

- (3) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, Y. Wang, M. Inoue, R. Kawahara, **R. Maekura**, Y. Ozeki, H. Ogura, **K. Kobayashi**, Y. Suzuki, and **S. Matsumoto**. 2012. Dominant Incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. PLoS One 7: e42505.
- (4) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. L. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto**. 2012. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J. Biol. Chem. 287: 27743-27752.
- (5) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto**. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- (6) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto**. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Vaccine 29:6881-6887.

・研究分担者 杉田 昌彦

- (1) Morita D, Hattori Y, Nakamura T, Igarashi T, Harashima H, **Sugita M**. 2012. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaque monkeys. Infect. Immun. In press.

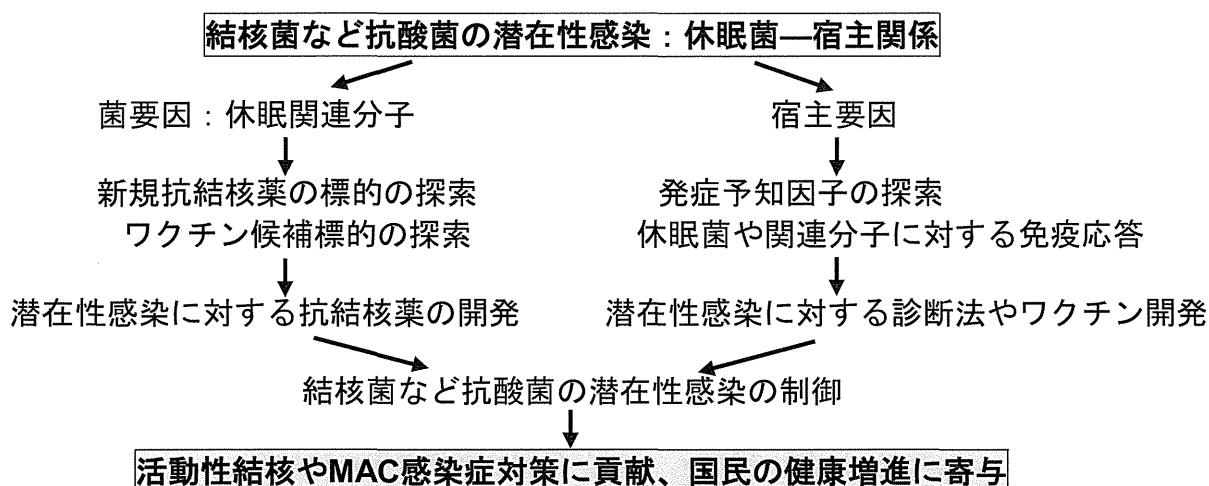
・研究分担者 小出 幸夫

- (1) Seto S, Tsujimura K, Horii T, **Koide Y**. Mycobacterial survival in macrophages in the lung as a result of coronin-1a inhibition of autophagosome formation. Hyatt MA, ed., Autophagy: cancer, other pathologies, inflammation, immunity, and infection. Elsevier. In press.
- (2) Nagata T, **Koide Y**. Identification of T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* with biolistic DNA vaccination. Methods Mol. Biol. In press.
- (3) Nagata T, **Koide Y**. 2012. Immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* and the vaccine strategies. Cardona, P-J, ed., Understanding tuberculosis – Analyzing the origin of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. In Tech p. 391-414.
- (4) Kono M, Nakamura Y, Kato M, Ozawa Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Imui N, Suda T, Uchijima M, Tsujimura K, Nagata T, **Koide Y**, Giermasz AS, Kalinski P, Nakamura N, Chida K. 2012. Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. Vaccine 30: 2633-2639.
- (5) Seto S, Tsujimura K, **Koide Y**. 2012. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. Cell. Microbiol. 14: 710-727.
- (6) Seto S, Tsujimura K, **Koide Y**. 2011. Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. Traffic 12: 407-420.

・研究分担者 前倉 亮治

- (1) Yano Y, Kitada S, Mori M, Kagami S, Taguri T, Uenami T, Namba Y, Yoneda T, Yokota S, **Maekura R**. 2012. Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: A retrospective study of 44 Cases in Japan. Respiration In press.
- (2) Kitada S, Uenami T, Yoshimura K, Tateishi Y, Miki K, Miki M, Hashimoto H, Fujikawa T, Mori M, Matsuura K, Kuroyama M, **Maekura R**. 2012. Long-term radiographic outcome of nodular bronchiectatic *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Int J Tuberc. Lung Dis. 16: 660-664.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



潜在性感染は結核菌—宿主関係を基盤とし、結核菌は代謝の低下した休眠状態、宿主は防御免疫を誘導することにより、成立していることが考えられる。従来、結核対策（感染症法：2類）は活動性患者の早期発見や治療など、増殖期結核菌感染による活動性結核に対する抗微生物化学療法を中心に構築されてきた。結核発病の多くが無症候性潜在性感染からの内因性再燃に起因（約70%）していることから、潜在性結核菌感染の細胞・分子機序の解明は診断、治療：新規抗結核薬や予防：ワクチン研究開発を推進し、結核対策に基盤を提供することが期待される。また、結核近縁MAC感染症は近年増加傾向、かつ、薬剤耐性であることから、対応に苦慮している。本研究の成果はMAC感染症対策にも寄与することが期待される。

2年間の研究成果として、1) 菌要因：休眠関連分子、2) 宿主要因、3) 診断抗原の探索および免疫診断、4) 新規抗結核薬の標的の探索、5) ワクチン候補標的の探索が挙げられる。

