

(2)アデノウイルスを検出する迅速診断キット評価のための調査方法を策定

・研究分担者(永井正規): 定点サーベイランスの統計学的な指標の開発

(1)定点サーベイランスによる感染症の流行状況について、警報・注意報の発生と基幹定点対象疾患の妥当性分析

(2)定点把握感染症の罹患数の推計の評価と新たな方法としての補助変量の利用の検討

・研究分担者(山本英二): 疫学ソフト Epi Info の日本語化と普及

(1)2011年公開の新版 Epi Info TM7の新規モジュール基本部分の日本語化の実施、利用手引き作成

・研究分担者(中瀬克己): STIサーベイランスの評価と改善

(1)性感染症発生動向調査活用のためのガイドライン作成周知、研修会(平成25年1月)

(2)ウイルス検査技術連絡会の協力を得て、全国の性感染症検査結果(クラミジア、淋菌およびHIV)を解析した結果、HIV抗体確認検査陽性件数が同時期の全国届け出件数の倍以上

(3)三重県において詳細な年齢、検査契機などを含んだ性感染症の強化サーベイランス

・研究分担者(高橋英之): 髄膜炎菌の日本人における健康保菌率調査

(1)髄膜炎菌の核酸レベルの検出法としてLAMP法開発し、健康保菌者のうがい液を用いた検出系の検証

・研究分担者(笠原 敬): 肺炎球菌および腸内細菌の薬剤耐性サーベイランス事業に対する提言

(1)2001年~2012年の肺炎球菌の薬剤感受性および血清型、2008年~2012年の広域β-ラクタマーゼ産生腸内細菌の薬剤感受性および耐性遺伝子調査完了

・研究分担者(蒲地一成): 百日咳菌と類縁菌の病原体サーベイランスの精度向上

(1)百日咳菌とその類縁菌を同時に検出するmultiplex real-time PCR法を構築、臨床検体から直接菌の遺伝子型を決定するMLVA法確立

・研究分担者(齋藤玲子): RSウイルス感染症の垂直サーベイランス

(1)日本各地(青森~熊本)の10か所の臨床医から協力を得て、RSウイルスの検体調査開始

(2)新潟市の調査では昨年(2011年)はB型RSウイルスの流行、今年(2012年)はA型RSウイルスが流行

・研究分担者(堀野敦子): マイコプラズマの垂直サーベイランス

(1)2012年度は初発のマイコプラズマ肺炎患者例に限定した臨床検体収集を行い、分離株の性状解析中

(2)地方衛生研究所と共同でM. pneumoniaeのp1遺伝子型別

・研究分担者(池松秀之): 自然災害時を含めたシステムとして内科医ネットワークの開発維持

(1)2011-12年流行期においてH3N2は10代(26.2%)の割合が高く、60歳以上が13.5%と比率が高かった

・研究分担者(西藤成雄): インターネットによるサーベイランスネットワーク

(1)MLインフルエンザ流行前線情報データベース(ML-flu)、RSウイルス・オンライン・サーベイの改良と運営

(2)ML-fluでの重症例の頻度や臨床的特徴について評価を行い得た

(3)Tweet fluにおいてツイッターのつぶやきがfluの流行を反映していることを証明

・研究分担者(森兼啓太): 新型インフルエンザ発生時の臨床情報共有システムの開発

(1)2009年のパンデミックにおいて成功したと評価されている米国カリフォルニア州政府の早期臨床情報収集システムの成功要因を特定

・研究分担者(中野貴司): 入院患者におけるインフルエンザサーベイランス

(1)インフルエンザ患者について、ウイルス排出期間、分離ウイルスの薬剤耐性の有無検討

(2)侵襲性細菌感染症(Hib、肺炎球菌)の、サーベイランススタンダードについて考察

・研究分担者(砂川富正): 百日咳サーベイランスのあり方と災害後のサーベイランスのあり方

- (1)高知県における百日咳強化サーベイランスを2012年8月より開始、11月9日現在、病原体検査を含む症例届出が178件(うち、百日咳LAMP法陽性45件)、症候群のみ症例届出が58件
- (2)現行の感染症法上の届出基準には4割程度しか合致しない
- (3)東日本大震災の被災地域を含む4県の保健所から平成24年11月26日までに44ヶ所のうち32ヶ所から回答あり(暫定回答率72.7%)

・研究分担者(奥村貴史): 簡易クラウド技術の感染症サーベイランスへの応用

- (1)保健医療関係者が自由に利用することが可能なFaxOCR技術、クラウド技術の開発と整備
 - (2)パンデミック発生時にクラウド基盤を用いて収集した情報をNESIDに自動供給するための訓練と課題整理・研究
- ・研究分担者(大日康史): 避難所サーベイランスシステムの開発維持

- (1)避難所サーベイランスのための電子システムをサーバ上に展開し、維持強化

IV. 平成25～26年度の課題

- (1)感染症法に基づく発生動向調査については、現状調査、地方感染症情報センター担当者会議、公衆衛生学会自由集会の開催を主催もしくは後援し、地方感染症情報センター間の連携をはかる
- (2)24年度稼働の新しいシステム(NESID)の評価を行い実践的な活用方法を検討
- (3)定点・全数把握感染症について、今後のサーベイランスに求められる機能・性能に応じた方法を開発・評価
- (4)開発したガイドラインの周知と活用による地方自治体における性感染症対策の進展
- (5)病原体別調査、垂直サーベイランス、ネットワークサーベイランスの強化、検体採取協力医療機関との協力推進
- (6)開発された検査法については実際の臨床検体による実証
- (7)検査終了検体については解析開始、MLSTやPFGEを使用して更なる検討と患者臨床データとの比較検討
- (8)ツール作成とシステム技術は開発改良を継続し、自然災害時での運用を試行、自動化の推進
- (9)感染症のサーバ間の「感染症情報交換規約(Infection Info XML)」
- (10)サーベイランスの計画における厚生労働省、地方自治体と学会等の組織の連携のあり方の整理と検討

