

201028015A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・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22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）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  
新型インフルエンザ等新興・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22年度 総括・分担研究報告書

平成23（2011）年3月

研究代表者 倉 根 一 郎

(国立感染症研究所)



Fc $\gamma$ RIIA 発現細胞を用いたデングウイルス研究の有用性	43
研究代表者：倉根一郎 (国立感染症研究所)	
2010 年、中国・広東省で発生したデング熱の分子遺伝学的解析	49
研究分担者：前田秋彦 (京都産業大学総合生命科学部)	
イエカ類における日本脳炎ウイルス増殖能の評価	52
研究分担者：小林睦生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)	
RT-LAMP 法を用いた媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出	59
研究分担者：江下優樹 (大分大学医学部)	
富山県のイノシシと寄生マダニ類におけるリケッチア保有調査	65
研究分担者：滝澤剛則 (富山県衛生研究所)	
中部山岳国立公園立山の観光ルート沿いにおける蚊類幼虫調査	70
研究分担者：滝澤剛則 (富山県衛生研究所)	
フラビウイルスのウイルス様粒子作製法の改良についての研究	75
研究分担者：前田秋彦 (京都産業大学総合生命科学部)	
ウエストナイルウイルス感染マウス脳内浸潤T細胞におけるTCRレパトア解析によるウイルス特異性に関する研究	79
研究分担者：鈴木隆二 (国立病院機構相模原病院・臨床研究センター)	

# I. 総括研究報告書

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 副所長）

研究要旨：地球温暖化は感染症にも大きな影響を及ぼすと考えられている。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・患者数増加がおけると予想されている。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。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基盤技術確立することを目的とした。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確立を中心に研究を進めた。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、アジアにおける感染症と気候変動の関連に関する研究を遂行した。特に、バングラデシュにおける下痢症発生と降雨量との関連について関連性を明らかとした。

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・昆虫医科学部 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（京都産業大学 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されていない。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、特に

1) 地球温暖化に伴う気候変動が、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整備する、

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技術移転を行い、影響予測を行う基盤を整備する、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) 各種病原体及ぼす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 イエカ類における日本脳炎ウイルス増殖能

② 媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出

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下痢症と気候変動

② 中国におけるデング熱患者発生状況と気候変動

(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。

Vv, Vp は特に水温に影響されて菌数が増加し始めるが、Vv については、塩分濃度による影響もあると考えられた。一方、Vc は、水温による影響もあるものの、塩分濃度の低い地点で多く分離されたことから、塩分濃度が重要な因子と考えられた。また、環境中にある Vc は PFGE 解析から多様であることが示唆された。以上より、Vc, Vp, Vv と環境因子によって分布が変化することが示唆された。

(2) ウイルス感染症モニタリングのための技術基盤の確立:

フラビウイルスのウイルス様粒子 (VLP) 中和試験法に使用する VLP 作製の簡易法の開発を試みた。通常の VLP 作製法では、レプリコンを *in vitro* で転写し、これを構造

蛋白質発現ベクターと細胞に共発現する 2 つのステップで VLP を得る。しかし、簡易法では予めレプリコン持続複製細胞を樹立し、本細胞に構造蛋白質発現ベクターを導入する 1 つのステップで VLP が得られるため、非常に簡便である。本法によって得られる VLP 量は通常法と同等であり、本法は VLP 作製法として有用である。

(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:

現在国内に分布する広東住血線虫は、1930 年代に台湾から沖縄に持ち込まれ、西日本の太平洋岸を中心に拡散したとされるが、詳細は不明である。気候変動による国内での拡散を予測するには、過去の侵入拡散経路の検討が不可欠であり、これまでに採取された広東住血線虫の分子系統解析を試みた。核リボソーム DNA の ITS2 領域とミトコンドリア DNA の CO1 領域の分子系統解析を行ったところ、首都圏と奄美大島の個体間、沖縄本島と小笠原の個体間、仙台と名古屋の個体間で、両領域の解析結果はともに完全に一致した。決定した配列と、Gene bank に登録されている遺伝子配列情報を元に、近隣接合法による系統樹を作成したところ、首都圏-中国広東省・浙江省グループ、那覇-小笠原-タイ-フィリピン-ハワイ-フロリダ-ブラジル-カナリア諸島グループ、仙台-名古屋-福建省グループの 3 つのクレードが形成された。日本国内への広東住血線虫の侵入と拡散には、複数の経路が関与している可能性が高いことが示された。さらに、沖縄県での広東住血線虫性髄膜炎の発生と、最近の気候変化の関連について検討したが、直接の相関関係は認められなかった。



(4) 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による深在性真菌症の一つであり、おもに温暖な地域を流行地とする感染症であり、わが国では輸入真菌症として取り扱われている。地球温暖化により問題となる真菌症と考えられる。ヒストプラズマ属の日本における生息を調査した結果、菌の発育は認められなかったが、ヒストプラズマ属特異的PCR法にて *H. capsulatum* と高い相同性を有する増幅産物が得られ、わが国でのヒストプラズマ属の存在が示唆された。一方、タイにおけるヒストプラズマ症の感染源について、コウモリの堆積糞がリザーバーとして関与していることが推測された。

## 2) アジアにおける感染症と気候変動

(1) 熱帯アジアにおける感染症と地球温暖化：

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により、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、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するとともに、先行する冬の寒さにも関連していた(1°Cごとに16%の疾病発生数の上昇)。2つめ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(110mm/moごとに30%の疾病発生数の上昇)。コレラ患者のみを分析した結果、平均雨量が45mmの閾値から、10mm増加するごとに患者数は

14%増加した。また、閾値以下の雨量においても、10mm減少するごとに24%増加した。

(2) 中国における Dengue 熱患者発生状況と気候変動

1978-2007年、中国・広東省では周期的に Dengue ウイルス感染症の流行が認められた。調査期間における患者数は顕著に減少した。1990年以前は、Dengue ウイルスの4つの血清型の内のいずれかの型の流行が認められたが、近年は1型が主流となっている。調査地である広州市の気象と Dengue ウイルス感染症流行との相関は、相対湿度の低下や日射量の増加が本感染症の流行年と一致する傾向があった

## 3) 新たな感染検出新技術の確立

(1) Dengue ウイルス NS1 抗原検出キットの評価：

Dengue ウイルス NS1 抗原検出迅速キットの評価を行った。

①NS1 抗原検出 ELISA キットの評価：検体を10倍希釈して、検出感度を検討したところ、Index が10以上の37検体に関しては、37検体すべてが10倍希釈によっても検出が可能であった。Index が10未満1以上の場合は、16検体中13検体で抗原が検出された。全体では93%(40/43)の感度であった。検体を100倍に希釈した場合は、Index が10未満1以上の10検体では、いずれも抗原は検出できなかった。

②イムノクロマト NS1 抗原検出キットの評価：イムノクロマト法では、Index が10以上の検体では、10倍希釈で91.7%の検出率であったが、Index が10未満1以上の検体では抗原は検出されなかった。

## (2) Fc $\gamma$ RIIA 発現細胞を用いたデングウイルス抗体の生物活性測定

ヒト血清並びに抗体における感染増強活性を測定する ADE assay 及び ADE 活性測定基礎的条件を確立した。確立した ADE assay はヒト血清における DENV に対する感染増強活性と中和活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。この ADE assay により感染性ウイルス-抗体複合体が検出され、感染増強活性を合わせたウイルス力価が測定できることが明らかになった。DENV の感染ターゲット細胞の多くが Fc $\gamma$ R 発現細胞であることから、本測定法により測定したウイルス中和抗体価およびウイルス力価は生体内において有意義であることが示された。

## (3) 中国・広東省で発生したデング熱の分子遺伝学的解析

2010 年、中国・広東省で発生したデング熱の患者よりデングウイルスの血清型 1 型 (DENV1) および 3 型 (DENV3) 分離された。これらウイルスの E 蛋白質の遺伝子配列を決定し、広東省や中国国内の他省、あるいは海外各国から報告されているデングウイルスについて系統解析を行った。その結果、2010 年のデング熱の原因 DENV1 の由来は様々であると考えられた。近年、広東省のデング熱は DENV1 が主な原因ウイルスであるが、2010 年には DENV3 が分離された。本ウイルスは、近年 United States や Venezuela 流行しているものに近縁であり、近年、本省に輸入された可能性が高いものと考えられた。地球温暖化により感染の拡大が危惧されるデングウイルス感染症につ

いて、今後とも国際的な注意が必要であると考えられた

## (4) 蚊媒介性ウイルス感染の免疫学的診断法確立:

地球環境の変化によりその拡大が懸念されるウエストナイルウイルス (WNV) 特異的 T 細胞が、近縁ウイルス間の交差反応を示すかどうかについて検討した。分離した WNV 脳内浸潤 T 細胞は、他の近縁ウイルスとの交差反応は認められなかった。したがって T 細胞による各フラビウイルス抗原の認識において、近縁ウイルス間で共通部位の抗原性が非常に低く、ウイルス特異的であることが示された。T 細胞レセプターレパトアの解析に基づく蚊媒介性ウイルス感染の免疫学的診断法の基盤となることが示唆された。

## 4) 媒介ベクターと地球温暖化

### (1) イエカ類における日本脳炎ウイルス増殖能の評価:

コガタアカイエカとアカイエカにおける日本脳炎ウイルス (JEV) の増殖性を比較・評価した。アジア全域で JEV の主要な媒介種として知られるコガタアカイエカにおいては、特に Nagasaki37 株、JaGAR 株の高い増殖能が唾液線を確認されたが、アカイエカにおいてはいずれのウイルス株の増殖も認められなかった。また、コガタアカイエカにおいては、JEV1 型、3 型のジェノタイプに関わらず高率に増殖したが、イノシシ由来の 1 型株 (JaNBo) の増殖能は両株に比べて低かった。本株は冬季捕獲イノシシ由来株あり、これまでに蚊が係わる感染環と異なる増殖で維持されていた可能性があり、媒介蚊での増殖能が低かったのではないか

と考えられた。蚊の体内における JEV の越冬温度・日長条件を想定し、ウイルス経口摂取後の蚊を異なる飼育条件下で最長 4 カ月間維持した結果、コガタアカイエカでは 20℃に 1 ヶ月間維持した後 1 頭当たり 50,000 コピー数のウイルス量が得られ、さらにその 3 ヶ月後でも 120,000 コピー数/頭が検出された。コガタアカイエカが 10℃の低温を 1 ヶ月経験しても、JEV は 4 ヶ月間蚊の体内で維持され、さらに後半の高温 (28℃) 条件による維持によってウイルス量が増加したことが示唆された。一方、いずれの条件下でもアカイエカにおける JEV の増殖は認められなかった。

(2) RT-LAMP 法を用いた媒介蚊からの Dengue ウイルスゲノム検出:

RT-LAMP 法を用いて、Dengue ウイルス (DENV) 感染蚊からのウイルスゲノム検出の条件を検討した。DENV を経口感染させたネッタイシマカ雌を 28℃で 14 日間飼育した後、蚊の検査を行うまで -80℃に保管した。後日、個別の蚊から精製した RNA を鋳型として、RT-LAMP 法を実施した。ゲノムの増幅を確認のために、電気泳動を行い、ラダー状の特異的な複数の泳動バンドを確認した。

Dengue 熱流行地のラオス国において、確立した上記方法を実施した。Dengue 熱患者宅で蚊の採集を行った。1 日半の調査で 5 軒の患者宅を訪問して、ネッタイシマカ成虫を 1 軒につき 10 個体ほどを採集した。ラオス保健省の実験室において、DENV の 4 つの血清型に特異的なプライマーおよび、蛍光・目視検出試薬を用いた RT-LAMP 法を実施した。その結果、DENV1 型と 2 型が別々

の蚊から検出された。電気泳動を省略可能な RT-LAMP 法は、RT-PCR よりも迅速なため、流行地での感染蚊の有無を短時間で把握出来ることから、感染蚊対策にも有用な方法と考えられた。

(3) 富山県のイノシシと寄生マダニ類におけるリケッチア保有調査:

イノシシの分布拡大に伴ってマダニ類とリケッチアの分布が拡大している可能性について検討するため、イノシシ及びイノシシ体表より採集したマダニ類からのリケッチア検出を行った。イノシシ 31 頭からリケッチアは検出されなかった。イノシシ寄生マダニ類から *R. japonica* の遺伝子は検出されなかったものの、214 個体中 14 個体 (6.5%) から、ヒトへの病原性は不明のリケッチアが検出された。ヤマトチマダニからは比較的高率にリケッチアが検出された。イノシシの 38% にリケッチア陽性マダニが寄生していた。

(4) 中部山岳国立公園立山の観光ルート沿いにおける蚊類幼虫調査:

2010 年 7 月、8 月、および 10 月に、中部山岳国立公園の立山観光ルート (標高約 500 ~ 2,000m) において、蚊類幼虫を採集し、その垂直分布を調査した。計 973 個体の蚊類が採集され、これらは少なくとも 8 種に分類された。個体数がもっとも多かったのはヤマトヤブカ *Ochlerotatus japonicus* (439 個体) で、キンバラナガハシカ *Tripteroides bambusa* (430 個体) がこれに次いだ。ヤマトヤブカはすべての調査地点で採集された。本年の調査では、昨年と異なり、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は採集されなかった。昨年、標高 1,200m 地

点で採集されたヒトスジシマカは、何らかの理由で一時的に発生していたものと推定された。

#### 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。

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として、①各種病原体のモニタリング技術基盤、②ヒトにおける感染検出新技術の確立、③媒介ベクターと地球温暖化について研究を進展させた。また、これまで確立した基盤技術が国内やアジア各国で応用可能であることを検討するため、バングラデシュにおける下痢症と気候変動に関する研究、中国における Dengue 熱と既往変動の研究を推進した。

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。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が得られてきた。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く、今後一層の検討が必要となる。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。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、今後とも影響評価も地域ごとの解析が必要となる。

#### 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した。特に、地球温暖化の、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基盤技術の確立を行った。種々の感染症に関して、温暖化影響評価の技術確立が進展した。また、バングラデシュにおける雨量と下痢症の発生に関する関連を明らかにした。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

N. Sithivong, H. Izumiya, K. Munnalath, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, A. Vongdouangchanh, P. Vongprachanh, H. Watanabe, and M. Ohnishi: Cholera Outbreak, Laos, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (4), 745-746, 2010.

S. Yamamoto, M. Morita, H. Izumiya, and H. Watanabe: Chitin disaccharide (GlcNAc)<sub>2</sub> induces natural competence in *Vibrio cholerae* through transcriptional and translational activation of a positive regulatory gene *tfoXVC*. *Gene.* 457, 42-49, 2010.

M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, S. Yamamoto, G.B. Nair, S. Matsushita, K. Yokoyama, A. Kai, K. Seto, H. Watanabe, and H. Izumiya: Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. *J. Med. Microbiol.* 59 (6), 708-712, 2010.

Umehara, A., Kawakami, Y., Ooi, H.-K., Uchida, A., Ohmae, H. and Sugiyama, H. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 161-165, 2010.

Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by

pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Med Mycol.* 48(4):606-12, 2010.

Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Intern Med* 49:491-495, 2010.

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*, in press (2011)

Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*, 16 (11), 1770-1772 (2010)

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests using FcγR-negative and FcγR-expressing BHK cells. *Clin Vac Immunol*, 17: 402-407 (2010)

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for

dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. *J Virol Meth*, 163:205-209 (2010)

Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the FcγRIIA receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*, 91:103-111 (2010)

Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Intern Med*, 49:501-505 (2010)

Kenji Kurokawa, Kunihiro Iida, Mariko Mine, Manabu Yoshii, Keikichi Uchida, Yuki Eshita, and Tsutomu Oda (2010) : Variation in the number of ommatidia in valid female *Culex pipiens molestus* Forskal, a vector of *Dirofilaria immitis*, collected from an ovitrap, a septic tank, and an apartment in Nagasaki city. *House and Household Insect Pest*, 32(1): 1-8, July 2010

Obara, M., Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, S., Ueda, Y., Matsuno, K., Iwai, M., Horimoto, E., Kurata, T., Takizawa, T., Kariwa, H., Takashima, I. Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama prefecture, Japan. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. in press.2011

## 2. 学会等発表

### 1) 国際学会

Umehara, A., Kawakami, Y., Ooi, H.-K., Uchida, A., Ohmae, H. and Sugiyama, H. Molecular identification of *Anisakis* type I

larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. International Congress of Parasitology (ICOPA XII), Melbourne, 15-20 August 2010.

Ohno H, Tanabe K, Kaneko K, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis. 12<sup>th</sup> Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore (2010年12月)

Norkaew T, Sriburee P, Takarn P, Tharavicitkul P, Tanabe K, Ohno H, Miyazaki Y. Detection of *Histoplasma capsulatum* in soil contaminated with bat guano by nested PCR. 12<sup>th</sup> Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore (2010年12月).

Hisamatsu M, Ma E, Wagatsuma Y. The effect of meteorological factors on fetal growth. チュニジア-日本文化・科学・技術学術会議. チュニジア共和国,チュニス, 2010年11月30日.

Hisamatsu M and Wagatsuma Y. Temperature effect during pregnancy influenced on birth size -- an example of the use of Matlab HDSS, Bangladesh. 第1回 Health and Demographic Surveillance System(HDSS)研究会, 京都. 2010年11月28日.

Maeda, A., and Ke, Chang-Wen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. The Workshop of Network Laboratories on

Emergency Response and Surveillance of Infectious Diseases in Pan Pearl River Delta Region (2010.12.12, Guangzhou, China)

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Titration of neutralizing antibody and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK-21. 14<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Kuala Lumpur, Malaysia, 2010年10月

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using FcγRIIA-expressing BHK cells. 44<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Hokkaido, Japan, 2010年6月

Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Miho Imada, Yuki Eshita, Josef Sem Berth Tuda, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Jun-ichi Watanabe (2010): Transcriptome Analysis of Malaria Parasites, Vector Insects and Infected Humans. Parasite pathogen genomics: Prospect for tropical disease control. International scientific meeting in line with the 51<sup>st</sup> anniversary of Faculty of Medicine Sam Ratulangi University (The Watanabe Memorial Symposium), Manado, Indonesia, 27 May 2010.

Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Chamarn Apiwathnasorn, Yupha Rongsriyam,

Yuki Eshita (2010): Evidence of mutations in sodium channel domain IIS6 in field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti*. The Fourth ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, SINGAPORE, 2-4 JUNE 2010.

## 2) 国内学会

田辺公一、大野秀明、山越 智、宮崎義継。タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討。第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京 (2010年10月)

若山 恵、大久保陽一郎、篠崎 稔、中山晴雄、蜜田亜希、大野秀明、宮崎義継、中谷行雄、亀井克彦、渋谷和俊。In situ hybridization を用いたヒトヒストプラズマ症の組織診断の検討。第54回日本医真菌学会総会、東京 (2010年10月)

宮崎義継、梅山 隆、田辺公一、大野秀明。ヒストプラズマ等のアウトブレイク型真菌症への対策。第31回衛生微生物技術協議会、鹿児島 (2010年5月)

モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎： Dengue再感染患者血清中ウイルスカバレッジの検討：感染性抗体- Dengueウイルス複合体は FcγR 発現細胞においてのみ検出された。第58回日本ウイルス学会学術集会 (徳島)。平成22年11月

佐々木年則、澤邊京子、鋤田龍星、金京純、津田良夫、伊澤晴彦、小林睦生。蚊の日本脳炎ウイルス感受性。第62回日本衛生動物学会大会、2010年4月

佐々木年則, 澤邊京子, 鎌田龍星, 金京純, 津田良夫, 伊澤晴彦, 小林陸生. 蚊の日本脳炎ウイルス感受性. 第 62 回日本衛生動物学会大会, 2010 年 4 月

沢辺京子, 佐々木年則, 森林敦子, 葛西真治, 津田良夫, 小林陸生. 日本脳炎ウイルスのアカイエカ体内での越冬の可能性について. 第 62 回日本衛生動物学会大会, 2010 年 4 月

森林敦子, 澤邊京子, 金京純, 津田良夫, 小林陸生. コガタアカイエカの休眠導入期から覚醒期における脂質含量と脂肪酸組成の変動. 第 62 回日本衛生動物学会大会, 2010 年 4 月

江下優樹, 高崎智彦, 林 昌宏, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, 湯 偉峰, 青野裕士, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, 倉根一郎 (2010): タイ国産ネッタインシマカのチクングニアウイルス感受性. 第62回日本衛生動物学会大会, 2010年4月3日(土)・4(日)、鹿児島市

小原真弓, 山内健生, 渡辺護, 滝澤剛則「富山県のイノシシと寄生マダニ類からのリケッチア検出」第 65 回日本衛生動物学会西日本支部大会, 2010 年 11 月

小原真弓, 山内健生, 渡辺護, 長谷川澄代, 岩井雅恵, 堀元栄詞, 滝澤剛則「コガタアカイエカから分離された *Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干

渉」第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、新宿区、2010 年 5 月

小原真弓, 山内健生, 渡辺護, 長谷川澄代, 岩井雅恵, 堀元栄詞, 倉田毅, 滝澤剛則「*Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干渉」第 58 回日本ウイルス学会、徳島市、2010 年 11 月

前田秋彦, 染谷梓, 西野佳以, 村田英雄, 倉根一郎. ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立. トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会(2010. 12. 10, 東京)

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等・新興再興感染研究事業）

平成 22 年度 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確立に関する研究」

分担研究課題名：「食水系細菌感染症と環境モニタリングに関する研究」

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 松本一俊 熊本県保健環境科学研究所 微生物部

森田昌知 国立感染症研究所 細菌第一部

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 バ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】

2010 年 5 月から 11 月までの間、ほぼ毎月 1 回、4 地点において、ほぼ満潮時に岸壁から海水を採取した（図 1）。地点 D は今年度新たに追加した。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  $18 \pm 2$  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  $18 \pm 2$  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）などで同定した。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。

#### 【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

分離したビブリオ属菌の *atpA* 遺伝子の配列を決定し、データベースを作成した。Genbank に登録されているデータも含めて、これまでに約 80 菌種、600 株分のデータベースを構築した。得られたデータベースから Vc、Vp、Vv に特異的と推定されるプライマーを設計し、これらの菌株 DNA を試験し、プライマーの有用性を検討した。

#### 【*V. cholerae* 分離株の PFGE 解析】

分離した Vc の全 DNA を *NotI* で消化し、パルスフィールドゲル電気泳動法によって分離した。得られた泳動パターンからクラスタ解析を行った。

#### 【*V. vulnificus* 分離株の MLST 解析】

分離した Vv について、multilocus sequence typing を行った。解析には <http://pubmlst.org/vvulnificus/> にある 10 遺伝子座 (*glp*, *gyrB*, *mdh*, *metG*, *purM*, *dtdS*, *lysA*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*) を用いた。得られた結果を上記データベースにある配列と比較した。

### C. 研究結果

#### 【ビブリオ属菌と環境因子】

図 2 に環境要因と MPN 法で推定される各ビブリオ属菌の菌量の変化を示す。A, B, C 地点における Vv および Vp の挙動については過去

2 年間とほぼ同様であった。本年度追加した地点 D は塩分濃度が極めて低く (1~3‰)、Vc がよく分離された (うす緑のバー)。一方で Vp, Vv はほとんど検出されなかった。7 月に地点 A および C 地点において極度な塩分濃度低下、並びに Vv の増加が観察された。9 月に若干の塩分濃度の低下が地点 C において観察され、この時のサンプルでは Vc が検出された。

#### 【*atpA* 遺伝子によるビブリオ属菌分類】

NCBI 等の公共データベース、ならびに昨年度から収集した海水からの分離株を併せて、約 80 菌種、600 株からなる *atpA* 遺伝子の塩基配列データベースを構築した。また、データベースを元に設計した Vc, Vp, Vv 検出用 PCR プライマーは、これまでの分離株において正しく標的微生物を鑑別し、また、腸内細菌科細菌 (サルモネラ、赤痢菌など) を含めて他の環境細菌との非特異反応は見られなかった (図 3)。

#### 【*V. cholerae* 分離株の PFGE 解析】

本研究で分離した Vc が遺伝的に均一のものなのかを調べるため、地点 C の株 6 株、地点 D の株 36 株を用いて PFGE による解析を行った。その結果、少なくとも地点 D の株は多様であることが明らかとなった。また、株数は少ないものの、地点 C の株も 3 つのグループに分けられた。さらに、地点 C の株は地点 D の株のグループに包含されることが明らかとなった。(図 4)

#### 【*V. vulnificus* 分離株の MLST 解析】

Vc 同様、本研究で分離した Vv の多様性を調べるため、環境分離株 6 株について MLST による解析を行った。解析結果を、上記に示

したサイトにあるデータベースと比較した。その結果、大きく2つのグループに分かれた。2株は生物型1と2を含む環境株が多いとされるグループ、4株は生物型1の患者株が多いグループに包含された。(図5)

#### D. 考察

V<sub>v</sub>、V<sub>p</sub>は特に水温に影響されて菌数が増加し始めるが、V<sub>v</sub>については、塩分濃度による影響もあると考えられた。一方、V<sub>c</sub>は、水温による影響もあるものの、塩分濃度の低い地点で多く分離されたことから、塩分濃度が重要な因子と考えられた。

環境中にあるV<sub>c</sub>はPFGE解析から多様であることが示唆された。また、隣接する地点からのV<sub>c</sub>が塩分濃度の低い地点からのV<sub>c</sub>と類似性があること、分離頻度が後者の方が高いことから、何らかの理由でV<sub>c</sub>が移動することで塩分濃度の高いところでも検出されるようになる時が生じていることが考えられた。

本研究で分離されたV<sub>v</sub>環境株には二つのグループがあり、一方は患者由来が多いグループに含まれた。本研究で分離されたV<sub>v</sub>が両方のグループを含んでいたことは興味深い。

本研究で検討してきた*atpA*遺伝子配列の多様性に基づくPCRの有用性がさらに示された。今後、本法を環境調査に応用していくことでより正確かつ迅速な解析が可能になることが期待される。

#### E. 結論

V<sub>c</sub>、V<sub>p</sub>、V<sub>v</sub>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、応用性が示された。

#### F. 健康危機情報

温暖化による海水温上昇に関し、V<sub>v</sub> および V<sub>p</sub> 感染リスクの増加が懸念される。

#### G. 研究発表

N. Sithivong, H. Izumiya, K. Munnalath, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, A. Vongdouangchanh, P. Vongprachanh, H. Watanabe, and M. Ohnishi: Cholera Outbreak, Laos, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 16 (4), 745-746, 2010.

S. Yamamoto, M. Morita, H. Izumiya, and H. Watanabe: Chitin disaccharide (GlcNAc)<sub>2</sub> induces natural competence in *Vibrio cholerae* through transcriptional and translational activation of a positive regulatory gene *tfoXVC*. *Gene.* 457, 42-49, 2010. (Jun)

M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, S. Yamamoto, G.B. Nair, S. Matsushita, K. Yokoyama, A. Kai, K. Seto, H. Watanabe, and H. Izumiya: Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. *J. Med. Microbiol.* 59 (6), 708-712, 2010.