**特記事項**として、下記の2点が挙げられる。

1. 基礎的研究

平成23年 小林 六造 記念賞（日本細菌学会）

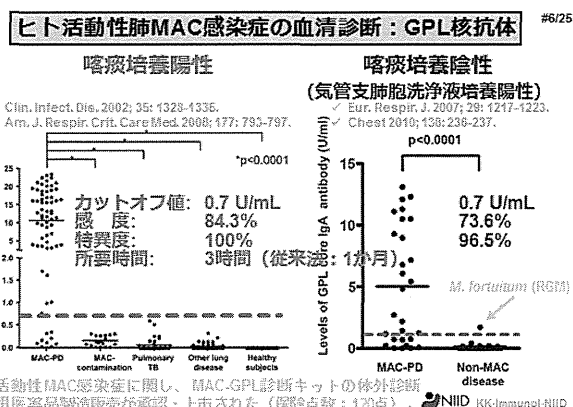
受賞者：研究分担者 松本 壮吉 准教授（大阪市立大学大学院医学研究科細菌学）

研究課題：結核菌の病原性および増殖制御機構の分子遺伝学的解析と応用研究

結核菌の増殖制御機構を解析し、潜在性結核菌感染における休眠菌の解明に寄与した。

2. 橋渡し医学研究

2011(平成23)年8月、活動性Mycobacterium avium complex (MAC) 感染症に関し、MAC-GPL診断キット(キャピリア® MAC抗体ELISA タウンズ)が保険医療項目として、また、2012年9月から民間の臨床検査機関である株式会社BMLがMAC-GPL診断キットを導入し、普及を促進した。この診断キットの感度：84%、特異度：100%、所要時間の大幅短縮：3時間（従来法：約1か月）、かつ、非侵襲性であり、今後、MAC感染症の診療に威力を発揮することが期待される。



## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1982年09月-1985年08月	アメリカ合衆国コネチカット大学医学部病理学博士研究員
1985年09月-1995年06月	昭和大学助手・専任講師・助教授・医学部・第1内科学・細菌学
1997年04月-1999年06月	国立感染症研究所ハンセン病研究センター-生体防御部長
1999年07月-2006年06月	大阪市立大学大学院教授・医学研究科感染防御学分野
2006年07月-現在	国立感染症研究所免疫部長（厚生労働技官）

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

コネチカット大学：	吉田 彪 博士	肉芽腫炎症の細胞・分子機構、免疫病理学
	Stanley Cohen 博士	サイトカイン生物学
昭和大学医学部：	笠間 毅 博士	リウマチ性疾患の炎症機序
	笠原 慶太 博士	肉芽腫炎症とサイトカイン
大阪市立大学大学院医学研究科：		
	前田 伸司 博士	結核の分子疫学、薬剤耐性機構
	藤原 永年 博士	結核菌糖脂質の病原性や血清診断
	松本 壮吉 博士	結核菌蛋白質の病原性やワクチン開発

### ・主な研究課題

抗酸菌感染症の戦略的制圧研究  
肉芽腫炎症の細胞・分子機構  
自己免疫およびアレルギー-疾患の分子医学

### ・これまでの研究実績

1. Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, **K. Kobayashi**, Y. Suzuki, and S. Matsumoto. 2012. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. *PLoS One* 7: e42505.
2. Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2012. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. *J. Bacteriol.* 194: 6336.
3. Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2012. A novel mechanism underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 287: 27743-27752.
4. Onodera, T., Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama, S. Hachimura, T. Kurosaki, and **K. Kobayashi**. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 2485-2490.
5. Matsumura, T., M. Ato, T. Ikebe, M. Ohnishi, H. Watanabe, and **K. Kobayashi**. 2012. Interferon-gamma-producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections. *Nat. Commun.* 3. Article number: 678.
6. Mitsuki, Y.-y., K. Terahara, K. Shibusawa, T. Yamamoto, T. Tsuchiya, F. Mizukoshi, M. Ishige, S. Okada, **K. Kobayashi**, Y. Morikawa, T. Nakayama, M. Takeda, Y. Yanagi, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2012. HIV-1 Infection ex vivo accelerates measles virus infection by

- upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Virol.* 86: 7227-7234.
7. Kasama, T., H. Furuya, R. Yanai, K. Ohtsuka, R. Takahashi, N. Yajima, Y. Miwa, and **K. Kobayashi**. 2012. Correlation of serum CX3CL1 level with disease activity in adult-onset Still's disease and significant involvement in hemophagocytic syndrome. *Clin. Rheumatol.* 31: 853-860.
  8. 活動性 *Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症に関し、MAC-GPL 診断キット (キヤピリア<sup>®</sup> MAC 抗体 ELISA タウンズ) の体外診断用医薬品製造販売が承認・上市 (保険点数: 120 点) され、保険医療として、臨床使用を開始した (2011 年 8 月 22 日)。
  9. **Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto.** 2011. **Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis.** *J. Disaster Res.* 6: 443-450.
  10. Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* Tokyo 172 substrain. *J. Biol. Chem.* 286: 44153-44161.
  11. Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi**, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 193: 5766-5774.
  12. Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*. *Vaccine* 29: 6881-6887.
  13. Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. *PLoS One* 6: e20985.
  14. Terahara, K., T. Nochi, M. Yoshida, Y. Takahashi, Y. Goto, H. Hatai, S. Kurokawa, M. H. Jang, M.-N. Kweon, S. E. Steven, T. Hiroi, Y. Yuki, Y. Tsunetsugu-Yokota, **K. Kobayashi**, and H. Kiyono. 2011. Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 822-828.
  15. Kasama, T., M. Sato, T. Odai, T. Isozaki, and **K. Kobayashi**. 2010. The CX3CL1/CX3CR1 axis is a sensitive marker of the response to anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol. Musculoskel. Med.* 1: 19-25.
  16. Kasama, T., K. Ohtsuka, M. Sato, R. Takahashi, K. Wakabayashi, and **K. Kobayashi**. 2010. Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases. *Arthritis* 2010: article ID 106202.
  17. Tomizawa, K., T. Nagao, R. Kusunoki, K. Saiga, M. Oshima, **K. Kobayashi**, T. Nakayama, M. Tanokura, and K. Suzuki. 2010. Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis. *Rheumatology* 49: 1245-1256.
  18. Sena, C.B.C., T. Fukuda, K. Miyanagi, S. Matsumoto, **K. Kobayashi**, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Kinoshita, and Y.S. Morita. 2010. Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285: 13326-13336.
  19. Ikebe, T., M. Ato, T. Matsumura, H. Hasegawa, T. Sata, **K. Kobayashi**, and H. Watanabe. 2010. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog.* 6: e1000832.
  20. Kitada, S., **K. Kobayashi**, Y. Nishiuchi, K. Fushitani, K. Yoshimura, Y. Tateishi, K. Miki, M.

