

行い、分子系統解析を行った。2011 年の手足口病流行時に北部ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 株の多くは、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。2011 年にベトナムで検出された遺伝子型 C4 ウイルスは、中国で伝播している EV71 株と分子系統学的に近縁であった。遺伝子型 C4 ウイルス株は中国本土以外の、台湾、日本、等でも近年報告されている。2011 年の手足口病流行以前の EV71 分離株を用いた分子疫学解析によると、2005～2009 年にかけての北部ベトナムにおける EV71 分離株の主要な遺伝子型 C5 ウイルスであり、遺伝子型 C4 は、2010 年から高頻度に検出され、2011 年の手足口病流行時に主要な原因ウイルスとなった(表 1、ベトナム NIHE Dr Thanh 提供資料)。

表 1

EV71 subGENOTYPES IN THE NORTH OF VIET NAM 2003-2011					
Year	NUMBER OF STRAINS	NUMBER OF STRAINS SEQUENCED	RENAME	Major	Minor
2003	01	01	0	C4	
2005	05	05		C5	
2008	07	07		C5	0
2009	01	01		C5	0
2010	05	05		C4/C4	C5/1
2011	240	21	219	C4/20	C5/1

#### 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、ベトナムパスツール研、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

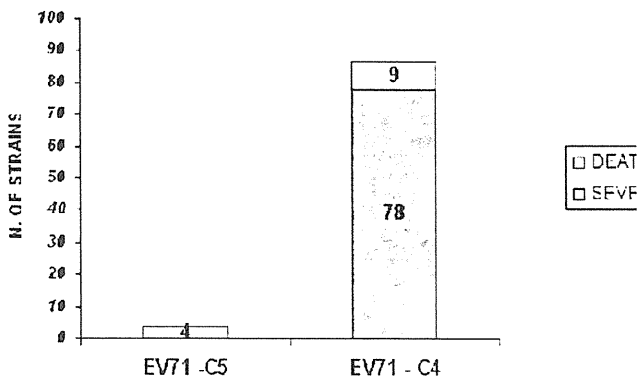
的性状を解析し、EV71 遺伝子型標準株パネルとした(表 2)。ベトナム固有の遺伝子型である遺伝子型 C5 株(209-VN 株、2006 年分離株)についてウイルスストックを作製し、ウイルス学的性状を解析した。また、日本で分離された C4 株(75-Yamagata)は、現在、ベトナムおよび中国本土で伝播している C4 株と分子系統学的に近縁であるため、遺伝子型 C4 株のウイルス学的性状の解析に使用可能と考えられる。

#### D. 考察および今後の研究方針

ベトナムでは、2005 年以来、重症例・死亡例を含む手足口病流行が報告されている。ベトナム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、多くの 2011 年分離株が、中国で近年継続的に伝播している遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。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、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。2005～2009 年にかけて北部ベトナムにおける EV71 分離株の主要な遺伝子型はベトナム固有の遺伝子型 C5 だったが、2010 年から遺伝子型 C4 が高頻度に検出され、2011 年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。ベトナム南部で 2011 年に分離された EV71 を含め(図 2、パスツール研 Dr Thao 提供資料)、ベトナムでは、近年、主要な EV71 遺伝子型が C5 から C4 に入れ替わった可能性が示唆された。また、2011 年の流行株遺伝子型 C5 は、死亡例も含む手足口病重症例から高頻度に検出されている(図 2)。ベトナムで伝播している EV71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も注視が必要である。

図 2

DISTRIBUTION OF SUBGENOGROUP EV 71



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)

表1 EV71 遺伝子型標準株パネル

Genotype (subgenogroup)	Strain (variant)	Country-Year of isolation	Originated from	Remark	Accession number
A	BrCr (39C-1)	USA-70	(NIID)	A plaque purified variant of the BrCr strain (available from NIID)	U22521
B1	Nagoya	JPN-73	NIID	available from NIID	AB059813
B2	86-11316	NLD-86	Netherland RIVM	available from NIID	AB524132
B3	SK-EV006	MAL-97	IMR/NIID	available from NIID	AB059819
B4	C7-Osaka	JPN-97	Osaka/NIID	available from NIID	AB059819
B5	2972-Yamagata	JPN-03	Yamagata	available from NIID	AB213650
C1	02363	THA-02	Thai NIH/NIID	available from NIID	AB115495
C1	KED005	MAL-97	IMR/NIID	available from NIID	AY207612

C2	1095-Shiga	JPN-97	Shiga/NIID	available from NIID	AB059817
C3	001-KOR-00	KOR-00	Korea CDC	available from NIID	AY125966
C4	75-Yamagata	JPN-03	Yamagata	available from NIID	AB177813
C5	209-VN	SVN-06	Pasteur Institute/NIID	available from NIID	Unpublish

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）

分担研究報告書

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

WPR に流行する麻疹ウイルス、風疹ウイルスの解析  
ベトナム (NIHE) におけるウイルス遺伝子診断技術と解析技術の確立、  
並びに中国 (CCDC)、韓国 (KCDC) とのウイルス遺伝子情報交換体制の構築

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究協力者 森 嘉生 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究要旨 WHO では麻疹の排除、風疹、CRS の減少、根絶を目指している。そのためには高いワクチン接種率の維持とともに実験室診断によるサーベイランス体制の確立が必須である。また排除の定義から、麻疹、風疹の流行株の起源の鑑別が重要になってくる。ベトナムにおいては、麻疹、風疹の検査診断は WHO が標準法とする IgM ELISA 法で行われているが、遺伝子検出による診断技術はまだ十分に確立されていない。本研究はベトナム北部の National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE と共同で、ベトナムにおける遺伝子検出による診断技術、ならびに遺伝子解析技術を確立する事、そしてまた過去に採集された検体からウイルス遺伝子を検出し過去に流行したウイルスの変遷を調査する事を目的としている。本年は NIHE の共同研究者と連絡をとり、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査技術、施設の状況、試薬等の入手状況を確認するとともに、当地でのプロジェクトの内容を検討した。また、日本では東南アジアに由来する株を含む数種類の麻疹ウイルスを用いて確立している麻疹 real-time PCR 法の再評価を行い、現行の方法でも最近の分離株の検出が可能である事を確認した。また、中国、韓国の担当者とは会合をもち、今後、麻疹、風疹のアウトブレイク等が起こった時は適時、情報を交換する事となった。

#### A. 研究目的

WHO は麻疹、風疹の排除を目指している。日本、中国、東南アジア等が所属する WHO 西太平洋地域 (Western pacific region :WPR) では 2012 年までに麻疹の排除を、2015 年までに風疹症例数を人口 100 万人当たり 10 例以下に、先天性風疹症候群 (CRS) を 100 万出生数当たり 10 人以下にする事を目標としている。WHO は麻疹排除の定義を「質の高いサーベイランスが存在するある一定の地域内において、常在する麻疹ウイルス

による麻疹の伝播が 12 ヶ月以上ないこと」としており、質の高いサーベイランスとしては、80%以上の麻疹疑い例が検査診断される事、取り下げ麻疹症例が人口 10 万人当たり 2 例以上あること等を挙げている。麻疹、風疹の排除の達成にはワクチン接種率を高く維持し症例数を減少させるだけでなく、検査に基づくサーベイランス体制を確立する事が要件となっている。また、排除の最終段階では流行するウイルスの遺伝子解析を実施し、ウイルスがその土地に常

在する株なのか、あるいは輸入された株なのかの鑑別が必要となる。また、解析されたウイルス遺伝子の情報は、世界のウイルスの分布状況の把握や伝播コースのトレースにも有用である。麻疹ウイルス、風疹ウイルスともに感染力が強く、免疫が不十分なヒトにはたやすく感染する。これはとりもなおさず、日本での麻疹排除、風疹排除の達成には、周辺国の流行が大きく関連する事を示す。本研究はWPRにおける麻疹、風疹排除を推進するために、ベトナムにおける遺伝子診断技術、解析技術の確立、並びに中国、韓国との情報共有環境の構築を目指している。

#### B. 研究対象と方法

- ・ ベトナムの麻疹、風疹に関する情報の収集

ベトナム NIHE の Dr. Trieu Thanh Van と連絡をとり、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査状況、検査手技、機器、試薬等の入手状況等を確認した。またベトナムにおけるプロジェクト内容について議論した。

- ・ real-time PCR 法の評価

近年、日本で分離された麻疹ウイルス株を用いてすでに確立している real-time PCR 法の再評価を行った。使用した麻疹ウイルスは 2009 年から 2011 年にかけて分離された遺伝子型 D4、D5、D9、D8、G3、H1 株のウイルスである。これらは疫学調査でヨーロッパ、タイ、インドネシア、フィリピン、中国等での感染が疑われた麻疹症例から分離されたウイルスである。

- ・ 中国、韓国の麻疹、風疹に関する情報収集

中国 CCDC の Dr. Xu Wenbo、韓国 KCDC の Dr. Kiso Kim と連絡をとり当地での麻疹、風

疹の流行状況、検査診断体制の問題点等を議論した。

#### C. 研究結果

- ・ ベトナムの麻疹、風疹の状況と実験室環境

NIHE の counter partner である Dr. Trieu Thanh Van から麻疹、風疹の流行状況の情報を得た。麻疹は 2009 年に全土にわたるアウトブレイクがあり約 7500 例の報告があったが、補足的ワクチン接種を実施し、2010 年後半からは落ち着いてきている。一方、風疹は 2010 年にはおよそ 2400 例の報告があり、2011 年と春先も流行は収まっていない。CRS 児の出生も確認されている。麻疹疑い例は IgM ELISA kit で検査しており、WHO のプロトコールに従い、麻疹検査で陰性だった場合、風疹の IgM ELISA を実施している。またごく少数、ベトナムの流行株の遺伝子解析結果は報告されているが、それらは香港の Public Health Laboratory Centre で実施されたものであり、NIHE では実施されていない。ベトナムに於ける実験室の環境は、PCR 装置、電気泳動層等はそろっており、試薬、プライマー等も入手可能とのことである。PCR の経験もあり、また、WHO の麻疹、風疹トレーニングコースを修了した技術者がいることから、当地の状況を確認する必要はあるが遺伝子診断技術の導入、実施はそう困難ではないと判断した。また、必要に応じてより感度が高い nested PCR による遺伝子検出技術の移譲を考えている。

- ・ 麻疹診断用の real-time PCR 法の再評価

先に述べた、2009 年～2011 年に日本で分離されたウイルスを用いて、real-time PCR

の検出能を再評価した。すべての株を現行の real-time PCR 法で検出できた (図 1)。Real-time PCR 法はコンタミネーションの可能性がひくく、また、1 度に多数の検体の処理が可能であることから、麻疹、風疹の遺伝子診断に向いている。コストの問題はあるが、将来はベトナムの検体を用いて検出能を確認の上、移譲を検討する。

・ 中国、韓国の麻疹、風疹に関する情報  
韓国は 2006 年に麻疹排除を宣言しているが、その後も日本、中国、タイ、インド等に由来すると考えられるウイルスによる麻疹が報告されている。2010 年にインチョンの高校で起こったアウトブレイクはウイルスの由来が不明であった。中国は 2007-2010 年に麻疹の流行が続き、2010 年、末に 9000 万ドーズの補足的ワクチン接種をおこなった。2011 年はその効果からか麻疹のケースは減少している。主な麻疹の流行株は遺伝子型 H1 である。風疹の流行は続いており、遺伝子型 1E、2B のウイルスが検出されている。WPR における麻疹、風疹の排除の達成には人口の多い国での感染の遮断が必要であり、すでに排除を宣言している韓国を含めて、日本、中国での情報交換は有用との意見で一致、アウトブレイク等が起きたときは適時連絡を取る事を確認した。

#### D. 考察

麻疹、風疹はともに高い感染力をもつ感染症である。麻疹は死亡率が高く、風疹は先天性風疹症候群をもつ子供の出生の原因となるなど重要な感染症であり、WHO の推進する麻疹、風疹の排除計画は公衆衛生上、医療経済上、重要な計画だと考えられる。容易に国外へ旅行ができる現代では、麻疹

排除、風疹排除を達成し、その状態を維持するには、一部の国だけの達成は十分ではなく、少なくとも WPR 等のある一定の広さを持つ地域からの排除が必要になってくる。事実、日本においては 2010 年、2011 年と麻疹症例数が激減、500 症例を切っているが、検出された麻疹ウイルスの大部分は、遺伝子解析の結果、海外に由来すると考えられるウイルスであった。国内の麻疹、風疹の排除達成は国外、おもに近隣の状況と無関係ではない。特に中国、韓国、東南アジア等のように人口が多い国の中心的なラボラトリーと技術、情報の交換等緊密な連携とれる体制を確立しておくことは今後、ますます重要になると考えられる。また、国立感染症研究所ウイルス第 3 部は WHO が組織する麻疹、風疹実験室ネットワークにおいて、米国 CDC、英国 HPA とともに global specialized laboratory とされており、周辺国をふくめて技術的な支援が期待されている。その意味からも今回の連携は、WPR の麻疹、風疹排除の達成に貢献すると思われる。また、ベトナムにおいては現在、風疹のワクチンが導入されていない。ワクチンの導入には disease burden や感受性者数を推測するために血清疫学調査が必要とされるが、ベトナムでは十分な情報がない。NIHE と共同でワクチン導入へむけた活動も検討していきたい。

#### E. 結論

ベトナムへの麻疹、風疹の遺伝子診断技術の移譲は開始されたばかりだが、近い将来、可能と考えられた。韓国、中国の研究機関とも有効な協力体制ができつつあり、これらは日本、WPR における麻疹、風疹排除に貢献できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tran DN, Vu MP, Ha MT, Giang TPL, Komase K, Mizuguchi M, Ushijima H. Viral molecular characterization of the first congenital Rubella syndrome case in Vietnam. *Clin Lab.* 2011;57 (5-6) : 397-401.
  2. Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, Hubschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukenya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN, Bellini WJ, Featherstone D. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis.* 2011 Jul; 204. Suppl 1: S514-23.
  3. Abernathy ES, Hubschen JM, Muller CP, Jin L, Brown D, Komase K, Mori Y, Xu W, Zhu Z, Siqueira MM, Shulga S, Tikhonova N, Pattamadilok S, Incomserb P, Smit SB, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Lim WW, Woo GK, Triki H, Jee Y, Mulders MN, de Filippis AM, Ahmed H, Ramamurty N, Featherstone D, Icenogle JP. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S524-32.
  4. Featherstone DA, Rota PA, Icenogle J, Mulders MN, Jee Y, Ahmed H, de Filippis AM, Ramamurty N, Gavrilin E, Byabamazima C, Dosseh A, Xu W, Komase K, Tashiro M, Brown D, Bellini WJ, Strebel P. Expansion of the global measles and rubella laboratory network 2005-09. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S491-8.
  5. Phengxay M, Hayakawa Y, Phan TG., Tanaka-Taya K, Ueno-Yamamoto K., Vongphrachanh P, Komase K, Ushijima H. Seroprevalence of rubella and measles virus antibody in Lao PDR. *Clin Lab.* 2011; 57 (3-4) ;237-244.
  6. 駒瀬勝啓、竹田誠 ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題、病原微生物検出情報 33 (2) ; 29-30 (2012)
  7. 駒瀬勝啓 麻疹排除の進捗と麻疹輸入例の増加 -麻疹排除に向けた今後の課題- 小児科 金原出版 53 (1) :105-112 (2012)
  8. 駒瀬勝啓 麻疹検査診断法とその問題点、小児科 金原出版 52 (9) :1273-1280 (2011)
  9. 竹田誠、駒瀬勝啓、社会情勢の中で変わりゆく麻疹という感染症、*BIO Clinica*, 26, 1198-1202 (2011)
2. 学会発表
1. Tran Nguyen、駒瀬勝啓、早川智、牛島廣治、Phylogenic analysis of rubella viruses found in Vietnam in 2009-2010 第52回日本臨床ウイルス学会 津市三重県総合文化センター、2011年6月11日~12日
  2. 倉田貴子、井澤恭子、西村公志、加瀬哲男、高橋和郎、大平文人、松井陽子、梯和代、久保英幸、改田厚、後藤薫、

長谷篤、内野清子、三好龍也、田中智之、駒瀬勝啓、森嘉生、竹田誠、大阪府内における 2011 年の風しん発生状況 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 東京都日本教育会館、2011 年 12 月 10 日～11 日

3. 小川知子、堀田千恵美、小倉惇、福嶋得忍、平野憲朗、小山早苗、駒瀬勝啓、中山哲夫、和山行正、MR ワクチン接種後、約 4 ヶ月を経て麻疹ワクチン株が検出された症例について 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 東京都日本教育会館、2011 年 12 月 10 日～11 日
4. Hiroko Minagawa, Teruo Yamashita, Yoshihiro Yasui, Mami Hata, Shinichi Kobayashi, Hirokazu Adachi, Emi

Mizutani, Miyabi Ito, Noriko Fujiwara, Akira Fujiura, Katsuhiro Komase. COLLECTION/PRESERVATION CONDITIONS OF SAMPLES FOR MEASLES VIRUS DETECTION TO IMPROVE LABORATORY DIAGNOSIS FOR CASE-BASED MEASLES SURVEILLANCE. XV International Congress of Virology, 札幌市札幌コンベンションセンター、2011年9月11日～16日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

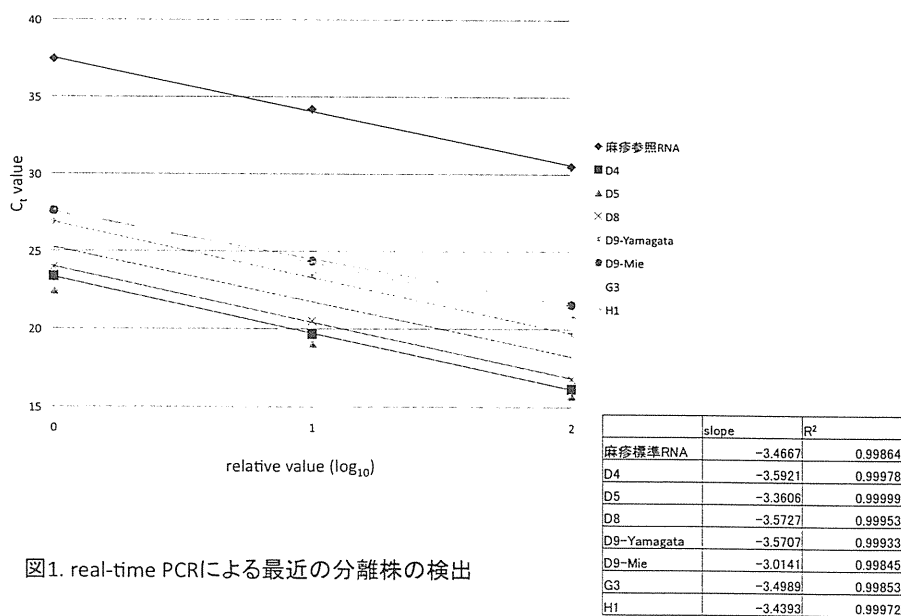


図1. real-time PCRによる最近の分離株の検出



厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
（総括（分担））研究報告書

ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Health and Environments: NIHE）との炭疽および狂犬病に関する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

分担研究者：	井上 智	国立感染症研究所獣医科学部、室長
協力研究者：	奥谷晶子	国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
	野口 章	国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官
	Hoang Thi Thu Ha	NIHE、細菌部、室長
	Luong Minh Hoa	NIHE、細菌部
	Nguyen Thi Kieu Anh	NIHE、ウイルス部、室長
	Nguyen Tuyet Thu	NIHE、ウイルス部

研究要旨：本研究では、ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）と国立感染症研究所・獣医科学部で進めている炭疽及び狂犬病に関する共同研究の体制を強化するために、細菌部・Dr.Hoan Thi Thu Ha 室長（炭疽）、ウイルス部・Dr.Nguyen Thi Kieu Anh 室長（狂犬病）と、野外検体等を利用した当該病原体の検査・同定法の開発及び分子疫学的解析によるラボラトリーネットワークの促進を目的としている。以下が、今年度行った共同研究の成果である。**炭疽**：共同で確立した検査法等を利用して、2011年6月にベトナムの北部山岳地帯で発生した皮膚炭疽の集団発生事例から炭疽菌を分離した。菌株からDNAを抽出して、MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis) と SNP (Single Nucleotide Polymorphism)による系統解析を行い、本分離株が西ヨーロッパや北アメリカの菌株と同じ遺伝学的クラスター(A1クラスター)に分類されることを明らかにした。**狂犬病**：これまで、NIHEで行う狂犬病の実験室内診断法と野外検体の採取・取扱法を確立して、これらの検証とベトナムで流行している狂犬病ウイルス(RV)の分子疫学を明らかにしてきた。今年度は、NIHE 狂犬病研究室と共同して、ベトナムに生息する翼手目(コウモリ)がRVを含むリッサウイルス属の自然宿主あるかを調べるために、NIIDで保有している5株(RV、EBLV-1、Duvnhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus)を利用した簡易中和抗体検出系を確立した。また、ベトナムのコウモリから採取した血清について前記5ウイルス株に対する中和活性をNIHEとNIIDのラボラトリー間で同時に行い、その手技と検査成績を検証して、概ね同じ成績であることが分かった。

現在、炭疽と狂犬病について、当該ラボラトリーとの間で確立した検査系や遺伝子解析等について、その技術的な課題、改良点、得られた成績の比較・検証を行いながら、共同研究体制をどのように強化できるのか研究手法等を含めて検討を行っている。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）と国立感染症研究所・獣医科学部で進めている炭疽及び狂犬病に関する共同研究体制

の強化と、野外検体等を利用した当該病原体の検査・同定法の開発及び分子疫学的解析によるラボラトリーネットワークの促進である。

現在、炭疽に関する研究については、NIHE・細菌部の Hoan Thi Thu Ha 室長と、検査法の共同

開発、ベトナム北部山岳地帯の皮膚炭疽集団発生事例を利用した炭疽菌の分離法の確立等を行っている。一方、狂犬病に関する研究については、NIHE・ウイルス部の Nguyen Thi Kieu Anh 室長と、NIID で保有しているリッサウイルス 5 株 (RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) を利用した簡易中和抗体検出系の確立を共同で確立して、ベトナムに生息する翼手目 (コウモリ) について血清疫学調査を試みた。

## B. 研究方法

### 炭疽：

◇NIHE の役割：2011 年 7 月に発生した炭疽事例の疫学調査、患者および環境等の検体採取、採取した検体からの菌分離、分離菌株の同定を行い、分離・同定の行われた炭疽菌から菌体の DNA を QIAGEN・DNA 抽出キットによって抽出した。

◇NIID の役割：Hoan Thi Thu Ha 室長のもとで、炭疽を担当している Luong Minh Hoa 研究員の来日に合わせて、抽出した炭疽菌の DNA 6 検体を輸入して、同 DNA を利用した下記の研修を行った。

1. PCR による MLVA8 領域の増幅
2. PCR 産物のダイレクトシークエンシング
3. 塩基配列の解読方法および系統解析方法

◇ベトナム分離株については、日本分離株で確立した 80SNP による詳細な系統解析を NIID で行った。

### 狂犬病：

◇NIHE の役割：ベトナム北西部 Hoa Binh、東北部 Long Song, Phu Tho, Yen Bai, Tuyen Quang に生息するコウモリを捕獲して、血清の採取をした。

◇NIID の役割：NIID で保有している狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株 (RV、

EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) を利用して、簡易中和抗体検出系を確立し、ベトナムのコウモリから採取した血清について前記 5 ウイルス株に対する中和活性を測定した。

◇NIHE・NIID 連携：NIID で確立した簡易中和抗体検出系をラボラトリー間で共有・検証するために、(1) NIID で保有している 5 株 (RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) を NIHE に分与、(2) NIHE がベトナムのコウモリから採取した血清を NIID に分与、(3) 同じコウモリの血清を利用して NIID で作成した SOP を両ラボラトリーで検証した。また、利用して研究室間での検出結果を検証した。

◇Nguyen Thi Kieu Anh 室長のもとで、狂犬病を担当している Nguyen Tuyet Thu 研究員の来日に合わせて、NIID で作成した RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus に対する中和抗体検出系の SOP に対する研修を行った。

## C. 研究結果

本研究結果では、NIID 側で得られた成果を中心に報告する。NIHE 側の成果は、別途 NIHE の報告書を参照されたい。

**炭疽：** Luong Minh Hoa 研究員の研修を 11 月 13 日-12 月 7 日にかけて行い、炭疽菌の分離方法、同定法、遺伝子診断法、分子遺伝学的解析法、などについてラボラトリー間での知見共有と技術的な課題点等の確認が可能になり、これを次年度以降の研究計画に反映させて共同研究体制の強化を実際的なものとする事ができた。

### ◇遺伝子解析

1) **MLVA8**：ベトナムで分離に成功した炭疽菌 6 株から抽出された DNA について、MLVA8 による遺伝子解析を行ったところ、いずれの菌株

も西ヨーロッパおよび北米で分離される炭疽菌と同じ遺伝学的クラスターである A1 となった（図 1）。

2) **80 tag-SNP** : わが国で分離された炭疽菌から構築した 80 tag-SNP を利用して、ベトナム分離株 6 株の DNA について系統解析を行ったところ、全て西ヨーロッパ由来の菌株と同じクラスターに分類された（図 2）。

※遺伝子バンクのデータベースに保存されている世界各国で分離された炭疽菌の DNA 配列を利用して、VNA25 と 80 rtag-SNP を利用したベトナム分離株の系統解析結果を「図 3」に示した。

**狂犬病** : Nguyen Tuyet Thu 研究員の研修を 11 月 13 日-12 月 7 日にかけて行い、狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系の実践的な手技を共同して行い、技術的な知見共有と課題等の確認が可能になった。これらを次年度以降の研究計画に反映させることで、共同研究体制の強化を実践的なものとする事ができた。

#### ◇中和抗体検出法

狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）のウイルス価と簡易中和抗体検出系の方法を「図 4」と「図 5」に示した。

前記 5 ウイルス株に対する中和活性を NIID と NIHE で測定して、概ね同じ成績を得ることができた（図 6 と図 7）。

#### D. 結論

ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）と国立感染症研究所・獣医科学部で進めている炭疽及び狂犬病に関する共同研究の体制を強化

するために、野外検体等を利用した当該病原体の検査・同定法の開発及び分子疫学的解析をラボラトリー間で比較・検証を行うことによって、ネットワークの促進と共同研究体制の強化が可能になった。

現在、確立した検査系や遺伝子解析等について、その技術的な課題、改良点、得られた成績の比較・検証を当該ラボラトリーと行いながら、共同研究体制をどのように強化できるのか研究手法等を含めて検討を行っている。

※以下、炭疽と狂犬病について結論を記す。

**炭疽** : ベトナム分離株は西ヨーロッパや北アメリカで分離される菌株と同じ遺伝学的クラスター(A1 クラスター) に分類され、日本やモンゴルなど他のアジア諸国で分離される炭疽菌が分類される A3 クラスターとは異なることが明らかになった。

今後、感染経路の推定や感染動物あるいは環境への浸潤状況調査が必要であり、ベトナム分離株のフルゲノム解析を行って、特異的な SNP タイピングを開発して、感染経路の推定や詳細な分子疫学を可能にすることが重要と考えられた。また、本邦で行った分子遺伝学的タイピング研修によって、ベトナムで発生する炭疽の疫学調査が分子レベルで行い得るようになることを期待する。

**狂犬病** : NIHE 狂犬病研究室と共同して、NIID で保有している 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系を確立した。また、ベトナムのコウモリから採取した血清を利用して、前記 5 ウイルス株に対する中和活性を NIHE と NIID のラボラトリー間で手技および検査成績を検証して、概ね同じ成績であることを明らかにした。今後、コウモリ等の野外調査を進めながら、NIHE と NIID のラボラトリー間で血清等の検体を共有して、検査系の比較検証を行い、狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス属のベトナムにおける分布と自然宿主の疫学を明らかにしていきたい。これによって、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が期待される。

#### E. 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011:4:345-348.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). Jpn.J.Infect.Dis. 64:391-396.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G., Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., Nguyen T.H. (2010) Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006-2009”, Journal of Preventive Medicine, Vietnam. Volume XX, 6:164 - 170.

Inoue, S. The clinical signs and diagnosis of animal rabies. Training Program for Rabies Laboratory Diagnosis. ESRM in NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

Inoue, S. Brain operation of rabies suspected dog for taking samples, packaging and transporting to the laboratory. ESRM in NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

井上 智。事例 3：狂犬病の発生様式、5：感染症の疫学事例、16 章：感染症の疫学。獣疫学・第 2 版 (Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣疫学会編。近代出版。p131、

2011

井上 智。18. ラブドウイルスと感染症。第 3 章 II. ウイルス学各論。獣医微生物学 (第 3 版)。監修：見上 彪。編集：関崎 勉、高井 伸二、堀本泰介、望月雅美。文永堂出版、p231-238、2011

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピングについて。第 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2011、11 月 5 日、国立感染症研究所、東京都

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

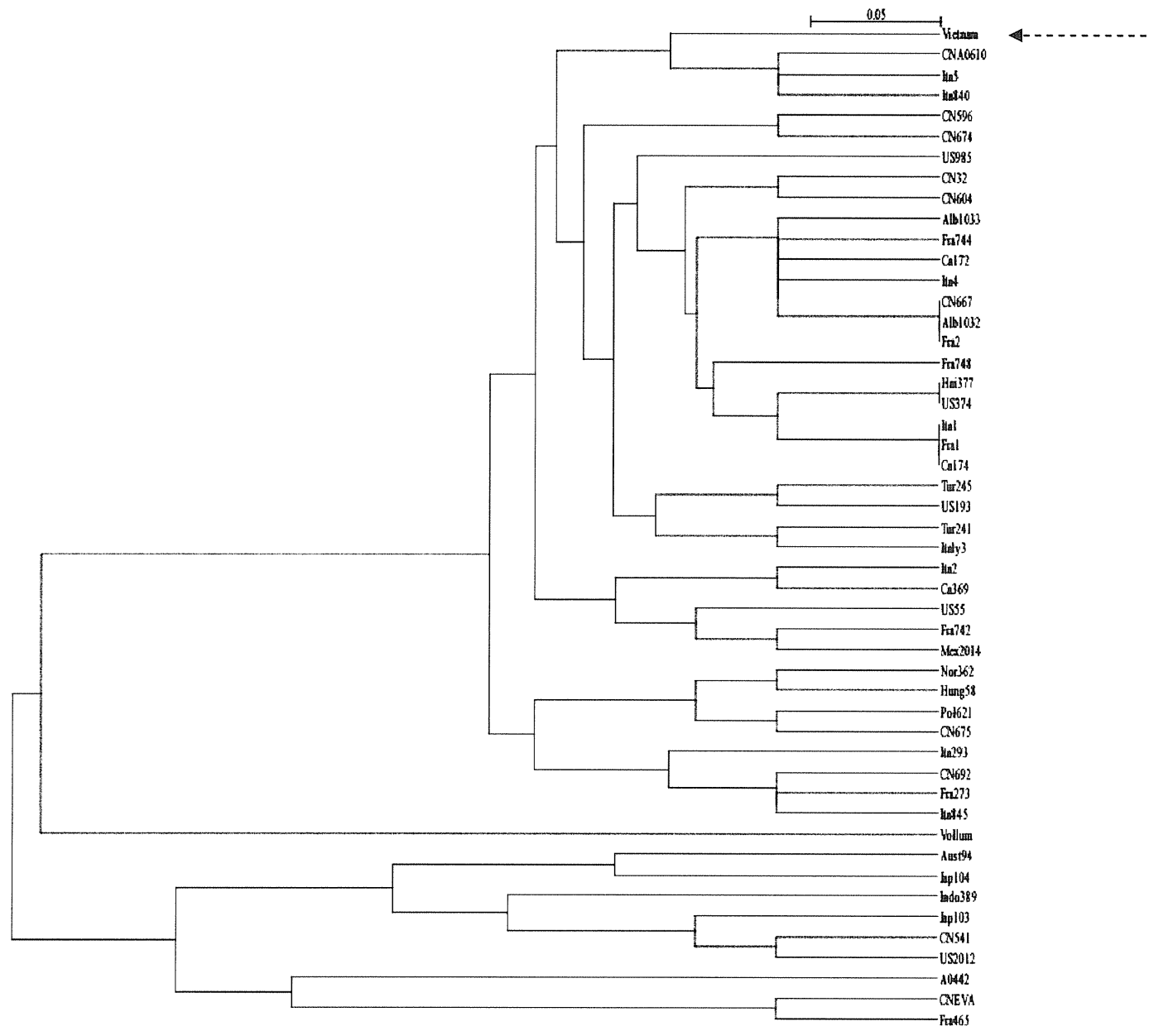
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



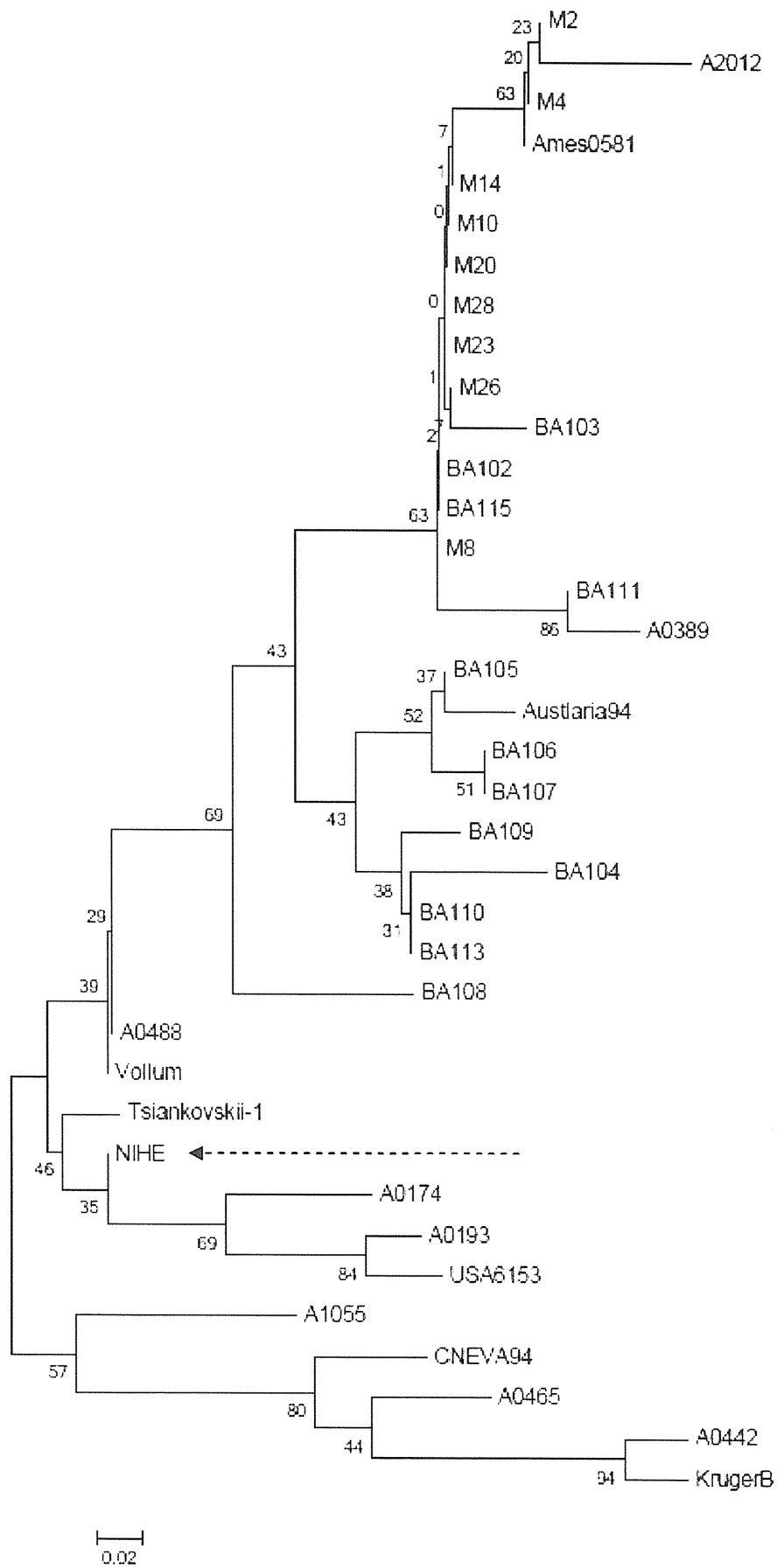
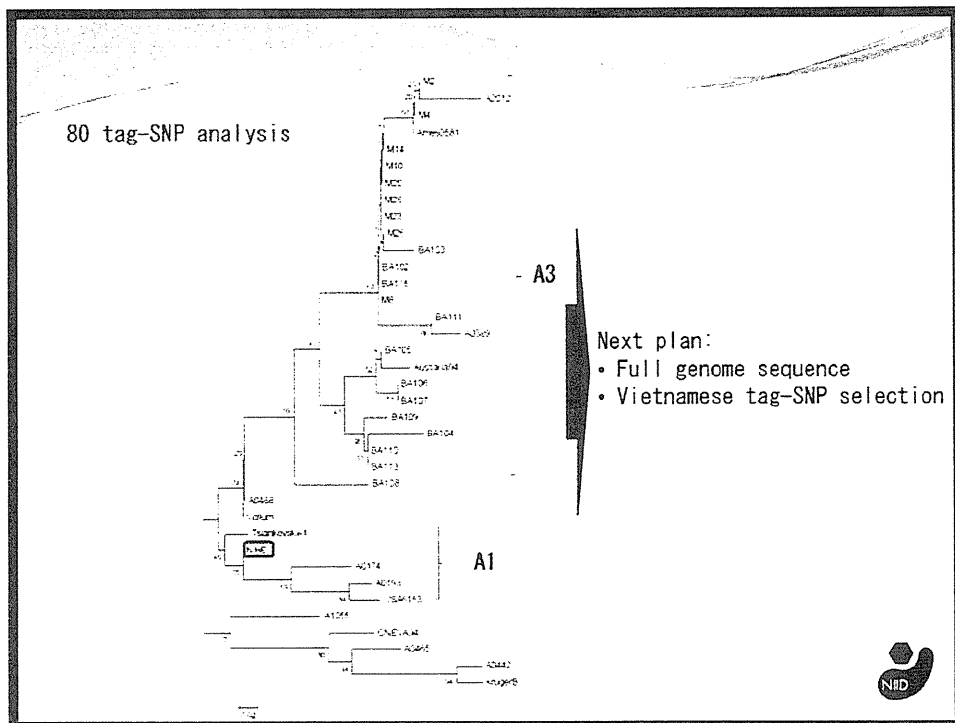
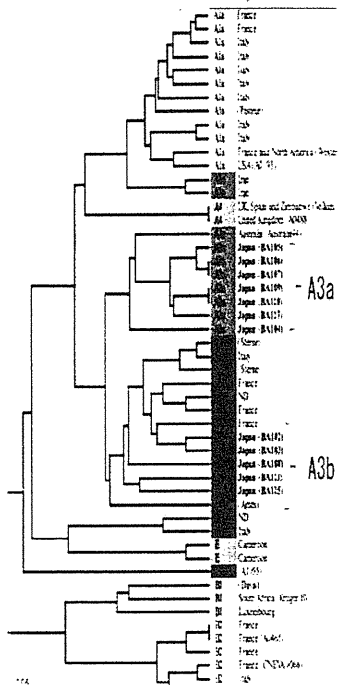


图 2

MLVA25 analysis



Next plan:  
 • Full genome sequence  
 • Vietnamese tag-SNP selection

☒4. Viral titer of lyssaviruses used in neutralization test

Lyssaviruses

Genotype	Species	Titer (TCID <sub>50</sub> /50ul)	Dilution
1	Rabies:CVS11	10 <sup>6.6</sup>	1/40,000
2	Lagos bat	10 <sup>5.5</sup>	1/5,000
3	Mokola	10 <sup>4.6</sup>	1/500
4	Duvenhage	10 <sup>5.1</sup>	1/1,000
5	EBLV-1	10 <sup>5.4</sup>	1/2,000

Cell: MNA (8 x 10<sup>5</sup>/ml in MEME-10, S 100ug/ml, P 100U/ml, Ampho 0.25ug/ml)

FITC-Conjugate: FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirebio)。  
50-100 fold dilution by PBS(-) with 0.002% Evan's Blue。



☒5. Lyssavirus Neutralisation Test, Method

---

Step

---

1. Serum dilution (x10)		50ul
2. Add challenge virus(100TCID <sub>50</sub> /50ul)		50ul
3. Incubation		37 C 1hr
4. Add MNA cells (8 x 10 <sup>5</sup> /ml)		50ul
5. Incubation		37 C 46hrs
6. Remove medium(by micropipette tip)		
7. Add PBS(-) (Rinse)		150ul
8. Remove PBS(-)(by micropipette tip)		
9. Fixation by 80% cold acetone (full of well)		4 C 30min
10. Remove acetone(decantation)		
11. Dry up		1 - 2h
12. DFA(Fujirebio)	80ul/well	30min at RT
13. Wash by PBS(-)	200ul	3times
14. Observation by microscope (UV)( x40 – 100)		

---

☒ Judgement: % reduction or foci /well (Yes or No)

☒6. Neutrarlisation test of lyssaviruses, NIID

%-reduction	CVS-11 (GT-1)	EBLV-1 (GT-5)	Duvenhage (GT-4)	Mokola (GT-3)	Lagos (GT-2)
100%	0/229 0%	0/225 0%	0/228 0%	0/224 0%	0/224 0%
>90%	5/229 2.18%	1/225 0.44%	0/228 0%	1/224 0.45%	2/224 0.89%

cf. 90%-reduction of bat sera against lyssabiruses

(CVS-11, EBLV-1, Duvenhage virus, Mokola virus, Lagos bat virus) by using of 1:10 bat serum dilution

図7. Neutrarlisation test of lyssaviruses, NIHE

%-reduction	CVS-11 (GT-1)	EBLV-1 (GT-5)	Duvenhage (GT-4)	Mokola (GT-3)	Lagos (GT-2)
100%	0/229 0%	1/225 0.44%	0/228 0%	-	-
>90%	6/229 2.62%	2/225 0.89%	0/228 0%	-	-

cf. 90%-reduction of bat sera against lyssabiruses  
(CVS-11, EBLV-1, Duvenhage virus, Mokola virus, Lagos bat virus) by using of  
1:10 bat serum dilution

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）

分担者研究報告書

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）

ヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究におけるアジアの感染症研究機関との  
共同研究ネットワークの構築

研究分担者 倉根一郎 国立感染症研究所 副所長

研究協力者 大野秀明、田辺公一、宮崎義継（国立感染症研究所生物活性物質部）、

Natteewan Poonwan (The National Institute of Health, Thailand)、

Pojana Sriburee (Chiang Mai University, Thailand)

Thi Thu Ha Hoang (National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam)

研究要旨：西アジア、東南アジアはヒストプラズマ症の流行地域の一つにかぞえられ、日本人旅行者がこれらの地域で感染し、帰国後発病することも稀ではない。一方、これらの地域でのヒストプラズマ症の疫学情報や感染源、危険因子等については未解明な点が多い点をふまえ、本研究ではタイ国、ベトナム国の感染症研究機関との共同研究によるこれらの解明を進め、公衆衛生学的な寄与を目的とした。タイ・バンコク近郊での土壌検体でのヒストプラズマ属の生息状況の検討では、多くの公共の場でのヒストプラズマ属の生息が疑われたことから、今後感染源としての危険性や他の真菌との相対的な病原性などの検討、さらに診断・治療などの基盤研究を共同で発展させる必要があるものと考えられた。

#### A. 研究目的

ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともいわれ、高病原性真菌（BSL3）であるヒストプラズマ属（*Histoplasma capsulatum*）を原因真菌とし、HIV 感染者など免疫不全者に加え、健常人にも発病が認められる真菌感染症である。ヒストプラズマ属は通常土壌中に生息し、コウモリや鳥類の糞中で盛んに増殖する真菌で、世界的に広く生息が確認されているが、な

かでも米国ミシシッピー川流域や中南米、西アジア、東南アジア、オーストラリアが大きな侵淫地域であり、本感染症は地域流行型真菌症の性格をもつ。日本人のヒストプラズマ症患者は年々増加傾向を示し、その多くは北中米と東南アジアでの感染であることが考えられているが、東南アジア地域でのヒストプラズマ症の実態、流行状況、感染源、危険因子等については未解明な点が多く、日本人現地在住者、日本人