

(狂犬病分野)

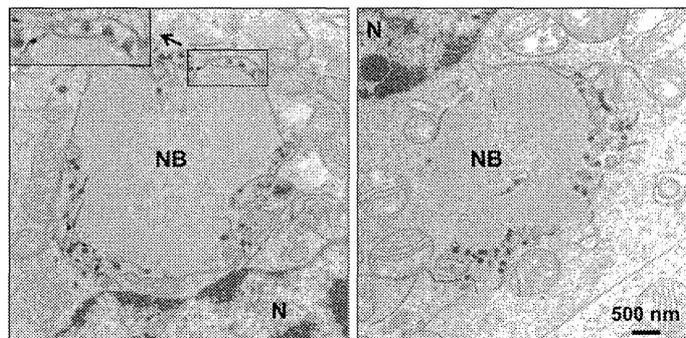


図1 ネグリ小体とそれを取り囲む二重膜

狂犬病ウイルス感染 NA 細胞の電子顕微鏡観察像。ネグリ小体 (NB) 周囲に膜様構造物とウイルス様粒子の出芽像が観察される。N は細胞核を示す。

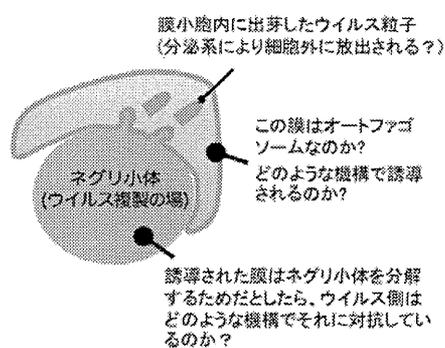


図2 考えられるウイルス複製とオートファジーとの関連(仮説)

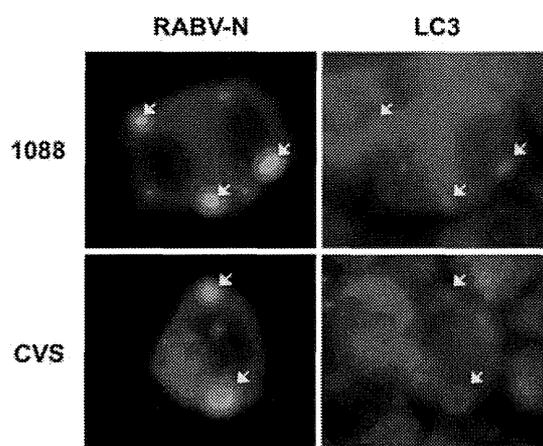


図3 狂犬病ウイルス感染 NA 細胞におけるネグリ小体と LC3 の局在

狂犬病ウイルス (1088 株もしくは CVS 株) 感染 NA 細胞において蛍光抗体法により、狂犬病ウイルス N 蛋白質 (緑) および LC3 (赤) を検出した。矢印は、ウイルス封入体 (ネグ

リ小体) と LC3 が共局在している部分を示す。

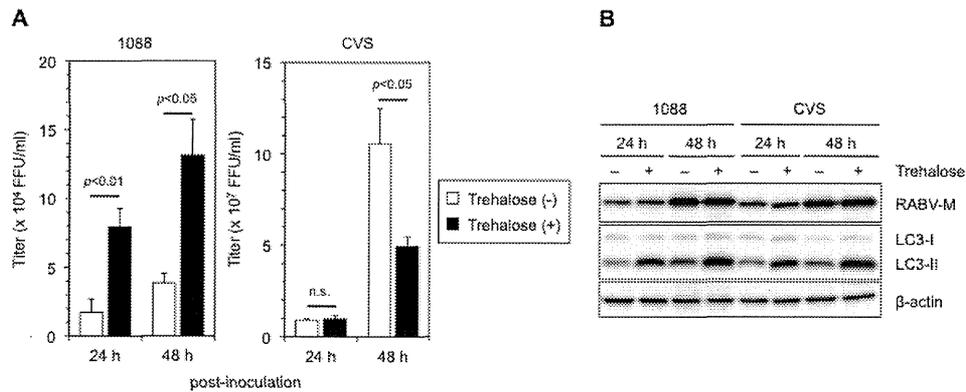


図4 オートファジーの誘導が狂犬病ウイルスの増殖に与える影響

1088 株もしくは CVS 株を NA 細胞に接種後 (moi = 1)、Trehalose (100 mM) 存在下・非存在下で 24 もしくは 48 時間培養した。(A) 培養上清中のウイルス力価を示す。値は 3 つのサンプルの平均を、バーは標準偏差を示す。統計処理は t 検定により行った。n.s. は $p \geq 0.05$ であることを示す。(B) 感染細胞における各種蛋白質の発現はウェスタンブロット法により確認した。

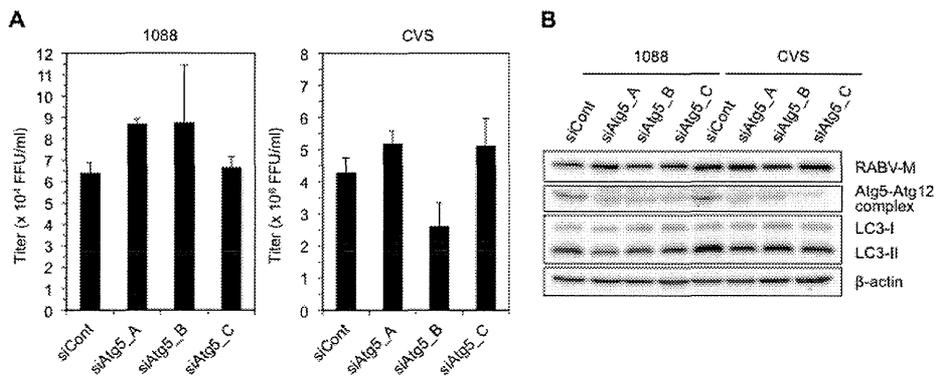


図4 オートファジーの抑制が狂犬病ウイルスの増殖に与える影響

マウス Atg5 特異的 (A~C の 3 種類) もしくはコントロール (siCont) siRNA を 100 nM でそれぞれ NA 細胞に導入した後、1088 株もしくは CVS 株を NA 細胞に接種し (moi = 1)、48 時間培養した。(A) 培養上清中のウイルス力価を示す。値は 3 つのサンプルの平均を、バーは標準偏差を示す。Tukey の多重比較検定では、コントロール siRNA 導入と Atg5 特異的 siRNA 導入の間に有意な差は認められなかった ($p \geq 0.05$)。(B) 感染細胞における各種蛋白質の発現はウェスタンブロット法により確認した。なお、Atg5 は Atg5-Atg12 複合体として検出される。

(アルボウイルス感染症分野)

図1 NS1'発現株と非発現株の共感染実験: トリ細胞(DF-1)でウイルスの継代とともに(p1→p2→p3)、NS1'発現株が優勢になってゆく様子がウイルス塩基配列解析(左)、細胞内のNS1'とNS1蛋白のウエスタンブロット解析(右)で明らかである。