- Miki, H. Hashimoto, M. Motone, T. Fujikawa, T. Hiraga, and R. Maekura. 2010. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex proven by bronchial wash culture. *Chest* 138: 236-237.
21. Ozeki Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2010. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. *Int. Immunol.* 22: 179-189.
  22. Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog.* 5: e1000643.
  23. Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.* 46: 6-12.
  24. Yamamoto, T., Y. Tsunetsugu-Yokota, Y.-y. Mitsuki, F. Mizukoshi, T. Tsuchiya, K. Terahara, Y. Inagaki, N. Yamamoto, **K. Kobayashi**, and J.-i. Inoue. 2009. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog.* 5: e1000279.
  25. Takahashi, Y., H. Hasegawa, Y. Hara, M. Ato, A. Ninomiya, H. Takagi, T. Odagiri, T. Sata, M. Tashiro, and **K. Kobayashi**. 2009. Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199: 1629-1637.
  26. Mizukoshi, F., T. Yamamoto, Y.-y. Mitsuki, K. Terahara, A. Kawana-Tachikawa, **K. Kobayashi**, A. Iwamoto, Y. Morikawa, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2009. Activation of HIV-1 Gag-specific CD8<sup>+</sup> T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. *Microbes Infect.* 11: 191-197.
  27. Fujiwara, N., and **K. Kobayashi**. 2008. Chapter IV. Mycobacterial glycolipids and host responses. *Glycolipids: New Research*. Sasaki, D., editor. Nova Science Publishers: New York/USA. 99-116. ISBN: 978-60456-216-3
  28. Kitada, S., **K. Kobayashi**, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. 2008. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177: 793-797.
  29. Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, **K. Kobayashi**, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 190: 1064-1071.
  30. Mitsuki, Y.-y., K. Ohnishi, H. Takagi, M. Oshima, T. Yamamoto, F. Mizukoshi, K. Terahara, **K. Kobayashi**, N. Yamamoto, S. Yamaoka, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2008. A single amino acid substitution in the S1 and S2 Spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. *Microbes Infect.* 10: 908-915.
  31. Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and **K. Kobayashi**. 2007. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 189: 8241-8249.
  32. Bhatt, A., N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S. A. Porcelli, **K. Kobayashi**, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 5157-5162.
  33. Kitada, S., Y. Nishiuchi, T. Hiraga, N. Naka, H. Hashimoto, K. Yoshimura, K. Miki, M. Miki,

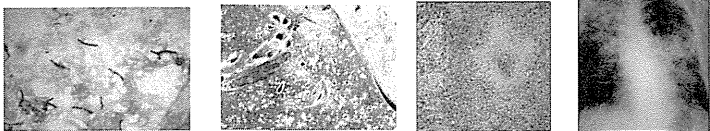
- M. Motone, T. Fujikawa, **K. Kobayashi**, I. Yano, and R. Maekura. 2007. Serological test and chest computed tomography findings in patients with *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Eur. Respir. J.* 29: 1217-1223.
34. Fujiwara, N., N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano, and **K. Kobayashi**. 2007. Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J. Bacteriol.* 189: 1099-1108.
35. Wada, T., S. Maeda, A. Hase, and **K. Kobayashi**. 2007. Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Med. Microbiol.* 56: 1052-1057.
36. Matsumoto, S., M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, and **K. Kobayashi**. 2005. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* 175: 441-449.
37. Maekura, R., Y. Okuda, A. Hirotsu, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, I. Yano, **K. Kobayashi**, and M. Ito. 2005. Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3150-3158.
38. Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and **K. Kobayashi**. 2005. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 44-51.
39. Fujiwara, N., and **K. Kobayashi**. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4: 281-286.
40. Aoki, K., S. Matsumoto, Y. Hirayama, T. Wada, Y. Ozeki, M. Niki, P. Domenech, K. Umemori, S. Yamamoto, A. Mineda, M. Matsumoto, and **K. Kobayashi**. 2004. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 279: 39798-39806.
41. Wada, T., S. Maeda, A. Tamaru, S. Imai, A. Hase, and **K. Kobayashi**. 2004. Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5277-5285.
42. Kitada, S., R. Maekura, N. Fujiwara, I. Yano, T. Ogura, M. Ito, and **K. Kobayashi**. 2002. Serodiagnosis of pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex with an enzyme immunoassay that uses a mixture of glycopeptidolipid antigens. *Clin. Infect. Dis.* 35: 1328-1335.
43. Maeda, S., M. Matsuoka, N. Nakata, M. Kai, Y. Maeda, K. Hashimoto, H. Kimura, **K. Kobayashi**, and Y. Kashiwabara. 2001. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3635-3639.
44. Kasama, T., F. Shiozawa, **K. Kobayashi**, N. Yajima, M. Hanyuda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2001. Vascular endothelial growth factor expression by activated synovial leukocytes in rheumatoid arthritis. Critical involvement of the interaction with synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 44: 2512-2524.
45. Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and **K. Kobayashi**. 2001. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* 69: 810-815.
46. **Kobayashi, K.**, K. Kaneda, and T. Kasama. 2001. The immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.* 53: 241-245.
47. Lu, J., T. Kasama, **K. Kobayashi**, Y. Yoda, F. Shiozawa, M. Hanyuda, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of

- murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 164: 5922-5927.
48. Kasama, T., **K. Kobayashi**, N. Yajima, F. Shiozawa, Y. Yoda, H.T. Takeuchi, Y. Mori, M. Negishi, H. Ide, and M. Adachi. 2000. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 121: 533-538.
  49. Hamasaki, N., K. Isowa, K. Kamada, Y. Terano, T. Matsumoto, T. Arakawa, **K. Kobayashi**, and I. Yano. 2000. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.* 68: 3704-3709.
  50. Saita, N., N. Fujiwara, I. Yano, K. Soejima, and **K. Kobayashi**. 2000. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect. Immun.* 68: 5991-5997.

