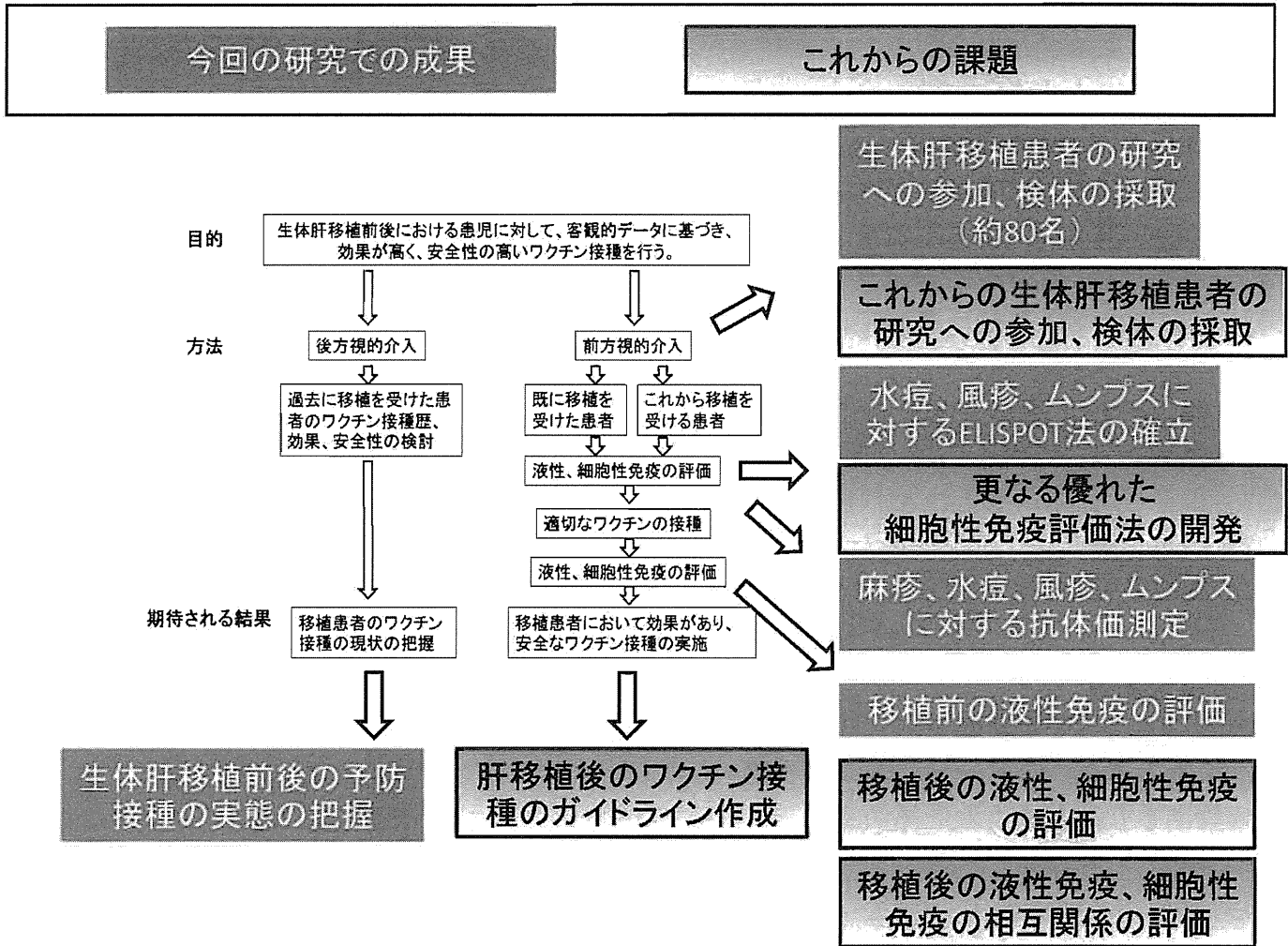


Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

- 1991-1995 聖路加国際病院小児科
- 1994-1995 国立感染研究所 ウイルス第2部
- 1995-1997 ハーバーUCLA メディカルセンター アレルギー、臨床免疫部門
- 1997-2000 南カルフォルニア大学 (USC) 小児科
- 2000-2008 カルフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) 小児感染症科
- 2008-2011 国立成育医療研究センター 感染症科
- 2011- 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 小児科学分野

### ・主な共同研究者 (又は指導を受けた研究者)

- 1994-1995 国立感染研究所 ウイルス第2部 (宮村達夫先生)
- 1995-1997 ハーバーUCLA メディカルセンター アレルギー、臨床免疫部門 (Dr. Gildon Beall)
- 1997-2000 南カルフォルニア大学 (USC) 小児科 (Drs. Lawrence Opas, Andrea Kovacs)
- 2000-2008 カルフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) 小児感染症科 (Dr. Stephen Spector)

### ・主な研究課題

- 小児の HIV 患者の薬理遺伝学
- 抗 HIV 薬のミトコンドリアに対する影響
- 免疫抑制患者における免疫評価法
- ウイルスの迅速診断
- 予防接種

### ・これまでの研究実績

齋藤昭彦

過去3年分 (2012)

- Saitoh A, Nagai A, Tenjinbaru K, Li P, Vaughn DW, Roman F, Kato T. Persistence of immunological response six months after vaccination with an AS03-adjuvanted H1N1 2009 influenza vaccine: an open-label, randomised trial in Japanese children aged 6 months to 17 years. *Hum Vaccin & Immunother.* 2012 Jun 1;8(6). [Epub ahead of print]
- Hanaoka M, Saitoh A, Kubo T. Discrepancy between human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) screening test and confirmatory tests in non-endemic areas. *J Obstetrics and Gynaecology Research* 2012;38:793-6.
- Shoji K, Komuro H, Kobayashi Y, Shike T, Funaki T, Katsuta T, Miyata I, Saitoh A. An Infant with Human Parechovirus Type 3 Infection with a Distinctive Rash on the Extremities. *Pediatr Dermatol* (in press).
- Saitoh A, Okabe N. Current Issues with the Immunization Program in Japan: Can we Fill the "Vaccine Gap"? *Vaccine* 2012 30:4752-6.

- Ogimi C, Shoji K, Katsuta T, Watanabe Y, Saitoh A. Utility of Gram Stain of Endotracheal Aspirates on Empiric Therapy in Children with Hospital-Acquired Pneumonia. *J Infect* (in press). 2012 Jun 18. [Epub ahead of print]
- Shoji K, Komuro H, Kobayashi Y, Shike T, Funaki T, Katsuta T, Miyata I, Saitoh A. An Infant with Human Parechovirus Type 3 Infection with a Distinctive Rash on the Extremities. (in press) *Pediatr Dermatol* 2012 Sep 3. [Epub ahead of print]
- Shoji K, Komuro H, Miyata I, Miyairi I, Saitoh A. Dermatologic Manifestations of Human Parechovirus Type 3 Infection in Neonates and Infants. *Pediatr Infect Dis J* (accepted).
- Miyata I, Saitoh A. Detection of enteroviral RNA from preserved umbilical cord. *J Clin Virol* (accepted).