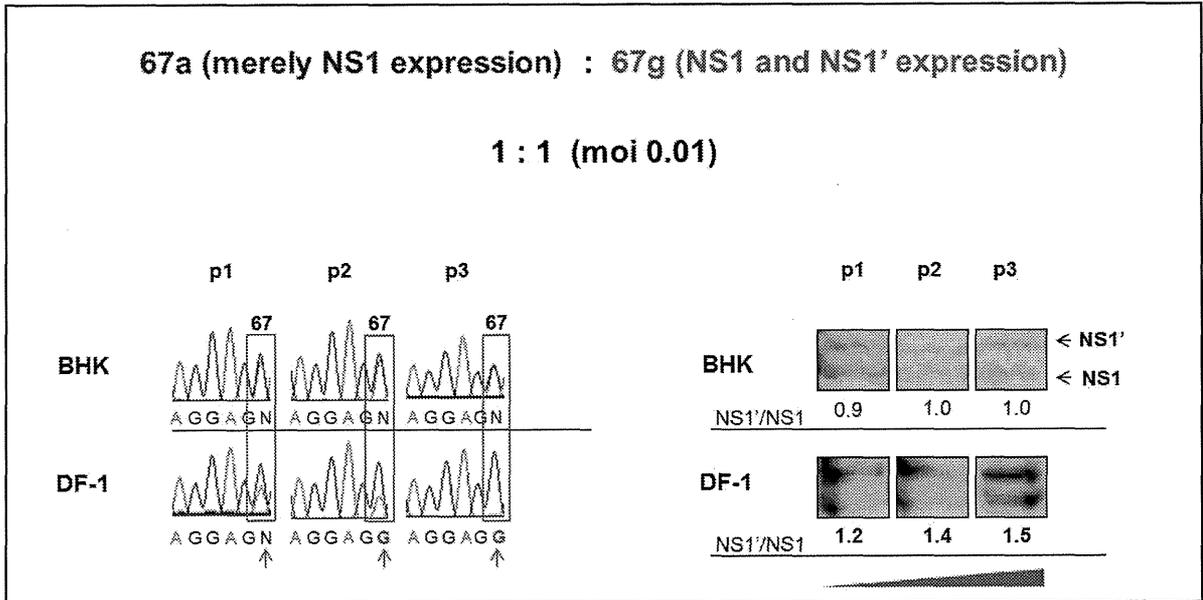
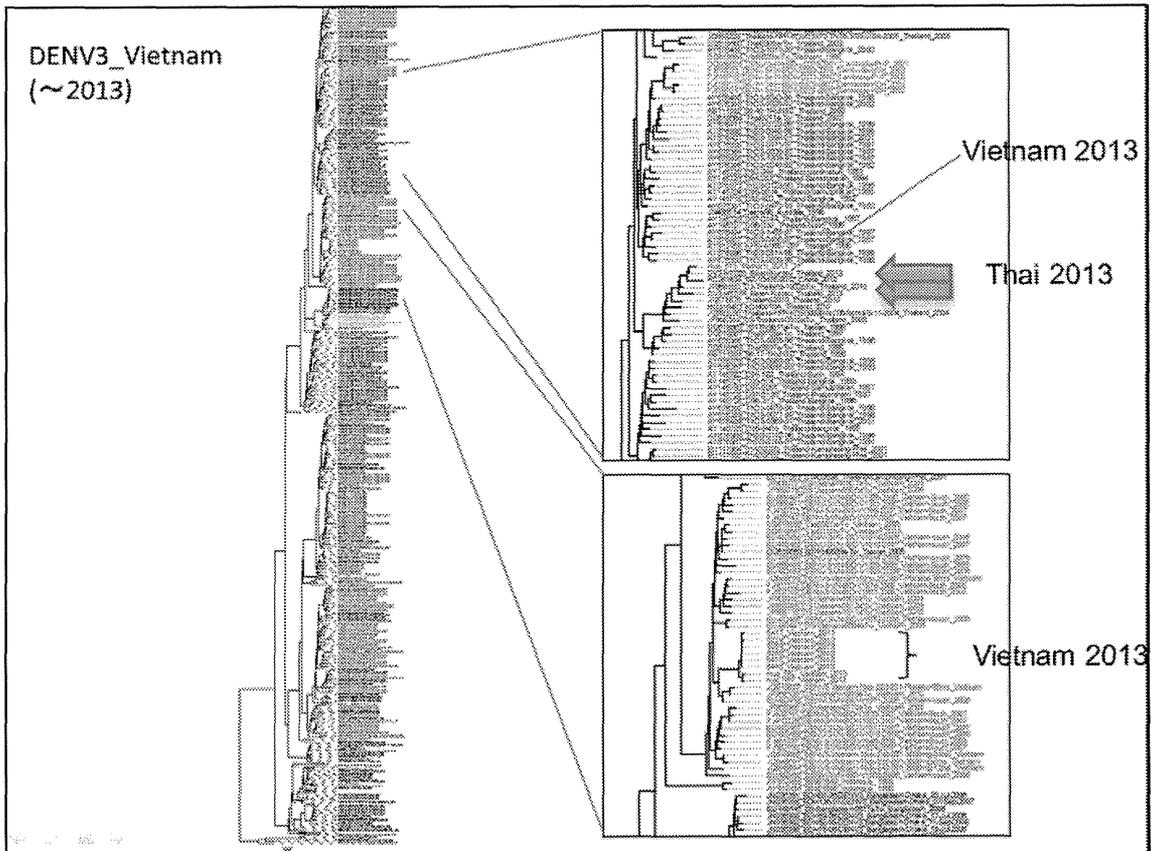


図2ベトナムで分離されたデング 3 型ウイルスの分子疫学解析(タイ株のベトナムへの侵入)



ウイルス肝炎の研究・米側との専門協議
「アジアにおいて特に蔓延するウイルス性肝疾患の制御へ向けた
日米共同ウイルス肝炎研究」

研究分担者： 小池和彦 東京大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：本研究は、日米医学協力研究会（USJCMSP）肝炎部会（以下『日米肝炎』と略す）の活動の一環として実施された。日米肝炎が、アジアに特に蔓延する肝炎ウイルスとしてB型とE型（HBV, HEV）、将来の感染拡大が懸念される肝炎ウイルスとしてC型（HCV）を主要標的として定めたことに呼応し、本研究班の今年度の研究活動も主にこの三種の肝炎ウイルスに関するものであった。更に、最近A型肝炎についても対象として研究を行っている。B型肝炎ウイルスに関しては、家族内キャリア集積の現状把握と解析、HBV培養細胞系の開発とHBV複製機序の解析、miRNAによるHBV複製制御の機構解析、バングラデシュにおけるB型肝炎対策、肝発癌制御の試み等を、E型肝炎ウイルスについては、バングラデシュにおける実態解明と対策へ向けた試みを、A型肝炎についてはアジアにおける流行の実態解明を継続して行なった。アジアのウイルス性肝疾患の制御に資するため、更なる基礎研究、国際医学協力による肝炎対策を進めていく。

A.構成

- <研究分担者>
- | | |
|--|---|
| 小池和彦 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教授（USJCMSP『部会長』） | 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科先進医療開発科学分子病態制御内科学教授（USJCMSP『部会員』） |
|--|---|
- <研究協力者>
- | | |
|--------------------------------------|---|
| 脇田隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部部長（USJCMSP『部会員』） | 金子周一 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学教授（USJCMSP『部会員』） |
|--------------------------------------|---|
- アクバル シェイクモハマドファズレ 東芝病院研究部主任研究員（USJCMSP『部会員』）
- <研究協力者 USJCMSP『米国部会員』>
Christopher Walker （USJCMSP『米国部会長』）

Professor, Ohio State University

Adrian Di Bisceglie

Professor, St Louis University

Michael Gale Jr.