### 潜在性抗酸菌感染症の病態機構の解明 及び診断・治療・予防に関する研究 (H23-新興-一般-080)

研究代表者: 小林 和夫  
国立感染症研究所免疫部

E-mail: kobayak@niid.go.jp  
http://www.niid.go.jp/niid/immunology



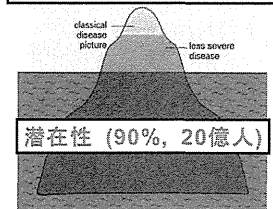
KK-Immunol NIID

### 潜在性 VS 活動性結核

**潜在性結核菌感染 (90%)**  
 ● 世界: 20億人、日本: 0.25億人  
 ● TSTやIGRA (QFT) 陽性  
 ● 胸部X線: 著変なし  
 ● 呼吸器症状: なし  
 ● 喀痰検査: 陰性、無症候性結核菌

**活動性肺結核 (10%)**  
 ● 世界: 870万人 日本: 2.3万人  
 ● TSTやIGRA (QFT) 陽性  
 ● 胸部X線: 病的陰影 (結節、浸潤、胸水・胸膜炎など)  
 ● 呼吸器症状: 咳嗽、喀痰・血痰など  
 ● 喀痰検査: 陽性、無症候性結核菌  
 ● 培養検査: 塗抹や遺伝子増幅・培養陽性

活動性 (10%, 870万人)



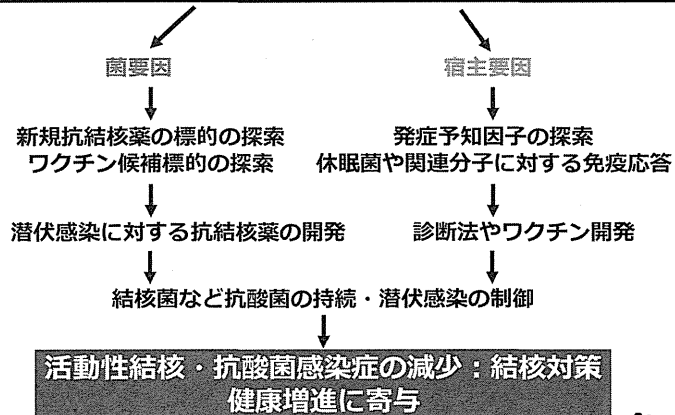
潜在性感染 → 内因性再燃 → 活動性結核 (70-80%)

### 結核対策: 発生動向・疫学・診断・治療・予防

- 活動性結核・抗酸菌感染症: 早期発見、治療、隔離、接触調査
- 潜在性結核菌・抗酸菌感染症: 菌および宿主要因、治療

KK-Immunol NIID

### 目的や期待される成果: 潜在性抗酸菌感染 (休眠菌-宿主関係)



KK-Immunol NIID

### 休眠期発現蛋白質による持続性潜在結核菌感染を検出する診断法の開発

**方法** 酵素抗体法 (EIA) による血清IgG抗体検出

**抗原** 増殖期に発現が増大する結核菌蛋白質: ESAT6, CFP10, Antigen 85A, Antigen 85B  
 休眠期に発現が増大する結核菌蛋白質: MDP1, Acr, HBHA, HrpA

**DNA Microarray解析: 低酸素下**  
 休眠期 < 増殖期 休眠期 > 増殖期  
 1,239 929

**血清** 健常対象者: 大阪市立大学医学部・学生 (n=17)  
 活動性肺結核患者: NHO刀根山病院ならびに大阪社会医療センターの結核患者 (n=18)  
 治療後陳旧性 (潜在性) 肺結核: NHO刀根山病院の結核治療歴のある患者 (n=31)

KK-Immunol NIID

### 結核菌蛋白質に対するヒト血清抗体応答 -Ag85AやMDP1抗体価は陳旧性結核を反映する-

● 潜在性結核菌感染部位では「分裂増殖期」と「休眠期」結核菌が混在している可能性

	HC (n=17)	active TB (n=15)	old TB (n=15)
ESAT6	0.0% (1)	20.0% (3)	6.7% (1)
CFP10	6.7% (1)	53.3% (8)	33.3% (5)
Acr	0.0% (0)	60.0% (9)	60.0% (9)
DosS	0.0% (0)	6.7% (1)	13.3% (2)
Ag85A	6.7% (1)	33.3% (5)	86.7% (13)
Ag85B	0.0% (0)	13.3% (2)	33.3% (5)
HBHA	6.7% (3)	6.7% (1)	20.0% (3)
HrpA	0.0% (0)	0.0% (0)	0.0% (0)
MDP1	0.0% (0)	13.3% (2)	60.0% (9)
PPDs	6.7% (1)	46.67% (7)	20.0% (3)

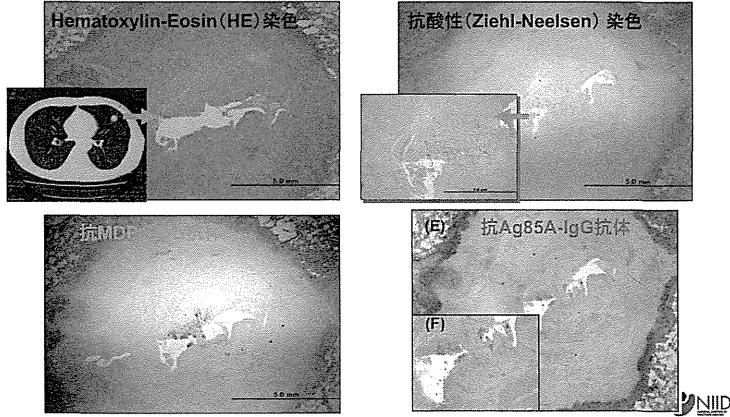
分裂増殖期発現:  
ESAT6, CFP10, Ag85, PPD

休眠期発現:  
MDP1, Acr, DosS, HBHA, HrpA

Microbiol. Immunol., in press.