(2011)

- Saitoh A, Sakamoto S, Fukuda A, Shigeta T, Kakiuchi T, Kamiyama S, Katsuta T, Shoji K, Ogimi C, Kasahara M. Universal Preemptive Therapy for Cytomegalovirus Infections in Children after Live-Donor Liver Transplantation. *Transplantation* 2011 27;92:930-5.
- Ogimi C, Tanaka R, Saitoh A, Oh-ishi T. Immunogenicity of Influenza Vaccine in Children with Pediatric Rheumatic Diseases Receiving Immunosuppressive Agents. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:208-11.
- Shoji K, Saitoh A. Bacteremia Associated with Intravascular Catheter Colonized *Staphylococcus aureus* in Children. *J Hosp Infect* 2011;78:65-6.
- Katsuta T, Kato H, Kaneko Y, Kaneko M, Misaki Y, Kimura M, Shoji K, Nakao H, Saitoh A. Complete Atrioventricular Block without Myocarditis as a Complication of Varicella in Children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:445-6.
- Saitoh A, Dominguez D, Stani TM, Rossi S, Capparelli E, Spector SA. Intracellular Concentrations of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Its Potential Role on Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Antivir Antiretrovir* 2011;3: 14-19.

(2010)

- Saitoh A, Sarles E, Capparelli E, Aweeka F, Singh KK, Kovacs A, Burchett SK, Wiznia A, Nachman S, Fenton S, Spector SA. CYP2C19 Genetic Variants Affect Nelfinavir Pharmacokinetics and Virologic Response in HIV-1 Infected Children Receiving HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54:285-9.
- Ohishi A, Takahashi S, Ito Y, Ohishi Y, Tsukamoto K, Nanba Y, Ito N, Kakiuchi S, Saitoh A, Morotomi M, Nakamura T. Bifidobacterium septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. *J Pediatr* 2010;156:679-81.
- Shoji K, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, Azuma N, and Saitoh A. Is a Six-Week Course of Ganciclovir Therapy Effective for Chorioretinitis in Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection? *J Pediatr* 2010;157:331-3.

・ 平成 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況

小児の肝移植患者におけるワクチン接種の安全性・有効性に関する研究（25181001）に応募

新型インフルエンザ等  
新興・再興感染症研究事業

小児の臓器移植前後におけるワクチン接種  
の安全性・有効性に関する研究

2013/1/24

新潟大学医歯学総合研究科  
小児科学分野  
齋藤昭彦

研究構成員

- 研究代表者  
- 齋藤昭彦 (新潟大学小児科教授)
- 研究分担者  
- 笠原群生 (国立成育医療研究センター  
臓器移植センター長)  
- 竹田誠 (国立感染症研究所ウイルス第3部  
部長)

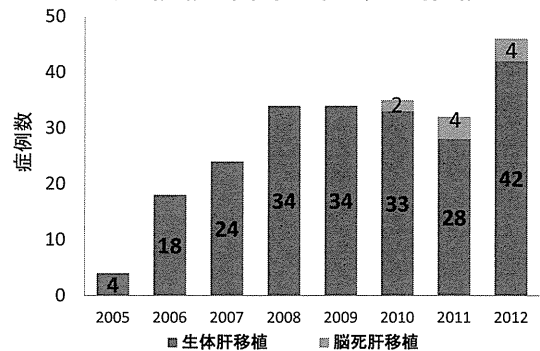
背景

- 臓器移植後の児は、免疫抑制剤を服用することにより、多くの感染症疾患に罹患しやすく、また罹患すると重症化、死亡することがある
- その中の幾つかの疾患は、ワクチンで予防可能である
- しかしながら、臓器移植後の患者に対する予防接種の適応は明確でなく、接種基準が存在しない

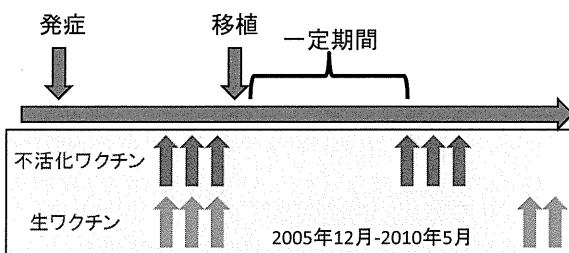
目的

- 肝移植患者に対して、有効性が高く、かつ安全なワクチン接種を確立するための基礎的データを蓄積する

国立成育医療研究センターにおける  
肝移植年間症例数の推移

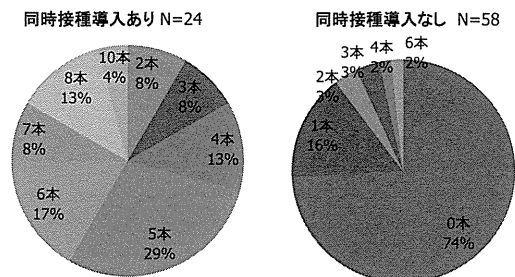


肝移植患者の予防接種



① 移植前後のワクチン接種の現状

当院初診から移植までの期間に  
接種されたワクチンの本数

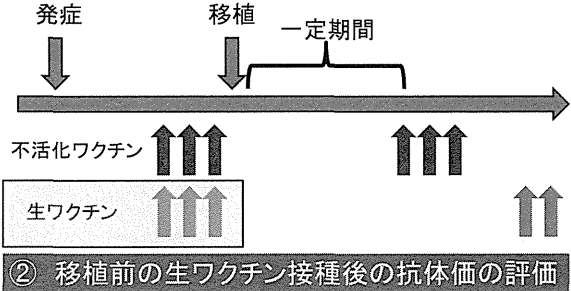


勝田友博ほか 第16回日本ワクチン学会 東京

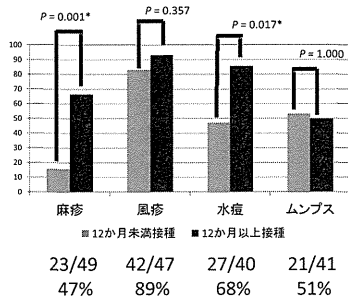
## 有害事象、副反応

- 術前複数ワクチン同時接種: 24名に施行
  - 明らかな有害事象、副反応は認めず
- 術後ワクチン接種: 生ワクチン7名、不活化ワクチン47名に施行
  - 明らかな有害事象、副反応は認めず

