

- Frank J. Gonzalez, Kazuhito Tomizawa, Takaaki Akaike, Tatsuya Yoshizawa, and Kazuya Yamagata. Anks4b, a novel target of HNF4 α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 287: 23236-23245, 2012.
- 12) Takatsugu Goto, Yoshitoshi Ogura, Hideki Hirakawa, Junko Tomida, Yuji Morita, Takaaki Akaike, Tetsuya Hayashi, and Yoshiaki Kawamura. Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J Bacteriol*. 194: 3744-3745, 2012.
- 13) Yu Ishima, Hitomi Hoshino, Takuya Shinagawa, Kaori Watanabe, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Ulrich Kragh-hansen, Toshiya Kai, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. 101: 3222-3229, 2012.
- 14) 藤井重元、赤池孝章. 硫化水素と炎症. 感染・炎症・免疫 42: 235-237, 2012.
- 15) 赤池孝章. 概論：活性酸素によるレドックス制御の新たなパラダイム転換に迫る. 実験医学増刊：活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患（山本雅之監修，赤池孝章，一條秀憲，森泰生編集）30: 2690-2696, 2012.
- 16) 澤智裕、赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. 実験医学増刊：活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患（山本雅之監修，赤池孝章，一條秀憲，森泰生編集）30: 2740-2745, 2012.
- 17) 藤井重元、赤池孝章. NO シグナリング NO signaling. イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典（山本雅，仙波憲太郎，山梨裕司 編）. 羊土社，p.67-69, 2012.
- 18) Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Koji Enomoto, Naomi Sakashita, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Hisao Ogawa, Hiroshige Yamabe, and Takaaki Akaike. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. *Microbiol Immunol*. 56:145-154, 2012.
- 19) Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Shingo Kasamatsu, Jun Yoshitake, Rahaman Md Mizanur, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem J*. 441: 719-30, 2012.
- 20) Yu Ishima, Fumika Yoshida, Ulrich Kragh-Hansen, Kaori Watanabe, Naohisa Katayama, Keisuke Nakajou, Takaaki Akaike, Toshiya Kai, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res*. 45: 1196-1206, 2011.
- 21) Eiko Yoshida, Takashi Toyama, Yasuhiro Shinkai, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Yoshito Kumagai. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol*. 24: 1633-5, 2011.
- 22) Yoshiko Tokutomi, Keiichiro Kataoka, Eiichiro Yamamoto, Taishi Nakamura, Ma-saya Fukuda, Hisato Nako, Kensuke Toyama, Yi-Fei Dong, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Shohei Kim-Mitsuyama. Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice. *Br J Pharmacol*. 162: 1884-93, 2011.
- 23) Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, and Takaaki Akaike. Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile. *Curr Top Med Chem*. 11: 1854-60, 2011.
- 24) Hiroaki Nomori, Takeshi Mori, Kenichi Iyama, Tatsuya Okamoto and Mitsuhiro Kamakura. Risk of bronchioloalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 17: 19-23, 2011.
- 25) Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Koichi Shudo, and Hiroshi Katsuki. Mid-brain dopaminergic neurons utilize nitric oxide/cyclic GMP signaling to

- recruit ERK that links retinoic acid receptor stimulation to up-regulation of BDNF. *J Neurochem.* 116: 323-333, 2011.
- 26) Hideshi Ihara, Tomohiro Sawa, Yusaku Nakabeppu, and Takaaki Akaike. Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *J Clin Biochem Nutr.* 48: 1-7, 2011.
- 27) Hideshi Ihara, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomoaki Ida, Shingo Kasamatsu, Kouhei Kunieda, Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. *Nitric Oxide.* 25: 169-175, 2011.
- 28) Takaaki Akaike, Albert van der Vliet, and Philip Eaton. Frontiers in nitric oxide and redox signaling. *Nitric Oxide.* 25: 57-58, 2011.
- 29) Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. *Amino Acids.* 41: 123-130, 2011.
- 30) 澤智裕、小野勝彦、赤池孝章. 活性酸素・一酸化窒素によるニトロ化シグナルと抗炎症作用. *感染・炎症・免疫.* 41: 12-19, 2011.
- 31) 岡本竜哉、居原秀、赤池孝章. 喫煙と酸化ストレス: Oxidative stress induced by cigarette smoking. *最新精神医学.* 特集号「精神障害者と喫煙」16: 431-439, 2011.
- 32) 今吉理恵子、岡本竜哉、永尾潤一、長環、松永勝政、赤池孝章、上西秀則. 植物精油 citral のインフルエンザウイルス感染能抑制効果について: Experimental study of a citral on the preventive effect of influenza virus infection. *医学と生物学.* 155: 489-494, 2011.
- 33) Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Kit I. Tong, Tomoaki Ida, Tatsuya Okamoto, Ahmed Khandaker Ahtesham, Yu Ishima, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, and Takaaki Akaike. The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. *J Biol Chem.* 285: 23970-23984, 2010.
- 34) Takaaki Akaike, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, and Hideshi Ihara. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide.* 23: 166-174, 2010.
- 35) Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide. *J Clin Biochem Nutr.* 46: 14-19, 2010.
- 36) Tomohiro Sawa, Hiorokazu Arimoto, and Takaaki Akaike. Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles. *Bioconjug Chem.* 21: 1121-1129, 2010.
- 37) Yu Ishima, Shuichi Hiroyama, Ulrich Kragh-Hansen, Toru Maruyama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Toshiya Kai, and Masaki Otagiri. One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide.* 23: 121-127, 2010.
- 38) 藤井重元、澤智裕、赤池孝章. 8-Nitro-cGMP の発見と生理機能の解明. *化学と生物.* 48: 22-27, 2010.
- 39) 澤智裕、赤池孝章. 毒性説から脱した活性酸素研究-シグナル分子としての活躍-. *現代化学.* 469: 34-38, 2010.
- 40) 岡本竜哉、赤池孝章. 呼吸器疾患における酸化ストレスと制御シグナルの分子基盤: Molecular mechanisms of nitric oxide- and reactive oxygen species-mediated signalings in the respiratory diseases. *呼吸.* 29: 859-866, 2010.
- 41) 岡本竜哉、澤智裕、赤池孝章. Nitric oxide (NO) および NO 関連物質. *日本臨床増刊号 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査.* 4. 982: 839-842, 2010.