KK-Immunol NIID

### ヒト肺結核肉芽腫における結核菌蛋白質の発現 -抗MDP1やAg85抗体は潜在結核菌 (特に、乾酪壊死) を検出する-



NIID





## 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：国際的なバイオリスク管理の基準に基づく病原体取扱いと管理のモデル総合システムの構築と検証に関する研究

課題番号：H23-新興-一般-009

予定期間：H23年度からH25年度まで

研究代表者：杉山 和良

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：バイオセーフティ管理室

職名：室長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 27,636,000 円 2年目 24,015,000 円

## I. 研究の意義

(1) 我が国では感染症法に規定されている病原体取扱施設の施設要件の達成が先行し、バイオリスクに対して総合的に緩和を図り、バイオリスク管理の強化の取り組みは始まったばかりで、基準、ロールモデル、評価対象、方法論が確立していない。

(2) バイオリスク管理の考え方がWHOのガイダンスで示された。欧州標準化委員会でも国際的な基準が示されているが、我が国においては、バイオリスク管理については一部実施されているところもあるが、全体的には概念そのものの理解も不十分な状況である。本研究ではバイオリスク管理のモデルを示し、実際の導入を行い、バイオリスク管理を評価し、最終的に病原体取扱施設での適正なバイオリスク管理システムを構築することができる。

(3) バイオリスク管理教育・訓練に必要な各種実証データを収集し、教材に反映させ、有効な研修を行うことができる。

(4) テロ対策、新興感染症対策として、国際的連携と協調を保った国内のバイオリスク対策の実現が必要である。

(5) バイオリスク管理は長期的に費用対効果が高く、組織・施設の存続に効果的であるということが知られていない。

## II. 研究の目的、期待される成果

(1) インフルエンザパンデミック対策でWHOが参考としたCWA15793のバイオリスク管理基準と、それを参照し改訂された欧米の指針を分析し、バイオリスク委員会の役割の設定、試料管理を含むバイオリスクの管理運用の仕組みの構築、バイオリスク評価の導入、教育研修プログラム導入の総合モデルを2～3か所の特徴的施設で設計し、バイオリスク管理の導入前後での研究活動におけるインパクトを検証する。

(2) 病原体取扱施設のバイオリスク管理体制の確立に有用な指標を提示する。

(3) 病原体取扱施設でのバイオリスク管理システムの向上を図ることができる。

(4) 様々な不測の事態へ対応できる人材養成と、リスク評価に基づく臨機応変な対応を可能とするバイオリスクの管理体制の仕組みへと改善し、国民及び環境の保護と社会の安全確保に貢献できる。

(5) 国際的に標準化されたバイオセーフティ教育プログラムを、臨床検体や病原体を取扱う国内外の実験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

### Ⅲ. 2年間の研究成果

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

#### ・研究代表者(杉山)

(1) 実験室での基本的なバイオセーフティに必要な知見の実証と教育教材の検討を行った。

病原体輸送容器の耐久性の実証実験を行った。消毒・滅菌処理後に規定の強度試験（内圧試験、破裂試験、落下試験、積み重ね試験）を行い、有効な結果が得られた。ドライアイスによる容器破裂の衝撃から病原体の漏出を防止する梱包方法について検討した結果、有効な梱包方法を見出した。

温度、時間、被滅菌物内の水蒸気量の調節、被滅菌物の状況等により様々な条件を作出した上で高圧蒸気滅菌処理を施し、各条件下における滅菌効果について検討し、水蒸気を効率よく被滅菌物内に充満させる方法を見出した。

以上の成績は、各種研修等で動画を使用するなどし、教育効果を検討した。

(2) 民間輸送会社が病原体を運搬することに対する風評被害への懸念あることから、一般人を対象としたグループインタビューによるイメージ調査の結果を受け、ネット調査による3,000人を対象とした量的調査の成績の解析を行った。

(3) 海外のバイオリスク管理に必要な研修に参加し、マネジメント、BSL3施設等に関する情報収集を行った。

#### ・研究分担者(清水)

(1) WHO/WPRO バイオセーフティトレーニングワークショップにて行われたWHOポリオウイルス実験室ネットワークでの標準的なバイオセーフティ教育訓練に参加し、それを我が国で実施された国際ポリオ研修に導入し、評価を行った。

(2) WHO野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階評価報告書作成以降、ポリオウイルスを新たに保有した可能性を有する研究施設を複数の調査により抽出した。

#### ・研究分担者(重松)

(1) 感染症発生動向調査の継続に必要な梱包要件を満たす四次容器を開発した。

(2) バイオセーフティ専門家認証等、バイオリスク管理に関わる海外情報の収集・提供を継続して行った。

#### ・研究分担者(藤本、重松)

(1) 演習用3Dプラットフォームの改良のための複数プラットフォームを比較分析した。

(2) 既存大学実験室を国際基準に準じたモデル実験室へ改良するため、必要機材を搬入してデザインを変更し、その後の状況を分析して解決すべき課題を探求した。

(3) バイオリスク管理の基本の学習に有用な教材の内容分析を行った。

#### ・研究分担者(御手洗、安藤、重松)

(1) 教育用に開発した安全キャビネットを使用した結核菌取扱い研修を実施し評価を行った。

・研究分担者(安藤、佐多、重松)

- (1) WHO「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2011-2012 版」の日本語翻訳を行い、HPでの閲覧ができるようにした。
- (2) 地方衛生研究所のバイオリスク管理の現状に関するアンケート調査を行った。

#### IV. 平成 25 年度の課題

- (1) 臨床検査室、遺伝子組換え実験施設、動物実験施設へのバイオリスク管理システム導入と検証
- (2) 施設への導入に際しての手引き様の参考資料の作成
- (3) 最も効率的なバイオリスク管理基準の国内普及及び定着にむけた方法論および施設設計の検討
- (4) 病原体取扱施設及びバイオリスク管理者の認定の仕組みの構築に関する調査研究
- (5) 地方衛生研究所のリスク管理（災害時を含む）教育の強化
- (6) バイオリスク評価に基づく管理の理論と実践についてのまとめの作成

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 病原体等取扱施設のバイオリスク管理体制の査察等に有用な評価指標の提供が期待される
- (2) 感染症法のハード面の基準の妥当性について利用できる情報の提供
- (3) 感染症法の病原体管理面でのバイオリスク管理者の適格性について利用できる情報の提供
- (4) 野生株ポリオウイルス保有実験室の継続調査により、WHO ポリオ根絶認定委員会年次報告書等に病原体管理情報を提供する

#### 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。

杉山：(1) Iki S, Horiguchi I, Shigematsu M, Sata T, Sugiyama K. Qualitative Analysis of the Perception and Acceptability of Pathogen Transport among Housewives Using Focus Group Interviews. Jpn. J. Infect. Dis. 2012; 65(5), 403-409.

(2) 杉山和良：実験室におけるバイオハザード、リスク評価、病原微生物のリスク分類 組織管理と健康管理 バイオセーフティの原理と実践. 39-45, 50-54, 54-58, 73-85, 2011.