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1)24年度に厚生労働省が導入した新しい発生動向調査システム(NESID)の運用面での評価により訂正や次期システムへの反映の提言
- (2)実際の発生動向調査データの解析と検討により、サーベイランスの評価、今後の情報提供方法とサーベイランス手法の改善に貢献
- (3)「性感染症発生動向調査活用のためのガイドライン」、「EpiInfo」など地方感染症情報センター担当職員に還元、サーベイランス結果の今まで以上の活用
- (4)マイコプラズマ、RSウイルス、百日咳、髄膜炎菌感染症などのより効果的なサーベイランスによる対策の進展
- (5)新型インフルエンザや自然災害時にネットワークから必要な情報を集約、全国レベルで統合できる
- (6)災害後のサーベイランスを含む感染症対応について、災害後の集団発生サーベイランス、避難所サーベイランスのあり方を含んで整理し、公衆衛生上の提言として構築
- (7)全国・地域の感染症の流行情報を市民へ迅速に提供できる

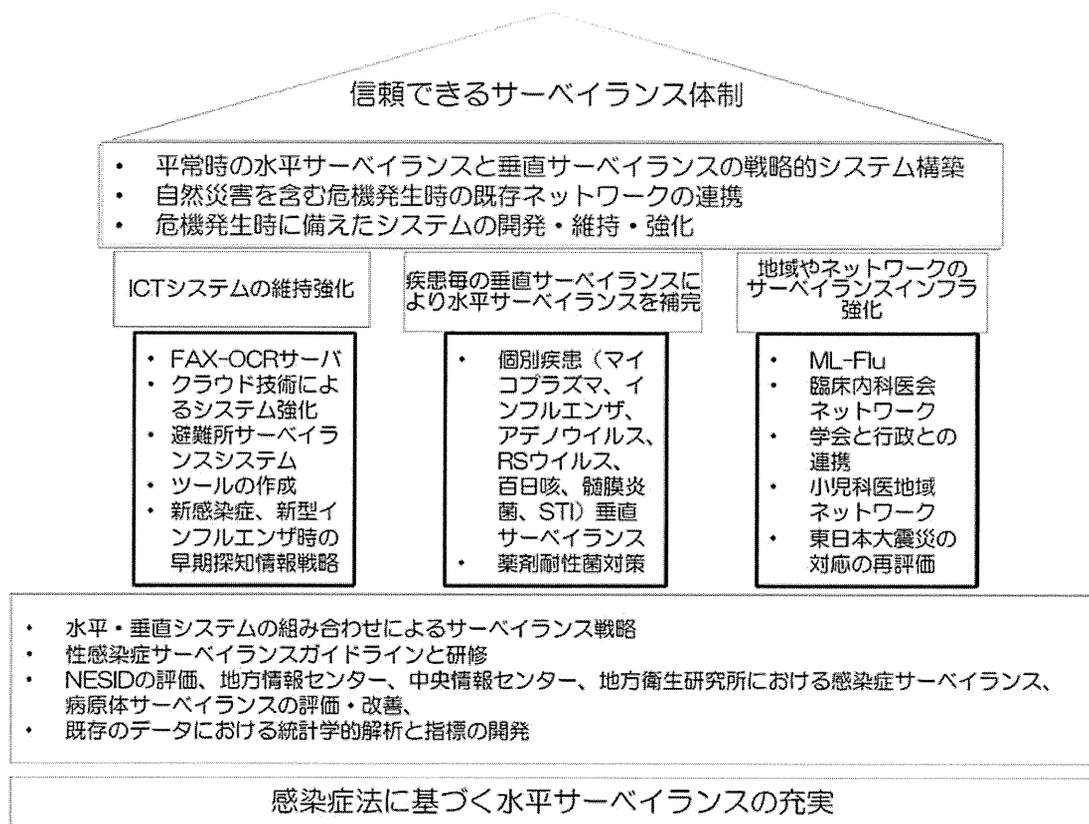
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 灘岡陽子 神谷信行 戸来小太郎 早田紀子. 東京都におけるインフルエンザサーベイランス(2011～2012 シーズン). 第71回日本公衆衛生学会総会
- (2) 河合直樹, 廣津伸夫, 池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2012-2013年シーズン版. インフルエンザ研

究班編集(柏木征三郎、岩城紀男監修). 日本臨床内科医会誌 27(2), 臨時付録, 2012.