## 肝移植患者の予防接種



## 接種年齢による抗体価陽性率の差



Funaki T, et al. 50th IDSA Meeting, San Diego, CA, 2012

## 麻疹・水痘ワクチン接種患者における抗体陽性化に関する多変量解析

### 麻疹ワクチン

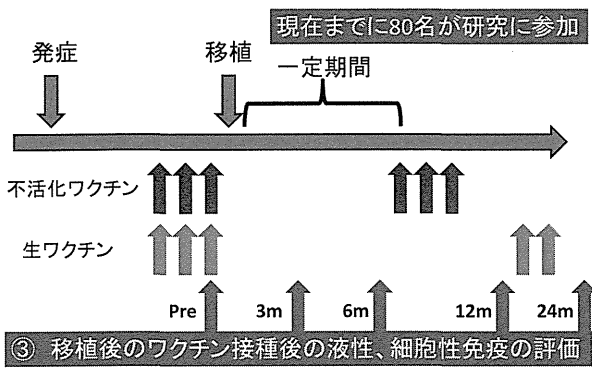
Covariates	Regression coefficient ± SE	P 値	オッズ比 (95% CI)
ワクチン接種月齢 (month)	-2.068 ± 0.834	0.013*	0.126 (0.025 - 0.648)
体重 (kg)	0.103 ± 0.052	0.046*	1.108 (1.002 - 1.226)
constant	-1.241 ± 1.042	0.234	

### 水痘ワクチン

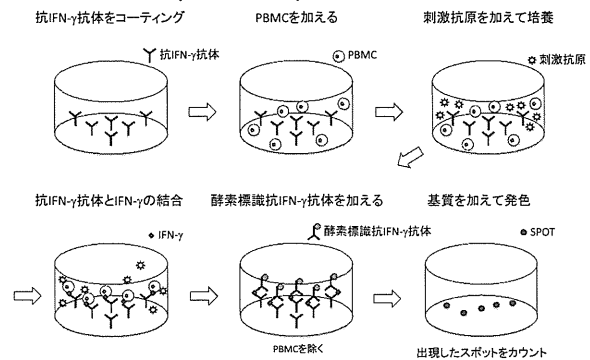
Covariates	Regression coefficient ± SE	P 値	オッズ比 (95% CI)
体重 (kg)	0.309 ± 0.129	0.017*	1.362 (1.057 - 1.755)
constant	-3.790 ± 1.763	0.032	

Funaki T, et al. 50th IDSA Meeting, San Diego, CA, 2012

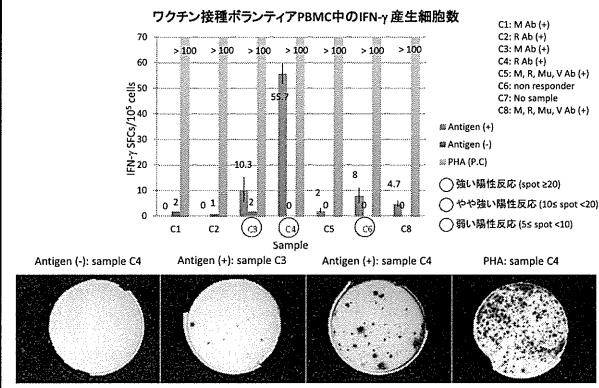
## 肝移植患者の予防接種



## Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT)法の原理



## ELISPOT 測定条件の確認(例: 麻疹)



## まとめ

- 肝移植前の予防接種においては、同時接種が効率のよい接種を可能とした
- 肝移植前の生ワクチンの接種に関しては、麻疹、水痘、ムンプスにおいて抗体陽性率が低く、麻疹、水痘においては、児の年齢、および体重が抗体価陽性率に影響を与えた
- ELISPOT法による麻疹、風疹、水痘に対する細胞性免疫の評価法を確立した
- 今後、臨床情報、抗体価、細胞性免疫との関連をまとめ、更なる患者の研究への参加を進める予定である

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：抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の網羅的細菌叢解析と  
病因・増悪因子細菌群の解明

課題番号：H22-新興-若手-019

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：黒田 誠

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：病原体ゲノム解析研究センター

職名：センター長

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 2,000,000円 2年目 1,700,000円 3年目 1,647,000円 計 5,347,000円

### **I. 研究の意義**

- (1) 潰瘍性大腸炎(UC)は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。
- (2) 三種の抗菌剤(アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール)を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解することが明らかとなってきた。
- (3) 抗菌薬治療による有効性の理由を詳細に把握出来ていない。

：

### **II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) UC発症の環境要因となる細菌叢を網羅的解読法にて定量化し、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解する。
- (2) UC発症に関与する細菌種の同定により、より有効な抗菌薬の選択を提起できる。

：

### **III. 3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) 腸内細菌フローラを次世代シーケンサーで網羅・定量解析するためのシステムを構築した。
- (2) 腸内細菌フローラを判別するための16S-rDNAデータベースを構築した。
- (3) UC発症患者の抗菌薬治療前後の糞便に内在する細菌種を定量化・特定し、急性期では様々な腸内フローラの変動(dysbiosis)が生じていることを明らかにした。
- (4) UC急性期下痢便には大腸菌の存在比が高く、抗菌薬治療により存在比が減少していたことから、UCの増悪因子候補としての可能性が示唆された。

：



#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

- (1) UC 患者特有の dysbiosis に係る患者菌株を単離し、動物実験等において発症に関与するかどうか評価・検討する。
  - (2) 特徴的な菌種について、UC 患者急性期において保菌率が高いのかどうか定量的に評価する。
  - (3)
- :

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) UC 発症に係る関与因子を解明できる。
  - (2) ステロイド抵抗性 UC 患者への代替治療法として抗菌薬治療を科学的に提言することができる。
  - (3) より有効な抗菌薬選択の基礎データとなりうる。
- :