Professor, University of Washington

Anna Lok

Professor, University of Michigan

Rajen Koshy

NIAID, NIH

B.研究目的

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御を目的とする。

C.研究方法

ウイルス肝炎は、世界において最も重要な感染症の一つであり、多くの人に肝硬変、肝癌の災厄をもたらし、一方、劇症肝炎によって生命を脅かしている。特に、社会経済、保健衛生、医療水準的に厳しい状況にあるアジア諸国においては、HBV キャリア率の高さ、現在も増加しつつある HCV への新規感染、A 型肝炎の多発、E 型肝炎の集団発生等、その問題は小さくなることはない。更に、貧困等の社会的状況によって、十分な肝炎・肝癌の診断・治療を受けられない状況も、アジアにおけるウイルス肝炎の morbidity と mortality を上げる原因となっている。この様なアジア諸国における肝炎・肝癌を、日本と米国の研究者・医師が共同研究を通じ、またアジアの研究者を

指導・共同研究することを通して制御することを目的とする。

1.基礎的研究：本研究に参画する班員とその研究協力者が、それぞれの専門領域に於ける基礎研究の深化に努力した。具体的には、HBV と HCV と HEV に関する疫学的、ウイルス学的、免疫学的、分子生物学的研究を行った。

2.米国研究者との研究協力：従来からの日米医学協力研究事業肝炎部会の日米両パネル間の研究協力体制を維持し、先端情報の速やかな相互開示によって、当該領域の知識と技術の増進に努力した。

3.アジア諸国研究者との研究協力：アジア諸国の医師・研究者との間に存在する研究協力体制を更に強化すると同時に、新たな研究協力の可能性をも模索した。

D.研究結果及び考察

(1) USJCMASP 肝炎部会は、本年度は開催されなかった。

(2) B 型肝炎関連肝癌 (B-HCC) の家族歴に焦点を当てた報告は少ないが、これまでの報告を総合すると、親・同胞に HCC 患者が存在すれば本人の発癌リスクは 2~3 倍程度になるものと推測される。本邦における B-HCC の家族歴の実態を明らかにするため、当科に 2007 年~2011 年に入院した B-HCC 125 例 (男性 99 例、女性 26 例、平均年齢 60.5 歳) の家族歴を、診察時の問診および過去の診療記録により調査した。当科における B-HCC では、親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 39 例 (31%)、29 例 (23%)、HCC 歴が

判明している例は7例（6%）、9例（7%）であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については今回の調査では明らかではなく、複数の同胞にB-HCCが確認された濃厚家族歴をもつ4例に限ってみても同様であった。家族歴は、問診が唯一の情報源であるが、臨床医の家族歴への関心があまり高いとは言えないことと、本人自身も家族歴を把握していない例があり、漏れのない正確な情報の集積が今後の課題である。（小池班長）。

（3）初代培養肝細胞にHBVを接種して約2週間後に免疫染色でウイルス蛋白質の発現を確認した。また、テトラサイクリン制御細胞ではcccDNAの発現を確認できた。さらにHepaRG細胞を用いた解析でCsAが感染初期過程を阻害する事を見いだした。また、HBVの複製をIL1betaとTNFalphaが制御することを見いだした。アジア各国ではHBV感染症は大きな健康上の問題であり、本研究は新たな治療法の開発に繋がる重要な研究である。（脇田班員）。

（4）これまでに、血清中のmiR-122とmiR-22について解析を加え、miR-122は血清中のHBs抗原と高度の相関関係を示すことを見いだした。また、miR-122とmiR-22との間には緩やかな相関関係が認められた。血清alanine amino transferaseの活性も両者と相関したが、miR-22との相関の方が強かった。これらのことからmiR-122はウイルス産生と、miR-22は肝細胞障害と相関し、両者とも血清に存在する肝炎関連バイオマーカーとして有用であることが示された。これらの成果は日米肝炎会議で報告した。（茶山班員）。

（5）アジアの発展途上国では適切な予防策がいまだに確立されておらず、公衆衛生システムが未発達なため肝炎の有病率すら把握されていない。現在推奨されている肝炎予防策は、先進国における研究結果から発展してきたものであり、予防目的のための健康保険もないアジアの発展途上国では、そういった予防策をそのまま適用することは困難である。バングラデシュ国民のHEVジェノタイプがほとんど知られていないため、バングラデシュ国内で発生した急性E型肝炎の突発的流行に関する200例から血清検体の収集を行った。その結果、バングラデシュで採取したHEVは全てジェノタイプIであった。バングラデシュにおけるCHBに関する3年間にわたる免疫学的研究、及び発症と治療についての調査から、バングラデシュの社会的・経済的状況と先進国で採用されてきた抗ウイルス剤（NA）を用いた治療法が相いれないことは明白である。こうしたことから、新たな科学的証拠に基づいた治療法、すなわち免疫療法がバングラデシュで開始された。第一相・第二相臨床治験は安全であり、ワクチンを用いた免疫療法の高い治療効果を確認した。

この1年間、第三相臨床治験が二つの治療群のもとに着手されている。一つはHBsAg/HBcAg混合ワクチンを接種した群、もう一つは対照群としてペグインターフェロンを投与した群を設定している。投与は終了し、現段階ではワクチン治療の効果が明らかになることを観察している現在第三相臨床治験では、HBs/HBc抗原ワクチンは、PEGYLATEDインターフェロンより安全であり、同じような効果を示した。社

会・経済・医療制度面において他のアジアの発展途上国も、バングラデシュと多くの点で類似した状況にあるため、本研究で慢性 B 型肝炎の治療法の新ガイドラインはアジアの多くの発展途上国においても適用可能である。(Akbar 班員)。

(6) BおよびC型の慢性肝炎、肝硬変および関連する肝細胞がんを対象とする。培養細胞、実験動物系、ヒト臨床材料より核酸を抽出し real time PCR, DNA sequence を始めとする解析を行い、幹細胞に及ぼす変化を解析した。肝炎ウイルスによって引き起こされる慢性肝炎の病態、肝硬変および肝細胞がんへの進展の病態が明らかになる。これによって感染の予防、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がんの診断、さらに治療に重要な標的分子および標的とする経路が明らかになる。本研究は日米医学研究協力をもとに、アジアにおける肝炎ウイルス行政および社会への貢献も大きいと考えられる。また、本研究により開発される薬物の保健医療への貢献は大きい。(金子班員)。

E. 結論

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御という目的のための個別研究は、予定通りに進捗した。日米医学の枠組みの再検討が進展し、主に経済的な理由から、一つの「ジャンボミーティング」を開催して同時に部会を開催するという方針となった。そのため、昨年度に開催された肝炎部会は、今年度は部会は開始英樹されなかった。しかし、肝炎部会はアジアにおける B 型肝炎の制圧に向けた研究を中心として、大きな成果をあげることができた。アジアにおける B 型肝炎の

現状と問題点が明らかになり、対策のポイントを日米両国において今後も継続して確認して行くこととした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

小池班長

- 1) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- 2) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. Int J Cancer 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- 3) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of HBV after the onset

- lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- 4) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalapur S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- 5) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
- 脇田隆字
- 6) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology*. 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- 7) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. 443(3):808-813.
- 8) Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J; CEVHAP North Asia Workshop on Viral Hepatitis. Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO Framework for Global Action on viral hepatitis in North Asia. *J Hepatol*. 2013. 59(5):1073-1080.
- 9) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013. 288(44):31715-31727.
- 茶山一彰
- 10) Ohishi W, Cologne JB, Fujiwara S, Suzuki G, Hayashi T, Niwa Y, Akahoshi M, Ueda K, Tsuge M and Chayama K. Serum interleukin-6 associated with hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study. *Int J Cancer*. 2014; 134: 154-163.