2. 学会発表

- 1) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Tomohiro Sawa. Nitrated cyclic nucleotide mediates endogenous electrophilic signaling for Ras-dependent senescence and autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. (Sapporo,

- JAPAN), June 26-29, 2012.
- 2) 赤池孝章. 硫化水素によるレドックスシグナル制御：新しいセカンドメッセンジャー 8-SH-cGMP の発見. 第 12 回日本 NO 学会学術集会. 神戸市, 6 月, 2012.
 - 3) Takaaki Akaike, Hideshi Ihara, and Tomohiro Sawa. 8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide. (Edinburgh, UK), July 22-26, 2012.
 - 4) Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide regulation for electrophile-mediated ROS signaling. Second International Conference on H₂S Biology and Medicine. (Atlanta, USA), September 20-22, 2012.
 - 5) 赤池孝章. 感染防御における活性酸素シグナル制御と破綻. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 徳島市, 10 月, 2012.
 - 6) 赤池孝章. レドックスシグナル制御と酸化ストレスバイオマーカー. 第 20 回日本精神科救急学会学術総会. 奈良市, 10 月, 2012.
 - 7) Takaaki Akaike. Persulfide regulation of redox signaling involving unique polysulfur biology. 第 85 回日本生化学会大会. 福岡市, 12 月, 2012.
 - 8) Takaaki Akaike. Electrophilic cellular signaling regulated by H₂S-mediated sulfhydration. 第 11 回日本 NO 学会学術集会. 東京都町田市, 5 月, 2011.
 - 9) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死的 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析 -Detection of protein-bound 3-nitrotyrosin in plasma from pediatric patient with fulminant ARDS and avian influenza virus infection-. 第 11 回日本 NO 学会学術集会. 東京都町田市, 5 月, 2011.
 - 10) 赤池孝章. 活性酸素シグナル伝達と加齢. 第 11 回日本抗加齢医学会総会. 京都市, 5 月, 2011.
 - 11) Takaaki Akaike. Cellular signaling mediated by nitrated cyclic nucleotide and regulated by hydrogen sulfide. 5th International Conference on cGMP. (Halle, Germany), June 24-26, 2011.
 - 12) 赤池孝章. 内因性硫化水素イオンによる親電子シグナル制御. 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会. 留寿都, 7 月, 2011.
 - 13) 赤池孝章. 親電子シグナルと硫化水素. 九州大学生体防御医学研究所共同利用研究集会「活性酸素によるシグナル伝達制御の新展開」. 福岡市, 7 月, 2011.
 - 14) 岡本竜哉, 松永哲郎, Shahzada Khan, 井上博文, 小山耕太, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. オートファジーを介した細胞内殺菌と 8-ニトロ-cGMP による制御：感染症治療への応用をめざして. 第 4 回感染症態研究フロンティア. 吹田市, 8 月, 2011.
 - 15) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死的 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析. 第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会. 門司市, 8 月, 2011.
 - 16) 岡本竜哉, 澤智裕, 藤井重元, 河内正治, 布井博幸, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, 中島典子, 鈴木和男, 赤池孝章. 小児致死的 ARDS 症例および鳥インフルエンザウイルス感染症例の血漿蛋白質中の 3-ニトロチロシンの解析: Detection of protein-bound 3-nitrotyrosin in plasma from pediatric patient with fulminant ARDS and avian influenza virus infection. 第 84 回日本生化学会大会. 京都市, 9 月, 2011.
 - 17) 岡本竜哉, 松永哲郎, Shahzada Khan, 小野勝彦, 小山耕太, 吉武淳, 井上博文, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. サルモネラ感染におけるオートファジーを介した細胞内殺菌と内因性硫化水素イオンによる抑制. 第 17 回 MPO 研究会. 熊本市, 10 月, 2011.
 - 18) 岡本竜哉, 赤池孝章. 硫化水素によるオートファジー制御と感染防御シグナル: Hydrogen sulfide regulation of autophagy-mediated host defense signaling. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎市, 3 月, 2012.
 - 19) Takaaki Akaike. Protein S-guanylation: a

new post-translational regulation for re-dox signaling. The 20th World Congress of the International Society for Heart Research. (Kyoto, Japan), May, 2010.