#### **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。

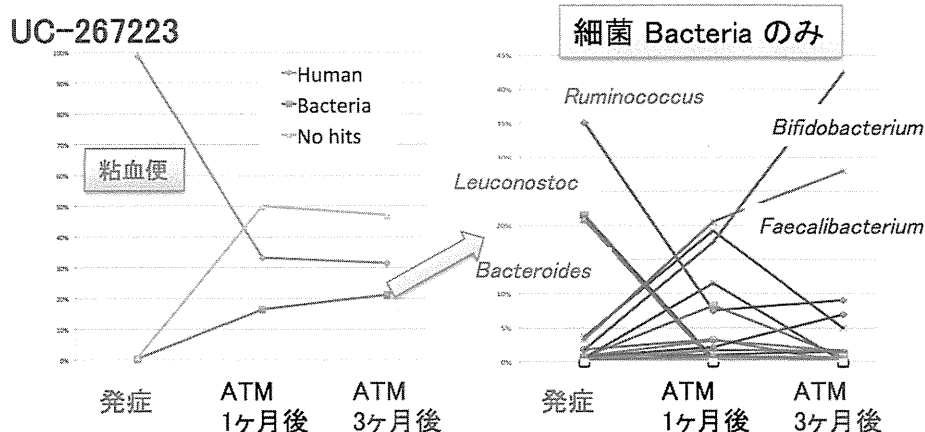
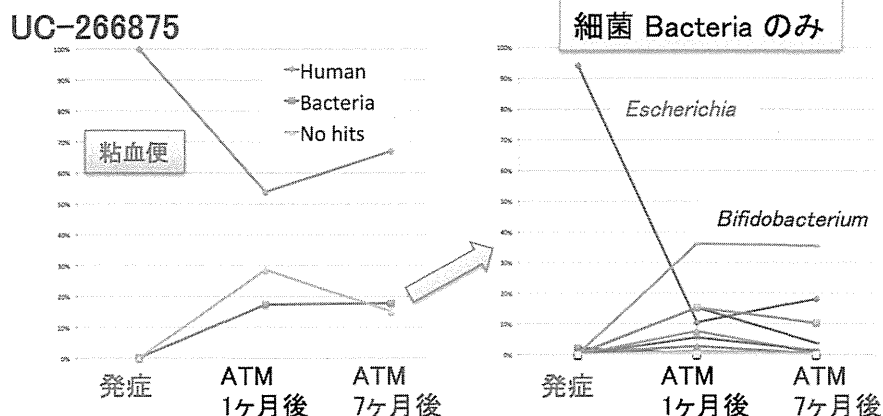
※執筆者全員を明記し、当該研究者名に下線を引いてください。

- (1) 無し
  - (2)
  - (3)
- :

### Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

#### メタゲノクスによる細菌フローラ解析

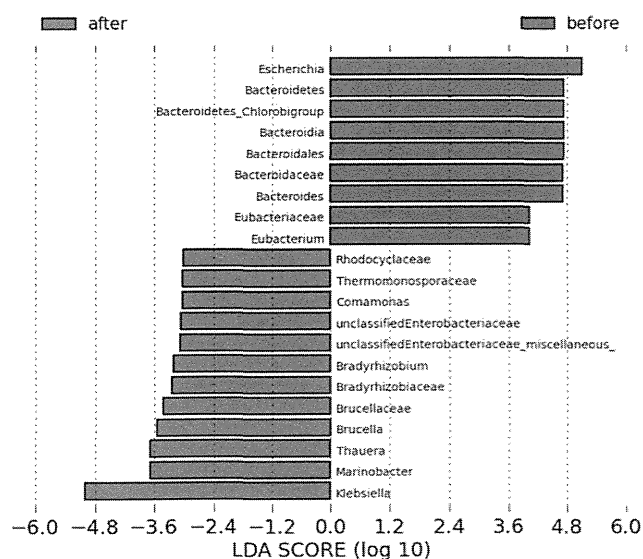


UC患者(2名: UC-266875とUC-267223)の患者便(発症、ATM治療1ヶ月後、ATM治療3-7ヶ月後)の細菌フローラをメタゲノム解析として網羅配列解読を行った。塩基レベルで相同性解析 (blastn) した結果を属レベルで同定分類した。ATM治療前(before ATM)で多く存在し、治療後に顕著に減少・増加した細菌を抽出した。発症時は粘血便であり、網羅解読の結果が示すように99%近くの解読リードがヒト配列であった。ATM治療により寛解が維持されていることを示唆するように、便中の細菌DNA量(解読リード数)が20%程度まで増加していた(左図ラインプロット)。寛解維持に伴い、腸内環境を改善する*Bifidobacterium*、*Faecalibacterium*の増加が顕著であり、腸内フローラが健常に近づきつつあるように考えられる。ATM治療により消失する細菌がUC発症の増悪因子と想定される。患者2名の発症時の様子は異なっており、

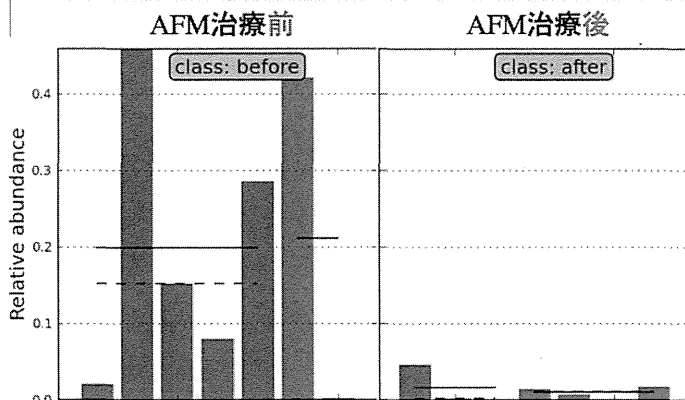
UC-266875の便の細菌の95%が大腸菌であり、UC-267223では*Bacteroides*、*Leuconostoc*が顕著であった(中央図ラインプロット)。UC-266875便の大腸菌は、菌株の固有SNPsを利用して具体的な株系統に分類した。発症時は腸管外大腸菌ExPECの系統に属するUMN026株と同等の菌株が有意に存在し、ある特定の大腸菌株が腸内で大量に増殖していることが推察された。ATM治療による寛解に伴い、健常フローラと同様の多様な系統の大腸菌の割合に変動していることが分かった。一方、UC-266875便は*Bacteroides*、*Leuconostoc*が顕著でありUC-266875とは異なるが、*Leuconostoc*の菌数の減少がUC-266875でも認められることから、共通する候補の可能性はある。

#### AFM治療後

#### AFM治療前



#### 患者7名毎のAFM治療前後における大腸菌の変動量



7名の抗菌薬カクテルAFM治療の前後で変動する細菌フローラを抽出した(左図)。大腸菌*Escherichia coli*が有意に検出された。LEfSeによる統計解析においても7名中4名で*E. coli*は治療前において有意な存在量を示し(上図)、潰瘍性大腸炎に何らかの要因となっている可能性が示唆された。

## ●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

筑波大学大学院博士課程医学研究科生物系専攻	平成11年3月修了	博士(医学)取得
順天堂大学医学部細菌学	助手	自 平成11年4月 至 平成15年3月 4年
ワシントン大学・微生物学	ポストドクトラルフェロー	自 平成15年4月 至 平成16年3月 1年
筑波大学大学院人間総合科学研究科	講師	自 平成16年4月 至 平成19年2月 2年11月

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

東京慈恵会医科大柏病院・消化器肝臓内科・教授 大草敏史

富山県衛生研究所・所長 佐多徹太郎

国立感染症研究所・寄生動物部・部長 野崎智義

国立感染症研究所・細菌第1部・部長 大西真

名古屋大学・医学部・教授 荒川宜親

国立成育医療研究センター研究所・免疫アレルギー研究部・室長 阿部淳

### ・主な研究課題

1. ブドウ球菌属のゲノム解析
2. バイオテロ・新興感染症対策としての超高速ゲノム解読システムの構築
3. 薬剤耐性食中毒菌に係るゲノム配列レベルでの検出系開発
4. 感染症の関与が疑われる難治性疾患の病原体検索・解析

### ・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. 著書

(1) **Makoto Kuroda, and Keiichi Hiramatsu.**

Chapter "Genome sequencing and annotation: an overview" in *Genomics, Proteomics and Clinical Bacteriology*. Humana Press Inc. (2003) (筆) (ゲノム配列解読と遺伝子予測法)

(2) Hiramatsu K., Kuroda M., Baba T., K. Okuma.

