

ないウイルスも分離されている。フィリピン、インドネシア共に島の多い国であることから今後は詳しい旅行歴をデータに組み入れる必要がある。しかし、フィリピンのデングウイルス 1 型、2 型株は極めて近縁であったことから、2011 年の主流株の起源は単一のウイルスであった可能性が高い。

E. 健康危機情報

フィリピン、インドネシアとも 2011 年にデングウイルス 4 型による流行があったことが本研究から確認された。4 型ウイルスはアジアではまだ大きな流行を起こしておらず、今後大きな流行を起こす可能性がある。また、8 月に台湾 CDC はフィリピン（ミンダナオ島）からの輸入チクングニア症例を確認した。フィリピン熱帯医学研究所（RITM）に確認したところ、チクングニア熱のミンダナオ島での流行が確認された。

F. 研究発表

論文発表（英文）

なし

学会発表

なし

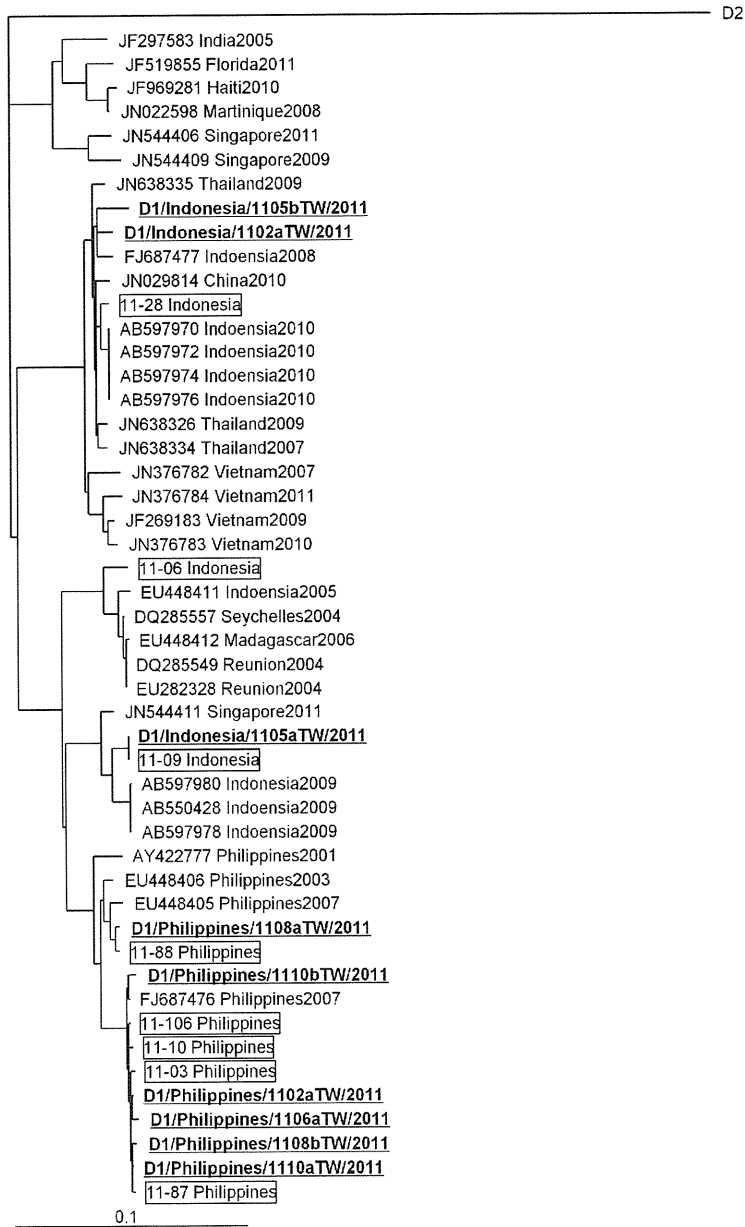
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1、日本と台湾における分離株遺伝子解析リスト

	SEQ serial number_Taiwan	SEQ serial number_JAPAN
1	D1/Indonesia/1102aTW/2011	D1/11-06/Indonesia_NIID
2	D1/Indonesia/1105aTW/2011	D1/11-09/Indonesia_NIID
3	D1/Indonesia/1105bTW/2011	D1/11-28/Indonesia_NIID
4	D3/Indonesia/1106aTW/2011	D2/11-92/Indonesia_NIID
5	D3/Indonesia/1108aTW/2011	D1/11-03/Philippines_NIID
6	D4/Indonesia/1105aTW/2011	D1/11-88/Philippines_NIID
7	D4/Indonesia/1107aTW/2011	D1/11-106/Philippines_NIID
8	D4/Indonesia/1109aTW/2011	D2/11-75/Philippines_NIID
9	D1/Philippines/1102aTW/2011	D3/11-86/Philippines_NIID
10	D1/Philippines/1106aTW/2011	
11	D1/Philippines/1108aTW/2011	
12	D1/Philippines/1108bTW/2011	
13	D1/Philippines/1110aTW/2011	
14	D1/Philippines/1110bTW/2011	
15	D2/Philippines/1102aTW/2011	
16	D2/Philippines/1107aTW/2011	
17	D2/Philippines/1109aTW/2011	
18	D3/Philippines/1102aTW/2011	
19	D3/Philippines/1108aTW/2011	
20	D3/Philippines/1110aTW/2011	
21	D4/Philippines/1101aTW/2011	
22	D4/Philippines/1108aTW/2011	
23	D4/Philippines/1108bTW/2011	