- 11) Kosaka K, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T and Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 441: 230-235.
- 12) Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H and Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*. 2013; 48: 1188-1204.
- 13) Tsuge M and Chayama K. Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*. 2013; 48: 779-780.
- 14) Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W and Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 2013; 85: 789-798.
- アクバル シェイク MF
- 15) Akbar SM, Al-Mahtab M, Uddin MH, Khan MSI. Scope and limitation of HBsAg-, HBcAg-, and HBsAg/HBcAg-based combined therapeutic vaccines in chronic HBV infection: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2013;12(4):363-369.
- 16) Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI. Non-antigen-specific and antigen-specific immune therapies for chronic hepatitis B: Evidences from laboratory benches and patient's bedsides. *Expert Opin Biol Ther* 2013;13(7): 1063-1074.
- 17) Al-Mahtab M, Akbar SM, Aguilar JC, Uddin H, Khan MS, Rahman S. Therapeutic potential of combined hepatitis B surface antigen and core antigen vaccine in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2003; 784:981-989.
- 18) Stefanska B, Bouzeimat A, Huang J, Sudermant M, Hallett M, Han Z-G, AL-Mahtab M, AkbarSM, Khan WA, Raqib R, Szyfi M. Discovery and validation of DNA hypomethylation biomarkers for liver cancer using HRM-specific probes. *PlosOne* 2013; 8(8):e68439.
- 金子周一
- 19) Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology* (in press)

- 20) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nat Med* 2013;19(11):1542-1546.
- 21) Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology* 2013;58(3):1133-1142.
- 22) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57(4):1484-1497.
- 23) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Yamashita T, Fushimi K, Kaneko S. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57(4):1448-1457.

I. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

急性呼吸器感染症の研究・米側との専門協議

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

この研究では、アジア地域の途上国で問題となっている急性呼吸器感染症について、研究や対策に関する計画を立案することを目的としている。今年度は米国側との申し合わせにより、特に細菌の薬剤耐性をメインテーマとして研究を遂行した。日本及びアジアの国々においては、様々な病原細菌で薬剤耐性が問題となっている。マイコプラズマでは特にマクロライド耐性の増加が著しく、治療上問題となっていることが明らかになった。日本においては関連学会が治療のガイドラインを出しているが、今後も状況の変化に合わせて改定し、またアジア各国においてはまず実態を把握し、状況に合わせたガイドラインが必要と考えられる。百日咳では、薬剤耐性は現在のところ大きな問題とはなっていないが、先進国で導入されている acellular vaccine の感染防御効果が不十分である可能性が指摘されている。アジアの途上国では、旧来の whole cell vaccine が用いられているが、acellular vaccine に切り替えるべきか、議論が行われている。日本を含む先進国での acellular vaccine の効果に関する基礎研究、疫学研究が必要である。肺炎球菌では、ワクチン導入に伴って侵襲性肺炎球菌感染症が減少したことが明らかになった。同時にペニシリン耐性の割合は減少したが、トスフロキサシン耐性の割合は増加傾向にあることが分かった。ワクチンでカバーされる血清型は限られており、またキノロン系薬剤は安価でよく用いられるので、今後も臨床で分離される菌の血清型や薬剤耐性についてモニターが必要である。薬剤耐性は、日和見感染を起こす細菌でも大きな問題となっている。アジアの途上国では、NDM 型、KPC 型や OXA-48 型等新型カルバペネマーゼを産生する多剤耐性菌が広く蔓延し、医療機関において深刻な問題となっている。日本においてはこれらの新型カルバペネマーゼ産生菌は、これまで輸入例を中心に十数例から分離されているのみである。日本においてカルバペネム耐性は、例えば大腸菌では 0.1% であるが、アジアの途上国では非常に多いとされている。これらの耐性菌は抗菌薬の不適切な使用及び院内感染により拡散する。アジアの途上国においては、抗菌薬の使用に関しての制度や医療現場における感染対策に課題があると考えられる。

研究協力者				
山中 昇	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科	喜田 宏	北海道大学大学院	獣医学研究科
河岡 義裕	東京大学医科学研究所・感染免疫部門 ウイルス感染分野	鈴木 宏	新潟青陵大学 北里生命科学研究所	ウイルス感染 制御
田代 真人	国立感染症研究所・インフルエンザウ イルス研究センター	中山 哲夫	久留米大学医学部	感染医学講座臨 床感染医学部門
中野 貴司	川崎医科大学・小児科学	渡辺 浩	新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座	
森島 恒雄	岡山大学大学院医歯学総合研究科 小児医科学	齋藤 玲子	公衆衛生学	
荒川 宜親	名古屋大学大学院 医学研究科 分 子病原細菌学	石和田稔彦	千葉大学附属病院	小児科
堤 裕幸	札幌医科大学医学部小児科 国立感染症研究所感染症情報センタ ー	保富 宗城	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科	
大石 和徳	東北大学大学院医学系研究科 微生 物学分野	平岡 政信	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科	
押谷 仁	国立感染症研究所 インフルエンザ ウイルス研究センター	山内 一真	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科	
長谷川秀樹		山崎 勉	わかばこどもクリニック	
		菖蒲川 由 郷	新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生学	

高橋 幸子 千葉大学附属病院 小児科
見理 剛 (国立感染症研究所・細菌第二部)
蒲地 一成 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 里和 (国立感染症研究所・細菌第二部)
松井 真理 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 仁人 (国立感染症研究所・細菌第二部)

A. 研究目的

急性呼吸器感染症 (ARI) は、インフルエンザなどのウイルスおよび、肺炎球菌やインフルエンザ菌、マイコプラズマなどの細菌、その他多種類の病原微生物が関与する。ARI は先進国、途上国ともに common disease として感染者は非常に多い。これらの病原体は、治療薬の使用やワクチン接種などの宿主環境の変化に適応し、進化を続けるため、有効な対策を策定するためには、病原体の監視と解析を継続し、対策法を随時アップデートして行く必要がある。本研究は、日米双方の研究成果について情報交換を行って、今日 ARI 感染症に対してどのような研究が行われ、どのようなことが明らかになっていて、どのような対策が取られているのかを俯瞰的に把握し、それをもとにより適切な対策のためどのような研究、対応が必要なのかを明らかにし、政策への提言を行って、日本及びアジア地域での感染症対策の向上に資することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、特にインフルエンザ、マイコプラズマ、百日咳、肺炎球菌などを中心に、各研究班などで得られている次の情報を整理する。①疫学的データの集積・特徴的な臨床像の解析、②病態の解明、③変異と薬剤耐性、④ワクチンによる疾病予防とワクチン導入後の病原体および疾病変化、⑤感染症対策の策定に資する情報の提供、⑥新型インフルエンザ発生に対する危機管理。

今年度は、米国側との申し合わせにより、特に細菌の薬剤耐性をメインテーマとして研究を遂行した。マイコプラズマ、百日咳、薬剤耐性菌に関する分子疫学、分子生物学的研究、肺炎球菌では、ワクチン導入にともなう流行型の変化の分子疫学、新規ワクチン開発について、各研究班での研究の成果を把握、整理した。そしてこれらを踏まえ、どのような施策が必要で、さらにどのような研究が必要かを検討した。これらについて、H26年2月12日にバングラデシュダッカの国際下痢疾患研究センター、バングラデシュ (ICDDR, B) において開催された日米合同会議で日米双方の研究者と議論を行った。また、ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) の研究者と議論を行った。