Application of Genomic Information to the Diagnosis, Management and Control of Bacterial Infections: *Staphylococcus aureus* model. Diagnostic Molecular Microbiology 2nd Ed. D. Persing. ASM Press. (2002)

(他) (黄色ブドウ球菌をモデルにしたゲノム情報による細菌感染症の診断・マネージメント)

## 2. 学術論文

### 1) 欧文.

1. Mizuta K, ◦Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, Ikeda T, Abiko C, Noda M, Kimura H, Mizutani T, Kato T, Kawanami T, Ahiko T. (2012) Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. Emerg Infect Dis. 18(11):1787-93.
2. Sekizuka T, Yamamoto A, Komiya T, Kenri T, Takeuchi F, Shibayama K, Takahashi M, ◦Kuroda M, Iwaki M. (2012) *Corynebacterium ulcerans* 0102 carries the gene encoding diphtheria toxin on a prophage different from the *C. diphtheriae* NCTC 13129 prophage. BMC Microbiol. 12:72.
3. ◦Kuroda M, Sekizuka T, Shinya F, Takeuchi F, Kanno T, Sata T, Asano S. (2012) Detection of a possible bioterrorism agent, *Francisella* sp., in a clinical specimen by use of next-generation direct DNA sequencing. J Clin Microbiol. 50(5):1810-2.
4. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, ◦Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. (2012) Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin Infect Dis. 54(8):1046-52.
5. Katano H, Sato S, Sekizuka T, Kinumaki A, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Morikawa S, Saijo M, Mizutani T, ◦Kuroda M. (2012) Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. Int J Clin Exp Pathol. 5(8):814-23.
6. Chieko Sakano, ◦Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Taisei Ishioka, Yukio Morita, Akihide Ryo, Hiroyuki Tsukagoshi, Yuko Kawai, Nobuko Inoue, Hayato Takada, Yumiko Ogasawara, Atsuyoshi Nishina, Masa-aki Shimoda, Kunihisa Kozawa, Kazunori Oishi, Hirokazu Kimura. (2012) Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan. J. Clinical Microbio. In press.
7. Mika Saitoh, Makoto Takeda, Koichi Gotoh, Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, ◦Makoto Kuroda, Katsumi Mizuta, Akihide Ryo, Ryota Tanaka, Haruyuki Ishii, Hayato Takada, Kunihisa Kozawa, Ayako Yoshida, Masahiro Noda, Nobuhiko Okabe, and Hirokazu Kimura. (2012) Molecular Evolution of Hemagglutinin (H) Gene in Measles virus Genotypes D3, D5, D9, and H1. PLoS One. In press.
8. Noriyuki Otsuki, Tsuyoshi Sekizuka, Fumio Seki, Kouji Sakai, Toru Kubota, Yuichiro Nakatsu, Surui Chen, Hideo Fukuhara, Katsumi Maenaka, Ryoji Yamaguchi, ◦Makoto Kuroda, Makoto Takeda. (2012) Canine Distemper Virus with the Intact C Protein Has the Potential to Replicate in Human Epithelial Cells by Using Human Nectin4 as a Receptor. Virology. In press.
9. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M (2011) Complete Sequencing of the bla(NDM-1)-Positive IncA/C Plasmid from *Escherichia coli* ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens. PloS one 6: e25334.
10. Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I,

- Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M (2011) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 4114-4121.
11. Tsukagoshi H, Mizuta K, Abiko C, Itagaki T, Yoshizumi M, Kobayashi M, Kuroda M, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H (2011) The impact of Saffold coronavirus in patients with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Scandinavian journal of infectious diseases* 43: 669-671.
  12. Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H (2011) Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Applied and environmental microbiology* 77: 1572-1580.
  13. Izumiya H, Sekizuka T, Nakaya H, Taguchi M, Oguchi A, Ichikawa N, Nishiko R, Yamazaki S, Fujita N, Watanabe H, Ohnishi M, Kuroda M (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via *IS1* derivatives on the chromosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 623-630.
  14. Serizawa M, Sekizuka T, Okutani A, Banno S, Sata T, Inoue S, Kuroda M (2010) Genomewide screening for novel genetic variations associated with ciprofloxacin resistance in *Bacillus anthracis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 2787-2792.
  15. Okutani A, Sekizuka T, Boldbaatar B, Yamada A, Kuroda M, Inoue S (2010) Phylogenetic typing of *Bacillus anthracis* isolated in Japan by multiple locus variable-number tandem repeats and the comprehensive single nucleotide polymorphism. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 72: 93-97.
  16. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T (2010) The first autopsy case of pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: detection of a high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. *Japanese journal of infectious diseases* 63: 67-71.
  17. Matsuoka E, Tanaka Y, Kuroda M, Shouji Y, Ohta T, Tanaka I, Yao M (2010) Crystal structure of the functional region of Uro-adherence factor A (UafA) from *Staphylococcus saprophyticus* reveals participation of the B domain in ligand binding. *Protein science : a publication of the Protein Society*.
  18. Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S (2010) Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *Journal of clinical microbiology* 48: 2821-2829.
  19. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T (2010) Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PloS one* 5: e10256.
  20. Yamao T, Eshita Y, Kihara Y, Satho T, Kuroda M, Sekizuka T, Nishimura M, Sakai K, Watanabe S, Akashi H, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Miyata T, Sakata A, Hosokawa M, Nakashima M, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Nakauchi M, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T (2009) Novel virus discovery in

