

201028043A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

| | |
|---|----------|
| I. 総括研究報告 | |
| 重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究 木村博一 | ----- 1 |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究 野田雅博 | -----17 |
| 2. 重症呼吸器感染症サーベイランスに係わる実態調査に関する研究 小澤邦壽 | -----63 |
| 3. 呼吸器系ウイルスの遺伝子検出法に関する検討に関する研究 調 恒明 | -----67 |
| 4. 呼吸器ウイルス遺伝子の網羅解析に関する研究 黒田 誠 | -----70 |
| 5. 細胞障害を起こさないウイルスについての新しい分離法の開発に関する研究 水谷哲也 | -----77 |
| 6. パラインフルエンザウイルス 3 型感染ヒト肺線維芽細胞によって産生が誘導される サイトカインとシグナル伝達経路との相互関係に関する研究 木村博一 | -----86 |
| 7. 呼吸器感染ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究 竹田 誠 | -----92 |
| 8. 呼吸器感染ヒトコロナウイルス全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究 松山州徳 | --101 |
| 9. 新規ワクチン開発と感染細胞モデル系の構築に関する研究 梁 明秀 | -----103 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | -----107 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | |

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究
平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者

木村博一 国立感染症研究所感染症情報センター

研究分担者

小澤邦壽 群馬県衛生環境研究所

調 恒明 山口県環境保健センター

竹田 誠 国立感染症研究所ウイルス第三部

野田雅博 国立感染症研究所ウイルス第三部

松山州徳 国立感染症研究所ウイルス第三部

水谷哲也 国立感染症研究所ウイルス第一部

黒田 誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

梁 明秀 横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学

研究協力者

筒井理華 吉田綾子 青森県環境保健センター

水田克巳 山形県衛生研究所

荒川美果 栃木県保健環境センター

塚越博之 吉住正和 群馬県衛生環境研究所

昆美也子 新潟県保健環境科学研究所

平野映子 福井県衛生環境研究センター

小淵正次 富山県衛生研究所

平良勝也 仁平稔 沖縄県衛生環境研究所

岡本玲子 山口県環境保健センター

小村珠喜 島根県保健環境科学研究所

清田直子 熊本県保健環境科学研究所

大内好美 吉田時子 滋賀県衛生科学センター

横井 一 田中俊光 千葉市環境保健研究所

吉岡政純 京都市衛生環境研究所

山下暁朗 横浜市立大学大学院医学研究科分子生体防御学

岡山吉道 日本大学大学院医学研究科先端医学系分子細胞免疫アレルギー学分野

斎藤義弘 東京慈恵会医科大学小児科

森田幸雄 東京家政大学家政学部

藤塚麻子 横浜市立大学附属市民総合医療センター小児科

菅井和子 国立病院機構横浜医療センター小児科

研究要旨

ほとんどの呼吸器ウイルスは、気管支炎や肺炎などの重症感染症を引き起こすが、本邦においては、重症呼吸器ウイルス感染症の実態及び病態はよくわかっていない。また、これらのウイルスに対するワクチン開発もほとんどなされていない。そこで、本研究は、重症呼吸器ウイルス感染症における包括的なウイルスサーベイランス、重症化の病態解明及びワクチン開発を目的とした以下の研究を行い、以下の結果が得られた。

1. svARI 症例由来検体のウイルス検索を試みた結果、Respiratory Syncytial ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、ヒトライノウイルス (HRV)、ヒトボカウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス等が本疾患へ関与していることが明らかになった。また分子疫学解析結果から、我が国で流行している各々のウイルスは固有の遺伝学的多様性を有することが示唆された。2)ウイルス感染による喘鳴は、RSV と HRV の関与が主体であることがわかった。3)施設内の感染症流行の svARI の原因究明を試みた結果、これらの事例は主に HMPV および HRV が原因であることが示唆された。4)ウイルス網羅遺伝子検出 (RDV) 法や次世代シーケンサーによるウイルス遺伝子解析は、不明疾患に極めて有効な実験室内診断検査法であることが示唆された。
2. 全国の地方衛生研究所(地研)において、感染症発生動向調査を基にした重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査を行った。その結果、地研が数多くの気管支炎や肺炎患者の検査診断を行っていることがわかった。また、重症化には多彩なウイルスが関与することがわかった。さらに、効率的な呼吸器ウイルス RNA 抽出キットの選択に関する調査や呼吸器ウイルス遺伝子検査法(RT-PCR 法)の改良に関する研究も行った結果、各々のウイルスの RT-PCR 法にさらなる改良が必要であることが示唆された。
3. ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型(HPIV3)感染によるヒト肺線維芽細胞(HEL)のサイトカインプロファイル(27 種類)を行い、サイトカイン産生に関与するシグナル伝達経路に関する研究を行った。その結果、HPIV-3 感染細胞により産生されたサイトカインが喘息の増悪やサイトカインストームに関与する可能性が示唆された。また、これらのサイトカインの産生には、IkB キナーゼと p38MAPK のリン酸化が重要であることもわかった。
4. 重症入院下気道感染児のウイルス検索を実施した結果、患者から高率に RSV、RV および HMPV 等が分離・検出された。
5. 肺に特異的に存在する膜貫通型セリンプロテアーゼ(TMPRSS2)がコロナウイルス(CV)の S 蛋白を活性化し、細胞侵入を促進させることを発見した。また、TMPRSS2 発現細胞では、2つの経路より CV が感染することもわかった。この結果から、TMPRSS2 とカテプシンの阻害剤の同時投与により、CV 感染を阻止できる可能性が示唆された。さらに、HPIV-1 には、その増殖にトリプシン要求型の株と、非要求型の株が存在することを明らかにした。F タンパクのアミノ酸の違いを解析したが、差異は見られなかった。
6. コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、抗原となる PIV-3-HN 全長タンパク質合成系の確立を行っ