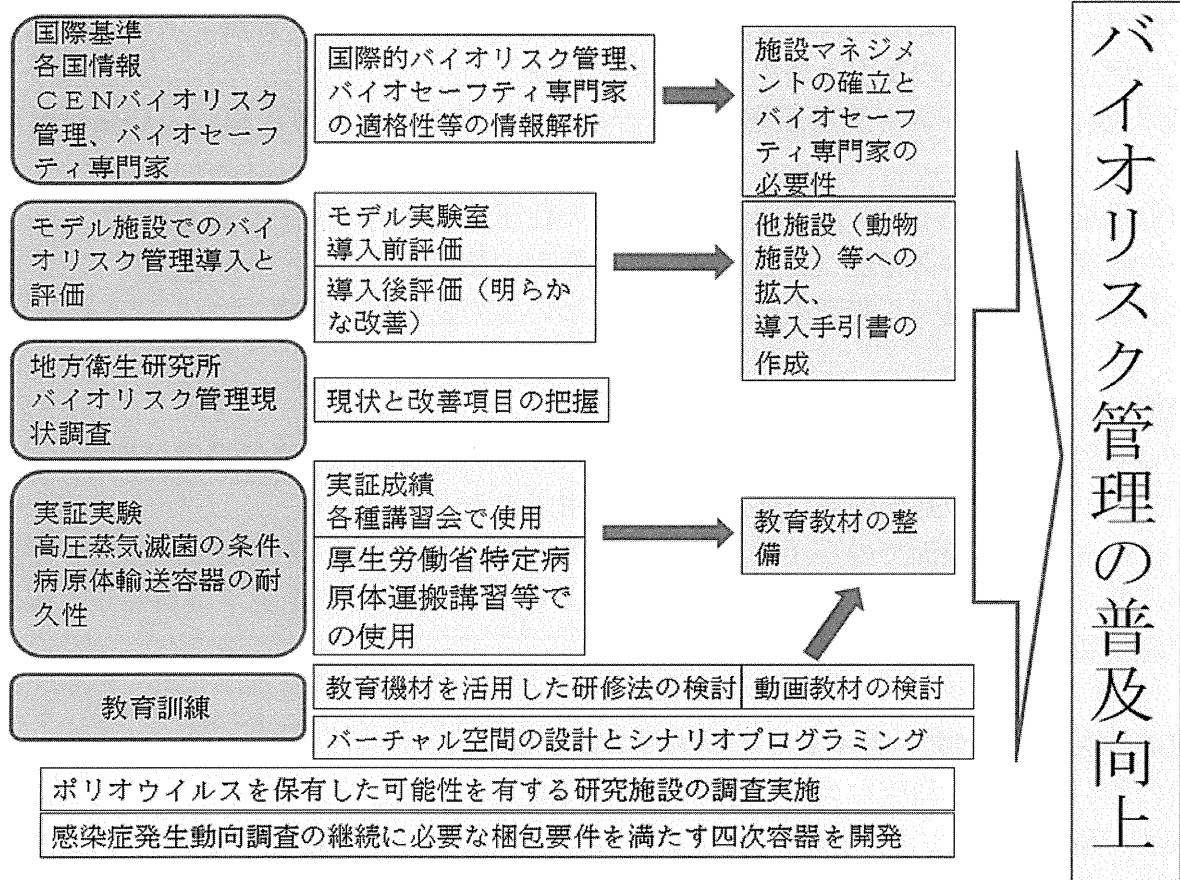
(3) 杉山和良：病原体の適正管理 取扱施設における管理システム. 病原体の適正管理と輸送の現状と課題. 化学療法の領域. 105-109, 2011.

(4) 高木弘隆、杉山和良：新規技術により作成した二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)不織布の光触媒反応によるウイルス不活性化効果についての検討. 感染症学雑誌. 85(3): 244-249, 2011.

重松：(1) 世界保健機関「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2011-2012 版」日本語翻訳 (WHO 出版物翻訳・監修)

### Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



## ●研究代表者の研究歴等

※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

昭和53年—56年 株式会社三菱油化メディカルサイエンス研究所

昭和56年—56年 国立予防衛生研究所(現:国立感染症研究所)

昭和61年—63年 英国自然環境研究院ウイルス研究所

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

北村敬(国立予防衛生研究所)、梁川良(北海道大学)、Dr. D. Bishop(英国自然環境研究院ウイルス研究所)、小野悌二(三菱油化メディカルサイエンス研究所)、小松俊彦、森田千春、有川二郎、松浦善治、森川茂(国立感染症研究所)

### ・主な研究課題

- ・腎症候性出血熱ウイルスの疫学、性状、診断法の開発に関わる研究
- ・バキュロウイルスを用いた腎症候性出血熱ウイルスの構造タンパクの発現
- ・安全キャビネットの経過観察と保守プログラムに関する研究
- ・感染研バイオリスク管理講習会の強化に関する研究
- ・病原微生物の取扱におけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究
- ・バイオリスク管理の包括的強化及び必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究

### ・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. ***Iki S, Horiguchi I, Shigematsu M, Sata T, Sugiyama K. Qualitative Analysis of the Perception and Acceptability of Pathogen Transport among Housewives Using Focus Group Interviews. Jpn. J. Infect. Dis. 2012; 65(5), 403-409.***
2. ***杉山和良: 実験室におけるバイオハザード、リスク評価、病原微生物のリスク分類、組織管理と健康管理 バイオセーフティの原理と実践 39-45, 50-54, 54-58, 73-85, 2011***
3. ***杉山和良: 病原体の適正管理 化学療法の領域 Vol. 27, No. 1, 105-109, 2011***
4. 高木弘隆、***杉山和良: 新規技術により作成した二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)不織布の光触媒反応によるウイルス不活性化効果についての検討、感染症学雑誌 第85巻 第3号、244-249、2011***
5. ***杉山和良: 実験室のバイオセーフティ 必携 バイオセーフティ指針 岡田淳編集 39-67, 2010***
6. 杉山和良: バイオセキュリティの国際基準と日本 感染症 Vol. 39, No. 6, 9-18, 2009
7. 杉山和良: ズーノーシスハンドブック 岸本寿男、山田章雄監修 バイオリスク管理(マネジメント) 20-22, 2009
8. 杉山和良: 食品微生物学辞典 バイオセーフティ、バイオハザード他 2009

9. 杉山和良：注意すべきウイルス感染症 アウト・ブレイクにどう対応するのか 診断と治療 Vol. 97, No. 3, 165-171, 2009
10. 杉山和良：バイオセーフティからバイオセキュリティ 感染・炎症・免疫 Vol. 38, No. 4, 345-357, 2008
11. 杉山和良：バイオセーフティの事典 小松俊彦編集 分担；第4章 バイオセーフティの組織体制と活動、第7章 病原体の取扱い みみずく舎／医学評論社, 2008
12. 杉山和良：感染症法における病原体の分類と管理体制 化学療法の領域 Vol. 24, No. 4, 547-552, 2008
13. 杉山和良：V 病原体の輸送 病原体等安全取扱・管理指針 日本細菌学会 85-100, 2008
14. 宮村達男、杉山和良、佐多徹太郎、安藤秀二、重松美加：感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2007-2008 版 WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2007
15. 杉山和良：改正感染症法と CDC ガイドラインについて 月刊薬事 Vol. 49, No. 11, 1699-1704, 2007
16. 杉山和良：病原微生物等の適正管理の実際 公衆衛生 Vol. 71, No. 10, 841-844, 2007
17. 高木弘隆、杉山和良 ネコカリシウイルス (FCV) を代替としたノロウイルス (NV) 不活性化効果の検討 アルカリ剤、過酸化水素および過炭酸ナトリウムによる不活性化効果一、医学と薬学 57(3) : 311-312, 2007
18. 安藤秀二、佐多徹太郎、重松美加、杉山和良、倉田毅、中嶋建介：バイオリスクマネジメント 実験施設バイオセキュリティガイダンス WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2006
19. 北村敬、小松俊彦、杉山和良、森川茂 (北村敬、小松俊彦監修)：実験室バイオセーフティ指針 3 版 WHO (翻訳) バイオメディカルサイエンス研究会 2006
20. 杉山和良：B ウイルス感染症 獣医感染症カラーアトラス, 325-326, 文永堂出版, 2006
21. 倉田毅、杉山和良、安藤秀二、重松美加、篠原克明、高木弘隆、富田康浩：感染性物質の輸送規則に関するガイダンス WHO (翻訳) 国立感染症研究所 2005
22. 杉山和良：バイオハザード対策用クラス II キャビネット キャビネットの使い方 空気清浄 Vol. 43, No. 2, 51-58, 2005
23. 杉山和良：バイオセーフティのあり方 汚染時の対応 臨床と微生物 Vol. 32, 増刊号, 575-579, 2005
24. 杉山和良：医学研究におけるバイオセーフティとバイオセキュリティ Mebio (メジカルビュー社) 73 2005
25. 杉山和良：バイオセーフティの考え方と実践 静電気学会誌 Vol. 28, No. 3, 220-224, 2004
26. 杉山和良：バイオハザード病原体 ファルマシア Vol. 40, No. 3, 220-224, 2004
27. 杉山和良：SARS の実験室感染とその対策 感染症と化学療法 37 日経 大阪 2004
28. 杉山和良：実験動物施設におけるバイオセキュリティ 実験動物と環境 Vol. 11, No. 2, 105-109, 2003
29. 杉山和良：腎症候性出血熱 動物由来感染症その診断と対策 92 真興交易 (株) 東京 2003
30. Morita C, Inoue S, Sugiyama K, Kitamura T. Different transmissibility of 2 isolates of Seoul virus from the same wild brown rat (*Rattus norvegicus*). J. Vet. Med. Sci. 56:549-550. 1994







## 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：我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に  
関する研究

課題番号：H23-新興-一般-10

予定期間：H23 年度から H25 年度まで

研究代表者：高崎 智彦

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：室長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 25,778 千円 2年目 22,178 千円

### I. 研究の意義

- (1) デング熱に対する候補ワクチンが実用化されていない背景には、4つの型のデングウイルスに対する交差防御免疫が不明なことにある。ワクチンの正しい評価系確立が必要である。
- (2) デング熱輸入症例は年間 200 例前後であり、迅速で簡易な検査法の開発は重要である。
- (3) アルボウイルスは世界に広範囲に分布するが、ウイルスの国境を超える移動の制限は大きいので、遺伝子情報があればウイルス様粒子を作出できる方法が、ワクチン開発、診断系開発に必要である。
- (4) ヒト-蚊-ヒトの感染環で流行するデング熱やチクングニア熱の流行拡大を防ぐためには、媒介蚊に関する研究および媒介蚊サーベイランス・対策は必要である。
- (5) デング熱と類似の症状を呈するチクングニア熱の鑑別診断は重要であり、より迅速な実験室診断法の実験室開発および病態解明が急がれる。
- (6) 海外渡航者の旅行中の感染リスクを軽減し、発症後の重症化、後遺症発生を予防する。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) デング熱、チクングニア熱などの迅速診断法を開発し、地方衛生研究所等に普及させることにより輸入症例からの国内発生を予防する。
- (2) 生体内におけるデングウイルスに対する防御メカニズムの解明、特に感染防御における中和抗体、特に交差中和抗体の防御能の詳細を明らかにし、ワクチンの有効な評価アッセイ開発することを目的とする。
- (2) 新規高感度ウイルス分離法を開発し、流行株と流行状況（規模、致死率）の関係を解析する。
- (3) ウイルス RNA を常温で保存する方法を確立・評価し、陽性コントロールの輸送、配布を容易にする。
- (4) 遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製可能な系の開発しワクチン開発、実験室診断系開発を容易にする。
- (5) 海外渡航者を対象に蚊媒介性ウイルス感染症の情報を提供し、旅行中のリスクを軽減する。
- (6) デング熱、チクングニア熱の媒介蚊の基礎データを得て、有効な媒介蚊対策を確立する。

### III. 2年間の研究成果

- ・研究代表者（高崎智彦）

- (1) Fc レセプター発現 BHK 細胞による抗体陽性患者血清からの高感度ウイルス分離法を確立した。
- (2) デングウイルス患者血清を用いて新規中和抗体測定法を評価した。
- (3) デングウイルス RNA 遺伝子の常温安定化法の確立評価を実施した。

・研究分担者(小西英二)

- (1) チクングニアウイルス E1-E3 遺伝子に基づく DNA ワクチンを作製、*in vitro* 発現を確認した。
- (2) 遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルス作製系を開発した。

・研究分担者(森田公一)

- (1) デングウイルスの4つの血清型すべてを同時に検出する RT-LAMP 法を開発した。
- (2) デングウイルスを直接検出できるイムノクロマト法を開発した。

・研究分担者(高橋和郎)

- (1) 迅速で高感度な日本脳炎ウイルス、デングウイルスの RT-PCR 法の改良に成功した (GeneCube 使用)。所要時間は1時間で従来法より迅速で高感度である。
- (2) 細胞培養日本脳炎ワクチンの1回接種により88%の健常成人(対象者272名)に、感染防御を示す有意な中和抗体上昇がみられた。1回または2回の接種による陽転率は93.8%であった。しかし、ワクチン接種1年後には抗体価は約1/4に低下し、陰転率は21.4%であった。

・研究分担者(永田典代)

- (1) DENV 中和エピトープを含むキメラ prM/E VLP 発現ベクターを5種作成し、発現を確認した。
- (2) JEV-E および WNV-E 特異的単クローン抗体を対照として、4種の DENV 認識単クローン抗体の交差反応性、有用性を確認した。
- (3) 新生仔マウスに対してデングウイルス1~4ストックをそれぞれ脳内接種し、病原性を確認した。(2)の抗体の免疫組織化学法における有用性を検討した。

・研究分担者(澤辺京子)

- (1) 我国への輸入症例の多いフィリピン都市部においてウイルス分離を実施するための媒介蚊調査を行った。
- (2) 国内産ヒトスジシマカを用いたデングウイルスの経口感染モデル、ウイルス検出系を確立した。
- (3) 国内産ヒトスジシマカの卵越冬評価のための実験系を検討した

・研究分担者(濱田篤郎)

- (1) ホームページの開設とパンフレットの作成

デング熱など海外渡航に関連する病気の情報を提供するホームページ「海外旅行と病気」<http://www.tra-dis.org> を開設した。また、海外渡航者向けにパンフレット「デング熱豆知識」を作成し、トラベルクリニックや海外の日本人会などに配布した。

- (2) デング熱に関する意識調査

インドネシア、フィリピンの在留邦人、日本国内で海外旅行に関心のある人々を対象に、デング熱に関する意識調査(アンケート調査)を行った結果、デング熱についての関心は高いものの、流行状況や予防法などの知識不足明らかになった。

- (3) 海外での日本人デング熱患者の実態調査

フィリピン・マニラの医療機関で日本人デング熱患者の受診状況の調査を行った。この結果、2012年は10月までに49名の患者が確認され、とくに7月~8月の患者発生が多いことが明らかになった。

・研究分担者(鈴木隆二)

(1) ウエストナイルウイルス感染マウスの脳内浸潤 T 細胞の解析により、特異的 T 細胞が脳内に浸潤している事が明らかとなった。この特異性は日本脳炎ウイルスとは交差反応性を示さなかった。

(2) デングウイルス感染モデル系の病態解析系の確立を目的に、コモンマーモセットに対する免疫学的ツールを開発 (microplate hybridization assay) し、TCR 解析に必要な基礎情報を確定した。

(3) コモンマーモセットの免疫関連遺伝子 (CD14, IL-1a, IL-1b, IL-12b) 配列を決定した。

・研究分担者 (江下優樹)

(1) ウイルス遺伝子検出法 (RT-LAMP 法) を簡便化し、チクングニアウイルス感染蚊および患者全血から直接増幅・検出が可能となった。

(2) マウスに短時間のデングウイルス血症を起こすことができ、多数の感染蚊作製が可能となった。

(3) トランスクリプトーム解析 (次世代シケンサー) から感染、非感染蚊で遺伝子発現レベル相違点を確認した。

(4) タイのデング熱流行地域における感染蚊の動態調査を行い、野外蚊に薬剤抵抗性が認められ、その抵抗性はナトリウムチャネルの点突然変異に起因することを明らかにした。

・研究分担者 (モイ・メンリン)

(1) 生物的に意義のある (感染増強活性と合わせた中和抗体価) 評価アッセイの開発に成功した。

(2) 新規中和抗体アッセイ評価のため、デングウイルス患者血清と抗体を用いて評価した。

(3) チクングニアウイルス RNA 遺伝子の常温安定化保存法を検討した。

・研究分担者 (倉根一郎)

(1) マーモセットを用いたチクングニアウイルスの感染実験の結果感染 1 - 3 日後の血清よりウイルスを分離し、感染 10 日後までウイルス遺伝子が血清中に検出された。

(2) 病理学的解析の結果、脾臓、腋窩リンパ節、肝臓中のマクロファージや内皮系細胞にウイルス抗原あるいはウイルス遺伝子を検出した。

#### IV. 平成 25 年度の課題

(1) 新規デングウイルス中和アッセイを流行地患者血清を使用し、知見の収集を行う。

(2) マサチューセッツ大学医学部と共同研究を行い、同大学がデング熱流行地 (タイ) で経時的に採取した検体を使用し、ホモとヘテロの中和抗体防御メカニズム解明の基礎データを収集する。

(3) 遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルス作製系の評価を行う。

(4) 開発したデングウイルス遺伝子検出法 (RT-LAMP) 法やウイルス蛋白検出法 (イムノクロマト) を流行地域の患者サンプルを用いてその有効性を確認する。

(5) ウエストナイルウイルス、チクングニアウイルスについてもさらに迅速で高感度な RT-PCR 法を改良する。これら開発した方法を用い、臨床検体について検討し従来法との性能比較を行う。

(6) 細胞培養日本脳炎ワクチン接種により抗体が上昇した群の 2 年後の抗体価持続状況を明らかにする。

(7) デングウイルスを用いて新生仔マウス、成マウスに対する病原性を確認し、免疫—攻撃実験系の作出を試みる。感染後マウス、マーモセットにおけるウイルス動態、感染細胞の同定と病理学的検討を行う。

(8) 国内外のヒトスジシマカのデングウイルス感受性を経口感染実験により評価し、媒介蚊の卵越冬を検討する。また、媒介蚊のピレスロイド系殺虫剤抵抗性遺伝子を解析する。

(9) RT-LAMP 法の簡便化を更に進め、野外で利用可能なキット化を目指す。

(10) チクングニアウイルスの感染蚊作製のため人工吸液装置による条件を検討する。