- field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Archives of virology 154: 153-158.
21. Watanabe M, Tanaka Y, Suenaga A, Kuroda M, Yao M, Watanabe N, Arisaka F, Ohta T, Tanaka I, Tsumoto K (2008) Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third neat domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 283: 28649-28659.
  22. Tanaka Y, Sakamoto S, Kuroda M, Goda S, Gao YG, Tsumoto K, Hiragi Y, Yao M, Watanabe N, Ohta T, Tanaka I (2008) A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. Structure 16: 488-496.
  23. Sakamoto S, Tanaka Y, Tanaka I, Takei T, Yu J, Kuroda M, Yao M, Ohta T, Tsumoto K (2008) Electron microscopy and computational studies of Ebh, a giant cell-wall-associated protein from *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 376: 261-266.
  24. Miyafusa T, Tanaka Y, Kuroda M, Ohta T, Tsumoto K (2008) Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of CapF, a capsular polysaccharide-synthesis enzyme from *Staphylococcus aureus*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64: 512-515.
  25. Kuroda M, Tanaka Y, Aoki R, Shu D, Tsumoto K, Ohta T (2008) *Staphylococcus aureus* giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. Biochem Biophys Res Commun 374: 237-241.
  26. Kuroda M, Ito R, Tanaka Y, Yao M, Matoba K, Saito S, Tanaka I, Ohta T (2008) *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun 377: 1102-1106.
  27. Higashide M, Kuroda M, Omura CT, Kumano M, Ohkawa S, Ichimura S, Ohta T (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Have Emerged in Urogenital Tract Infections. Antimicrob Agents Chemother.
  28. Tanaka Y, Kuroda M, Yasutake Y, Yao M, Tsumoto K, Watanabe N, Ohta T, Tanaka I (2007) Crystal structure analysis reveals a novel forkhead-associated domain of ESAT-6 secretion system C protein in *Staphylococcus aureus*. Proteins 69: 659-664.
  29. Kuroda M, Nagasaki S, Ohta T (2007) Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 59: 425-432.
  30. Kuroda M, Nagasaki S, Ito R, Ohta T (2007) Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 273: 28-34.
  31. Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K (2007) Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. FEMS Microbiol Lett 268: 98-105.
  32. Kuroda M (2006) [Whole genome sequence analysis reveals staphylococcal pathogenesis and antimicrobial resistance]. Nippon Saikingaku Zasshi 61: 235-241.
  33. Higashide M, Kuroda M, Ohkawa S, Ohta T (2006) Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the detection of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. Int J Antimicrob Agents 27: 500-504.
  34. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, Kuroda M, Cui L, Takahashi M, Ankai A, Baba S, Fukui S, Lee JC, Hiramatsu K (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the

- extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* 187: 7292-7308.
35. Kuroda M, Yamashita A, Hirakawa H, Kumano M, Morikawa K, Higashide M, Maruyama A, Inose Y, Matoba K, Toh H, Kuhara S, Hattori M, Ohta T (2005) Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13272-13277.
  36. Ohta T, Hirakawa H, Morikawa K, Maruyama A, Inose Y, Yamashita A, Oshima K, Kuroda M, Hattori M, Hiramatsu K, Kuhara S, Hayashi H (2004) Nucleotide substitutions in *Staphylococcus aureus* strains, Mu50, Mu3, and N315. *DNA Res* 11: 51-56.
  37. Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, Hiramatsu K (2003) Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 49: 807-821.
  38. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359: 1819-1827.
  39. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225-1240.
  40. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 486-493.
  41. Kuroda M, Kuwahara-Arai K, Hiramatsu K (2000) Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 485-490.
  42. Kuroda M, Hiramatsu K (2000) [The mechanism of vancomycin-resistant in *Staphylococcus aureus*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 45: 1329-1338.
  43. Kuroda M, Kobayashi D, Honda K, Hayashi H, Ohta T (1999) The *hsp* operons are repressed by the *hrc37* of the *hsp70* operon in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 43: 19-27.
  44. Kuroda M, Hayashi H, Ohta T (1999) Chromosome-determined zinc-responsible operon *czr* in *Staphylococcus aureus* strain 912. *Microbiol Immunol* 43: 115-125.
  45. Ohta T, Nettikadan S, Tokumasu F, Ideno H, Abe Y, Kuroda M, Hayashi H, Takeyasu K (1996) Atomic force microscopy proposes a novel model for stem-loop structure that binds a heat shock protein in the *Staphylococcus aureus* HSP70 operon. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 730-734.
  46. Kuroda M, Ohta T, Hayashi H (1995) Isolation and the gene cloning of an alkaline shock protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 978-984.
  47. Ohta T, Saito K, Kuroda M, Honda K, Hirata H, Hayashi H (1994) Molecular cloning of two new heat shock genes related to the *hsp70* genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 176: 4779-4783.
  48. Ohta T, Honda K, Kuroda M, Saito K, Hayashi H (1993) Molecular characterization of the gene operon of heat

shock proteins HSP60 and HSP10 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 730-737.

2) 邦文

- (1) 黒田誠 遺伝子型別法・タイピング法 臨床と微生物 39 巻増刊号: 501-506 2012 年 10 月
- (2) 黒田誠 感染性腸炎 臨床栄養～腸管と免疫・栄養～ vol.120(6): 711-716, 2012 年 5 月
- (3) 黒田誠 変貌する感染症研究 ～感染症対策に欠かせない網羅配列解読～ 医学のあゆみ 2011 2/5 Vol.236 No.6: 571-576
- (4) 黒田誠 超高速シーケンサーによる病原体検索 化学療法の領域 2011 9 月号 Vol.27 No.9: 122-130
- (5) 黒田誠 ブドウ球菌属のゲノム解析とゲノムから見える薬剤耐性・病原因子の解析 日本細菌学雑誌 61 巻(2): 235-41 2006 年 6 月
- (6) 黒田誠、平松啓一 (筆) バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌の薬剤耐性機構 蛋白質・核酸・酵素 45:1329-38. 2000 年

**・平成 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規公募課題の応募状況**

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究  
(25181601)



## 抗菌剤治療により寛解する 難治性炎症性腸疾患患者の網羅的 細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明 H22-新興-若手-019

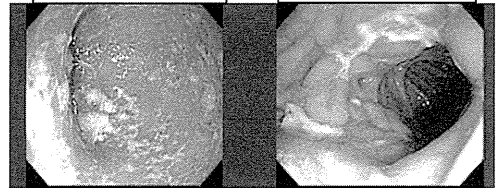
国立感染症研究所  
 病原体ゲノム解析研究センター  
 黒田 誠

研究協力者：大草敏史（東京慈恵会医科大）  
 寺尾秀一（加古川東市民病院）  
 関塚剛史（国立感染症研究所・ゲノムセンター）

## 難治性疾患に指定されている 炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD)

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis)      クロห์น病 (Crohn's disease)

大腸粘膜上皮全周にびらん      小腸粘膜上皮の局所に炎症

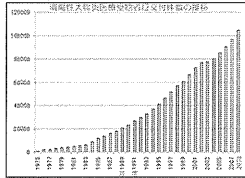


潰瘍性大腸炎とは？

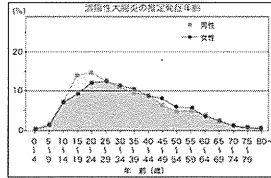
- 大腸の粘膜（最も内側の層）にびらんや潰瘍ができる大腸の炎症性疾患です。
- 特徴的な症状としては、結血便と下痢、腹痛です。
- 病変は直腸から連続的に、そして上行性（口側）に広がる性質があり、最大で直腸から結腸全体に広がります。

## 難病情報センターのホームページから ～ 潰瘍性大腸炎 UC ～

患者さんはどのくらいいるのですか



どのような人に多いのですか



- この病気の原因はわかっているのですか  
 これまでに腸内細菌の関与や本来は外敵から身を守る免疫機構が正常に機能しない自己免疫反応の異常、あるいは食生活の変化の関与などが考えられていますが、まだ原因は不明です。
- この病気は遺伝するのですか  
 家族内での発症も認められており、何らかの遺伝的因子が関与していると考えられています。欧米では患者さんの約20%に炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎あるいはクローン病)の近親者がいると報告されています。  
 参考文献: Nature genetics 2008 Nov;40(11):1319-23.  
 Sequence variation in immunosuppressive cytokine IL10 is associated with UC.