- (3) 堀野敦子. 病原体検出マニュアル(マイコプラズマ肺炎)、IASR2012年10月肺炎マイコプラズマ特集号.
- (4) 西藤なるを. ML インフルエンザ流行前線情報 DB は、新型インフルエンザを捉えたか?, 日本インターネット医療協議会会員フォーラム. 2012/06/24
- (5) Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, Odaira F, Yoshino S, Kawano K, Takahashi H, Nishida T, Hidaka Y, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K, Sunagawa T, Taniguchi K, Okabe N. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18:1166-9.
- (6) 蒲地一成. 百日咳の迅速診断法. *小児科臨床*. 2012; 65(12):2559-63.
- (7) 砂川富正, 安井良則. 災害下における感染症対策について. *東京小児科医会報*. 102(30)No.2:2011年
- (8) Shinsai FaxOCR システム (オープンソースシステム):<https://sites.google.com/site/faxocr2010/>
- (9) ezcloud システム (オープンソースシステム):<https://cloud.niph.go.jp/>
- (10) 長村敏生、吉岡 博、青谷裕文. 京都府の小児救急医療における重症患者の現状—京都小児重症患者診療情報システム稼働開始1年間(2010年11月~2011年10月)のまとめ—*京都医学会雑誌*・2012年(p47-55)
- (11) Hideyuki Takahashi, Tatsuo Yanagisawa, Kwang Sik Kim, Shigeyuki Yokoyama, and Makoto Ohnishi. Meningococcal Pili Potentiates *Neisseria meningitidis* Type IV Pilus-Mediated Internalization into Human Endothelial and Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 80(12):4154-4166, 2012.
- (12) 「性感染症発生動向調査活用のためのガイドライン」研究班として作成、2012年11月
- (13) 山岸拓也、尾本由美子、川畑拓也、白井千香、高野つる代、多田有希、中島一敏、灘岡陽子、堀成美、宮原愛理、持田嘉之、山内昭則、中瀬克己. 地方自治体における感染症発生動向調査の業務を支援する性感染症発生動向結果活用ガイドラインについて. *日本性感染症学会*、2012年
- (14) 中瀬克己、堀成美、尾本由美子、高橋裕明、川畑拓也、山岸拓也、中谷友樹、神谷信行、白井千香、持田嘉之. 性感染症感染者パートナーへの公的検査における働きかけ. *日本性感染症学会誌*、2012年
- (15) 中瀬克己、山岸拓也、尾本由美子、高橋裕明、山内昭則、白井千香、川畑拓也. HIV 感染症・性感染症サーベイランス結果の地方自治体による活用の評価. *日本エイズ学会誌*、2012年
- (16) 川畑拓也、森 治代、小島洋子. 大阪府内の HIV 感染症の流行状況と対策について. 第53回日本社会医学会総会、高槻市、2012/7/15
- (17) 亀岡 博、古林敬一、安本亮二、川畑拓也、志牟田健、大西 真. 平成 23 年度 大阪府内淋菌薬剤感受性調査結果. 第 192 回公衛研セミナー、大阪市、2012/6/20
- (18) 志牟田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、上田朋宏、亀岡 博、古林敬一、川畑拓也、大西 真. 京都府と大阪府における 2010-2011 年に分離された淋菌株の性状解析. *日本性感染症学会誌*、Vol. 23, No.1 83-89 2012
- (19) 鹿島, 津田, 槌田, 土橋, 中瀬, 溝口, 山本. 食中毒の疫学講座, 日本食品衛生協会 (2012).
- (20) Kasahara K, Komatsu Y, Nakayama A, Ui K, Mizuno F, Mikasa K, Kita E. Emergence of IMP-1 Producing *Escherichia coli* in a Tertiary Hospital in Japa. *APIC2012*.
- (21) 笠原 敬. 腸内細菌の治療. 第 23 回抗菌薬適正使用生涯教育セミナー. 2012
- (22) 笠原 敬. 当院でカルバペネマーゼ産生腸内細菌が分離された症例の臨床的検討. 第 8 回奈良感染症サーベイランス. 2012
- (23) 笠原 敬. 腸内細菌感染症の治療. 第 24 回抗菌薬適正使用生涯教育セミナー. 2012

VII. III(1年間の研究成果)の概要図等



- ① 現行の感染症法に基づく発生動向調査をシステムとともに評価、最大限に利用するために、ガイドライン作成や解析方法を工夫するとともに改善の提言を作成
- ② 現行の発生動向調査で足りない部分を補完するための垂直サーベイランスを設計、実行
- ③ 疾患毎の垂直サーベイランスにより理想的なサーベイランスを考えると同時に、科学的な知見により現状のサーベイランスを補完し、対策に貢献する
- ④ 自然災害を含む健康危機時に備えてシステムの準備と実効性の検証、戦略を樹立
- ⑤ 地域やボランティアのネットワークサーベイランスや情報共有ネットワークを支援
- ⑥ 平常時より縦糸と横糸の戦略的サーベイランスにより小さな負担で十分な情報を収集
- ⑦ 危機時には、平常時のネットワークサーベイランスの連携とスタンバイシステムの稼働による情報収集
- ⑧ 最終的に国家としての戦略的サーベイランス体制が樹立される

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

三重大学医学部小児科学教室、鹿児島市立病院小児科、静岡県立こども病院臨床病理科、Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana、国立三重病院、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)

武 弘道(鹿児島市立病院小児科部長)、櫻井実(三重大学小児科教授)、駒田美弘(三重大学小児科教授)、Francis K.Nkrumah(Director, NMIMR, University of Ghana, Ghana.)、神谷斉(国立三重病院長)、Keiji Fukuda(Chief, Epidemiology division, Influenza branch, NCID,米国 CDC)、Michael J. Ryan(世界保健機関)、岡部信彦、進藤奈邦子、多田有希、砂川富正、中島一敏、重松美加、大日康史、藤本嗣人、神谷元(感染研)、Tham Chi Dung(NIHE、ベトナム)、大村昭人(帝京大)、鈴木宏(新潟大学)、永井正規(埼玉医大)、橋本修二(藤田保健衛生大学)、Van Kerkhove(WHO)、Jason Jui-Wei Hsieh、Chin-Shui Chi(台湾 CDC)、庵原俊昭(国立三重病院長)、中野貴司(川崎医大小児科教授)

・主な研究課題

小児感染症の臨床研究、白血病／神経芽細胞種のDNA量と細胞周期、小児疾患の組織病理学、慢性下痢症と免疫能、ワクチン副作用としてのゼラチンアレルギーの研究、効果的なサーベイランス手法、インフルエンザ疫学、バイオテロ対策、国際保健規則による Core Capacity requirement とこれらの評価、パンデミックインフルエンザ対策、ワールド疫学調査手法、Indicator-based surveillance

・これまでの研究実績

-論文

1) Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, Odaira F, Yoshino S, Kawano K, Takahashi H, Nishida T, Hidaka Y, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K, Sunagawa T, Taniguchi K, Okabe N. *Transmission of Bordetella holmesii during pertussis outbreak, Japan. Emerg Infect Dis, 2012; 18:1166-9.*

2) Yoshiaki Gu, Nobuhiro Komiya, Hajime Kamiya, Yoshinori Yasui, Kiyosu Taniguchi, and Nobuhiko Okabe. Pandemic(H1N1) 2009 Transmission during Presymptomatic Phase, Japan. *Emerging Infectious Diseases* 17(9): 1737-39, 2011.

3) Van Kerkhove MD, Vandemaele KAH, Shinde V, Jaramillo-Gutierrez G, Koukounari A, Taniguchi K, et al. Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: A Global Pooled Analysis. *PLoS Med* 8(7): e1001053. doi:10.1371/journal.pmed.1001053, 2011

4) Fujimoto T, Konagaya M, Enomot M, Tsuboi K, Hashimoto K, Taniguchi K, Kodama T, Okabe N. Novel high-speed real-time PCR method (Hyper-PCR): results from its application to adenovirus diagnosis. *Jpn J Infect Dis* 63, 31-35, 2010.

5) Komiya N, Gu Y, Kamiya H, Yahata Y, Yasui Y, Taniguchi K, Okabe N. Household transmission of pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus in Osaka, Japan in May 2009. *Journal of infection* 16(4):284-8, 2010.

6) F Odaira, H Takahashi, T Toyokawa, Y Tsuchihashi, T Kodama, Y Yahata, T Sunagawa, K Taniguchi, N Okabe. Assessment of secondary attack rate and effectiveness of antiviral prophylaxis among household contacts in an influenza A(H1N1)v outbreak in Kobe, Japan, May-June 2009. *Eurosurveillance*, 14(35): 1-5, 2009.

7) K. Taniguchi, M. Yoshida, T. Sunagawa, Y. Tada, N. Okabe. Imported infectious diseases and surveillance in Japan. *Travel Medicine and Infectious Disease* 6, 349-354, 2008.

- 8) Taniguchi K, Hashimoto S, Kawado M, Murakami Y, Izumida M, Ohta A, Tada Y, Shigematsu M, Yasui Y, Nagai M. Overview of infectious disease surveillance system in Japan, 1999–2005. *J Epidemiol* 17(suppl): S3–S13, 2007.
- 9) K.Taniguchi, T.Rikimaru, JE Yartey, P.Akpedonu, MA Armar–Klemesu, FK Nkrumah, H.Kamiya, K.Kishi, DA Armar. Immunological background in children with persistent diarrhea in Ghana. *Pediatrics International* 41:162–7, 1999.
- 10) K Taniguchi, T Fujisawa, T Ihara, H Kamiya. Gelatin-induced T-cell activation in children with non-anaphylactic reactions to vaccines containing gelatin. *J Allerg Clin Immunol* 102:1028–32, 1998.
- 11) T. Rikimaru, K. Taniguchi, JE Yartey, DO Kennedy and FK Nkrumah. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. *Eur J Clin Nutr* 52:344–350, 1998.
- 12) MM Addae, Y Komada, K Taniguchi, T Kamiya, M Osei-Kwasi, BD Akanmori, FK Nkrumah. Surface Marker patterns of T cells and expression of interleukin-2 receptor in measles infection. *Acta Paediatr Jpn* 37:308–314, 1998.
- 13) H Hiraiwa, M Hamazaki, H Murata, K Taniguchi, M Sakurai. Epstein-Barr virus infection, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and reactive follicular hyperplasia in Japanese children.: Evaluation of paraffin-embedded specimens using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Acta Paediatrica Japonica* 39:158–165, 1997.
- 14) M. Ido, Y. Nagao, K. Taniguchi et al. Differential growth inhibition of isoquinolinesulfonamides H-8 and H-7 towards multidrug-resistant P388 murine leukemia cells. *Br. J. Cancer* 64:1103, 1991.

-政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)

- (1) WHO Crisis communication guideline (Consultation member として)
- (2) International Health Regulations (2005) WHO CHECKLIST AND INDICATORS FOR MONITORING IHR CORE CAPACITIES IN STATES PARTIES (WHO informal consultation member として)
- (3) 新型インフルエンザガイドライン(厚生労働省新型インフルエンザ対策専門家会議委員として)
- (4) 発生動向調査システム開発事業評価委員会の提言(委員会委員長として)
- (5) WHO pandemic surveillance guideline (Informal consultation member として)
- (6) WPRO event-based surveillance guideline (Informal consultation member として)
- (7) 新型インフルエンザ対策行動計画(新型インフルエンザ対策専門家会議委員として)
- (8) 厚労省・厚生科学審議会感染症分科会・予防接種部会への「ファクトシート」作成(ヒブワクチンおよび肺炎球菌ワクチンの統括責任者)
- (9) ヒブ・肺炎球菌ワクチンの接種に伴う患者サーベイランス(発生動向調査)の新たな体制のデザイン
- (10) WPRO indicator-based surveillance guideline (Informal consultation member として)

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 『成果概要』

研究課題：侵襲性真菌症例から分離された原因真菌の分子疫学解析と疫学データベース化した院内感染対策の研究

課題番号：H24-新興-若手-015

予定期間：H24年度からH26年度まで

研究代表者：田辺公一

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：生物活性物質部

職名：主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：1年目 3,000,000円

I. 研究の意義

- (1) 侵襲性真菌症に関する疫学研究は乏しく、経験的治療も頻繁になされている。
- (2) 侵襲性真菌症は予後が悪い
- (3) 薬剤感受性試験も経過的に行われることはほとんどない

：

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 常在菌である *Candida* 属のうち重症化する遺伝子型を明らかにする
- (2) 抗真菌薬耐性化しやすい遺伝子型についても検証する
- (3) 免疫不全に伴う日和見感染において治療方針、衛生管理方針を科学的根拠に基づいて決定でき、医療コストの削減につながる。

：

III. 1年間の研究成果

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

・研究代表者

- (1) 従来の遺伝子型決定以外に、質量分析法による菌種同定法などの迅速かつ有効な *Candida* 属の分類方法を検討した。Multi Locus Sequence Typing が最適であると判断した。
- (2) 医療機関における真菌症の検査体制や分離される真菌の状況について情報集を行った。
- (3) 臨床分離株の輸送基準の設定、プロトコルを作成した

：

IV. 平成 25～26 年度の課題

- (1) 従来通りの MLST 法を用いて菌の分類をすすめる
- (2) 今後送付されてくる分離菌の解析・管理方法を見直す。
- (3) 分離菌の提供先を増やす。
- (4) 解析結果と分離された患者の疾患情報の照合。遺伝子型と重症化との関連を検討する。

:

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 真菌症治療ガイドライン決定のための有効な疫学情報となる

(2)

(3)

:

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、

知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

(1)

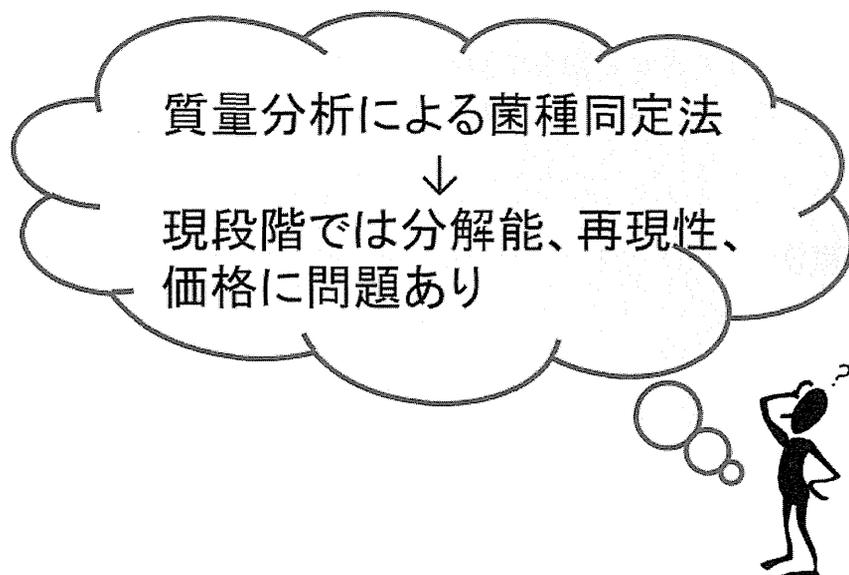
(2)

(3)

:

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。



<解析方法の改良>

Multi Locus Sequence Typing解析
迅速簡便化

<情報収集>

*Candida*属分離状況
検査体制、検査方針

<医療機関との連携>

分離株輸送の Protokol 作成

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

京都大学農学部 応用生命科学科 細胞生化学研究室 (平成平成 15 年 3 月まで)

国立感染症研究所 生物活性物質部 (平成 15 年 4 月から現在に至るまで)

オタゴ大学歯学部 微生物学教室 (平成 15 年 11 月から平成 16 年 2 月)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

<指導教官>

植田和光 (京都大学農学部、教授)

<共同研究者>

中山浩伸 (鈴鹿医療科学大学・薬学部、准教授)

知花博治 (千葉大学真菌医学研究センター、准教授)

・主な研究課題

病原真菌 *Candida glabrata* のステロール取り込みと鉄欠乏応答

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1. Nagi M, **Tanabe K***, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. **J Infect Chemother**; accepted (*Corresponding author)
2. **OTanabe K**, Lamping E, Nagi M, Okawada A, Holmes AR, Miyazaki Y, Cannon RD, Monk BC, Niimi M. Chimeras of *Candida albicans* Cdr1p and Cdr2p reveal features of pleiotropic drug resistance transporter structure and function. **Mol Microbiol**. 2011 Oct;82(2):416-33.
3. Nakayama H, Ueno K, Uno J, Nagi M, **Tanabe K**, Aoyama T, Chibana H, Bard M. Growth defects resulting from inhibiting *ERG20* and *RAM2* in *Candida glabrata*. **FEMS Microbiol Lett**. 2011 Apr;317(1):27-33.
4. Inui S, Nakamura T, **OTanabe K**, Ohno H, Koike C, Okuda K, Nakata C, Fujimoto H, Ohkura H, Miyazaki Y, Takahashi H. [A case of micafungin-hyposensitive *Candida glabrata* due to *FKS2* gene

- mutation] *Kansenshogaku Zasshi*. 2011 Jan;85(1):49-53. Japanese.
5. Nagi M, Nakayama H, **OTanabe K***, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells*. 2011 Jan;16(1):80-9. (***Corresponding author**)
 6. Niimi K, Monk BC, Hirai A, Hatakenaka K, Umeyama T, Lamping E, Maki K, **Tanabe K**, Kamimura T, Ikeda F, Uehara Y, Kano R, Hasegawa A, Cannon RD, Niimi M. Clinically significant micafungin resistance in *Candida albicans* involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (FKS1) allele followed by loss of heterozygosity. *J Antimicrob Chemother*. 2010 May;65(5):842-52.

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 『成果概要』

研究課題：水疱性口内炎ウイルスを用いたアレナウイルス感染中和抗体開発に関する基盤研究

課題番号：H24-新興-若手-016

予定期間：H24年度からH26年度まで

研究代表者：谷 英樹

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第一部

職名：主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：1年目 5,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) ラッサウイルスや各種南米アレナウイルス感染症に対する治療法は現在まで存在しない。
- (2) ウイルスのエンベロップ蛋白質に対する中和抗体薬は、特に出血熱ウイルス感染症のような急性期に劇症化する疾患の場合、ウイルスの生体内への感染そのものを阻止することができ、非常に効果的である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ラッサウイルスや各種南米アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体の作製を試みる。
- (2) 各種アレナウイルスの感染を阻害できるような中和抗体が作製できれば、予防ワクチンのみならず、感染後に治療薬としても利用することが期待できる。
- (3) エンベロップ蛋白質を検出できる抗体が作製できれば、アレナウイルス感染症対策に関する基礎研究の有用なツールとして活用できるだけでなく、抗原検出のための迅速診断法への開発にも応用することが期待できる。

III. 1年間の研究成果

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

・研究代表者

- (1) 本年度はラッサウイルスおよび各種南米アレナウイルスエンベロップ蛋白質 (GP) を外套したシュードタイプウイルスを大量作製し、分離用超遠心機を用いてウイルス粒子の濃縮・精製を行った。このウイルス粒子への GP の取り込み量および作製細胞内の GP の発現を確認するために、ウエスタンブロット法を行った。その結果、南米アレナウイルス GP およびコントロールとして作製した VSVG を一過性に外套した VSVG シュードタイプウイルスは GP を効率良く大量に取り込んでいるのに対し、ラッサウイルス GP を外套したシュードタイプウイルスにおける GP の取り込み量は少ないことがわかった。ラッサウイルスの GP は細胞内での発現量も少なく安定性が低いことが予想された。

- (2) エンベロープ蛋白質の取り込み量が少ないながらも、この精製したラッサウイルス GP 外套シュードタイプウイルス粒子を BALB/c マウス三群に、それぞれ精製粒子、プラスミド DNA、粒子とプラスミド DNA を併用したパターンで五回免疫し、二週間おきに採血し、それぞれの血清中におけるシュードタイプウイルスの感染中和活性を、ウイルスの感染性を指標に測定した。その結果、コントロールとして VSVG を外套したシュードタイプウイルスを免疫したマウスの血清において、VSVG のシュードタイプウイルスにおける感染性は 99.99%以上中和されたのに対し、ラッサウイルス GP 外套シュードタイプウイルスの場合、どのパターンでの免疫でも血清における中和活性は認められなかった。
- (3) マウスへの免疫と平行してウサギへプラスミド DNA を免疫し、ポリクローナル抗体の作製も試みた。この実験ではラッサウイルス GP の他、南米アレナウイルスの一つであるルジョウイルス GP を発現するプラスミド DNA を複数回導入し、それぞれ対応する GP を外套したシュードタイプウイルスに対する感染中和活性を調べた。その結果、ルジョウイルス GP に対して感染中和活性を持つ抗血清は得られたものの、マウスへの免疫と同様ラッサウイルス GP に対して感染中和活性を持つ抗血清は得られなかった。

IV. 平成 25～26 年度の課題

- (1) ラッサウイルス GP に関しては、発現量を高く維持させるために産生細胞を検討する。また、プロテアーゼ阻害剤などを添加して再度 GP の取り込み量の高いシュードタイプウイルスの作製を試みる。
- (2) ラッサウイルス GP を外套したシュードタイプウイルス以外に南米アレナウイルスの代表的なウイルスであるフニンウイルスと近年新たに同定されまだ研究が進んでいないルジョウイルスの GP を外套したシュードタイプウイルスをマウスへ免疫し、血清中の感染中和活性の有無をそれぞれのシュードタイプウイルスを用いて評価する。
- (3) 活性が認められたら、脾臓細胞よりハイブリドーマを作製し、モノクローナル抗体の選出を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) ラッサウイルスや各種南米アレナウイルスのエンベロープ蛋白質に対する感染中和抗体作製の取り組みは、世界的にもほとんど報告されておらず、感染中和抗体が作製できれば、予防ワクチンのみならず、感染後に治療薬としても利用することができ、抗体医薬品として臨床現場においても有用性は高い。感染患者等への応用にはまだ取り組むべき課題は多いが、将来的なワクチン開発及び抗体療法確立に向けての第一歩になるものと考えられる。特に、西アフリカ等の感染流行地域においては、こうした治療法や治療薬の整備も遅れていると予想されるため、本邦から治療薬として供給することができれば、国際的な貢献度は高い。また、流行地以外での輸入感染例も世界中で見られることから、本邦においても決して対岸の火事ではなく、厚生労働行政として対策を講じておく必要性があり、本研究課題は行政施策への貢献度も高いと思われる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

※本研究費において行った研究に対するもののみを記載してください。

※研究代表者、研究分担者、研究協力者ごとに、発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、ガイドライン名・作成主体・策定年月日等を記載して下さい。

※ 執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

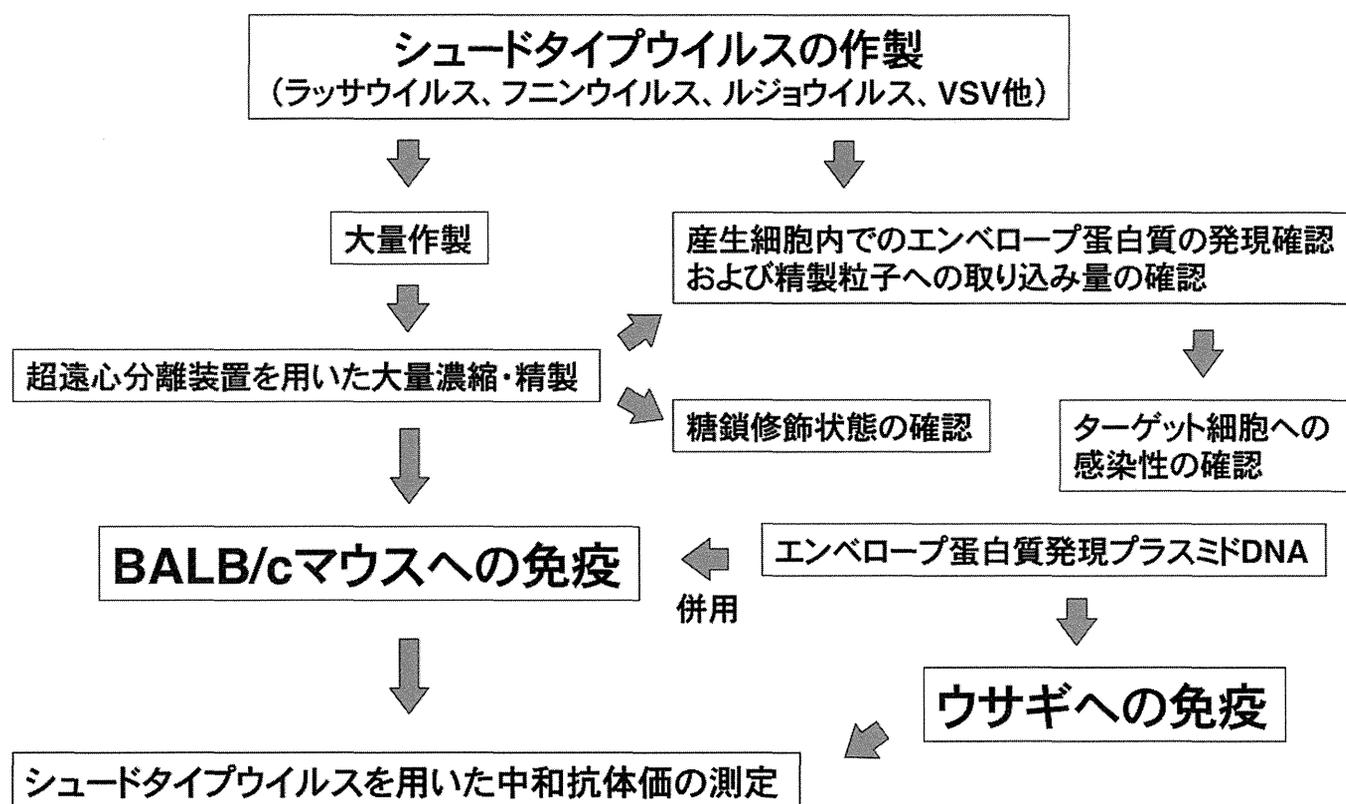
(1) 学会発表

Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.

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。

1年間の研究成果概要図



本年度はラッサウイルスおよび各種南米アレナウイルスエンベロップ蛋白質 (GP) を外套したシュードタイプウイルスを大量作製し、ウイルス粒子の濃縮・精製を行うと共に、このウイルス粒子への GP の取り込み量および作製細胞内の GP の発現確認を行った。精製したラッサウイルス GP 外套シュードタイプウイルス粒子を BALB/c マウスに免疫し、血清中におけるシュードタイプウイルスの感染中和活性を、ウイルスの感染性を指標に測定した。さらに、マウスへの免疫と平行してウサギへプラスミド DNA を免疫し、ポリクローナル抗体の作製も試みた。この実験ではラッサウイルス GP の他、南米アレナウイルスの一つであるルジョウイルス GP を発現するプラスミド DNA を複数回導入し、それぞれ対応する GP を外套したシュードタイプウイルスに対する感染中和活性を調べた。その結果、ルジョウイルス GP に対して感染中和活性を持つ抗血清は得られたものの、ラッサウイルス GP に対しては、マウスへの免疫と同様に感染中和活性を持つ抗血清は得られなかった。

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

国立感染症研究所ウイルス第二部

大阪大学微生物病研究所

米国テネシー大学メンフィス校

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大阪大学微生物病研究所 松浦善治教授

国立感染症研究所獣医科学部 森川茂部長

国立感染症研究所ウイルス第一部 西條政幸部長

・主な研究課題

バキュロウイルス感染に重要な細胞表面因子の解析

HCV エンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプ VSV の細胞侵入機構の解析

日本脳炎ウイルスの細胞侵入における脂質分子の役割

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

学術論文

Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa.

Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*. (2012). **4**: 2097-2114.

学会発表

1. 谷 英樹、伊波興一朗、谷口 怜、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、森川 茂：シュードタイプVSVを用いたルジョウイルスの細胞侵入機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
2. 谷口 怜、佐山勇輔、永田典代、飯塚愛恵、谷 英樹、吉河智城、福士秀悦、西條政幸、久和 茂、森川 茂：レストンエボラウイルス自然感染カニクイザルにおける免疫応答の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
3. 福士秀悦、新倉 綾、谷 英樹、吉河智城、伊波興一朗、谷口 怜、緒方もも子、西條政幸、森川 茂：日本のマダニ類における新種のブニヤウイルス (SFTSV) 保有調査とSFTSV血清学的診断法の開発 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月
4. Kie Yamamoto, Koichiro Iha, Christine Bruce, Stuart D. Dowall, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Yoshiyuki Ishii, Shigeru Kyuwa, Roger Hewson,

Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of viral hemorrhagic fevers caused by arenaviruses. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.

5. ***Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Analysis of cell entry of New and Old World arenaviruses using pseudotyped viruses bearing their envelope proteins. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Rio de Janeiro, Brazil, September 23-27, 2012.***
6. Hideki Tani, Koichiro Iha, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, and Shigeru Morikawa : Characterization of pseudotype VSV possessing New and Old World arenavirus envelope proteins. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Japan, 2012.

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 『成果概要』

研究課題： エンベロープウイルス粒子形成の分子基盤の解明と創薬に向けた研究開発課題番号： H24-新興-若手-017予定期間： H24 年度から H26 年度まで研究代表者： 森田 英嗣所属研究機関： 大阪大学微生物病研究所所属部局： 感染症国際研究センター・ウイルス研究グループ職名： 特任准教授年次別研究費(交付決定額)：1年目 5,000,000 円

I. 研究の意義

(1) インフルエンザウイルスやデングウイルスの粒子形成には多くの宿主因子が関与していると想定されるが、その機構は殆ど明らかにされていない。

(2) ウイルス粒子形成過程などの感染後期は、抗ウイルス薬の標的として極めて重要なステップでありその分子基盤の確立が求められている。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 他の多くの RNA エンベロープウイルスでは、宿主 ESCRT 経路が粒子形成に関与することが明らかになっているが、インフルエンザウイルスやデングウイルスではまだ不明である。このため、これらウイルスの粒子形成に ESCRT 経路が関与するかを明らかにする。

(2) インフルエンザウイルスやデングウイルスの複製複合体を精製し、定量プロテオミクス解析を行うことにより、ウイルスの粒子形成に関与する宿主因子を同定する。

(3) 同定された宿主因子に対して siRNA や優勢機能不全体発現系などを用いてウイルスの増殖にどのように関与するのか、その作用機序を明らかにし、創薬の標的となり得るか検討する。