3. その他：なし

- 20) Tatsuya Okamoto, Tomohiro Sawa, Shi-gemoto Fujii, Mie Tateyama, Shoji Ka-wachi, Thuy Thi Bich Phung, Liem Thanh Nguyen, Kazuo Suzuki, Takaaki Akaike. Detection of protein-bound 3-nitrotyrosine in plasma from pediatric patients with fulminant ARDS and avian influenza infection. 6th International Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of NO 2010. (Kyoto, Japan), June, 2010.
- 21) 岡本竜哉、藤井重元、澤 智裕、赤池孝章。インフルエンザウイルス肺炎・ARDSにおける血漿蛋白質中の3-ニトロチロシンの定量的解析。第47回日本ウイルス学会九州支部総会。宮崎市，9月，2010。
- 22) 澤 智裕、赤池孝章。核酸分子の化学修飾による活性酸素シグナルのケミカルセンシング。第83回日本生化学会大会。神戸市，12月，2010。
- 23) Takaaki Akaike. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine. (Kyoto, Japan), January, 2011.
- 24) Takaaki Akaike. Cellular signaling by nitrated cyclic nucleotides and regulation of its biological effects. Gordon Research Conference on Nitric Oxide: Understanding the Biology and Chemistry of Its Formation, Action, and Signaling. (Ventura, USA), February, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 1) 出願番号：特願 2007-252877
発明の名称：SH基修飾剤
発明者：赤池孝章、有本博一、澤智裕
出願日：平成19年9月28日
- 2) 出願番号：特願 2007-015728
発明の名称：抗8-チオアルコキシグアノシン-3',5'-サイクリック1リン酸抗体
発明者：赤池孝章、澤智裕
出願日：平成19年1月26日

2. 実用新案登録：なし

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの 遺伝子検査系開発と評価

研究分担者 影山 努 国立感染研究所インフルエンザウイルス研症究センター第二室 室長

研究要旨：

現在、多くの国々ではコンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法などの遺伝子検査により H5 亜型の同定が行われている。しかし遺伝子検査は、検体からの核酸精製を必要とし、反応に必要な試薬調製等の操作も非常に煩雑なため、ラボコンタミネーションや検体の取り違えといった偽判定のリスクが少なからずある。病院やクリニックなどの多くの医療施設では、遺伝子検査が行えるクリーンな環境を持っておらず、遺伝子検査など実験室診断に熟練した作業員もいないため、施設内で遺伝子診断を行う事は非常に困難であった。このような施設においては、簡便かつ迅速に H5 亜型を同定できる遺伝子検査系の導入が待たれている。Direct RT-LAMP 法は、検体からの核酸精製を必要とせずに、検体をバッファーに懸濁するだけで、簡便で短時間に RT-LAMP 反応を行う事ができる遺伝子診断系である。本研究では RT-LAMP 法による H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの同定法について、臨床検体を用いて評価検討を行っている。現在はこの方法をベースにして、H5 亜型だけでなく季節性インフルエンザウイルスの型・亜型(A 型、B 型、H1pdm 亜型、H3 亜型)も一度に同時に簡便かつ迅速に同定できるマルチプレックス型のマイクロ流路チップを用いたコンタミネーションフリーな遺伝子検出キットの構築を進めている。本方法はインフルエンザ診断のみならず、他の呼吸器感染症ウイルスの同定などにも応用可能であるため、病原体サーベイランスにも活用できるなど、特に臨床現場においてはあらゆる感染症予防や治療・診断などの感染症対策に大きく貢献できるものと期待される。

A. 研究目的

H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1-HPAI)は、2003 年以降、東南アジア地域から中国、ロシア、中東、アフリカ、ヨーロッパ諸国へと流行が広がり、現在でもわが国も含めて、野鳥および家禽を中心とした流行が続いている。このウイルスに感染した鳥との濃厚接触により、ヒ

トへの感染例も多数報告され、2003 年以降 2013 年 2 月までに 15 カ国 615 人の感染者および 364 人の死者が確認されている。この H5N1-HPAI はブタなどのほ乳類にも感染するため、例えば、ヒト・鳥・ブタインフルエンザウイルスが同時に感染した場合にはこれらのウイルス同士の遺伝子交雑により、新たなインフルエンザウイルスが出

現し、パンデミックとなる可能性がある。また、同時感染ではなくても、継続的に家禽で流行すれば、鳥からヒトへの感染機会が増え、突然変異などによりヒトからヒトへ感染しやすくなった新たなインフルエンザウイルスが出現する可能性もある。特に、H5N1-HPAI を由来とする病原性の強いウイルスの出現が危惧されている。

このようなウイルスの出現をモニターする、あるいはこのようなウイルスが出現してヒトの間で流行するようになった際に、迅速に診断できる検査系をあらかじめ構築しておく事は重要である。

現在、多くの国々ではコンベンショナル RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検査により H5 亜型の同定が行われている。しかし遺伝子検査においては、検体からの核酸精製を必要とし、反応に必要な試薬調製等の操作も非常に煩雑なため、ラボコンタミネーションや検体の取り違えといった偽判定の可能性が少なからずある。こうした検査を行うためには、熟練した技術を持った検査員による実験室診断が必要であり、一般的な病院やクリニックなど、遺伝子検査を行える実験室を持たない施設では、遺伝子検査系の導入は難しかった。