た。また、ヒトテロメラーゼ hTERT を定常的に発現するヒト肺繊維芽細胞(MRC5)に、ヒトパピローマウイルス E7 またはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16 に対する特異的 shRNA を安定的に発現するクローンを樹立した。これらの不死化細胞により、今後、種々の呼吸器ウイルス分離が可能になることが示唆された。

A. 研究目的

本邦において、重症呼吸器感染症(肺炎)による年間死者数は推定で 10 万人を超えており、少なからず呼吸器ウイルスの関与が推定されるが、その実態は不明である。特に、乳幼児においては、RSV やヒトメタニューモウイルス(HMPV)感染による呼吸器感染症は重症化しやすい傾向がある。また、喘息は、本邦において増加の一途をたどっており、死者数も 1 年あたり推定で 4000 名を超えているが、これらのウイルスは喘息の発症と増悪にも密接に関与することが知られている。さらに、多くの呼吸器ウイルスの効果的なワクチンは未だに開発されていないか、あるいは過去に開発を断念している。このような背景から、呼吸器ウイルス感染症の包括的なウイルスサーベイランス、患者疫学の実態解明、重症化の病態解明および効果的なワクチン開発も視野に入れた研究は重要でかつ必要性が極めて高いと思われる。本研究においては、国内の重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス、病態解明および制御の拠点である全国地方衛生研究所、大学医学部微生物学教室および国立感染症研究所が連携し、以下の内容の研究を行った。

B. 研究方法

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

1) 各地域レベルで感染症発生動向調査等により収集された急性呼吸器感染症 (ARI) 患者検体から呼吸器ウイルス分離・検出と解析を実施し、ウイルス学的・疫学的に svARI の因

果関係を明らかにした。また、代表株の系統保存・遺伝子情報の集積も行った。

- 2) 既知ウイルス感染が否定された場合あるいは起因ウイルス確定不能の場合には、ウイルス網羅的検出 (RDV) 法等の技法を用いて、原因ウイルスを究明した。
- 3) それぞれのウイルスの血清疫学的な調査を行った。
- 4) svARI 患者における気管支喘息発症リスク因子とウイルス学的要因の解析および検討を行った。
- 5) 医療施設内における ARI の感染実態を調査し、院内感染制御に関する方策を検証した。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究

- 1) 地方衛生研究所全国協議会のネットワークを活用し、全国 77 カ所の地方衛生研究所等を対象とした svARI に関するアンケート調査を実施した。本調査では、重症呼吸器感染症を、気管支炎、細気管支炎、クループ様疾患、気管支喘息、肺炎、喉頭炎、気管支肺炎、38℃以上の発熱 + 下気道炎と定義し、感染症発生動向調査の結果を基に、臨床症状 (発熱や下気道炎など)、検出方法 (ウイルス分離や PCR など)、検出結果 (RSV、InfV、不検出など)、さらに集団発生などの情報について調査を行った。なお、倫理面への配慮として、本研究においては、感染症発生動向調査事業に基づく検体情報を扱っており、個人情報保護に十分配慮して行った。
- 2) 2010 年に呼吸器症状を呈して、医療機関を受診した患者から採材された検体 (咽頭拭い液または鼻汁) から RNA を抽出後、HRV、EV

は EVP4/EVP2 領域、RSV は N 遺伝子、PIV は HN, P 遺伝子、hMPV は F 遺伝子、hBoV は NP1 領域について、PCR 法を行い、増幅された遺伝子については塩基配列の解析を行った。また、用いている primer 配列とデータベース上に登録されている塩基配列の比較なども行い、PCR による検査診断法の至適化に関する研究も行った。

- 3) 重症呼吸器ウイルス感染症患者から供試された検体（各種臓器・組織検体）から核酸配列を次世代シーケンサーの解析能力を駆使して網羅的に解読し、検体中に内在する微生物を全て抽出して微生物カタログを作製した。
- 4) 未知のウイルスを含んだ検体を培養細胞への添加によるウイルス感染の有無を判定可能なシステムを構築し、RT-PCR 法およびウエスタンブロット法によるウイルス感染マーカー遺伝子の検索を行った。
- 5) 主症状が呼吸器症状および筋痛症の不明疾患由来検体（咽頭・便検体）を用い、網羅的病原体検索を試みた。抽出 DNA から Genomic DNA sample prep kit (Illumina) を用いて Illumina DNA ライブラリーを作製し、そのライブラリーを解読した。病原体配列のアライメントは、ClustalW による neighbor-joining (NJ) 法で 1000 回のブートストラップを行った。系統樹は FigTree ver. 1.2.3 により作成した。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

- 1) HPIV3 感染肺線維芽細胞によって惹起されるサイトカインならびにサイトカイン産生に関与するシグナル伝達機構をマルチアレイビーズ法によりそれらの網羅解析を行った。

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

- 1) ヒトパラインフルエンザウイルス（1 型、2 型および 3 型）の膜融合タンパク質（F タン

パク質）を活性化するプロテアーゼを明らかにするとともに、GFP を組み込んだパラインフルエンザウイルス（1 型、2 型および 3 型）の増殖機構を明らかにした。ウイルスの増殖は、ブランク法、GFP から発する蛍光解析によって解析した。また、ウイルス蛋白のアミノ酸レベルでの解析は、それぞれのウイルス蛋白をコードする遺伝子解析によって行った。

5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

- 1) VSV シールドタイプウイルスの表面に、それぞれのコロナウイルス（SARS、NL63、229E および 229E の臨床分離株）の S 蛋白をもたせたものを作成し、細胞侵入実験に用いた。また、TMPRSS2 発現細胞と非発現細胞に感染させ、TMPRSS2 感受性の比較をおこなった。さらに、市販のプロテアーゼ阻害剤で処理した細胞へのウイルスの感染を調べ、TMPRSS2 の活性阻害剤の検索を行った。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

- 1) コムギ無細胞系発現ベクター pEU-E01-GST-PIV3HN を構築し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用い、抗原となる PIV-3-HN タンパク質全長タンパク質の合成を行った。タンパク精製はグルタチオンビーズによるカラム法を用いた。GST-PIV3HN 間の切断は TEV プロテアーゼを用いて行った。また、DNA ワクチンへの応用を考慮し、動物細胞コドンの最適化した PIV-3-HN の全長 cDNA を合成した。
- 2) 正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクターとして pLenti6_TERT, pLenti6_HP V16-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作成した。作成したベクターを用い、MRC-5/TERT 細胞に不死化誘導因子を導入した。
- 3) アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化因

子導入後、Embryoboid body 形成法を用いて細胞分化を行った。ウイルス感受性試験ではRSVおよびPIV3をMOI=1で標的細胞に感染させ、48時間後に細胞障害性および合胞体の形成を観察した。また感染細胞からRNAを抽出し、RT-PCRを用いてウイルス遺伝子の発現レベルを測定した。

C. 研究結果

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

- 1) 山形県、青森県、栃木県、千葉県、新潟県、福井県、滋賀県、京都市、島根県、山口県、熊本県および沖縄県域のsvARIウイルスサーベイランスの結果（2010年1月～11月）、Respiratory Syncytial ウイルス（RSV）148株、ヒトメタニューモウイルス（HMPV）205株、ヒトライノウイルス（HRV）224株、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）271株およびヒトボカウイルス（HBoV）28株がそれぞれ分離・検出された。その他、インフルエンザウイルス（InfV）、アデノウイルス（AdV）およびエンテロウイルス（EV）等が分離・検出された。
- 2) 2002-2009年の間に山形県において分離された計401株のHPIV3型（HPIV3）の疫学解析を行った。その結果、HPIV3は毎年必ず5-7月頃に流行し、この季節のsvARIでは、病因としてHPIV3を考慮すべきであることが明らかになった。
- 3) 上記分離株のうち279株について、分子疫学的解析を実施した。HN領域遺伝子の塩基配列（1,352bps）を決定した。現在、詳細遺伝学的解析を実施中である。
- 4) 沖縄県のインフルエンザ確定患者を除くARI患者181検体の咽頭拭い液について、ウイルス検索を行った。その結果、AdV22株、RSV20株、HPIV13株、HMPV9株、EV9株、

HBoV8株およびHRV5株がそれぞれ検出された。

- 5) 栃木県、千葉市、福井県、滋賀県および沖縄県から集積されたHBoV検出症例28例について、疫学的解析を実施した。その結果、71.4%(20/28)は下気道炎を呈しており、53.6%(15/28)は他のウイルスと重複感染していた。栃木県5株、沖縄県4株、千葉市3株のHBoV全長ゲノム(5,299bp)を解析し、国内外の既報告株と分子系統解析を実施した結果、日本国内のHBoVは3つのグループに分類された。
- 6) 2009年1月～2010年12月の間に、千葉市内1小児科クリニックで採取された鼻汁145検体について、下気道炎またはRSV感染児からsvARIウイルス分離・検出を実施した。その結果、(RT-)PCRによる各ウイルスの検出株数（検出率）は、RSV72株（49.7%）、HRV36株（24.8%）、HMPV8株（5.5%）、HBoVが8株（5.5%）であった。また、24株のRSV分離株の分子系統解析を行った結果、Subgroup A: 13株（genotype GA2:12株およびGA5:1株）、Subgroup B: 1株（genotype: BA）にそれぞれ分類される株であった。また、Subgroup Bに分類された1株では、Subgroup A（genotype GA2）のクローンも検出された。
- 7) 2009年1月～2010年11月の間に、福井県内の医療機関を受診したARIs等患者から採取された咽頭拭い液等を用いて、HBoV遺伝子検索を試みた。その結果、供試した120検体のうち咽頭拭い液5検体からHBoV遺伝子が検出され、ARIsへの関与が示唆された。下痢便からは検出されなかった。現在、詳細な遺伝子解析を実施中である。
- 8) 新潟県ではウイルス分離を主にしてARIsウイルスサーベイランスを実施し、新型インフルエンザ（AH1pdm）流行中および前後のウイルス分離動向を検討した。その結果、A/H1pdmの流行終息期のHPIV、RSVおよび

HMPV 分離株数は、流行前後に比し、増加傾向を示した。

- 9) 山口県内の ARI ウイルスサーベイランス (2010 年) を実施した結果、HRV(species A) 40 株、HRV(species B) 4 株、HRV (species C) 31 株、EV68 15 株、RSV (Subgroup A) 11 株、RSV (Subgroup B) 14 株、HPIV1 が 4 株、HPIV2 が 6 株、HPIV3 が 13 株、HPIV4 が 7 株、HMPV (genotype A2) 7 株、HMPV (genotype B2) 2 株、HBoV4 株がそれぞれ検出された。重複感染は 20 例 (9.6%) あった。
- 10) EV68 検出株について VP4/VP2 領域(390nt) の遺伝子解析を行った結果、検出株間の遺伝子相同性は 90~100%であった。現在、継続解析中である。
- 11) 起因ウイルス確定不能の svARI 症例について、ウイルス網羅的検出 (RDV) 法等の技法を応用した起因ウイルスの特定を試みた。その結果、Saffold cardiovirus あるいは Parechovirus 等の感染が診定された。
- 12) 横浜医療センター小児科の入院児より鼻腔分泌物を採取し、RT-PCR 法にてウイルス検索を行った。その結果、RSV 55 例、HRV48 例、HMPV 3 例、HPIV1 例、RSV と HRV の混合感染が 20 例確認された。そこでいずれかのウイルスが検出された計 129 例 (年齢 1.3 ± 1.9 歳) を対象に、ウイルス検出と臨床像との比較検討を行った。その結果、RSV 単独感染例と HRV 単独感染例を比較すると年齢は有意に RSV 例で低い ($p < 0.05$)、SpO2 最低値は RSV 例が有意 ($p < 0.05$) に低く、酸素投与有無は RSV 例が有意に多い ($p < 0.05$)。HRV 単独感染例と RSV と HRV 混合感染例で比較した場合、混合感染例で呼吸状態は有意に悪く、RSV 感染により入院となる児は低年齢で初回喘鳴の児が多い。これらの知見から、気道過敏性を有する児において HRV 感染は重要な喘鳴悪化要因となりさらに RSV との混