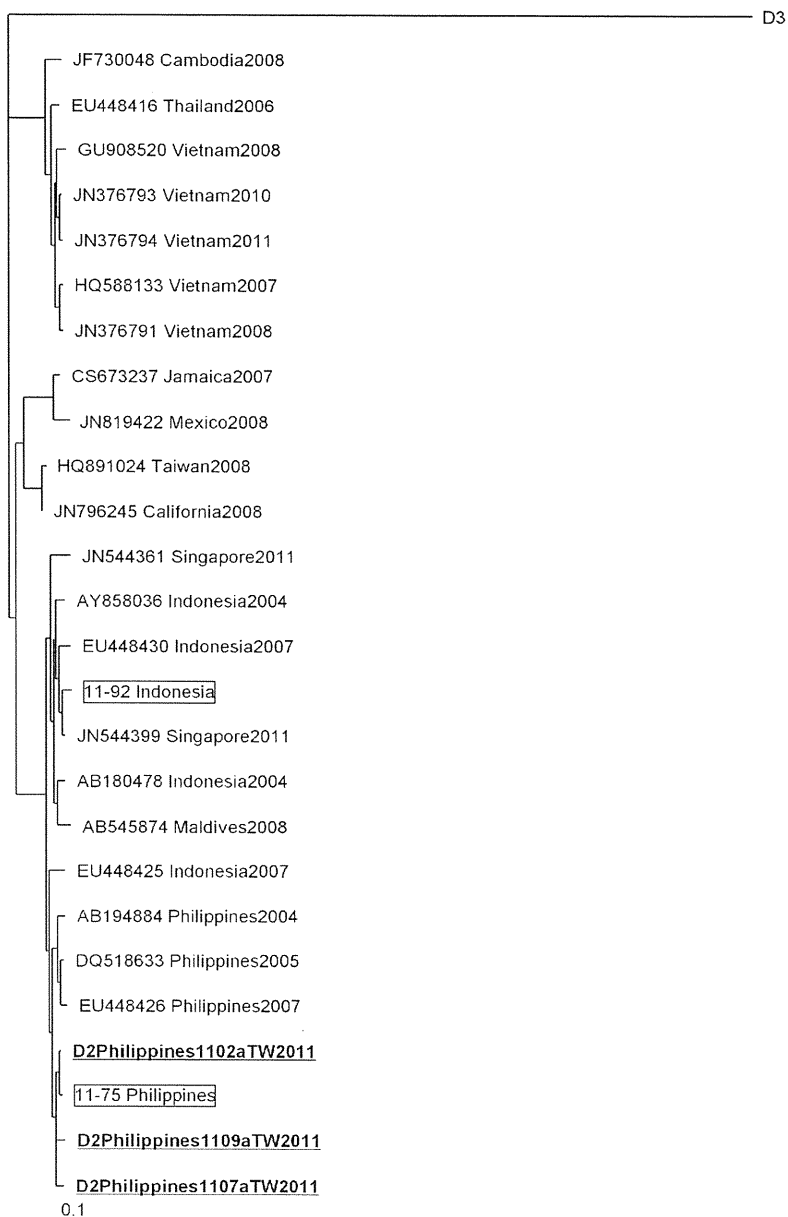
図1、デングウイルス1型系統樹



太字_下線；台湾の分離株

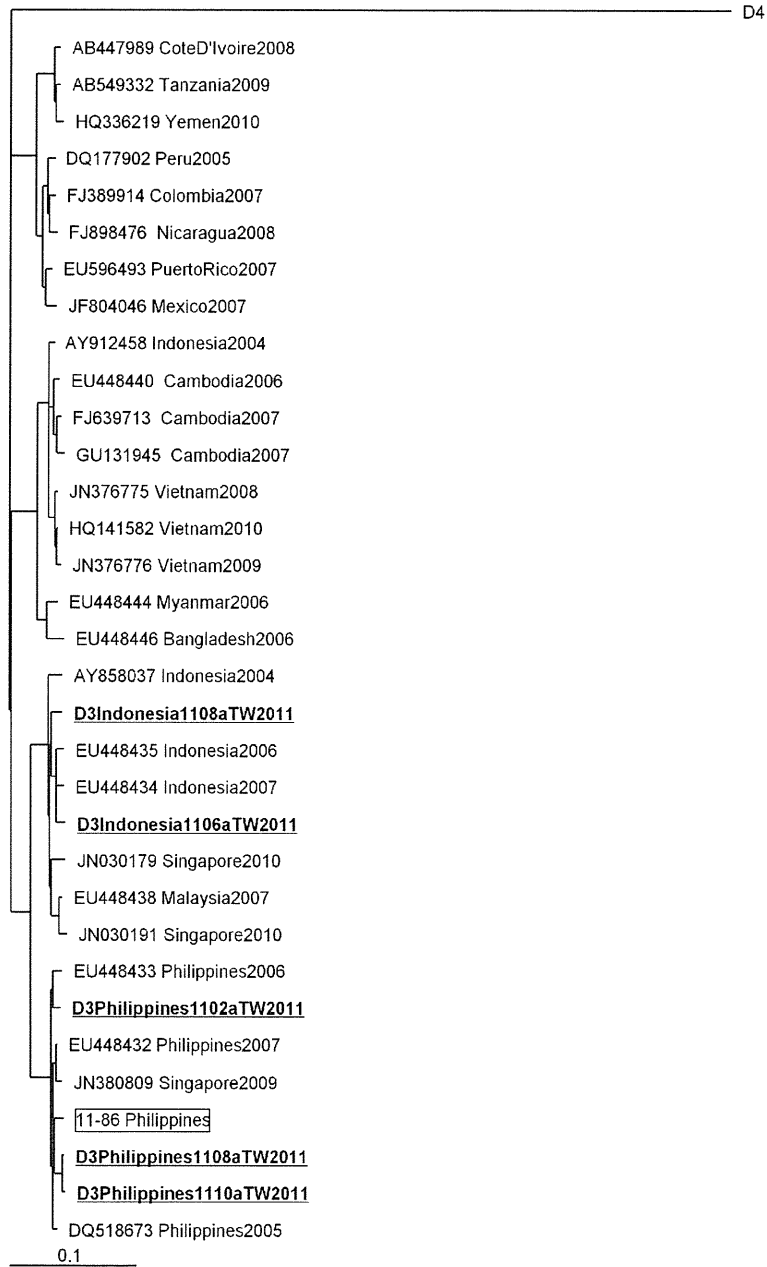
囲み；日本の分離株

図 2、デングウイルス 2 型系統樹



太字_下線 ; 台湾の分離株
 囲み ; 日本の分離株

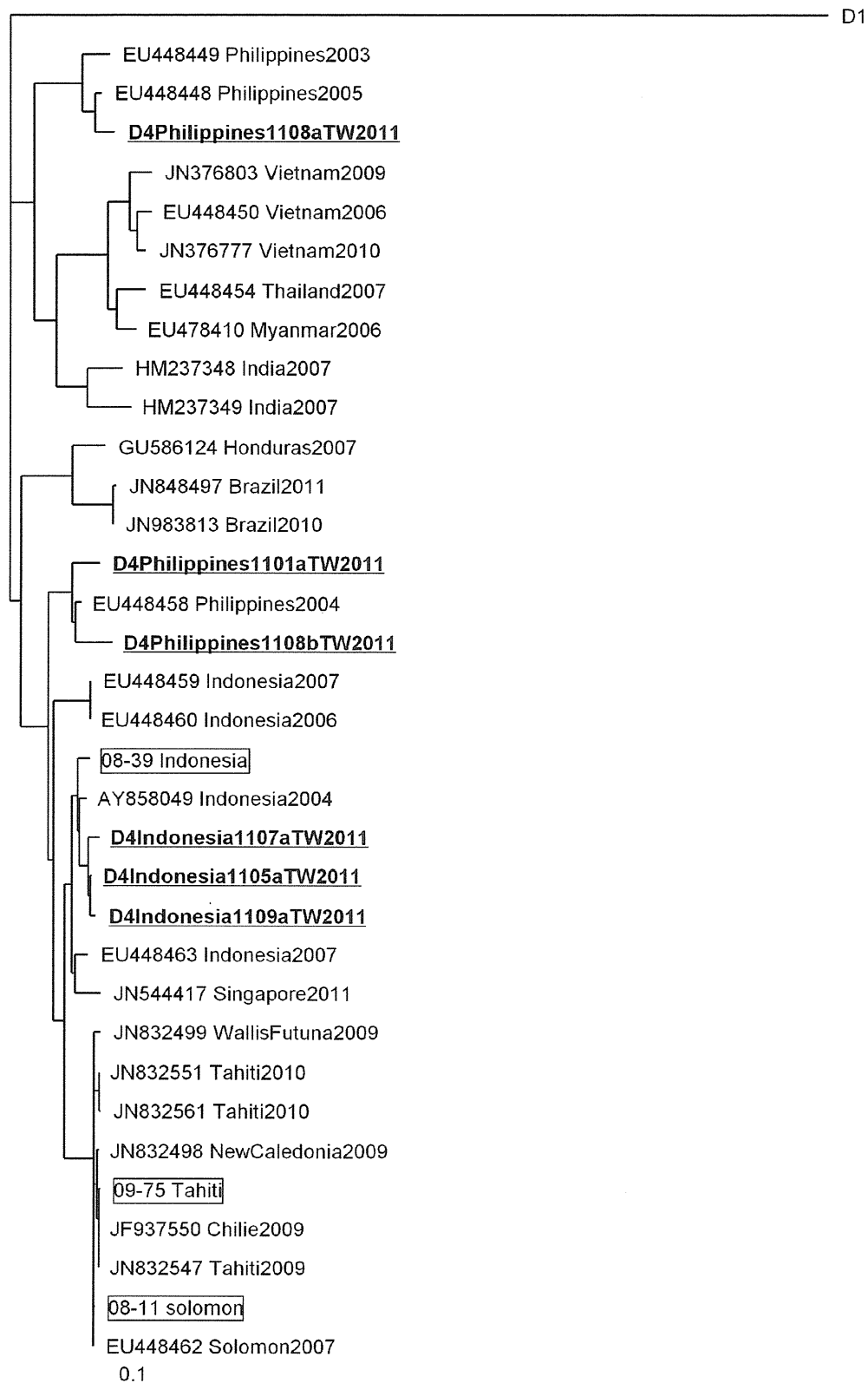
図 3、デングウイルス 3 型系統樹



太字_下線；台湾の分離株

囲み；日本の分離株

図4、デングウイルス4型系統樹



太字_下線 ; 台湾の分離株、囲み ; 日本の分離株

結核菌の薬剤耐性(台湾 CDC)
NDM-1 型薬剤耐性菌(ベトナム NIHE)
Clostridium difficile の分子疫学(ベトナム NIHE)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)

研究要旨

ピラジナミド (PZA) は結核菌の菌体内でピラジナミダーゼにより活性型のピラジン酸 (POA) に変換され、抗菌活性を示すことが知られている。結核菌の PZA 耐性はピラジナミダーゼの変異によるものがほとんどだが、台湾 CDC でピラジナミダーゼに変異を持たない PZA 耐性株が分離された。この株を用いて POA の標的分子の解析を行った。我々がこれまでに明らかにした標的分子ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Rv1330c) については、変異が見られなかった。今後、ゲノム解析、メタボローム解析により標的分子の検索を行う。NDM-1 型薬剤耐性菌、*Clostridium difficile* については、ベトナムと日本で分離される株の分子疫学解析を行うことで合意した。

研究協力者

森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部)
加藤 はる (国立感染症研究所・細菌第二部)
和知野純一 (国立感染症研究所・細菌第二部)

ベトナムでは嫌気性菌を培養出来るラボがなく、*C. difficile* についても実態が全く分かっていない。日本や欧米では、流行株についての分子疫学解析が進められている。この研究では、ベトナムでの流行株の実態を把握することを目的とした。

A. 研究目的

結核症の第一選択薬であるピラジナミド (PZA) はニコチンアミドの構造類縁体であり、菌体内においてピラジナミダーゼ (ニコチンアミダーゼ) によって加水分解されて活性型のピラジン酸 (POA) になり抗菌活性を示すことが明らかにされている。結核菌の PZA 耐性はピラジナミダーゼに変異が入って、PZA が活性型の POA に変換されなくなることによるものがほとんどである。POA の標的分子については不明な点が多く、結核菌における PZA 作用メカニズムの全容は明らかでない。POA の標的分子は複数であると予想されているが、我々はこれまでに、結核菌のニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Rv1330c) が POA の標的分子の一つであることを明らかにしてきた。我々は台湾 CDC と共同で、ピラジナミドの作用メカニズムを解明していくことを目的とした。

NDM-1 型カルバペネマーゼ産生菌については、2010 年に日本国内で 2 株が分離されたが、ベトナムではすでに数十株が分離されており、実際には臨床現場でかなり蔓延していると考えられている。この研究ではベトナムで分離される NDM-1 遺伝子をもつ菌株について、実態を把握することを目的とした。

Clostridium difficile は、抗菌薬関連下痢症として重要な病原細菌だが、この菌は嫌気性菌である。

B. 研究方法

台湾 CDC で分離された PZA 耐性結核菌で、ピラジナミダーゼに変異をもたない株を加熱処理して感染研に送付してもらい、ピラジナミダーゼ遺伝子、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子の変異の有無を調べた。

NDM-1 型カルバペネマーゼ産生菌、*C. difficile* については、ベトナムの状況を聞き取りし、今後の方針を検討した。

倫理面への配慮 該当なし。

C. 研究結果

台湾 CDC では、台湾全土から薬剤耐性結核菌を収集し、関連遺伝子の変異を調べ、データベースを構築している (<http://www.tbdreamdb.com/>)。台湾 CDC でピラジナミダーゼに変異を持たない PZA 耐性株が見出された。台湾 CDC より菌株(死菌)を感染研に送付してもらい、ピラジナミダーゼ遺伝子の塩基配列を感染研でも再度確認した結果、PZA 耐性に関わる変異はなかった。ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列を調べたところ、感受性株 H37Rv 株のものと全く同じだった。これらの結果から、この株の PZA 耐性はニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子の変異によるものではないことが分かった。

NDM-1型カルバペネマーゼ産生菌については、我々はこれまでに簡便なディスク検出法を開発した。また、国内分離株のゲノム解析を行ったところである。ベトナム NIHE では、ベトナム国内の医療機関において分離されたカルバペネム耐性菌株について PCR によるスクリーニングを行い、数十株の NDM-1 遺伝子陽性株を見出した。カルバペネム耐性菌のうち NDM-1 陽性のもののがかなり多いとのことだった。詳細データは近日に Publish される予定であるとのことだった。

C. difficile については、これまでベトナム国内で嫌気性菌の培養や研究が行えるラボが無かったので、これから NIHE において研究室を立ち上げるところである。感染研から、培養方法等に関する情報を提供した。

D. 考察

台湾で分離された結核菌株の PZA 耐性は、ピラジナミダーゼの変異によるものではないこと、そしてニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの変異もなかったことから、耐性はこれまでに知られていない変異によるものと考えられた。今後、ゲノム解析、メタボローム解析を行って、PZA の代謝を追跡して標的分子を同定し、この株の PZA 耐性メカニズムを明らかにしていきたい。

NDM-1 型カルバペネマーゼ産生菌については、NIHE で確認された株が、本当に NDM-1 産生株であることを感染研側においても遺伝子の解析等により確認する必要があると考えられる。一方、NIHE には感染研が開発した簡便なディスク法を技術供与し、NIHE での実態調査が迅速、簡便に実施されるようにする必要がある。また、調査を始めるにあたってベトナムでこれまでに分離さ

れた NDM-1 産生株を用いてこの方法が問題なく応用できるかどうかの検証も行う。今後、菌株の分与を求め、プラスミドのゲノム解析を行う。ベトナム国内での実態調査で分離された菌株について、分子疫学解析を行う。

C. difficile については、NIHE でラボの立ち上げを早急に進める必要が有る。今後、必要なアドバイス等を行い、早期に分子疫学解析が行える体制を整える。

E. 結論

台湾においてピラジナミダーゼに変異を持たない PZA 耐性結核菌を分離した。Rv1330c の変異もなかった。未知の変異によるものと考えられた。

ベトナムでの NDM-1 型カルバペネマーゼ産生菌、*C. difficile* の分子疫学解析を行うこととした。

以上の活動を通じて、台湾 CDC、ベトナム NIHE の担当者との人的な交流が出来、今後の情報交換を円滑に行う素地を醸成することが出来た。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

