

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

薬剤耐性淋菌の分子タイピング

研究分担者	中山 周一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	志牟田 健	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：最後の有効薬剤、セフトリアキソンに耐性の淋菌の出現と拡散動向を把握することを中心に分離株サーベイランスとその分子タイピングを行った。既に出現した *penA* 遺伝子変異による耐性株の顕著な拡散は認められなかった。また、 $\beta$ -lactamase の基質拡張型変異の一手手前となるタイプの淋菌の存在をタイ、日本で確認していたことを受け、 $\beta$ -lactamase 保有淋菌分離株の多い中国で、そのような株の存在を検討した。前者の拡散を今後とも封じこめるとともに、後者の動向を今後注意深くモニターする必要がある。

A. 研究目的

薬剤耐性の獲得とその拡散が非常に早い淋菌では、継続的な分離株サーベイランスにより、よりタイムリーな治療ガイドライン改定を行う必要がある。従来、国、地域毎に行われてきたこの作業を近隣国で行うことで、より有効なアクションを取ることが期待される。そこで中国との共同での分離株サーベイランスと分子タイピングのプロジェクト開始を目指している。このため、モデルケースとして、近年特に危惧されている、最後の有効薬剤と目されるセフトリアキソンに耐性な淋菌の出現と拡散のモニタリングを兼ねる形で、世界初のセフトリアキソン耐性菌 (*penA* 変異型) 出現を見た日本の関西地域でのその後の分離株解析と、今後危惧される $\beta$ -lactamase の

基質拡張型変異によるセフトリアキソン耐性菌出現の可能性評価のため、タイの $\beta$ -lactamase 保有淋菌を解析し、結果を中国の研究者にアナウンスした。これを受け、中国の $\beta$ -lactamase 保有淋菌を解析する。近隣国と共同での最新の分離株サーベイランス結果の結果の国間比較により、耐性プロファイル、菌系統の類似点、相違点を継続的に把握することで、国間のクローナル拡散の傾向について基礎的データが得られる。このことは、将来、新規な耐性がどちらかの国で発生した場合の他方への到来の時期を予測する根拠となるため、両国での治療ガイドラインのよりタイムリーな改定法の確立に向け有用である。このための基礎データ収集を中国との間で確立するための交渉でモデルデータとして使う

実例を作製する。

## B. 方法

### 1) 分離株：

日本国内株は、今年度については、Retrospective な解析を企図して、2005~2011 年に首都圏で分離した 147 株を使用し、分子タイプピングを行った。

中国側株のβ-lactamase 保有淋菌 1 株、不明淋菌株 1 株を用いて、変異型β-lactamase 遺伝子検出 PCR のプロトコールチェックを兼ね、現地でこの 2 株を検討した。株の分離年等の情報は知らされなかった。。

### 1) MIC 測定：

E test シート (AB bioMerieux, Solna, Sweden) を用いて、仕様書に従って測定した。

### 2) NG-MAST タイピング：

確立している Martin らの方法<sup>1)</sup>に従った。

### 3) 変異型β-lactamase 遺伝子、TEM-135 検出 PCR

我々が開発した方法<sup>4)</sup>に従った。

## C. 研究結果

### 1) 首都圏 2005 年~2008 年分離株のサーベイランス、NG-MAST タイピング：

全体として ST2958(19 株)と ST1407(16 株)とで主流を占めていた。他の ST は 5 株以下であった。

日本での体系的な NG-MAST 解析は、2008 年の福岡での検討<sup>5)</sup>、2010~2011 年の京都・大阪での検討<sup>6)</sup>、

があり、この 2 タイプで主流を占める傾向は今回と一致している。しかし、今回は 2005 年からの retrospective 解析を行ったことで、既報のようなスナップショットデータでは得られない知見も得た、即ち、①この現在主流の 2 タイプ ST2958、1407 はいずれも 2006 年に初例が検出され、いずれも 2008 年に prevalence のピークを示し、その後斬減しながらも 10% 以上の分離率を維持していること。②2008 年、2009 年では ST2958 が有為に ST1407 より多いのに対して、2010 年、2011 年ではそれが逆転していること。③この 2009 年と 2010 年での相変異が日本国内で有ったと考えると 2008 年の福岡での検討<sup>5)</sup>では ST2958 の方が多く、2010~2011 年の京都・大阪での検討<sup>6)</sup>では ST1407 の方が多かったことを説明できること。

以上より世界流行型であり、多剤耐性と強い相関が見られる ST1407 の日本での初検出から主流型となるまでの過程の一端を明らかにできた。

### 2) 中国に於けるβ-lactamase 保有淋菌 (以下、PPNG と呼ぶ) の解析：

PPNG の保有するβ-lactamase は近年まで、プロトタイプの TEM-1 以外は発見されていなかったが、2009 年タイと日本で、初めて TEM-135 型を保有するものが検出された<sup>2,3)</sup>。TEM-135 は基質拡張型β-lactamase ではないが、1 塩基置換変異のみで基質拡張型の TEM-20 となり得るタイプである。対して、TEM-1 は知られているいかなる基質拡張型になるにも最低 2 塩基の変異を必要とする。そこで、TEM

タイプの決定をも含めて、2005年～2008年に分離されたタイの96株のPPNGの分子タイピングを行った。結果、以下のことが分かった。96株中、TEM-135は9株(9.4%)、他の87株はすべて(90.6%)TEM-1であった。この2つのタイプ以外は発見されなかった。1塩基置換のみで基質拡張型となり得るものがマイナー、～10%の比率ながら、タイでサーキュレーションしていることが初めて示された<sup>4)</sup>。

これを受け、PPNGの分離率が全淋菌株30%をも占める中国でのTEM-135のサーベイランスが重要と考えカウンターパートの南京CDC施設で中国株解析を共同で行った。実際には実際にはカウンターパート側に意向で、今回はプロトコルチェックを主眼として、淋菌株2株、うち1株がPPNGを解析したが、その1株はTEM-135型のPPNGであった。

#### D. 考察

国内でのサーベイランス結果から、多剤耐性という性状と強く相関し、世界的に流行しているST1407は、日本では2006年に初検出され、その後2009年までST2958に次ぐ分離率で推移し、2010年から最頻型となっていったプロファイルを明らかにできた。その多剤耐性という性状からも今後の監視が重要である。セフトリアキソン耐性に関連して、今後、出現に備えるターゲットは、基質拡張型 $\beta$ -lactamaseを保有するPPNGである。前述のように、これに関しては基質拡張型の前駆体、中間体とも言うべきTEM-135の存在が確認され、そのタイに於けるprevalenceも約10%、という具体的な数字を我々は算出している<sup>4)</sup>。

今回、中国のPPNG株1株を解析し、それがTEM-135であったことから、中国でのTEM-135存在率はタイ以上であることも考えられる。また、中国ではPPNGの全分離淋菌に占める割合自体が～30%にも及ぶため、TEM-135の総数は非常に多いと懸念される。中国に於ける、TEM-135のサーベイランス、prevalenceの調査とその上昇の監視に加え、それからの基質拡張型、TEM-20の新生を注意深くモニターしていく必要があると思われる。

#### E. 結論

日本及びフランスで確認された変異型penA遺伝子によるセフトリアキソン耐性は現在、顕著な拡散状況にないが、今後その動向を引き続き観察する必要がある。日本国内で、セフトリアキソンMICが上昇傾向にあるNG-MAST ST1407型菌が増加している。日本でのその発生から最頻型となっていった過程を推定することができた。今後この動向を注視すべきである。基質拡張型 $\beta$ -lactamaseによるセフトリアキソン耐性菌出現が危惧されている。基質拡張型の前駆体タイプのPPNGがタイでマイナー集団ながら存在確認されたことから、中国でのPPNGについても検討し、中国でもこれが現存すること、確率論的にタイでの存在率よりさらに高いことが懸念された。このタイプのprevalence上昇と基質拡張型の新成をモニターしていく必要がある。このプロジェクトは元来、中国との共同研究であるが、中国側の正式合意が未決であるため、現在共同研究の形では進行できていない。今後、PPNGの多い中国でのそれらの株の解析の重要性をさらに説明し、たとえ自発的な形

であってもプロジェクトを本格始動させる必要がある。

#### 謝辞

今回解析した国内菌株を分与くださった、(株) 医学生理学研究所の高山美奈子先生に感謝いたします。

#### F. 参考文献

- 1) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**:1497-15015.
- 2) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility:an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:467-470.
- 3) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135  $\beta$ -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:3021-3023.
- 4) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.*

**56**:916-920.

- 5) Tanaka, M, et al. 2011. Anti-biotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: Identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) 志牟田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、上田朋宏、亀岡博、古林敬一、川畑拓也、大西真。2012。「京都府と大阪府における 2010 年-2011 年に分離された淋菌株の性状解析」日本性感染症学会誌. **23**:83-89.

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

- 1) 井戸田一朗、中山周一、石原朋子、志牟田健、大西真:「梅毒トレポネーマの DNA 検出法と蛍光抗体法の検討」日本性感染症学会第 25 回学術大会、岐阜、2012 年 1 2 月

##### 2. 論文発表

- 1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.

研究課題名：「腸内細菌の molecular typing 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

**研究要旨** 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。本年度は中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、赤痢菌の分子タイピングに関する共同作業を行った。

#### A. 研究目的

コレラ菌、赤痢菌、サルモネラといった、食水系腸管感染症起因菌を中心に研究を行う。当該感染症の流行地域であるアジア各国において、流行菌種あるいは菌型を把握するための分子タイピング法の検討を行う。また、必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

#### B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

#### C. 研究結果および考察

赤痢菌 (*Shigella* spp.) は細菌性赤痢の起因菌であり、当該菌によって汚染された飲料水および食品を摂取することによって感染する。わが国では海外渡航者による輸入例が多く、その渡航先のほとんどがアジアである。

赤痢菌は 4 つの種からなるが *S. sonnei* による赤痢が最も多い。赤痢菌の分子タイピングの手法としては、標準法である PFGE が使われることが多いが、*S. sonnei* に関しては MLVA も有用であることが示されている。こうした解析法の標準化は PFGE に関しては米国パルスネットを中心として進められているが、MLVA に関しては発展途上の段階にある。そこで、本研究では CCDC と我々との間で、*S. sonnei* MLVA に関する harmonization ができるかを検討した。

電子メールによる情報のやり取りから、双方が台湾のグループが開発した 8 遺伝子座を使った MLVA を行っていることがわかり、互いに DNA を交換、それぞれのラボで解析し、最終結果（リピート数に換算したもの）を送付しあい、結果を照合した。

CCDC サンプルの結果：我々のもとで CCDC からの 30 株について解析した結果、Ss11 遺伝子座においてすべて 1 リピートずつずれていたが、これらについては修正がなされ、最

最終的には一致した。それ以外の遺伝子座を含めた8遺伝子座30株、計240箇所中233箇所(97%)について一致した。

NIID サンプルの結果：CCDC のラボで我々(NIID)からの供与サンプル32株について解析したところ、当初は256箇所中201箇所(79%)について一致した(表1)。上記CCDC サンプルの解析結果よりも一致率が低かったため、CCDC から解析前の泳動ファイルを電送してもらい、我々の手法でファイルを解析した。その結果、すべての箇所でリピート数が一致した。

MLVA は最終結果が、各遺伝子座に関する遺伝子構造のリピート数に換算されるため、結果がデジタル化されており、比較するのが容易である。一方で、換算手法がラボによって異なる可能性があり、今回のCCDC とのharmonizationにおいても同様のことが明らかとなった。リピート数の算出は、観察された増幅産物の泳動上のサイズを本来の塩基配列からのサイズに置換し、そこからリピート数を整数として計算することからなる。ま

た、PCRによる非特異的な増幅産物を解析時に排除しなければならない。こうした細かい点は、意外と見過ごされがちなので、今回実施したように実際にDNAサンプルや解析ファイルをやり取りして、各ステップを確認する必要があることが示された。

分子タイピングのharmonizationはラボ間の連携を深め、また流行が発生した際に正しい情報交換を行うためにも重要な工程である。機会をみて、こうした活動を継続していく必要があると考えられる。

#### D. 結論

ラボ間のネットワークを構築していくうえで、解析手法の共通化、標準化、harmonizationは重要である。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

特になし

strain	Consistency (CCDC-NIID)							
	SS1	SS3	SS6	SS9	SS10	SS11	SS13	SS23
#1	-1	0	-1	0	0	0	0	0
#2	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#3	-3	0	-1	0	0	0	1	0
#4	-1	0	0	0	0	0	0	0
#5	-1	0	0	0	0	0	0	0
#6	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#7	-1	0	-1	0	0	0	0	0
#8	0	0	0	0	0	0	0	0
#9	-1	0	0	0	0	0	0	0
#10	-1	-1	-1	0	0	0	0	0
#11	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#12	-1	0	-1	0	0	0	0	0
#13	-4	0	0	0	0	0	0	0
#14	-1	0	0	0	0	0	0	0
#15	-2	0	-1	0	0	0	0	0
#16	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#17	0	0	0	0	0	0	0	0
#18	0	0	0	0	-1	0	0	4
#19	-1	0	-1	0	0	0	0	0
#20	-1	0	0	0	0	0	1	0
#21	-1	0	0	0	0	0	0	0
#22	0	0	0	0	0	0	0	0
#23	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#24	0	0	0	0	0	0	0	0
#25	0	0	0	0	-1	-1	0	0
#26	-1	-1	-1	0	-1	3	0	0
#27	-1	-1	0	0	-1	0	0	0
#28	-1	0	0	0	0	0	0	0
#29	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#30	-5	-1	-1	0	0	0	1	0
#31	0	0	0	0	0	0	0	4
#32	-1	0	0	0	0	0	0	0

表 1. NIID サンプルの解析結果の比較。CCDC から返送されたレポート数と我々のラボで得られたレポート数との差を表す。0 は両者で一致したことを示す。

## プロジェクト 2 : 台湾



### 別紙 3

## 厚生労働科学研究費補助金（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）

#### 赤痢アメーバに関する研究

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

#### 研究要旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により起こるアメーバ症は近年日本においても報告が増加している重要な原虫感染症である。本研究では日本と感染様式が類似している台湾と共同研究を行うことで、東アジアにおけるアメーバ症の分子疫学調査方法の確立と病原性を規定する遺伝子の発見を目指す。

#### A 研究目的

赤痢アメーバにより発症するアメーバ症は全世界で毎年 10 万人の死者を出すマラリアに次ぐ重要な原虫感染症である。アメーバ症は飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国においては水系感染により生じる下痢の主要原因の一つであるが、日本を含めた先進国では海外渡航者の他、自己の衛生環境を保てない障害者や老人施設、糞口感染の可能性がある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) や commercial sex worker の女性が主なリスク群となる。また、*E. histolytica* 感染を疑う場合、形態学的に見分けられない、非病原性の *E. dispar* 感染との鑑別が問題となる。*E. dispar* であれば便中に栄養体やシストが検出されても治療の必要はないとされるが、無症候性の *E. histolytica* 感染者も多く存在するため確実な鑑別と適正な治療が必要である。

欧米では MSM におけるアメーバ感染は *E. histolytica* と *E. dispar* の両方が同定されるため特に鑑別が重要とされている。しかし日本においては *E. dispar* が同定されることはほぼ無い。この事実は日本に独特な要因が存在することを示唆しているが、研究対象とすることが可能な症例数が限られる状況では研究を進めることが困難であった。また、現在の日本では症状のある患者が来院した場合にアメーバ症と診断され、検体を得る機会が生じるが、無症候性のキャリアからの検体を募ることは倫理面から非常に困難である。一方同じ東アジアに存在する台湾ではアメーバ症のリスク群は日本と同じであり、*E. dispar* 感染がほとんど見られないという状況も一致している。しかし台湾では外国人労働者に寄生虫検査を課していることから検査対象が非常に広く、多様な遺伝子型や株の取得が可能であ

る。

本研究では台湾 CDC と共同で日本と台湾から得られた臨床株の遺伝子型の特定と系統解析、さらに病原性に関与する遺伝子の同定と解析を行い、アジアにおけるアメーバ症の特徴を理解することを目指した。

## B 研究方法

日本の臨床分離株を使った比較ゲノミクスで見出された、病原性に関与すると予想される ORF について、昨年度行った複数の台湾株での評価に加え、日本株においてもその存否が病原性や系統上のグループと関連するか評価を行った。系統解析は昨年度行った日本・台湾で得られた臨床株を tRNA sort tandem repeat (STR) を指標とした遺伝子型別により分類し、これをもとに行った系統解析の結果に準じた。

## C 研究結果

### 1) 病原性関連 ORF の日本株における解析

日本国内で分離された非病原性株と病原性株との比較ゲノミクスにより以前我々の研究室で見出した、AIG1 family protein (EHI\_176590)：以降 AIG17、の ORF が日本株にどの程度存在するのか、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により検討した。AIG17 は非病原性株に存在していない ORF として同定されたため、無症候性株には存在せず、患者由来の株に存在がみられることが期待された。以前遺伝子型別がなされ、ゲノム DNA サンプルが存在していたものを優先に肝膿瘍、下痢症、無症候それぞれ 16, 11, 5 サンプルについて解析を行った。ゲノム DNA をテンプレートとして PCR により AIG17 の ORF の存在を検討したところ各症状別に 10, 7, 1 サンプルで陽性が確認された。これを

系統解析で分類すると A, B, C 各グループより 5, 14, 13 のサンプルを検討し、0, 8, 10 の陽性サンプルが確認された。

## D 考察

### 1) 日本株の遺伝子型別と系統解析

系統解析によりグループ分けされた A, B, C を比較するとクラス C は日本株が大半を占め、さらに無症候は 1 しかないことから、日本に多い病原性の高い遺伝子型が存在することが示唆された。また日本由来の 5 つの非病原性株はグループ A に 3 株分類され、このグループは台湾株の情報と合わせると無症候株が一番多いことから、日本の無症候株はアジアに広く存在する無症候株であることが示唆された。

### 2) 病原性関連 ORF の解析

以前無症候株で欠損しているとして同定された AIG17 の ORF を PCR にて確認したところ、日本の無症候株では 5 株のうち 1 株から検出された。よってすべての無症候株に共通の特徴ではないと考えられた。しかし肝膿瘍株、下痢症株ではそれぞれ 10/16, 7/11 の陽性株が存在していた。症状別に PCR 陽性サンプルを%で考えると無症候性、肝膿瘍、下痢症でそれぞれ 20, 62.5, 63.6% であり、昨年度行った台湾株での結果を合わせると下痢症と無症候性サンプル間で t-test で有意差を見出した。肝膿瘍株に関しては台湾株のサンプルが 2 株しかなく、母集団が確保されなかったため有意差を見出すことができなかったと考える。日本株では肝膿瘍、下痢症ともに 60%程度の陽性率を示すため、下痢症と無症候間でも有意差は存在すると考えられる。

系統解析から考察すると、日本株の結果はグループ A, B, C それぞれ 0/5, 8/14,

10/13 の陽性株が存在していた。%にするとグループ A, B, C で 0, 57, 77%が陽性であった。昨年度の台湾株での結果と合わせるとグループ A と C の間で t-test で有意差を見出した。グループ B に関しては台湾株では陽性率が 25%と比較的低く、日本株との差が大きく有意差を見いだせなかったと考える。少なくとも AIG17 の存在はグループ A とグループ C で差があり、その存在が赤痢アメーバの系統に依存する可能性が示唆された。今後サンプル数を増やし、検討を重ねる必要がある。

#### E 結論

日本・台湾由来臨床株の遺伝子型の系統解析から、日本で見出された非病原性株は台湾で多く見出された非病原性株と系統が似ていること、病原性に関与する可能性が示唆されていた AIG1 family protein

(EHI\_176590) が東アジア株の解析から実際の病態に関与する可能性が示された。また、AIG1 family protein (EHI\_176590) の分布は赤痢アメーバの系統に依存することも示唆された。

日本とリスクグループが共通であり、人種も近い台湾との共同研究は東アジアのアメーバ症疫学研究に有益であり、協力して臨床株の解析を行うことで日本だけでは不可能な疫学調査と研究を進展させることができる。今後も協力関係を続け、新たに樹立された臨床株のゲノム解析を行い、AIG1 family protein PRF が赤痢アメーバの病原性にどのように関与するのか、明らかにしていきたい。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

該当なし

##### 2 学会発表

Kumiko Tsukui, Genomic features of *Entamoeba histolytica* Japanese clinical isolates The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster、2012年9月

#### H 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書（H24年度）

日本および台湾におけるデング熱輸入症例からのデングウイルス遺伝子解析

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）

協力研究者 小滝徹、モイ メンリン、田島茂

（国立感染症研究所ウイルス第一部）

倉根一郎

（国立感染症研究所・副所長）

舒佩芸、鄧華眞

（台湾行政院衛生署疾病管制局）

**研究要旨** デング熱の流行地域および流行は年々拡大増加する傾向にある。台湾では毎年、デング熱が流行しているが、わが国同様海外からの輸入症例も多い。我が国の2010年のデング熱輸入症例数は245であり、台湾では300例を超えた。そこで、フィリピンおよびインドネシアからの輸入症例から、ウイルスを分離し、配列を決定したウイルス遺伝子情報を交換し解析した。2012年の我が国へのフィリピンからの輸入症例は34例、インドネシア16例であった。そのうちウイルス遺伝子を検出した症例は、フィリピンが20例、インドネシアが8例であった。このうちウイルスが分離できた株は10株、台湾の分離株は5株であった。その結果、フィリピンではデングウイルス1型が主流株であったが、2型、3型、4型すべてが活動していたことが明らかになった。これは2012年フィリピンのデング熱患者報告数が178,644例で死者数が872例（死亡率0.5%）であったことと関係する可能性が示唆される。

A. 研究目的

台湾と日本における主たる昆虫媒介性ウイルスは日本脳炎ウイルスとデングウイルスである。輸入症例を含めた患者報告数としては、デング熱が日本脳炎より多いため本年度はデング熱を対象とした。台湾ではデング熱が毎年流行しているが、日本では国内発生がない。そこで、デング熱輸入症例に対象を絞った。デング熱の輸入症例のなかでも、島国を対象にすることによって各島で異なるウイルスによる流行が存在する可能性が

高いと考え、島国であるインドネシア、フィリピンからの輸入症例に関してウイルス遺伝子情報を交換した。

B. 研究方法

フィリピン、インドネシアからの発熱患者をウイルス遺伝子検査、デングウイルス非構造抗原（NS1）検査およびデングウイルスIgM抗体検査（ELISA法）を実施し、デング熱であることが確認された症例に関して、急性期血清からウイルス

分離を実施した。ウイルス遺伝子解析は、患者血清からのダイレクトシーケンスと分離ウイルスからのシーケンスを実施し、患者血清からのシーケンスが得られた場合はその配列を優先して採用した。遺伝子解析は、E領域をダイレクトシーケンスにより、ABI prism Avant 7100(ABI社)によりプロトコールに従い塩基配列を決定した。決定した塩基配列はそれぞれデングウイルス型別にソフトウェア (MEGA4) により系統樹解析を行った。

### C. 研究結果

2012年のフィリピン、インドネシア輸入症例から日本側14株、台湾側5株のデングウイルス遺伝子解析データが得られた (H25年2月22日現在)。インドネシアからはデングウイルス1型; 5株、フィリピンからはデングウイルス1型: 10株 (台湾: 5株、日本: 5株)、2型は2株 (日本: 2株)、3型は1株 (日本: 1株)、4型は1株 (日本: 1株) であった。

フィリピンからの輸入症例のデングウイルス1型を台湾および日本のものを含めて系統樹解析したところ、フィリピンの1型ウイルスはいずれも相同性が高かったが、PH1207a(台湾)と12-19 (日本) は100%一致した。また最も離れたウイルスの相同性は96%であった (表1)。全体として基準とした分離株に対して変異が認められるウイルス株は、ほぼ同様の部分に変異を示していた。すなわち大きく2種類のウイルス群に大別できるといえる (図1)。またフィリピンから日本への輸入症例はD2感染2例、D3感染1例、D4感染1例が確認された。D2感染の1例はセブ島、D3感染例はダバオ島が渡航先であった。

インドネシアの2型ウイルスは、D2/12-11とD2/12-19が100%一致した (表2)。この2人の患者の渡航先はどちらもBali島であった。インド

ネシア由来の5株は相同性が97%以上と非常に近いウイルスであり、D2主流株は同一ウイルスである可能性が示唆された (表2、図3)。

### D. 考察

日本と台湾のデング熱輸入症例報告数は、例年台湾の方がやや多い。これは検疫所が台湾CDCに属し、空港におけるフィーバーサーベイランス体制が厳しいことによると考えられている。フィリピンの2012年のデング熱患者数は、178,644例で死亡数872例 (CFR=0.5%) であったことから、流行規模が大きく主流株はD1であったが、さまざまなウイルスが流行していたと考えられる。しかし、フィリピンからの輸入症例からは2型、3型、4型ウイルスも分離されているので、この状況が、多くの2度目の感染を引き起こし死亡数872人という状況を惹起した可能性は高いと考えられる。しかし、ウイルスが強毒化した可能性も考えられるので、日台双方の分離株に関して全ゲノム解析を実施し、比較解析する必要がある。

一方、日本人のインドネシアへの観光は、バリ島が多く、ジャカルタなど比較的渡航先が限定されているため、台湾のデータ整理を待って詳細に解析したい。

### D. 結論

日本および台湾のフィリピン、インドネシアからのデング熱輸入症例からの分離ウイルスは、近似なウイルスであることが多く、構造遺伝子部分で100%一致した株も存在した。しかし、近似で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。特に2012年のフィリピンの流行では致死率0.5%と高かったこともあり、さらなるウイルス学的解析、検討が必要である。

E. 健康危機情報  
なし。

F. 研究発表  
論文発表 (英文)

1. Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Kaw Bing Chua, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Dengue Virus Infection-Enhancing Activity in Serum Samples with Neutralizing Activity as Determined by Using FcγR-Expressing Cells. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 6(2):e1536. 2012
2. Yasutaka Mizuno, Yasuyuki Kato, Shigeyuki Kano, Tomohiko Takasaki. Imported malaria and dengue fever in returned travelers in Japan from 2005 to 2010. *Travel Medicine and Infectious Diseases*. 10:86-91. 2012.
3. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2047-2052
4. Tsutomu Omatsu, Meng Ling Moi, Tomohiko Takasaki, Shinichiro Nakamura, Yuko Katakai, Shigeru Tajima, Mikako Ito, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari & Ichiro Kurane. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *J Med Primatol* (2012) 1–8.

5. Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, Takasaki T, Kanagawa S. Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan. *J Travel Med*. 2012 Jul;19(4):255-257.
6. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods*. 384(1-2):81-91 2012
7. Yamaguchi Y, Nukui Y, Kotaki A, Sawabe K, Saijo M, Watanabe H, Kurane I, Takasaki T, Tajima S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *J Gen Virol*. ;94(1):90-96. 2013.
8. Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, Takasaki T, Rerkamnuaychoke W, Maeda K. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *J Virol Methods*. 187(1):85-89. 2013
9. Kazuo Nakamichi, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada, Shuji Kishida, Yoshiharu Miura, Toshio Shimokawa, Tomohiko Takasaki, Chang-Kweng Lim, Ichiro Kurane and Masayuki Saijo. Characteristics of progressive

multifocal leuko-encephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. BMC Neurology. 12:121. 2012

10. Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ogasawara Y, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K. Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a Japanese traveler after returning from Thailand. J Travel Med. 20(1):50-53. 2013

11. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 107(1):51-58. 2013.

## 2. 学会発表

### 1) 国際学会

Meng Ling MOI, Chang - Kweng Lim, Masayuki Saijo, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc  $\gamma$  R-expressing cells. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. 2012/Nov/11-15. (Atranta, USA)

Ujiie M, Moi ML, Kotaki A, Takeshita N., Kanagawa S., Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. 2012/Nov/11-15 (Atlanta, USA)

Tomohiko Takasaki. Development of an animal model for evaluation of vaccine and therapeutics against dengue virus

infection. 第9回日台シンポジウム 2012年9月20-21日(台北)

Tomohiko Takasaki. Dengue vaccine development in the world: overview and status update. Scientific Meeting on Infectious Diseases, Advance Update on Pathogenesis of Viral Infection: Hepatitis, Dengue, Coxsackie, Epstein Barr, and HIV. 2012/Oct/24th. FMUI (Jakarta, Indonesia)

M.L. Moi, T.Omatsu, S.Tajima, C.-K.Lim, M.Saijo, I.Kurane, T.Takasaki. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in traveler. 9th Asia Pacific Travel Health Conference. 2-5th May 2012 (Singapore).

### 2) 国内発表

小滝徹、モイメンリン、田島茂、高崎智彦. ウイルスRNA安定保存キットの評価. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日(大阪)

高崎智彦. デング熱、チクングニア熱など昆虫媒介性ウイルス感染症の現状と今後. 平成24年度新興再興感染症講演会. 2012年10月16日(名古屋市)

高崎智彦. 教育講演—我が国の日本脳炎の現状—特に小児において—. 第44回小児感染症学会総会・学術集会. 2012年11月24-25日(北九州市)

林昌宏、網 康至、藤井克樹、北浦和孝、モイメンリン、白井顕治、小滝 徹、須崎百合子、森川茂、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日(大阪)

高崎智彦. マーモセットを用いたチクングニアウイルス、デングウイルス感染病態解析. シンポジ

ウム2 熱帯感染症. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日(大阪)

モイメンリン、大松勉、高崎智彦、中村紳一郎、網康至、片貝祐子、須崎百合子、倉根一郎. Role of antibodies in dengue protective immunity and infection during secondary infection of marmosets. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月13-15日(大阪)

高崎智彦. チクングニアウイルスの生態と病原性. 第53回日本臨床ウイルス学会. 2012年6月16-17日(大阪府豊中市)

高崎智彦. デング熱など昆虫媒介ウイルス感染症. 第111回日本皮膚科学会総会. 2012年6月1-3日(京都市)

モイメンリン、林昌宏、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. デング熱診断サーベイランスのための

NS1抗原検出キットの有用性. 第86回日本感染症学会総会学術講演会. 2012年4月25-26日(長崎市)

駒瀬勝啓、高崎智彦、竹田誠. デング熱患者血清における麻疹IgM抗体の検出. 第86回日本感染症学会総会学術講演会. 2012年4月25-26日(長崎市)

竹下望、水野泰孝、Lim Chang-Kweng、小滝徹、氏家無限、大曲貴夫、加藤康幸、金川修三、高崎智彦. 日本脳炎ワクチンによる持続効果とブースター効果に関する研究. 第86回日本感染症学会総会学術講演会. 2012年4月25-26日(長崎市)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



表1 デングウイルス1型（フィリピン）のホモロジー

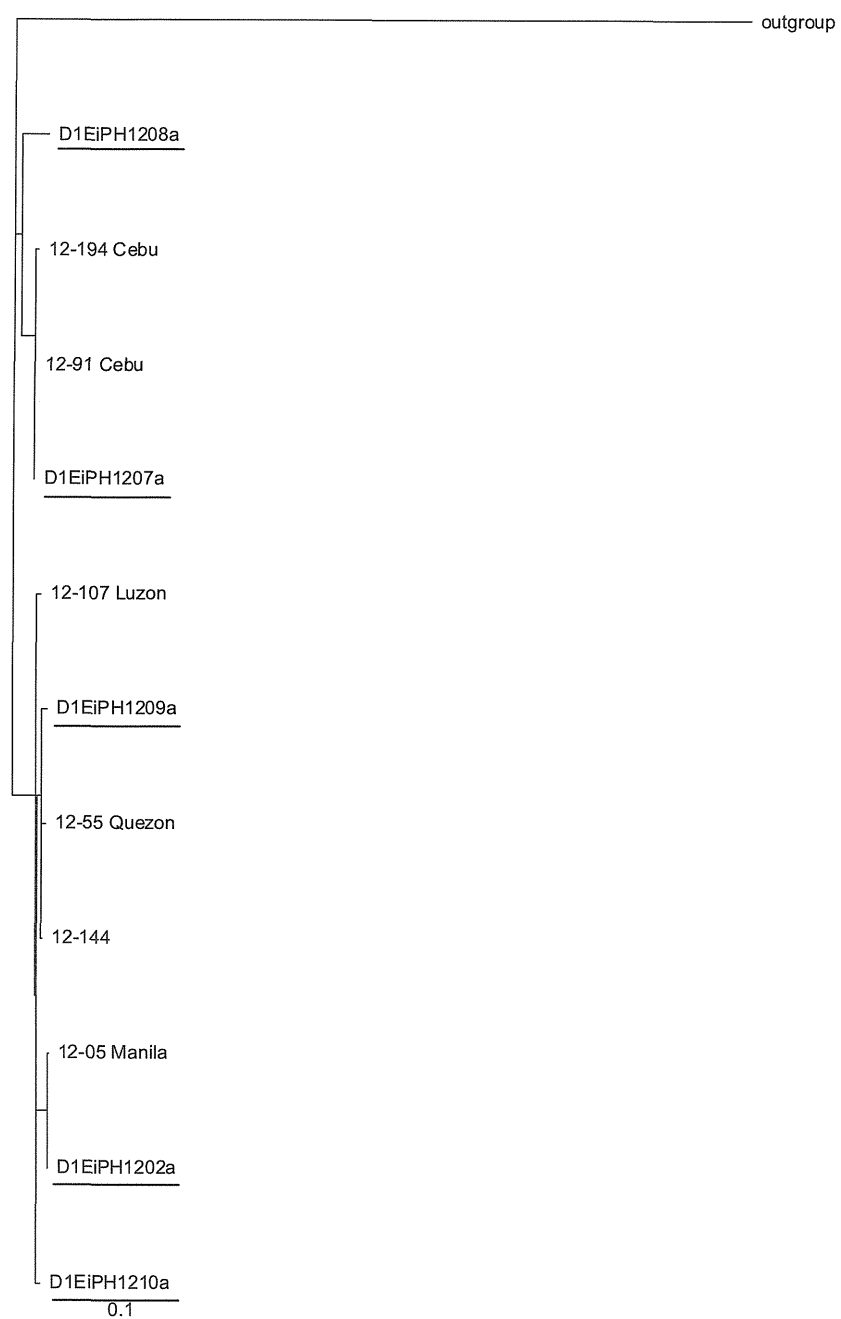
	12-55	12-91	12-107	12-144	12-194	PH1202a	PH1207a	PH1208a	PH1209a	PH1210a
12-05	1471/1485 (99%)	1448/1485 (97%)	1474/1485 (99%)	1473/1485 (99%)	1446/1485 (97%)	1484/1485 (99%)	1448/1485 (97%)	1437/1485 (96%)	1470/1485 (98%)	1474/1485 (99%)
12-55		1449/1485 (97%)	1476/1485 (99%)	1481/1485 (99%)	1447/1485 (97%)	1472/1485 (99%)	1449/1485 (97%)	1441/1485 (97%)	1478/1485 (99%)	1476/1485 (99%)
12-91			1454/1485 (97%)	1451/1485 (97%)	1483/1485 (99%)	1449/1485 (97%)	1485/1485 (100%)	1457/1485 (97%)	1448/1485 (97%)	1452/1485 (97%)
12-107				1478/1485 (99%)	1452/1485 (97%)	1475/1485 (99%)	1454/1485 (97%)	1446/1485 (97%)	1475/1485 (99%)	1479/1485 (99%)
12-144					1449/1485 (97%)	1474/1485 (99%)	1451/1485 (97%)	1441/1485 (97%)	1480/1485 (99%)	1478/1485 (99%)
12-194						1447/1485 (97%)	1483/1485 (99%)	1455/1485 (97%)	1446/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
PH1202a							1449/1485 (97%)	1438/1485 (96%)	1471/1485 (99%)	1475/1485 (99%)
PH1207a								1457/1485 (98%)	1448/1485 (97%)	1452/1485 (97%)
PH1208a									1438/1485 (96%)	1442/1485 (97%)
PH1209a										1475/1485 (99%)

表2 デングウイルス2型（インドネシア）のホモロジー

	12-19	12-22	12-26	12-42	12-62
12-11	1485/1485 (100%)	1451/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
12-19		1451/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
12-22			1484/1485 (99%)	1484/1485 (99%)	1484/1485 (99%)
12-26				1483/1485 (99%)	1483/1485 (99%)
12-42					1483/1485 (99%)



図 2



下線；台湾の分離株、他は日本の分離株

