

2009/02/19

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 21 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 22(2010)年 3 月

# 目 次

## 1. 平成 21 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 21 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 .....	17
--	----

研究分担者	寺嶋 淳	国立感染症研究所
研究協力者	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.....	24	
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.....	28
------------------------	----

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

メコン川流域諸国とのラボラトリーネットワークの構築の試みー腸管外病原性大腸菌 およびコレラ菌の分子疫学解析.....	34
---	----

研究分担者	大西 真	国立感染症研究所
研究協力者	泉谷 秀昌	〃

Dr. Sithivong Noikaseumsy

(National Center for Laboratory and Epidemiology, Lao PDR)

Dr. Kiratisin, Pattarachai

(Faculty of Medicine Shiriraj Hospital, Mahidol University, Thailand)

ビブリオの分子疫学マーカーの開発、データベース化 . . . . . 43

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 //  
山本 章治 //  
黒田 誠 //  
関塚 剛史 //

アジア地域におけるラボネットワークの構築に関する研究 . . . . . 48

研究分担者 三戸部 治郎 国立感染症研究所  
研究協力者 寺嶋 淳 //  
志牟田 健 //  
小泉 信夫 //

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* El Tor O1, O139 株の Integron Island を標的とした  
PCR-RFLP 解析 . . . . . 54

研究分担者 大澤 朗 神戸大学

The serotype-converting phages of *Shigella flexneri* . . . . . 63

**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 2010 . . . . . 68

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

Identification the new combinations of beta-lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors of *Shigella*  
isolates from 2007-2009 in Vietnam . . . . . 80

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

Development of PFGE protocol for *Yersinia enterocolitica* . . . . . 89

**Dr. Brent Gilpin**

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

Application of Multilocus variable-number tandem repeat analysis for typing of *Shigella* spp. . . . . 93

**Dr. Mi-Sun Park (Korea National Institute of Health, Korea.)**

Phenotypic and genotypic characterization of different virotypes of *Escherichia coli* present in diarrheal patients and non-diarrheal controls . . . . . 108

**Dr. Talukder KA, Dr. Azmi IJ, Dr. Aslam M, Dr. Salam MA,  
Dr. Howlader AM, Dr. Akter M, Dr. Amin MB,  
Dr. Haque R, Dr. Endtz HP and Dr. Cravioto A  
(ICDDR.B, Bangladesh)**

Clonal recycling, dual peaks and off-season cholera outbreaks in Dhaka . . . . . 131

**Dr. Munirul Alam, (ICDDR.B, Bangladesh)**

Genotyping of *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahaemolyticus* and *Campylobacter* spp.  
. . . . . 154

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

Virulence factors and antimicrobial susceptibility of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children . . . . . 175

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

Development and evaluation of multilocus variable-number tandem repeat analysis for fine typing and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium . . . . . 188

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

プロジェクト2：ウイルス (デング熱)

マレーシアにおけるチクングニヤ熱疑い患者の血清学的解析・・・ 219

研究分担者	倉根 一郎	国立感染症研究所
研究協力者	高崎 智彦	〃
	林 昌宏	〃

日本脳炎実験室診断ネットワークの構築と IgM キット評価・・・ 225

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

国立感染症研究所における2009年輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況・・・ 229

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

タイにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析・・・ 234

研究分担者	林 昌宏	国立感染症研究所
研究協力者	倉根 一郎	〃
	高崎 智彦	〃

日本脳炎ワクチンによるウエストナイルウイルスに対する交差中和抗体反応性の解析・・・ 241

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

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, 2009



..... 245

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

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, 2009  
..... 257

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

Investigation of arbovirus in Jiangxi province, China, 2009 ..... 268

**Dr. Guo-Don Liang**

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

研究成果の刊行 ウイルス (デング熱) ..... 275

**プロジェクト3：ウイルス (高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ)**

東アジア諸国との連携による季節性および新型インフルエンザ流行株の性状に関する研究 ..... 277

研究分担者	田代 真人	国立感染症研究所
研究分担者	小田切孝人	〃
研究協力者	影山 努	〃
	岸田 典子	〃
	徐 紅	〃
	高下恵美	〃
	小淵 正次	〃
	氏家 誠	〃
	中内 美名	〃

