

200829044A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

地球温暖化に伴い変化する感染症に 対する早期防御法確立に関する研究

(H20-新興-一般-015)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 倉 根 一 郎
(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

地球温暖化に伴い変化する感染症に 対する早期防御法確立に関する研究

(H20-新興-一般-015)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 倉根 一郎
(国立感染症研究所)

渡り鳥飛来地に生息するイナトミシオカの生態的研究：1. 幼虫の発育に対する温度の影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49

研究分担者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

ウエストナイルウイルス媒介チカイエカの幼虫期における高温の影響・・・・・・ 55

研究分担者：江下優樹（大分大学医学部感染予防医学講座）

イノシシと共に分布を拡大しつつあるマダニ類に関する研究・・・・・・・・・・ 63

研究分担者：滝澤剛則（富山県衛生研究所）

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

総括研究報告書

地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部 部長）

研究要旨：地球温暖化は人間の健康に大きな影響を継続的に及ぼすことが予想される。感染症に対する影響もその一部である。世界的には、特に蚊媒介性感染症や水系感染症への影響が大きく、発生地域の拡大や、流行規模・患者数増加がおこると考えられている。しかし、地球温暖化の影響は各国の社会基盤や対応策等によって大きく変わる。本研究においては、地球温暖化が感染症に及ぼす影響を早期に検出し、わが国における地球温暖化に伴う感染症の被害を防止するためのモニタリングのための基盤技術を確立することを目的とした。特に、地球温暖化が、ウイルス、細菌、寄生虫・原虫、真菌感染症に及ぼす影響をモニタリングするための技術基盤を確立することを中心に行った。本研究により、細菌、ウイルス、寄生虫・原虫、真菌感染症に関して、温暖化影響評価の技術確立が進展した。さらに、アジアにおける影響評価として、南アジアにおいて下痢症発生と降雨量との関連が明らかとなった。

研究分担者：

泉谷 秀昌（国立感染症研究所・細菌第一部 室長）

江下 優樹（大分大学医学部感染予防医学講座 准教授）

大前 比呂思（国立感染症研究所・寄生動物部 室長）

小林 睦生（国立感染症研究所・昆虫医学部 部長）

鈴木 隆二（国立病院機構相模原病院・臨床研究センター 室長）

高崎 智彦（国立感染症研究所・ウイルス

第一部 室長）

滝澤 剛則（富山県衛生研究所・ウイルス部 部長）

前田 秋彦（北海道大学大学院・獣医科学研究科 准教授）

宮崎 義継（国立感染症研究所・生活活性物質部 部長）

我妻ゆき子（筑波大学大学院・人間総合科学研究科 教授）

A. 研究目的

気候変動に関する政府間パネル（IPCC）

の第4次報告書においても、地球はすでに温暖化しており、また、温暖化の傾向が今後も進行することはほぼ明らかな事実として記載されている。近年、地球温暖化の健康への影響についても大いに危惧されているが、感染症への影響においてはいまだ明らかになっていない。影響は発展途上国において大きいと考えられているが、わが国もその影響から免れることはできない。

本研究においては、地球温暖化が感染症に及ぼす影響を早期に検出し、わが国における地球温暖化に伴う感染症の被害を防止するためのモニタリングのための基盤技術の確立とわが国のみならずアジアを含めたネットワークシステムの構築を確立することを目的とした。本年度は、

1) 地球温暖化を伴う気候変動が、ウイルス、細菌、寄生虫・原虫、真菌感染症に及ぼす影響をモニタリングするための技術基盤を確立する、
2) 地球温暖化が各種感染症に及ぼす影響をわが国及びアジア各国において予測するためのシステムを構築し、影響予測を行う、ことを目的とした。

B. 研究方法

これまで、地球温暖化が感染症におよぼす影響については海外において断片的な報告がなされているのみである。一方、わが国においては気候変動と感染症に関する研究はほとんどなされていない。また、多くの解析は必ずしも病原体の活動を反映する最適の指標を用いていない。本研究においては、ウイルス、細菌、寄生虫・原虫、真菌を含め全種類の病原体についての

解析を進めた。

研究は研究代表者（倉根）、研究分担者（高崎、泉谷、大前、宮崎、小林、江下、鈴木、前田、我妻、滝澤）の11人によって行われた。なお地球温暖化に関する詳細な気象データについては国立環境研究所より供給された。研究は1) 各種病原体及び地球温暖化影響をモニタリングするための技術基盤の確立、2) 確立技術が、わが国及びアジア各国において導入可能となるためのネットワークの確立、を中心に行った。具体的には、以下の具体的方法で研究を遂行した。

1. 各種病原体に及ぼす温暖化影響をモニタリングするための技術基盤の確立：

1) 各種病原体のモニタリング技術基盤：

- ① 節足動物媒介性ウイルス感染症モニタリングのための技術基盤の確立、
- ② 細菌感染症モニタリングのための技術基盤の確立、
- ③ 寄生虫・原虫感染症モニタリングのための技術基盤の確立、
- ④ 真菌感染症モニタリングのための技術基盤の確立、

2) ヒトにおける感染検出新技術の確立：

- ① 新たなウイルス学的感染検出法の確立、
- ② 新たな免疫学的感染検出法の確立、
- 3) 媒介ベクターと地球温暖化：
 - ① 媒介蚊分布に及ぼす気候変動影響の解明、
 - ② 媒介蚊におけるウイルス増殖に及ぼす外気温の影響、

2. 国内およびアジア各国における感染症温暖化影響ネットワークの確立：

1) アジアにおける感染症と気候変動：

① バングラデシュにおける細菌感染と気候変動

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行した。研究対象者に対して、研究の目的、個人の不利益、危険性に対して十分に説明し、倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサインあるいは捺印を得た上で遂行した。動物を用いる実験の倫理面においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なった。

C. 研究結果

1) 各種病原体のモニタリング技術基盤開発:

(1) 細菌感染症モニタリングのための技術基盤の確立:

地球温暖化によって影響を受ける気候変動の一つに海水温の上昇がある。海水温の上昇はそこに生息する生物の活発性、活動時期を変え、ひいては優勢生物種の変化、生態系の変化をもたらす。地球温暖化と細菌感染症の関係において、水との関連が深い食水系感染症を引き起こす細菌、特にビブリオ属菌(主に *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*; 以下それぞれ Vc, Vp, Vv) に着目し環境モニタリングを行うための基礎技術の開発を行った。Vc, Vp, Vv とも環境因子によって分布が変化することが示唆された。house keeping 遺伝子の一つ *atpA* の同定マーカーとしての有用性、ならびにビブリオ属菌

に対しての PMA 法の有効性が示された。

(2) 寄生虫・原虫感染症モニタリングのための技術基盤の確立:

寄生虫症に対する気候変化の影響は、媒介動物によってヒトに感染する寄生虫でより明らかとされているマラリアについては、感染蚊からのマラリア原虫検出法の改良に取り組み、日本住血吸虫媒介貝については、気候・環境変化と生息状況の関係について調査した。また、魚類媒介寄生虫症については、アニサキス症を例として、温暖化やそれに伴う海流変化による、海産魚類寄生虫種の変化について調査した。

ハマダラカからのマラリア原虫検出法改良については、ミトコンドリア・チトクローム *b* 遺伝子による PCR 法で、*An. dirus* 体内のマラリア原虫スポロゾイトの検出を試みた。新規 PCR 法による結果は、三日熱マラリア、熱帯熱マラリアとも、標準となる CS-ELISA による結果と 90% 程度一致した。日本住血吸虫を媒介する淡水性陸生貝 *Oncomelania* 属に関する研究は、熱帯のフィリピンで問題となる *O. h. quadrasi* を研究対象とした。*O. h. quadrasi* の生息には、温度よりも降水量の方が重要で、従来乾燥に弱いとされてきたが、場所によってはかなりの乾燥条件にも耐えることが判明した。アニサキス幼虫の調査では、台湾産タチウオには *Anisakis typica* が優占的に寄生していることが明らかとなった。

(3) 真菌感染症モニタリングのための技術基盤の確立、

ヒストプラズマ症はヒストプラズマ属菌による深在性真菌症の一つであり、わが国では輸入真菌症として取り扱われてい

る。地球温暖化に伴い、今後わが国でも発生頻度の上昇が懸念される真菌症、とくにヒストプラズマ症について、わが国での実態、疫学的調査ならびに迅速診断法の確立にむけた検討を行うこととした。その結果、開発された nested PCR 法は感度、特異度とも臨床応用可能なレベルであると判断された。実際に依頼のあった臨床検体について PCR 法による *H. capsulatum* の検出を試みた結果、生検組織のみでなく血清からも *H. capsulatum* 遺伝子が検出され、診断の一助となることが示された。

2) アジアにおける感染症と気候変動

(1) 地球温暖とバングラデシュにおける下痢症

バングラデシュにある国際下痢症研究センターと共同研究協定を締結し、下痢症発生データに関して共同研究利用承認を得た。気象データベースに関しては、バングラデッシュ気象局と京都大学防災研究所の協力を得て研究利用可能とした。異常気象現象、特に降雨や温度の変動に関して下痢症発生の時系列分析を行った。下痢症患者の発生数の 20 年間値からの変異には 2 つのピークがあり、はじめのピークは 4 月から 5 月にかけてで、2 つ目のものは 8 月から 10 月にかけてであった。はじめのピークは 1 ヶ月のラグをもって気温上昇変動と相関し、2 つ目のピークについては、ラグをもち、同期間、特に雨季の後期に降った降雨量と関連していた。コレラに関する分析では、多雨と少雨の両方である閾値をもって発生が増加した。水位に関しては特定のパターンを示さなかった。

3) ヒトにおける感染検出新技術の確立

(1) デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価:

デングウイルスは急性熱性疾患であるデング熱を引き起こすウイルスであり、蚊によってヒトからヒトへ感染が拡大する。新たなデング熱に対する実験室診断法としてオーストラリア製の NS1 抗原検出 ELISA (Dengue Early ELISA[®]) の評価を行った。デング熱患者 113 名の検体中 70 名 (62%) で、血中より NS1 抗原が検出された。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 抗原が検出されたものもあった。しかし、デングウイルス 4 型感染患者においては本 NS1 抗原検出キットの感度が低いことが確認された。

(2) ダニ媒介脳炎ウイルスの遺伝子診断法確立:

ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) はわが国においても北海道に分布していることが知られているが、未だ簡便にウイルス遺伝子を検出・定量することが可能な real-time PCR 法が確立されていない。TBEV Oshima 株に対するプライマーを設計し、迅速なウイルス遺伝子検出および定量法の確立を試みた。TBEV 感染マウスの脳サンプルから、E 領域および NS1 領域をターゲットとした 2 種類のプライマーを用いることによって、TBEV 遺伝子の特異的に検出することが可能であった。

(3) ウイルス様粒子を用いたフラビウイルス用抗体検出法の確立:

フラビウイルス感染症の血清学的な鑑別は困難であるとされている。各種フラビ

ウイルス感染症の鑑別法の確立を目指し、ウイルス様粒子 (VLP) を用いた中和試験法による感染鑑別について検討した。フラビウイルスに属する日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスの VLP (各々、JEV-VLP と WNV-VLP) を作製した。各 VLP を用いた中和試験法と生ウイルスを用いた常法により得た結果について比較検討したところ、強い正の相関が認められた。また、JEV-VLP を用いた試験では JEV の感染血清中に存在する JEV に対する中和抗体が、WNV-VLP を用いた試験では WNV 感染血清中に存在する WNV に対する中和抗体が特異的に検出された。

4) 媒介ベクターと地球温暖化

(1) 渡り鳥飛来地に生息するイナトミシオカの生態学的研究

イナトミシオカ幼虫を 6 つの異なる温度で飼育し、有効積算温度則に基づく分析を行った。その結果イナトミシオカの幼虫・蛹期の発育零点は、雌で 8.75℃、雄で 9.51℃、発育を完了するのに要する温度は、雌が 270 日度、雄が 208 日度と推定された。幼虫期の生存率と温度の関係および気温と成虫の吸血活動の関係から、日最高気温が 18℃以上の日を活動可能日とし、近年東日本で生息が確認された地域について、活動可能期間および年間世代数を推定した。検討した地域の中で最北に位置する釧路では、年間の活動期間は 76 日、世代数の推定値は 1.75 世代であった。生息地の緯度が低くなるにしたがって、活動可能期間は長く推定年間世代数は多くなり、青森 142 日、3.88 世代、新潟 183 日、6.33 世代、東京では 208 日、7.64 世代と推定

された。

(2) チカイエカの幼虫期における高温の影響

ウエストナイルウイルス感受性のチカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal に対する季節的に変動する気温の影響を把握するために、屋外に設置された浄化槽内のチカイエカ幼虫の季節的消長を調べた。浄化槽内の水温は、外気温と同様に季節的に変化した。水温が約 20℃になる 5 月下旬から 6 月にかけて、幼虫は最も多くなった。その後、7 月には減少を始め、30℃になる 8 月と 9 月には幼虫はほとんど採集されなかった。10 月には水温が 20℃に下がり、幼虫は再び増えた。夏季の高温下では、1 齢幼虫がほとんど採集されなかった。また採集された卵塊の卵は胚子に発育していたがふ化できなかった。これらのことから、夏季の気温上昇による高温はチカイエカ幼虫個体群の激減の重要な要因である可能性が高いと結論された。

(3) イノシシと共に分布を拡大しつつあるマダニ類に関する研究

2008 年に富山県内で捕獲されたイノシシの外部寄生虫を調査したところ、富山県では初の記録となるタカサゴチマダニと、野外において未確認であったタカサゴキラマダニを含む 5 種のマダニ類が採集された。タカサゴチマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、富山県が本種の分布北限となる。タカサゴキラマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、富山県では本種による 1 例の人体刺咬症例が報告されていたが、これまで野外での採集例はなかった。

D. 考察

地球温暖化は人間の健康に大きな影響を継続的に及ぼすことが予想される。感染症に対する影響もその一つと考えられる。世界的には、特に蚊媒介性感染症や水を介した感染症（水系感染症）への影響が大きく、発生地域の拡大や、流行規模・患者数増加がおこると考えられている。しかし、地球温暖化の影響は各国の社会基盤や対応策等によって大きく変わる。発展途上国においては、十分な適応策をとることができず大きな影響が出現する可能性がある。一方、社会基盤が整備され、十分な適応策をとりうる日本などの先進国においては、ある程度の気候変動・温暖化までは、影響を小さく抑えられることが可能であると考えられる。しかし、温暖化が進行すれば、先進国における影響も明らかな形として現れる可能性がある。温暖化による感染症への影響を最小限にとどめるためには、気候変動・温暖化自体に対する緩和策とともに、影響に対する適応策を十分にとることが重要である。

現在考えられている地球温暖化と感染症のシナリオはまだ断片的な知識に基づき、構築されたものであるといえる。また、気候変動の影響は温暖化のみではなく、降水量や大規模災害とも深く関連してくることから、解析をいっそう複雑にすることから、解析をいっそう複雑にする。断片的ながらも、気候変動・温暖化により感染症の状況が変化する、あるいは気候変動・温暖化が感染症のパターンが変化する素地となっているというデータは、世界各地で得られている。しかし、どのような感染症の患者がどの程度増加するか、どの感

染症の分布地域がどの程度増加するか、についての理解はまだ定まったものではない。わが国においては、地球温暖化による患者数の増加はまだ見られていないが、影響が患者数の増加として現れる時点においては影響がすでに深刻なものとなっている可能性がある。従って、各種の感染症について、何をモニタリングすれば感染症への影響を早期に把握することが可能であるか研究を進める必要がある。さらに、影響は国内においても一定ではなく、各地域によって異なることが予想されることから、今後も影響評価も地域ごとの解析が必要となる。今後も細菌、ウイルス、寄生虫・原虫、真菌の各感染症に関して、感染症の温暖化影響を早期に把握するための方法論の開発を行い、合わせて国内外における温暖化影響の把握を行うことが重要である。

E. 結論

本研究においては、地球温暖化が感染症に及ぼす影響を早期に検出し、わが国における地球温暖化に伴う感染症の被害を防止するためのモニタリングのための基盤技術を確立することを目的とした。特に、地球温暖化が、ウイルス、細菌、寄生虫・原虫、真菌感染症に及ぼす影響をモニタリングするための技術基盤を確立することを中心に行った。本研究により、細菌、ウイルス、寄生虫・原虫、真菌感染症に関して、温暖化影響評価の技術確立が進展した。また、南アジアのバングラデシュにおいて下痢症発生と降雨量との関連が明らかとなった。

F. 健康危機管理情報

2008 年は、我が国へのデング熱輸入症例が、1999 年の感染症法施行後初めて 100 例を超えた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S.

Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(5):1868-70. 2008

Ohno H, Matsuo N, Suyama N, Nagayoshi Y, Kohara N, Kazumi Y, Miyazaki Y, Kohno S. The first surgical treatment case of pulmonary *Mycobacterium malmoense* infection in Japan. *Inter Med* 47: 2187-2190, 2008.

Hashizume M, Armstrong B, Hajat S, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Sack DA. The effect of rainfall on the incidence of cholera in Bangladesh. *Epidemiology.* 2008 Jan;19(1):103-10.

Hashizume M, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Hunter PR, Armstrong B, Sack DA. Factors determining vulnerability to diarrhoea during and after severe

floods in Bangladesh. *J Water Health.* 2008 Sep;6(3):323-32.

Kitaura K., Kanayama K., Fujii Y., Shiobara N., Tanaka K., Kurane I., Suzuki S., Itoh T., Suzuki R.: T Cell Receptor Repertoire in BALB/c Mice Varies According to Tissue Type, Sex, Age and Hydrocortisone Treatment. *Experimental Animals* (in press)

Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A. A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods* 148 : 244-252, 2008

Maeda, A., Maeda, J., Murata, R., Akiyama, M., Kariwa, H., Takashima, I., and Kurane, I., Differential sero-diagnosis of flaviviruses using sub-viral particles and virus-like particles *Animal Viruses*. Eds. Maeda. et al., *In press*, 2009

Ma, H., Ke, C.-W., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., and Maeda, A. Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China, 2005-2007. *Animal Viruses*. Eds. Maeda. et al., *In press*, 2009

Jose D. J. Diaz Aquino, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2008): Molecular epidemiology of

dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.* (2008)

Yamauchi, T, Obara, M., Watanabe, M., Ando, S., Ishikura, M., Shinagawa, Y., Hasegawa, S., Nakamura, K., Iwai, M., Kurata, T. & Takizawa, T. (2009) Survey of tick fauna possessing the ability to act as vectors of rickettsiosis in Toyama Prefecture, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 60(1): in press.

Izumiyama S, Omura M, Takasaki T, Ohmae H, Asahi H. *Plasmodium falciparum*: development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer. *Exp Parasitol* 121(2):144-150, 2009.

Ishikawa H, Ohmae H. Modeling the dynamics and control of transmission of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. *Korean Journal of Parasitology* 2009 (in press)

大前比呂思, 石川洋文. 気候変動と寄生虫症 資源環境対策 44(9):29-38, 2008.

牧野芳大、江下優樹 (2008) : 地球温暖化の影響による亜熱帯地域の感染症拡大に関する疫学研究. 国立大学法人 大分大学

環境報告書 2008 (2007 年度) 、41pp、2008 年 9 月大分大学発行、2007 : 25-26。

2. 学会等発表

1) 国際学会

Wagatsuma Y, Terao T, Hayashi T, Faruque ASG., Sack DA. Influence of Local and Global Climatic Changes on Diarrhea Diseases in Bangladesh. US-Japan Viral Disease Panel Satellite Symposium, Nagasaki, Japan, 26 May 2008.

Maeda, A., Maeda, J., Ma, H., Ke, C.-W., Takagi, H., Takashima, I., Kurane, I., Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China, 42nd Joint Viral Diseases Panels Meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Nagasaki (2008, 5)

Yuki Eshita, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Hiroshi Aono, Yoshihiro Makino, Tomohiko Takasaki and Hiroshi Ushijima (2008) : Dengue infection' s dynamics of vector mosquitoes in the patient' s houses, Thailand. Ordinary session on Vector-virus interaction. The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008, "Global Innovation for Combating Dengue Infection" . October 15-17, 2008., Phuket, Thailand. Abstract of The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008: 147.

Yuki Eshita (2008): Arbovirus infection's dynamics of vector mosquitoes in experimental and natural conditions. Parasite Vector Genomics Symposium II in Sapporo, Oct. 21-22, 2008

Ohmae H, Olveda R, Socheat D, Sudomo M, Chigusa Y, Matsuda H. Recent situation and next steps of schistosomiasis control programs in Southeast Asia. International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep - 3 Oct, 2008.

Ishikawa H, Hisakane N, Ohmae H, Kirinoki M, Chigusa Y, Pangilinan Redulla A, Sinuon M, Socheat D, Matsuda H. Modeling the dynamics and control of transmissions of *Schistosoma japonicum* and *S. mekongi* in Southeast Asia. International Conference of Tropical Medicine and Malaria, Cheju, Korea, 30 Sep - 3 Oct, 2008.

2) 国内学会

宮崎義継. 日米ガイドラインからみた重症感染症戦略-真菌症-. 第48回日本呼吸器学会学術講演会(神戸)

宮崎義継. 多様な深在性真菌感染症の現況. 衛生微生物技術協議会 第29回研究会(東京)

山越 智、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継. SST-REX法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表面および分泌蛋白質の網羅的同定. 第8回糸状菌分子生物学コンファレンス、金沢、2008.

山越 智、橋本ゆき、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継. シグナルシーケンストラップ法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表面および分泌蛋白質の網羅的同定. 第52回日本医真菌学会総会、長崎、2008.

金子幸弘、大野秀明、今村圭文、河野 茂、宮崎義継. *Candida albicans* の biofilm に対するミカファンジンとポリコナゾール、アンフォテリシンBとの併用効果. 第52回日本医真菌学会総会、長崎、2008.

大川原明子、山越 智、橋本ゆき、大野秀明、新見昌一、宮崎義継. *C. albicans* 細胞壁表面層のマンナン構造の違いによる初期免疫応答の解析. 第52回日本医真菌学会総会、長崎、2008.

藤井克樹、早坂大輔、小池智、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎: フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析 第56回日本ウイルス学会学術集会(岡山) 2008年10月26-28日

北浦一孝、藤井克樹、林 昌宏、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎: ウエストナイルウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤T細胞の解析 第56回日本ウイルス学会学術集会(岡山) 2008年10月

26-28 日

早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (岡山) 2008 年 10 月 26-28 日

藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：フラビウイルス脳炎における脳内浸潤 T 細胞の TCR レパトア解析 第 15 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (岡山) 2007 年 10 月 25 日

前田秋彦、前田潤子、村田亮、荻和宏明、高島郁夫、倉根一郎、ウイルス様粒子を用いたウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルス感染症との鑑別中和試験法の開発、トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、岡山 (2008、10)

前田秋彦、前田潤子、倉根一郎、ウエストナイルウイルス RNA 複製の解析-マイナス鎖 small RNA を中心に、第 56 回日本ウイルス学会、岡山 (2008、10)

片野理恵、斉藤康秀、津田良夫、2008. 渡り鳥飛来地に生息する日本産ウエストナイルウイルス (WNV) 媒介蚊の生態的特徴：イナトミシオカ (*Culex inatomi*) の場合。第 14 回日本野生動物医学学会大会、神戸大学、2008 年 9 月 3 日～7 日。

山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、鹿志毛信広、見明史雄、Narumon

Komalamisra, Raweevan Srisawat, Yupha Rongsriyam, 水谷 哲也 (2008) : 蚊媒介性ウイルス検出を目的とした RDV 法の改良。第 60 回日本衛生動物学会大会。2008 年 4 月 17-19 日、群馬県、自治医科大学、Med. Entomol. Zool., 59 (Suppl.): 61, 2008。

江下優樹、牧野芳大、湯 偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島 茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎 (2007) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (12) アカイエカ体内における日本脳炎ウイルスの増殖。第 60 回日本衛生動物学会大会。2008 年 4 月 17-19 日、群馬県、自治医科大学、Med. Entomol. Zool., 59 (Suppl.): 61, 2008。

湯 偉峰、吉用省三、吉田知佳子、江下優樹、青野裕士、牧野芳大 (2008) : 大分地域における日本脳炎ウイルスの活動。第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008 年 5 月 30 日 (金) ~31 日 (土)、日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集 : 16、2008。

江下優樹、牧野芳大、湯 偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島 茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎 (2008) : アカイエカにおける日本脳炎ウイルスの増殖について。第 43 回日本脳炎ウイルス生態研究会、香川県、観音寺市、2008 年 5 月 30 日 (金) ~31 日 (土)、第 43 回日本脳炎ウイルス生態研究会 プログラム・抄録集 : 34、2008。

村田 亮、好井健太郎、荻和宏明、江下優樹、高島郁夫 (2008) : ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加がウイルス増

殖に与える影響。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金)～31日(土)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集：48、2008。

村田 亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太郎、苅和宏明、梅村孝司、高島郁夫(2008)：ウエストナイルウイルスのE蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日)～28日(火)。日本ウイルス学会学術集会・抄録集：ID05、2008。

佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、中島学、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也：Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良法によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日)、27日(月)、28日(火)。日本ウイルス学会学術集会・抄録集：2P048、2008。

山尾卓也、江下優樹、佐藤朝光、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也(2008)：Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウ

イルスの検出。第61回日本寄生虫学会・第58回日本衛生動物学会南日本支部合同大会、2008年11月1日(土)・2日(日)、沖縄産業支援センター、沖縄県那覇市

佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也(2008)：Rapid determination of RNA viral sequence法の改良と本法によるネッタイシマカ幼虫からブニヤウイルスの検出。第25回日本薬学会九州支部大会、宮崎県延岡市、2008年12月6-7日、九州保健福祉大学、講演要旨集：1B-20。

山内健生・小原真弓・渡辺 護・安藤秀二・品川保弘・滝澤剛則・堀元栄詞・長谷川澄代・中村一哉・倉田 毅(2008年9月16日)「富山県のマダニ相と紅斑熱リケッチア」日本昆虫学会第68回大会 香川大学(高松市)

渡辺 護・小原真弓・山内健生(2008年11月3日)「1民家における蚊の捕集成績(2003～08年)」第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 神戸大学医学部(神戸市)

山内健生・小原真弓・渡辺 護・上田泰史・滝澤剛則(2008年11月3日)「富山県の住家性ネズミ類に寄生するノミ類」第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 神戸大学医学部(神戸市)

大前比呂思、千種雄一、松田肇、桐木雅

史, 朝日博子, Sinuon M, Socheat D. 東南アジアにおける住血吸虫症の拡がりと気候変化について。第 68 回日本寄生虫学会・東日本支部大会 浜松, 2008. 10. 4.

梅原 梓里, 杉山広, 森嶋康之, 山崎 浩,
太前比呂思, 荒木潤, 川上泰, 黄鴻堅,
内
田明彦, 台湾でタチウオから検出された
アニサキス幼虫の分子同定 第 78 回
日本寄生虫
学会大会 東京, 2009. 3. 28-29.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

研究課題名：地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法の確立に関する研究：
地球温暖化と細菌感染症

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 八尋俊輔 熊本県保健環境科学研究所 微生物部

研究要旨 地球温暖化に伴い細菌感染症のリスクも影響を受ける。温暖化に付随する現象の一つである海水温の上昇は、食水系細菌感染症のリスク変化をもたらすことが予想される。本研究では上記細菌感染症に関連したコレラ菌、腸炎ビブリオ、ビブリオ パルニフィカスを含むビブリオ属菌の環境分布調査に関して有効な手法等の開発・検討を主眼とする。

A. 研究目的

地球温暖化によって影響を受ける気候変動の一つに海水温の上昇がある。海水温の上昇はそこに生息する生物の活発性、活動時期を変え、ひいては優勢生物種の変化、生態系の変化をもたらす。こうした変化は当然のことながら水中に生息する細菌にも生じうるもので、そうした細菌の中にヒトに感染するものが存在すればヒトへの感染リスクもまた変動する。本研究では地球温暖化と細菌感染症の関係において、水との関連が深い食水系感染症を引き起こす細菌、特にビブリオ属菌（主に *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*；以下それぞれ Vc、Vp、Vv）に着目し環境モニタリングを行うための基礎技術の開発を目的とする。

B. 研究方法

【ビブリオ属菌と環境因子】

2008年4月から12月までの間（Vcは9月～12月）毎月1～2回、地点A、地点Bおよび地点Cにおいて、ほぼ満潮時に岸壁から海水を採取した（図1）。採取した海水10mLを倍濃度アルカリペプトン水（APW）10mLの3本に、1mLをAPW10mL3本に接種し、以下 10^4 までPBSで10倍段階希釈し、各1mLをAPW10mLに接種後、 $35\pm 1^\circ\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養した。また、定性試験として、海水500mLをAPWで培養した。その後、混濁がみられた培養液から1白金耳を選択培地（クロモアガービブリオ寒天培地）に塗抹し、 $35\pm 1^\circ\text{C}$ で 18 ± 2 時間培養した。寒天培地上のVc、Vp、Vvと疑われるコロニーを純培養し、各種生化学性状試験（オキシダーゼ、1%NaCl加TSI、1%NaCl加LIM、1%NaCl加VP、0、3、8、10%塩分濃度発育試験）で同定し、かつそれぞれの同定を目的としたPCRで陽性バンドが確認さ

れたものを Vc、Vp、Vv とした。最終的に陽性が確認されたそれぞれの陽性本数を最確数表に当てはめて MPN 値を算出した。分離した菌株は各検体より 2 株ずつ保存し、分離した Vp、Vc については病原因子 *tdh*、*trh*、*ct* の遺伝子の有無を TaKaRa Primer Set (VPD-1 & 2、VPR-1 & 2、VCT-1 & 2) を用い PCR で確認した。

【新規同定用遺伝子の検討】

選択培地上に生育したコロニーから DNA を調製し、16S rRNA、*atpA*、*recA* 遺伝子を PCR で増幅し、塩基配列を決定、そのデータベースを構築した。16S rRNA はユニバーサルなプライマーを、*atpA* および *recA* は既知の配列からビブリオ属菌に特異的と推定されるプライマーを使用した。*atpA* に関しては得られたデータベースからさらに Vc、Vp、Vv に特異的と推定されるプライマーを設計し、代表株の DNA に対し、その特異性を検討した。

【PMA による死菌 PCR の抑制】

環境中の微生物遺伝子を調査するに当たり障害となる死菌の影響を低減させるため、propidium monoazide (PMA) の効果をコレラ菌で検討した。65 度 15 分加熱処理を施した死菌と生菌を回収後、PBS に懸濁し、20mM PMA を終濃度 50 μ M になるように添加した。5 分間暗所で静置後、3-5 分間光照射を行った(参考文献: Appl. Env. Microbiol. 73, 5111-7, 2007)。菌を PBS で洗浄後、DNA を調製し PCR の鋳型として使用した。標的としては 16S rRNA を選択し、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR で産物を検出した。

C. 研究結果

【ビブリオ属菌と環境因子】

結果を表 1 に示す。Vv、Vp はどの地点とも夏場に高い菌数を示し、比較的塩分濃度の低い地点 A、地点 C では地点 B に比べ高い菌数を示した。どの地点も 7 月に Vp、Vv とも最高値となり、水温の低下と共に菌量は低下した。一方、Vc は地点 C では 7 回中 5 回分離されたにも関わらず、地点 A、地点 B では 1 度しか分離されなかった。また、地点 A、地点 B で Vc が分離されたときの塩分濃度は不検出の場合に比べ低かった(地点 A: 9‰、地点 B: 27‰)。それぞれが検出された最低水温は Vv が 12.5℃、Vc は 18℃、Vp は 12℃であった。

また、気温(℃)、水温(℃)、透視度(cm)、塩分濃度(‰)、Vv 菌数、Vp 菌数、Vc 菌数の各相関係数を表 2 に示す(Vc のみ n=21、その他は n=45)。海水中における Vv は、気温、水温、塩分濃度と高い相関が見られ、Vp は気温、水温に高い相関が見られたが、Vc は気温、水温との相関は高くなく、塩分濃度に高い相関を示した。

今回分離された Vp、Vc に病原因子を保有する株は無かった。

【新規同定用遺伝子の検討】

選択培地上に発育したコロニーを釣菌し、約 80 株から DNA を調製し、16S rRNA、*atpA*、*recA* の配列決定を試みた。結果として 81 株、80 株、49 株についてそれぞれの遺伝子配列を決定した。これと既報の遺伝子配列を併せて比較しデータベースを作成した。図 2 には各配列に基づいた最小全域木を示す。16S rRNA は、Vc に関しては比較的独立したグループを作ったが、Vv および Vp については他