本研究では核酸精製作業が不要で、従来の遺伝子検査法に比べて、操作性がより簡便に短時間で結果が得られる Direct Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification 法 (Direct RT-LAMP 法)を用いた、H5 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの鑑別が可能な遺伝子検査系を構築し、臨床検体を用いてその検査系の評価を行い、本研究により新たに構築した遺伝子検査系が、インフルエンザのみならず他の様々な

感染症診断にも応用可能かどうか検討する事が目的である。

B. 研究方法

栄研化学株式会社が製造販売している H5 亜型インフルエンザウイルス検出試薬キットの Clade 1、2.1、2.2、2.3 に対する反応性は、これまでに我々が構築したリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 亜型 HA 遺伝子検出法 (検出感度は 7.5 コピー/反応) と比較するとほぼ同等から 1/100 程度の検出感度である。このキットを用いて、乾燥した増幅試薬が反応チューブの蓋に固定されている RT-LAMP 試薬および Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を組み合わせた Direct RT-LAMP 法を用いて、ベトナム国立衛生疫学研究所の Dr.Le Quynh Mai らの協力を得て、2008 年から 2010 年の間にベトナム北部の H5N1-HPAI への感染が確認された患者から採取した 13 検体の鼻腔ぬぐい液(2ml のウイルス輸送培地に懸濁して保管され、コンベンショナル RT-PCR 法により全て H5 亜型が同定された)を用いて臨床的評価を行った。

さらに Clade 1、2.1、2.2、2.3 に対してどの Clade にも反応するように、RT-LAMP 用のプライマーを再設計し、蛍光インターカラー剤を用いてさらに高感度に検出するように改良した RT-LAMP 検査系の構築を行い、ベトナム国立衛生疫学研究所(ハノイ)およびホーチミンパスツール研究所にて、ベトナム国で流行した H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに罹患した患者検体に対する臨床的評価を 2013 年 3 月に行う予定である。

C. 研究結果

1ml の Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬に 20 μ l のウイルス輸送培地に懸濁された鼻腔ぬぐい液を添加して攪拌し、その混合液から 10 μ l を分取し、15 μ l の Type A 用あるいは H5 HA 用のプライマー液と混合して RT-LAMP 反応を行った。その結果、13 検体中 9 検体から H5 HA が検出され、また H5 HA 陽性となった 9 検体中 7 検体で Type A が検出された。H5 HA および Type A が検出されなかった 4 検体については QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルス輸送培地に懸濁された鼻腔ぬぐい液より RNA を精製抽出し、これをテンプレートに用いて H5 HA および Type A の RT-LAMP 法を行うと、4 検体中 3 検体から Type A および H5 HA が検出された。また、Direct RT-LAMP 法により H5 HA 陽性、Type A 陰性となった 2 検体についても、同様に鼻腔ぬぐい液より抽出した精製 RNA をテンプレート用いて Type A の Direct RT-LAMP 法を行うと、2 検体とも Type A 陽性となった。同時に、イムノクロマト法による迅速診断キット(エスプライン：富士レビオ)を用いて、同じ 13 検体のウイルス輸送培地に懸濁された鼻腔ぬぐい液に対して、A 型陽性となるかどうか試みたが、弱陽性を含め陽性判定となったのは 4 検体のみであった。

研究所ではウイルス分離や RT-PCR 等の遺伝子検査が主体となるため、患者より採取した鼻腔拭い液などの臨床検体は、通常はウイルス輸送培地に懸濁されて病院等から研究所に輸送される。これらの検査では Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を用いてウイルス輸送培地で希釈され

た鼻腔ぬぐい液を用いて RT-LAMP を行う事になったため、検体採取時より低濃度のウイルス量で検査を行う事になり、本来鼻腔拭い液を直接検体として使う場合よりも検出効率が悪くなった事が考えられた。そこでこのウイルス輸送培地で希釈された鼻腔ぬぐい液をなるべく多く反応に持ち込めるように、試薬組成を変更した前処理液を使用して、またより高感度に検出できるように蛍光インターカレーター剤を利用した改良型 RT-LAMP 法を構築し、今後、臨床検体を用いてこれら検出系の検証を行う予定である。

D. 考案

現在、家禽および野鳥で流行している H5N1-HPAI は、赤血球凝集素 (HA) の遺伝的系統から Clade 0 から 10 のグループに分類されており、ヒトへの感染例のほとんどは Clade 1(2004 年以降、主にベトナムで流行した株) または Clade 2 に分類されたウイルスにより起きている。2006 年以降、Clade 2 はさらに 3 つの sub-clade に細分されており Clade 2.1 は、主にインドネシアで 2005 年以降に流行している株、Clade 2.2 は中国青海湖、中東、アフリカ、ヨーロッパ等の地域で流行している株、Clade 2.3 は中国南部や東南アジアで流行している株が含まれる。さらに Clade 2.1 は Clade 2.1.1-2.1.3、Clade 2.3 は 2.3.1-2.3.4 に細分され(現在は、例えば Clade 2.1.3 は 2.1.3.1-2.1.3.3 のようにさらに細分されている)、H5N1-HPAI の遺伝的な多様性が広がっている。H5N1-HPAI の診断には、こうした遺伝的な違いに関係なく、全ての H5N1-HPAI 流行株を高感度かつ特異的に検出できる検査系で