倫理面への配慮

該当なし

C. 研究結果

日米合同会議での発表と議論、またベトナム NIHE の研究者との議論について、以下に記載する。また、日米合同会議の抄録を巻末に添付する。

アジアの途上国においては、様々な病原細菌で薬剤耐性が問題となっている。マイコプラズマではアジア地域で特にマクロライド耐性の増加が著しく、治療上問題となっていることが明らかになった。マイコプラズマは日本では 2000 年頃までは耐性はほとんど見られなかったが、近年耐性菌の割合が著しく増加し、2011 年では約 9 割が耐性菌と報告されている (生方ら、<http://idsc.nih.gov/iasr/rapid/pr3814.html>)。実際にマクロライドの有効性を検討するため、我々は医療機関の協力を得て、外来治療を経ずに入院となった 176 例についてその治療予後を初期治療抗菌薬ごとに比較した。これまで有効とされてきた抗菌薬のうち、マクロライド治療群がミノサイクリン、フルオロキノロン治療群にくらべ抗菌薬の変更率が高く、有熱期間や罹病期間もやや延長していた (表 1)。β-ラクタム単剤治療群を基準として比較した線形多変量解析の結果、有熱期間はいずれの抗菌薬も β-ラクタム単剤治療群と有意な差を認めなかったが、罹病期間は、ミノサイクリン治療群のみが有意差を認め、β-ラクタム単剤治療群と比較して 2.5 日 (95%信頼区間: 0.7~4.3 日) 短縮していた。つまり、マクロライドの治療効果が有意でないことを示す結果となった。クリンダマイシンも同様に治療効果が有意でなかった。ただ、これは対象を比較的重症な症例としたため、結果的に耐性菌が多かった可能性がある。外来治療例など、軽症例を含めればマクロライドの治療効果は有意に示された可能性が高い。日本小児呼吸器疾患学会と日本小児感染症学会が出している小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2011 追補版 (平成 25 年) では、まず LAMP 法等高感度の検出法によりマイコプラズマを正確に診断した上で、第一選択薬としてマクロライド系薬を推奨している。マクロライド系薬の効果は投与後 2-3 日以内の解熱で概ね評価出来、マクロライド系薬が無効で必要があると判断される場合はトスフロキサシンあるいはテトラサイクリン系薬の投与を検討するとされている。ただし、8 歳未満にはテトラサイクリン系薬剤は原則禁忌とされている。トスフロキサシンについては、現在のところ市販後調査で重篤な副反応である関節障害は報告されていない。マイコプラズマは 2011 年から 2012 年にかけて日本で大流行があった。今後も周期的に流行が来る可能性がある。耐性菌の動向を調査し、適切な治療法について検討を続ける必要があると考えられる。またマイコプラズマは培養が難しいため、アジアの途上国では、薬剤耐性に関する情報が限られている。各国の状況を正確に把握した上で、適切な治療法に関するガイドラインを作成する必要があると考えられる。また、抜本的な対策として、ワクチン開発も必要である。マイコプラズマの接着に関わる P1 蛋白などが

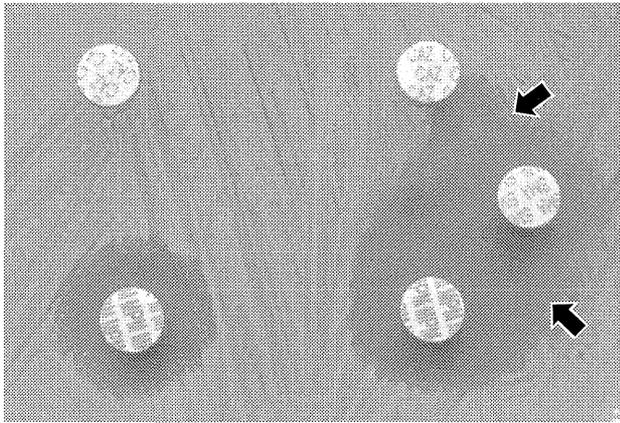
有力な抗原の一つと考えられる。

百日咳では、薬剤耐性は現在のところ大きな問題とはなっていないが、1980年代から日本をはじめ先進国で導入された acellular vaccine の感染防御効果が不十分である可能性が近年指摘されている。日本では中高生や大学生でアウトブレイクが報告されている。米国では成人で百日せきワクチンの追加接種が実施されるようになった (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6001a4.htm>)。しかし、それにより成人の百日咳症例が減少したのかどうかははっきりしない。アジアの途上国では、未だ旧来の whole cell vaccine が用いられてきており、副反応がより少ない acellular vaccine への切り替えが議論されていたところだが、結論を出すにあたり先進国での acellular vaccine の評価が待たれている。そのためにはまず正確なサーベイランスが必要である。ところで、百日咳の診断は従来、東浜株、山口株に対する抗体価測定法(菌凝集素価法)が用いられていたが、2008年度に厚生労働省が実施した感染症流行予測調査で健康人でもしばしばこれらの抗体価が高いことが示されたため、今日では用いられていない。現在、血清診断は抗百日咳毒素(PT) IgG 抗体を測定する方法が主流になっている。しかしながら、抗体が誘導されるのは咳嗽出現後少なくとも1週間程度を要するため、臨床現場での診断は多くの場合は臨床診断である。感染症法に基づく医師の届出でも、血清診断法は届出基準に含まれていない。届出の対象は、臨床的特徴から百日咳が疑われ、かつ2週間以上持続する咳嗽及び、スタカート及びウープを伴う咳嗽発作、または新生児や乳児で他に明らかな原因がない咳嗽後の嘔吐又は無呼吸発作が認められる場合とされている。全国約3,000カ所の小児科定点医療機関において、この届出基準に当てはまる症例があった場合に届出がされて、集計が行われている。百日咳として届出があった症例の中には、マイコプラズマ、ライノウイルスその他のウイルスによるものもかなり含まれていることが分かっている。今後、正確に百日咳の罹患率と、ワクチン効果を解析するには、病原体の遺伝子検出などによる正確な検出法を用いて、Population-based のサーベイランスを実施する必要がある。またそれとともに、近年の分離株が昔の株と比較して抗原性や病原性の違いがあるのかなどについて基礎的な研究を進める必要もある。仮に、現行のワクチンが近年の流行株に対しては効果を期待出来ないことが明らかになれば、新規ワクチン開発を進める必要がある。

肺炎球菌では、国内では7価、及び13価のワクチンが導入されたことに伴い、肺炎球菌感染症が減少したことが明らかになった。2008年に肺炎をおこした16歳未満の患者486名と、2012年の同様の患者495名を比較したところ、肺炎球菌による症例が有意に減少していた(62.5% in 2008 versus 18.4% in 2012, $p < 0.001$)。保菌と感染症の区別は、鏡検検査での喀痰の質の確認と、菌量から、また純培養で

分離された場合は起炎菌と判断した。ペニシリンのMIC₅₀は0.5µg/mlから0.25µg/mlに下がっていた。ただ、トスフロキサシンのMIC₅₀は0.12µg/ml以下から0.25µg/mlに上昇していた。7価ワクチンにカバーされていない血清型19Aにはペニシリン耐性が多いが、昨年にこの型をカバーする13価ワクチンが導入されたので、今後ペニシリン耐性の割合は減少していくことが期待される。厚生労働省院内感染対策サーベイランスの集計によると、国内の医療機関で分離される肺炎球菌では、86.6%がマクロライド耐性である (<http://www.nih-janis.jp/index.asp>)。肺炎球菌の治療にはマクロライドは効果が期待出来ない状況であるので、トスフロキサシンが使われることも多いと考えられる。トスフロキサシンの耐性については、引き続き監視が必要である。また13価ワクチンでもカバーされていない血清型15Aが分離されているので、今後注意が必要と考えられる。さらに、膿胸の症例についても検討に含めるべきと考えられる。肺炎球菌は小児の鼻咽頭に他の常在菌とともに常在するが、何らかの感染症の治療で抗菌薬が投与されると、常在菌のPopulationに占める *Haemophilus influenzae* や *Moraxella catarrhalis* 及び肺炎球菌の割合が大きくなることが明らかになっている。保菌状態の肺炎球菌は侵襲性感染症の原因となり得るので、常在する菌についてもサーベイランスを行う意義があると考えられる。常在菌のPopulationについては、さらに年齢をマッチさせた比較や、米国で行われている同様の解析結果と比較することも有用であろう。アジアの途上国においては、抗菌薬が処方箋なしで市中の薬局で購入出来る。特にキノロン系薬剤は安価であり、様々な感染症で頻繁に使われていると推測される。これらの国において、肺炎球菌の薬剤耐性についての情報は限られている。正確に実態を把握した上で、抗菌薬の処方の適正化を図る必要がある。

