

表1-2. 台湾CDCとの共同研究プロジェクト

No	Taiwan CDC		NIID	
	Title	Researcher	Title of Japan side	Japanese researcher
1	Genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne pathogens between Taiwan and Japan	Dr. Hwa-Jen Teng	Genetic relationship of vector mosquitoes and the vector-borne pathogens between Taiwan and Japan	Dr. Tomohiko Takasaki, Chief of the Arbovirus Laboratory, Department of Virology 1, NIID, , Dr. Yoshio Tasuda , Laboratory of Taxonomy and Ecology, Dept of Medical Entomology
2	Genetic analysis of highly virulent strains of Entamoeba histolytica in the high risk groups between Taiwan and Japan	Dr. Dar-Der Ji	Genetic polymorphism of Entamoeba genome	Kumiko Tsukui, PhD, Department of Parasitology
3	Drug-resistance mechanism, pathogenesis and genomics of tuberculosis	Dr. Ruwen Jou	Molecular mechanisms of resistance to antituberculous agents	Drs. Keigo Shibayama Department of Bacteriology II
			<ul style="list-style-type: none"> <li>•Molecular mechanisms of latent tuberculosis infection</li> <li>•New serodiagnostics of disease due to nontuberculous mycobacteria, M. avium complex</li> </ul>	Kazuo Kobayashi, Director Department of Immunology, NIID
4	Molecular studies on virulence and drug resistance of leprosy	Dr. Ruwen Jou	Molecular studies on virulence and drug resistance of leprosy	Dr. Masanori Kai , Dept of Mycobacteriology, Leprosy Reseach Center
5	Sapovirus epidemiological study & Quick diagnostic system for diarrheal viruses	Dr. Jyh-Yuanh Yang	Development of Sapovirus molecular epidemiology and high sensitive diagnostic system for diareal viruses	Kazuhiko Katayama, Ph.D. Chief Laboratory of Gastroenteritis viruses Department of Virology II
6	Development of diagnostic methods for brucellosis and leptospirosis	Dr. Jung-Jung Mu	Development of diagnostic methods for brucellosis, leptospirosis and validation of diagnostic methods for human and animals used in Japan	Brucellosis: Koichi Imaoka, Laboratory Chief, Laboratory of Reservoir Control of Zoonoses, Department of Veterinary Science, National Institute of Infectious Diseases. , Leptospirosis: Koizumi, N. PhD, Department of Bacteriology I

表1-3. インドNICEDとの共同研究プロジェクト

No	NICED		NIID	
	Title of Indian side	Researcher	Title of Japan side	Jananese researcher
1	Retrospective analysis on the evolutionary aspects of <i>Vibrio cholerae</i>	Asish K. Mukhopadhyay and B.L. Sarkar	Molecular analysis of evolutionary pathway - genetic variation of CTX phages derived from <i>Vibrio cholerae</i> O1	Masatomo Morita, PhD Senior Research Scientist, Department of Bacteriology I
2	Differential pathogenesis of <i>Giardia</i> : Role of <i>Giardia</i> Virus.	Dr. Sandipan Ganguly	Identification and characterization of novel viruses in the enteric protozoa	Tomoyoshi Nozaki, Director Department of Parasitology
3	Development of universal <i>Shigella</i> vaccine based on virulence gene expression	Hemanta Koley	Development of universal <i>Shigella</i> vaccine based on virulence gene expression	Jiro Mitobe, M.D. & PhD , Senior Research Scientist, Department of Bacteriology I
4	Analysis of HLA-associated HIV-1 mutations in India and Japan	Dr Sekhar Chakrabarti	Analysis of HLA-associated HIV-1 mutations in India and Japan	Matano, Director, AIDS Research Center

表1-4. ベトナムNIHEとの共同研究プロジェクト

No	NIHE		NIID	
	Title	Researcher	Title of Japan side	Japanese researcher
1	Evaluation and improvement of double-disk synergy test method for detection of NDM-1-producing Enterobacteriaceae clinical isolates and research on <i>Clostridium difficile</i>	Nguyen Binh Minh, M.D. Ph.D.	Evaluation and improvement of double-disk synergy test method for detection of NDM-1-producing Enterobacteriaceae clinical isolates and research on <i>Clostridium difficile</i>	Drs. Keigo Shibayama , Director, Department of Bacteriology II
2	Development of methods for detection of rubella and measles viruses and epidemiological analysis of rubella and measles viruses in Vietnam	TrieuThi Thanh Van, M.D	Development of methods for detection of rubella and measles viruses and epidemiological analysis of rubella and measles viruses in Vietnam	Dr.Katsuhiko Komase, Chief, Department of Virology III
3	The improvement of the epidemiological surveillance of rabies and anthrax in Vietnam.	Rabies: Dr.Nguyen Thi Kieu Anh Anthrax: Dr.Thi Thu Ha Hoang	The improvement of the epidemiological surveillance of rabies and anthrax in Vietnam.	Rabies: Dr.Satoshi INOUE Chief , Anthrax: Dr.Akiko OKUTANI , senior reseacher ,Department of Veterinary Science
4	Collaborative network between National institute of Infectious diseases (NIID) and National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) on basic and clinical study of Histoplasmosis.	Dr.Thi Thu Ha Hoang	Collaborative network between National institute of Infectious diseases (NIID) and National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) on basic and clinical study of Histoplasmosis.	Dr.Hideaki Ohno , Chief, Department of Chemotherapy and Mycoses
5	Establishment of laboratory diagnosis for leptospirosis and investigation of prevalence of leptospirosis among patients with fever of unknown origin in northern area of Vietnam	Dr.Thi Thu Ha Hoang, Bacteriology Department	Establishment of laboratory diagnosis for leptospirosis and investigation of prevalence of leptospirosis among patients with fever of unknown origin in northern area of Vietnam	Dr.Nobuo Koizumi, Senior researcher, Department of Bacteriology I
6	Molecular epidemiology of <i>Vibrio cholerae</i> in Vietnam.	Nguyen Binh Minh, M.D. Ph.D. binhminh.nihe@gmail.com	Molecular epidemiology of <i>Vibrio cholerae</i> in Vietnam.	Dr. Hidemasa IZUMIYA, Chief Department of Bacteriology I
7	Laboratory diagnosis and molecular epidemiology of enteroviruses from cases with hand, foot, and mouth disease in Vietnam	Nguyen Thi Hien Thanh	Laboratory diagnosis and molecular epidemiology of enteroviruses from cases with hand, foot, and mouth disease in Vietnam	Dr. Hiroyuki Shimizu Chief, Department of Virology II

# プロジェクト 1 : 中国

厚生労働科学研究費補助金

平成23年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (アジア指定研究)

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究

Epidemiology of HFMD and genetic characterization of HEV71 and CVA16

手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析

研究分担者：	清水博之	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究分担者：	Xu Wenbo	Chinese Center for Disease Control and Prevention
研究協力者：	Zhang Yong	Chinese Center for Disease Control and Prevention

研究要旨

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2010 年には、中国全土で 850 例以上の手足口病死亡例が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。日本を含む東アジア他の地域では、異なる EV71 遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、今後の EV71 ワクチン開発にとって重要な疫学的特徴と考えられる。

A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、一般的には、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちの 1 つである。しかし、1990 年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、大きな社会問題となっている。1990 年代後半には、マレーシアおよび台湾で EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000 年代に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病あるいは EV71 感染症流行の発生が報告されている。とくに、2010 年には、中国全土で 850 例以上の手足口病死亡例が報告されており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

EV71 の伝播様態を解析するため、また、強い神経病原性を有する特定の遺伝子型の EV71 が伝播している可能性を検討するため、EV71 分離株の分子系統学的解析

が進められている。カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2 種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かれ、さらに B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990 年代後半以降、おもに、B3 および B4、C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。中国の手足口病重症例からは遺伝子型 C4 が検出され、2008 年以降の中国の EV71 株は、ほとんど C4 であるとされているが、詳細については、引き続き解析が必要とされる。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、多数の重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生している中国本土で分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は、きわめて重要

である。本研究では、中国 CDC および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有体制を基盤として、EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析を行う。

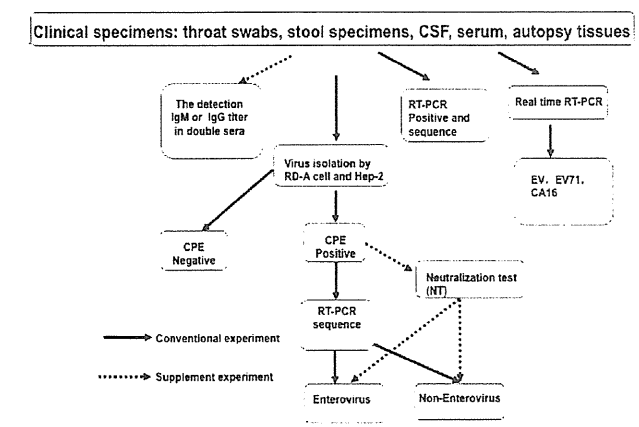
## B. 研究方法

中国における手足口病流行および病原体サーベイランスに関する最新情報は、中国 CDC 側研究分担者である Dr Xu Wenbo および研究協力者である Dr Zhang Yong から情報提供を受けた。

中国では、2008 年以來、手足口病は全数報告対象感染症となっており、臨床診断による手足口病症例数が報告されている。手足口病実験室診断は、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークにおいて実施されており、咽頭拭い液や糞便等の臨床検体を用いた、培養細胞を用いたウイルス分離、RT-PCR 法、あるいは real-time PCR 法による遺伝子検出が行われている。中国における手足口病実験室診断フローの概要を以下に示す(図 1. Dr Xu Wenbo 提供資料)。

図 1

HFMD Cases Flow Chart for Laboratory Identification



中国 CDC において、手足口病患者から分離された EV71 および CA16 株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。一部の EV71 および CA16 分離株については、非カプシド領域あるいは全ゲノム遺伝子解析を行い、ゲノム遺伝子組換えについて解析を行った。

現在、中国で分離された病原体の外国研究機関への分与は非常に困難であり、今回の共同研究において、

中国で分離された EV71 株の分与を受けるのは事実上不可能であるとの連絡を受けた (Dr Xu Wenbo 提供情報)。そのため、当室では、中国で伝播しているのと分子系統学的な近縁な遺伝子型 C4 株を含む、これまで報告されている全ての遺伝子型の EV71 株を含む EV71 標準株パネルを作成し、遺伝子解析およびウイルス学的性状の解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 中国 CDC 側担当者との共同研究打合せの実施

WHO Global Polio Laboratory meeting (2011 年 9 月 22-23 日、ジュネーブ) の際、中国 CDC 側の研究代表者である Dr Xu Wenbo、および、エンテロウイルス感染症担当の Dr Zhang Yong と、本年度および本年度以降の共同研究の方向性について研究打合せを実施した。本年度及び次年度、中国 CDC では、手足口病由来検体から分離されたエンテロウイルス (EV71 および CA16) の分子疫学的解析および血清疫学的解析を実施することを確認した。

### 2) WHO 手足口病ガイドラインの作成・公開

1990 年代後半より、東アジア地域では、手足口病および EV71 感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、諸外国との疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO 西太平洋地域事務局、中国 CDC、台湾 CDC ベトナムパスツール研および NIHE 等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン” A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)” を作成した。本ガイドラインは、2011 年に公開され、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法等に関する基盤情報の共有が可能となった。

### 3) 中国で分離された EV71 株の分子疫学解析 (中国 CDC)

中国の手足口病患者から分離された EV71 および

CA16 株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。2008 年の手足口病流行時、重症例が多発した安徽省の症例から検出された EV71 株は、VP1 領域の塩基配列に基づく分子系統解析により遺伝子型 C4 に分類された。その後、中国各地で分離された EV71 株の分子系統解析を行ったが、すべての EV71 株は遺伝子型 C4 に分類され、より詳細な解析により C4a と C4b に分類されることが明らかとなった(図 2、Dr Xu Wenbo 提供資料)。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、中国で伝播している EV71 の分子疫学的特徴と考えられる。2008 年の手足口病流行以前に分離ウイルスを用いた分子疫学解析においても、中国における EV71 分離株は遺伝子型 C4 関連ウイルスであり、遺伝子型 C4 は、長年、中国本土で伝播している地域固有の遺伝子型であることが明らかとなった(図 2)。また、EV71 および CA16 分離株の非カプシド領域あるいは全ゲノム遺伝子解析により、EV71 を含む異なる血清型のエンテロウイルスにおける頻繁なゲノム遺伝子組換えが示唆された。

#### 4) EV71 遺伝子型標準株パネルの作成とウイルス学的性状の解析 (感染研ウイルス第二部)

現在報告されている 11 種類の EV71 遺伝子型 A、B1～B5 および C1～C5 について、標準ウイルス株を収集した。従来、当室で、研究・検査等に使用し、論文として報告済みの EV71 標準株(当室の責任で分与可)以外の標準株については、感染研から他の研究施設への研究目的での分与についての了解を得た上で、台湾 CDC、韓国 CDC、オランダ RIVM、山形衛研等から分与を受けた。当室で新たにウイルスストックを調整するとともに、ウイルス力価やカプシド領域の塩基配列、EV71 特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析し、EV71 遺伝子型標準株パネルとした。日本で分離された C4 株は、現在、中国本土で伝播している C4 株と分子系統学的に近縁であるため、受容体特異性等 C4 型のウイルス学的性状の解析に使用可能と考えられる。

今後、感染研で作製した EV71 標準株パネルを中国

CDC に分与し、遺伝子検査による手足口病実驗室診断に関する解析・評価・精度管理を行うための標準ウイルス株として利用する(病原体分与手続き中)。

#### D. 考察および今後の研究方針

1990 年代後半以降、東アジア地域で、小児急性死症例を含む重症 EV71 エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し大きな社会問題となっているが、中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病流行が報告されている。中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、中国で伝播している EV71 の分子疫学的特徴と考えられる。中国では現在、数施設により不活化 EV71 ワクチン開発が進められており、今後、EV71 の遺伝的多様性および異なる遺伝子型間の抗原性の違いについての解析が重要となる。

中国における EV71 を含めたエンテロウイルス感染症実驗室診断では、遺伝子検査が汎用されている。エンテロウイルス遺伝子検査の標準化と精度管理のため、感染研ウイルス二部で保有している、異なる遺伝子型の EV71 標準株パネルを中国 CDC に分与し、遺伝子検査標準化のためのレファレンスパネルとして使用する。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表 (報告書等を含む)

- 1) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen J Clin Microbiol (in press)
- 2) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K,

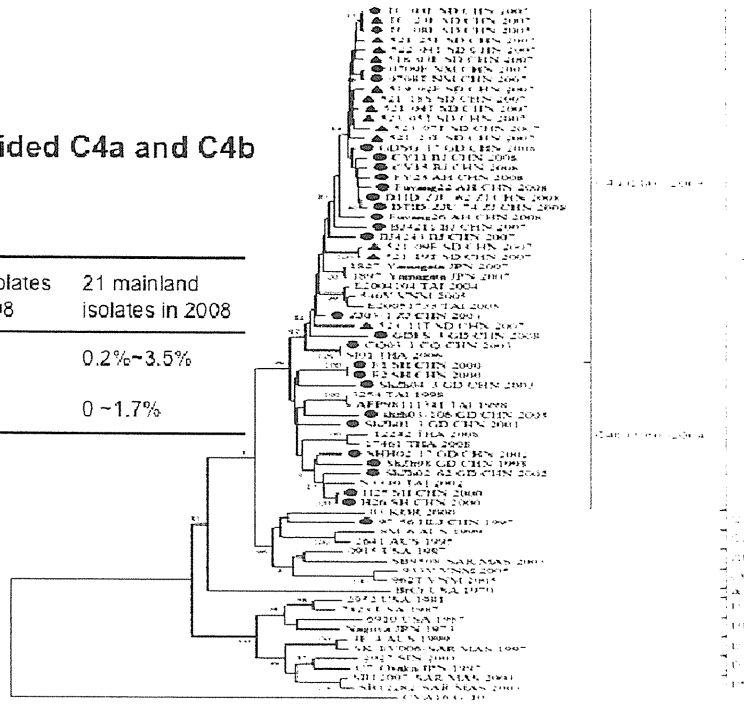
- Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 3) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
- 4) Iwai M, Horimoto E, Obara M, Obuchi M, Kurata T, Kawagoshi K, Nakamura S, Shimizu H, Yoshida H, Takizawa T: Endemic transmission of echovirus 30 in Toyama, Japan in 2010 is verified by environmental surveillance. *Jpn J Infect Dis* 64:165-167, 2011
- 5) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011
- 6) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)
- 7) Zhang Y, Wang J, Guo W, Wang H, Zhu S, Wang D, Bai R, Li X, Yan D, Zhu Z, Tan X, An H, Xu A, Xu W. Emergence and transmission pathways of rapidly evolving evolutionary branch c4a strains of human enterovirus 71 in the central plain of china. *PLoS One* 6: e27895, 2011
- 8) Tan X, Huang X, Zhu S, Chen H, Yu Q, Wang H, Huo X, Zhou J, Wu Y, Yan D, Zhang Y, Wang D, Cui A, An H , Xu W. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008. *PLoS One* 6: e25662, 2011



图 2

C4 genotype was divided C4a and C4b

	78 mainland isolates since 1997-2008	21 mainland isolates in 2008
Nt diversity	0.2%-7.8%	0.2%-3.5%
aa diversity	0-3.4%	0-1.7%



Yong Zhang et al. J Clin Virol, 44(4):262-267,2009.

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究

レジオネラの分子疫学

研究分担者	倉 文明	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	前川純子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：レジオネラ症の主要起因菌である *Legionella pneumophila* 血清群 1 株について、分子疫学的手法であるパルスフィールド電気泳動法と sequenced based typing (SBT) 法の検討を行った。パルスフィールド電気泳動法は感染源解明のため最も有用な手法である。従来日数がかかっていたが、それが短縮された。SBT 法は結果が ST 型で示されるので、他の菌株との異同の確認が容易で、データベース化され、世界規模でのデータが蓄積してきている。

A. 研究目的

レジオネラ症はレジオネラ属菌を起因菌とした呼吸器感染症で、日本では入浴施設においてしばしば集団感染事例が起きる。諸外国ではホテルの給湯設備や、空調の冷却塔水などによる集団感染事例が報告されている。レジオネラ症の感染源を明らかにするためには患者から分離された菌株と感染源と推測される環境水から分離された菌株の異同を確認する必要がある。現在行われている分子疫学的手法を改良し、評価する。

B. 方法

1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

(1) BCYE $\alpha$  寒天培地上 35°C で継代培養 48 時間以内の新鮮な菌体を 100~200  $\mu$ L の滅菌超

純水にマックファーランド 5 程度の濃度に懸濁し、50~55°C に温めた等量の 1% SeaKem<sup>R</sup> Gold Agarose と混ぜ、plug mold (Bio-Rad) に流し込み室温で固化させ、アガロースブロックを作製する。

(2) アガロースブロックを蛋白質分解酵素液 (0.1mg/ml proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5 M EDTA, pH 8.0) 1 mL に浸し、50°C で 1 時間振盪処理する。

(3) アガロースブロックを適当な大きさに切断後、4 mM Pefabloc SC (Roche Diagnostics) を含んだ TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1 mL に浸し、50°C で 30 分振盪洗浄する。液を新しい 4 mM Pefabloc SC を含んだ TE バッファーに換え、再び 50°C で 30 分振盪洗浄する。液を TE バッファー 1 mL に換え、氷上で 30 分振盪洗浄する。液

を制限酵素処理のための 1×Mバッファー (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 100 µg/mL bovine serum albumin) 200 µL に換え、氷上で 30 分振盪し、バッファーの平衡化を行う。

(4)液を 50 units/sample の制限酵素 *Sfi* I (Roche) を含む制限酵素バッファー 100 µL に換え、50°C で 4 時間振盪し消化する。酵素処理を終えたアガロースブロックは液を 0.5×TBE ( Tris-borate 45 mM, EDTA 1 mM ) に換え、電気泳動を開始するまで 4°C に置く。

(5)ブロックを 1% SeaKem<sup>R</sup> Gold Agarose に埋め室温で泳動用ゲルを固めた後、0.5×TBE バッファー (14 °C)、パルスタイム 5 秒から 50 秒 6 V/cm、泳動時間 21 時間でパルスフィールドゲル電気泳動 (CHEF DR III System, Bio-Rad) を行う。電気泳動終了後、ゲルは 0.5 µg/mL のエチジウムブロマイドで染色し、超純水で 30 分 3 回洗浄し紫外線照射装置上で写真撮影する。得られた PFGE パターンに基づき Fingerprinting II ソフトウェアを用いて樹形図を作成する。

## 2) Sequence Based Typing (SBT) 法

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、遺伝子型を決定した<sup>1,2)</sup>。*flaA* は鞭毛 (flagellin)タンパク質、*pilE* は IV 型線毛(type IV pilin)タンパク質、*asd* はスレオニン生合成系酵素であるアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aspartate-b-semialdehyde

*dehydrogenase*)、*mip* は宿主マクロファージへの感染に寄与する(*macrophage infectivity potentiator*)タンパク質、*mompS* は主要外膜タンパク質(*major outer membrane protein*)、*proA* は亜鉛メタロプロテアーゼ(*zinc metalloprotease*)、*neuA* は N-アシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ (*N-acylneuraminate cytidyltransferase*)をそれぞれコードする遺伝子である。7 遺伝子の遺伝子型が決まった分離株を EWGLI のデータベース<sup>3)</sup>に登録すると、新しい遺伝子型の組み合わせについては ST (sequence type)ナンバーが付与される。

## C. 研究結果

日本各地から独立に得られた *Legionella pneumophila* 血清群 1 分離株 31 株 (冷却塔水分離株 10 株、温泉水分離株 10 株、温泉に関連した感染による臨床分離株 7 株、感染源不明の臨床分離株 4 株) は 30 種類の PFGE パターンに分かれた。PFGE パターンから描かれた樹形図は冷却塔水分離株が 1 つのクラスターを形成していることを示した。上述の 31 株は SBT 法により 16 種類に分かれた。10 株の冷却塔水分離株はすべて ST1 だった。さらに感染源不明の臨床分離株 2 例も ST1 で、PFGE の冷却塔水分離株のクラスターに含まれた。残りの 15 種類の ST のうち、2 株存在したのは 4 種類で、11 種類は 1 株ずつだった (図 1)。

冷却塔水分離株についてはさらに独立な 55 株について SBT を行ったところ、ST1 以外の遺伝子型も見出されたが、ST1 が 40 株 (72%) を占めた。その結果を表 1 に示した。

表1 冷却塔水由来 *L. pneumophila*  
血清群1分離株の遺伝子型別

遺伝子型	株数 (%)	
ST1	40	(73%)
ST154	4	(7%)
ST598	3	(5%)
ST150	2	(4%)
その他 (1株ずつ)	6	(11%)
計	55	100%

#### D. 考察

PFGE 法は、新鮮な菌体を使う、蛋白質分解酵素処理時間を短くする、高濃度の制限酵素液で短時間処理するなどの改良点により、結果が出るまでの時間が短縮され、解像度がよくなり、ますますその分子疫学的重要性が増した。

SBT 法は、特に冷却塔水分離株が ST1 に偏る (調べた 65 株中 50 株が ST1、77%) ために、結果として、PFGE 法より分解能は劣るものの、データベース化が容易であり、異なる時期、場所での結果の比較が可能である。日本のレジオネラ症の主要な感染源である温泉水分離株については PFGE 同様 SBT についても多様性が認められた。

今年度、中国の環境水からの *Legionella pneumophila* 血清群1分離株について PFGE と SBT を行った結果が、中国 CDC から初めて報告された<sup>4)</sup>。それによると、82 株は 46 種類の PFGE パターンに分けられ、SBT では 22 種類に分けられ、日本の結果と似た傾向だった。22 種類の ST 型のうち、17 種類は新しい型だった。残りの 5 種類のうち、1 つは ST1 で 46.3%

と最も多く、他は、ST150、ST154 など日本の冷却塔水分離株と共通の ST 型が見られた。今後調査が進むにつれて、日本と中国の菌株の共通性や差異がより明確になることが期待される。

#### E. 結論

近年の尿中刻限診断法の普及によりレジオネラ症届出数は 4 類感染症の中でも最大数となっているが、患者から菌株を分離し、感染源を解明することはレジオネラ症予防のための環境水の衛生管理のために重要である。そのための分子疫学的手法としての PFGE 法および SBT 法についての普及が望まれる。

#### 謝辞

今回解析した菌株を分与くださった、縣 邦雄、市瀬正之、井上浩章、権平文夫、鈴木敦子、不二崎順二、薮内英子、和田昭仁、和田正道 (敬称略) の諸氏に感謝いたします。

#### F. 参考文献

- 1) Gaia, V, Fry, NK, Afshar, B, Lück, PC, Meugnier, H, Etienne, J, Peduzzi, R, and Harrison, TG. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-52.
- 2) Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based

- scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Clin. Microbiol. 45:1965-8.
- 3) [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)
- 4) Zhu, BQ, RenHY, Zhou HJ, Qin T, Shao ZJ. 2011. Sequence-based typing of 82 strains of serotype I *Legionella pneumophila* isolated from 9 provinces in China. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 45:890-4.
- 85 回日本感染症学会総会. 東京、2011年4月.
- 2) Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and Fumiaki Kura: *Legionella* isolates from patients in Japan. Annual Meeting of the European Working Group for *Legionella* Infections, Vienna, Austria. May 2011.
- 3) Junko Amemura-Maekawa, Kiyomi Kikukawa J. H. Helbig, Katsunori Furuhashi, Masayuki Ichinose, Atsuko Suzuki-Hashimoto, Bin Chang, Miyo Murai, and Fumiaki Kura: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from bath water, cooling tower water, and soil in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.
- 4) Fumiaki Kura, Junko Amemura-Maekawa, Akiko Kaneko, Toshiro Kuroki, Junko Isobe, Masafumi Nukina, Hiroshi Nakajima, Kimiko Kawano, Yuki Tada, and J. H. Helbig: Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from patients in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 2011.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 西山明宏, 石田直, 興梠陽平, 小西聡史, 坪内和哉, 伊賀知也, 國政啓, 岩破将博, 福山一, 仲川宏昭, 伊藤明広, 生方智, 吉岡弘鎮, 橘洋正, 有田真知子, 橋本徹, 前川純子: *Legionella pneumophila* serogroup 3による呼吸器感染症の4症例. 感染症学雑誌85:373-379 (2011)

### 2. 学会発表

- 1) 原田義高, 吉嶺裕之, 諸角美由紀, 生方公子, 前川純子, 倉 文明, 渡辺喜和雄, 森本浩之輔, 有吉紅也: MultiplexPCRが有用であった *Legionella pneumophila* serogroup 10によるレジオネラ肺炎. 第

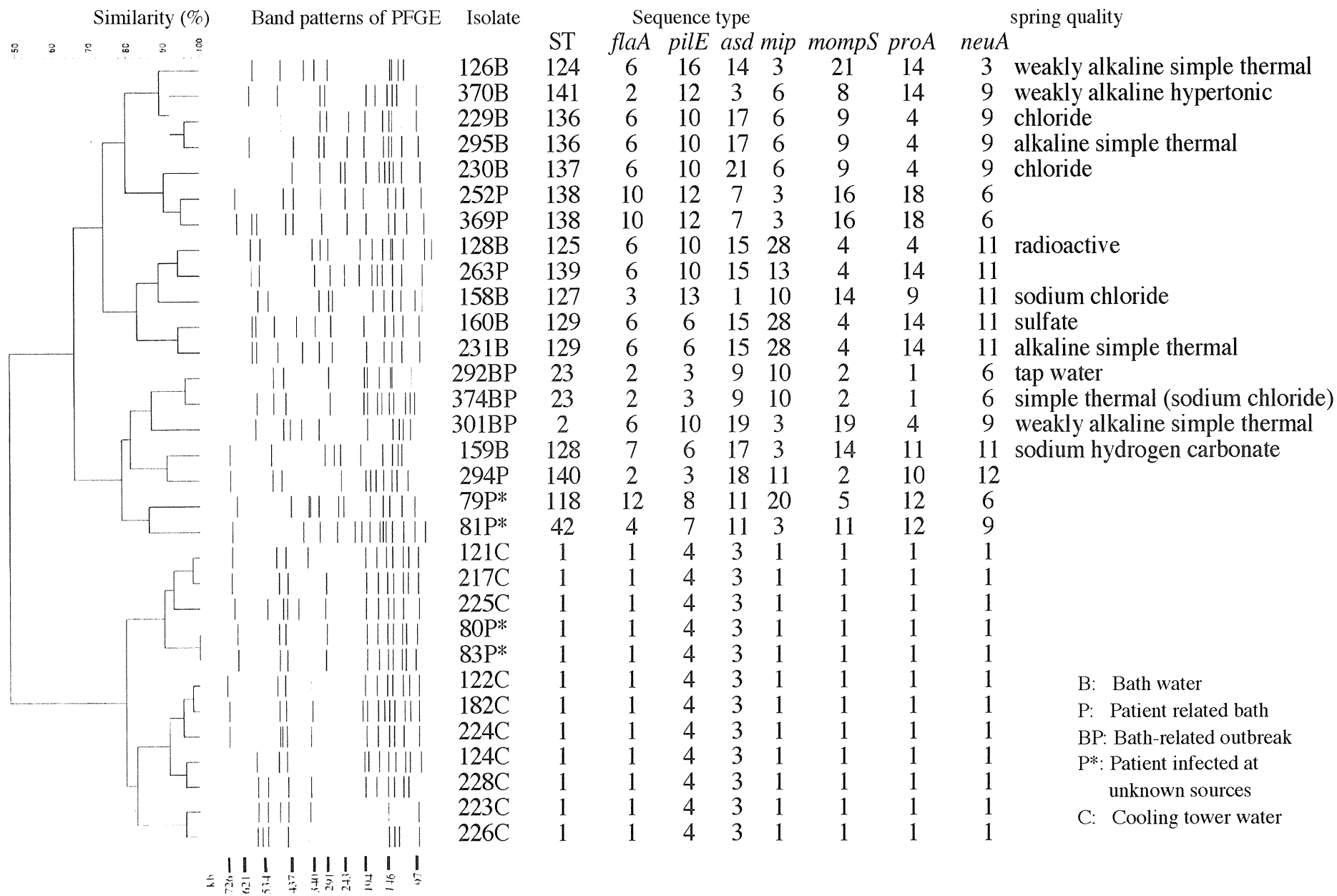


図1 *L. pneumophila*血清群1分離株のPFGEパターンおよびSBT法による型別結果

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の  
強化に関する研究 (H23-新興-指定-020 )

(分担)研究報告書

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の  
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 2009年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)の原因ウイルスは、  
ブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス(SFTS ウイルス: SFTSV)であること  
が中国 CDC によって報告された。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず、  
日本を含めアジア、太平洋地域に広く生息している。本研究で PCR を用いて日本のマダニ  
類から SFTS ウイルスの検出を試みたが、すべて陰性であった。また、リコンビナント  
SFTSV 核蛋白質発現系を作製し、これを抗原とした ELISA および間接蛍光抗体法による  
SFTSV 抗体の検出法を開発した。

研究協力者：福士秀悦、谷英樹、吉河智城、  
谷口怜、伊波興一郎、西條政幸（国立感染  
症研究所ウイルス第一部）、新倉綾（同、  
実験動物管理室）

A 研究目的

2009年3月から7月にかけて、中国湖北  
省と河南省の山岳地域に住む農民の間で、  
発熱、血小板減少、胃腸症状、白血球減少  
を示す急性の疾患として Severe Fever  
with Thrombocytopenia Syndrome  
(SFTS: 重症発熱性血小板減少症)が報告さ  
れた。当初、*Anaplasma phagocytophilum*  
などの細菌感染による顆粒球アナプラズマ  
症が疑われたが、細菌感染は検出されず原

因は不明であった。中国疾病防疫センター  
(CDC)によって、患者末梢血サンプルから  
のウイルス分離が試みられ、2011年、新種  
のSFTSウイルス(SFTSV)の感染が原因で  
あることが報告された。その後の疫学調査  
でSFTSの高い致死率(感染患者の約12%  
が死亡)が明らかになり、ヒトからヒトへ  
の感染事例も報告されたことから、公衆衛  
生上重要なウイルス感染症の一つとして注  
目されている。

SFTSVは、3つのRNAセグメント (S, M  
および, L) をゲノムとしてもつブニヤウイ  
ルス科フレボウイルス属に属する。分子系  
統上、フレボウイルス属はサンドフライ熱  
ウイルスグループ (リフトバレー熱ウイル

ス、プンタトロウイルスなど）とウークニエミウイルスグループに大別される。今回見つかったSFTSVはいずれにも属さず、第三のグループを形成している（図1）。フレボウイルス属の多くのウイルスはスナバエにより感染が媒介されるが、ダニ、蚊により媒介されるウイルスもある（ウークニエミウイルス、リフトバレー熱ウイルス）。SFTSVの感染源を特定するため、中国CDCによりSFTS流行地域の蚊5,900個体が調べられたが、全てPCR陰性であった。一方、*Haemaphysalis longicornis*（フタトゲチマダニ）186個体中10個体（5.4%）が陽性であった。SFTSVが検出されたフタトゲチマダニは中国だけではなく、日本を含めアジア、太平洋沿岸の多くの地域に生息し、ヒツジ、ウシ、ネズミなど多くの哺乳動物を宿主としている。このため、日本を含め、広い地域でSFTSV感染サーベイランスを行う必要がある。

本研究では、中国CDCから提供されたSFTSVの遺伝子配列、PCRプライマー、PCR条件等の情報をもとに、SFTSV検出系を開発し、日本のダニにおけるSFTSVの保有状況を調査する。また、SFTSV抗体検出法を確立し、SFTSの輸入感染事例発生への対応を整備するとともに、日本の野外動物におけるSFTSV感染の有無を調べる。平成23年度は西多摩地方で採取したフタトゲチマダニおよび他のマダニ類からPCRを用いてSFTSV遺伝子の検出を試みた。また、組換えSFTSV核蛋白質(NP)発現系を作製し、これを抗原としたELISAお

よび間接蛍光抗体(IFA)によるSFTSV抗体の検出法について検討した。なお、SFTSVウイルス、ウイルス由来核酸、血清サンプル等は中国側の規制で他国へ分与しておらず、入手出来なかったため、本研究ではSFTSV遺伝子を独自に化学合成して実験に用いた。

## B 研究方法

### ダニ採取

2011年6月および8月に西多摩地方の山中の草が生い茂る場所でダニを採取し、実体顕微鏡を用いて形態学的にダニを分類した。内訳はフタトゲチマダニ51匹、ヒゲナガチマダニ16匹、ヤマトマダニ5匹、キチマダニ2匹であった。

### RNA抽出、cDNA合成およびPCR

1つのチューブあたりダニ個体2-4匹をISOGEN中で破碎し、RNAを抽出した。RT-PCR beads (GEヘルスケア社)を用いてランダムプライマーによりcDNAを合成した。cDNA 1 $\mu$ lを用いて、1) フレボウイルス属共通プライマーセットおよび、2) SFTSV特異的プライマーセットを用いてnested PCRを行った。また、ダニ破碎サンプルからのPCRコントロールとして、3) ダニミトコンドリア16S RNAをターゲットとしたプライマーセットを用いてPCRを行った。プライマー配列を以下に示す。

- 1) フレボウイルス属共通プライマーセット  
1<sup>st</sup> PCR



NPlebo1+: 5'-ATG GAR GGI TTT GTI  
WSI CII CC-3'

NPlebo1-: 5'-AAR TTR CTI GWI GCY  
TTI ARI GTI GC-3'

2<sup>nd</sup> PCR

NPhlebo2+: 5'-WTI CCI AAI CCI YMS  
AAR ATG-3'

NPhlebo2-: 5'-TCY TCY TTR TTY TTR  
ARR TAR CC-3'

2) SFTSV 特異的プライマーセット

1<sup>st</sup> PCR

SFTSV NP-2F: 5'-CAT CAT TGT CTT  
TGC CCT GA-3'

SFTSV NP-1R: 5'-TTC AGC CAC TTC  
ACC CGA A-3'

2<sup>nd</sup> PCR

SFTSV NP-1F: 5'-ATC GTC AAG GCA  
TCA GGG AA-3'

SFTSV NP-2R: 5'-AGA AGA CAG AGT  
TCA CAG CA-3'

3) ダニミトコンドリア 16S RNA をターゲ  
ットとしたプライマーセット

mtrrsH-F: 5'-GTA TTT TGA CTA TAC  
AAA GGT ATT GWA ATAAG-3'

mtrrsH-R: 5'-GTA GGA WTT YAA AAG  
TTG AAC AAA CTT CTT-3'

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP  
調製

SFTSV NP cDNA (Invitrogen 社で合成)を  
バキュロウイルストランスファーベクター

pAcYM1 にクローニングし、バキュロウイ  
ルス DNA とともに昆虫細胞 Tn5 にトラン  
スフェクション後、昆虫細胞抽出液から組  
換え SFTSV NP を調製した。

哺乳動物細胞での SFTSV NP 発現

SFTSV NP cDNA を哺乳動物細胞発現ベク  
ター pKS336 にクローニングし、HeLa 細胞  
にトランスフェクションし、プラストサイ  
ジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択し  
た。NP 遺伝子非導入細胞とミックス後、  
スライドグラス上に塗布し乾燥、固定させ  
IFA 抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清の調製

バキュロウイルス発現系で調整、精製した  
SFTSV NP をウサギに免疫し、ウサギ抗  
SFTSV NP 血清を調製した。

C 結果

PCR による SFTSV 検出

西多摩地方でフタトゲチマダニおよび他  
のマダニ類を採取し、RNA 抽出、cDNA 合  
成後、PCR を行い、SFTSV 遺伝子検出を  
試みた。中国 CDC からの SFTSV 遺伝子、  
PCR プライマー、PCR 条件等の情報を参  
考にし、1) フレボウイルス属共通プライマ  
ーセットおよび、2) SFTSV 特異的プライ  
マーセットを用いた。また、ダニからの  
RNA 抽出、cDNA 合成等の工程のポジティ  
ブコントロールとして、3) ダニミトコンド  
リア 16S RNA をターゲットとしたプライ  
マーセットを用いた。

その結果、フレボウイルス属共通プライマーセットを用いた PCR ではダニは全て陰性であった(図2)。SFTSV 特異的プライマーセットを用いた PCR ではいくつか PCR 産物が認められたが(図2)、これらのダイレクトシーケンスを行ったところ、SFTSV の配列は認められず全て非特異的増幅産物であった(データは示さず)。これらの結果から、今回採取したフタトゲチマダニおよびその他のマダニ類は SFTSV を保有していないと考えられた。

#### SFTSV NP の発現とウサギ抗 SFTSV NP 血清の作製

中国側の規制で SFTSV 遺伝子は入手出来なかったため、SFTSV NP cDNA を化学合成し、これをバキュロウイルス発現系を用いて組換え SFTSV NP を調製した。これをウサギに免疫し、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を作製した(図3)。

#### SFTSV NP ELISA

バキュロウイルス発現系で調製した SFTSV NP を抗原として IgG-ELISA を行ったところ、SFTSV NP はウサギ抗 SFTSV NP 血清 (anti-SFTSV NP) に反応した(希釈倍率 6,400 倍以上)。一方、同じフレボウイルスに属するリフトバレー熱ウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-RVFPV NP) および、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-CCHFV NP, anti-LASV NP, anti-JUNV NP) は SFTSV の NP に反応しなかった(図4)。

#### IFA による SFTSV NP 検出

SFTSV NP を HeLa 細胞で発現させ、細胞塗抹標本をアセトン固定し IFA 抗原とした。ウサギ anti-SFTSV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に特異的に反応し、RVFV 感染細胞には反応しなかった。一方、ウサギ anti-RVFPV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に反応しなかった(図5)。

#### D 考察

SFTS はその高い致死率と、ヒト-ヒト感染を起こす可能性があることから、公衆衛生上重要なウイルス感染症の一つとして注目されている。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず日本全国に分布し、多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、我が国においてもマダニ類が SFTSV あるいは近縁のウイルスを保有するかどうか調査することが必要である。また、グローバル化が急速に進展している近年において SFTS が輸入感染症として持ち込まれる可能性があるため、我が国においても SFTSV 抗体検出等の実験室診断法を整備しておかなければならない。本年度の研究において、西多摩地域のマダニ類から PCR で SFTSV 遺伝子は検出されなかったことから、本地域のマダニ類が SFTSV あるいは近縁のウイルスを保有している可能性は低いと考えられた。今後、マダニ類の調査域を拡げるとともに、SFTSV あるいは近縁のウイルスを高感度に検出するような PCR プライマーの設計を行う必要がある。

また、本研究で開発した、ELISA あるいは IFA により抗 SFTSV NP 抗体を特異的に検出することが可能となった。この抗体検出系の有用性を評価するためには、SFTS 患者あるいは感染動物の血清サンプルを用いることが必須である。今後、中国 CDC との国際共同研究を一層推し進めていく必要がある。

#### E 結論

(1) 中国 CDC からの SFTSV 遺伝子、PCR プライマー、PCR 条件等の情報を参考にし、フレボウイルス属共通プライマー、SFTSV 特異的プライマーを用いて、日本のマダニ類から SFTSV 遺伝子検出を試みたが、すべて陰性であった。

(2) SFTSV ウイルスそのもの、血清サンプル等は中国側の規制で他国へ分与しておらず、入手出来なかったため、SFTSV 遺伝子を独自に化学合成して SFTSV NP 発現系を作製した。

(3) 本研究で開発した ELISA および IFA により SFTSV NP に対する抗体を特異的に検出することが可能となった。

(4) 来年度以降、マダニ類における SFTSV 保有調査の継続と PCR 法の改良を行う。また、ELISA および IFA の有用性の評価が必要である。

#### F 論文発表

- 1) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. J Virol Methods. 2012 in press

#### G 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

図 1) フレボウイルス属の分子系統樹

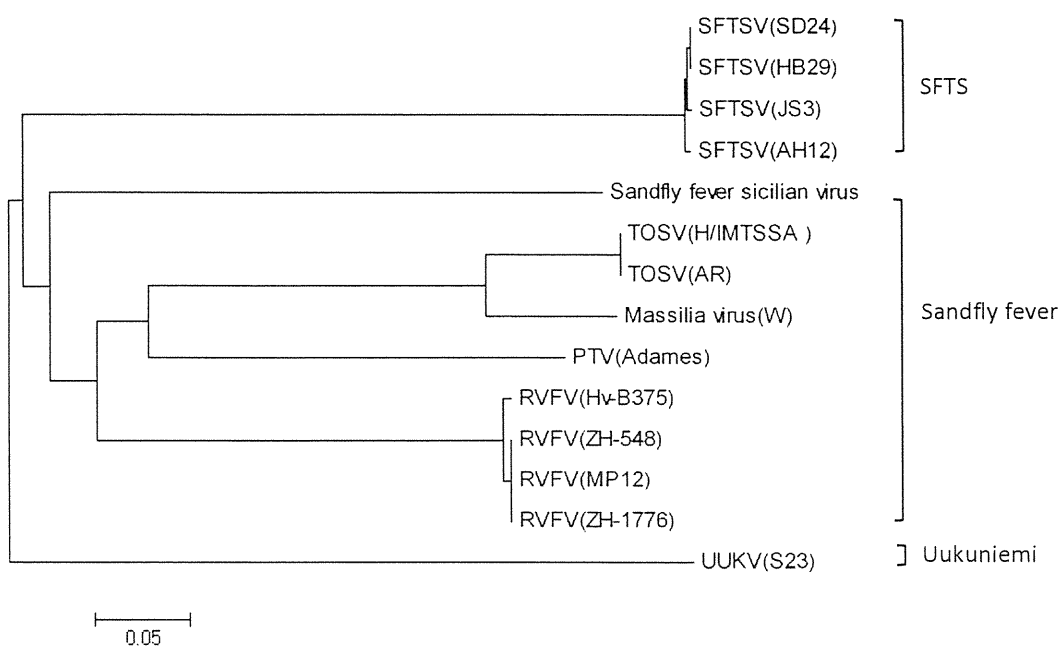


図 2) PCR の結果