**プロジェクト4：ウイルス (風疹と CRS)**

ラオスにおける風疹の状況ならびに風疹ウイルスゲノム検出用 LAMP 法の確立 . . . . . 283

研究分担者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所
研究協力者	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
	阿保 均	〃

ラオス National Center of Laboratory and Epidemiology との麻疹風疹における実験室的ネットワーク構築実現に向けた取り組み . . . . . 288

研究分担者	山本久美	国立感染症研究所
研究協力者	駒瀬勝啓	〃

ベトナムにおける風疹の実験室的ネットワーク構築のための調査ならびに ベトナムで最近見られた先天性風疹症候群の 1 例 . . . . . 295

研究分担者	牛島廣治	藍野大学 藍野健康科学センター
研究協力者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所
	<b>Tran Dinph Nguyen</b>	ホーチミン第 2 小児病院
	早川有子	群馬パース大学看護学部

**プロジェクト5：ウイルス (狂犬病ウイルス)**

狂犬病ウイルスの分子疫学等に関する研究 . . . . . 301

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所
	山田章雄	〃
	朴 天鎬	北里大学
研究協力者	野口 章	国立感染症研究所
	佐藤 豪	〃
	黒田 誠	〃
	杉浦尚子	〃
	宇田晶彦	〃
	<b>Bordbaatar Bazartseren</b>	〃
	<b>Nguyen Thi Kieu Anh</b>	

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

**Beatriz Quiambao**

Research Institute for Tropical Medicine

**Qing Tang**

China CDC

狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立 . . . . . 340

研究分担者	朴 天鎬	北里大学
研究協力者	小嶋 大享	”
	石田 誠	”
	井上 智	国立感染症研究所
	野口 章	”
	佐藤 豪	”
	杉浦 尚子	”
	井上謙一	京都大学霊長類研究所
	高田昌彦	”

Construction of laboratory net work on the molecular epidemiology and the development and standardization of Rabies diagnostic methods . . . . . 347

**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 . . . . . 355

**Dr. Nguyen Thi Kieu Anh**

**(National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)**

Enhancement of rabies surveillance by strengthening rabies research in the Philippines . . . . . 399

**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	.....	415
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	〃
	田邊 和裕	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
マラリア疫学における熱帯熱マラリア原虫尿中抗体価の意義		
	.....	420
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
	伊藤 誠	愛知医科大学・寄生虫学
	<b>Berand Bakotee</b>	
	<b>Solomon Islands Medical Training and Research Institute</b>	
輸入マラリア薄層標本による薬剤耐性遺伝子の遺伝的多型： ピリメサミン耐性遺伝子の歴史		
	.....	426
研究分担者	中野由美子	国立感染症研究所
我が国におけるマラリア媒介蚊の分布・分類の再検討と医学上重要な疾病媒介蚊の分子分類システムの構築		
	.....	430
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		
	.....	437
研究分担者	田邊 和裕	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		
	.....	443
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 antimalarial drugs resistance in <i>Plasmodium falciparum</i> in China .....	449
<b>Tang Linhua,</b>	<b>National Institute of Parasitic Diseases, China CDC</b>
Construction of international network of research and control on vivax malaria in Asia and Pacific .....	456
<b>Guan Yayi,</b>	<b>National Institute of Parasitic Diseases, China CDC</b>
The strengthening & integrating of malaria control activities in newly developed area in Kampot Province, Southern Cambodia .....	466
<b>Duong Socheat, Chea Nguon,</b>	<b>National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control (CNM) (Cambodia)</b>
Screening of transmission blocking efficacy of antibodies produced against <i>Plasmodium vivax</i> and <i>P. falciparum</i> vaccine candidates. ....	477
<b>Jetsumon Prachumsri,</b>	<b>AFRIMS / Burapha University (Thailand)</b>
Evaluation of malaria diagnostic in north Sumatera Province, Indonesia .....	489
<b>Lambok Shiahaan,</b>	<b>North Sumatera University (Indonesia)</b>
3. 平成21年度業績	
研究成果の刊行に関する一覧表（業績）.....	499
学会発表一覧表（業績）.....	511