なければならない。

Direct-RT-LAMP の評価に用いた臨床検体から検出された H5 HA は全て Clade 2.3 に分類される。これら検体に対する各診断法による検出率は、コンベンショナル RT-PCR 法(RNA 精製が必要)で Type A および H5 HA のどちらも 13/13(100%)、RT-LAMP 法 (RNA 精製を行った場合)で Type A および H5 HA のどちらも 12/13(92.3%)、Direct RT-LAMP 法 (RNA 精製を行わずに、Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を使用した場合)は Type A で 7/13(53.8%)、H5 HA で 9/13(69.2%)、迅速診断キット(エスプライン)で A 型陽性となったのは 4/13(30.8%)であった。ウイルス輸送培地で希釈された鼻腔ぬぐい液の場合、Type A の検出率は RT-PCR が最も高いが、RNA 抽出を行った場合は、Direct RT-LAMP 法とほぼ同じ検出率となった。また、迅速診断キットより Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を使用した Direct RT-LAMP 法の方が Type A の検出率は高かった。Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬を使用した Direct RT-LAMP 法より RNA 精製後に RT-LAMP 法を行う方が検出率は高くなるが、これは RNA 精製により、RT-LAMP 反応を阻害する検体由来の夾雑物が取り除かれたためと、ウイルス核酸が少し濃縮されたためと考えられる。

また、今回用いた臨床検体は、鼻腔を拭ったスワブが 2ml のウイルス輸送培地に懸濁されており、鼻腔拭い液など患者より直接採取したスワブを Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬に懸濁するよりもウイルス濃度が希釈された状態で検査を行っているため、検出感度は鼻腔拭い液など

患者より直接採取したスワブを利用した場合よりも低くなる事が予想される。従って実際の臨床現場では、鼻腔などを拭ったスワブを直接 Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬に懸濁して Direct RT-LAMP 法を行う事により、より高感度に Type A および H5 HA を検出する事が可能になると考えられる。

本方法により、RT-LAMP 法でも高頻度に H5 亜型の同定ができる事が明らかになった。本方法を用いれば核酸精製を行う事ができない施設においても、H5 亜型の同定が可能となるため、病院やクリニックでの診断も可能と考えられる。ただしこのような施設で診断を行う場合は、遺伝子増幅産物や検体間のコンタミネーションには十分に留意する必要がある。

今回検討した Clade 2.3 に対しては、他の Clade に比べて反応性が少し低いため、より高感度に検出するためのプライマー類の追加および変更等さらなる改良および検討も必要である。また、ウイルス輸送培地に希釈した鼻腔拭い液だけではなく、鼻腔拭い液などの患者より直接採取したスワブ等を利用してより詳細に検討を行う事も必要である。

今後改良する RT-LAMP 法では、どの Clade にも反応するように、RT-LAMP 用のプライマー配列の見直しを行うため、ベトナムでの流行の主体である Clade 2.3.2 についても反応性が良くなる事が期待される。また、新たな前処理液を開発するなどして、抽出過程におけるウイルス濃度の希釈度合いを下げ、蛍光インターカラー剤等を利用してより高感度な RT-LAMP 法を構築する事で、臨床現場でもより高感度な遺伝

子診断が行えるようになる事が期待される。

E. 結論

通常、患者検体としてスワブを用いた鼻腔拭い液、咽頭拭い液の採取もしくは鼻腔吸引液等を採取し、インフルエンザ診断に利用する。日本においては地方衛生研究所あるいは国立感染症研究所に輸送して、ウイルス分離や RT-PCR 検査を行わなければならないため、通常は病院等で採取した検体はウイルス輸送培地等に懸濁される。ベトナムでも同様に、ウイルス分離や RT-PCR 検査を研究所で行うため、病院で採取した検体はウイルス輸送培地に懸濁されている。このような検体を用いて遺伝子検査を行う場合は、検出感度を上げるために検査に持ち込む検体量をなるべく多くする必要がある。リアルタイム RT-PCR 法など従来の遺伝子診断法では、検体由来の夾雑物による反応阻害の影響をなくすために、検体からの核酸抽出を前処理に行う必要があるが、RT-LAMP 法は RT-PCR 法に比べこれら反応阻害に対して寛容なため、検体を希釈して反応阻害の影響を少なくすれば、核酸精製を行わなくても十分な感度で遺伝子検査を行う事が可能である。ウイルス輸送培地に懸濁された検体は、既に検体由来の夾雑物の濃度が薄まっているため、反応阻害に対する影響は大元の検体と比べて少ないと考えられる。このため、ウイルス輸送培地に懸濁された検体は Loopamp®インフルエンザウイルス用抽出試薬(4mL の抽出液に対し検体を $\sim 100\mu\text{L}$ 程添加して抽出を行う)を用いなくても、そのままあるいは抽出液を工夫すれば極少量(検体量の 1/2 以下がふさわしい)の使用で RT-LAMP 反応を行う事

ができるようになると考えられる。抽出時における検体の希釈割合を少なくする事で、RT-LAMP 法による高感度なインフルエンザ診断が行える事が期待される。

一方、Direct RT-LAMP 法は、従来の RT-PCR 法などの遺伝子検査に比べると、操作性や迅速性に優れてはいるが、ピペットターを用いた分注作業があるため、操作ミスによる陽性コントロール混入やサンプル同士混入などのコンタミネーションのリスクが高く、遺伝子診断を行うクリーンな環境が整っていない病院やクリニックなどの臨床現場でこの検査をルーチンに行うにはまだ問題がある。

臨床現場においてイムノクロマト法による迅速診断キット並に簡便に遺伝子検査を行うためには、コンタミネーションフリーな遺伝子検査系の開発が必須と考えられる。

現在、このような欠点を補うべく、マルチプレックス型マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 遺伝子診断キットの開発を行っている。このキットは、検体採取後、抽出液に検体を懸濁し、この懸濁液を反応試薬入りのマイクロ流路チップに自動注入(ピペットター操作も不要で検体懸濁液の入ったチューブをチップに差し込むだけ)して、等温維持(63°C)できる蛍光検出装置に入れるだけで、Direct RT-LAMP 法を利用した遺伝子検査を行う事ができる。ピペットターなどを用いた分注操作が一切ないため、遺伝子検査で絶対に排除しなければならないコンタミネーションの心配が全くない。どんな診断検査でも RT-LAMP 法による診断系が構築できていれば、将来マイクロ流路チップ利用によるコンタミネーションフリーな遺伝子検査が簡単に行う事が

できるようになる。今後は本研究結果を踏まえて、一度にインフルエンザウイルスのA型、B型、H1pdm亜型、H3亜型、H5亜型のタイピングが可能な検査キットの構築を行い、日本のみならずベトナムなどのH5N1-HPAI発生国の臨床現場あるいは研究所において、本キットの有用性を評価する予定である。本診断系は臨床現場においてインフルエンザの診断のみならず、他の呼吸器感染症ウイルスの同定などにも応用でき、不顕性感染の有無について詳細に調査する、臨床現場において様々な病原体サーベイランスに活用するなど、あらゆる感染症に対して感染予防や診断・治療等に役立つ事ができ、感染症対策にも寄与する事が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa, Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihira, Masato Tashiro, and Tsutomu Kageyama. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*, 83(1):10-15, 2011
- 2) Mina Nakauchi, Makoto Ujike, Masatsugu Obuchi, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Miho Ejima, Kunihiro Oba, Nami Konomi, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama, the

influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology* 83(7):1121-7.2011

- 3) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, Yasuko Tsunetsugu-Yokota. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 65(1):19-27, 2012.
- 4) Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods* 188(1-2):73-75, 2013.
- 5) Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru

Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito. Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam. Archives of Virology. (in press)

2. 学会発表

【国際会議】

- 1) Tsutomu Kageyama, Mina Nakauchi, Tetsushi Yoshikawa, Hidetaka Nakai, Ken Sugata, Akiko Yoshikawa, Yoshizo Asano, Masaru Ihirac, Masato Tashiro, Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong, 2010, September
- 2) Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
- 3) kuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza

A/H1N1pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, Rio de Janeiro, November, 2011

- 4) Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

【国内会議】

- 1) 森安義、仙波晶平、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山 努、中内美名: 遺伝子迅速診断としての LAMP 法. 第 51 回日本臨床ウイルス学会、2010 年 6 月
- 2) 仙波晶平、森安義、富田憲弘、神田秀俊、納富継宣、影山 努、中内美名.:LAMP 法を用いたインフルエンザウイルスの簡易迅速遺伝子検査法. 第 17 回日本遺伝子診療学会大会、2010 年 8 月
- 3) 影山 努、中内美名、田代真人、吉川哲史、中井英剛、菅田健、吉川明子、浅野喜造、井平勝: Direct RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルス A/H1N1pdm 検出法の開発. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月

- 4) 影山 努. インフルエンザ診断検査の技術的課題と精度管理について. 衛生微生物技術協議会総会第 33 回研究会. 2012 年 6 月
- 5) 大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断の臨床的検討. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012 年 10 月
- 6) 田中智子、大場邦弘、小田智三、高山郁代、中内美名、影山 努. 中枢神経症状を呈した A/H3 亜型、B 型インフルエンザウイルス重複感染の 2 例. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 東京. 2012 年 10 月
- 7) 高山郁代、中内美名、大場邦弘、田代真人、影山 努. 蛍光標識プライマーを用いた Direct RT-LAMP 法による季節性インフルエンザウイルスの型・亜型検出系の構築. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
- 8) 影山 努、高山郁代、中内美名、田代真人、大場邦弘. マイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法によるインフルエンザ診断法の開発. 第 59 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪. 2012 年 11 月
3. その他
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y.	Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles.	Journal of Physics: Conference Series	--	in press	2013
Nobuhiro Takemae, Tung Nguyen, Long Thanh Ngo, Yasuaki Hiromoto, Yuko Uchida, Vu Phong Pham, Tsutomu Kageyama, Shizuko Kasuo, Shinichi Shimada, Yasutaka Yamashita, Kaoru Goto, Hung Vo Van, Do Thi Hoa, Tsuyoshi Hayashi, Aya Matsuu, Takehiko Saito	Antigenic variation of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza viruses in Japan and Vietnam	Archives of Virology		in press	2013
Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike.	Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger.	Antioxid Redox Signal.		in press	2013
Md. Mizanur Rahaman, Tomohiro Sawa, Ahmed Khandaker Ahtesham, Shahzada Khan, Hirofumi Inoue, Atsuh Irie, Shigemoto Fujii, and Takaaki Akaike.	S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling.	Antioxid Redox Signal		in press	2013
Takahiro Joudoi, Yudai Shichiri, Nobuto Kamizono, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Naotaka Yamada, and Sumio Iwai.	Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in Arabidopsis.	Plant Cell.		in press	2013
Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, Nunoi H.	Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia.	Pediatr Blood Cancer	60(2)	329-31	2013
Yohko K. Shimizu, Minako Hijikata, Masamichi Oshima, Kazufumi Shimizu, Harvey J. Alter, Robert H. Purcell, Hiroshi Yoshikura, Hak Hotta	Isolation of Human Monoclonal Antibodies to the Envelope E2 Protein of Hepatitis C Virus and Their Characterization	plos one	7-Feb	online	2013

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, Nunoi H.	J Pediatr Efficacy of Temozolomide in a Central Nervous System Relapse of Neuroblastoma With O 6 - Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation.	Hematol Oncol.	35(1)	e38-41	2013
Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Shigemoto Fujii.	Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide.	J Biochem	153	131-138	2013
Yuki Kurauchi, Akinori Hisatsune, Yoichiro Isohama, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, and Hiroshi Katsuki.	Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP(+) cytotoxicity.	Neuroscience	231	206-215	2013
Kaori Watanabe, Yu Ishima, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Teruo Kuroda, Wakano Ogawa, Hiroshi Watanabe, Ayaka Suenaga, Toshiya Kai, Masaki Otagiri, and Toru Maruyana.	S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis.	FASEB J.	27	391-398	2013
Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama	Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay	Journal of Virological Methods	188(1-2)	73-75	2013
Kudo D, Uno U, Aoyagi T, Akahori A, Ishii K, Kanno E, Maruyama R, Kushimoto S, Kaku M, Kawakami K	Low-dose interferon- α treatment improves survival and inflammatory responses in a mouse model of fulminant acute respiratory distress syndrome	Inflammation	41319	online	2013
Hanada S, Fujioka K, Futamura Y, Manabe Y, Hoshino A, Yamamoto K	Evaluation of anti-inflammatory drug-conjugated silicon quantum dots: their cytotoxicity and biological effect.	Intl. J. Mol. Sci	14(1)	1323-34	2013
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T.	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam	Mod Pathol.	23-Nov	doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugamata, Ryuichi; Dobashi, Hideki; Nagao, Tomokazu; Yamamoto, Ki-ichi; Nakajima, Noriko; Sato, Yuko; Aratani, Yasuaki; Oshima, Masamichi; Sata, Tetsutaro; Kobayashi, Kazuo; Kawachi, Shoji; Nakayama, Toshinori; Suzuki, Kazuo	The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection	Microbiology and Immunology	56(3)	171-82	2012
Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K, K-Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nunoi H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K., Japan.	Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture	Int J Hematol.	96(3)	324-9	2012
Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, Nunoi H, Ihara T.	Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections.	Allergol Int.	61(3)	507-9	2012
Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, Nunoi H.	Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease.	Am J Hematol.	87(4)	447-50	2012
Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H.	Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis.	Pediatr Int.	54(1)	147-50	2012
Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H.	Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease.	PLoS One	7(2)	e27782	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Homma S, Azuma A, Taniguchi H, Ogura T, Mochiduki Y, Sugiyama Y, Nakata K, Yoshimura K, Takeuchi M, Kudoh S,	Efficacy of inhaled N-acetylcysteine monotherapy in patients with early stage idiopathic pulmonary fibrosis.	Respirology	17(3)	467-77	2012
Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T.	Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.	Blood.	119(23)	5458-66	2012
Nakajima, N., Sato, Y., Katano, H., Hasegawa, H., Kumasaka, T., Hata, S., Tanaka, S., Amano, T., Kasai, T., Chong, J.M., Iizuka, T., Nakazato, I., Hino, Y., Hamamatsu, A., Horiguchi, H., Tanaka, T., Hasegawa, A., Kanaya, Y., Oku, R., Oya, T., Sata T.	Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection.	Mod Pathol	25	1-13	2012
Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y., Fu, S., Hirayama, N., Oshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y.	Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies.	Jap J Infect Dis.	65	19-27	2012
Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokota	Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus	Japanese Journal of Infectious Diseases	65	19-27	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H.	PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite.	Exp Biol Med (Maywood).	237(6)	703-8	2012
Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Koji Enomoto, Naomi Sakashita, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Hisao Ogawa, Hiroshige Yamabe and Takaaki Akaike.	Potential association of <i>Helicobacter cinaedi</i> with atrial arrhythmia and atherosclerosis.	Microbiol Immunol.	56(3)	145-54	2012
Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Shingo Kasamatsu, Jun Yoshitake, Rahaman Md Mizanur, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii and Takaaki Akaike.	Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling.	Biochem J.	441	719-730	2012
Ishiwada, N., Takada, N., Okunishi, T., Hishiki, H., Katano, H., Nakajima, N., Kohno, Y.	Rhabdomyolysis associated with influenza A/H1N1 2009 infection in a pediatric patient.	Pediatrics International	54	703-705	2012
Takeuchi K, Umeki Y, Matsumoto N, Yamamoto K, Yoshida M, Suzuki K, Aratani Y.	Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan.	Inflammation Res	61(3)	197-205	2012
Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H.	Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency.	J Clin Immunol.	32(1)	39-49	2012
Kohta Oyama, Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Tetsuro Matsunaga, Jun Yoshitake, Tomohiro Sawa, Junko, Tomida, Yoshiaki Kawamura, and Takaaki Akaike.	Identification of and screening for human <i>Helicobacter cinaedi</i> infections and carriers via nested PCR.	J Clin Microbiol	50	3893-3900	2012
Yohei Saito, Tomohiro Sawa, Jun Yoshitake, Chisato Ito, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike, and Hirokazu Arimoto.	Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells.	Mol Biosyst	8	2909-2915	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Motohiro Nishida, Tomohiro Sawa, Naoyuki Kitajima, Katsuhiko Ono, Hirofumi Inoue, Hideshi Ihara, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Makoto Suematsu, Hitoshi Kurose, Albert van der Vliet, Bruce A Freeman, Takahiro Shibata, Koji Uchida, Yoshito Kumagai, and Takaaki Akaike.	Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration.	Nat Chem Biol	8	714-724	2012
Shang Guoguo, Takaaki Akaike, Jiang Tao, Chen Qi, Zhang Nong, and Li Hui.	HGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells.	Free Radic Res	46	1238-1248	2012
Yoshifumi Sato, Mitsutoki Hatta, Md. Fazlul Karim, Tomohiro Sawa, Fan-Yan Wei, Shoki Sato, Mark A. Magnuson, Frank J. Gonzalez, Kazuhito Tomizawa, Takaaki Akaike, Tatsuya Yoshizawa, and Kazuya Yamagata.	Anks4b, a novel target of HNF4 α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells.	J Biol Chem	287	23236-23245	2012
Takatsugu Goto, Yoshitoshi Ogura, Hideki Hirakawa, Junko Tomida, Yuji Morita, Takaaki Akaike, Tetsuya Hayashi, and Yoshiaki Kawamura.	Complete genome sequence of Helicobacter cinaedi strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia.	J Bacteriol	194	3744-3745	2012
Yu Ishima, Hitomi Hoshino, Takuya Shinagawa, Kaori Watanabe, Takaaki Akaike, Tomohiro Sawa, Ulrich Kragh-hansen, Toshiya Kai, Hiroshi Watanabe, Toru Maruyama, and Masaki Otagiri.	S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents.	J Pharm Sc	101	3222-3229	2012
Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O	A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins.	Curr Chem Genomics	6	27-37	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
河内正治	オートプシーイメージング (今月の用語)	医療	66(10)	570	2012
中島典子、長谷川秀樹	インフルエンザウイルス感染症 の病理	医学の歩み	241	37-43	2012
中原 彰彦, 布井 博幸	【クローズアップ感染症】<感染 症治療の進歩>急性脳症と臓器 障害 インフルエンザ脳症を中 心に	小児内科	44(7)	1104-8	2012
Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K, K- Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nunoi H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K., Japan.	Int J Hematol. Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture		96(3)	324-9	2012
Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T.	Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts.	J. Cell Sci.	21-Dec	Epub ahead of print	2012
Shotaro Hagiwara, Tatsuya Mori, Hayato Tuchiya, Someyo Sato, Misato Higa, Mika Watahiki, Miho Hoshina, Tomomi Mochizuki, Takiko Chiba, Akiyoshi Miwa, Shoji Kawachi.	Multidisciplinary nutritional support for autologous hematopoietic stem cell transplantation: A cost-benefit analysis.	Nutrition	11-12	112-7	2011
Takahashi K, Oharaseki T, Nagao T, Yokouchi Y, Yamada H, Nagi-Miura N, Ohno N, Saji T, Okazaki T, Suzuki K.	Mizoribine provides effective treatment of sequential histological change of arteritis and reduction of inflammatory cytokines and chemokines in an animal model of Kawasaki disease. Pediatric Rheumatol.	Pediatric Rheumatol	9	30-39.	2011