薬剤耐性は、日和見感染を起こす細菌でも大きな問題となっている。アジアの途上国では、新型のNDM型、KPC型やOXA-48型カルバペネマーゼを産生する多剤耐性菌が広く蔓延し、医療機関において深刻な問題となっている。これらの耐性菌は通常良く用いられるほとんどの薬剤に耐性のため、治療に困難を来す。国内医療機関でのNDM型、KPC型、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌の分離状況を表2に示す。これらのカルバペネマーゼ産生菌は、いずれも輸入例が中心であり、今のところ国内での拡散は認められない。我々は、NDM型カルバペネマーゼ産生菌の簡便なスクリーニング法を開発した。Muller Hinton培地でNDM型カルバペネマーゼ産生菌を塗布し、セフトチジム(CAZ)、メロペネム(MPM)と、SMAディスクを下図のように配置すると、SMAディスクの周囲に特徴的な阻止円の拡大が観察される。



本法をまずスクリーニングとして用い、PCR 等で遺伝子を確定することで、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を効率的に検出出来ると考えられる。この方法は、ベトナム NIHE に移転した。ところで、日本においては、カルバペネマーゼ産生菌は比較的少ない。厚生労働省院内感染対策サーベイランスの 2012 年の集計では、臨床分離菌でイミペネム耐性は大腸菌では 0.1%、*Klebsiella pneumoniae* では 0.2% である。米国では腸内細菌科細菌全体で 4.2%、特に *K. pneumoniae* に限ると 10.4% と報告されている。アジアの途上国ではさらに多いとされている。これらの耐性菌は不適切な抗菌薬の使用及び院内感染により拡散する。アジアの途上国においては、抗菌薬が処方箋なしで市中で購入できることや、医療現場における感染対策が極めて不十分であることが背景にあると考えられる。

D. 考察

マイコプラズマはこれまで 4 年周期で流行が起こってきた。次の流行では、耐性菌がさらに多くなる可能性が高い。入院、外来も含めて耐性の割合について調査を実施し、状況の変化に応じて適切な治療薬の選択についてのガイドラインを示していく必要がある。マイコプラズマは培養が難しいため、アジアの途上国でのマクロライド耐性の実態については情報が少ない。実態を正確に把握し、適切な治療法に関するガイドライン等を整備すべきと考えられる。

百日咳は、臨床診断では他の感染症の紛れ込みが多く精度が低い。まず日本国内での百日咳患者の発生動向を正確に把握する必要がある。病原体の遺伝子検出法などを用いたサーベイランスを実施する必要がある。そして、現行の acellular vaccine の効果を評価し、米国で実施されているように成人で百日咳ワクチンの追加接種が必要なかどうか、またアジアの途上国において whole cell vaccine を acellular vaccine に切り替えるのがよいかどうか、判断するための evidence を出していく必要がある。

肺炎球菌は、日本においてはワクチン導入に伴いペニシリン耐性株の分離も減少した。しかしトスフロキサシン耐性が分離されており、またキノロン系薬剤は臨床で頻繁に用いられるので、今後も耐性菌

について注意深く監視する必要がある。キノロン系の抗菌薬は、アジアの途上国では安価に購入できるため、耐性の動向について注意を払う必要がある。

海外で蔓延している NDM 型、KPC 型、OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌は、現在のところ国内には輸入例を中心に 10 数例にとどまっていた。しかし、今後輸入例をきっかけに国内で拡散する恐れも有るため、注意深く監視することが必要である。アジアの途上国においては、抗菌薬が市中で処方箋なしで購入できること、医療機関での院内感染対策が不十分であることが背景にあると考えられる。

E. 結論

マイコプラズマは日本およびアジア地域でマクロライド耐性が近年非常に増えている。今後も耐性の動向を調査し、治療法に関するガイドラインを適宜改定していく必要がある。アジアの途上国においては簡便に耐性を判定出来る検査法の開発、普及が求められる。またワクチン開発も感染対策に資する有力なアプローチである。

百日咳は、日本においては今後 LAMP 法を用いて正確なサーベイランスを実施し、発生動向を適確に把握する必要がある。また先進国で導入されている acellular vaccine の効果についても正確な評価が必要である。そしてその結果について whole cell vaccine を使っているアジアの途上国への情報提供が必要である。それとともに、今後さらに改良ワクチンを開発していく必要がある。

肺炎球菌は、引き続き分離株の血清型別についてサーベイランスを実施し、ワクチンでカバーされている血清型との関連をモニターしていく必要がある。同時に、耐性菌について注意深く監視する必要がある。

日本においては、海外で蔓延している新型耐性菌の流入に引き続き注意する必要がある。アジアの途上国においては抗菌薬が適正に使用されるような社会制度の整備と、感染拡大を防止するための院内感染対策のレベル向上が必要である。

F. 健康危険情報

マイコプラズマ肺炎の患者の治療にあたっては、まずマイコプラズマの診断を正確に行う事と、マクロライド耐性の可能性を考え、ガイドラインに沿った対応が必要である。

医療機関において海外で入院歴のある患者を受け入れる場合は、NDM 型、KPC 型、OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌等を保菌している可能性を考える必要がある。もしこれらが検出されたら、拡散防止のための対策を十分にとる必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Evaluation of a

- Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo- β -Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(1):66-8.
- 2) Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. A subclass B3 metallo- β -lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. 2013 Dec 18.
 - 3) Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. *Genome Announc.* 2013 Oct 31;1(5). pii: e00919-13.
 - 4) Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One.* 2013 Oct 4;8(10):e77165.
 - 5) Matsui M, Shibayama K, Tsuji Y, Kamimura H, Karube Y, Yoshida M, Masuda Y, Hiraki Y, Takaki K, Kawano F. Isolation of genetically indistinguishable carbapenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii* Isolates from a single patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5781-2.
 - 6) Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Rimbara E, Asai S, Miyachi H, Takata T, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome Sequences of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains from Nosocomial Outbreaks in Japan. *Genome Announc.* 2013 Jul 18;1(4). pii: e00476-13.
 - 7) Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of bla(OXA-51-like) genes. *J Microbiol Methods.* 2013 Aug;94(2):121-4.
 - 8) Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino J, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Shibayama K, Arakawa Y. Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(3):222-5.
 - 9) Kimura K, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(2):158-60.
 - 10) Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Nagano N, Shibayama K, Arakawa Y. High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B Streptococcus. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jul;68(7):1533-6.
 - 11) Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, Toyama M, Matsui M, Shibayama K, Arakawa Y. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(1):79-81.
 - 12) Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, Shibayama K. Detection of tripoli metallo- β -lactamase 2 (TMB-2), a variant of blaTMB-1, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jun;68(6):1441-2.
 - 13) Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y. Ability of the VITEK(R) 2 system to detect group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS). *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jun;68(6):1442-4.
 - 14) Tamura K, Matsubara K, Ishiwada N, Nishi J, Ohnishi H, Suga S, Ihara T, Chang B, Akeda Y, Oishi K; the Japanese IPD Study Group. Hyporesponsiveness to the infecting serotype after vaccination of children with seven-valent pneumococcal conjugate vaccine following invasive pneumococcal disease. *Vaccine.* 2014 Jan 28. pii: S0264-410X(14)00063-2.
 - 15) Otsuka T, Kitami O, Kondo K, Ota H, Oshima S, Tsuchiya A, Shirai T, Fujii K, Nakamura M, Shoji Y, Nakamura H, Masuda Y, Komiyama K, Yoshida K, Ishikawa Y, Iwaya A, Takahashi S, Okazaki M, Hotomi M, Yamanaka N. Incidence survey of acute otitis media in children in Sado Island, Japan--Sado Otitis Media Study (SADOMS). *PLoS One.* 2013 Jul 2;8(7):e68711.
 - 16) Hotomi M, Togawa A, Kono M, Sugita G, Sugita R, Fujimaki Y, Kamide Y, Uchizono A, Kanesada K, Sawada S, Okitsu N, Masuda H, Tanaka H, Tanaka Y, Yamanaka N. An application of outer membrane protein p6-specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Haemophilus influenzae* in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions. *PLoS One.* 2013 Aug 28;8(8):e71774.
 - 17) Takei S, Hotomi M, Yamanaka N. Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. *J Infect Chemother.* 2013 Jun;19(3):504-9.

- 18) Hotomi M, Togawa A, Kono M, Ikeda Y, Takei S, Hollingshead SK, Briles DE, Suzuki K, Yamanaka N. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan. PLoS One. 2013;8(3):e58124.
- 19) Otsuka T, Chang B, Shirai T, Iwaya A, Wada A, Yamanaka N, Okazaki M; SADO-study Working Group: Individual risk factors associated with nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: a Japanese birth cohort study. Pediatr Infect Dis J. 2013;32(7):709-14.
- 20) Neumann G, Macken CA, Kawaoka Y. Identification of amino acid changes that may have been critical for the genesis of A(H7N9) influenza viruses. J Virol. 2014 Feb 12.
- 21) Wang G, Deng G, Shi J, Luo W, Zhang G, Zhang Q, Liu L, Jiang Y, Li C, Sriwilaijaroen N, Hiramatsu H, Suzuki Y, Kawaoka Y, Chen H. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. J Virol. 2014 Feb 5.
- 22) Nakayama M, Shichinohe S, Itoh Y, Ishigaki H, Kitano M, Arikata M, Pham VL, Ishida H, Kitagawa N, Okamoto M, Sakoda Y, Ichikawa T, Tsuchiya H, Nakamura S, Le QM, Ito M, Kawaoka Y, Kida H, Ogasawara K. Protection against H5N1 Highly Pathogenic Avian and Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Infection in Cynomolgus Monkeys by an Inactivated H5N1 Whole Particle Vaccine. PLoS One. 2013 Dec 23;8(12):e82740.
- 23) Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. Virulence-Affecting Amino Acid Changes in the PA Protein of H7N9 Influenza A Viruses. J Virol. 2013 Dec 26.
- 24) Fonseca W, Ozawa M, Hatta M, Orozco E, Martínez MB, Kawaoka Y. A recombinant influenza virus vaccine expressing the F protein of respiratory syncytial virus. Arch Virol. 2013 Dec 1.
- 25) Xiong X, Coombs PJ, Martin SR, Liu J, Xiao H, McCauley JW, Locher K, Walker PA, Collins PJ, Kawaoka Y, Skehel JJ, Gamblin SJ. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. Nature. 2013 May 16;497(7449):392-6.
- 26) Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. J Virol. 2013 Jul;87(14):7874-81.
- 27) Takahashi T, Song J, Suzuki T, Kawaoka Y. Mutations in NA that induced low pH-stability and enhanced the replication of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus at an early stage of the pandemic. PLoS One. 2013 May 16;8(5):e64439.
- 28) Deng G, Tan D, Shi J, Cui P, Jiang Y, Liu L, Tian G, Kawaoka Y, Li C, Chen H. Complex reassortment of multiple subtypes of avian influenza viruses in domestic ducks at the Dongting Lake Region of China. J Virol. 2013 Sep;87(17):9452-62.
- 29) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamoto M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. Nature. 2013 Sep 26;501(7468):551-5.
- 30) Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y. The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. J Virol. 2013 Nov;87(21):11316-22.
- 31) Mitchell HD, Einfeld AJ, Sims AC, McDermott JE, Matzke MM, Webb-Robertson BJ, Tilton SC, Tchitchek N, Josset L, Li C, Ellis AL, Chang JH, Heegel RA, Luna ML, Schepmoes AA, Shukla AK, Metz TO, Neumann G, Benecke AG, Smith RD, Baric RS, Kawaoka Y, Katze MG, Waters KM. A network integration approach to predict conserved regulators related to pathogenicity of influenza and SARS-CoV respiratory viruses. PLoS One. 2013 Jul 25;8(7):e69374.
- 32) Sugita Y, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y. Configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. J Virol. 2013 Dec;87(23):12879-84.
- 33) Kobayashi H, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Uraki R, Ichiko Y, Takimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent influenza virus

- bearing the HN glycoprotein of human parainfluenza virus as a bivalent vaccine. *Vaccine*. 2013 Dec 16;31(52):6239-46.
- 34) Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Einfeld AJ, Neumann G, Hase T, Ghosh S, Shoemaker JE, Lopes TJ, Watanabe T, Watanabe S, Fukuyama S, Kitano H, Kawaoka Y. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol*. 2013 Oct 2;7:97.
- 35) Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, Imai M, Hatta M, Nelson CW, O'Connor DH, Hughes AL, Neumann G, Kawaoka Y, Friedrich TC. Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat Commun*. 2013;4:2636.
- 36) Takashita, E., Ejima, M., Fujisaki, S., Kishida, N., Xu, H., Imai, M., Yamashita, K., Kim, N., Sato, A., Sugawara, H., Itoh, R., Doi, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tashiro, M., Odagiri, T., the Influenza Virus Surveillance Group of Japan Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *J. Influenza other Respir. Viruses* DOI:10.1111/irv.12132 (2013)
- 37) Fujisaki, S., Imai, M., Takashita, E., Taniwaki, T., Xu, H., Kishida, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tashiro, M., Odagiri, T. Mutations at the monomer-monomer interface far from the active site of influenza B virus neuraminidase cause reduced susceptibilities to neuraminidase-inhibitor drugs *J. Infect. Chemother*. DOI 10.1007/s10156-013-0589-6 (2013)
- 38) Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Kiselev, O., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Avian flu transmission research resumes. *Science* DOI: 10.1126/science.1235140 (2013)
- 39) Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Kiselev, O., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu *Nature* 493: 460, 2013.
- 40) McKimm-Breschkin, J. L., Williams, J., Barrett, S., Jachno, K., McDonald, M., Mohr, P., Saiito, T., Tashiro, M. Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase *J. Antimicrobial Chemotherapy*. doi: 10.1093/jac/dkt205 (2013)
- 41) Kushibuchi, I., Kobayashi, M., Kusaka, T., Tsukagoshi, H., Ryo, A., Yoshida, A., Ishii, H., Saraya, T., Kurai, D., Yamamoto, N., Kanou, K., Saitoh, M., Noda, M., Kuroda, M., Morita, Y., Kozawa, K., Oishi, K., Tashiro, M., Kimura, H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect. Genetics Evol*; 18:168-173, 2013.
- 42) Ainal, A., Tamura, S-I., Suzuki, T., van Riet, E., Ito, R., Odagiri, T., Tashiro, M., Kurata, T., Hasegawa, H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 9(9) :1-8, 2013.
- 43) Kageyama, T., Fujisaki, S., Takashita, E., Xu, H., Yamada, S., Uchida, Y., Neumann, G., Saito, T., Kawaoka, Y., Tashiro, M. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *EuroSurveill*. 18; (15):pii=20453. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20453> (2013)
- 44) Watanabe, T., Kiso, M., Fukuyama, S., Nakajima, N., Imai, M., Yamada, S., Murakami, S., Yamayoshi, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Sakoda, Y., Takashita, E., McBridge, R., Noda, T., Hatta, M., Imai, H., Zhao, D.,

- Kishida, N., Shirakura, M., de Vries, R. P., Shichinohe, S., Okamatsu, M., Kawakami, E., Ishikawa, I., Watanabe, S., Ito, M., Sakai-Tagawa, Y., Sugita, Y., Uraki, R., Yamaji, R., Eisfeld, A., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E. A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J. C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans *Nature*. 501: 551-555, 2013. doi:10.1038/nature12392 (2013)
- 45) Kishida, N., Imai, M., Xu, H., Taya, K., Fujisaki, S., Takashita, E., Tashiro, M., Odagiri, T. Seroprevalence of a novel influenza A(H3N2) variant virus in the Japanese population *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 549-511, 2013.
- 46) Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System: Dwyer, D., Barr, I., Hurt, A., Kelso, A., Reading, P., Sullivan, S., Buchy, P., Yu, H., Zheng, J., Shu, Y., Wang, D., Lam, W., Aguon, A., Oliva, R. Q., Odagiri, T., Tashiro, M., Verasahib, K., Yusof, M. A., Nymadawa, P., Alexander, B., Gourinat, A.-C., J Grangeon, J.-P., Jennings, L., Huang, S., Horwood, P., Lucero, M., Roque, V. Jr., Suy, L. L., Cardon, P., Tandoc, A. III., Olveda, R. M., Chun, K., Park, Y.-J., Cutter, J., Lin, R., Low, C., Mai, L. T. Q., Balish, A., Kile, J., Mei, S., McFarland, J., Moen, A., Olsen, S., Samaan, G., Xi, X., Chea, N., Diorditsa, S., Feldon, K., Fox, K., Jamsran, M., Konings, F., Lewis, H. C., McPherson, M., Nilles, E., Olowokure, B., Partridge, J. Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region Western Pacific Surveillance and Response (WPSAR) *Journal* (2013). 4: 2013. doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009 (2013).
- 47) Miyazaki, M., Nishihara, H., Hasegawa, H., Tashiro, M., Wang, L., Kimura, T., Tanino, M., Tsuda, M., Tanaka, S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* DOI:10.1016/j.bbrc.2013.11.011 (2013)
- 48) Barr, I. G., Besselaar, T. G., Cox, N. J., Daniels, R. S., Donis, R., Engelhardt, O. G., Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A., McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C., Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D., Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X., Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013-4) WHO recommendations for the viruses to be used in the 2013-14 Northern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. *Vaccine* (2014, in press)
- 49) Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T. Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):549-51.
- 50) Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(4):276-83.
- 51) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013 Nov;7(6):1390-9.
- 52) Hamamoto I, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. *PLoS One.* 2013;8(3):e59892.
- 53) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother.* 2013 Oct;19(5):891-5.
- 54) Ato M, Takahashi Y, Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine.* 2013 Apr 19;31(17):2184-90.
- 55) Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine

- viruses. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(1):65-8.
- 56) Kawai Y, Miyashita N, Kubo M, Akaike H, Kato A, Nishizawa Y, Saito A, Kondo E, Teranishi H, Wakabayashi T, Ogita S, Tanaka T, Kawasaki K, Nakano T, Terada K, Ouchi K. Nationwide surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):4046-9.
- 57) Inamura N, Miyashita N, Hasegawa S, Kato A, Fukuda Y, Saitoh A, Kondo E, Teranishi H, Wakabayashi T, Akaike H, Tanaka T, Ogita S, Nakano T, Terada K, Ouchi K. Management of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: Utility of measuring serum lactate dehydrogenase level. *J Infect Chemother.* 2014 Jan 30. pii: S1341-321X(14)00073-7.
- 58) Kawai Y, Miyashita N, Kubo M, Akaike H, Kato A, Nishizawa Y, Saito A, Kondo E, Teranishi H, Ogita S, Tanaka T, Kawasaki K, Nakano T, Terada K, Ouchi K. Therapeutic efficacy of macrolides, minocycline, and tosufloxacin against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2252-8.
- 59) Oikawa J, Tanaka J, Yoshikawa T, Morita Y, Hishiki H, Ishiwada N, Ohye T, Kurahashi H, Kohno Y. An immunocompetent child with chromosomally integrated human herpesvirus 6B accidentally identified during the care of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Infect Chemother.* 2013 Dec 11.
- 60) Tanaka J, Kurosaki T, Shimada A, Kameyama Y, Mitsuda T, Ishiwada N, Kohno Y. Complications of adenotonsillectomy: a case report of meningitis due to dual infection with nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, and a prospective study of the rate of postoperative bacteremia. *Jpn J Antibiot.* 2013 Aug;66(4):205-10.
- 61) Tamura K, Matsubara K, Ishiwada N, Nishi J, Ohnishi H, Suga S, Ihara T, Chang B, Akeda Y, Oishi K; the Japanese IPD Study Group. Hyporesponsiveness to the infecting serotype after vaccination of children with seven-valent pneumococcal conjugate vaccine following invasive pneumococcal disease *Vaccine* 2014 Jan 28
- 62) Inaida S, Shobugawa Y, Matsuno S, Saito R, Suzuki H. The South to north variation of norovirus epidemics from 2006-07 to 2008-09 in Japan. *PLoS One.* 2013 Aug 19;8(8):e71696.
- 63) Dapat C, Kondo H, Dapat IC, Baranovich T, Suzuki Y, Shobugawa Y, Saito K, Saito R, Suzuki H. Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of pandemic and seasonal influenza viruses during the 2009-2010 and 2010-2011 influenza seasons in Japan. *Antiviral Res.* 2013 Sep;99(3):261-9.
- 64) Hara K, Nakazono Y, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. Co- incorporation of the PB2 and PA polymerase subunits from human H3N2 influenza virus is a critical determinant of the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. *J. Gen. Virol.* 94: 2406-2416, 2013.
- 65) Yano H, Yamazaki Y, Qin L, Okitsu N, Yahara K, Irimada M, Hirakata Y, Kaku M, Kobayashi T, and Watanabe H. Improvement rate of acute otitis media caused by *Haemophilus influenzae* at one week is significantly associated with the time to recovery. *J Clin Microbiol.* 51: 3542-3546, 2013.
- 66) Zhou ZY, Hu BJ, Qin L, Lin YE, Watanabe H, Zhou Q, and Gao XD. Removal of waterborne pathogens from liver transplant unit water taps in prevention of healthcare-associated infections: a proposal for a cost-effective, proactive infection control strategy. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jun 20.
- 67) Qin L, Kida Y, Ishiwada N, Ohkusu K, Kaji C, Sakai Y, Watanabe K, Furumoto A, Ichinose A, and Watanabe H. The relationship between biofilm formations and capsule in *Haemophilus influenzae*. *J Infect Chemother.* 2013 [in press] .
- 68) Hamada N, Hara K, Matsuo Y, Imamura Y, Kashiwagi T, Nakazono Y, Gotoh K, Ohtsu Y, Ohtaki E, Motohiro T and Watanabe H . Performance of a rapid human metaneumovirus antigen test during an outbreak in a long-term care facility. *Epidemiol Infect.* 142: 424-427, 2014.
- 69) Uemura Y, Qin L, Gotoh K, Ohta K, Nakamura K, and Watanabe H. Comparison study of single and concurrent administrations of carbapenem, new quinolone, and macrolide against in vitro nontypeable *Haemophilus influenzae* mature biofilms. *J Infect Chemother.* 19: 902-908, 2013.
- 70) Hidaka H, Miura M, Masunaga K, Qin L, Uemura Y, Sakai Y, Hashimoto K, Kawano S, Yamashita N, Sakamoto T, and Watanabe H. Infection control for a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service center, as monitored by molecular analysis. *J Infect*

Chemother, 19: 884-890, 2013.

- 71) Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, and Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66: 51-55, 2013.
- 72) Qin L, Kida Y, Imamura Y, Kuwano K and Watanabe H. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother*, 19: 261-271, 2013.

2. 学会発表

省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし