

アジアで流行している感染症の
我が国への侵入監視に関する研究
(課題番号：H17- 新興 - 一般 - 019)

平成 18 年度総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業)

主任研究者 渡 辺 治 雄

国立感染症研究所 細菌第一部

目 次

1. 平成 18 年度総合研究報告書

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	1
主任研究者 渡辺 治雄	国立感染症研究所

2. 平成 18 年度分担研究報告書

プロジェクト 1：細菌

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	21
-------------------------------	----

分担研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所
協力研究者	泉谷 秀昌	〃
	荒川 英二	〃
	伊豫田 淳	〃

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	30
-------------------------------	----

分担研究者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所
研究協力者	寺嶋 淳	〃
	大西 真	〃
	伊豫田 淳	〃

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	33
-------------------------------	----

分担研究者	伊豫田 淳	国立感染症研究所
協力研究者	陸 彦	〃
	佐藤 人美	〃
	齋藤 剛仁	〃

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	41
-------------------------------	----

分担研究者	三戸部 治郎	国立感染症研究所
-------	--------	----------

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	45
-------------------------------	----

分担研究者	大西 真	国立感染症研究所
-------	------	----------

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	51
-------------------------------	----

分担研究者	森田 昌知	国立感染症研究所
研究協力者	泉谷 秀昌	〃

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	55
分担研究者 大澤 朗 神戸大学	
協力研究者 大倉 正稔 ”	
アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究	
「コレラ菌の多様性、新しい疫学マーカーの研究開発」	69
分担研究者 山崎 伸二 大阪府立大学	
0157 および non-0157 EHEC のゲノム多様性解析とそれに基づく	
新規疫学ツール・マーカーの検索	74
分担研究者 林 哲也 宮崎大学	
協力研究者 小椋 義俊 ”	
大岡 唯祐 ”	
アジアを中心に世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの	
同定法に関する研究	80
分担研究者 西渕 光昭 京都大学	
協力研究者	
Muhammad Kamruzzaman 京都大学大学院 医学研究科	
Phuangthip Bhoopong プリンス・オブ・ソンクラ大学(タイ)理学部	
Varaporn Vuddhakul ”	
Surveillance and construction of PFGE data bases <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar typhi and paratyphi A, <i>Shigella</i> spp. and <i>Yersinia enterocolitica</i> in China	87
Dr. Jian-Guo Xu	
(Chinese Center for Disease Control and Prevention, China)	
Organization of PFGE workshop for training and technology transfer for Asia Pacific countries/ areas in February 2007	94
Dr. Kai-Man Kam	
(Public Health Laboratory Centre, Hong Kong)	
Antimicrobial susceptibility and Pulsed Field Gel Electrophoresis analysis of <i>Shigella</i> strains in Vietnam (1997-2004)	106
Dr. Phung Dac CAM	

(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)

Genotyping of *Salmonella* and *Burkholderia pseudomallei* in Malaysia 116

Dr. Kwai-Lin THONG (University of Malaya, Malaysia)

Prediction of Penner serotype and species of *Campylobacter* based on PFGE profiles

r . . . 131

Dr. Brent Gilpin

(Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand)

PFGE standardization and molecular epidemiological study of *Vibrio vulnificus* 136

Dr. Bok Kwon Lee (Korea National Institute of Health, Korea.)

Study of the relatedness of quinolone resistant nontyphoidal *Salmonella* isolated from 2002 onwards in Metro Manila 152

Dr. Celia C. Carlos (Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)

Salmonellosis in Bangladesh: Using Pulsed-field gel electrophoresis to identify the outbreak causing strain(s) 158

Dr. Kaisar Ali Talukder & Dr. Ishrat Jahan Azmi G. Balakrish

(ICDDR.B, Bangladesh)

Phenotypic and Genotypic Characterization of Common Enteric Pathogens Isolated from Diarrheal Patients: a National Study 174

Dr. T. RAMAMURTHY

(National Institute of Cholera and Enteric Diseases, INDIA)

Virulence Factors and Molecular Epidemiology of Bacteria Causing Food-borne

Poisoning Isolated in Thailand 197

Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI

(National Institute of Health, Thailand)

Development of Multilocus Variable-Number Tandem Repeat analysis (MLVA) method for molecular subtyping of *Shigella sonnei* 222

Dr. Chien-Shun Chiou (Center for Disease Control, TAIWAN)

研究成果の刊行	235
---------	-----

プロジェクト2：ウイルス

アジアデング熱ネットワークの構築に関する研究	243
------------------------	-----

分担研究者	倉根 一郎	国立感染症研究所
協力研究者	高崎 智彦	〃
	田島 茂	〃
	根路銘令子	〃
	林 昌宏	〃
	小滝 徹	〃

2006年度輸入デングウイルス感染症病原体、血清診断	247
----------------------------	-----

分担研究者	高崎 智彦	国立感染症研究所
協力研究者	田島 茂	〃
	小滝 徹	〃
	原田 文植	〃
	林 昌宏	〃
	倉根 一郎	〃

サモア独立国からの集団輸入デング	252
------------------	-----

分担研究者	田島 茂	国立感染症研究所
協力研究者	貫井 陽子	〃
	林 昌宏	〃
	小滝 徹	〃
	高崎 智彦	〃
	倉根 一郎	〃

2006年度輸入デングウイルス感染症の疫学	259
-----------------------	-----

分担研究者	林 昌宏	国立感染症研究所
協力研究者	田島 茂	〃
	小滝 徹	〃
	原田 文植	〃
	高崎 智彦	〃
	倉根 一郎	〃

Characterization of dengue viruses prevalent in Korea for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia 265

Dr. Haewol Cho (National Institute of Health, KCDC, Korea)

Characterization of dengue viruses prevalent in Thailand and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia 268

Dr. Wen-Yi Shih (Taiwan Center for Disease Control, Taiwan)

Dr. Jyh-Hsiung Huang

Dr. Pei-Yun Shu

Characterization of dengue viruses prevalent in Indonesia 279

Dr. T. Mirawati Sudiro (University of Indonesia, Indonesia)

Dr. Beti D Dewi

Dr. Suhendro

Dr. Herdiman Pohan

Dr. Karyanti

学会発表に関する一覧表 (平成18年度) 292

プロジェクト3 : 原虫

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究 293

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所
大前比呂思 "

I. マラリア

インドネシア、ロンボク島におけるマラリア対策と感染状況の変化 —入植地におけるマラリア感染状況の変化を例として— 314

分担研究者 神原 廣二 長崎大学熱帯医学研究所

アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況と疫学的指標の変化 —ソロモン諸島におけるマラリア感染状況の変化を例として— 318

分担研究者 大前比呂思 国立感染症研究所
研究協力者 亀井喜世子 帝京大学医学部

熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性：アフリカと東南アジア・西太平洋の比較・・・	324
分担研究者 田辺 和裕 大阪大学微生物病研究所	
我が国における輸入マラリア標本を用いた東南アジアにおける薬剤耐性遺伝子の遺伝的多型性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	329
分担研究者 中野由美子 国立感染症研究所	
マラリア流行の血清疫学指標の開発・・・・・・・・・・・・・・・・	333
分担研究者 坪井 敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター	
マラリア原虫の薬剤耐性モニタリングに関する研究・・・・・・・・	338
分担研究者 朝日 博子 国立感染症研究所	
研究協力者 泉山 信司 ”	
東南アジアにおけるG6PD欠損症の疫学・・・・・・・・	345
分担研究者 川本 文彦 大分大学総合科学研究支援センター	
石垣島におけるマラリア媒介蚊の発生状況・・・・・・・・	347
分担研究者 津田 良夫 国立感染症研究所	
研究協力者 飯塚 信二 新潟検疫所	
” 長谷山路夫 仙台検疫所	
” 田島章太郎 成田空港検疫所	
” 新妻 淳 横浜検疫所	
” 山内 健生 広島大学	
輸入患者情報の整理・・・・・・・・	354
分担研究者 木村 幹男 国立感染症研究所	
研究協力者 波川 京子 札幌医科大学保健医療学部	
「マラリア流行の数理解析」に関する研究・・・・・・・・	359
分担研究者 石川 洋文 岡山大学環境学研究科	
マラリア感染データの統計的解析とホットスポット検出に関する研究・・・・・・・・	363
分担研究者 石川 洋文 岡山大学環境学研究科	
研究協力者 栗原 考次 岡山大学大学院環境学研究所	

Follow-up of control of Malaria in a Newly Developed Region in Kampot Province,

Southern Cambodia		365
Duong Soheat	Ministry of Health National Centre for Parasitology (Cambodia)	
Muth Sinuon	”	
Application of Geographic Information System (GIS) in Understanding Factors Affecting Malaria Transmission in The Philippines.		372
Fe Esperanza Espino	Research Institute for Tropical Medicine (Philippines)	
Jennifer S. Luchavez	”	
Ferdinand V. Salazar	”	
Mark Philip Bugayong	”	
Reduction of The Frequency of Epidemics Through Better Strategies Using The Present Mararia Information System in Solomon Islands.		403
Beranrd Bakotee	Ministry of Health and Medical Services (Solomon Islands)	
Risk Assenssement of Malaria in Thailand(in order to support the project “ Establish new monitoring tools of malaria”)		420
Jeeraphat Sirichaisinthop	Minisutry of Public Health(Thailand)	
Establish new monitoring tools of malaria		422
Jetsumon Sattabongkoto Prachumsri	Armed Forces Research Institute of Medical Science (Thailand)	
Strengthening Malaria Surveillance System In Central Java Province Phase I, Baseline study		425
Wibisono H.	Ministry of Health (Indonesia)	
Laihad F.	”	
Herawati L.	”	
Munanto A.	”	
Tobing C.	”	
Junaidi	”	
Warsito U.	”	
Widyaningsih W.	”	

II.腸管原虫類

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究・・・・・・・・ 438

分担研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
”	泉山 信司	”
”	八木田健司	”
”	古屋 宏二	”
”	中井 裕	東北大学大学院農学研究科

cpgp40/15 領域を用いたクリプトスポリジウムの分子疫学・・・・・・・・ 446

分担研究者	泉山 信司	国立感染症研究所
”	八木田健司	”
”	遠藤 卓郎	”
研究協力者	小村 麻子	国立感染症研究所
”	亀岡 洋祐	医薬基盤研究所

動物由来クリプトスポリジウムの型別・・・・・・・・ 460

分担研究者	中井 裕	東北大学大学院農学研究科
-------	------	--------------

Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp, *Isospora belli*, *Giardia intestinalis* and *Blastocystis hominis* among Thai patients・・・・・・・・ 463

Somchai Jogwutiwes	Chulalongkorn University(Thailand)
Chaturong Putaporntip	”
Takuya Iwasaki	Nagasaki Iwate Hospital

Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Stool Samples of Diarrheic Patients from the Philippines・・・・・・・・ 496

Filipinas F. Natividad	St. Luke’s Medical Center (Pilippines)
Corazon C. Buerano	”
Catherin B. Lago	”
Cynthia A. Mapua	”
Blanquita B. de Guzman	”
Shinji Izumiyama	NIID (Japan)
Kenji Yagita	”
Ebonia B. Seraspe	University of the Philippines in the Visayas
Lorena P. Samentar	”

Ronald R. Matias
Takuro Endo

St. Luke's Medical Center (Pilippines)
NIID (Japan)

参考資料 (会議資料)

International Conference on Vivax Malaria in Asia and Pacific Area Tuesday, January
16, 2007

研究成果の刊行 592

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究

主任研究者：渡辺治雄（国感染症研究所）

Asia-Pacific の CDC 様の国立の感染症研究機関との連携；アジアで流行しているビブリオの検査体制（PFGE を用いた genotyping）の標準化促進のため、「Pulse-Net Asia-Pan・Pacific」の立ち上げを行った。共通のプロトコルの作成、その制度管理を行った。1年目は感染研で、2年目は中国南京 CDC で連携国間の国際会議を開催して、協力関係を築いた。アジア各国で過去数年間流行していたデングウイルス 1-4 型に関し、E 遺伝子の全塩基配列を決定し、系統樹を作成した。この系統樹は今後、アジアにおけるデングウイルス株の解析を進める上で基盤的データとなる。アジアで流行しているデングウイルスの E 遺伝子塩基配列に基づいた系統解析の標準化、塩基配列決定法の講習会を行った。熱帯熱・三日熱マラリアの迅速診断法（LAMP 法）の開発を行った。クロロキン耐性マラリアの分布と耐性遺伝子のデータベース化を開始し、一部の解析を終了した。H19 年 1 月に中国上海でアジア地域の研究機関間での研究会議を行った。

分担研究者

寺嶋淳：国立感染症研究所
細菌第一部
伊豫田淳：国立感染症研究所
細菌第一部
泉谷秀昌：国立感染症研究所
細菌第一部
三戸部次郎：国立感染症研究所
細菌第一部
大西 真：国立感染症研究所
細菌第一部
森田昌知：国立感染症研究所
細菌第一部
大澤 朗：神戸大学 農学部
林 哲也：宮崎大学フロンティア

ア科学実験総合センター

山崎伸二：大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
西渕光昭：京都大学東南アジア研究所
協力研究員
Dr. Jian-Guo Xu. (Chinese Center for Disease Control and Prevention, China)
Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI. (National Institute of Health, Thailand)
Dr. Kwai-Lin THONG. (University of Malaya, Malaysia)
Dr. T. RAMAMURTHY. (National

Institute of Cholera and Enteric Diseases, INDIA)

Dr. Celia C. Carlos. (Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)

Dr. Bok Kwon Lee. (Korea National Institute of Health, Korea.)

Dr. Brent Gilpin. (Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand)

Dr. Phung Dac CAM. (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)

Dr. Chien-Shun Chiou. (Center for Disease Control, TAIWAN)

Dr. Kai-Man Kam. (Public Health Laboratory Centre, Hong Kong)

Dr. G. Balakrish NAIR. (ICDDR. B, Bangladesh)

Dr. Diane Lightfoot. (University of Melbourne, Australia)

Dr. Bala Swaminathan. (FDDB/DBMD/NCID/CDC, U. S. A)

Dr. D. W. N. Chee. (Minister of State for Health, Singapore)

プロジェクト2

分担研究者

倉根一郎：国立感染症研究所
ウイルス第一部

高崎智彦：国立感染症研究所
ウイルス第一部

伊藤美佳子：国立感染症研究所
ウイルス第一部

田島 茂：国立感染症研究所

ウイルス第一部

林 昌弘：国立感染症研究所

ウイルス第一部

協力研究員

Dr. Lyle R. PETERSEN. (Centers for Disease Control and Prevention, U. S. A)

Dr. T. Mirawati Sudiro. (University of Indonesia, Indonesia)

Dr. Surapee Anantapreecha (National Institute of Health, Thailand)

Dr. Emily s. Bomasang. (Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)

Dr. Wen-Yi Shih. (Taiwan Center for Disease Control, Taiwan)

プロジェクト3

分担研究者

遠藤卓郎：国立感染症研究所
寄生動物部

大前比呂思：国立感染症研究所
寄生動物部

朝日博子：国立感染症研究所
寄生動物部

澤田良夫：国立感染症研究所
昆虫科学部

木村幹男：国立感染症研究所
感染症情報センター

古屋宏二：国立感染症研究所
寄生動物部

中野由美子：国立感染症研究所
寄生動物部

八木田健司：国立感染症研究所
寄生動物部

泉山信司：国立感染症研究所
寄生動物部
田辺和祐：大阪工業大学工学部
神原廣二：長崎大学熱帯医学研究所
石川洋文：岡山大学大学院環境学
研究科
坪井敬文：愛媛大学無細胞生命科学
工業研究センター
川本文彦：大分大学・総合科学研究
支援センター

協力研究員

Dr. R. Olveda (Malaria Study group,
Institute for Tropical Medicine,
Philippines)

Dr. S. Jongwutives (Armed Forces
Research Institute of Medical
Science, Thailand)

Dr. W. Wootta (NIH, Thailand)

Dr. D. Socheat (National Centre for
Parasitology, Entomology and
Malaria Control, Cambodia)

Dr. F. Natividad (St. Luke's
Medical Center, Philippines)

Dr. T. Linhua (China CDC, China)

Dr. L.K. Thuan (Vietnam)

1. 研究目的：

新興・再興感染症の多くはアジアにおいて問題となっているものが多い。それらの感染症が旅行者、輸入産物、動物、鳥類等を介してわが国へ侵入する可能性がある。侵入の未然防止、あるいは侵入の迅速把握のためにはアジアで問題となっている病原体の特徴（形質的特徴、遺伝型、薬剤耐性等）

に関する情報の集積が重要である。その病原体遺伝情報に基づき、病原体の出現、伝播の関連性を科学的に解析できる。そのための基盤として、国際間で比較可能な検査法・解析法の確立およびその標準化を行うことが不可欠である。それらは、アジア各国でレファレンスラボとして責任ある研究機関（CDC 様の研究機関）との連携において行うことが最も効率的である。今この時期こそ、わが国がリーダーシップをとり、アジアの CDC 様研究機関の検査体制のネットワーク化および病原体遺伝情報のデータベース化に向けて尽力する時であり、この研究班においてそれを目指す (Fig. 1)。

2. 研究方法：

グループを病原体別に①細菌関連（アジアで問題となっている腸内細菌感染症を対象にする）、②ウイルス、③原虫に分け、それぞれの班を中心に、各国で比較可能な病原体の検査法の開発、およびその標準化を行う。研究班は、1) 国内の研究者による検査法の開発、分子疫学的データの解析法の開発研究、2) アジアの CDC 様研究機関への委託研究、および各国の病原体の情報の集積・解析、データの保管等に関する研究からなる (Fig. 2)。

(1) 今期は以下の病原体（細菌：腸管系感染症。ウイルス：デング熱、。原虫：マラリア）を対象にした検出法、および遺伝型等の解析法のプロトコールの標準化並びに制度管理を行い、アジ

ア諸国の研究所間でデータを比較可能にさせる。それら検査・解析法の統一を図るため、講習会を実施する。

- (2) 各国で分離される病原体の遺伝型等のデータベースの作成を行う。
- (3) アジア諸国のCDC様研究機関の研究者の人的交流を促進させ、技術・方法面の情報交換の促進を図る
- (4) アジア諸国で発生している病原体に関して相互に比較可能なデータベースの集積が可能となる。わが国にそれら病原体が侵入した場合に、迅速にそのオリジンを把握でき、適切なる対策に結びつけることが期待できる

3. 研究結果：

細菌関係；

- 1) アジア研究機関間でのPFGEの標準化および制度管理：

アジア地域の研究連絡会議：細菌関係〔下痢症疾患〕のプロジェクトのアジア地域の研究連絡会議を2006年12月に中国南京疾病対策センターで行った (Fig. 3)。Asia Pan-Pacific regionの14カ国の国のCDC様研究機関の研究者が参加した。プログラムにあるように参加国が各国の下痢性細菌の状況、その菌の解析状況を報告するとともに解析法のひとつのPFGE法の導入の現状を紹介した。その後、PFGEネットワーク構築に向けての

具体的進行状況についての議論を行った。

講習会の開催：香港公衆衛生研究所が中心となり、PFGEの講習会を2007年2月に開催した。アジア各国（インド、バングラデシュ、中国、タイ、フィリピン、マレーシア、韓国等）の国立の感染症責任研究機関から1～2名の参加者があった。ビブリオ菌を用いてのプロトコルの配布、実習、その結果の解析ソフトBioNumericsを用いての解析演習を行った。この講習会を通し、技法の標準化、各国の技術力の安定化に寄与してきている。此处で習った技法を各国が、国内研修会を重ねることにより、各国の国内への技術の普及が可能となる。

実際、中国では各省の地方衛生研究所間のネットワークの構築を行っており、中央研究機関（China CDC）に情報の集約が行われてきているという。ただ一方で、フィリピンのようなところは、この研究班のファンドにより漸くPFGE装置を購入できたということで、技術力の安定化はこれからの問題である。国間での差が歴然としている。今後、国間の差を最小限にしていく努力が必要である。

- 2) データーベースの構築

各国で利用できるデーターベースの構築に向けて、まずは各国で利用できるホームページの立ち上げを開始した。ニュージーランドのDr. Brent Gilpin. (Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand)

が中心となり、当研究所のホームページに Pulse-Net Asia Pacific を開設した。ここに各国の下痢性細菌の遺伝型情報の閲覧、また解析方法の技術的問題点の討論の窓口を設けることとした (Fig. 4)。

3) 菌株多様性検出法の開発

a) *Vibrio parahaemolyticus* について;

米国 CDC を中心として香港 (Public Health Laboratory Centre; PHLC)、Bangladesh (International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh; ICDDR, B)、India (National Institute of Cholerae and Enteric Diseases, NICED)、Thailand (National Institute of Health) 及び国立感染症研究所細菌第一部において PFGE 標準化プロトコールの作成を試みた。CDC, ICDDR, B, PHLC, NICED Thailand NIH 及び細菌第一部から供出された *Vibrio parahaemolyticus* 計 36 株について、それぞれの研究室において標準化プロトコールの候補により泳動を行い、画像を PHLC に電送後、解析ソフト BioNumerics により比較解析を行った。

b) Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の開発;

広域で分離された EHEC 0157 について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法と PFGE 法の比較検討を行った。ほぼ同じような識別能力を持っていることが判明した。MLVA は塩基配列の解析技術に基づくので、再現性に優れているが、

コスト面、および解析数の面では PFGE にまだ及ばない。しかし、今後の状況によっては PFGE に変わる方法になりえる。

c) EHEC のゲノム多様性解析

0157 マイクロアレイを用いた 8 株の 0157 の遺伝子レポーター解析 (CGH 解析) を行い、多型領域の網羅的な構造解析を終了した。その結果、サイズの小さな構造多型の大部分は IS629 と ISEc8 が関与した変化であることが確認され、さらに IS629 と ISEc8 の挿入部位を利用した系統解析も可能であることが示された。

non-0157 EHEC のなかでも、臨床的な重要性が高いと考えられる 026・0111・0103 EHEC 菌株 (それぞれ 9, 6, 6 株) の、0157 株をレファレンスとする WGPS 解析と 0157 マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。いずれの non-0157 EHEC でも、0157 特異的遺伝子群の約 3 分の 2 は全く存在しないことが明らかとなり、かなりの多様性の存在を明らかにした。

d) サルモネラの識別法の開発:

サルモネラでは既に血清型 Typhimurium、Enteritidis、Typhi、Paratyphi A などにおいてゲノム解析が完了しており、MLVA が開発可能な状況にある。計 22 遺伝子座に関する PCR 反応を 2 本にまとめられるよう、マルチプレックス PCR の系を設計した。*S. Typhimurium* および *S. Enteritidis* 分離株 40 株ずつを試験した。その結果、Enteritidis においてはバリエーションが観察される遺伝子座が少な

かった。一方、Typhimurium では約半数の遺伝子座においてバリエーションが観察され、本 MLVA が有用であることが示唆された。

e) 新興型腸炎ビブリオに関する遺伝子解析:

アジアを中心に世界的に流行している新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) の流行の要因については依然として明らかになっていない。新興型腸炎ビブリオが 03:K6 血清型株を起源とし、次々と新しい血清型株が出現している。03:K6 株の 03 の合成に関わる領域に 04 血清型株群のいずれかの 04 の合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型が変換したと考えられた。

新型クローンは系統発生の過程で大染色体中に環境変化への適応に必要な挿入配列 (23 kb および 16 kb 配列)、小染色体中に病原性関連遺伝子群 (*tdh* 遺伝子を含む) を獲得したと考えられた。

g) コレラ菌のスーパーインテグロン (SI) を用いた解析法;

感染源や感染経路を特定する為の手段として分子疫学的解析法が大きな威力を発揮している。中でも、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) が、その再現性と識別度の高さのため分子疫学的解析法のゴールドスタンダードとして用いられている。しかしながら、PFGE にもいくつかの問題点があり、より簡便で迅速な分子疫学的解析法の開発も求められている。コレラ菌のスーパーインテグロン (SI) に着目

し、その多様性を解析した。その結果、SI に存在するインテグラーゼ遺伝子は、血清型を問わず調べた全てのコレラ菌に存在し、コレラ菌の SI には、菌株間でかなり多様性があることを見いだした。

ウイルス関係:

1) わが国で分離された Dengue ウイルス株の解析:

わが国でこれまで分離された Dengue ウイルス 1-4 型計 33 株の E 遺伝子の全塩基配列を決定し、世界のものと比較した。Dengue ウイルス 1, 2, 3 型については各々 5 つの遺伝子型に、また 4 型については 2 つの遺伝子型に分類されることを確認した。この系統樹は現在世界にあるデータのほとんどを含んでいるものであり、今後アジアにおける Dengue ウイルス株の解析を進める上で重要な基盤的データとなる。

2) アジア間のネットワークの構築:

日本国国立感染症研究所、タイ NIH、フィリピン RITM、台湾 CDC、インドネシア大学、韓国 NIH、ベトナムパスツール研究所の各国間における Dengue 熱検査技術や、Dengue ウイルス分離法、遺伝子解析法、性状解析法には相違があることが明らかとなった。アジア Dengue 熱ネットワークの設立に当たっては、各国間において Dengue 熱検査法の確立、標準化、Dengue ウイルス分離法の確立、遺伝子解析法、性状解析技術の確立、標準化が必要であることが明らかとなった。タイ NIH およびインドネシア大学には技術協力をを行い、デ

ング熱検査法、デングウイルス分離法、遺伝子解析法においては共通の検査体制が確立された。

3) アジア間での Web サイト構築：

アジアにおけるデング熱・出血熱流行状況をリアルタイムに共有する仮 Web サイト (Asian ArboNET ウェブサイト Fig. 5) を作製し、アジア各国との情報共有に向けての協議を開始した。

4) 国内医療機関からの依頼検査成績：

国内医療機関からのデングウイルス感染に関する検査依頼件数は、2006 年は 76 件であった。このうち本研究事業に基づいてデングウイルス感染が確認された症例は 30 例であった。感染推定国の分布域は東南アジア、南太平洋、南アジア、南米と多岐に渡った。東南アジアではフィリピンからの帰国者が最も多く続いてタイ、マレーシア、インドネシア、東チモール、カンボジア等での感染が認められた。南太平洋ではサモアからの帰国者に感染が認められた。南アジアではインド、バングラディッシュ、モルジブからの帰国者に感染が認められ、南米ではブラジルからのデング熱の輸入症例が認められた。また中国、ベトナム等の複数の国を訪問した患者も認められた。

原虫関係：

1) 国際会議の開催

未だ国内には、マラリア原虫を媒介するハマダラカの生息が多数認めら

れており、今後、日本でマラリアが再興感染症として問題となる可能性は否定できない。実際、再興感染症としての三日熱マラリアは、日本と気候・環境条件が比較的類似している中国や朝鮮半島といった温帯アジアで、現在大きな問題となっている (Fig. 6)。2007 年 1 月 16-18 日に、本研究班と中国 CDC, WHO の共済で三日熱マラリアに関する国際会議が上海で開かれ、そこで、WHO (WPRO, SEARO, EMRO), 韓国, 中国, 北朝鮮, カンボジア, フィリピン, タイ, インドネシア, ソロモン諸島の参加者から、各々の国や地域における三日熱マラリア感染状況について説明があった。アジア・太平洋地域での三日熱マラリア感染状況に関して、情報の収集と共有に努めた (Fig. 7)。

2) アジア・太平洋関係各国のマラリア・原虫研究機関とのネットワーク強化及び情報の収集：

東南アジアや南太平洋の国々では、感染者数が減少するとともに、感染の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアにシフトしていることが共通している。一方朝鮮半島では、韓国では 1999 年に 4142 人、北朝鮮では 2000 年に 30 万人以上の患者発生をみるに至った。北朝鮮では 2002 年以降減少する傾向を示しているが、2006 年の患者数は 9353 人と多い。中国の温帯地域でも、三日熱マラリアが再興感染症として問題になっている例が多く報告されており、高緯度地域であっても、三日熱マラリアが一度侵入して定着

すると、その対策を進めるのが非常に困難であることが再認識された。

またソロモン諸島国では、三日熱マラリアが感染者の60%以上を占めていた。クロロキンにプリマキンも加えた治療的介入を続けたところ、今年度の調査では、マラリア感染率は、2006年9月(乾季):22.7%、2007年2月(雨季):17.4%にまで減少し、三日熱マラリアも熱帯熱マラリアも同様に低下した。

3) マラリアの薬剤耐性に関する研究:

クロロキン耐性関連遺伝子: *pfert* 遺伝子については、アジア・太平洋地域における出現・拡散状況を検討した。クロロキン感受性型(野生型)を示したサンプルは、1985年のフィリピンからの輸入例1例のみであり、残りの28例は全てクロロキン耐性型(変異型)を示した。PfcRT タンパク質の72から76番目のアミノ酸配列によって、野生型(CVMNK)、インドシナ半島型(CVIET)、パプアニューギニア型(SVMNT)などと分類されるが、1997年まで、大陸アジアと島嶼部アジア(フィリピン、インドネシア、パプア・ニューギニア)の間で、*pfert* 遺伝子は地域ごとによく保存されていたことがわかった。

耐性遺伝子の拡散速度や治療的介入が薬剤耐性を導く可能性を検討するための、数理モデル作成に努めた。ソロモン諸島を対象として、同地域における薬剤耐性株拡大の状況をシミュレートしたところ、集団治療投薬のcoverageが50%程度にとどまると、

15年経過後耐性株の占める割合は15%以上になることがわかった。

4) 国内におけるマラリア媒介蚊の生息状況に関する研究:

熱帯熱マラリアを媒介するハマダラカは、主にセリア亜属(Subgenus *Cellia*)に属する種で、わが国ではコガタハマダラカ(*Anopheles minimus*)が八重山諸島に生息している。そして、コガタハマダラカは、かつて八重山諸島で熱帯熱マラリアが流行した際の主たる媒介蚊であると推定されている。近年多くの観光客が訪れる石垣島西部(崎枝周辺)を調査した結果、コガタハマダラカは山脚部に位置する採集場所で多く採集され海岸部ではほとんど採集されないこと、採集場所周辺の地形や植生構造に依存して捕獲個体数が大きく異なることがわかった。少なくとも過去6年間でコガタハマダラカの密度が大きく変化している様子は見られない。

5) 国内における輸入マラリア患者に関する研究:

渡航先におけるマラリアのリスクの認識については、70%以上の対象者が認識していたが、マラリア予防に関する室内用殺虫剤スプレー、防虫剤を携行した者はいずれも半数程度にとどまった。暗くなってから外出した者も64%に達し、それらの中の約3分の1は、防蚊対策を全く行なっていなかった。いずれのマラリア予防法についても、わが国では実施率が低いことがわかった。