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa and Takaaki Akaike.	Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides.	Amino Acids	41	123-130	2011
Hiroaki Nomori, Takeshi Mori, Kenichi Iyama, Tatsuya Okamoto and Mitsuhiro Kamakura.	Risk of bronchioloalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results.	Ann Thorac Cardiovasc Surg.	17	19-23	2011
Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K.	Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications.	Arch. Toxicol.	85(7)	85(7):	2011
Yoshiko Tokutomi, Keiichiro Kataoka, Eiichiro Yamamoto, Taishi Nakamura, Masaya Fukuda, Hisato Nako, Kensuke Toyama, Yi-Fei Dong, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike and Shokei Kim-Mitsuyama.	Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice.	Br J Pharmacol.	162	1884-1893	2011
Eiko Yoshida, Takashi Toyama, Yasuhiro Shinkai, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike and Yoshito Kumagai.	Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells.	Chem Res Toxicol.	24	1633-1635	2011
Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara and Takaaki Akaike.	Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile.	Current Topics Med Chem	11	1854-1860	2011
Guoli Shi, Fumihiko Yagyu, Yohko Shimizu, Kazufumi Shimizu, Masamichi Oshima, Aikichi Iwamoto, Bin Gao, Wenjun Liu, George Fu Gao, Yoshihiro Kitamura	Flow Cytometric Assay Using Two Fluorescent Proteins For the Function of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus	Cytometry Part A	79A	653-660	2011
Hiroyuki FURUYA, Shoji KAWACHI, Mika SHIGEMATSU, Kazuo SUZUKI, Tetsu WATANABE.	Clinical factors associated with severity in hospitalized children infected with avian influenza (H5N1).	Environ Health Prev Med	16	64-68	2011