種の実施方法の改善に役立てる。

【方法】平成17年4月から21年3月までの4年間に厚生労働省にコッホ現象として報告された814例の集計・分析を行った。

【結果】1. 報告例は、都道府県により大きな違いがあった。これは感染危険度の違い以上に、接種時の保護者への説明、相談後の対応、市町村から都道府県までの報告システムなど人為的な要因も関与しているものと考えられた。  
2. コッホ現象に係る重篤な副反応の報告は認められなかった。

都道府県別出生10万対報告件数  
(平成17年度から20年度)



### 【結論】

1. 報告数には人為的な要因が関係している可能性がある。適切な措置の徹底を図るため、今後とも保護者及び医療機関等に対してコッホ現象に関する正しい情報提供をする必要がある。
2. BCG直接接種は安全であることが確認できた。

【成果】①改正された「予防指針」に反映された。  
②日本のコッホ現象報告の分析。結核2010; 85: 777-782

## 日本版DOTSの技術強化

【目的】結核看護システムを活用し、コホート分析をひとつの指標として看護サービスの評価・分析を検討する。結核患者の治療における日本版DOTSを良質かつ広範に普及させる方法を開発し、結核治療の成績を向上させる。

【方法】①服薬支援者育成のための教材DVD「服薬支援の心づくり」(15分)を作成した。23年度地域別講習会保健看護学科講義で試写し修正版を作成、評価アンケートを12月に実施した。

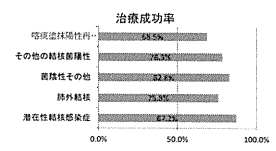
②本システム試行に参加した12自治体34保健所から報告(平成23年10月末時点)された登録者総数3,198人(治療開始平成19-22年)の患者分類コード別の成績を分析した。

③月々の服薬情報とDOTSタイプを組み合わせた服薬支援の評価指標(服薬支援スコア)をシステムに搭載し、分析した。

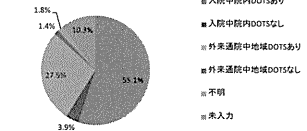
④結核医療の地域連携強化のための基礎研究として21年の新登録患者の治療機関について調査を行った。

### 【結果】

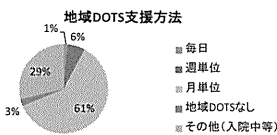
- ①アンケート調査結果は解析中
- ②DOTS成績



### 初回治療DOTSタイプ



## 日本版DOTSの技術強化



④入院患者(1107名)では治療終了までに医療機関が変わったのは29.9%であった。外来患者(887名)では5.6%であった。また医療機関への所要時間が90分未満を見てみると入院患者は30.2%であったが、退院時転院した患者は、60.7%であった。

### 【考察】

①服薬支援者の育成は各自治体に任せられている。地域連携体制を構築するためには、全国共通の教材が必須である。

DVD教材を用いることで、服薬支援の姿勢にフォーカスを当てた初期導入の有用性や、DOTSのさらなるエンパワメント効果、

信頼関係づくり等に関する教育効果を評価することができ、今後の教材開発において有用な資料として役立たせることができるため、DOTS推進に貢献が期待できる

②本システムを活用し、コホート分析を一つの指標として看護サービスの評価および分析を行った。リスクアセスメント表を用いることにより疾患の特徴を捉えた客観的指標として支援頻度や地域DOTSタイプを構築する資料として活用でき、共通に用いることで信頼性が保証される

③アセスメント表および服薬支援スコアの新たな導入は、服薬支援活動の突進を反映したDOTS支援のツールとして、さらに有用性が高まると考えられる

④入院可能結核専門医療機関が減少しつつある中、医療機関の変更に際しては、緊密な地域連携が必要であり、重要な意義をもつと思われる。

## 院内DOTS業務量調査

【目的】院内DOTS業務の実施状況と患者の理解度・満足度を指標として相関を検証し、診療報酬評価に活用する。

【方法】20床以上の結核認可病床を持つ医療機関21施設を対象として、調査票によって、病院の基本情報、DOTSに係る職種毎の業務量、入院患者の背景、患者満足度(自記式)に関する情報を収集した。

【結果】患者の理解度・満足度は、看護体制でプライマリナーシング体制を持つ方が高い傾向にあった。医師においては、業務時間の増加に伴い、患者理解度・満足度の向上する傾向があった。患者教育方法ではビデオ・DVDを使っている病院のほうが高い満足度を示す傾向が見受けられた。

【考察】良好な「院内DOTS業務」は「教育指導」、「服薬支援」、「連携」に関して医師、看護師、薬剤師、MSW等々がそれぞれ職種毎の特性・役割を反映する形で遂行されており、それによって患者の理解度・満足度が高くなることを示唆する結果が得られた。結核患者においては合併症を持つ患者が多いことも合わせて、適正な診療報酬上の評価を与える根拠となりうるものと考えられた。

【成果】①調査実施のために院内DOTSの概念を整理した結果、DOTS戦略の改正通知に反映された。②診療報酬評価の資料として活用された。

## 結核病床調査

【目的】医療提供体制再編成、病床基準策定、診療報酬評価の基礎資料とする。

【方法】1. ドイツにおける結核病床の視察を行った。

2. 結核病床、感染症病床、モデル病床を持つ合計20病院の現地調査を実施した。

3. 結核病床、感染症病床を持つ医療機関に対してアンケート調査を実施

【結果】1. ①ドイツで視察した範囲では結核患者に陰圧病室は使われていなかった。②長期入院に相応しい環境に配慮されていた。

2. ①換気システムは多様で、気流への配慮が不適切な設計もあった。保守点検の方法も様々であった。②認知症等の患者管理方法はセンサーの設置、施錠など様々な工夫がされていた。③アメニティは概して不十分。

3. ①アンケート調査の回収率は69%。②ユニット化された病床は2/3程度。③アメニティは不足しており、個室は病床数の2割以下④1人当たり15㎡以上の病室は2割以下。

【考察】換気・メンテナンスが十分行われる必要がある。アメニティの配慮が不足している場合が少なくなかった。施設基準設定には緩和措置、経過措置等現実的な対応が必要と考えられた。

【成果】①施設基準検討の基礎データとして、活用されている。

②伊藤邦彦、他。結核病床の施設整備状況に関する全国アンケート調査。結核2012(印刷中)

## 結核新化学療法剤を含めた治療方法の開発・評価

1. 「調査票(新しい結核治療剤使用)」を全国結核診療施設(269施設)に送付し、調査。リファブチン(RBT)はリファンピシン(RFP)耐性結核の29.4%に有効。リネゾリドは66.7%に有効。

2. リファブチンがリファンピシン耐性菌(MDR-TB菌)の18.6%に感受性。rpoB遺伝子解析よりリドロン516が(Asp→Val)変異でRBT感受性発見。これをライン・ブローアッセイ・ジェノスカラー-Rif TBキットで迅速診断を発見。RFP耐性RBT感受性菌の89%でAsp516Valであり迅速診断できた。(J. Inf. Chem. 2010)

3. モキシフロキサシンのMDR-TBIに対し、著効例。

4. 開発中新薬 ①デラマニド: MDR-TB治療効果。AIDSモデルマウスで結核治療効果。

②カプラザマイシン: XDR-TB治療効果(マウス)。INH+RFP治療法と相乗的結核治療効果。

③INH+新規結核治療剤クエン(HSP65+IL-1 DNA)と治療相乗効果。

5. MDR-TBの外科的治療法(2010)の調査。手術後51例中46例(90.1%)で排菌陰性。外科治療法有効。

新化学療法剤(臨床例)	リファブチン(RBT)	リネゾリド
有効性	MDR-TB患者の29%	MDR-TB患者の67%
感受性迅速診断法	MDR-TB菌(rpoB遺伝子耐性)の19%に感受性。 rpoB遺伝子の516Asp→Val変異で89%感受性。	
特徴	迅速診断法確立	切れ味が良い
副作用	白血球減少	末梢神経障害 骨髄抑制

## 結核菌の感染性・病原性の評価方法の開発

- 臨床分離結核菌の相対的毒力を、*in vitro*での競合アッセイ(発育競合、感染競合、細胞内生存競合)評価した。
    - 感染細胞として、PMA(100nM)/IFN- $\gamma$ で活性化させたTHP-1細胞を用いた。病原体サーベイで全国から収集した結核菌のうち、VNTRクラスターサイズの異なる株(size: 1-6)をH37Rvと競合感染させた(MOI=1)。感染3h後、24h後、72h後、及び120h後に回収し、定量培養した。
    - 非病原性株H37Ra及び集団感染株についても検討した。
  - 図1のように菌数の比率の変化率とクラスターサイズの間には相関が認められた。
  - 集団発生株はこれらの被検株よりもさらに競合性が強かった。
  - 競合感染アッセイにより、毒力を評価できる可能性と病原性サーベイによる解析の有用性が示唆された。
2. Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS)
- 臨床分離株によりMODSの迅速性と精度を評価した(表1)。
  - 迅速な培養・感受性検査法と考えられた。

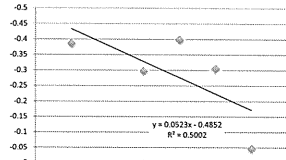


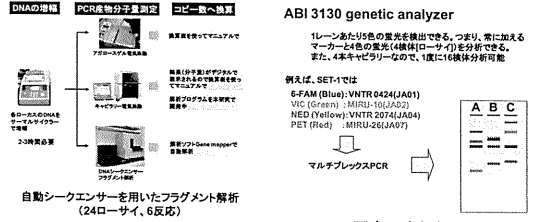
図1 クラスターサイズと菌数比率の変化

表1 検体塗抹陽性度と感受性判定までの日数(TAT)

Strain	1D	1D <sub>2</sub>	1D <sub>3</sub>	1D <sub>4</sub>
3+	6.3	7.3	9.0	12.0
2+	9.6	10.1	15.4	16.2
1+	7.6	9.9	10.8	17.4
±	11.0	14.3	16.3	17.5
-	11.7	12.0	14.4	20.0

45検体(喀痰)中、コントロール陰性5検体(11.1%)、汚染4検体(8.9%)  
INHのL法との一致率: 94.9%、RFPの一致率: 97.4%

## 結核菌のVNTR標準分析法の確立と自動化を目指した分析システムの構築

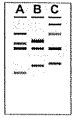


ABI 3130 genetic analyzer

1レーンあたり55色の蛍光を検出できる。つまり、常に加えるマーカー4色の蛍光(4検体(ローイ))を分析できる。また、4本キャピラリーなので、1度に16検体分析可能

例えば、SET-1では  
6-FAM (Blue): VNTR 042(JA01)  
VIC (Green): MIRU-10(JA02)  
NED (Yellow): VNTR 207(JA04)  
PET (Red): MIRU-26(JA07)

マルチプレックスPCR



自動シーケンサーを用いたフラグメント解析  
(24ローサイ、6反応)

### 研究のまとめ

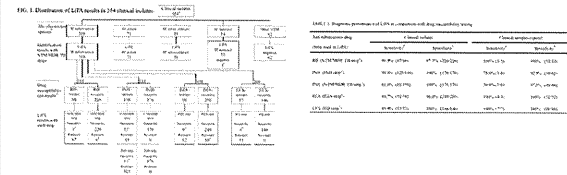
- DNA自動シーケンサーを使ったJATA(16), Supply(15)、北京型株の高頻度変位部位(HV)のVNTR分析システム(24箇所、6反応)を確立
- キャピラリー電気泳動装置を使った各ローカスでDNAサイズからコピー数へ換算するプログラムを開発
- アガロースゲル電気泳動を使った2ローサイのマルチプレックスPCR分析システムを作成



JATA(16)  
Supply(15)  
HV(4)

## Line Probe Assay(LiPA)の臨床評価試験

6施設、計554の臨床検体を用いて、これまでに開発したLiPAの臨床評価試験を実施した。本法では、INH、RFP、PZA、FQs耐性結核及び抗酸菌種を同定できる。評価試験によって特異性・感度ともに優れていることが証明された(Mitarai S. et al., *J Clin Microbiol*, 2011, in press)。キット化及び全自動化を目指している。



## fabG1変異によるINH耐性化の解明

INH耐性臨床分離株の約20%がfabG1<sup>909a</sup>サイレント変異を有していることを見出した。

標準株H37Rvにおける当該変異の再構築によって、*inhA*の発現量増大とINH(0.2)耐性化を確認した。当該変異によって新たなプロモーターが構築されていると予想しており、現在、転写開始点の同定を試みている。



## 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：動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明

-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査

課題番号：H21-新興-若手-014予定期間：H21 年度から H23 年度まで研究代表者：大屋 賢司所属研究機関：岐阜大学所属部局：応用生物科学部職名：准教授

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 9,000,000 円 2 年目 8,100,000 円 3 年目 7,128,000 円 計 24,228,000 円**I. 研究の意義**

本課題では、4 類感染症に指定されているオウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* を始めとした、人獣共通感染症の原因となりうる動物由来クラミジアを対象とする。

(1)クラミジアは偏性細胞内寄生細菌であり、その分離・培養には特殊な技術・設備を必要とする。そのため、検査室レベルで実施可能な検査法の確立が必要である。

(2)感染症法では、性器クラミジア (*Chlamydia trachomatis*) 及び肺炎クラミジア (*C. pneumoniae*) が定点把握の 5 類感染症に指定されている。しかしながら、これらクラミジアとオウム病クラミジアを鑑別可能な検査法は確立されておらず、医療行政上の支障となっている。

(3)動物由来クラミジアに関しては、野生・飼育動物における保有状況の把握が公衆衛生学上重要であるが、不明の点が多いのが現状である。

**II. 研究の目的、期待される成果**

(1)オウム病を始めとした動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法を開発する。

(2)動物由来クラミジアの比較ゲノム解析により、*C. psittaci* 特異的な遺伝子領域を明らかにし、種特異的診断法開発・自然界における存在様式解明のための技術基盤とする。

(3)鳥類を始めとした野生・飼育動物における動物由来クラミジアの実態調査を行う。

上記課題の遂行を通じて、期待される成果は以下の通りである。

(1)性器クラミジア・肺炎クラミジアとオウム病クラミジアの鑑別診断が可能になる。

(2)実態調査の結果の公開（誌上・講演等）により、医師・獣医師等による本疾患の認知度向上に繋がる。

**III. 3 年間の研究成果**

・研究代表者（大屋 賢司）

(1) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法の開発

・ネコクラミジア *C. felis* について、感染抗体を検出する ELISA の系を樹立した。

・*C. psittaci* 多型膜タンパク質 Pmp を抗原とした ELISA の系を樹立した。患者血清を用いて、感度に問題があるものの有効性を確認した。

・ *C. psittaci* を始めとした動物由来クラミジアを検出し、*C. pneumoniae*、*C. trachomatis* と反応しないリアルタイム PCR の系を樹立した。

・ 解読したゲノム情報より同定した遺伝子を標的に、multiplex PCR による各種クラミジア鑑別系、LAMP 法による *C. psittaci* 検出系それぞれを樹立することができた。

#### (2) 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

・ 飼いネコ (714 検体) における *C. felis* の血清疫学調査を行った。陽性率は約 17%であった。

・ 学校飼育鳥、全国の動物病院・動物園からの依頼検体、野生のハト計 487 検体 (各年度 202、152、133) におけるクラミジア保有状況を検査した。陽性率は 4.1%であった。

※ 2003 年に行った調査における陽性率は 14.8%であり、クラミジアの清浄化が進んでいることを示唆した。我々のグループは、ガイドライン策定や自治体への技術指導に関与してきており、クラミジアの清浄化に多少なりとも貢献できているのではと考えている。

・ 流産・結膜炎の常在化している農場のブタよりクラミジアを検出し性状解析を行っている。

・ 研究分担者(福士 秀人)

(1) *C. psittaci* 国内集団発生時分離株 (Mat116 株) の全塩基配列を決定した。

(2) *C. psittaci daruma* 株 (反芻獣クラミジアと近縁)、Borg 株 (強毒株)、近縁他種クラミジア (*C. pecorum*) DNA を次世代シーケンサー解析に供し、コンティグの並びを推定した。現在 gap close を行っている。

(3) 解読したゲノム情報を元に *C. psittaci* アレイを作製した。宿主 (ヒト) アレイとあわせ、感染細胞におけるクラミジア遺伝子発現プロファイル解析を行った。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトームが進行中である。

#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

(1) 開発した遺伝子・血清遺伝子系を用いて、引き続き各種動物におけるクラミジア保有状況、優勢な遺伝子型の調査を行う。

(2) *C. psittaci* 近縁多種株の配列決定を終了し、詳細な比較解析を行う。

(3) 感染細胞内における *C. psittaci* トランスクリプトームの詳細な解析

(4) 今秋より、鳥飼育施設での *C. psittaci* 高陽性 (13/28) 事例、ブタ流産・結膜炎における *C. suis* 検出に遭遇した。これまでの知見を生かし分離株の性状解析、畜主への適切な飼育衛生指導を行う。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

(1) 岐阜県獣医師会 (2009)、臨床獣医師 (2010) からの依頼をうけ、岐阜市近郊の小学校・幼稚園にて飼育されている愛玩鳥のクラミジア検査と飼育衛生の指導を行った。2011 には、厚生労働省および長野県の依頼をうけ、オウム病疑いから休園となった動物園 (長野県飯田市) における検査を行い、問題の沈静化に貢献した。

(2) 研究分担者 (福士) は、人獣共通感染症、家畜伝染病についての依頼講演を積極的に行い、人獣共通感染症、家畜伝染病の認知度向上に貢献している。

(3) これらの活動により、過去に発生したオウム病集団発生事例時 (H13 松江市、H17 神戸市) におけるガイドライン制定、農林水産省病性鑑定指針改定作業 (H19; オウム病、牛クラミジア症、流行性羊流産、コクシエラ症)、動物由来感染症ハンドブック 2010 改訂作業 (厚生労働省) に参画している。研究代表者 (大屋) は平成 22-23 年度の獣医事審議会専門委員 (農林水産省)、日本獣

医学会微生物分科会教育委員会委員（分担者の福士は同委員長）に任命され、獣医師養成、獣医微生物学分野の教育（コアカリキュラム策定・コアカリ準拠教科書編集作業）に貢献している。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

大屋賢司（研究代表者）と福士秀人（研究分担者）

(1)発表論文・著書

- ・ “オウム病クラミジア集団発生事例分離株ゲノム配列決定とその意義” **獣医畜産新報** vol.63: 804-806, 2011. **大屋賢司**, 黒田誠, 関塚剛史, Garry MEYERS, 岸本寿男, 安藤秀二, 奥田秀子, **福士秀人**
- ・ “クラミジア” 獣医微生物学（第3版, 文永堂, 2011）. P.132-137. **福士秀人**, **大屋賢司**
- ・ “Detection of *Chlamydomphila psittaci* by Using SYBR Green Real-Time PCR.” **J. Vet. Med. Sci.** vol.73: 249-254, 2011. Okuda H, **Ohya K**, Shiota Y, Kato H, **Fukushi H**
- ・ “Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydomphila felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats.” **Vet. Microbiol.** vol.146: 366-370, 2010. **Ohya K**, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, **Fukushi H**
- ・ “オウム病” ズーノーシスハンドブック（メディカルサイエンス社, 2009）. P.121-122. **大屋賢司**, 岸本寿男, **福士秀人**.

(2)学会発表（最終年度分のみ）

- ・ “*Chlamydia psittaci* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of chlamydia species”, **Ohya K**, Ibrahim E, Kuroda, M, Sekizuka T, Okuda H, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, **Fukushi H**, 2011 International Union of Microbiological Societies Congress, 2011 Sep. (Sapporo)
- ・ “Rapid Multiplex PCR Assay for simultaneous Detection of *Chlamydomphila* causing abortion in ruminants”, Ibrahim R, **大屋賢司**, 黒田誠, 関塚剛史, 安藤秀二, **福士秀人**, 第152回日本獣医学会, 2011年9月（堺）
- ・ “Complete genome sequence of *Chlamydomphila psittaci* Mat116 strain isolated in Japan”, **Ohya K**, Okuda H, Kuroda M, Sekizuka T, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, **Fukushi H**, The 2011 *Chlamydia* basic research meeting, 2011 Mar. (CA, USA)
- ・ “オウム病クラミジアのゲノム解析:鑑別診断法開発と病態解明を目指して”, **大屋賢司**, **福士秀人**, 平成22年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2011年2月（招待講演）

(3)ガイドライン・マニュアル等

- ・ 動物由来感染症ハンドブック改訂作業（2010年1月厚生労働省より依頼）

福士秀人（研究分担者）

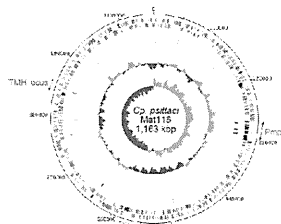
(1)発表論文・著書

- ・ “コクシエラ・クラミディア感染症” 最新医学 vol.66: 2721-2725, 2011. **福士秀人**
- ・ “Epidemiology of *Chlamydomphila caviae*-like *Chlamydia* isolated from urethra and uterine cervix.” **Acta Med. Okayama** vol.64: 1-9, 2010. Murao W, Wada K, Matsumoto A, Fujiwara M, **Fukushi H**, Kishimoto T, Monden K, Kariyama R, Kumon H
- ・ “鳥類のクラミジア感染症”, **福士秀人**, **INK plus**, vol.8: 8-9, 2010

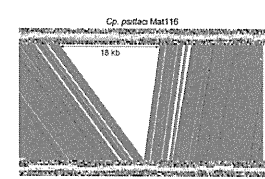
### Ⅶ. Ⅲ(3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

#### C. psittaci 株間の比較ゲノム解析



Mat116株ゲノムの環状マップ

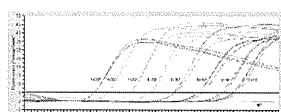
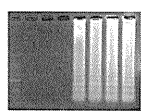


他種クラミジアとの比較解析

- ・ C. psittaci 国内分離株 (Mat116株) 配列決定 (投稿準備中)
- ・ 由来、病原性の異なる他種・株の配列決定 (進行中)

#### ゲノム情報の利用


#### 遺伝子・血清診断法の開発

リアルタイム PCR による診断系開発 C. psittaci 検出 LAMP 法の樹立

- ・ C. felis 感染抗体検出 ELISA の樹立 (2010 発表)
- ・ C. psittaci 検出リアルタイム PCR 系の樹立
- 動物クラミジアを広くに検出可能に (2011 発表)
- ・ C. psittaci Pmp を抗原とした ELISA の樹立 (投稿準備中)
- ・ multiplex PCR による動物クラミジア鑑別系の樹立
- 1 反応での鑑別が可能に
- ・ C. psittaci 検出 LAMP 法の樹立
- より迅速・簡便な検出が可能に

#### C. psittaci 遺伝子発現プロファイル

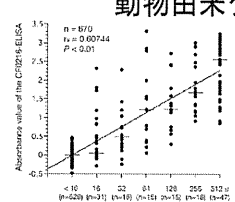
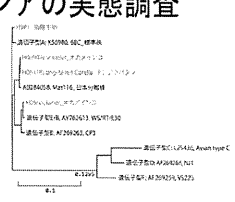


クラミジアアレイを用いた発現プロファイル解析

- ・ クラミジア、ヒトアレイを用いた解析
- ・ 次世代シーケンサーによる解析 (進行中)

#### 樹立した診断法の実践

#### 動物由来クラミジアの実態調査

C. felis 血清疫学調査 検出した株の系統解析

- ・ 飼いネコ (714 検体) における C. felis 疫学調査
- 陽性率は約 17.0% (2010 発表)
- ・ 国内鳥類 (487 検体) における C. psittaci 保有状況
- 陽性率は 4.1% と 2003 年度調査 (14.8% 陽性) より低下
- 清浄化が進んでいる? (投稿準備中) 4
- ・ ブタ流産・結膜炎事例からのクラミジア検出 (進行中)

#### 今後の課題

- ・ 開発した診断法を用いた実態調査の継続
- ・ C. psittaci 近縁多種株の配列決定と詳細な比較解析
- ・ C. psittaci トランスクリプトーム解析
- ・ 新しい発生事例における分離・性状解析

#### 得られた成果の行政施策等への貢献

- ・ 動物クラミジア検査と飼育衛生の指導 (臨床獣医師、飼育施設、飼育農場)
- ・ 講演等を通じた人獣共通感染症、家畜伝染病の認知度向上への貢献
- ・ 病性鑑定指針の改定
- ・ 集団発生事例時のガイドライン制定

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1998～2002：北海道大学大学院獣医学研究科・大学院生（日本学術振興会特別研究員 DC2）  
 2002～2005：東京大学医科学研究所・博士研究員（日本学術振興会特別研究員 PD）  
 2005～現在：岐阜大学応用生物科学部・助教（2005-2009.3）・准教授（2009.4-現在）

### ・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

1998～2002：小沼操 教授、杉本千尋 教授、大橋和彦 教授（北海道大学大学院獣医学研究科）  
 2002～2005：笹川千尋 教授（東京大学医科学研究所）  
 2005～現在：福士秀人 教授（岐阜大学応用生物科学部）、安藤秀二 室長（国立感染症研究所）、黒田誠 センター長（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

### ・主な研究課題

1998～2002：遺伝子導入植物による哺乳動物サイトカインの発現系の開発とその経口投与による生体防御能賦活化  
 2002～2005：赤痢菌の上皮細胞侵入機構に関する研究  
 2005～現在：動物クラミジアの診断法開発と病態発現機序の解明

### ・これまでの研究実績

発表論文・著書（2005年以降の、クラミジアや鳥類の感染症に関するものを中心に抜粋；同期間にはこの他 PubMed 掲載論文 12 報）

- ・“オウム病クラミジア集団発生事例分離株ゲノム配列決定とその意義” 獣医畜産新報 vol.63: 804-806, 2011. 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, Garry MEYERS, 岸本寿男, 安藤秀二, 奥田秀子, 福士秀人
- ・“クラミジア” 獣医微生物学（第3版, 文永堂, 2011）. P.132-137. 福士秀人, 大屋賢司
- ・“Detection of *Chlamydophila psittaci* by Using SYBR Green Real-Time PCR.” Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H, *J. Vet. Med. Sci.* vol.73: 249-254, 2011.
- ・“Molecular Genetic and Pathogenic Characterization of Psittacid Herpesvirus Type 1 Isolated from a Captive Galah (*Eolophus roseicapillus*) in Japan.” Katoh H, Yamada S, Hagino T, Ohya K, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Yamaguchi T, Fukushi H, *J. Vet. Med. Sci.* 73: 1341-1345, 2011.
- ・“Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydophila felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats.”, Ohya K, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, Fukushi H, *Vet. Microbiol.* 146: 366-370, 2010.
- ・“A novel genotype of beak and feather disease virus in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*).”, Ogawa H, Katoh H, Sanada N, Sanada Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H, *Virus Genes*, 41: 231-235, 2010.
- ・“The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model.”, Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira A, Matsumura T, Tsujimura K, Madbouly H, Yamaguchi T, Ohya K, Fukushi H, *Virology*, 400: 259-270, 2010.



- “オウム病”, 大屋賢司, 岸本寿男, 福士秀人, ズーノーシスハンドブック (メディカルサイエンス社), pp.121-122, 2009.
- “A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of Siadenovirus.”, Katoh H, Ohya K, Kubo M, Murata K, Yanai T, Fukushi H, Virus Res., 144: 294-297, 2009.
- “Molecular characterization of avian polyomavirus isolated from psittacine birds based on the whole genome sequence analysis.”, Katoh H, Ohya K, Une Y, Yamaguchi T, Fukushi H, Vet. Microbiol., 138:69-77, 2009.
- “*Chlamydophila felis* CF0218 is a novel TMH-family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection.”, Ohya K, Takahara Y, Kuroda E, Koyasu S, Hagiwara S, Sakamoto M, Hisaka M, Morizane K, Ishiguro S, Yamaguchi T, Fukushi H, Clin. Vaccine Immunol., 15:1606-1615, 2008.
- “Equine herpesvirus type 9 in giraffe with encephalitis.”, Kasem S, Yamada S, Kiupel M, Woodruff M, Ohya K, Fukushi H, Emerg. Infect. Dis., 14:1948-1949, 2008.
- “Molecular phylogeny of equine herpesvirus 1 isolates from onager, zebra and Thomson’s gazelle.”, Ghanem YM, Fukushi H, Ibrahim ESM, Ohya K, Yamaguchi T, Kennedy M, Arch. Virol., 153: 2297-2302, 2008.
- “Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds.”, Katoh H, Ohya K, Fukushi H, J. Virol. Methods, 154:92-98, 2008.
- “新たなオウム病診断用抗原の探索.” 杉浦尚子, 大屋賢司, 山口剛士, 福士秀人, 獣医畜産新報, 61:202-203, 2008.
- “*Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry via the ELMO-Dock180 machinery.”, Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske AJ, Fukui Y, Sasakawa C, Nature Cell Biol., 9:121-128, 2007.
- “A survey of avian polyomavirus (APV) infection in imported and domestic bred psittacine birds in Japan.”, Ogawa H, Chahota R, Hagino T, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H, J. Vet. Med. Sci., 68: 743-745, 2006.
- “Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene.”, Chahota R, Ogawa H, Mitsunashi Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H, Microbiol. Immunol., 50: 663-678, 2006.
- “人および鳥類より分離された *Chlamydophila psittaci* 株の特性.”, Chahota R, 小川寛人, 大屋賢司, 松本明, 山口剛士, 福士秀人, 獣医畜産新報, 59:289-291, 2006.
- “IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells: Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation.”, Ohya K, Handa Y, Ogawa M, Suzuki M, Sasakawa C, J. Biol. Chem., 280:24022-24034, 2005.
- “Ability of orally administered IFN-alpha-containing transgenic potato extracts to inhibit *Listeria monocytogenes* infection.”, Ohya K, Matsumura T, Itchoda N, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C, J. Interferon Cytokine Res., 25:459-466, 2005

受賞等

- ・獣医学奨励賞（日本獣医学会：第33号、平成14年9月）
- ・第134回日本獣医学会 大会長賞（第6号、平成14年9月）

#### 研究課題の実施を通じた政策提言等

- ・獣医事審議会専門委員（農林水産省；平成22-23年）
- ・日本獣医学会微生物分科会教育委員会委員（平成22-23年）
- ・動物由来感染症ハンドブックの改訂作業（厚生労働省；平成22年）
- ・農林水産省病性鑑定指針の改定（平成19年）「オーム病、牛クラミジア症、流行性羊流産、コクシエラ症」

#### ・平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

平成24年度は応募を予定していない。

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明  
—比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査  
(H21-新興-若手-014)

岐阜大学応用生物科学部  
獣医微生物学分野

大屋 賢司

クラミジア感染症		
感染症法 (ヒト)		
オウム病	<i>C. psittaci</i>	4類感染症 (全数把握)
クラミジア肺炎	<i>C. pneumoniae, C. trachomatis</i>	5類感染症 (定点把握)
性器クラミジア感染症	<i>C. trachomatis</i>	5類感染症 (定点把握)
家畜伝染病予防法		
流行性羊流産	<i>C. abortus</i>	届け出伝染病 (日本での報告はないが、 北米・欧州では多発)
指定されていない動物のクラミジア感染症		
ウシ	<i>C. psittaci, C. pecorum, C. abortus</i>	流産・脳脊髄炎・関節炎
ブタ	<i>C. pecorum, C. suis</i>	結膜炎・流産
ネコ	<i>C. felis</i>	結膜炎

動物に病気を起こすクラミジアの多くはヒトへも感染  
(人獣共通感染症)

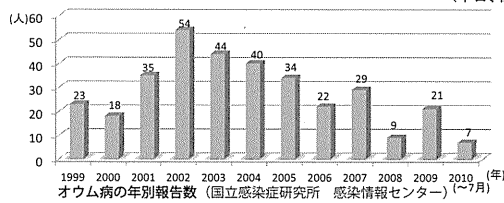
動物における保有状況把握が重要

オウム病クラミジア  
*Chlamydia psittaci*

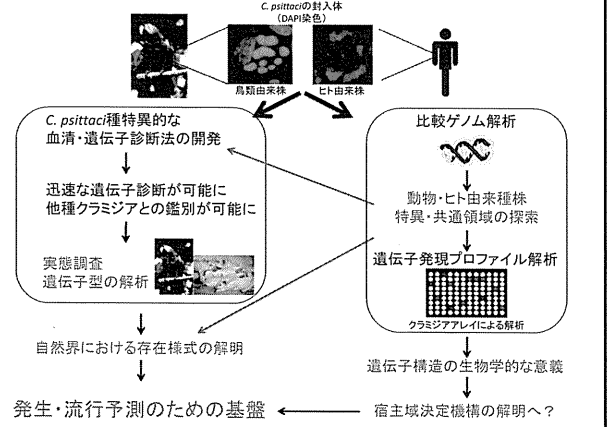
- ・トリからヒトへ伝播する人獣共通感染症の原因
- ・インフルエンザ様の呼吸器症状
- ・4類感染症(全数届出疾患)に指定
- ・5類感染症に指定されている肺炎クラミジア、性器クラミジア(定点把握)とは医療行政上鑑別が必要



H23.11.5新聞紙上より  
(中日、信濃毎日)

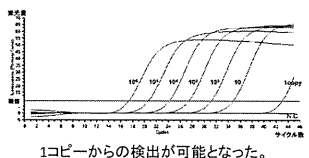


本研究課題の概略



*C. psittaci*遺伝子診断法の開発

～*C. psittaci*外膜蛋白質envB領域を標的としたリアルタイムPCRの系を樹立～



1コピーからの検出が可能となった。

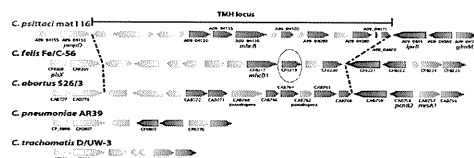
各種クラミジアとの反応性

<i>C. psittaci</i>	+
<i>C. abortus</i>	+
<i>C. felis</i>	+
<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>C. trachomatis</i>	-

従来のnested PCR法より感度・所要時間が向上した系を確立し、実態調査に用いている。

ネコクラミジア*C. felis*血清診断法の確立

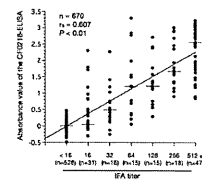
～TMH family CF0218を抗原としたELISAの評価～



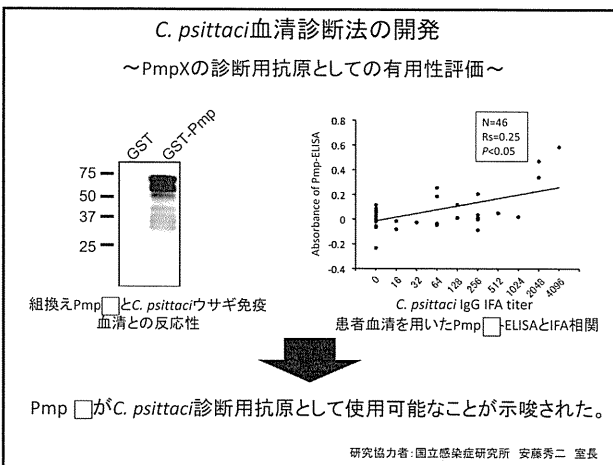
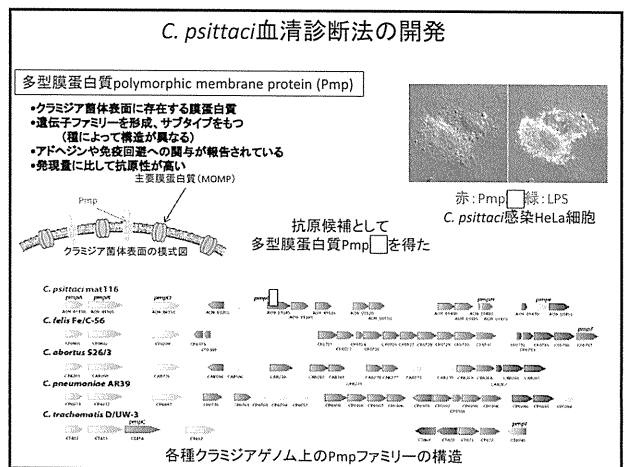
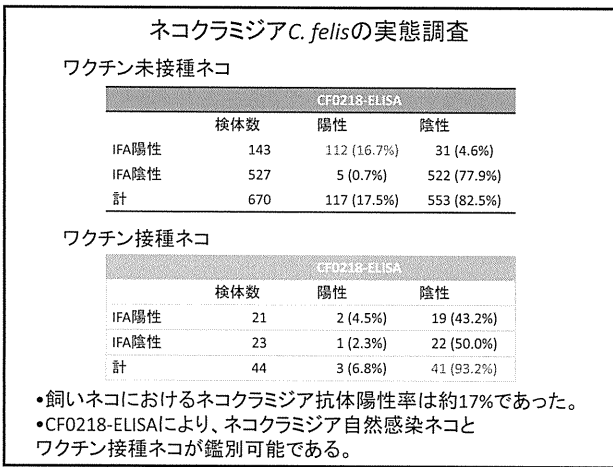
各種クラミジアゲノム上のTMHファミリーの構造



*C. felis*感染血清のIFA像



CF0218-ELISAとIFAは高い相関を示した。



### 鳥類における *C. psittaci* 保有状況調査

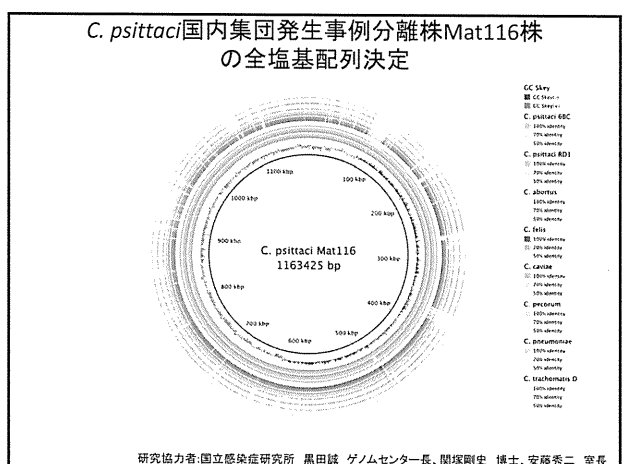
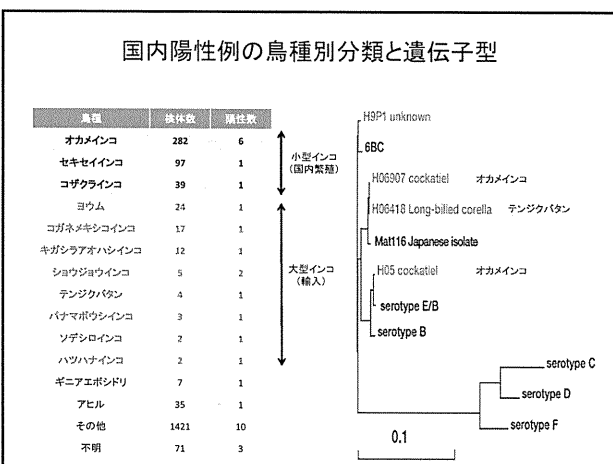
~nested PCRもしくは、新たに開発したリアルタイムPCR法による~

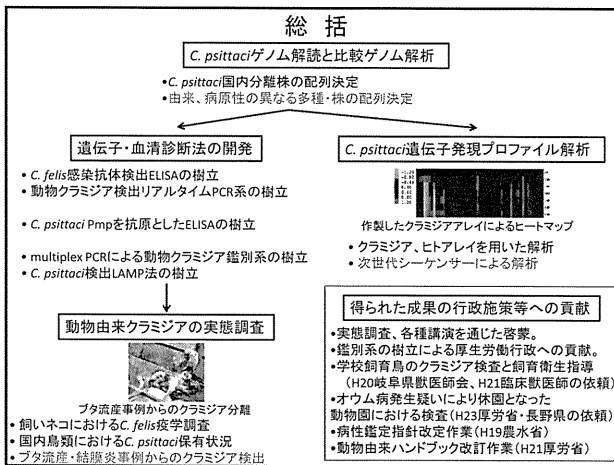
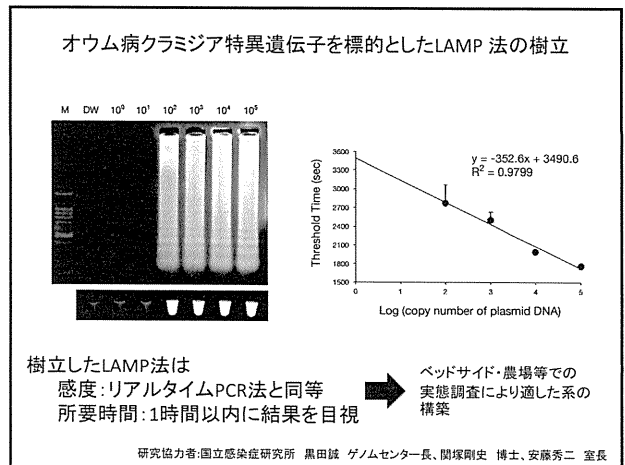
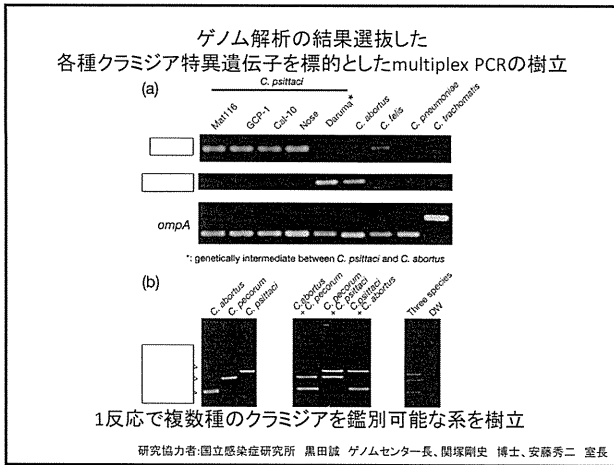
対象: 愛玩鳥販売業者、動物病院、鳥類展示施設、野鳥

年	検査数(羽)	陽性数(羽)	陽性率(%)
2005年	428	10	2.3
2006年	996	16	1.6
2007年	328	7	2.1
2008年	353	2	0.6
2009年	202	8	4.0
2010年	152	6	3.9
2011年	133	14	10.5
合計	2592	63	2.4

鳥類における保有率は2.4%(2003年は14.8%)

販売業者等の認知度向上による清浄化推進?





## 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： コクサッキーA16 型ウイルス特異的受容体の同定と機能解析

課題番号： H22-新興-若手-020

予定期間： H22 年度から H23 年度まで

研究代表者： 西村順裕

所属研究機関： 国立感染症研究所

所属部局： ウイルス第二部

職名： 主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 2,000,000 円 2 年目 1,700,000 円 計 3,700,000 円

## I. 研究の意義

(1) 手足口病は四肢末端・口腔粘膜の水疱性発疹を主症状とし、幼児に流行する。患者からはエンテロウイルス属であるコクサッキーA16 型ウイルス (CVA16)、エンテロウイルス 71 型 (EV71) が頻繁に分離される。

(2) 手足口病の症状は一般に軽いが、EV71 感染者では時として髄膜炎・脳炎・脳症を起こし重症化し、死に至る場合がある。なぜ CVA16 感染は重症化せずに経過するのかは解明されていない。

(3) 申請者は、EV71 と CVA16 が細胞に感染する際に結合する受容体として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を発見した。また、PSGL-1 を受容体としない EV71 (PSGL-1 非結合株) が存在することを明らかにした。さらに、T リンパ球細胞株である Jurkat 細胞には、未知の CVA16 受容体が存在することを明らかにした。

## II. 研究の目的、期待される成果

有効な治療法を確立するためには、感染の分子基盤を解明することが必要である。このため、重症化を起こしやすい EV71 と、重症化を起こさないが遺伝学的に最も近縁な CVA16 の、病原性発現機構を比較解析する。本研究では、CVA16 と EV71 の受容体の違いに着目し、CVA16 が Jurkat 細胞に感染するための受容体の機能解析を目的とする。さらに、CVA16 の研究成果を EV71 研究にフィードバックし、EV71 感染重症化メカニズム解明に役立てる。

## III. 2 年間の研究成果

Jurkat 細胞において、EV71 (PSGL-1 結合株、非結合株) と CVA16 の増殖を検討した (VII. 概要図①②③)。さらに、受容体特異性を決定するウイルスキャプシドアミノ酸を同定した (VII. 概要図④⑤)。

(1) Jurkat 細胞での EV71 (PSGL-1 結合株) の増殖は、硫酸化阻害剤で阻害された。つまり、PSGL-1 の硫酸化が、PSGL-1 と EV71 の結合に重要であることを明らかにした (概要図①)。

(2) Jurkat 細胞での EV71 (PSGL-1 非結合株) の増殖は、硫酸化阻害剤で阻害されなかった。つま

り、EV71 (PSGL-1 非結合株) 未知受容体は、硫酸化を受けない分子であることが明らかとなった (概要図②)。

(3) Jurkat 細胞での CVA16 の増殖は、抗 PSGL-1 抗体では阻害されなかった。しかし、硫酸化阻害剤で阻害された。したがって、CVA16 未知受容体は PSGL-1 以外の硫酸化を受ける分子であることを突き止めた (概要図③)。

(4) ここまでの成果 (学術雑誌 *PLoS Pathogens* に発表) より、CVA16 と EV71 の病原性の違いには、PSGL-1 以外の受容体への特異性 (CVA16 は硫酸化を受ける受容体、EV71 は硫酸化を受けない受容体を使うこと) が関与する可能性が考えられた。

(5) CVA16 のキャプシド蛋白質の、僅か1つのアミノ酸により、受容体特異性が規定されていることを明らかにした (概要図④)。このアミノ酸に相当する EV71 キャプシドアミノ酸も、受容体特異性に関与することを明らかにした (概要図⑤)。

(6) 以上のように、本研究により Jurkat 細胞における CVA16 受容体を明らかにした。さらに CVA16 受容体特異性の研究成果を、EV71 研究へフィードバックできた。

#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

(1) CVA16 の受容体特異性および EV71 の受容体特異性が、個体での病原性発現にどのように関与しているかを明らかにする必要がある。

(2) 様々な CVA16 分離株を用い、硫酸化依存性ウイルス増殖に関する知見を収集する。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

(1) リンパ球への CVA16 感染には、硫酸化を受ける分子が関与することが明らかとなった。宿主細胞の硫酸化を制御することにより、CVA16 感染を阻害できる可能性がある。本研究の成果は、CVA16 感染に効果的な抗ウイルス薬の開発に役立つと思われる。

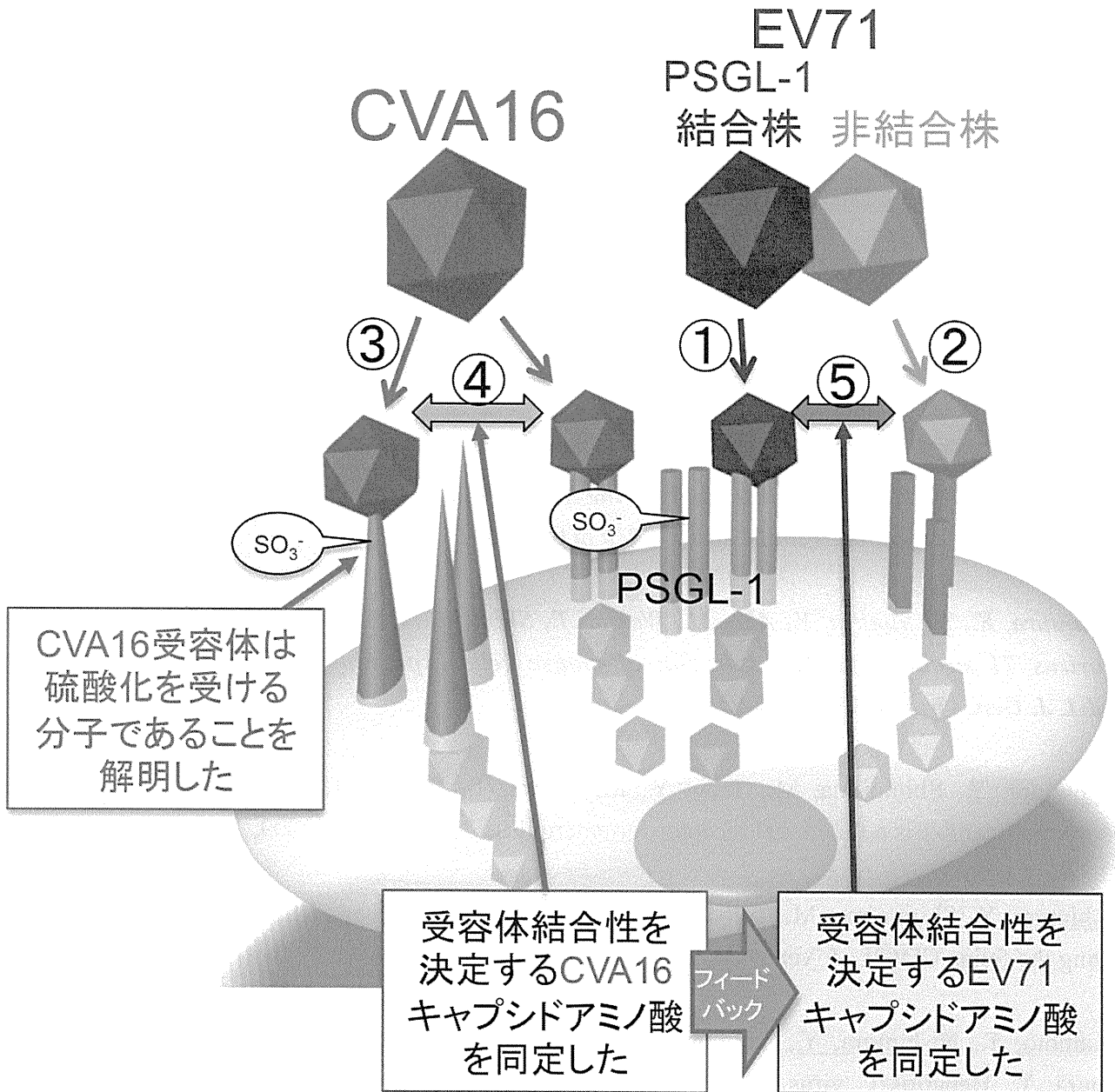
(2) 厚生労働省の検討会において新興・再興感染症対策のための資料となることが期待される。

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

(1) Nishimura, Y., Wakita, T., and Shimizu, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog.* 2010 6(11):e1001174.

(2) Miyamura, K., Nishimura, Y., Abo, M., Wakita, T., and Shimizu, H. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Gen. Virol.* 2011 92(Pt2):287-91.

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

大阪大学微生物病研究所

東京大学大学院農学生命科学研究科

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

国立感染症研究所： ウイルス第二部部長 脇田隆宇

ウイルス第二部第二室室長 清水博之

前所長 宮村達男

大阪大学微生物病研究所： エマージング感染症研究センター教授 松浦善治

東京大学大学院： 農学生命科学研究科 獣医微生物学教室教授 見上彪・高橋英司

### ・主な研究課題

手足口病ウイルスの感染機構に関する研究

### ・これまでの研究実績

1. Nishimura, Y., Wakita, T., Shimizu, H. Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 Is Critical for Enterovirus 71 Infection. *PLoS Pathog.* 2010 6(11):e1001174

2. Miyamura, K., Nishimura, Y., Abo, M., Wakita, T., Shimizu, H. Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Gen. Virol.* 92(Pt2):287-91

3. Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Shimizu, H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* 2009, 15(7)794-7

4. Nishimura, Y., Shimojima, M., Tohya, Y., Akashi, H., and Miyazawa, T., Molecular cloning of a cDNA encoding the feline CD62L. *J. Vet. Med. Sci.*, 2007. 69:81-4.

5. Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y., Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, 2006. 25:5015-25.

6. Nishimura, Y., Shimojima, M., Sato, E., Izumiya, Y., Tohya, Y., Mikami, T., and Miyazawa, T., Downmodulation of CD3ε expression in CD8α<sup>+</sup>β<sup>-</sup> T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Gen. Virol.*, 2004. 85:2585-9.

7. Nishimura, Y., Shimojima, M., Miyazawa, T., Sato, E., Nakamura, K., Izumiya, Y., Ikeda, Y., Mikami, T.,

and Takahashi, E., Molecular cloning of the cDNAs encoding the feline B-lymphocyte activation antigen B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) homologues which interact with human CTLA4-Ig. *Eur. J. Immunogenet.*, 2000. 27:427-30.

8. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Sato, E., Mikami, T., and Takahashi, E., Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the feline FcγRIIIA (CD16) homologue. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2000. 73:353-9.

9. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Sato, E., Mikami, T., and Takahashi, E., Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the feline cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) homologue. *Eur. J. Immunogenet.*, 2000. 27:99-101.

10. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Sato, E., Mikami, T., and Takahashi, E., Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the feline T-cell activation antigen CD26 homologue. *Immunogenetics*, 1999. 50:366-8.

11. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Sato, E., Mikami, T., and Takahashi, E., Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding the feline T-cell antigen CD28 homologue. *Immunogenetics*, 1999. 50:369-70.

12. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Cai, J.-S., Sato, E., Kohmoto, M., Mikami, T., and Takahashi, E., Characterization of feline CD56 molecule expressed on insect cells by the baculovirus expression system. *J. Vet. Med. Sci.*, 1999. 61:701-3.

13. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Cai, J.-S., Sato, E., Kohmoto, M., and Mikami, T., Molecular cloning and sequencing of feline CD56 (N-CAM). *Eur. J. Immunogenet.*, 1999. 26:29-32.

14. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Cai, J.-S., Sato, E., Kohmoto, M., and Mikami, T., Molecular cloning and sequencing of feline stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  and  $\beta$ . *Eur. J. Immunogenet.*, 1998. 25:303-5.

15. Nishimura, Y., Miyazawa, T., Ikeda, Y., Izumiya, Y., Nakamura, K., Cai, J.-S., Sato, E., Kohmoto, M., and Mikami, T., Molecular cloning and expression of feline CD3 $\epsilon$ . *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998. 65:43-50

#### ・受賞歴

平成 23 年度日本ウイルス学会杉浦奨励賞「エンテロウイルス 71 の感染機構に関する研究」

- ・ 平成24年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況  
なし

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 H22-新興-若手-020  
2年計画の2年目(事後) 研究発表会  
平成24年1月30日

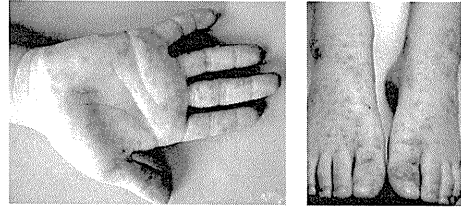
# コクサッキーA16型ウイルス 特異的受容体の同定と 機能解析

研究代表者 西村 順裕

国立感染症研究所 ウイルス第二部

1/11

# 手足口病



コクサッキーA16型ウイルス (CVA16)  
エンテロウイルス71型 (EV71)  
EV71感染→まれにポリオ様麻痺

写真:上島 亮 先生 2/11

# 本研究の特色

ポリオ様  
麻痺

EV71

CVA16

CVA16に  
敢えて  
着目



EV71研究にフィードバック 3/11

# 特色・目的

## CVA16に敢えて着目

1. CVA16未知受容体の同定
2. CVA16感染機構の解明
3. CVA16研究成果を、EV71研究にフィードバック→EV71の病態解明へ

4/11

# 本研究の成果

1. CVA16未知受容体→硫酸化を受ける分子  
(Nishimura et al., PLoS Pathog., 2010)
2. CVA16受容体特異性を規定する、  
CVA16キャプシドアミノ酸の同定  
EV71研究へ  
フィードバック
3. 相当するEV71キャプシドアミノ酸も、  
EV71受容体特異性を規定することを解明

5/11

# CVA16とEV71の受容体

PSGL-1

PSGL-1, SCARB2以外の  
CVA16未知受容体が存在



SCARB2



Nishimura et al. Nat. Med. 2009

Yamayoshi et al. Nat. Med. 2009

6/11