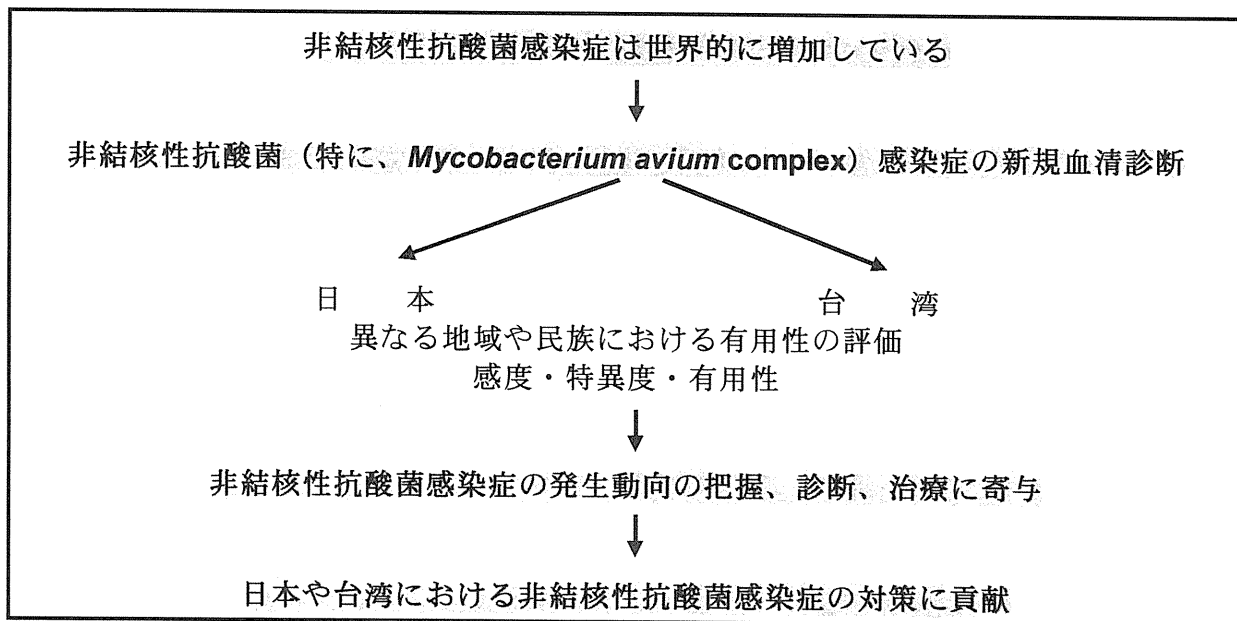
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

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）
平成 23 年度分担研究報告書

- 研究課題： 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）
- 研究代表者： 国立感染症研究所・副所長 倉根 一郎
- 分担研究課題： 非結核性抗酸菌感染症の研究
- 研究分担者： 国立感染症研究所・免疫部長 小林 和夫
- 研究協力者： 台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室・請負人 周 如文
- 研究協力者： 国立台湾大学医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源
- 研究協力者： 国立感染症研究所・免疫部第二室長 阿戸 学
- 研究協力者： 国立感染症研究所・免疫部第二室研究員 松村 隆之
- 研究協力者： 大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学准教授 松本 壮吉
- 研究協力者： 国立病院機構刀根山病院・副院長 前倉 亮治
- 研究協力者： 国立病院機構刀根山病院・呼吸器内科医長 北田 清悟

研究要旨

活動性非結核性抗酸菌（特に、*Mycobacterium avium complex* : MAC）感染症の迅速簡便血清診断（所要：約 3 時間）の研究開発に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局 周 如文 博士、国立台湾大学病院医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源 博士と日台共同研究を推進することを合意した。研究分担者は血清診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の開発に寄与し、本キットは体外診断用医薬品製造販売承認（厚生労働省）され、2011 年 8 月に日本で上市、保険医療対象検査項目となった。しかし、本キットの異なる地域や民族における有用性に関する国際評価は未了である。現在、国際評価に資するため、ヒトを対象とする医学研究倫理審査申請を準備、その後、台湾の供試血清を収集、抗体価を測定し、性能を評価する。



A. 研究目的

非結核性抗酸菌（NTM）感染症は結核など抗酸菌

感染症の約 20%を占め、世界的に増加している。特に、*Mycobacterium avium complex*（MAC）感染症

は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成される。アメリカ合衆国胸部疾患学会および感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致した活動性 MAC 感染症に関し、感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体検出の診断キットを開発した。国内検体では診断感度：84%、特異度：100%、また、所要時間は 3 時間 (従来法では約 1 か月) であり、高い臨床的有用性を示し、厚生労働省は体外診断用医薬品製造販売承認し、保険医療品目として収載されている (2011 年 8 月)。

この診断キットは GPL 特異的 IgA 抗体応答を指標しているため、人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。加えて、非結核性抗酸菌感染症は地域により、原因菌種の頻度が異なることが知られている。

本診断キットの国際的有用性を検証するため、日本と異なる地域や民族 (台湾) における性能評価を目的とした。

B. 研究方法

活動性抗酸菌感染症の血清

抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) の血清を収集する。

キャピリア® MAC 抗体酵素免疫測定 (ELISA) による血清抗体価の測定

MAC 感染症の MAC 特異抗原に対する血清 IgA 抗体を検出する迅速血清診断キット (所要：約 3 時間、キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ) を用い、血清抗体価を測定する。

倫理面への配慮

ヒトを対象とする医学研究倫理に関し、国立感染症研究所、台湾行政院衛生署疾病管制局や国立台湾大学病院で申請書を作成、機関で承認を得る。なお、利益相反はなかった。

C. 研究結果

対象患者候補の選定

抗酸菌感染症 (MAC を含む非結核性抗酸菌抗酸菌、結核) 患者候補を選択した。今後、ヒトを対象とする医学研究倫理審査承認後、登録し、血清を収集する。

ヒトを対象とする医学研究倫理審査

血清検体の収集に先立ち、ヒトを対象とする医学研究倫理審査申請書の作成について、電子郵便による事前協議を終了し、2012 年 2 月 07-09 日に渡台し、台湾行政院衛生署疾病管制局や国立台湾大学病院附設医院内科部と最終協議し、大筋合意した。

D. 考察

非結核性抗酸菌 (NTM) 感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占め、世界的に増加している。特

に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。NTM 感染症の診断は米国胸部疾患学会 / 感染症学会の診断基準 (2007 年) により、診断される。その骨子は 1) 臨床症状 (慢性咳嗽、喀痰、発熱など)、2) 画像所見 (浸潤、空洞、気管支拡張) および 3) 細菌学的所見 (喀痰培養：2 回以上陽性) から構成されている。MAC は遅発性 (集落形成に約 2 週間が必要) であり、細菌学的所見 (喀痰培養：2 回以上陽性) を満足するため、約 1 か月が必要となる。