## 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

### 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

研究代表者：渡邊治雄（国感染症研究所）

概要：病原体検査法の標準化および共通のマニュアルの作成、病原体の分子疫学的解析の共同研究、病原体情報の効率的交換の促進を図る目的で、細菌、ウイルス、寄生虫の分担担当者ごとにアジアの感染症に責任を担う国立の研究機関との連携、および共同研究を進めた。その結果以下の成果を得た。(1)細菌チーム；アジア（韓国、中国、台湾、ベトナム、マレーシア、フィリピン、タイ、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）および米国 CDC 等の国立の感染症研究機関との連携を図り、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。アジア地域で現在流行しているコレラ菌は、古典型コレラ毒素を産生するエルトル型コレラ菌のハイブリッド型にシフトしてきており、それが臨床症状の悪化に関与している可能性が示唆された。(2)ウイルスチーム；分離されたチクングニヤウイルスの系統学的解析の結果現在アフリカおよびアジア地域で流行域を拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型に分類されることが示唆された。中国 CDC、韓国 CDC と日本脳炎 IgM 抗体検査法の統一化に関する会議をおこなった。(3)狂犬病：狂犬病の簡易・迅速抗原検出を可能とする dRIT 法をフィリピンと簡易・迅速遺伝子検出を可能とする RT-LAMP 法と Real-time PCR 法をベトナム NIHE 研究所と開発し、野外で使用した。アジアの狂犬病国際会議と ASEAN Plus Three 会議において意見及び情報交換を行って、アジアで必要とされるラボラトリーネットワーク構築に必要な研究課題について議論した。(4)インフルエンザ：2008年にミャンマー、ラオスで発生した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ分離株はクレード 2.3.4 に分類され、中国や東南アジア周辺国では、このグループが主流になっていることが示唆された。ブタインフルエンザウイルス由来の新型 A/H1N1 ウイルスの PCR 高感度診断系を開発し、そのマニュアルをアジア周辺諸国へ提供した。(5)麻疹・風疹：ラオス NCL との共同でビエンチャン市の小学校の児童の風疹抗体価、麻疹抗体価を測定し、約 45%が風疹抗体陽性であり、95%以上が麻疹抗体陽性であることを明らかにした。(6)原虫チーム：アジア・アフリカのマラリア浸淫地から得られ熱帯熱マラリア原虫集団の遺伝的多様性とその分布の定量的解析を行った結果、各地域において遺伝的多様性は大きく異なり、マラリア獲得免疫やワクチン効果は

一様には現れないことが示唆された。1982年から1998年までのクロロキンとピリメサミン耐性遺伝子の遺伝子型をアフリカからの輸入熱帯熱マラリアのサンプルから特定した結果、アフリカ独自の耐性株が1980年代に出現し、1990年代よりアジアの耐性株がアフリカに流入したと推定された。