## ヒトゲノム解析によるUC関連因子の特定

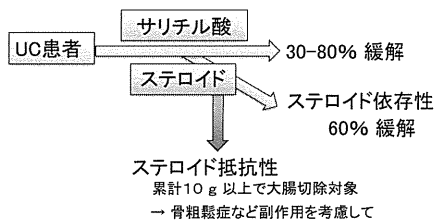
Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease

Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47

A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population

Kouchi Amano<sup>1</sup>, Yumonga Matsushita<sup>2</sup>, Junji Ueno<sup>3</sup>, Naoto Hosono<sup>4</sup>, Atsushi Yakushiji<sup>5</sup>, Takahiko Kawaguchi<sup>6</sup>, Takayoshi Matsumoto<sup>7</sup>, Toshiyuki Matsuo<sup>8</sup>, Maki Kakuta<sup>9</sup>, Yoshitaka Kusunoki<sup>10</sup>, Tetsuo Shimomura<sup>11</sup>, Hisaoki Hirokawa<sup>12</sup>, Yoshitaka Kitama<sup>13</sup>, Naohiko Nakamura<sup>14</sup>, Yukihiro Kiyohara<sup>15</sup>, Takahiko Tamada<sup>16</sup>, Naoyuki Konstanti<sup>17</sup>, Mitsuo Hida<sup>18</sup>, Yusuke Sakumura<sup>19</sup>, & Michihiko Inoue<sup>20</sup>

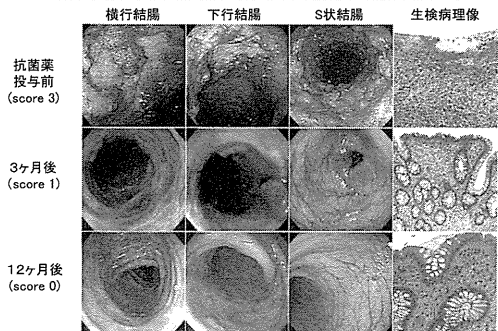
## 潰瘍性大腸炎 UC の治療方針



- その他治療法
- ・シクロスポリン(免疫抑制剤)
  - ・TNF α抗体薬
  - ・白血球除去療法
  - ・プロバイオティクス(緩解維持)
  - ・多剤併用ATM療法 (本研究課題に関連)

## ステロイド抵抗性 UC 有効例(26歳男性、総PSL量10,076 mg, UC歴9年)

抗菌薬(2週間): アモキシシリン、テトラサイクリン、メロニダゾール



引用文献: 大草敏史, 他. 消化器内視鏡 Vol.18 No.8 2006: 1305-1313

# 抗菌薬 ATM治療の有効性

Newly Developed Antibiotic Combination Therapy for Ulcerative Colitis: A Double-Blind Placebo-Controlled Multicenter Trial

Shimada T, et al. *Gastroenterology*. 2014;146:1031-1041. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.031

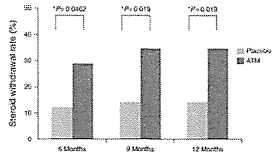


Figure 4. Steroid withdrawal rates in steroid-dependent cases (n = 100). The rates of patients with clinical remission and discontinuation of steroid therapy at 6, 9, and 12 months after treatment completion were 28.6% (95% confidence interval [CI] 16.4–43.2), 34.7% (95% CI 21.7–49.6), and 34.7% (95% CI 21.7–49.6) in the ATM (vancomycin, tetracycline, and metronidazole) group and 11.8% (95% CI 4.4–23.9), 13.7% (95% CI 5.7–26.3), and 13.7% (95% CI 5.7–26.3) in the placebo group, respectively.

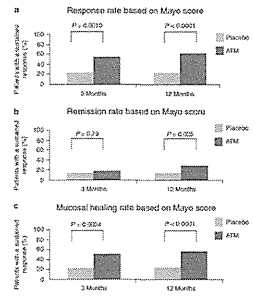
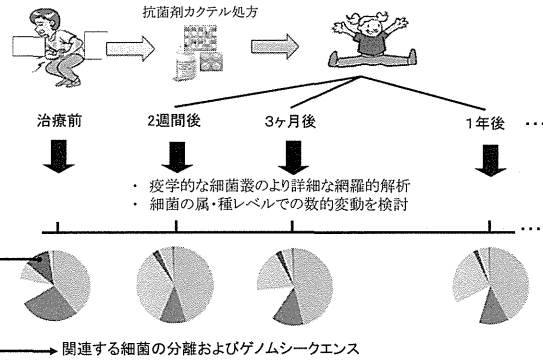
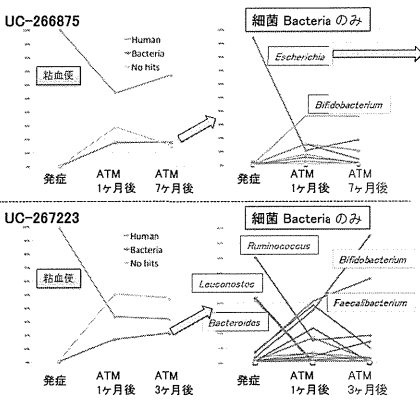


Figure 5. Subanalyses of patients with active ulcerative colitis (UC). Mayo scores of 6–12). The rates of (a) response, (b) remission, and (c) mucosal healing at 3 and 12 months after treatment were significantly higher in the ATM (vancomycin, tetracycline, and metronidazole) group than in the placebo group, except for the remission rate at 3 months after treatment in patients with active UC.

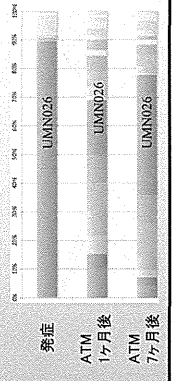
# 研究計画の流れ



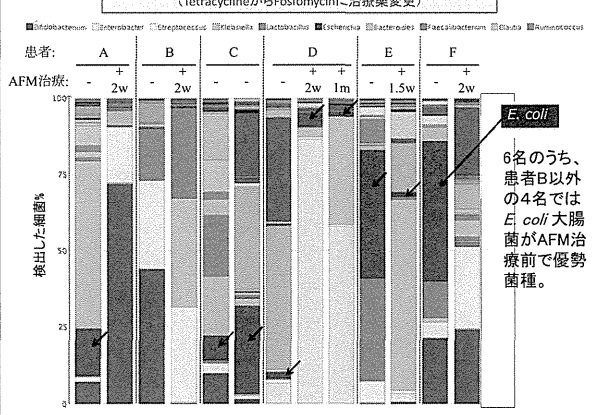
# メタゲノミクスによる細菌フロー解析



大腸菌 *Escherichia coli* 発症時に UMN026と同じ系統の *E. coli* が大多数



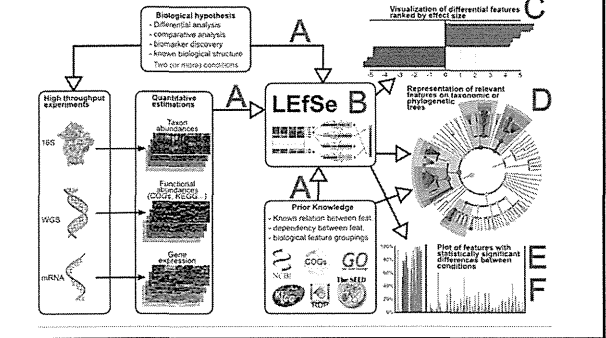
# AFM治療における便フローラの組成分析



6名のうち、患者B以外の4名では *E. coli* 大腸菌がAFM治療前で優勢菌種。

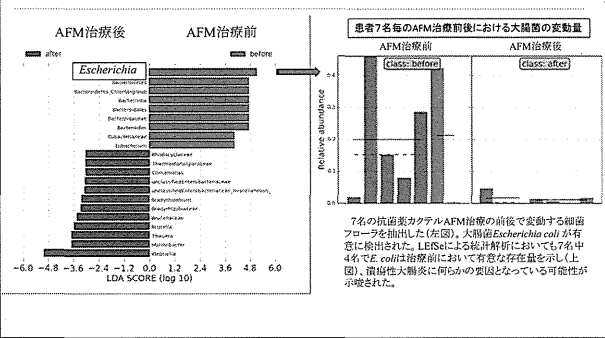
# AFM治療における便フローラのLEfSe 統計解析

LEfSe (Segata, et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) Non-parametric検定とLinear discriminant analysisによる統計解析法。

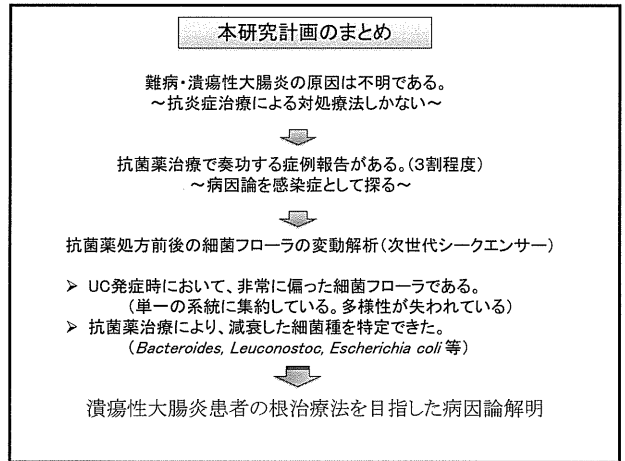
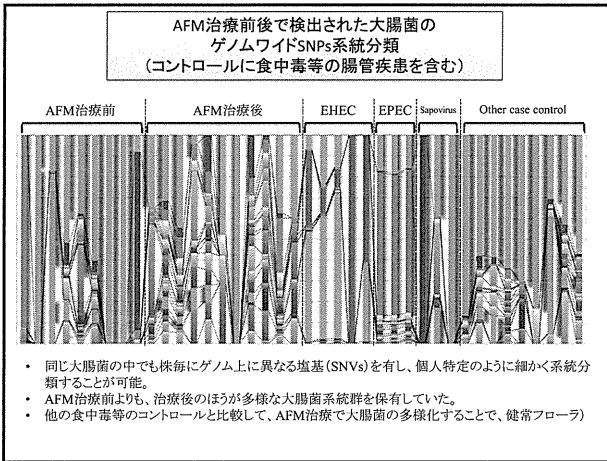


# AFM治療における便フローラのLEfSe 統計解析

LEfSe (Segata, et al, Genome Biol. 12, R60, 2011) Non-parametric検定とLinear discriminant analysisによる統計解析法。



7名の抗菌薬カクテルAFM治療の前後に変動する細菌フローラを抽出した(左図)。大腸菌 *Escherichia coli* が有意に検出された。LEfSeによる統計解析においても7名中4名で *E. coli* は治療前において有意な存在量を示した(右図)。潰瘍性大腸炎に何らかの変因となっている可能性が示唆された。



## 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：野兎病菌亜種間の病原性相異および動物種間の野兎病感受性の相異に関する研究

課題番号：H23-新興-若手-022

予定期間：H23年度からH24年度まで

研究代表者：堀田 明豊

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：獣医科学部

職名：主任研究官

年次別研究費(交付決定額)：

1年目 1,549,000 円 2年目 1,500,000 円 計 3,049,000 円

### **I. 研究の意義**

- (1)野兎病菌亜種 Type A と Type B の亜種間の病原性相異は不明な点が多い。
- (2)日本分離野兎病菌株の性状の詳細な研究は進展していない。
- (3)動物種間の野兎病菌に対する感受性のメカニズムは明らかになっていない。

### **II. 研究の目的、期待される成果**

- (1)野兎病菌の日本分離株と海外由来株との性状相異が明らかになる。
- (2)野兎病菌日本分離株の病原性が明らかになる。
- (3)マウスとラットの野兎病菌感受性の相異の詳細が解明される。

### **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 堀田明豊

(1)保有する野兎病菌全51株中、海外分離全17株と日本分離30株は弱毒化されていると考えられ、病原性解析への供試に不适当であることが判明した。このため海外由来株と日本分離株の病原性比較解析は不能であった。一方、近年分離の2株を含む日本分離4株は野兎病菌の病原性を保持している株と考えられた。

(2)日本分離株の薬剤感受性を解析したところ、供試全34株がペニシリン、セフトキシムに耐性であり、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシンに感受性であった。一般には野兎病治療に有効でないとされるβラクタム系の薬剤のいくつかに感受性を示す株が認められた。この性状から日本の野兎病菌株の薬剤感受性は既報の北米に分布する野兎病菌 Type B biovar I に近いと考えられた。(結果は論文発表予定)