4. 考察

アジア地域を原因とする新興・再興感染症は数多い。もっとも最近の事例はSARSでありH5N1鳥型インフルエンザである。現在のようなグローバルな世界では一国の感染症は起こった時点で世界の問題となる。新興する感染症を迅速に検知し、迅速なる対応をとる体制作りがWHOをはじめとして多くの機関で試行されて来ている。WHOを中心に進められている迅速警鐘システムGOARNもそのひとつである。そのようなシステムは種々の方向から多数であることに越したことはない。それにより異常発生を確実に把握できる。本研究の目的は、病原体の遺伝的形質情報を元に、病原体の伝播経路の迅速把握、その結果を利用したの迅速対応である。

病原体の遺伝情報は多様性がある。特に細菌は、分裂に要する時間は30分であるので、1日で 10^8 個にもなる。その間に少なくとも 10^{7-8} にひとつの割合で変異が起こりえる。場所、時間の違いで菌のゲノムに差異が生じ、それを検出できる技術があれば、各々の菌を識別可能となる。それにより発生場所の違いまたは関連性を推測可能となる。本研究においては、ゲノムの差異を検出する方法として感度の高いPFGE法を利用し、アジアの国々の中での標準化、品質管理を行い、お互いの国で分離できる菌株の情報を集積し、データベースを構築するにある。アジア・パシフィックの14カ国の間での共同作業を進めることによ

り、お互いの国における状況把握がかなり進んできている。その基盤は、これから起こるかもしれない事件等への迅速対応の構築に連なっている。

科学の進歩と共に解析技術も変わりえる。PFGEの欠点(再現性の困難性)を補える方法の開発も本研究で試みている。再現性の向上、解析時間の短縮を目指しMLVAの開発を行っているが、PFGE法と同等レベルの識別能力を持つことが明らかになってきている。今後、このネットワークの中で試行を行う予定である。

この試みは、細菌だけ出なくウイルスにおいても然りである。アジア地域で頻発しているデングウイルス感染症に対応するネットワーク作り(アルボネット)を最優先事項にしている。E遺伝子の塩基配列を基にしたウイルスのデータベースの構築を行い、発生している地域による多様性を明らかにしてきている。今後さらに株数と地域を広めることにより、さらに利用価値のある情報ネットとなりえるであろう。

マラリアにおいても、アジア・太平洋諸国での流行の中心が熱帯熱マラリアから三日熱マラリアへとシフトしている状況が明らかになった。そのような状況を踏まえ今年度行われた三日熱マラリア国際会議では、越冬した感染蚊によって三日熱マラリアの流行がおきるアジアの温帯地方においては、媒介蚊の生息密度などを定期的にモニタリングしていくことが、再流行の潜在的可能性を検討し、早期に

警戒を促すために重要であるという認識を共有することができた。わが国においても、重点地域を選んでマラリア媒介蚊の種や密度を定期的にモニタリングしていくシステムを構築することが望ましい。

東南アジアにおけるクロロキン耐性遺伝子の分布状況を解析した結果、2000年に同定されたクロロキン耐性遺伝子 *pfcr1* のインドシナ半島型と島嶼部型は、15年間にわたり、地域でよく保存されており、インドシナ半島とフィリピン、インドネシア、メラネシアのクロロキン耐性は、全く別に拡散していると考えられた。また、熱帯熱マラリアの薬剤耐性に関しては、従来から遺伝子レベルの解析と *in vitro*, *in vivo* 試験の結果が、一致しないことが度々指摘されてきた。今後は適切なマラリア原虫増殖評価法を用いて、フィールドでも応用できる薬剤耐性モニタリング法の開発が期待されている。

5. 結論

新興・再興感染症の多くはアジアにおいて問題となっているものが多い。それらの感染症が旅行者、輸入産物、動物等を介してわが国へ侵入する可能性がある。侵入の未然防止、あるいは侵入の迅速把握のためにはアジアで問題となっている病原体の特徴（形質的特徴、遺伝型、薬剤耐性等）に関する情報の集積が重要である。そのための基盤として、国際間で比較可能な検査法・解析法の確立およびその標準

化を行うことが不可欠である。わが国がリーダーシップをとり、アジアのCDC様研究機関の検査体制のネットワーク化に向けて尽力する時期であり、この研究班においてそれを目指して成果を挙げてきている。アジアで問題となっている疾患の原因病原体（ピブリオ、デングウィルス、マラリア）に関して、各国のCDC様研究機関との連携強化を図り、共通の検査試験プロトコルの作成を行った。国内的には、アジアから帰国者等を介して運ばれてきている病原体の現状把握を行った。その形質、および遺伝学的特徴づけを行い、データベース化を行う体制の構築を開始した。