分担研究者		Institute for
寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部	Tropical Medicine;RITM,
伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部	Philippines)
泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Bok Kwon Lee. (Korea National Institute of Health;NIH, Korea)
大西 真	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Brent Gilpin. (Institute of Environmental Science & Research Limited;IESR, New Zealand)
森田昌知	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Phung Dac CAM. (National Institute of Hygiene and Epidemiology;NIHE, Vietnam)
三戸部治郎	国立感染症研究所 細菌第一部	Dr. Chien-Shun Chiou. (Center for Disease Control;CDC, TAIWAN)
大澤 朗 協力研究員	神戸大学 農学部	Dr. Kai-Man Kam. (Public Health Laboratory Centre;PHLC, Hong Kong)
Dr. Jian-Guo Xu. (Chinese Center for Disease Control and Prevention;CDC, China)		Dr. G. Balakrish NAIR. (ICDDR. B, Bangladesh)
Dr. Orn-Anong RATCHTRACHENCHAI. (National Institute of Health;NIH, Thailand)		Dr. Diane Lightfoot. (University of Melbourne, Australia)
Dr. Kwai-Lin THONG. (University of Malaya, Malaysia)		Dr. Bala Swaminathan. (FDDDB/DBMD/NCID/CDC,
Dr. T. RAMAMURTHY. (National Institute of Cholera and Enteric Diseases ; NICED, INDIA)		
Dr. Celia C. Carlos. (Research		

	U. S. A)	プロジェクト4	
Dr. D. W. N. Chee. (Minister of State for Health, Singapore)		駒瀬 勝啓	国立感染症研究所ウ イルス第三部
プロジェクト2		山本 久美	国立感染症研究所感 染症情報センター
分担研究者		牛島 廣治	鹿藍野大学医療保健 部
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	プロジェクト5	
田島 茂	国立感染症研究所 ウイルス第一部	山田 章雄	国立感染症研究所 獣医科学部
林 昌弘	国立感染症研究所 ウイルス第一部	井上 智	国立感染症研究所 獣医科学部
高橋 和郎	大阪府立公衆衛生研 究所	朴 天鎬	北里大学 獣医学部
協力研究員		協力研究員	
Dr. T. Mirawati Sudiro. (University of Indonesia, Indonesia)		Dr. Q. Tang (China CDC, China)	
Dr. Surapee Anantapreecha (National Institute of Health, Thailand)		Dr. Nguyen Kieu Anh. (National Institute of Hygiene and Epidemiology;NIHE, Vietnam)	
Dr. Emily s. Bomasang. (Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)		Dr. Beatriz P. Quiambao (Research Institute for Tropical Medicine, Philippines)	
Dr. Wen-Yi Shih. (Taiwan Center for Disease Control, Taiwan)		プロジェクト6	
Dr. Guo-Dong Liang (China CDC, China)		大前比呂思	国立感染症研究所 寄生動物部
プロジェクト3		中野由美子	国立感染症研究所 寄生動物部
田代 真人	国立感染症研究所ウ イルス第三部	津田良夫	国立感染症研究 所昆虫科学部、
小田切 孝人	国立感染症研究所ウ イルス第三部	田辺和術	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. J. Prachumsri (Burapha University, Thailand)
- Dr. C. Nguon (National Centre for Parasitology, Entomology and Malaria Control, Cambodia)
- Dr. L. Shiahahan (North Sumatera University, Indonesia)
- Dr. T. Linhua (China CDC, China)
- Dr. G. Yayi (China CDC, China)
- Dr. I. Mueller (Papua New Guinea institute of Medical Research)

#### A. 研究目的：

病原性鳥インフルエンザ、狂犬病等の多くの病気がアジアを中心に発生している。それらの発生状況を常時に把握し、わが国への侵入あるいは拡散を防止する事前対応が必要である。問題となる病原体の正確な情報、および特徴を日常的に把握し監視していくためにアジア地域（主に ASEAN 諸国を対象）の感染症を専門とする国立の研究機関（国立感染症研究所と同じような機能を持つ機関を対象にする）との

ネットワークを構築し、感染症情報および病原体情報の交換、およびそのデータベース化を行う。①腸チフス、コレラ等の細菌性下痢症、②高病原性鳥インフルエンザ、デング熱、狂犬病等のウィルス性疾患、③マラリア等の原虫性疾患を対象に研究プロジェクトを組織し、病原体検査法の標準化および共通のマニュアルの作成、病原体の分子疫学的解析の共同研究、病原体情報の効率的交換の促進を図る。H20-21 年度においては、ビブリオを用いて、アジア・環太平洋諸国 14 カ国の国立の研究機関との共同研究により、ゲノムの多様性を解析する PFGE 法の標準化、その制度管理を行った。また、アジアで分離される、細菌では腸チフス菌、赤痢菌の PFGE 法の標準化、ring-trial、ウィルスにおいてはデング熱の E 遺伝子を用いた塩基配列の系統樹解析、狂犬病ウィルスのゲノム解析とデータベース化、原虫においてはマラリアの LAMP 法による迅速診断法の有用性の検討と、クロロキン耐性遺伝子情報のデータベース化を進めてきた。今年度は、ASEAN 諸国からラボラトリーネットワークの構築における拠点として感染研が期待されているので、より一層 Asia-Pacific の感染症の研究・対策を目指す国立の研究機関との連携を行い、病原体情報交換の質を高める。病原体を各国からの入手は国際的に非常に難しい状況になってきている。原則的には各国で分離される病原体の解析は各国に委託し、標準化された方

法で解析してもらい、わが国では輸入感染症として分離される病原体を解析しそれらの比較分析を行い、データベース化を進める。

## B. 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（デング熱、チクングニア、インフルエンザ、狂犬病、風疹、麻疹と主に）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

## C. 研究結果：

細菌関係；

### 1) アジア諸国との連携：

パルスネット・アジアパシフィック合同会議の開催を2009年12月、タイバンコックで行った。その報告を記する。

- ・参加各国（国立感染症研究所、中国 CDC、韓国 NIH、香港 PHLC、フィリピン RITM、台湾 CDC、タイ NIH、マレーシア Malaya 大学、ベトナム NIHE、インド NICED、バングラデシュ ICDDR, B、オーストラリアメルボルン大学、ニュージーランド IESR、米国 CDC：15 研究機関）
- ・PFGE 解析法の標準化、精度管理に関する研究報告を行った
- ・PFGE 解析の研修コース；香港 (Public Health Laboratory Center, PHLC) で PFGE 解析に関する研修を2010年2月に行った。
- ・PFGE 解析ソフト (BioNumerics, Applied Maths 社) 使用による解析及びデータベース構築に関する研修を行った
- ・パルスネットアジアパシフィックの WebBoard 設置を行った
- ・新規解析法の開発、評価。MLVA, EHEC 0157 の virulent clone の国際比較を行うことにした
- ・EHEC の分子疫学的識別法の開発を各



国との共同で行うことにした

## 2) 腸管出血性大腸菌の解析

### a) 我が国の EHEC の解析

2008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広域で分離された EHEC 0157 について、PFGE 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を行った。XbaI 消化による PFGE パターンが一致し広域から分離されている EHEC 0157 には、1) 散发事例由来株が主である広域分離株でも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、2) 長期間に広域から分離されている株では遺伝学的特性が異なる変異株があることが示唆された。

### b) EHEC の clade の分布解析

EHEC の分離株の遺伝型と臨床症状の重症度との間に相関があるとの報告がある。特に、clade 8 の株が重症度の高い患者から分離されるとの報告がある。米国で 2006 年に単離された、HUS 患者が多くみられたほうれん草アウトブレイク由来株は clade 8 に属する。1999 年から 2008 年までの我が国の分離株について解析すると、HUS 患者分離株で有意に clade 8 が多く存在した。2009 年の分離株においても解析すると、HUS 患者から単離された 36 株の 0157:H7 のうち、19.4%にあたる 7 株が clade 8 であったが、40 株の無症状保菌者由来株には clade 8 は存在しなかった。病原性に関与する LEE 遺伝子群の発現レベルの解析を行うと、clade 8 の株は、他の clade と

比較して有意に高いことが示唆された。

## 3) コレラ菌の解析

### a) ラオスで発生したコレラ集団発生に関する分子疫学解析

2007 年 12 月ラオス南部、ベトナム国境にある Xekong 県において、コレラの集団発生が認められた。360 名を超える重篤な下痢を伴う患者が発生し、3 名が亡くなった。ラオスにおいては、2000 年の集団発生以来のものであった。ラオス NCLE で分離同定された菌株を PFGE 法にて菌株間の比較解析を行った。Xekong 県で分離された 15 株は、環境から分離された 2 株を含めて、完全に同一であった。

### b) アジア地域流行している変異エルトール型コレラ菌の解析

現在、アジア地域におけるコレラは全て変異エルトール型コレラ菌によるものになってきた。変異エルトール型コレラ菌にのみ存在する遺伝子断片を同定するため、変異エルトール型コレラ菌 V070005 株のゲノムシーケンスを行い、エルトール型コレラ菌 N16961 株のゲノム配列と比較した。N16961 株と比較して約 28kb の特異的配列が挿入されていた。日本国内で分離された輸入事例に由来する変異エルトール型コレラ菌 8 株 (渡航先別ではインド 2 株、フィリピン 1 株、タイ 3 株、インドネシア 2 株) を用い、特異的配列内の遺伝子を標的としたプライマー 3 組を用いた PCR の結果、インド及びフィリピン由来の 3 株については当該遺伝子の増幅は見られなか

ったが、タイ及びインドネシア由来の5株については全てのプライマーで遺伝子増幅が見られた。全ての変異エルトール型コレラ菌がその配列を持つのではなく、地域差があるようである。

#### 4) 赤痢菌の解析

分子疫学的手法としてパルスフィールドゲル電気泳動 PFGE 以外に、複数の遺伝子座に対する VNTR (variable-number tandem repeat) を検出する MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis) が開発された。昨年度は *S. sonnei* に関して 8 遺伝子座による MLVA 法の有用性を示したが、今年度は *S. sonnei* で使用している 8 遺伝子座を含め、25 遺伝子座を選択し、*S. flexneri* の MLVA の有用性を検討した。25 遺伝子座を使用した解析では、クラスターはより細分化され、疫学的に関連性のある株、あるいは関連性が疑われる株のみが同じか、近縁のクラスターに分類され、有用であった。

#### ウイルス関係：

##### 1) デングウイルス関係：

a. 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。2009 年に感染研で実験室診断された陽性検体数は 42 例に達した。年代別では 20 代および 30 代が多かった。渡航先別ではインド、インドネシア、ベトナムの順で

あった。特に 10 月にはインドからの帰国者が 9 例と多くみられた。また本年は全検査数中の 13% がチクングニヤウイルスにも陽性であった

##### b. マレーシアのチクングニヤウイルス (CHIKV) 感染症

マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清 80 検体を検査した結果、17 検体においてはチクングニアウイルス IgM 抗体が検出された。急性期のチクングニアウイルス感染が示唆された。このうち 15 血清では同時に中和抗体も検出された。マレーシアはチクングニア熱とともにデング熱の流行地域であるため、デングウイルスに対する IgM 抗体、中和抗体も検討した。13 人はデング熱と判定される。

##### c. タイのチクングニヤウイルス (CHIKV) 感染症

タイの CHIKV 熱疑い急性期患者血清 11 例のうち 8 例から CHIKV が検出された。患者血清中の CHIKV RNA コピー数は  $1.6 \times 10^4$  —  $9.1 \times 10^7$  RNA copies/ml であった。遺伝子後の系統樹作成した結果、タイで流行している株はインド・マレーシアで流行している株と関連性があることが示唆された。

##### d. 日本脳炎 (JEV)

JEV ワクチン接種者では、日本脳炎に対する中和抗体価が 40 倍よりも低い場合は WNV (ウェストナイルウイルス) に対する中和抗体は認められなかったが、日本脳炎患者では 40 倍でも 3/8 に交差中和抗体が認められた。また、JEV に対する中和抗体価が 320 倍以上あるワクチン接種者では 32% に

WNV 交差中和抗体が認められた。JEV と WNV の間には交差抗体が存在する。

感染研は日本脳炎実験室診断に関して各地域レファレンスセンターを指導する立場である Global Specialized Laboratory (GSL) に WHO から指定された。