この診断キットは MAC 特異的細胞壁抗原 (GPL) を用い、特異的 IgA 抗体応答を指標とし、日本国内の性能評価で感度 (84%)、特異度 (100%)、迅速性 (所要時間：3 時間) など、高い有用性を具備している。しかし、宿主抗体応答は人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。加えて、非結核性抗酸菌感染症は地域により、原因菌種が異なることが知られている。

今後、台湾で収集した供試血清 (目標：100 症例程度) を用い、MAC 感染症の国際的診断基準であるアメリカ合衆国胸部疾患学会および感染症学会の診断基準 (2007 年) (所要：約 1 か月) を対照として、MAC 感染症の MAC 特異抗原に対する血清 IgA 抗体を検出する迅速血清診断 (所要：約 3 時間、キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ) に関する日本および台湾の診断感度・特異度・臨床的有用性を評価・検証する。

E. 結論

- 活動性非結核性抗酸菌感染症の血清診断に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室と国立台湾大学病院で日台共同研究の推進に合意した。
- 日台共同で具体的な研究計画を作成し、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会に申請することになった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Kobayashi, K.**, M. Ato, and S. Matsumoto. 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Disaster Res.* 6: 443-450.
- 2) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and S. Matsumoto. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against

DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.

- 3) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Vaccine 29: 6881-6887.
- 4) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193: 5766-5774.
- 5) Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. J. Biol. Chem. 286: 44153-44161.

3. その他

特になし

2. 学会発表

- 1) 小林和夫、光山 正雄. 2011. 結核研究の最先端 (シンポジウム 10-S-4). 学術講演要旨 246, 2011. 第 28 回日本医学会総会 (東京、4 月—誌上開催).
- 2) 松本壮吉、岡 真優子、北田清悟、前倉亮治、小林和夫、2011. 結核研究の最先端 (シンポジウム 10-S-4). 学術講演要旨 246, 2011. 第 28 回日本医学会総会 (東京、4 月—誌上開催)
- 3) 小林和夫. 2011. 感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究 (Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症). 日臨免誌、34 : 268、2011. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 (東京、9 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし

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「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

ハンセン病の病原性と薬剤耐性に関する日台共同研究

研究分担者 甲斐 雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 第3室長
研究協力者 牧野 正彦 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 部長
研究協力者 前田 百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 主任研究官

研究要旨 本年度より新たに開始した台湾 CDC との共同研究の内容として、第1はハンセン病の血清診断法の開発と評価であり、第2にハンセン病の起原菌であるらい菌の薬剤耐性に関する遺伝子変異の検出である。台湾のハンセン病患者血清を用い、らい菌由来診断抗原候補の血清診断を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。今後、健康人及びらい菌と同じ抗酸菌である結核菌による感染で生じる結核患者の血清を用いて、本法のハンセン病血清診断法としての特異度・感度を測定する予定である。

薬剤耐性変異の検出では13例中5例の結果を得ることができたが、増幅効率が低いので、今後はDNA抽出やPCR反応系等台湾と技術の統一を図り、より高感度にする必要がある。また、1例のダプソン耐性変異を発見したので、症例情報と比較した結果、耐性が疑われる難治例であることがわかった。

A. 研究目的

ハンセン病対策は世界保健機関（WHO）が1981年より推奨してきた多剤併用療法が効果を奏して感染者の発症数は激減してきた。しかし、今なお世界の登録患者数及び新患発生数は約20万人を数え、最近では新患発生数の減少傾向も見られなくなっているのが現状である。また薬剤耐性菌の関与が疑われている再燃や再発などの難治例も無視できない状況である。多くの東南アジア諸国は登録患者の数値ではハンセン病流行国としての登録からは外れたものの、未だにインド、インドネシア、ネパール、ベトナム、ミャンマーなどでは流行地域が存在する国が多く、それぞれの国全体の感染症対策においてもまだ重要な対象感染症となっている。この現状を踏まえ、新患者数を減少させ、さらには難治性ハンセン病を治療するためには、ハンセン病の早期診断、治療

経過のモニタリング、薬剤耐性菌の調査、発生源となりうる感染者の発見と感染予防、発症前予防などが必要と考えられる。これまでハンセン病研究センターでは東南アジア諸国でのハンセン病対策のため施設の充実やスタッフの技術力向上の一助を担い、協力関係を構築してきた。そこで、新たに協力研究を開始した台湾においても培ってきた協力研究の成果を活かし推進することによりさらにハンセン病の理解と制圧を目指すものである。そのために以下のような事業を展開していく予定である。第1に、ハンセン病の早期診断を可能にするため、これまで行ってきた抗原を用いたハンセン病の血清診断法を台湾のハンセン病患者由来血清の試験と新しい診断用抗原を用いた診断法の開発及び導入である。第2に、各国から報告が散見される薬剤耐性菌の台湾における動向調査である。

薬剤耐性菌の存在は世界各地より散発的な報告があるものの、その伝播状況を正確に把握する必要があり、WHO の GLP (global leprosy program)は2007年より世界各地に耐性菌の監視拠点を設定し、その実態把握のための事業を開始した。各拠点で採取された検体はハンセン病研究センターを含む9カ国 17カ所の検査機関において Drug Resistance Determining Region (DRDR)における遺伝子変異の検索が行われ、ダプソン、リファンピシン、キノロンに対する耐性の有無の判定がなされている。台湾 CDC から本事業への参加を希望する声があり現在 GLP チームリーダーが台湾の参加も検討しているところである。このような協力促進を含めアジアの連携体制の強化を目指すものである。

B. 研究方法

精製したらい菌膜タンパク抗原 Major membrane protein-I (MMP-I)と MMP-II のハンセン病患者血清との反応性を ELISA 法で確認する。この精製抗原を用い、台湾のハンセン病患者血清 98 検体について検討する。本血清は台湾市郊外にある元ハンセン病療養所を持つ病院、楽生療養院が保存している患者血清である。特異性や感度あるいは病型、臨床症状との相関性について解析する。

MDT で用いられているダプソン、リファンピシン及び2次薬剤として利用されているキノロン剤であるオフロキサシンに対する薬剤耐性を惹起することが明らかとなっている遺伝子、*folP1*, *rpoB* そして *gyrA* 遺伝子の耐性とかかわる領域である Drug Resistance Determining Region (DRDR)における変異を迅速・簡便に検出する。ハンセン病患者由来の生検材料は台湾 CDC が収集し DNA 抽出を行い、その一部を分与された。DNA から各遺伝子を個別に PCR 増幅し、DRDR における変異の有無を直接シーケンスすることにより検出する。台湾 CDC と日本のハンセン病研究センターで独立に試験しその結果を照合した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を含まない。分担研究、共同研究者の所属する両施設の倫理委員会の承認を得て行った。検体の採取は通常の菌検査

において実施される方法であり、その方法は特段の侵襲性を有するものではなく、菌の解析は患者のプライバシーには抵触しない。患者に対しては目的を説明し、同意が得られた場合にのみ検体の採取を実施した。

C. 研究結果

ハンセン病患者血清の詳細な情報はまだ調査中であり、少菌型、多菌型の区別はできていないものの全体として、患者由来サンプル 98 検体の ELISA を3種の抗原を用いて行った。

台湾の健常人血清がないことから現時点では正確なカットオフ値が算出されなかったため、今回は我々が保存している陽性血清コントロールの値の10%以上の値を示すものを陽性とした結果、表1のように従来法で用いられる抗原 PGL-I で62%陽性であるのに対し、MMP-II で87%と高い陽性率を示した。また、新しく調整した抗原 MMP-I では91%とも高い陽性率を示した。

表 1

Antigen	No. of positive	No of sera	Positive rate
PGL-I	61	98	62%
MMP-II	85	98	87%
MMP-I	89	98	91%

薬剤耐性変異については、これまでに、ダプソン耐性をもたらすことが知られている *folP1* 遺伝子のコドン 53 位と 55 位、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子 4 カ所 (410 位、420 位、425 位、427 位) 及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子 2 カ所 (89 位、91 位) の変異の有無を 13 検体について調べた。変異検出のための陰性コントロールとして標準株である Thai-53 株の DNA についても検討した。

表 2

Sample	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	wt	wt	wt
NTU002	wt	wt	wt
NTU003	wt	wt	wt
NTU004	T53R★	wt	wt
NTU007	wt	wt	-

★ T53R: *folP1* 遺伝子の 53 位トレオニンがアルギニンに変異

13 検体での各標的遺伝子増幅は台湾と日本で感度に差が生じたので、表 2 には両者で共通であったものをまとめた。NTU004 は *folPI* 遺伝子の 53 位のアミノ酸に変異があり、ダブソン耐性をもたらすことが推察された。他は変異が認められず、各薬剤に対して感受性であることがわかった。

D. 考察

今回の血清診断試験では、従来法に使用する PGL-I での値に比べ MMP-II はより高い陽性率であり、他の東南アジア諸国で得られた結果とほぼ同様であった。血清の少菌型、多菌型の区別がわからないので従来法より少菌型が高い値を示したかどうかはまだ判定できないが、いい結果が期待できるだろう。MMP-II よりいい結果を MMP-I が示したことは大変興味深く、また期待もできそうであるが、結核患者や健常人のデータを揃え特異度を検討し、今後正確な評価をする必要がある。

13 検体中、ダブソン耐性変異が 1 つ検出された。このトレオニンからアルギニンへの変異はコドンの ACC が AGA に変わる変異であった。このように 2 つの塩基が変化している例はこれまでほとんど見られないことから大変興味深い結果であった。また、患者データからも NTU004 は多菌型患者であり、臨床的にも薬剤耐性が疑われた例であることが台湾 CDC からの情報でわかり、この変異検出の有有用性をお互いに再認識することができた。

E. 結論

台湾でのハンセン病患者血清を用い、血清診断法の評価を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。今後、健常人及びらい菌と同じ抗酸菌である結核菌による感染で生じる結核患者の血清を用いて、本法のハンセン病血清診断法としての特異度・感度を測定する予定である。

薬剤耐性変異の検出では 13 例中 5 例の結果を得ることができたが、増幅効率が低いので、今後は DNA 抽出や PCR 反応系等台湾と技術の統一を図り、より高感度にする必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. Vol. 64: 246-248, 2011.
- 2) Nakata N., Kai M., Makino M. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. Doi:10.1128/AAC. 05831-11, 2012
- 3) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol. Vol. 50: 742-753, 2011

2. 学会発表

- 1) 甲斐雅規、松岡正典、宮本友司、中田登、牧野正彦：増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析。第 83 回日本ハンセン病学会総会、岡山市、2011 年 5 月
- 2) Amako, K., K. Iida, M. Kai, M. Matsuoka, and S. Yoshida. *In vitro* cultivation of *Mycobacterium leprae* in microaerophilic or anaerobic conditions. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 3) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 4) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 5) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 7) Tsukamoto, Y., E. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae rpoB* gene and rifampicin resistance. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他 著書
1) 著者名Kai M. 編集・分担執筆
Edited by Makino, M., M. Matsuoka, M. Gotoh, and K. Hatano.
書名 Leprosy chapter 9 Serology.
Tokai University Press, Kanagawa, Japan Total page 274 (partial page 108-115) 2011

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)

下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨： ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、新たな流行を起こすと考えられている。Genotype の変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC と、両国における 2010 年以降 2012 年度末まで、3 年間、NoV, SaV の流行状況、流行株の変遷を経時的に解析し、流行のメカニズムを研究する。初年度は、簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法の検討、評価を試みた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、毎年新たな流行を繰り返すと考えられている。Genotype の全世界的変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、両ウイルスの流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC と、両国における 2010 年以降 2012 年度末まで、3 年間、両ウイルスの流行状況、流行株の変

遷を経時的に解析し、ウイルス流行のメカニズムを研究することに取り組んだ。また、簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法と、分子疫学解析手法の開発も開始した。本研究のカウンターパートは、台湾 CDC Director, Research & Diagnostic Center Director, National Influenza Center Centers for Disease Control, DOH, Taiwan, Ho-Sheng Wu, Ph. D. (吳 和生), Head, Viral Enteric & Emerging Disease Lab Research & Diagnostic Center, Jyh-Yuanh Yang, Ph. D. (楊 志元), Viral Enteric & Emerging Disease Lab, Research &

Dianostic Center, Fang-Tzy Wu, Ms. (呉 芳姿) の3名である。

具体的には、新規迅速診断システムとして、Super rapid real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR, long distance RT-PCRの構築、ELISA, イムノクロマトグラフィー (IC) を用いた抗原検出システムの評価、応用、NoV, SaVのキメラに対応した新規genotyping system構築と評価を行う。疫学調査として、台湾における流行の把握、genotype, 流行の経時的变化を日本と比較検討する。これらの検討を、台湾CDC職員を長期研修として感染研に受け入れ、技術の共同開発、共同研究を行う。本年度は、NoVのsuper rapid real-time RT-PCRの検討を開始した。

B. 研究方法

1. 材料と方法

<NoV, SaV 陽性検体>

台湾 CDC によって 2010 年から 2011 年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体を NoV, SaV のコンベンショナルな RT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を呈した糞便検体 169 検体を対象とした。

これらの検体は、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990 年から 1999 年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体である。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべての genotype の約 90% をカバーする糞便レファレンスパネルとして保管管理運用してい

る。本研究では、132 検体を新手法の評価用レファレンスパネルとして用いた。

<コンベンショナル RT-PCR>

NoV の検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告された G1SKF & R, G2SKF & R プライマーセットを用いた RT-PCR を行った。

<Super rapid RT-PCR>

Shimazu 社によって開発され、供給されているノロウイルス GI, GII 検出試薬キットを用いて、前述の検体を処理し、ノロウイルスの検出を行った。10%糞便乳剤 1 μ L をキットに添付された検体処理試薬 19 μ L に加え、85 $^{\circ}$ C 1min の熱処理を行う。その後、RT 反応液、PCR 反応液を加え、real-time PCR、もしくは、PCR 後、電気泳動によって標的サイズの増幅産物を確認することで判定した。前述のすべてのサンプルについて、NoV GI の検出と NoV GII の検出を別々に行った。NoV GI、NOV GII が双方とも陽性を示したサンプルを混合感染と判定した。

C. 研究結果

1. Super rapid RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1min の加熱だけで修了する。これに加え、逆転写反応、PCR まで、試薬を加えることで実施可能であった。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半の操作が必要であったが、本法では、試薬準備時間も含め、約 10 分で実施可能であった。

2. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた

PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 16 検体、GII 単独感染 78 検体、GI, GII の混合感染 37 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、14/16 (87.5%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、67/79 (85.9%)、混合感染検体の陽性率は、32/37 (86.5%) であった。検出不能であった検体の genotype に特筆すべき特徴はなかった。

3. 台湾 CDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII 混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、1/39 (2.6%) と極めて低かった。GII 単独感染検体に対する陽性率は、93/123 (75.6%) であったが、結果 2 に示したレファレンスパネル試験で示した 85.9% に比較して、約 10% 程度低い値を示した。混合感染検体の陽性率は、0/7 (0%) であった。

D. 結論

本年は、従来のコンベンショナルな RT-PCR 法に変わる Super rapid RT-PCR を確立し、簡便かつ高感度に NoV, SaV の分子疫学に用いることのできる検出法を開発、構築することを目的とし、Shimazu 社より供給された糞便検体をほぼダイレクトに RT-PCR に用いることのできる super rapid RT-PCR 法を評価した。本検出法の感

度は、1990 年代にサンプリングされた GI, GII レファレンス検体を用いた場合、両者ともに 85% 以上を示し、十分な感度を有すると考えられた。テストあたりに含まれる 10% 糞便懸濁液量は、コンベンショナル RT-PCR が 1.7 μ L であるのに対し、Super rapid 法は、1 μ L と、約 40% 持ち込む NoV RNA 量が異なると思われる。この条件下で、15% の感度低下にとどまっていたのは、評価に値する。

2010 年から 2011 年に台湾でサンプリングされた検体で比較検討した場合、GI の検出率が極めて低い値を示した。レファレンスには、多種多様な GI genotype が認められるとともに、多様な GI genotype の混合感染も認められた。しかし、2010 年から 2011 年にサンプリングされた台湾 CDC の検体では、GI. 1, GI. 4, GI. 8 などの単一 genotype の感染事例であった。Super rapid 法に用いられている GI primer set は、コンベンショナルな RT-PCR に用いられている G1SKF & R とは異なる COG1F, R をベースにしたプライマーセットである。COG primer のターゲット領域の塩基配列が、近年の GI. 1, GI. 4, GI. 8 の genetic drift により、マッチしなくなっている可能性が考えられた。

Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く大規模なスクリーニングには、適していると思われる。しかし、増幅領域がコンベンショナルな RT-PCR とは異なる、COG primer set のターゲット領域 (ORF1-2 ジャンクション領域) であり、

genotyping を行うには、陽性検体について、改めてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、PCR 増幅産物を得て、塩基配列を決定する必要がある。また、検出感度においても、改良が必要である。特に GI に対する反応性の低下は深刻であり、プライマーデザインから設計し直す必要がある。

今後、台湾 CDC の GI 陽性検体について、プライマーのターゲット領域を含む塩基費ア列解析を施行し、プライマーのデザインの可能性を探る予定である。また、super rapid RT-PCR の産物を用いて、genotyping が行えるよう、新たなプライマーセットのデザインを行うとともに、試薬の改良を行い、増幅領域の延長を試みる。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

今期は初年度のため、発表業績は無い。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし