

201028013B

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 20～22 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)

研究代表者 渡 辺 治 雄

国立感染症研究所

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

1. 平成 20-22 年度 総括研究報告書

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 渡辺 治雄 国立感染症研究所

1

2. 平成 20-22 年度 総合分担研究報告書

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

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 ”

17

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 -----

研究分担者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

23

病原性大腸菌の侵入監視に関する研究 -----

研究分担者 伊豫田 淳 国立感染症研究所

30

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-----

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)

39

ビブリオの分子疫学マーカーの開発、データベース化 ----- 48

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	"
	荒川 英二	"
	高井 信子	"
	大西 真	"
	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 ----- 56

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	"

Vibrio cholerae の新規 DNA フィンガープリンティング法の開発 ----- 65

研究分担者	大澤 朗	神戸大学
-------	------	------

プロジェクト2：ウイルス (デング熱)

血清学的検査法によるアジアのチクングニヤ熱疑い患者血清の解析 ----- 79

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	"
	モイ・メンリン	"

日本脳炎実験室診断ネットワークの構築と IgM 抗体検査用パネル血清の評価 ----- 82

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	"

国立感染症研究所における輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況 (2008-2010) ----- 84

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	"
	小滝 徹	"

グローバルな視点から見たベトナムにおける風疹の血清および分子疫学調査と風疹迅速診断法の開発 ----- 139

研究分担者	牛島 廣治	藍野大学 藍野健康科学センター
	駒瀬 勝啓	国立感染症研究所
研究協力者	Tran Dinh Nguyen	東京大学 医学系研究科
	Nguyen Minh Phuong	パスツール研究所ホーチミン市
	Ha Manh Tuan	ホーチミン市第二小児病院
	周 玉梅	ジョージア州立大学
	野村 裕子	イムノプローブ社

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 ----- 153

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
	関塚 剛史	”
	加来 義浩	”
	飛梅 実	”
	佐藤 豪	”
	阿戸 学	”
	黒田 誠	”
	杉浦 尚子	”
	宇田 晶彦	”
	奥谷 晶子	”
	Bordbaatar Bazartseren	”
	Nguyen Thi Kieu Anh	
	The National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi (NIHE)	
	Beatriz Quiambao, Daria Manal, Catalino Demetria	
	Research Institute for Tropical Medicine (RITM)	
	Qing Tang	China CDC
	Myung Guk Han	Korea CDC

狂犬病ウイルスに関する研究(狂犬病の免疫組織診断系の検証と確立) ----- 171

研究分担者	朴 天鎭	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	"

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 ----- 175

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

マラリア免疫診断法の開発と評価 ----- 195

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
	石川 洋文	岡山大学・環境学研究科
	Beranrd Bakotee	
	Solomon Islands Medical Training and Research Institute	

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：

東南アジアからアフリカへの薬剤耐性の移入 ----- 203

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 ----- 207

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
	今西 望	明治大学農学部

マラリア原虫の遺伝的多様性とその分布 ----- 214

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 ----- 222

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

3. 平成 20-22 年度業績

研究成果の刊行に関する一覧表（業績） ----- 235

学会発表一覧表（業績） ----- 268

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（20～22 年） 総括研究報告書

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（国立感染症研究所）

概要：感染症は一国の問題ではない。SARS の事件が実証したように、ヒトあるいは物を介して瞬く間に世界中に拡散し、時には莫大なる被害をもたらす。それを未然に阻止する対策が求められている。いつ発生するかまたはどのような状況で伝播するかわからない感染症に対しては、常時監視体制の確立が最も効果的な阻止法である。そのためには国を越えての協力体制の構築が求められている。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国立感染症研究所の連携を深め、感染症の患者及びその原因病原体の遺伝子型等の情報の共有化を図ることは重要である。政府も「東アジア構想」を掲げて、アジア諸国との連携の強化、感染症制御に向けての協力体制の促進を掲げている。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）、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス等、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、マラリア等を主な対象病原体として、その病原体の表現型（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）の解析結果の情報収集を図る基盤の作製を各国の研究機関との連携を図ることにより行った。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として活かされる。

分担研究者		三戸部治郎	国立感染症研究所
寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部		細菌第一部
		大澤 朗	神戸大学 農学部
伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部	協力研究員	
		Dr. Jian-Guo Xu.	(Chinese Center for Disease Control and Prevention; CDC, China)
泉谷 秀昌	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		
		Dr. Orn-Anong	RATCHTRACHENCHAI. (National Institute of Health; NIH,
森田昌知	国立感染症研究所 細菌第一部		

- | | | | |
|------------------------|---|---------------------------|--|
| | Thailand) | | Melbourne, |
| Dr. Kwai-Lin THONG. | (University of
Malaya, Malaysia) | | Australia) |
| Dr. T. RAMAMURTHY. | (National
Institute of Cholera
and Enteric
Diseases ; NICED,
INDIA) | Dr. Bala Swaminathan. | (FDDDB/DBMD/NCID/CDC,
U. S. A) |
| Dr. Celia C. Carlos. | (Research
Institute for
Tropical
Medicine;RITM,
Philippines) | Dr. D. W. N. Chee. | (Minister of State
for Health, Singapore) |
| Dr. Bok Kwon Lee. | (Korea National
Institute of
Health;NIH, Korea) | プロジェクト2 | |
| Dr. Brent Gilpin. | (Institute of
Environmental
Science & Research
Limited;IESR, New
Zealand) | 分担研究者 | |
| Dr. Phung Dac CAM. | (National
Institute of Hygiene
and
Epidemiology;NIHE,
Vietnam) | 倉根 一郎 | 国立感染症研究所
ウイルス第一部 |
| Dr. Chien-Shun Chiou. | (Center for
Disease Control;CDC,
TAIWAN) | 高崎 智彦 | 国立感染症研究所
ウイルス第一部 |
| Dr. Kai-Man Kam. | (Public Health
Laboratory
Centre;PHLC, Hong
Kong) | 田島 茂 | 国立感染症研究所
ウイルス第一部 |
| Dr. G. Balakrish NAIR. | (ICDDR. B,
Bangladesh) | 林 昌弘 | 国立感染症研究所
ウイルス第一部 |
| Dr. Diane Lightfoot. | (University of | 高橋 和郎 | 大阪府立公衆衛生研
究所 |
| | | 協力研究員 | |
| | | 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) |
| | | Dr. Guo-Dong Liang | (China CDC,
China) |
| | | 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

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
協力研究員

Dr. Q. Tang (China CDC, China)

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

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

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、

田辺和祐 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. Shiahaan (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:

デング熱、コレラ、高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、狂犬病等のウイルス性疾患、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を行うとともに、病原体情報の効率的交換の促進を図る。

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。

a. 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。

- b. 各国で分離される病原体の遺伝型等のデータの作成を行う。
- c. 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) 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、森田、大澤、大西）

a. アジア各国との連携：

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（各国に研究委託金を渡し、各国の分離株の解析を依頼した。詳細は各分担研究者の報告書を参照）。PFGEの方法論の精度管理に関しては、毎年香港衛生研究所が担当し、希望国の研究者を相手に研修会と実習を行い、精度の維持を行っ

ている。加盟国のうち少なくとも8カ国ぐらいが毎年参加しており、同じ“物差し”で解析を行えるようになってきている。また、加盟国との研究報告会を3年間に2回(H21年はタイ NIH, H22年は香港衛生研究所)開催した。お互いの研究成果の報告とネットワークの問題点に関して討議された。ネットワークを維持していくための資金的問題が討議されたが、現在は当該厚生科学研究費によりほとんどが支援されており、それに対して各国から感謝が示された。今後継続する場合の資金的支援が大きな課題として指摘された。

b. アジアで流行している新しい遺伝型のコレラ菌

現在のアジア地域におけるコレラ流行株は、生物学的性状は El Tor であるが classical 型コレラ毒素遺伝子をもつ *V. cholerae* 01 El Tor variant であった。また、それらの菌株間には遺伝的多様性が存在していた。*V. cholerae* 01 El Tor variant V070005 株に特有な SNPs を同定した。それらの中で 15ヶ所を標的とすることで、*V. cholerae* 01 El Tor variant の判別が可能であり、より有用性の高い新規型別方法として期待される。*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示唆された。そこで、本領域に多数散在する「Vibrio cholerae」repeat (VCR) に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法、VCR-PCR を開発した。

VCR-PCR によって *V. cholerae* 01 株群は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる7つのグループに分類することが可能であった。一方 0139 株群は、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。他方、コレラ毒素産生性 *V. cholerae* の 01 El Tor 株および 0139 株のゲノム DNA 上に存在する約 120kb の Integron Island 領域の多型性をより詳細に解析するため、この領域を 11 に分割した細分領域について PCR-resitricition fragment length polymorphism (RFLP) 法を用いて解析した。その結果、1983 年以前と 1994 年以後に分離された株間で RFLP パターン違いが見られる2つの領域、IV 領域と VI 領域が認められた、VI 領域においてさらに詳細な解析を行った結果、1994 年以降に分離された株は総て約 20 kb の DNA を「欠失」していることが明らかとなった。これらの結果から 1994 年以降に増加してきたコレラ菌 (*V. cholerae* 01 El Tor variant) は以前の株とゲノムレベルで異なるクローンであると考えられた。

c. 赤痢菌の解析

本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系腸管感染症を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。細菌性赤痢は輸入例に

よるところが多いが、渡航歴のない国内事例も頻繁に報告される。近年、新たな疫学解析の手法として注目されている Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis (MLVA) に関して赤痢菌の疫学解析への有用性を検討し、さらには他国とのラボ間での validation を行った。

赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system は温度によってその発現が厳密に制御され、その調節はレギュレーター分子 InvE の発現の転写後調節によって制御されることを明らかにした。汎赤痢菌群に効果が認められる赤痢ワクチンの候補株として、赤痢菌の病原性発現に関わる RNA 結合蛋白遺伝子 *hfq* の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。*hfq* 欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型の違いに関わらず一定のワクチン効果が認められた。

d. 腸管出血性大腸菌の解析

我が国の散発事例由来株の解析から、1) 遺伝学的特性が極めて類似した株が検出されており、これらの散発事例由来株が “Unrecognized outbreak” を形成している可能性があること、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り、これらの株では複数の感染源・汚染源が存在する可能性があることが示唆された。

国内で分離される高病原性株 (HUS 患者由来株) の中には、米国で見出さ

れている高病原性株と同一の遺伝系統株 (クレード 8 株) が 1999 年の国内株に存在することが明らかとなった。1999 年から 2010 年までに分離された株の解析から、クレード 8 株の HUS 患者由来株における割合は、ほぼ同数の無症状保菌者由来株における割合よりも有意に高いことが明らかとなった。クレード 8 株では他のクレード株と比較して、Stx2 と LEE の活性が上昇している可能性が示唆された。クレード 8 を特異的に検出可能な MAMA-PCR 系を確立し、地方衛生研究所の協力を得て、その再現性について確認した。

ウイルス関係：

(1) デング熱等 (研究分担者；倉根、高崎、田島、林、高橋)：

a. デング熱

2008～2010 年に感染研で実験室診断された陽性検体数は 236 例であり、2005～2007 年の 125 例の約 2 倍に達した。特に 2010 年は 124 例で例年の 2～3 倍に増加した。渡航先別ではインドネシア、インド、タイ、フィリピンが目立っており、流行国での状況を反映していると考えられる。また近年、インドをはじめとする南アジアからの帰国者が増加している。この 3 年間でアフリカ (コートジボアール、タンザニアおよびベナン) での感染例も 4 例確認された。

b. 日本脳炎

日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA 法のためのパネル血清・髄液 (血清 253 サンプル、

髄液 153 サンプル) をそれぞれ評価した。選定した第一次パネル (血清・髄液) および第 2 次パネルを選定した。これらのパネルにより評価したところ、デングウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別法として、血清希釈法による抗体価希釈法は非常に優れていることが確認された。

c. チクングニアウイルス (CHIKV) 感染症

確立したチクングニア熱血清学的検査法が流行地域の患者血清に使用可能であることを、マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清を用いて検討した。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ことから、デングウイルスに対する IgM 抗体、中和抗体も検討した。80 人のチクングニア熱疑い患者中、血清学的に 14 人はチクングニア熱患者と確定された。一方 13 人はデング熱と判定された。また、3 血清は両ウイルスに対する IgM 抗体を有し、確定が困難であった。これまでに確立した中和法、IgM 捕捉 ELISA 法によりチクングニア熱の確定診断が可能であることが示された。また、東南アジアにおいてはチクングニアウイルス、デングウイルスに対する検査を同時に行うことが重要であることが示された。

(2) ラオスの麻疹・風疹ウイルス (研究分担者; 駒瀬、牛島等) :

ラオスの国立研究機関である National Center for laboratory and Epidemiology (NCLE)、WHO Lao Office

と協力して ラオスの首都、ビエンチャン市における小学生 (6 才~12 才)、妊娠可能年齢女子 (15-35 才) の血中風疹抗体保有状況を調査し、風疹の流行状況、抗体保有状況を調査し、将来、風疹ワクチンの導入を検討する際の情報を示す事にある。2007 年に 411 名の小学生、2010 年には 784 名の妊娠可能年齢女子より血液を集め、風疹抗体価を測定した。小学生では 43.6%、15-35 才の女性では 83.2% が風疹抗体を保有しており、年齢とともに抗体保有率が上昇する傾向にあった。この事から風疹の流行は常にあり、また、ラオスで第 1 子を最も妊娠する年齢である 20-24 才でも約 20% の女性が風疹の感受性者である事が明らかになった。風疹ウイルス検出のための従来あった LAMP 法では、東南アジアに多い Clade B のウイルスの検出が不可能であったが、新たに Clade A, B ともに検出可能な LAMP 法を開発した。この方法はラオスを含む東南アジアにおける風疹の診断に有用な方法であると思われた。

風疹ワクチンを過去に接種した履歴がないのに、全体で 8 割程度の抗体保有率 (全て感染による) であった。この結果をもとに、WHO /WPR LaoPDR Office では、麻疹ワクチンの接種キャンペーンにおいて、9 か月から 19 歳までの全年齢を対象に MR ワクチンを使用することを本格的に検討し始めた。本調査がラオス NCLE の capacity building に貢献しただけではなく、ラオス国内の予防接種政策を含めた麻

疹風疹をめぐる公衆衛生対応に大きな影響と、非常に重要な示唆を与えることができた。

(3) 狂犬病（研究分担者；山田、朴、井上）：

CDC 機能を持つアジアの国立研究機関等と連携した狂犬病ウイルスのラボラトリーネットワークの構築を強化するために分子疫学情報および診断技術等の共有化を行った。平成 20 年度に、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) と共同研究および委託研究を開始した。平成 21 年度に、アジアの狂犬病国際会議等に参加し、RITM、NIHE、China CDC の共同研究者と共に他のアジア諸国の狂犬病専門家と連携強化を進める技法について意見交換と連携研究の打ち合わせを行った。(1) 各国で流行している狂犬病ウイルス株の分子系統樹構築によるゲノムネットワークの基盤の構築、(2) LAMP 法 (遺伝子検出) と dRIT 法 (抗原検出) を連携機関で確立して共有、(3) 実験感染マウスを利用して感染初期の免疫応答遺伝子の発現プロファイルをマイクロアレイで作成 (早期診断マーカーの検索)。平成 22 年度には RITM、NIHE、China CDC に NIH/KCDC の専門家を加えて連携ネットワークの拡大強化を行い、特に前年度までに確立した検査系等の成果・技術の評価と見直し、課題点の補強、連携研究の方向性等について国立感染症研究所 (NIID) で実技を交えた

議論と研修を行った。今後、他のアジア諸国との相当機関によるネットワーク化の拡大と連携強化を進めるために RITM、NIHE、China CDC、NIH/KCDC と NIID の連携を強化してゲノム情報の共有化とデータベースの拡大やアジア関係諸国で標準化がなされていない中和抗体測定法等の試験法評価や共有化等をネットワークを活用して継続・推進することが必要である。

(4) インフルエンザ (研究分担者；田代、小田切、板村等)：

アジアの各国の研究機関にて高病原性鳥インフルエンザウイルスを安全かつ確実に診断できるようにするため、各国の研究者が高度なバイオセーフティー技術の取得および微生物学的知識と検査診断技術の取得を目的とする育成トレーニングを行った。また、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た。これら流行株の抗原性、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。また、アジア地域の流行株の解析成績をもとにワクチン候補株の検索を行った。一方、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) についても、近隣諸国からウイルスを収集し、季節性インフルエンザウイルスと同様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。インフルエンザ・パンデミック対策にはワクチンは要のひとつとなるが、ワクチンの品質管理はその基盤となるものである。インフルエンザワクチンの力価試験（一元放射免疫拡散試験法 [SRD 試験法]）のアジア地域での標準化及びアジア地域でのインフルエンザワクチンの品質管理研究機関の連携強化を目的として、SRD 試験の実験室内再現性についてインドネシアの国立試験研究機関である National Quality Control Laboratory of Drug and Food（国立医薬食品品質管理研究室）との間で共同研究を実施した。測定基準を含めて標準化された試験手順に基づいて試験を実施すると、従来得られていた試験成績と同等の再現性が得られることが判った。今後、連携する試験研究

機関の実験室間再現性を検討していくことが重要な課題であり、このような共同研究を随時実施していくことでインフルエンザワクチンの品質管理精度を連携試験研究機関で一定にすることが可能になり、その結果、品質の一定したワクチンの供給が実現することが期待される

原虫関係（分担研究者；大前、田辺、坪井、中野、津田）：

a. 原虫抗原を検出するマラリア迅速診断キット

ソロモン諸島、ガダルカナル島のマラリア流行状況は、かつての八重山諸島における制圧数年前の状況に近づいている。その状況の中で、相対的に増えている原虫密度の低い三日熱マラリアは、Histidine rich protein-2 (HRP-2)、Parasite lactate dehydrogenase (pLDH) の両方を同時に検出するマラリア迅速診断キットでも、検出困難であった。また、マラリア対策の進捗状況が異なる2つの地域で、住民の尿中熱帯熱マラリア原虫 IgG 抗体価を測定し、陰性化までの期間も推測した。その結果、尿中の熱帯熱マラリア原虫抗体価の陽性率は、マラリア低浸淫地における Rapid assessment やマラリア対策の成果をモニタリングする指標として利用できる可能性が示された。

b. 熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質の作製

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、コドンを何ら

改変することなくゲノムワイドに熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質約 1700 種を含むプロテインアレイの作製に成功した。ハイスループット抗原スクリーニング法（アルファスクリーニング法）により、その内 374 種類の組換えタンパク質とタイから得られた 19 人分のマラリア免疫血清によりスクリーニングを試行した。その結果、少なくとも一人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。さらにマリ共和国のマラリア流行地から得た 10 名の免疫血清との反応性を検討した結果、10 名全員の血清と反応した抗原 8 種類、半数（5 名）以上の血清と反応した抗原が 47 種同定された。以上の結果より、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイのハイスループット抗原スクリーニングシステムが樹立され、ゲノムワイドな熱帯熱マラリア原虫新規抗原探索が可能となった。

d. マラリア原虫の遺伝的多様性とその分布

タンザニア、ガーナ、タイ、フィリピン、パプアニューギニア、ソロモン諸島、ブラジル、ベネズエラから約 1,300 株を集め、そのうち多重感染を除いた約 500 株について、非抗原タンパク遺伝子 (*serca*, Ca^{2+} -ATPase; *adsl*, adenylosuccinate lyase), ワクチン候補抗原遺伝子 (*mspl*, merozoite surface protein-1; *amal*, apical membrane antigen-1; *csp*, circumsporozoite protein) の全長シ

ーケンスを得た。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かった。調べたハウスキーピング遺伝子及び抗原遺伝子のすべてにおいて、各地域の原虫集団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、塩基多様度の約 7~9 割が地理的距離によって決定されていることが判明した。また、*P. falciparum* 集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と深く関わりながら形成されてきたことを示唆する成績を得た。これらの結果は、世界各地の *P. falciparum* 集団が遺伝的多様性において大きく異なることを示し、マラリアの獲得免疫やワクチン効果が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を示唆する

e. クロロキン耐性遺伝子の歴史

1950 年代後半にインドシナ半島で発生したクロロキン (CQ) 耐性熱帯熱マラリアは、1978 年にはアフリカ東側から全土に広まっていた。CQ 耐性を付与する *pfcr*t 変異をアーカイブサンプルから検出したところ、もっとも古い 1984 年のサンプルからインドシナ半島型の *pfcr*t 耐性型を検出した。またアフリカでのマラリア流行度の高さを反映し、野生型も多く検出された。最後に、CQ と Pyr 耐性熱帯熱マラリアは、異なる時代にアフリカに移入したことを遺伝学的に示した。

f. 我が国におけるマラリア媒介蚊の分布・分類

日本脳炎ウイルス媒介能を持ち *Cx. gelidus* subgroup に属する *Cx. gelidus* と *Cx. sitiens* subgroup に属する *Cx. sitiens* について分子分類のためのプライマーを作成した。ヤブカ類（特にデング熱媒介蚊、チクングニヤ熱媒介蚊）の卵を分子分類するためのプライマーを開発した。これまでに開発したプライマーを使用することで、形態的に破損した日本脳炎ウイルスやフィラリア媒介蚊でも種の同定ができるようになった。

アジアの研究機関との共同研究

この研究班ではアジアにおける病原体解析は、当該国の国立の感染症研究機関に御願ひした。その共同研究を通して、より感染研との人的および研究におけるネットワークが密になり、連携強化に繋がってきている。このような共同研究を通し、研究者間の交流が促進され、新しい感染症の発生時には、必要なデータの交換が迅速に行われ、その結果を感染症対策に生かせる基盤が整ってきたと考えられる。

D. 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の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ている。政府も「東アジア構想」を掲げて、アジア諸国との連携の強化を促進している。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）の解析結果の情報の収集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、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）、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス等、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、マラリア等を主な対象病原体として、研究を進めてきた。

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（+米国CDC）の協力の下に進めてきた。各国の 12 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だきその成果を報告書としてまとめることができた。デングウイルス、狂犬病ウイルス、マラリアにおいてもアジア諸国との共同研究の促進を図った。それらの結果は、感染研とアジアの研究機関との連携の強化、人的交流、およびアジアで発生している病原体の遺伝型等のデータベースの構築として生かせるであろう。

感染症の発生、その拡大には国境は

ない。今回の新型インフルエンザ (A/H1N1) (インフルエンザ (H1N1) 2009) のようにいつどのような病原体の勃発、その世界的伝播が起こるか予測できない。その発生を迅速に検知するためにも、近隣諸国との連携、および病原体の検出技術の均一化が重要である。幸いにも我が国は科学的にも技術的にもアジア諸国のなかでは先んじている。我が国がリーダーシップをとり、アジア諸国の感染症対応の責任を担う国立の研究機関とのネットワークを構築し、人的、技術的な交流を深めておくことが、強いては我が国への新規病原体の侵入防止、および拡大の迅速把握に結びつき、我が国の感染症対策に役立つこととなる。構築されつつあるネットワークのさらなる発展および維持に当該研究の果たす役割は大きいと考える。

E. 結論：

感染症は一国の問題ではない。SARSの事件が実証したように、ヒトあるいは物を介して瞬く間に世界中に拡散し、時には莫大なる被害をもたらす。それを未然に阻止する対策が求められている。いつ発生するかまたはどのような状況で伝播するかわからない感染症に対しては、常時監視体制の確立が最も効果的の阻止法である。その

ためには国を越えての協力体制の構築が求められている。本研究はアジア諸国を中心として感染症対策に関与する研究機関と国立感染症研究所とのネットワークを構築し、各国における研究促進を図ると共に、感染研との人的交流を促進し、危機発生時に迅速に対応できる下地を作ることである。アジア地域を中心に問題となっている細菌（腸管感染症）、ウイルス（デング熱、日本脳炎、狂犬病、インフルエンザ、風疹）、原虫（マラリア）による感染症、その病原体の遺伝型等に関する研究ネットワークの構築ができてきたと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

別途記載。

表1. H20～22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	
China CDC	<u>Molecular Analysis of Shigella flexneri 4C emerged in China.</u>	<u>J-G. Xu</u>
インド NICED	<u>Genotyping of Vibrio cholerae 01, Vibrio parahaemolyticus and campylobacters.</u>	<u>B. B. Nair</u>
バン格拉デシュ	<u>Construction of laboratory net work on the characterization of bacterial enteric pathogens prevalent in Asia and Pan-pacific area (Bangladesh)</u>	<u>A. Cravioto,</u>
ICDDR		
バン格拉デシュ	<u>Phenotypic and Molecular Characterization of Vibrio cholera Causing Epidemics, 1991, and Subsequent Endemic Cholera in Latin America</u>	<u>M. Alam</u>
ICDDR		
韓国 NIH	<u>Application of Multilocus variable tandem-repeat analysis for typing of Shigella spp.</u>	<u>B. K. Lee</u>
タイ NIH	<u>Molecular epidemiology of non-ESBL and ESBL-producing Shigella sonnei strains in Thailand during year 2007-2008.</u>	<u>O. A. Ratchrathentrai</u>
香港公衆衛生研究所	<u>Organization of PFGE Working for Training and Technology transfer for Asia Pacific countries / areas in February 2009.</u>	<u>K. Man Kam</u>
マレーシア医学研究所	<u>Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi: An Intercountry Collaborative Study (Malaysia, Taiwan and Vietnam)</u>	<u>Thong Kwai-Lin</u>
ベトナム、NIHE	<u>Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (I): Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi AP. D. Cam (Malaysia, Taiwan and Vietnam)</u>	