## 2) ラオスの麻疹・風疹ウイルス

ラオスの NCLE では、麻疹サーベイランスの一環として、2007 年から風疹の IgM 検査を実施している。2007 年には 1 件のみが風疹と診断されたが、2008 年は 4 つの県から 45 件、2009 年 8 月までに 7 県から 42 件が報告されていた。Clade A, B のウイルスともに 1-10 pfu/test の感度で検出できる LAMP 法が確立できた。この LAMP 法を用いて、最近のベトナムの風疹検体も検出が可能であった。

ラオスにおける麻疹風疹の公衆衛生上の重要性、その対策をめぐるラオスの現状を知るとともに、ラオス NCLE との麻疹風疹をめぐる Laboratory network 構築の可能性を探り、今後の活動計画を立てる目的で、現地を訪問の上、担当者と直接議論した。今後、本検討を実施するため現実的な費用・予算確保を含めて、具体的な技術支援の方法を明確にし、さらに NCLE 側と詳細を検討する必要があると考えられた。

## 3) 狂犬病：

### a. アジアの国々とのネットワークの構築

本研究は CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と狂犬病ウイルスのラ

ボラトリーネットワークを構築してその連携を強化することが目的である。狂犬病の国際会議等に参加して RITM、NIHE、China CDC の共同研究者と共に他のアジア各国の狂犬病専門家と連携強化に必要な調査・研究法に関する意見交換と共同研究の打ち合わせを行いながら、(1) 狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報の収集と分析、(2) ラボラトリーネットワークの構築に必要な実験室内診断系の開発・共有、(3) 新しい診断方法の開発に関する研究を行った。

平成 21 年 (2009) 4 月 29 日-30 : RITM-TOHOKU research collaboration workshop、working towards rabies control in the Philippines に参加した。

平成 21 年 (2009) 9 月 7 日-11 日 : ASEAN Plus Three Workshop on Strengthening National Rabies Programmes and The Second Rabies in Asia Conference に参加した。

平成 22 年 (2010) 3 月 12 日-21 日 : ベトナムの狂犬病流行地域 (HaGiang 省) におけるヒトと動物の発生実態調査と地域の診断ラボの現状調査を行う。

### b. ラボラトリーネットワークを活用した実験室内診断系の開発・共有

狂犬病の分子疫学ネットワーク構築の基盤となるゲノム情報の収集と分析：共同研究機関である RITM の狂犬病グループと RITM に研究拠点を置く東北大学の新興・再興感染症共同研究

センターの連携協力によってフィリピンで流行している狂犬病のG遺伝子について分子疫学データベース（試験的）をRITMで構築した。アジア諸国のCDC相当機関によるラボラトリーネットワークができればアジア地域における国境を越えた狂犬病の侵入・流行拡大について情報共有が可能となり公衆衛生領域での狂犬病対策に大変有益であると考えられた。

c. ラボラトリーネットワーク構築に必要な実験室内診断系の開発・共有 RITMとの共同研究により狂犬病ウイルスに対するRT-LAMP法を確立した。検査用抗体を簡便作成する目的で組換え蛋白を作成しないで発現プラスミドを直接免疫（プラスミド免疫）して得たmonospecific-polyclonal (ms)抗体を使用するdRIT法を開発した。

d. 狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立

ウサギとニワトリ卵黄で作製した抗狂犬病ウイルス蛋白抗体の特性等についてホルマリン固定材料を用いて比較検討した。その結果、最も染色感度が高いのはウサギおよびニワトリ卵黄由来の抗P蛋白抗体であり、ニワトリ卵黄由来のP抗体では非特異反応が殆どみられないことが明らかになった。

#### 4) インフルエンザ

韓国、中国、台湾、ミャンマー、ラオス、モンゴルおよびシンガポールなど東アジア諸国のインフルエンザセンターとの連携により、当該地域での

季節性インフルエンザ流行株を入手し、抗原性、遺伝子性状の解析、およびノイラミニダーゼ阻害剤（オセルタミビルおよびザナミビル）感受性試験を実施し、流行株および薬剤耐性株の性状と流行状況を調べた。これらの成績をウイルス提供国とタイムリーに情報共有し、それぞれの国のインフルエンザ対策に貢献した。

2009年5月から世界的な大流行を起こしたブタ由来の新型A/H1N1インフルエンザ流行株（A/H1N1pdm）の実態調査を行った。その結果、A/H1N1pdmウイルス流行以降は、本ウイルスが流行株の99%を占め、抗原性、遺伝子性状ともにワクチン株A/California/7/2009と極めて類似していることが明らかになった。また、新型ウイルスの殆どはオセルタミビルおよびザナミビルに感受性であり、耐性株はオセルタミビルの予防投与または治療投与からまれに散見される程度であった。これらの情報は、WHOグローバルインフルエンザサーベイランス参加国とも共有され、世界の新型インフルエンザ対策に貢献できた

#### 原虫関係

アジア・太平洋地域におけるマラリア制圧に向けた動きを加速し、日本の防疫にも役立つような研究ネットワークを形成し、その中で病原体遺伝子情報の共有、検査法の開発・評価や標準化をはかることが目的とし、本年度は大きく以下のような3つのグループに分かれて研究をすすめた。2011

年1月には、関連する11カ国から14の研究機関の参加を得て、中国寄生虫症研究所、中国CDCと国立感染症研究所が共催する第2回アジア・太平洋地域三日熱マラリア国際会議を上海で開き、情報や研究成果の共有をさらに進めた。

### 1) マラリアの新しい疫学的指標や Rapid assessment 手法の開発と評価

1990年代初めにはマラリア感染率が人口の30~40%と同じだったソロモン諸島の2地域で、住民の尿中の熱帯熱マラリア原虫IgG抗体価の違いを比較した。1990年代にマラリア対策が進んだ地域A(ホニアラ市)では、B(ガダルカナル島北東岸、タシンボコ地域村落群)に比して、特に20歳以下の若年者で陽性率が低く抗体価も低い例が多くなった。

また、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原スクリーニング法(アルファスクリーン法)により得られた、熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質374種類について、タイのコモンタ村から得られた無症候マラリア感染者19人の免疫血清によりスクリーニングを試行した。その結果、感染者の血清と反応する抗原タンパク質は161種存在することが明らかとなった。

### 2) マラリア原虫などの主要病原体の媒介蚊の検査法の改良

日本国内のマラリア媒介蚊の分布状況を現地調査によって調べ、得られた蚊サンプルの遺伝子分析によって分類の再検討を行った。これまで報告

されている12種のハマダラカのうち6種類の分布が確認されたが、過去の分布と比較して、北海道におけるシナハマダラカの分布が異なることが示された。また、釧路湿原で採集され、形態分類ではシナハマダラカと同定されたハマダラカと、本州で採集されたシナハマダラカのrDNAのITS2領域の塩基配列を比較したところ、大きく異なることがわかった。

### 3) マラリア原虫遺伝子の地域別の集団的な把握

熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)集団の多様性とその分布の定量的解析を行った。その結果、各地域集団内の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と強い負の相関を示した。一方、地域におけるマラリア伝播度の差異や過去のマラリア対策は熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性に大きな影響を与えていなかった。また、地域の原虫集団の共通祖先の年代推定は現生人類集団の東アフリカ起源と約6万年前の出アフリカ移動と大まかに一致した。

さらに、薬剤耐性遺伝子に関する研究では、ピリメサミン(Pyr)耐性遺伝子に着目して、東南アジア起源の耐性株が他の地域に及ぼした影響を解析した。その結果、東南アジア由来と考えられる耐性株は1990年代に入ってアフリカで広まっていることが明らかになった。

### アジアの研究機関との共同研究