合感染により重症化することが示唆された。

- 13) 2010 年に横浜医療センター小児科を受診した下気道疾患患者 115 例について、RSV、HRV、HMPV、HPIV、HBoV、AdV および InfV の検索を実施した。その結果、RSV 35 株、HRV 39 株、EV 7 株、HPIV 5 株、HBoV 4 株、AdV 2 株および InfV 1 株が検出された。
- 14) 島根県における HMPV の浸潤状況を把握するため、2009 年に 2 高齢者福祉施設で発生した集団呼吸器疾患から検出された 10 株と 2009-2010 年に実施したウイルスサーベイランスにおいて検出された 15 株について分子疫学解析を試みた。その結果、本県における両年の流行 HMPV 株は genotype B2 が主流で次いで A2 であり、B1 は散発的に検出されたのみであった。
- 15) 全国 49 重症心身障害児 (者) 施設を対象とした感染症発生に関する調査では、1 病棟あたり 0.5 回/年の流行があり、愛媛病院を含む中四国 10 施設では 1 病棟あたり 0.5~1 回/年の流行がみられた。流行した病原体は、InfV とノロウイルスが多かったが、半数以上は病原体不明の ARI であった。愛媛病院の 2009 年 11 月の ARI 流行例のウイルス検索では HRV が、また 2010 年 4 月の ARI 流行例では HMPV が確認された。ストレプトコッカス、HRV、HMPV、マイコプラズマ感染者の臨床経過・症状にはそれぞれ特徴がみられ、HRV は流行性が強かったが症状は軽く数日で回復、HMPV は流行性中等度であったが症状は強く 1 週間ほど持続した。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究

- 1) 77 の地方衛生研究所等のうち、svARI の検査診断を行わない 10 施設を含む 69 施設から回答が得られた (回答率 89.6%)。アンケート調査の結果、得られた 2007 年度における総検体数は、2,481 検体であった。一つの地方衛

生研究所で検査された svARI 由来の検体は、平均で 36 検体であったが、検体数には施設間で大きなばらつきがあった(0 から 222 検体)。また、冬期や春期において検体数が、多くなる傾向が見られた。一方、2007 年度において、最も多く検出されたウイルスは、InfV であり、全体の 10.0% であった。次いで、RSV も多く検出されており、HMPV などが原因となることも明らかとなった。一方で、全体の 60% 以上の検体では、ウイルスが検出されておらず、原因が不明となっている検体が数多く存在することも明らかとなった。また、秋期から冬期にかけての検体数の増加は、InfV や RSV の流行によることが推測された。

- 2) Human metapneumovirus の F 遺伝子の配列と primer 配列の比較では、1st primer set の配列の 2 カ所程度に変異のある配列があり、効率の低下が起こりうると考えられた。RS virus の N 遺伝子では、forward, reverse primer とともに 4, 5 カ所の塩基置換が存在したため検出不能となる変異ウイルスが多く存在すると考えられた。表面抗原遺伝子のデータベース上の配列を alignment すると比較的保存された配列を見いだすことが出来たため (data not shown)、表面抗原遺伝子を標的とした primer の設計は可能であると考えられた。
- 3) 呼吸器感染症が疑われ、病原体が検出できなかった症例について、網羅塩基配列解読による病原体検出を行った。結果として、Human parechovirus (HPeV) に類似したゲノムを見出すことができた。さらに、HPeV 全長配列の確定を行った。確定した全長配列の polyprotein 領域 (ATG—stop codon: 6534 nt) の系統樹解析により、HPeV-3 に非常に近い HPeV であることが分かった。
- 4) フラビウイルス科に属する Yokose virus を Vero 細胞に感染させ、ISGs の感染細胞と非感染細胞における発現の差を検討した。まず、

感染後 24 時間で Viperin、Mx1、Mx2、OAS-1、OAS-2、OAS-L、IFN- β 、ISG5、Herc5 および CXCL10 の検出を試みたところ、viperin と OAS-L では非感染細胞において検出できなかったのに対して、感染細胞では容易に増幅されていた。しかし、その他の ISGs では非感染細胞と感染細胞の有意な差は認められなかった。以上の結果から、Yokose virus が Vero E6 細胞に感染したときには、ISGs の中でも Viperin と OAS-L は感染マーカーの候補となり得ると考えられた。次に、Vero E6 細胞に様々なウイルスを感染したときに Viperin と OAS-L の発現が誘導されるか否かについて検討した。まず、canine parainfluenzavirus、Mammalian orthoreovirus 1、Equine herpesvirus 1 について検討したところ、canine parainfluenzavirus、Mammalian orthoreovirus 1 感染細胞では、Viperin と OAS-L の発現が誘導されていたのに対して、Equine herpesvirus 1 感染細胞では誘導されなかった。さらに、ヒト検体から分離された Human adenovirus 1 と Human coxsackievirus A16 を各種細胞 (Vero E6、Caco-2、MRC5、Hep-2、A549、RD-18S) に再感染させ、細胞から RNA を抽出し、ISGs について PCR を行ったが、これらのウイルスと細胞の組合せでは、Viperin や OAS-L は感染細胞と非感染細胞の間で差は認められなかった。しかし、Human adenovirus 1 を MRC5 細胞に感染させた場合には、OAS-1 と Mx1、Mx2、CXCL10 の発現誘導が認められ、A549 細胞では Herc5 が発現した。また、Human coxsackievirus A16 を MRC5 細胞に感染させたときには CXCL10 が発現していた。このように、Viperin とは別の ISGs を感染マーカーとして用いることが可能なことが示唆された。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

- 1) 感染 24 時間後では、炎症性サイトカインの

IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、抗炎症性サイトカインの IL-1ra、Th1 サイトカインの IFN- γ および IL-2、Th2 サイトカインの IL-4、IL-5 および IL-10、造血因子の G-CSF および GM-CSF、好中球遊走サイトカインの IL-8 および IP-10、好酸球遊走サイトカインの eotaxin、および RANTES 等、多くのサイトカインが有意に産生された。

- 2) PIV 感染により、I κ B、および p38 MAPK のリン酸化が有意に増強したが、Akt のリン酸化は増強しなかった。さらに、I κ B、および p38MAPK のシグナル伝達経路とサイトカイン産生との関係について、それぞれのシグナルリン酸化の特異的阻害剤(BMS-345541 および SB203580)を用いて調べたところ、HPIV によって誘導された多くのサイトカインの産生が有意に阻害された。

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

- 1) パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2130 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 08-1869 株、ならびにパラインフルエンザウイルス 3 型 09-1547 株は、Vero 細胞でトリプシン非依存的に多段階増殖し、Vero 細胞に多核巨細胞形成を伴う強い細胞変性 (CPE) を引き起こした。一方、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 09-2331 株、パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株ならびに SeV-GFP は、Vero 細胞で (トリプシンの添加なしでは) 多段階増殖せず、Vero 細胞に明らかな CPE を引き起こさなかった。Vero 細胞の場合とは異なり、Vero/TMPRSS2 細胞を用いた場合には、全てのウイルス株が、多段階増殖し、Vero/TMPRSS2 細胞に強い CPE を引き起こした。Vero/TMPRSS2 細胞では、全ての株が多段階増殖し、強い CPE を引き起こしたが、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、

パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株、および SeV-GFP 感染性細胞においては、多核巨細胞形成は、見られなかった。全てのウイルス株が、Vero/TMPRSS2 細胞でプラークを形成したが、パラインフルエンザウイルス 1 型 09-2272 株、パラインフルエンザウイルス 2 型 09-2331 株、パラインフルエンザウイルス 3 型 09-1835 株、ならびに SeV-GFP は、Vero 細胞ではプラークを形成しなかった。

- 2) パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) 間において、F 遺伝子解析の結果、F タンパクの開裂部位におけるアミノ酸配列の違いはみられなかった (ともに塩基性アミノ酸は 1 つしかなく、すなわち Furin 認識モチーフを有していなかった)。パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) の Ka/Ks 値の解析結果から、HN、P および C タンパク質にアミノ酸が特に集積していることが明らかになった。一方、M タンパク質のアミノ酸配列は同一であった。また、N、F あるいは L タンパク質のアミノ酸配列も非常に良く保存されていた。パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) 間において、F タンパク質には、7 個のアミノ酸置換が、HN タンパク質には 24 個のアミノ酸置換が見られた。

- 3) パラインフルエンザウイルス 1 型 2 株 (09-2130 株、09-2272 株) の F タンパク質ならびに HN タンパク質の立体構造モデルを作製できた。株間に見られたアミノ酸置換の場所を立体構造モデル上にマッピングすることができた。

5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

- 1) SARS と NL63 のシュードタイプウイルスの TMPRSS2 発現細胞への感染価は非発現細胞と比較して、3~5 倍高くなっていた。229E

では TMPRSS2 発現細胞で 1.5 倍程度感染価が高くなったが、臨床分離 229E ではさらに 3 倍程度高くなることがわかった。

2) セリンプロテアーゼ阻害剤 (Camostat) と システインプロテアーゼ阻害剤 (E64d) を同時に作用させることにより、TMPRSS2 発現培養細胞へのこれらのコロナウイルス侵入を完全に阻止できることも明らかになった。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

1) 真核生物型無細胞タンパク質合成技術であるコムギ胚芽タンパク質合成システムを用いてリコンビナント PIV-3-HN 全長タンパク質の作成を試みた。無細胞合成用の pEU-E01-GST ベクターに PIV3-HN 全長 cDNA をサブクローニングした。次に、全自動コムギ無細胞系タンパク質合成装置 PROTEMIST-DT-II を用いて GST 融合 PIV-HN タンパク質の大量合成を行った。本法により一度の合成で約 200 μ g の精製タンパク質が作製可能であった。今後は本標品と核酸アジュバント混合剤を BALB/c マウスに投与し、ワクチン抗原としての有効性を検討する。また、DNA ワクチンを用いた Prime-boost 法への応用として PIV-3-HN をマウスコドンに最適化した発現ベクターの構築に成功した。今後、本標品を上記のマウスワクチンモデルにおいて評価を行うとともに、PIV3 感染を阻止する中和抗体の開発を行う。

2) 正常細胞の不死化を誘導するレンチウイルスベクター、pLenti6_TERT, pLenti6_HP16-E7, pLenti6_sh-p16_TetOff_FRT-GFP-BSD を作成した。作成したウイルスベクターを MRC-5/TERT 細胞に感染させ、通常培養法にて長期培養を行った。現段階で少なくとも 100 回以上の分裂が可能な MRC-5/TERT, MRC-5/TERT_sh-p16, MRC-5/TERT_HP16-E7 の 3 つの不死化 MRC-5 細胞の誘導に成功し

た。今後は本細胞群を用いて広範囲な呼吸器ウイルスの感染性や細胞障害性について検討する。

3) 広いウイルス感染トポロジーを有する細胞を樹立する目的で、アカゲザル皮膚線維芽細胞に細胞初期化因子導入し、Rhesus Monkey Stem Cell (rSC) を作成した。ウイルス感染感受性試験により、rSC は RSV と PIV-3 に感染し、多核細胞や合胞体を形成することが確認された。また、感染細胞から RNA を抽出し、RSV G 遺伝子および PIV-3 HN 遺伝子領域の RT-PCR を行ったところ、ウイルス転写産物を確認した。今後は通常培養法への馴化を行うとともに、各種呼吸器ウイルスへの感染感受性や感染粒子形成能等について詳細に検討を行う。

D. 考察

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

1) まず、包括的な svARI ウイルスサーベイランスを実施した。とくに本年は AH1pdm 流行の翌年にあたりウイルスの動向が注目された。2010 年 1 月～11 月集計で、RSV148 株、HMPV205 株、HRV224 株、HPIV271 株および HBoV28 株がそれぞれ分離・検出された。東日本地域（山形県）では svARI ウイルス、とくに HPIV や HRV の動向が AH1pdm 流行後で若干異なった様相を呈することを、西日本地域（沖縄県）では svARI ウイルス動向は東日本地域のそれとは異なった様相を、それぞれ示している。

2) 地域単位で実施された RSV、HMPV、HRV および HPIV 等の疫学、分子疫学解析からいくつもの興味ある知見が得られた。このうち今年度、HPIV-3、HBoV および HRV を重点的に検討した。その結果、HPIV-3 は東日本地域（山形県）では毎年 3 月から 7 月の間に必ず

流行が確認され、分離株の *HN* 領域遺伝子の系統解析の結果、分離株は大きく 3~4 つのクラスターに分類されることを明らかにした。また、*HBoV* は今年度新たに 28 株が検出され、わが国では大きく 3 つのクラスターに分類される株がこれまで流行しており地域特性の可能性も推定された。*HRV* は *VP4/VP2* 遺伝子領域の系統解析の結果、我が国で流行した *HRV-A* は 8~11 クラスターに分類されることが明らかになった。さらに、今年度、全国的な *EV-68* の流行を確認された。

- 3) *svARI* 患者における気管支喘息発症リスク因子とウイルス学的要因について分離・検出ウイルスと臨床所見をもとに解析・検討した。その結果、気道過敏性の亢進がみられ、喘鳴を有する児において *HRV* 感染は重要な喘鳴悪化要因となること、さらに *RSV* との混合感染により重症化することを明らかにし、同症例の治療にあたり感染ウイルスの特定等が重要な指針になることを示した。
- 4) 全国重度心身障害児施設内の感染症流行の実態調査から、いずれの施設においても *ARI* 流行の発生頻度は低くなく、原因検索を試み *InfV* のほかに *HMPV* や *HRV* が主要な原因ウイルスであったことと臨床所見から *HMPV* 感染により重症化することもあることが明らかになった。さらに、高齢者施設内の *HMPV* 流行例から小児のみならず高齢者においても重症化することも示した。今後、前述した *HPIV* と同様に *HMPV* も衛生研究所において実施されるウイルスサーベイランスの検査診断強化対象ウイルスとなろう。
- 5) 現在、衛生研究所で実施されているウイルスサーベイランスに係る検査技法は、テクノロジーの進展、人材交代と技術の継承困難等の要因により *PCR* 検査法を主要な方法として実施している機関が増加している。しかし、効果的ウイルスサーベイランスを中長期的視

点で評価すると、ウイルス分離は *PCR* に比し労力面、迅速性、簡便性等で劣るものの、株（ウイルス粒子本体）が保存されていることから、研究資産としての価値は極めて高く、後方視的研究も容易に実施可能である。一方、ウイルス網羅的検出法はウイルス分離、*PCR* で解明することの困難であった症例において、高い有効性を示し原因ウイルスが解明された。時代の変遷にそって、感染症も変遷し、新興・再興感染症も多く出現している現在、ウイルスサーベイランスを行うにあたり、*Public Health Laboratory* である衛生研究所として、種々の技法を効果的に併用できる機能を有した、より効果的かつ積極的な責務遂行が期待される。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究

- 1) 2007 年度において、全国の地方衛生研究所等において、年間 2,000 件以上の *svARI* 由来の検体が検査されていることがわかった。しかし、本邦における *svARI* 患者数は、推定で 100 万人以上存在することを考慮すると、調査期間中においては、本疾患の十分な病原体サーベイランスが行われていないと考えられた。現行の感染症法においては、臨床検体の提供が義務化されていないため、ボランティアベースによる主治医の協力に頼っている点が多い。したがって、*svARI* のサーベイランスを強化するためには、新たな検体提供および収集システムの構築が必要であることも示唆された。また、本研究においては、*InfV* や *RSV* が多くの *svARI* から検出されているが、検体数と検出ウイルスには各施設間で大きな差がある。また、過半数の検体においては起病病原体が不明となっていることから、検査設備などのさらなる充実も必要であることが推定された。
- 2) 遺伝子検出に使用されている primer 配列と

報告された配列の比較を行ったところ、特に RS virus については、検出用 primer 配列とデータベース上の報告遺伝子配列との乖離が大きく、このために不検出となるウイルスが存在する可能性が考えられた。

- 3) 呼吸器感染症と筋痛症が疑われ、病原体が検出できなかった症例について、患者由来検体の網羅塩基配列解読による病原体検出を行った結果、HPeV-3 が検出された。このウイルスと病態との関連に、一部不明な点があるが、HPeV-3 は HPeV-1 に比し、中枢神経症状を伴う割合が高いという報告があることから、本症例においては HPeV-3 の関与が示唆された。HPeV は培養が比較的困難なため、RT-PCR 法を中心とした方法により主に検査診断が行われている。しかしながら、報告される数多くの病原体をあまねく検査同定するためには、本症例のように患者由来検体の網羅解析法を用いることも一つの手段として推奨される。
- 4) ウイルス感染の有無を判定できるようなマーカー遺伝子の探索を行った。その結果、Viperin が一つの感染マーカーの候補となり得ることが示唆された。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

- 1) 本研究により、HPIV3 感染によって、ヒト線維芽細胞が I κ B、および p38 MAPK のシグナル経路を介して多くのサイトカインを産生・放出することが明らかになった。これらの多量のサイトカイン産生とサイトカインバランスの不均衡が、部分的にはあるが喘息の病態生理や気道リモデリングに関与していることが示唆された。
- 2) HPIV3 は、肺の気道上皮細胞のみならず線維芽細胞にも感染し、種々のサイトカイン産生を亢進することも明らかになった。このことは、HPIV3 感染によって生ずる重症化、特にサイトカインストームへの関与も示唆する。

さらに、これらのシグナル伝達経路として I κ B および p38 MAPK のリン酸化が特異的に関与していることも推察された。HPIV3 感染による肺線維芽細胞の炎症性サイトカインを中心としたサイトカインの異常産生による生体反応機構は、単に呼吸器感染症として、急性の気道炎症を惹起するだけでなく、喘息の発症や増悪および気道リモデリング等の重要な機構になっていると考えられた。

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

- 1) インフルエンザウイルス (季節性、スペイン風邪)、ヒトメタニューモウイルス、SARS コロナウイルスのみならず、ヒトパラインフルエンザウイルス 1~3 型ならびにマウスパラインフルエンザウイルス 1 型 (センダイウイルス) もまた、TMPRSS2 を用いて多段階増殖できることがわかった。
- 2) TMPRSS2 やトリプシン無しでも、多段階増殖できるヒトパラインフルエンザウイルス 1 型が存在することが明らかになった。F タンパク質の開裂部位を見る限り、Furin でも開裂しないと予想できる。呼吸器感染症パラミクソウイルス活性化の新しいメカニズムの解明につながる可能性が示唆された。今後、F タンパク質や HN タンパク質の構造モデル解析の結果、また、タンパク質の発現実験、組換えウイルスを利用した実験などを通じて、その機構を明らかにしたい。

5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

- 1) TMPRSS2 発現細胞は、我々が人工的に作成したものであり、実際の肺での現象を反映しているのかどうかは不明である。したがって、今後、実際の肺に性質が近いと考えられる、ヒト肺胞上皮初代培養を用いて同様の実験を行い、肺由来細胞ではどのプロテアーゼが感染に利用され、どのようなプロテアーゼ阻害

剤の組み合わせにより、感染を阻止できるのかを明らかにしたい。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

- 1) 呼吸器ウイルス抗原タンパク質の合成にコムギ無細胞タンパク質合成系を活用した。その結果、リコンビナントウイルス外被タンパク質 (PIV-3-HN) のベクター構築および機能的タンパク質の大量精製に成功した。本法のような、無細胞タンパク質合成法は、生体の遺伝情報発現系を人工容器内に取り揃え、DNA からタンパク質を鋳型合成する試験管内合成法であるため、これらの問題が全て解決できる。その中でも、コムギ無細胞系は、真核生物のマルチドメインタンパク質の合成に優れた性能を発揮し、特にウイルスタンパク質のエピトープ領域の合成に優れていると考えられた。
- 2) 種々の呼吸器ウイルスに高感受性である MRC-5 細胞の不死化および新規アカゲザル細胞株の樹立に成功した。今後はこれらの細胞株のウイルス感受性のプロファイルを確認するとともに、ウイルス複製や病原性発現に至る分子基盤について解析を行う予定である。

E. 結論

1. 包括的な重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランスに関する研究

- 1) RSV、HPIV、HRV、HMPV、HBoV および EV-68 等のさまざまなウイルスの svARI への関与を確定した。また、RSV、HPIV、HRV、HMPV、HBoV および EV-68 について詳細な分子疫学解析、流行株の生物学的性状検討を行い、それぞれのウイルスの代表株について遺伝情報を *genebank* へ登録した。
- 2) RSV と HRV 感染に起因する病態、とくに感染喘息への関与を臨床ウイルス学および詳細な遺伝学的検討を行った。
- 3) 施設内の感染症流行実態の原因究明を試み、

原因の一部を確定した。

- 4) 地方衛生研究所における ARI ウイルスサーベイランスに関わる実験室体制整備に係る側面的支援を行った。

2. 重症呼吸器ウイルス感染症の実態調査および検査診断法に関する研究

- 1) 感染症発生動向調査に基づき svARI の実態を把握する研究を行った結果、最も多く検出されたウイルスは InfV と RSV であった。また、過半数の検体からは起因ウイルスが検出されなかった。今後、有効な svARI のサーベイランスを実施するには、病原体サーベイランスの義務化、各地研の検査設備や検査体制の整備が必要であると思われた。
- 2) RNA ウイルスの場合、遺伝子配列の変異が蓄積するため、定期的な primer の変更が必要である。今後 human metapneumovirus、RS virus について、ウイルス表面抗原の G protein 遺伝子を増幅する検出系を検討し、検出と同時に塩基配列によって、より正確な系統樹解析が可能となる検出系を開発することも必要であろう。
- 3) 本研究課題において、不明病態から病原体と想定されるウイルスを網羅配列解読法により偏見無く検出することができた。HPeV-3 は新規ウイルス種ではないが、従来の遺伝子検査法で多種多様に変異を導入する RNA ウイルス全てを検出するためには、検査数が膨大になり、煩雑にならざるを得ない。次世代シーケンサーによる検出・鑑別法は一部の研究者しか扱えない状況だが、手法の簡便化と機器類・検査費用の低価格が実現すれば幅広く病原体検査に適応できると考えられる。将来の先端的な病原体検査法の開発を視野に入れ、半数以上にのぼる不明感染症例を詳細に解析しながら、広範な感染症対策に貢献するシステムを構築すべきだと考えている。
- 4) 細胞障害を起こさないウイルスにおいて

Viperin や OAS-L の発現を検討することにより、ウイルス感染の有無を判定できる可能性が示唆された。

3. 重症呼吸器ウイルス感染症のサイトカイン解析に関する研究

1) HPIV3 感染によりヒト肺線維芽細胞から、種々のサイトカイン産生が誘導されることが明らかになった。この産生機構には、I κ B キナーゼおよび p38MAPK のリン酸化が重要であることが判明した。

2) 産生された多量のサイトカインが種々の病態、サイトカインストーム、喘息の発症増悪および気道リモデリングに関与することも推察された。

4. ヒトパラミクソウイルス全般の病態解明・制御に関する研究

1) ヒトパラインフルエンザウイルス 1~3 型ならびにマウスパラインフルエンザウイルス 1 型が TMRSS2 を用いて多段階増殖可能であることが示唆された。

2) TMRSS2 やトリプシン無添加でも多段階増殖できるヒトパラインフルエンザウイルス 1 型が存在することが明らかになった。これらの結果は、ヒトパラインフルエンザウイルスによる肺炎発症機構の解明、将来的な抗ウイルス剤開発につながる重要な知見であると考えられる。

5. ヒトコロナウイルス(HCoV)全般の感染機序解明、分離技術の向上・制御に関する研究

1) ヒトコロナウイルスは肺特異的プロテアーゼ TMRSS2 を利用して細胞に侵入することが明らかになった。また、セリンプロテアーゼ阻害剤とシステインプロテアーゼ阻害剤の同時処理により、細胞への感染を完全に阻止できることも明らかになった。

6. 重症呼吸器ウイルス感染症関連ウイルスの防御抗体産生機構および制御に関する研究

1) PIV-3 ワクチン開発に向け、コムギ無細胞系

を用いたリコンビナントウイルス外被タンパク質 (PIV-3-HN) のベクター構築および機能的タンパク質の大量精製に成功した。

2) 種々の呼吸器ウイルス分離や阻害剤スクリーニングのための優れた培養細胞モデル系は構築を目指し、ヒト胎児肺線維芽細胞 MRC-5 の不死化を行いこれに成功した。また、アカゲザル皮膚線維芽細胞から幹細胞を誘導することで呼吸器ウイルス感染感受性を示す培養細胞も樹立した。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M. Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549). *Cell Biol Int.* in press.
- 2) Morikawa S, Akashi H. Development of a method to detect viral RNA sequences from cultured cells by combining size fraction and a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *J Vet Sci Tech.* in press.
- 3) Kojima Y, Ryo A. Pinning down viral proteins: A new prototype for virus-host cell interaction. *Front Microbiol.* in press.
- 4) Hasegawa S, Hirano R, Hashimoto K, Haneda Y, Shirabe K, Ichiyama T. Characteristics of pandemic H1N1 influenza viral infection in atopic individuals - Pandemic H1N1 influenza reveals "occult" asthma - *Pediatric Allergy and Immunology*, in press.

- 5) Kato M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Saitoh M, Kozawa K, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. Different cytokine profile and eosinophil activation are involved in rhinovirus- and RS virus-induced acute exacerbation of childhood wheezing. *Pediatr Allergy Immunol.* in press.
- 6) Omura T, Iizuka S, Tabara K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Kimura H. Detection of Human Metapneumovirus Genomes during an Outbreak of Bronchitis and Pneumonia in a Geriatric Care Home in Shimane, Japan, in Autumn 2009. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):85-87, 2011.
- 7) Nakamura M, Taira K, Tsukagoshi H, Itokazu K, Nidaira M, Okano S, Kudaka J, Noda M, Takeda M, Kimura H. Detection of Various Respiratory Viruses in Patients with Influenza-Like Illness before and after Emergence of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus in Okinawa. *Jpn J Infect Dis.* 64(1):87-89, 2011.
- 8) Yoshizumi Y, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M. Relationships between cytokine profiles and signaling pathways in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts. *Front Microbiol.* 1(Article 124):1-7, 2010.
- 9) Tsukagoshi H, Masuda Y, Mizutani T, Mizuta K, Saitoh M, Morita Y, Nishina A, Kozawa K, Noda M, Ryo A, Kimura H. Sequencing and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus (SAFV) genotype 3 isolates from children with upper respiratory infection in Gunma, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 63(5):378-380, 2010.
- 10) Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Seto J, Mizuta K, Ahiko T, Tsukagoshi H, Nagano M, Noda M, Mizutani T, Kimura H. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis.* 42:950-952, 2010.
- 11) Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan, during summer 2009. *Jpn J Infect Dis.* 63(2):139-140, 2010.
- 12) Mizuta K, Hirata A, Suto A, Aoki Y, Ahiko T, Itagaki T, Tsukagoshi H, Morita Y, Obuchi M, Akiyama M, Okabe N, Noda M, Tashiro M, Kimura H. Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus genogroup A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Res.* 147(2):265-274, 2010.
- 13) Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of SARS coronavirus spike protein by the transmembrane protease, TMPRSS2. *J Virol.* 84(24):12658-12664, 2010.
- 14) Kyuwa S, Takagaki S, Matsuyama S, Taguchi F, Saegusa J, Iwakura Y, Tagawa Y, Yoshikawa Y.

- Characterization of a variant virus from ascitic fluid of subacute granulomatous serositis in interferon-gamma-deficient C57BL/6 mice persistently infected with murine coronavirus strain JHM. *Viral Immunol.* 23(4):437-442, 2010.
- 15) Watanabe S, Maeda K, Suzuki K, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Shimoda H, Kato K, Yoshikawa Y, Morikawa S, Kurane I, Akashi H, Mizutani T. Identification of a novel betaherpesvirus in bats using a rapid determination system for viral RNA sequences (RDV). *Emerg Infect Dis.* 16:986-988. 2010.
- 16) Shimada M, Yoshizaki S, Jounai N, Kondo A, Ichino M, Ryo A, Okuda K. DNA vaccine expressing HIV-1 gp120/immunoglobulin fusion protein enhances cellular immunity. *Vaccine.* 28(31):4920-4927, 2010.
- 17) Pulikkan JA, Dengler V, Peer Zada AA, Kawasaki A, Geletu M, Pasalic Z, Bohlander SK, Ryo A, Tenen DG, Behre G. Elevated PIN1 expression by C/EBPalpha-p30 blocks C/EBPalpha-induced granulocytic differentiation through c-Jun in AML. *Leukemia.* 24(5):914-923, 2010.

H. 知的財産の出願・登録状況

「幹細胞の安定性維持、複製を制御するためのペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1 の利用」特願:2010-238548 出願日:平成 22 年 10 月 25 日出願人:公立大学法人横浜市立大学 発明者:梁明秀、西真由子

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

重症呼吸器ウイルス感染症のサーベイランス・病態解明及び制御に関する研究

平成 22 年度 分担研究報告書

研究代表者 木村 博一

平成 23 (2011) 年 3 月