

200726003 B

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 17～19 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 17-19 年度 総括研究報告書

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 17-19 年度 総合分担研究報告書

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・・・・・・・・・・ 11

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・・・・・・・・・・ 16

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 //

森田 昌知 //

斐 迎新 //

大西 真 //

伊豫田 淳 //

林 哲也 宮崎大学

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 伊豫田 淳 国立感染症研究所

協力研究者 陸 彦 //

小泉 信夫 //

佐藤 人美 //

山本 章治 //

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・・・・・・・・・・ 26

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・・・・・・・・・・ 31

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	36
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	42
分担研究者	大澤 朗 神戸大学
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」	47
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	52
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	57
分担研究者	西渕 光昭 京都大学
協力研究者	西岡 輔 //
	中口 義次 //
	清水 理香 //
	松本 (真下) 千穂 大阪歯科大学
	山崎 渉 大阪府公衆衛生研究所
Ashrafuzzaman Chowdhury	バングラデッシュ国際下痢症研究センター
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)
Varaporn Kamruzzaman	プリンス・オブ・ソンクラ大学 (タイ)
研究成果の刊行に関する一覧表 (業績) 細菌	62

プロジェクト2：ウイルス

デングウイルスの我が国への侵入監視の強化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 75

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	〃
	伊藤美佳子	〃
	田島 茂	〃
	根路銘令子	〃
	林 昌宏	〃
	小滝 徹	〃
	大松 勉	〃

アジアのデング熱情報閲覧サイトの構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 84

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	〃
	林 昌宏	〃
	倉根 一郎	〃

国立感染症研究所における 2005-2007 年輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況
 ・・ 87

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

研究成果の刊行に関する一覧表（業績）ウイルス・・・・・・・・・・・・・・・・ 91

プロジェクト3：原虫

I.マラリア

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

マラリア等原虫疾患・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

分担研究者	遠藤 卓郎	国立感染症研究所
	大前比呂思	〃
	木村 幹男	(財)結核予防会新山手病院
	津田 良夫	国立感染症研究所
	朝日 博子	〃
	中野由美子	〃
	神原 廣二	長崎大学熱帯医学研究所
	田辺 和裕	大阪大学微生物病研究所
	川本 文彦	大分大学総合科学研究支援センター
	石川 洋文	岡山大学環境学研究科
	坪井 敬文	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況の変化に応じた疫学的指標・検疫技術の評価と改良の変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 114

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
	新妻 淳	横浜検疫所・輸入食品検疫検査センター
	飯塚 信二	新潟検疫所

本邦産マラリア媒介蚊の分布と発生状況に関する実地調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 122

分担研究者	津田 良夫	国立感染症研究所
-------	-------	----------

輸入患者情報の整理・・ 128

分担研究者	木村 幹男	(財)結核予防会新山手病院
-------	-------	---------------

マラリア原虫の薬剤耐性モニタリングに関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 134

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	〃

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の解析・・ 137

	分担研究者	中野由美子	国立感染症研究所	
熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性	分担研究者	田邊 和裕	大阪大学微生物病研究所	143
マラリア流行の血清疫学指標の開発	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	148
東南アジアにおけるマラリアとG6PD欠損症の疫学的解析	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	153
「マラリア流行の数理解析」に関する研究	分担研究者	石川 洋文	岡山大学環境学研究科	157
Strengthening and integrating of Malaria Control Activities in Remote and Endemic Villages in Kampot Province, Southern Cambodia	海外分担研究者	Duong Socheat	Ministry of Health National Centre for Parasitology (Cambodia)	162
	”	Chea Nguon	”	
Establish new monitoring tools of malaria	海外分担研究者	Jetsumon Sattabongkoto Prachumsri	Armed Forces Research Institute of Medical Science (Thailand)	177
Summary of International conference on Vira malaria				183

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

腸管寄生性原虫対応のアジアネットワーク				189
	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	”	
	”	中井 裕	東北大学大学院農学研究科	
	研究協力者	小村 麻子	国立感染症研究所	
		Somchai Jogwutiwes	Chulalongkorn University(Thailand)	
		Filipinas F. Natividad	St. Luke's Medical Center (Pilippines)	

Construction of Laboratory Network on the Characterization of Enteric Protozoan Pathogens Prevalent in Asia and Pan-Pacific: Philippine Report 2005-2008 194

分担研究者	Takuro Endo	NIID (Japan)
海外研究者	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	St. Luke's Medical Center (Pilippines)

Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp, *Isospora belli*, *Giardia intestinalis* and *Blastocystis hominis* among patients in Thailand 226

海外研究者	Somchai Jogwutiwes	Chulalongkorn University(Thailand)
"	Chaturong Putaporntip	"
"	Takuya Iwasaki	Nagasaki Iwate Hospital

わが国およびアジアのクリプトスポリジウム汚染状況の分子疫学的調査 234

分担研究者 中井 裕 東北大学大学院農学研究科

研究成果の刊行に関する一覧表（業績）原虫

（I.マラリア、II.腸管原虫類 とともに） 240

研究成果の刊行 249

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
3年間（17～19年） 総括研究報告書

アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究

主任研究者：渡辺治雄（国感染症研究所）

世界的グローバル化により、アジアで流行している感染症(マラリア、デング熱、下痢原性感染症等)が我が国に侵入する機会が以前よりも増えてきている。的確な病原体の情報を把握しておくことがそれらの感染症の我が国への侵入および拡大阻止という迅速対応・対策において不可欠である。そのためにアジアで感染症対策に資する研究を行っている国立のCDC様の任務を持つ研究機関とのネットワークを構築することにより、病原体情報の交換および研究者の人的交流を促進させる。そのことが我が国の感染症対策にも役立つと考えられる。当該目的に基づき、この3年間に、下痢原性感染症においては「Pulse-Net Asia」の構築、デング熱に関しては「アルボネット」の構築、マラリアに関しては「マラリアネット」の構築を推進してきており、その構築がほぼ整いつつある。

分担研究者		山崎 伸二	大阪府立大学大学院
寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部		生命環境科学研究科
		西潟 光昭	京都大学 東南アジア研究所
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	協力研究員	
三戸部 次郎	国立感染症研究所 細菌第一部		Dr. Jian-Guo Xu. (Chinese Center for Disease Control and Prevention, China)
大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI.	(National Institute of Health, Thailand)
森田昌知	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Kwai-Lin THONG.	(University of Malaya, Malaysia)
大澤 朗	神戸大学 農学部		
林 哲也	宮崎大学フロンティア科学実験総合センター	Dr. T. RAMAMURTHY.	(National Institute of Cholera and Enteric

	Diseases, INDIA)	倉根 一郎	国立感染症研究所 ウイルス第一部
Dr. Celia C. Carlos.	(Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)	高崎 智彦	国立感染症研究所 ウイルス第一部
Dr. Bok Kwon Lee.	(Korea National Institute of Health, Korea.)	伊藤 美佳子	国立感染症研究所 ウイルス第一部
Dr. Brent Gilpin.	(Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand)	田島 茂	国立感染症研究所 ウイルス第一部
Dr. Phung Dac CAM.	(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)	林 昌弘	国立感染症研究所 ウイルス第一部
Dr. Chien-Shun Chiou.	(Center for Disease Control, TAIWAN)	協力研究員	
Dr. Kai-Man Kam.	(Public Health Laboratory Centre, Hong Kong)	Dr. Lyle R. PETERSEN.	(Centers for Disease Control and Prevention, U. S. A)
Dr. G. Balakrish NAIR.	(ICDDR. B, Bangladesh)	Dr. T. Mirawati Sudiro.	(University of Indonesia, Indonesia)
Dr. Diane Lightfoot.	(University of Melbourne, Australia)	Dr. Surapee Anantapreecha	(National Institute of Health, Thailand)
Dr. Bala Swaminathan.	(FDDDB/DBMD/NCID/CDC, U. S. A)	Dr. Emily s. Bomasang.	(Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)
Dr. D. W. N. Chee.	(Minister of State for Health, Singapore)	Dr. Wen-Yi Shih.	(Taiwan Center for Disease Control, Taiwan)
プロジェクト2 分担研究者		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	Parasitology, Entomology and
澤田良夫	国立感染症研究所 寄生動物部	Malaria Control, Cambodia)
木村幹男	国立感染症研究所 寄生動物部	Dr. F. Natividad (St. Luke's Medical Center,
古屋宏二	国立感染症研究所 寄生動物部	Philippines)
中野由美子	国立感染症研究所 寄生動物部	Dr. T. Linhua (China CDC, China)
八木田健司	国立感染症研究所 寄生動物部	Dr. L.K. Thuan (Vietnam)
泉山信司	国立感染症研究所 寄生動物部	
田辺和裕 神原廣二	大阪工業大学工学部 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	

I. 目的:

- 1) アジアの CDC (疾病制御センター) 様機能を持つ研究機関と感染研との連携強化を図る。
- 2) アジアで流行している新興・再興感染症 (細菌; 新型コレラ、新型腸炎ビブリオ等、ウィルス; デング熱ウィルス、原虫; マラリアを対象) の実態の正確な情報を得るための検査法の基盤を構築する。検査法の標準化、精度管理を行う
- 3) 分子疫学的解析を可能にするため病原体のゲノム情報に基づいたデータベース化を推進する
- 4) 我が国に侵入する病原体の起源の追求を可能にし、防疫に役立たせる

II. 3年間の研究成果概要

- 1) 細菌チーム; 主任研究者 (渡邊治雄)、分担研究者 (寺嶋、泉谷、伊豫田ら)
アジア (韓国、中国、香港、台湾、ベトナム、マレーシア、フィリピン、タイ、インドネシア、バングラデシュ、インド、オーストラリア、ニュージー

ランド、日本) および米国 CDC 等の国立の感染症研究所との連携を図り、コレラ菌等の腸管系細菌のゲノム情報 (PFGE) に基づくデータベース化およびそのネットワーク (Pulse-Net) の構築を行った。PFGE 法の講習会を計 3 回、香港で開催し、アジア間での解析手法の標準化、精度管理を行った。また、上記の国からの参加で、計 3 回/3 年、国際研究会 (場所; 日本、中国、インド) を開催し、各国の疫学情報の交換、分析結果の討議を行い、各国共通の“物差し”で解析できるようにした。各国の情報のデータベースのウェブサイトニュージーランドが開設した。

2) ウィルスチーム; 分担研究者 (倉根、高崎、田島ら)

タイ、マレーシア、インドネシア、シンガポール、ベトナム、カンボジア、フィリピン、日本、オーストラリア、インド、スリランカ、アメリカ合衆国、イギリス、WHO (ジュネーブ) などから公衆衛生 (疫学)、ウィルス学、ワクチン学、昆虫学の専門家が集まり、それぞれデング熱流行の状況、輸入症例、実験室診断法、蚊対策について発表討議した。実験室診断法としてデングウィルス NS1 抗原検出 ELISA の標準化を行った。感染研のホームページに *Asian Arbonet* としてのサイトを開設し、各国がリンクを貼るようにした。

3) 原虫チーム; 分担研究者 (遠藤、大前、田辺ら)

2005 年に感染研、2006 年に中国 CDC、2007 年に感染研でアジア地域の国立

の感染症研究機関の研究者を集め国際会議を開催した。東南アジア各国のマラリアの疫学的状況の変化; 重症で致死率の高い熱帯熱マラリアから、症状が軽い慢性的な三日熱マラリアに流行の中心が移っていく傾向が明らかになった。QIAamp 法と Real-time PCR 法を併用した場合、三日熱マラリア原虫が 100% 検出できることが分かった。この手法の標準化を始めた。今後の流行状況の変化を予測し対策をたてるための、マラリアの伝播と対策に関する数理モデルの開発を行い、実際の現象と合うことが確かめられた。

詳細:

細菌関係

1) PFGE の標準化: アジア諸国において関心度の高い病原菌

Vibrio cholerae、*Vibrio parahaemolyticus* について、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)、

米国 CDC、およ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を作成した。参加機関から供出された *V. cholerae* 01 及び 0139 計 40 株と *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。最終的な標準化プロトコールを用いることで、供与株について泳動像の比較が正確にできる結果が得られたことから、本プロトコールの使用により、*Vibrio cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* の解析情報を国際的に共有しその対策に役立てることが期待される。

2) データベースの構築:

各国で利用できるデータ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。

3) MLVA 法の評価: 2005 年及び 2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、集団発生由来株或いは同一 PFGE パターンを示し広域から分離された散发事例由来株について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を行った。散发事例由来株が主である広域分離株においても、集団発生由来株で見いだされるような遺伝学的特性が極めて類似した株が検出されていることから、これらの散发事例由来

株は、” Unrecognized outbreak ” を形成している可能性が示唆された。

4) ニューキノロン耐性チフス菌: 2005~2007 年における海外旅行者由来分離株数は、チフス菌 120 株 (うち輸入例 91 株)、パラチフス A 菌 44 株 (うち輸入例 41 株) であったが、その中にニューキノロン剤に耐性を示すチフス菌が 3 株存在した。パルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析の結果、この 3 株は極めて類似した特有の泳動パターンを示し、全ての耐性菌において DNA ジャイレース GyrA サブユニットに S83F 及び D87N、トポイソメラーゼ IV ParC サブユニットに S80I の変異が確認された。今後もニューキノロン耐性菌だけでなく新型薬剤耐性菌の日本への侵入をいち早く見つけるため、常に分離株の薬剤感受性を調べる必要がある。

5) コレラ菌の新規マーカー: コレラ菌の新しい疫学マーカーを見つけ出すことを目的として、コレラ菌のスーパーインテグロン (SI) の多様性を解析し、PCR ベースでの簡便で迅速なコレラ菌の分子疫学的解析法の開発を試みた。コレラ菌の SI 領域は、複数の血清型の集合体である NAG ビブリオのみならず同じ生物型の 01 エルトール型間や 01 古典型間で、さらに 0139 コレラ菌間でも多様性があることを明らかにした。コレラ菌の SI 領域を標的とした Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法や PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法を開発した。

RAPDあるいはPCR-RFLP単独でもPFGEよりも高い解像度を示す場合があり、さらに両方を組み合わせた結果は、PFGEにも勝るとも劣らない高い解像度を有していた。

6) 腸炎ビブリオ新型クローン：アジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンが我が国に侵入することを防止するために、新型クローンを特異的にかつ簡便に同定するのに最も適したPCR法を明らかにするための研究を実施した。臨床的に重要な新型クローンの同定にはGS-PCR (group-specific PCR、*toxRS* 遺伝子の特異的塩基置換を標的) 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適していると結論した。本研究で有効性が確認できたGS-PCR法をベースにした方法を用いることにより、海外からの輸入魚介類中の新型クローン菌株のモニタリング検査を実施して情報を収集し、防疫対策に資することができると考えられる。

ウイルス関係

1) 輸入デング感染症：デングウイルス感染症は東南アジアを中心として世界的規模で熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、re-emerging infectious disease (再興感染症) の一つとして、極めて重要な感染症になっている。感染研ウイルス第一部で実験室診断された陽性検体数はこの3年間で増加傾向を示し、特に2007年は50例を超えた。さらに患者検体からこれまでに

報告の無いゲノム変化を有するウイルス株を分離することに成功した。本研究により邦人等の輸入デング感染症の実態を把握することにより、海外でのデング感染症の蔓延状況により流行状況をいち早く察知可能であることが実証された。

2) 輸入症例の検討：邦人等の輸入デング感染症の実態を把握することにより、海外でのデング感染症の蔓延状況により流行状況をいち早く察知可能であることが実証された。陽性患者の渡航先ベスト3は2005年がインドネシア、フィリピン、バングラディッシュ、2006年がフィリピン、マレーシア、ブラジル、2007年がインドネシア、フィリピン、タイ、インド、ジャマイカであった。特に2007年はインドネシアでもバリ島からの輸入症例だけで11例と顕著であった。インドネシアからの輸入症例は上半期に、一方フィリピンは8月末に多いという傾向がみられた。地域別では、8割以上が東南アジアを中心に、南アジア、ミクロネシア・ポリネシア地域であり、残りは中南米であった。デングウイルスには4種(1型～4型)の血清型が存在する。各型の割合をみると2005年から2007年の3年間ではいずれの年も3型が約3割と最も高く、次いで1型で2～3割で推移した。2型は10%程度であり、4型は10%に届かず2006年には観察されなかった。

マラリア関係；

1) 三日熱マラリアの実態：再興

感染症としての三日熱マラリアは、中国、朝鮮半島といった温帯アジアでも、公衆衛生上大きな問題となっており、未だ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るわが国においても再流行の可能性は否定できない。アジア・太平洋地域におけるマラリア感染状況の劇的な変化を背景に、2007年1月に三日熱マラリアに関する国際会議を開き、幅広く情報や研究成果の交換と共有を目指した。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、Reemergingの可能性を評価するのに、リスクがある地域で媒介蚊の生息密度やヒトの移動状況などをモニタリングしていく必要が認められた。熱帯のマラリア流行地では、マラリア対策が進んだ結果、従来の有症状の熱帯熱マラリアを中心とした診断法や指標で、三日熱マラリアの感染状況を把握するのが困難になっていることが確認され、横断的調査の実施とともに、新たな分子疫学的手法も取り入れた疫学的指標やモニタリング法の開発が望まれた。

2) 国内のコガタハマダラカ生息調査：国内におけるマラリア媒介蚊の生息調査の結果、熱帯熱マラリアを媒介できるコガタハマダラカは、八重山諸島で、かつてと同様な高い密度で生息していることが確認されたが、生息範囲の拡大は認められなかった。八重山諸島の石垣島を例に、1950年代にみられた熱帯熱マラリア流行を基礎として、実際に数理モデルの構築を進め

たが、適切な対策が採られなかった場合、マラリア原虫侵入に続く小規模な2次感染の発生を否定できなかった。一方、三日熱マラリアを媒介できるシナハマダラカとオオツルハマダラカは、現在も国内の広範囲に分布していることが確認された。

3) マラリア原虫迅速検出法の開発：従来のPassive Case Detection(PCD)中心の疫学的指標では、現在のマラリア感染傾向の変化を把握できない。PCR法に比して廉価なLoop-mediated isothermal amplification(LAMP法)についてフィールド応用も視野に入れた開発を目指した。PCR法のように温度条件を変更することなく、数時間で多量の検体を処理でき、精度もPCR法に匹敵することが確認された。

4) マラリア対策：アジアの大陸部と太平洋地域の島嶼部と比較すると、島嶼部では熱帯熱マラリア原虫の進化速度も遅く、薬剤耐性株の拡散速度も遅い。実際、インドネシア、カンボジアの新入植地において、熱帯熱・三日熱マラリアが、侵入・拡散していく状況について、その要因や対策を検討したところ、たとえ定着したとしても、比較的孤立した集団ならば、治療的介入で速やかに感染率が減少した。これらの現象は、今後途上国のマラリア対策を考えるうえで重要な基礎的知見となるばかりでなく、島嶼国であるわが国にマラリアが侵入した場合の防疫対策を考える場合も、貴重な資料となる。

5) マラリア組み換えタンパク質の発

現系：コムギ胚芽無細胞法を用いると、大腸菌等の既存の組換えタンパク質発現系では困難であった熱帯熱マラリア原虫のタンパク質を、高効率に発現できることが判明した。この方法を用いて、病態や免疫とも関連したマラリア流行の新規血清疫学指標のゲノムワイドな探索が期待される。

III. 考察

年間約500万の日本人が熱帯地域に旅行し、約200万の人達が熱帯地域から日本に入国している現状を考え合わせると、当該地域で流行しているコレラ、腸チフス、デング熱、マラリアのような疾患に罹患して帰国、あるいは入国する患者が今後多くなるとも考えられる。我が国への侵入および伝播を阻止するには、1) 発生地におけるコントロールの強化とそのための支援、2) 水際（検疫）による迅速検知と、侵入阻止、3) 国内発生例の迅速検知に基づくコントロール、等が効率的に行われる必要がある。感染症の疫学調査、確認検査に対応する責任を持つ国立感染症研究所としては、アジア各国で発生している感染症の状況、及びその病原体の特質および遺伝情報を含めた患者・病原体サーベイランスの把握をすることにより、上記感染症のコントロールの一翼に寄与することが求められている。その一環として、アジア地域の感染研と同じような責務を持つ研究機関とのネットワークの構築を行い、迅速なる病原体の情報交換をできる体制づくりを推進

する必要がある。本研究はその構築を目的に3年間遂行してきた。

細菌、ウイルス、原虫の分野ごとにアジア各国の研究機関の研究者を集め、分析方法の標準化およびデータベース化の方法に関しての話し合いがもたれ、それぞれにおいて方向性が示されてきた。特に細菌関係については、菌のゲノムの多様性を利用した解析手法 PFGE の標準化に向けての試行がなされた。そこで問題となった点は、各国の技術力の差と各国の研究資金の差であり、アジアの国における差が大きいということである。その差を縮めるためにも、当研究班による研究委託金としての資金の支援を行い、解析機器、試薬等が十分でないところにそれを揃えるための支援を3年間にわたり行ってきた。それにより参加したほぼすべての国において機器の整備がなされた。また、技術力の向上を図るために実習を含む研修会を3回にわたり行ってきた。さらに精度管理も行ってきたため、3年目には各国の技術力が均等化され、お互いの国によって作られた解析結果が“同一の物差し”で比較可能になってきた。これにより 各国で分離される病原体を比較できる下地ができてきたことになる。しかし、これが達成できた国は、この研究班に参加できた、又は参加できる技術力をもった国（アジアの中の10各国）だけであり、参加していない多くの国がまだ存在する。それらの国においては、その国の患者・病原体サーベイランスの体制が十分に確立

されていないところが多い。アジアのネットワークを構築していく過程には多くの問題点が存在することは確かであるが、まずできるところから一步一步踏み出していかなければならないのが現実であろう。アジアの中で、感染研がリーダーシップを示すべき第一歩が踏み出された。今後も継続して、その役割を果たしていくことが、アジアの中での感染症コントロール、如いては我が国の危機管理対策の一環としても重要である。

IV. 今後考えられる新たな課題

アジア各国の国立の感染症研究機

関との連携の輪ができたばかりである。各国で分離される病原体のゲノムベースの情報の収集が開始された。この継続と維持、活用が、感染症対策に結びつけるためには今後、不可欠である。

V. 行政施策への貢献の可能性

アジアで発生する病原体の遺伝情報のデータベースの構築ができる体制ができてきた。その情報に基づき、我が国に侵入してくる病原体の検査・その比較が迅速にできるようになり、病原体の伝播の回避に結び付けられる。防疫に貢献できる。

プロジェクト 1 : 細菌

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）

平成 17～19 年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「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」

分担研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	荒川英二	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨 アジア諸国において関心度の高い病原菌である *Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* について、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)、米国 CDC、およ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を作成した。参加機関から供出された *V. Cholerae* 01 及び 0139 計 40 株と *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。最終的な標準化プロトコールを用いることで、供与株について泳動像の比較が正確にできる結果が得られたことから、本プロトコールの使用により、*Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* の解析情報を国際的に共有しその対策に役立てることが期待される。

2005 年及び 2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、集団発生由来株或いは同一 PFGE パターンを示し広域から分離された散发事例由来株について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を行った。散发事例由来株が主である広域分離株においても、集団発生由来株で見いだされるような遺伝学的特性が極めて類似した株が検出されていることから、これらの散发事例由来株は、“Unrecognized outbreak” を形成している可能性が示唆された。

A. 研究目的

アジア諸国において脅威となっている細菌性腸管感染症である *Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* による下痢症を制

御するためには、これらの病原菌の解析情報を共有し感染拡大の阻止に向けた対策に役立てることが重要である。そのためには、解析方法のひとつとして汎用されている

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法の標準化プロトコールによる解析を行い、その結果が共有できるような条件の整備が必要である。*Vibrio Cholerae* 及び *Vibrio parahaemolyticus* の標準化プロトコールの作成を目的として、米国 CDC, ICDDR, B, PHLC, NICED 及び Thailand NIH とともに供出株を使用して標準化プロトコールの評価を行った。また、腸管出血性大腸菌 0157 については PFGE による解析を主体とした、国際的なネットワークである PulseNet Asia Pacific 等においても分離菌株の解析結果を比較することが可能となっている。一方、病原菌の遺伝子配列決定が進むとともに種々の遺伝子型別法が開発されてきており、そのひとつとして MLVA 法がある。結核菌やサルモネラをはじめとして腸管出血性大腸菌 0157 においても MLVA による解析報告がある。本研究では、腸管出血性大腸菌 0157 における MLVA の菌株識別能について、PFGE との比較を行い分子疫学的解析方法としての評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

PHLC, ICDDR, B 及び国立感染症研究所細菌第一部において、過去に分離された疫学的に重要度の高いと考えられる *V. Cholerae* 01 及び 0139 計 40 株を選択して PHLC に送付集約しこれら 40 株について、それぞれの研究室において PFGE を行った。PFGE の泳動条件としては、最終的に 2 ブロックの組み合わせで、block1; switch time 2 - 10 秒、13 h、block2; switch time 20 - 25 秒、6h、電圧; 6V/cm, 温度 14°C を使用した。*Vibrio parahaemolyticus* 用の PFGE プロトコールの

作成; まず Phase I 試験として、参加 6 機関において過去に分離された疫学的に重要度が高いと考えられる *Vibrio parahaemolyticus* 36 株を選択して PHLC に送付集約しこれら 36 株について、それぞれの研究室において PFGE を行った。PFGE の泳動条件としては、Switch time; 10 - 35.03 秒、電圧; 6V/cm, 泳動角度; 120°、泳動時間; 18h、温度; 14°C の条件を検討した。

MLVA による解析; 2005 年、および 2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 0157 のうち、PFGE 解析により XbaI 及び BlnI でのパターンが同一と考えられる広域分離株を使用して MLVA による解析を行った。MLVA の primer には、米国 CDC において選択された既報の 9 種類を使用した。9 種類の primer は 3 種の蛍光色素 (青、緑、黄色) で標識した市販品を使用した。PCR 反応は、9 種類 primer のうち、4 種類の multiplex PCR を 2 本と single set primer による計 3 本の PCR によるもので、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国) を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130xl Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社) を用いた。

C. 研究結果

標準化プロトコールを使用して、2005 年 5 月に発生したバリ島帰国者におけるコレラ事例に由来する菌株の解析を行った。本事例は、2005 年 5 月に 5 都道府県からバリ島に旅行した 8 名においてコレラが発生したものであり、これらの患者はバリ島において同一ホ

テルに滞在していた。なお、菌株の解析には1995年にやはりバリ島への旅行者で発生したコレラに由来する株も使用した。PFGE解析では、1995年分離株 (No. 1008) と2005年分離株 (No. 236) においては、SfiI 及び NotI のいずれにおいてもそれぞれ数本程度のバンドの違いが見られた。したがって、全体のパターンとしてはやや類似性があるものの、同じバリ島でのコレラ事例といえども1995年と2005年の事例に由来する *V. Cholerae* 株の遺伝子型は異なっていることが示唆された。

*Vibrio parahaemolyticus*用のPFGEプロトコルの作成;1ブロックの泳動条件であり、SfiI, NotI 処理で生ずるバンドもムラなく分布していることから、本条件を用いて6ヶ所の機関で解析を行った。用いた分離株は、上位4つの血清型を含む7種類の異なった *Vibrio parahaemolyticus* である。それぞれの分離株のパターンは本条件により鮮明な泳動像が得られた。泳動時間に関しては、18時間よりもやや延ばして行うことも可能と考えられた。

2005年の広域流行株についてのMLVAでは、2004年に見られたPFGEパターン名である、type No. (以下、TNと略す) 112, 52, 413については、変異が起きている遺伝子座の種類が多く、リピート数の違いも大きい傾向があった。一方、2005年に初めて観察されたTN a27, a491, a264, a230については、変異が発生している遺伝子座数及びリピート数の違いのいずれも少なかった。2005年に見られたパターンであるTN a27, a491, a264, a230については、XbaI 及び BlnI によるPFGEパ

ターンとMLVAの解析で一致する株があることから、それぞれのパターンに属するこれらの分離株については感染源等の共通性を強く示唆する結果であると考えられる。しかしながら、これらの株はほとんどが散发事例由来株であり疫学的な関連情報については不明である。

MLVAの結果ではそれぞれ、PFGEで同一パターンを示しながらもMLVAでは違いが見つかり、本法の識別能の高さが示された結果といえる。一方、TN 413 及び a264 においては、PCRでの増幅産物が得られていない遺伝子座 (No. 9 及び 10) があったものの、9つ全ての遺伝子座においてリピート数が極めて近く、なかには全く同じMLVAタイプを示す株も存在した。XbaIによるPFGEパターンも両者ではかなり類似しているが、パターンの違いが識別できることから、株によってはMLVAよりもPFGEの方が識別能の高い場合もあることを示している。

2006年の広域流行株については、XbaI と BlnI によるPFGEパターンが一致しているにもかかわらず、それぞれのPFGEタイプの中で3~5種類のMLVAタイプに分かれ、その違いは1 locus で1 repeat 数異なるものから3 loci で1 repeat から5 repeat 数異なるものまでであった。TN b328の株では、疫学的に関連が疑われる2事例に由来する14株において1 locus で1 repeat 数の違いがある株とさらに別の1 locus で2 repeat 数の違いを示す株がみられた。また、関連は不明である散发事例由来株においても上記2事例の株と同じMLVAタイプを示す株があった。TN b330を示す株においては、同一集団発生由来株に