(3) ウイルス-宿主因子の物理的な相互作用を同定し、その立体構造解析を試み、感染後期過程を標的とした創薬への分子基盤を確立する。

(4) これらの解析よりウイルス-宿主因子相互作用の構造情報を基にした *in silico* での抗ウイルス薬の開発が期待される。

III. 1 年間の研究成果

(1) デングウイルス感染細胞より複製複合体画分を精製し、SILAC 法による定量プロテオミクス解析を、非感染細胞より精製した画分を対照に用いて行ったところ、1941 種類の宿主因子に対して蛋白質の同定と比較定量を行うことに成功した。

(2) 定量プロテオミクス解析の結果、PI4KIII- α や OSBPL8 など既に複製複合体で作用することが報告されている宿主因子が、感染によってウイルス複製複合体にリクルートされる因子として

同定された。

- (3) デングウイルスの非構造蛋白質を 293T 細胞に発現させ、アフィニティー精製によって共精製される宿主因子を 430 種類同定した。
- (4) 上記プロテオミクス解析によって同定された因子群の中から、バイオインフォマティクス解析により 120 種類の蛋白質を要解析候補宿主因子として抽出した。
- (5) そのうち 88 種類の蛋白質をコードする遺伝子の cDNA のクローニングを行い、FLAG タグ付き哺乳動物細胞発現ベクターを作成した。
- (6) これら因子の細胞内局在に関してデングウイルス感染 HepG 2 細胞を用いて調べたところ、10 種類の蛋白質がウイルス蛋白質と共局在することが示された。
- (7) デングウイルスと同じフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルスを用いて、ウイルスの増殖における、これら因子群の強発現の影響を調べたところ、7 種類の蛋白質に関して強いウイルス増殖阻害効果(対照に比べ 1/10 以下)が認められた。
- (8) ウイルス複製複合体の定量プロテオミクス解析より、ESCRT 因子である CHMP5、CHMP6、CHMP7 が感染特異的に複製複合体にリクルートされることが示された。
- (9) ESCRT の優勢変異体を発現させたところ、VPS4A、VPS4B、CHMP5、CHMP6 の発現において著しい増殖阻害(対照に比べ 1/1000 以下)が認められた。
- (10) ウイルス感染細胞内において各種 ESCRT 因子の局在を調べたところ、CHMP7 及び VPS4A がウイルス蛋白質と共局在していることが示された。
- (11) ウイルス複製複合体の定量プロテオミクス解析より、宿主細胞のオートファゴソームのマーカーである LC3 が感染特異的に複製複合体にリクルートされることが示された。
- (12) デングウイルスを感染させると細胞内においてオートファゴソームマーカーである LC3 の輝点形成が認められた。
- (13) 各種 ATG 関連遺伝子欠損マウス繊維芽細胞(ATG3^{-/-}、ATG5^{-/-}、ATG7^{-/-}、ATG9L1^{-/-}、ATG14L^{-/-}、FIP200^{-/-}、Beclin^{-/-}、Rubicon^{-/-}、p62^{-/-})に、日本脳炎ウイルスを感染させその増殖能を調べたところ、FIP200^{-/-}および p62^{-/-}細胞において著しいウイルス増殖阻害(対照に比べ 1/100 以下)が認められた。

IV. 平成 25～26 年度の課題

- (1) プロテオミクス解析によって同定された宿主因子とウイルス蛋白質の直接結合を Yeast two hybrid 法を用いて検索する。
- (2) 直接結合する宿主因子及びウイルス蛋白質に関して、種々の末端欠損変異体を作成し、どのアミノ酸配列が結合に必要なか明らかにする。
- (3) ウイルス蛋白質に結合できない宿主因子、あるいは宿主因子に結合できないウイルスを作成し、その変異のウイルス増殖能に与える影響を調べ、その相互作用の重要性を検討する。
- (4) 宿主因子の結合部位とウイルス蛋白質をそれぞれ大腸菌で発現させ蛋白質の精製を試みる。
- (5) 宿主因子の結合部位とウイルス蛋白質の共結晶を作成し X 線結晶構造解析を試みる。
- (6) 同定された宿主因子に結合する低分子化合物をケミカルアレイチップを用いて検索する。
- (7) マウス細胞で増殖することが可能な適応変異の入ったデングウイルスを作成し、各種オートフ

テジー遺伝子欠損マウス繊維芽細胞でのデングウイルスの増殖能について検討する。

(8) インフルエンザウイルスを用いた各種プロテオミクス解析を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 新興再興感染症として早急な対策が求められているデングウイルスやインフルエンザウイルスの増殖に必須な新規宿主因子を同定することで、抗ウイルス薬開発につながる情報を提供できる可能性がある。

(2) 宿主因子-ウイルス因子相互作用を構造生物学的レベルで解析することにより *in silico*での創薬につながる情報を提供することが可能となる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(発表論文)

(1) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, **Morita E**, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol*. 2012 Oct 24.

(2) **Morita, E.**, Aarii J, Christensen D, Votteler J, Sundquist WI. Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *Biotechniques*. 2012 Aug;0(0):1-5.

(3) Tripathi, L.P., Kambara, H., Moriishi, K., **Morita, E.**, Abe, T., Mori, Y., Chen, Y.A., Matsuura, Y., Mizuguchi, K. Proteomic analysis of hepatitis C virus (HCV) core protein transfection and host regulator PA28 γ knockout in HCV pathogenesis: a network-based study. *J Proteome Res*. 2012 Jul 6;11(7):3664-79.

(4) Fukuhara, T., Kambara, H., Shiokawa, M., Ono, C., Katoh, H., **Morita, E.**, Okuzaki, D., Maehara, Y., Koike, K., Matsuura, Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol*. 2012 Aug;86(15):7918-33.

(5) **Morita, E.**, Yoshimori, T. Membrane recruitment of LC3 proteins during autophagosome formation. *Hepato Res*. 2012 42:435-441.

(6) **Morita, E.** ESCRT Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. *FEBS J*. 2012 279:1399-406.