

200829042A

アジアの研究機関との連携における
ラボラトリーネットワークの強化に関する研究
(課題番号：H20- 新興 - 一般 - 013)

平成 20 年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業)

研究代表者 渡 辺 治 雄

国立感染症研究所 細菌第一部

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

1. 平成 20 年度総合研究報告書

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究	1	
研究代表者	渡辺 治雄	国立感染症研究所

2. 平成 20 年度研究分担者報告書

プロジェクト 1：細菌

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究	15
------------------------------------------------	----

研究分担者	寺嶋 淳	国立感染症研究所
協力研究者	泉谷 秀昌	〃
	伊豫田 淳	〃

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク	25	
研究分担者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所

病原性大腸菌の侵入監視に関する研究	29
----------------------------	----

研究分担者	伊豫田 淳	国立感染症研究所
協力研究者	寺嶋 淳	〃
	佐藤 人美	〃
	泉谷 秀昌	〃

腸管外病原性大腸菌-血流細菌感染由来大腸菌の解析	32
-----------------------------------	----

研究分担者	大西 真	国立感染症研究所
-------	------	----------

ピブリオの分子疫学マーカーの開発、データベース化	37
-----------------------------------	----

研究分担者	森田 昌知	国立感染症研究所
研究協力者	泉谷 秀昌	〃
	荒川 英二	〃
	山本 章治	〃
	高井 信子	〃

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク	43
研究分担者	大澤 朗 神戸大学
Molecular Analysis of <i>Shigella flexneri</i> 4C emerged in China	49
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 2009	58
Dr. Kai-Man Kam (Public Health Laboratory Centre, Hong Kong)	
Application of pulse-field gel electrophoresis to the characterization of pathogenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates obtained from clinical sources in Nha Trang, Vietnam	70
Dr. Phung Dac CAM (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)	
Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> Typhi and Paratyphi A : An intercountry collaborative study (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	78
Dr. Kwai-Lin THONG (University of Malaya, Malaysia)	
Validation of new <i>Listeria</i> PFGE protocol and analysis of recalcitrant isolates	83
Dr. Brent Gilpin (Institute of Environmental Science & Research Limited, New Zealand)	
Application of Multilocus variable-number tandem repeat analysis for typing of <i>Shigella</i> spp.	87
Dr. Bok Kwon Lee (Korea National Institute of Health, Korea.)	
Pulse-Net Progress Report- 2009 (ICDDR,B, Bangladesh)	100
1. <i>Vibrio</i> Prevalence and Diarrheal Link of <i>tdh+</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Serogroup O8 : K21 in Estuarine Ecosystem of Bangladesh	
Dr. Alejandro Cravioto, Dr. Munirul Alam, Dr. Wasimul B. Chowdhury, Dr. N. A. Bhuiyan, Dr. Atiqul Islam, Dr. Hubert Ph. Endtz, (ICDDR,B, Bangladesh)	

2. *Campylobacter*; Fluoroquinolone resistant *Campylobacter jejuni* from Bangladesh show high degree of heterogeneity and are associated with a single point mutation in *gyrA*

**Dr. Talukder KA, Dr. Aslam M, Dr. Islam Z, Dr. Khajanchi BK,
Dr. Azmi IJ, Dr. Kabir Y, Dr. Cravioto A, and Dr. Endtz HP
(ICDDR.B, Bangladesh)**

El Tor (ET) in Peru, Classical, ET, and Hybrid Variants of Both Biotypes in Mexico Constitute Two Independent Pools of *Vibrio cholerae* O1 Causing Endemic Cholera in Latin America: Asia-Independent Emergence of Hybrid-ET, in 1991 108

**Dr. Munirul Alam, Dr. Suraia Nusrin, Dr. Atiqul Islam'
Dr. N. A. Bhuiyan, Dr. Niaz Rahim, Dr. Alejandro Cravioto
(ICDDR.B, Bangladesh)**

Genotyping of *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahaemolyticus* and *Campylobacter* spp
. 136

**Dr. T. RAMAMURTHY
(National Institute of Cholera and Enteric Diseases, INDIA)**

Molecular epidemiology of *Shigella sonnei* in Thailand during 2007 to 2008 152

**Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI
(National Institute of Health, Thailand)**

Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing and Phylogenetic Analysis of *Shigella flexneri* 156

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

ASEAN PLUS THREE emerging infectious diseases programme 181

**Dr. Dhannan Sunoto (ASEAN+3 Emerging Infectious Diseases
Programme Phase II,
Programme Facilitation Section,
The ASEAN Secretariat)**

プロジェクト2：ウイルス（デング熱）

チクングニヤ熱輸入症例の診断と検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 195

研究分担者	倉根 一郎	国立感染症研究所
協力研究者	高崎 智彦	〃
	林 昌宏	〃
	小滝 徹	〃
	三浦 影子	成田空港検疫所
	鎌倉 和政	〃
	佐川 宏明	〃
	井村 俊郎	関西空港検疫所

デングウイルス NS1 抗原検出 ELISA キット (PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA[®]) 評価
 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 201

研究分担者	高崎 智彦	国立感染症研究所
協力研究者	倉根 一郎	〃
	田島 茂	〃
	大松 勉	〃
	小滝 徹	〃

国立感染症研究所における2008年輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況・・ 205

研究分担者	田島 茂	国立感染症研究所
協力研究者	高崎 智彦	〃
	林 昌宏	〃
	小滝 徹	〃
	大松 勉	〃
	倉根 一郎	〃

フラビウイルス共通プライマーを用いた小樽検疫所における蚊族成虫のフラビウイルス検査の実施・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 209

研究分担者	林 昌宏	国立感染症研究所
協力研究者	倉根 一郎	〃
	高崎 智彦	〃
	松本 泰治	小樽検疫所検疫衛生課

チクングニヤ熱の疫学に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 216

研究分担者	高橋 和郎	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	青山 幾子	〃
	弓指 孝博	〃
	加藤 哲男	〃

Virological and serological surveillance of dengue fever/dengue hemorrhagic fever, Japanese encephalitis and chikungunya in Thailand, April, 2008 – March, 2009 . . . 220

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

Characterization of dengue virus prevalence in Taiwan for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia 227

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

Analysis of gene and polypeptide sequences of dengue viruses envelope and NS1 239

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

Isolation and characterization of Japanese Encephalitis Virus (JEV) in Gansu province China 2008 254

Dr. Guo-Don Liang

(Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC)

プロジェクト3：ウイルス（高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ）

アジアの研究機関における高病原性鳥インフルエンザウイルスの実験室診断 257

研究分担者	田代 眞人	国立感染症研究所
研究分担者	小田切孝人	〃
協力研究者	影山 努	〃
	板村 繁之	〃
	白倉 雅之	〃
	岸田 典子	〃
	小淵 正次	〃
	氏家 誠	〃

プロジェクト4：ウイルス（風疹とCRS）

ラオス人民民主共和国ビエンチャン市の小学生の風疹、及び麻疹の抗体保有率・・・261

研究分担者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所
協力研究者	牛島廣治	藍野大学 藍野健康科学センター
	山本久美	国立感染症研究所
	ペンサイ・マニライ	東京大学医学系研究科・大学院

ラオス National Center of Laboratory and Epidemiology との Vaccine Preventable Diseases における実験室的・疫学的ネットワーク構築実現の可能性に関する情報収集・266

研究分担者	山本久美	国立感染症研究所
-------	------	----------

風疹ウイルスゲノムのアミノ酸配列の解析と自然淘汰圧との研究・・・・・・・・・・273

研究分担者	牛島廣治	藍野大学 藍野健康科学センター
協力研究者	周玉梅	東京大学大学院医学系研究科
	Frey TK	ジョージア州立大学

プロジェクト5：ウイルス（狂犬病ウイルス）

狂犬病ウイルスの迅速遺伝子検出系に関する研究・・・・・・・・・・283

研究分担者	山田章雄	国立感染症研究所
協力研究者	井上 智	〃
	Bordbaatar	〃
	Bazartseren	〃
	野口 章	〃

狂犬病ウイルスの分子疫学に関する研究・・・・・・・・・・292

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所
協力研究者	山田章雄	〃
	黒田 誠	〃
	関塚剛史	〃
	杉浦尚子	〃
	Bordbaatar	〃
	Bazartseren	〃
	Nguyen Thi Kieu Anh	

The National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi (NIHE)

Beatriz Quiambao

Research Institute for Tropical Medicine

Qing Tang

China CDC

狂犬病ウイルスの迅速抗原検出系に関する研究 305

研究分担者	朴 天鎬	北里大学
協力研究者	井上 智	国立感染症研究所
	Bordbaatar	"
	Bazartseren	"
	杉浦 尚子	"
	小嶋 大享	北里大学
	野口 章	国立感染症研究所
	Beatriz Quiambao	
		Research Institute for Tropical Medicine
		Catalino Demetria
		Research Institute for Tropical Medicine

Construction of laboratory net work on the molecular epidemiology and the development and standardization of Rabies diagnostic methods 309

Dr. Qing Tang
(Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC)

DEVELOPMENT, APPLICATION OF NEW METHODS FOR RABIES DIAGNOSIS IN NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE AND EPIDEMIOLOGY (NIHE), HANOI, VIETNAM 314

Dr. Nguyen Thi Kieu Anh
(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)

Construction of laboratory network on the molecular epidemiology of Rabies and the development and standardization of Rabies diagnostic methods 327

Dr. Beatriz P. Quiambao
(Research Institute for Tropical Medicine (RITM))

プロジェクト6：原虫（マラリア）

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

マラリア分野総括報告書・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 337

研究分担者	大前比呂思	国立感染症研究所
	津田 良夫	〃
	中野由美子	〃
	田辺 和祐	大阪大学微生物病研究所
	坪井 敬文	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

マラリアの疫学的指標である脾腫の病態に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 345

研究分担者	大前比呂思	国立感染症研究所
研究協力者	亀井喜世子	平成帝京大学・公衆衛生学
海外研究協力者	Berand Bakotee	Solomon Islands Medical Training and Research Institute

我が国における輸入マラリア標本を用いたマラリア薬剤耐性遺伝子の遺伝的多型の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 350

研究分担者	中野由美子	国立感染症研究所
-------	-------	----------

医学上重要な疾病媒介蚊の分子分類システムの構築・・・・・・・・・・・・・・・・ 354

研究分担者	津田 良夫	国立感染症研究所
研究協力者	沢辺 京子	〃
	金 京純	岐阜大学大学院
	當間 孝子	琉球大学医学部
	比嘉由起子	長崎大学熱帯医学研究所

マラリア原虫の遺伝的多様性とその分布・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 359

研究分担者	田邊 和祐	大阪大学微生物病研究所
-------	-------	-------------

マラリア流行の血清疫学指標の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 364

研究分担者	坪井 敬文	愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター
-------	-------	---------------------

Molecular analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Hainan and

Yunnan Province, China	369
海外分担研究者 Tang Linhua	National Institute of Parasitic Diseases, China CDC

Strengthening and integrating of Malaria Control Activities in newly developed area in Kampot Province, Southern Cambodia	374
海外分担研究者 Duong Socheat	National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control (CNM) (Cambodia)
Chea Nguon	

Annual Report for October 2008 – March 2009	
Screening of transmission blocking efficacy of antibodies produced against <i>Plasmodium vivax</i> and <i>P. falciparum</i> vaccine candidates	385
海外分担研究者 Jeeraphat Sirichaisinthop	Ministry of Public Health(Thailand)

研究成果の刊行 マラリア	387
--------------	-----

プロジェクト7：インフルエンザ疾患

Circulation of Influenza like illness in Cam Giang district, Hai Duong province, 2009	437
---------------------------------------------------------------------------------------	-----

Dr. Tham Chi Dung
(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)

3. 平成20年度業績	
研究成果の刊行に関する一覧表 (業績)	441
学会発表一覧表 (業績)	449

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク
の強化に関する研究

研究代表者：渡邊治雄（国感染症研究所）

感染症研究に責任を持つアジア各国の国立研究機関との連携により、アジアで発生している感染症のコントロールのための研究協力体制の確立を行うことを目的として以下の活動を行った；対象病原体としては、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ウィルス（デング熱、チクングニア、インフルエンザ、狂犬病、風疹、麻疹）③原虫（マラリア）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った。1）国内の研究者による検査法の開発、分子疫学的指標の開発、データの解析法の開発等の研究、2）アジアの研究機関へ研究費を委託し、各国で分離される病原体の収集、その解析、データの保管等を遂行した。各研究機関との連携、および研究者間の人的交流が開始された。

分担研究者		(National Institute of Health;NIH, Thailand)
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	Dr. Kwai-Lin THONG. (University of Malaya, Malaysia)
泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. T. RAMAMURTHY. (National Institute of Cholera and Enteric Diseases ; NICODE, INDIA)
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	Dr. Celia C. Carlos. (Research Institute for Tropical Medicine;RITM, Philippines)
大澤 朗	神戸大学 農学部	Dr. Bok Kwon Lee. (Korea National Institute of Health;NIH, Korea.)
協力研究員		
Dr. Jian-Guo Xu.	(Chinese Center for Disease Control and Prevention;CDC, China)	
Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI.		

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

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

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

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

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

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

Dr. Bala Swaminathan. (FDDDB/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

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

高橋 和郎 大阪府立公衆衛生研
究所

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

田代 真人 国立感染症研究所
ウイルス第三部

小田切 孝人 国立感染症研究所
ウイルス第三部

プロジェクト4

駒瀬 勝啓 国立感染症研究所
ウイルス第三部

山本 久美 国立感染症研究所感
染症情報センター

牛島 廣治 鹿藍野大学医療保
健部

Philippines)

プロジェクト5

- 山田 章雄 国立感染症研究所
獣医科学部
井上 智 国立感染症研究所
獣医科学部
朴 天鎬 北里大学 獣医学部

プロジェクト6

- 大前比呂思 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
津田良夫 国立感染症研究所
昆虫科学部、
田辺和桁 大阪工業大学工学部
坪井敬文 愛媛大学無細胞生命
科学工業研究センタ
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,

Dr. T. Linhua (China CDC, China)

Dr. L. K. Thuan (Vietnam)

1. 研究目的:

デング熱、新型コレラ等の下痢性疾患、SARS、高病原性鳥インフルエンザなど新興・再興感染症のかなりのものが、アジアを起源として発生している。それらが、旅行者、輸入産物、動物、鳥類等を介して我が国に運ばれたり、あるいは今後侵入する可能性がある。その侵入の未然防止、あるいは侵入後の迅速把握それによる効果的対策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およびその分析が重要である。その結果、病原体の遺伝学的特徴に基づき、新規病原体の出現あるいはその伝播の関連性を科学的に解析できるようになる。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。標準化された方法により、各国で分離された病原体の解析、そのデータの収集、およびデータベース化を行う。それらは、アジア各国でレファレンスラボとして機能している国の研究機関(国立感染症研究所のような任務を持つ研究機関)との連携において行うことが最も効率的である。

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ウィルス(デング熱、チクングニア、インフルエンザ、狂犬病、風疹、麻疹の病原体を主に)③原虫(マラリアを中心に)に分け、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。研究班における研究内容は、1)国内の研究者による検査法の開発、分子疫学的指標の開発、データの解析法の開発等の研究、2)アジアの研究機関へ研究を委託し、各国で分離される病原体の収集、解析、データの保管等からなる。

- (1) 病原体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、アジア諸国の研究機関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

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、迅速にその起源を把握でき、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) アジア諸国との連携

アジア地区(中国 CDC、韓国 CDC/NIH、台湾 CDC、香港 PHLC、ベトナム NIHE、フィリピン RITM、タイ NIH、インド Niced、バングラデシュ ICDDR、マレーシア大学、ニュージーランド IESR、オーストラリア・メルボルン大学、米国 CDC)の研究機関との連携において、下痢原性細菌(コレラ菌、腸炎ビブリオ、腸チフス菌等)の genotyping の手法(PFGE, MLVA)の標準化に向けての検討および研修会(香港で2009年2月に開催)を行った。また、各国がそれらの手法を用いて自国で分離される下痢原性細菌の genotyping 解析を行い、その結果を海外からの報告書として加えた。

2) EHEC の分子疫学的識別法の開発：

a) PFGE と MLVA (multi locus variable tandem repeat analysis) の比較

2007年に分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 O157、2150株のうち、XbaI と BlnI による PFGE パターンが一致している株について MLVA (9 遺伝座について) で解析し比較検討を行った。その結果 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 遺伝座で 1 repeat だけ異なるものから、8 遺伝座で 1~8 repeat 数まで異なるものまでであった。MLVA の方がより細かい差異を識別可能であったが、疫学的関連性を論じる場合に、その微妙な差異をどのように解釈するかにおいてはさらなる解析事例

が必要であると考えられた。

b) 一遺伝子の SNP 解析

近年、96 loci における一塩基置換多型法：SNP (single nucleotide polymorphism) (参考文献：PNAS 105: 4868-4873, 2008) によって O157:H7 株が型別可能であることが示された。このうち、いくつかの遺伝系統グループ (clade1, 2, 3, 8) については一遺伝子の SNP 解析 (合計 4 遺伝子座の SNP 解析) によって簡便に型別が可能であることも明らかとなった (J.C.M 46: 2070-2073, 2008)。病原性の差異を識別するのに SNP (single nucleotide polymorphism) が利用できるかの検討を行った。国内の HUS 患者由来および無症状保菌者由来の O157:H7 株について解析を行った。2004 年から 2008 年までに国内で単離された HUS 患者由来株 (144 株) について SNP 解析を行ったところ、clade1 (1.4%), 2 (29.2%), 3 (27.1%) および 8 (17.3%) とこれら以外 (25%) に分離された。無症状保菌者から単離された EHEC O157:H7 株 (150 株) について 4 遺伝子座の SNP 解析を行ったところ、clade1 (3.3%), 2 (26.7%), 3 (16.7%) および 8 (3.3%) とこれら以外 (50%) に分離された。clade8 に属する国内株のうち、HUS 由来株の割合は、無症状保菌者由来株の割合と比較して有意に高く、対照的に、それ以外の clade 株は両由来株間で顕著な差は見られなかった。

3) 非定型コレラ菌の解析

生物型はエルトール型であるが、コ

レラ毒素遺伝子型が古典型であるコレラ菌 (非定型コレラ菌) が近年発見されている。コレラ毒素遺伝子の型を簡単に鑑別できる MAMA-PCR を開発し、それによりコレラ毒素遺伝子型別を行った。その結果、エルトール型コレラ菌は 1994 年以前まで検出されていたが、1993 年に初めて検出された非定型コレラ菌が、1995 年以降は全ての臨床分離株から検出されるようになった。1990 年代前半にエルトール型コレラ菌から非定型コレラ菌への流行株の遷移が起こったことが確認された。PFGE によるクラスター解析では、非定型コレラ菌は古典型コレラ菌とは異なるエルトール型コレラ菌を含むクラスターを形成した。さらに非定型コレラ菌はサブクラスターに分類され、非定型コレラ菌間での遺伝的多様性を示した。また、MLVA による解析でも、非定型コレラ菌は古典型コレラ菌とは異なるクラスターに属し、エルトール型コレラ菌の範疇に属していた。つまり非定型コレラ菌は、エルトール型コレラ菌から派生し、1990 年代半ばからは、アジアのコレラ流行地域における流行株になっていると考えられる。また、非定型コレラ菌間においては、いずれの分子疫学解析を用いてもサブタイプに分類され、遺伝的多様性を示した。これは単一のクローンがアジア各地域に広がったのではなく、複数のクローンが各地において発生したことを示唆している。

4) コレラ菌の識別法

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae*

の血清型 01 および 0139 の clonality(系統性)の異同の識別は難しいとされている。*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が存在することを明らかにし、そこに多数散在する *V. cholerae* repeat (VCR) を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法を開発した。それを用いて、*V. cholerae* 01 は 1990 年を境に系統的な違いあり、異なる 6 つのグループに分類することが可能であった。一方 0139 は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された 01 と酷似するパターンを示し、01 との系統的関連性を示唆する結果となった。本手法は、MLST や PFGE と比べ、簡便かつ迅速に結果が得られるため、病原性 *V. cholerae* の疫学解析に有用であることが示唆された。

5) 赤痢菌の解析

主として海外渡航者由来の *S. sonnei* 株約 300 株を対象に MLVA を実施した。

これらの菌株は PFGE では互いに類似しており、クラスター解析を行っても事例ごとに分けることができなかったが、MLVA で解析した場合には、事例内に多少のバリエーションはあるものの、事例ごとに分離することが可能であった。渡航者由来株について MLVA の結果と渡航先の傾向を調べたところ、大まかではあるが、渡航先ごとにクラスターが分けられることが明らかとなった。

ウイルス関係：

1) デングウイルス：

新たなデング熱に対する実験室診

断法として NS1 抗原検出 ELISA の評価を行った。その結果、PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA は、リアルタイム PCR 法に比較して十分な感度を有することを確認した。さらに一部の患者ではデングウイルス遺伝子およびデングウイルス特異的 IgM 抗体が共に検出されない時期の血中より NS1 抗原が検出された検体があった。従って、デング熱診断の一つとして NS1 抗原の検出は有用であった。

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・亜熱帯地域に広がっている。輸入感染症としてわが国に持ち込まれており、2008 年に感染研で実験室診断された陽性検体数は 67 例に達し、過去最多を記録した昨年 (52 例) を大きく上回った。渡航先別ではタイ、インド、インドネシアの順で多く、例年に比べインドでの感染者が多かった。陽性患者数は 9 月を中心に多数みられたことから、夏期休暇でデング熱流行地域に渡航する旅行者に対し注意を徹底する必要がある。

2) チクングニヤウイルス (CHIKV) 感染症

チクングニヤウイルス (CHIKV) 感染症はアフリカ、インド洋諸島、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行地域が拡大している。日本では 2007 年に初めてスリランカからの輸入症例が 2 例確認され、2008 年にインドから 1 例、2009 年にはマレーシア、インドネシアから各 1 例と、2009 年までに合計 5 例の輸入症例が確認さ

れていた。

3) フラビウイルス共通プライマーの開発

フラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる NS5 領域に PCR プライマーを設計し、蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、デングウイルス、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、さらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作製することに成功した。

4) 麻疹・風疹ウイルス

ラオス、ピエンチャン市の4つの小学校の児童の血中風疹抗体価、麻疹抗体価を測定することで、WHO が排除を目指す風疹、麻疹の流行状況、抗体保有状況を調査した。風疹に関しては43.6%が抗体陽性であり、麻疹では97.6%が陽性であった。これは本調査の直前に実施された麻疹ワクチン接種キャンペーンの効果であると考えられた。今回の結果から、ラオスでは風疹の流行が存在し、12歳までに約半数は自然感染していることが明らかになった。風疹は胎児に障害を残す先天性風疹症候群(CRS)の原因であり、妊娠可能年齢の女性に、事前に抗体を賦与しておくことが唯一のCRSの予防法である。風疹ワクチンの導入を図る必要があるが、かつてギリシャではワクチンの導入がかえってCRSを増

やした事実も報告されており、十分な流行状況、抗体保有状況の把握がさらに重要である。

5) 狂犬病：

アジアで流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的解析をフルゲノムで可能とするために必要となる増幅プライマーの設計とこのプライマーを利用して実験株(CVS-11株)と野外株(フィリピン由来株)のフルゲノムシーケンシングを行った。また、狂犬病ウイルスを迅速に検出するためのmpAbs-DRIT および RT-LAMP 法の開発を行っている。現在、委託研究を行っているフィリピンの熱帯医学研究所(RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所(NIHE)、中国の疾病制御センター(China CDC)の狂犬病研究部とともにゲノムデータを利用した診断用プライマーの設計、分子疫学データベース構築についてラボラトリーネットワークの強化を行っている。

6) インフルエンザ

ベトナム NIHE との協力として、鳥インフルエンザウイルスの検査にかかる RT-PCR、リアルタイム RT-PCR、遺伝子解析等の標準手順書の作成および正確な検査精度の維持・管理および検証方法を指導した。また、NIHE において適切な方法で精度の高い検査診断が行われているか、NIHE にて検証実験を行った。その結果、NIHE にて行われている検査診断は、WHO の推奨する方法と同等の検査精度を有しており、正確な検査診断が行われていると考えられた。国内研修では、海外よ

り招聘した2名を対象に、インフルエンザウイルスのサーベイランスについて、抗インフルエンザ薬に対する薬剤耐性株の調査方法、インフルエンザウイルスの性状解析、鳥インフルエンザウイルスの分離方法、高病原性鳥インフルエンザ H5N1 亜型ウイルスの診断方法等の講義および実技指導を行った。

原虫関係

1) マラリア診断

マラリアにおける脾腫の病態を血糖代謝の面から検討し、疫学的指標としての意義を確認するために、ソロモン諸島のマラリア浸淫地で小児を対象として、マラリア感染状況の調査と腹部超音波検査による脾臓の計測、及び血糖計測を同時に行った。熱帯熱マラリアの場合は、脾腫と血糖低下を示す例が多いが、三日熱マラリアの場合、脾腫や血糖の低下を示す例は少なく、非感染例との間で有意差は認められなかった。熱帯熱マラリアでは、脾臓における糖代謝が亢進し、結果として低血糖をきたしている可能性もある。

2) マラリア原虫の遺伝的多様性

アジア、太平洋諸国のみならず、アフリカ、南米にもまたがる熱帯熱マラリア原虫の集団遺伝学的解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高くなった。世界各地の熱帯熱マラリア原虫集団は、遺伝的多様性において一部共通点を有するが、

大きく異なっていることが示された。マラリアの獲得免疫やワクチン効果は、異なる原虫集団において必ずしも一様には現れないことが示唆された。

3) 三日熱マラリアのクロロキン耐性

三日熱マラリアのクロロキン耐性と関連している可能性がある遺伝子 *Pvmdr* は、実際の臨床でのクロロキン耐性マラリア事例の報告があった時期より以前に、存在していたことがわかった。*Pvmdr* 遺伝子の Y976F 変異は西大西洋諸国の三日熱マラリアの集団に耐性が出現する前から存在していた多型ではないかと推測される。アフリカのマダガスカル島の三日熱マラリアにも Y976F 変異を有する集団が存在し、さらに Y976F 変異の存在は CQ 耐性と相関が無いことが報告されている。西大西洋諸国の集団における Y976F 変異は CQ 耐性が出現する前から原虫に存在していた多型であり、CQ 耐性を付与する原因は他の変異部位に起因すると推測される。

4. 考察：

アジアの特定な地域で発生している感染症が、旅行者、食材（食品）、動物等を介してアジア地域全域に拡散し、それが我が国にも侵入する機会は増大してきている。そのような時期に、各国の感染症の制御に責任を持っている国立研究機関との連携を深め、情報の共有化を図るためのネットワーク化に向けた試みを行うことは時期を得た物である。特に、各地域、各国において発生している病原体の表

現型（生物型、薬剤耐性等）および遺伝型（塩基配列の差による型別）の解析結果の情報を収集し、そのデータベース化を図る基盤的研究成果は、新規病原体の発生、あるいは既存病原体の変異およびその伝播を迅速に検知する源になる。そのような目的を持って、今回は、アジアで問題となっている下痢症細菌（コレラ、赤痢、腸チフス等）、デング熱ウィルス、狂犬病ウィルス、マラリア等を主な対象病原体として、研究を進めることにした。

その結果、細菌においてはPFGE, MLVA等の分子疫学的解析手法の標準化に向けての検討がアジア諸国13カ国の協力の下に進むこととなった。12カ国の研究機関に委託研究費を分配し、その国における病原体の解析を共通の手法を用いて研究していた。その成果を報告書としてまとめることができた。デングウィルス関係は5カ国の研究機関、狂犬病ウィルスは3カ国、マラリアは4カ国の研究機関との共同研究が成立した（その国名、研究課題名は表1に示す）。これらの委託研究を通して、アジアの各研究機関との交流の足掛かりができてきている。わが国の研究者が現地へ赴き、共同研究の輪を広げるケース、及び相手国の研究者が我が国において研修を受けるケースが行われてきている。今後この輪が広がり、アジアの感染症を担う国立の研究機関およびその研究者との連携が深まることが期待される。

国内においては、分子疫学的手法の

改良及び新しい手法の開発研究を遂行した。国立感染症研究所が中心となり、そこに大学及び地方衛生研究所が連携を組む体制づくりを推し進めている。各病原体においてその連携が進められており、年度を重ねるごとに強化されると予想される。

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。

表1. H20年度 アジアネット 海外委託費一覧

細菌 (渡辺グループ)

国	Title of research	
1	China CDC	Molecular Analysis of Shigella flexneri 4C emerged in China. J-G. Xu
2	インド NICE	Genotyping of Vibrio cholerae 01, Vibrio parahaemolyticus and campylobacters. B. B. Nair
3	バングラデシュ ICDDR	Construction of laboratory network on the characterization of bacterial enteric pathogens prevalent in Asia and Pan-pacific area (Bangladesh). A Cravioto,
4	バングラデシュ ICDDR	Phenotypic and Molecular Characterization of Vibrio cholera Causing Epidemics, 1991, and Subsequent Endemic Cholera in Latin America M. Alam
5	韓国 NIH	Application of Multilocus variable tandem-repeat analysis for typing of Shigella spp. B. K. Lee
6	タイ NIH	Molecular epidemiology of non-ESBL and ESBL-producing Shigella sonnei strains in Thailand during year 2007-2008. O. A. Ratchtrachentrai
7	香港公衆衛生研究所	Organization of PFGE Working for Training and Technology transfer for Asia Pacific countries / areas in February 2009. K. Man Kam
8	マレーシア医学研究所	Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi: An Inter-country Collaborative Study (Malaysia, Thailand, Taiwan and Vietnam) Thong Kwai-Lin
9	ベトナム, NIH	Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (1): Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi A (Malaysia, Taiwan and Vietnam) P. D. Cam
10	ニュージーランド環境科学研究所	Validation of new Listeria PFGE protocol and analysis of recalcitrant isolates. B. J. Gilpin
11	CDC 台湾	Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (1): Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi A (Malaysia, Taiwan and Vietnam) C-S Chiou
12	A S E A N	Development of Laboratory Based Surveillance and Strengthening Regional Laboratory Networking among the ASEAN Plus Three Countries, under the ASEAN Plus Three Emerging infectious Diseases Programme. Dhannan Sunoto