

結核菌の薬剤耐性(台湾 CDC)
NDM-1 型薬剤耐性菌(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

これまでに台湾で分離された INH 耐性結核菌で、既存の耐性検出用 DNA プローブに含まれていない変異で、かつ耐性と関連が明らかにされていない変異 *ahpC* の C-10T、*KatG* の Y337C、*Ndh* の I68T を持つ株を複数見出した。今後感染研にて、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。そして INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良を目指す。台湾を始めアジア各国で結核罹患率の高い国で薬剤耐性結核の迅速診断に役立つことが期待される。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで6例報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻りに分離されている。ベトナムで分離された NDM 遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 株 1 2 株の MLST 型を調べたところ、全てが、世界的に流行タイプとして知られている CC-92 とは異なるタイプだった。院内感染に関する対策が十分でないことが背景として考えられる。日本国内においては、途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者について、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要があると考えられる。

研究協力者

森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部)
金 玄 (国立感染症研究所・細菌第二部)
松井 真理 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 仁人 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 里和 (国立感染症研究所・細菌第二部)
和知野純一 (名古屋大学医学部・細菌学)

A. 研究目的

薬剤耐性結核菌は世界の深刻な社会問題の一つである。治療薬であるイソニアジド(INH)に対する耐性菌はよく分離されるが、耐性は *katG*、*ndh* などの遺伝子の変異による。これらの変異を標的とした DNA プローブによる迅速検出法が実用化されているが、台湾 CDC では、その DNA プローブに含まれない変異を持つ耐性株が分離されている。台湾 CDC との共同研究では、台湾 CDC で見いだされたこれらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかを感染研で解析することとした。

NDM 型耐性菌は、2010 年にインド、パキスタンで見いだされてから世界中に拡散している。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで6例報告があるのみだが(Table 1)、ベトナムにおいては医療機関で頻りに分離される。発展途上国では医療機関だけでなく環境中にも蔓延していることが報告されている。ベトナム NIHE との共同研究では、ベトナムにおける NDM 型耐性菌の実態について分子疫学的に調査することとした。ベトナムの医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生株について、感染研において遺伝子型別を行う

こととした。

B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、*ahpC*、*katG*、*ndh* 遺伝子の変異を調べ、過去に報告がないものを選び出した。

ベトナム NIHE においては、医療機関からカルバペネム耐性菌を収集し、PCR により NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子をスクリーニングした。今年度は *Acinetobacter baumannii* に焦点を当てて、感染研で Multilocus sequence typing (MLST)により遺伝子型別を行った。また、感染研で考案した SMA ディスクによるカルバペネマーゼ産生菌の迅速検出法が NDM 型耐性菌にも応用できるかどうか、評価を行った。

倫理面への配慮 該当なし。

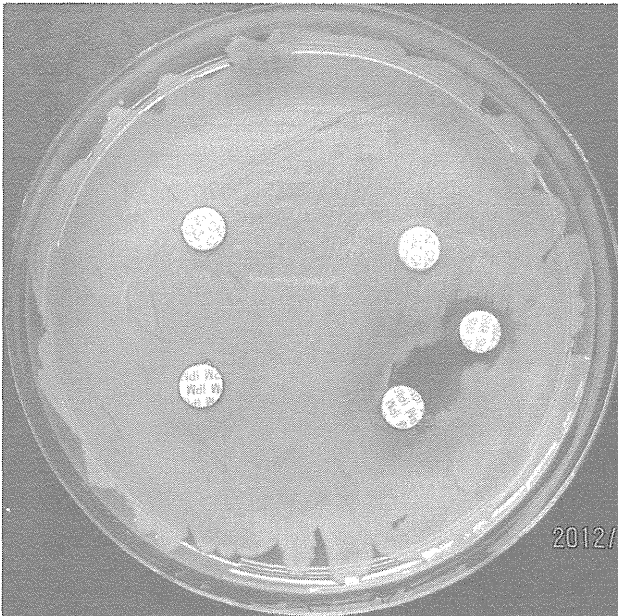
C. 研究結果

台湾 CDC で収集した結核菌で、INH 耐性のものについて遺伝子の変異のスクリーニングを実施し、過去に耐性と関連が証明された変異部位以外の変異を持つものについて、情報を蓄積した。*ahpC* 遺伝子の C-10T、*KatG* の Y337C、*ndh* の I68T の変異を持つ株を複数見出した。今後感染研にて、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。感染研にて遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させ、リコンビナント蛋白を作成して機能解析を行い、変異により活性がどのように変化しているのか、またその変化が薬剤耐性と相関するかどうかを調べることとした。さらに、遺伝子に既知の変異を持たない耐性株も複数分離されたので、耐性を再度確認後、菌を感染研に送

付してもらい、ゲノム解析を行うこととした。

ベトナムハノイ市内の医療機関で NDM 型カルバペナーゼ産生 *A. baumannii* を 12 株分離した。これらの株から DNA を抽出し、感染研にて MLST により型別を行った。*A. baumannii* は、MLST により世界的な流行タイプ CC-92 とそれ以外のものに分けられる。CC-92 は、多剤耐性のことが多く、また特に院内感染を起こしやすいという特徴がある。日本国内で院内感染によるアウトブレイクを起こすのは、ほとんどの場合 CC-92 タイプである。ベトナムで分離された NDM 産生株 12 株の MLST 型を調べたところ、全て non-CC-92 タイプだった。また、NDM を持たない *A. baumannii* 11 株も同時に解析したところ、2 株が CC-92 で、9 株は no-CC-92 タイプだった (Table 2)。また、同一医療機関から分離された株でも、タイプが異なっていた。

感染研で考案された SMA ディスクによるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌検出法を NDM 型耐性菌に応用したところ、*Acinetobacter* だけでなく、大腸菌、*Klebsiella*、その他腸内細菌において問題なく使用出来ることが分かった。例を示す。NDM 陽性の *A. baumannii* ではセフトチジム (CAZ) とイミペネム (IPM) では阻止円が形成されないが、SMA ディスクをおく事により IPM ディスクに阻止円が形成されることが分かった。株により、メロペネム (MPM) でも SMA ディスクにより阻止円が形成されることが確認出来た。



D. 考察

結核菌の INH 耐性株で、これまでに報告がない遺伝子の変異を見いだした。これらが実際に耐性に関与していることが明らかになれば、現行の INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良につながる。

NDM 型耐性菌については、日本ではまだ稀であるものの、ベトナムでは医療機関で蔓延状態にあることが分かった。これらの株は、流行タイプ CC-92 ではなかった。カルバペナム耐性のこれらの非流行タイプの株が頻繁に分離されるということは、医療

機関における院内感染対策が十分でないことを意味するだろう。ベッドは、複数の患者が共有しているようであるし、グローブや予防衣の着用なども十分にされていないようなので、一旦耐性菌が病棟に持ち込まれると速やかに院内に拡散し、蔓延してしまうと考えられる。また、市中の薬局で処方箋なしで抗菌薬が購入出来るので、国民は比較的頻繁に抗菌薬を服用しているようである。このようなことも、耐性菌を社会で拡散させる一因であると考えられる。

E. 結論

台湾 CDC で INH 耐性結核菌において新たな遺伝子変異を見いだした。

ベトナムで分離された NDM 型カルバペナーゼ産生 *A. baumannii* は、全て非流行タイプだった。このタイプは、仮に日本国内に持ち込まれても通常の感染対策がしっかりと実施されていれば、大きな院内感染を起こす可能性は低いが、海外渡航歴のある患者を受け入れる場合には注意を払う必要があると考えられる。

F. 健康危機情報

途上国を旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者については、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要がある。

G. 研究発表

- 1) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.

Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. *J. Clin. Microbiol.* 2013 Jan;51(1):373-4.

- 2) わが国における NDM 型および KPC 型カルバペナーゼ産生菌分離状況、2012 年現在.

鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子
吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾

病原体微生物検出情報 (IASR) 34(1):8-9, 2013.

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。

Table 1.

No.	Year	Bacterial species	Overseas travel history	Laboratory
1	2010	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	None	NIID
2	2010	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	None	NIID
3	2011	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	India	NIID
4	2011	<i>Escherichial coli</i>	India	Dokkyo University
5	2012	<i>Acinetobacter baumannii</i>	India	Toho University
6	2013	<i>Escherichial coli</i>	Bangladesh	Teikyo University and NIID

Table 2.

NIID No.	NIHE No.	NDM-1 (477bp)	Hospital	species identification (by <i>rpoB</i> sequence)	NIID data												
					PCR					MLST							
					NDM-1 PCR in NIID	OXA-51-like	OXA-23-like	OXA-58-like	OXA-24-like	<i>gltA</i> (722bp)	<i>gyrB</i> (909bp)	<i>gdhB</i> (775bp)	<i>recA</i> (425bp)	<i>cpn60</i> (479bp)	<i>gpi</i> (400bp)	<i>rpoD</i> (926bp)	Sequence Type
1	271	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
2	275	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
3	282	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	1	54	80	28	1	novel2	45	novel 2
4	303	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	1	81	11	48	18	24	43	302
5	320	+	T	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	1	81	11	48	18	24	43	302
6	327	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
7	340	+	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	22	15	13	12	4	62	2	91
8	351	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
9	357	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
10	393	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	33	12	120	10	32	56	5	novel 3
15	650	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
16	821	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	33	12	59	11	32	124	5	novel 4
17	856	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	1	15	3	2	2	3	3	novel 5
19	36	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	7	3	92
20	40	-	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	2	4	84	2	novel 6
21	42	-	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	-	-	-	1	1	13	12	4	16	2	novel 7
24	76	-	S	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	10	12	4	11	4	9	5	109
25	77	-	S	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
26	89	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	96	3	195
27	93	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	22	15	13	12	4	62	2	91
28	94	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
29	95	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
30	103	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	7	3	92

**Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and
Klebsiella pneumoniae Strains Containing
New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Isolated
from Two Patients in Vietnam**

Tran Huy Hoang, Heiman Wertheim, Nguyen Binh Minh,
Tran Nhu Duong, Dang Duc Anh, Tran Thi Lan Phuong,
Trinh Hong Son, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi, Keigo
Shibayama and Nguyen Tran Hien

J. Clin. Microbiol. 2013, 51(1):373. DOI:

10.1128/JCM.02322-12.

Published Ahead of Print 24 October 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://jcm.asm.org/content/51/1/373>

These include:

REFERENCES

This article cites 3 articles, 1 of which can be accessed free at:
<http://jcm.asm.org/content/51/1/373#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new
articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Containing New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Isolated from Two Patients in Vietnam

Tran Huy Hoang,^a Heiman Wertheim,^b Nguyen Binh Minh,^a Tran Nhu Duong,^a Dang Duc Anh,^a Tran Thi Lan Phuong,^c Trinh Hong Son,^c Hidemasa Izumiya,^d Makoto Ohnishi,^d Keigo Shibayama,^d Nguyen Tran Hien^a

National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam^a; Oxford University Clinical Research Unit—Hanoi, Hanoi, Vietnam^b; Vietduc Hospital, Hanoi, Vietnam^c; National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan^d

Emergence of Gram-negative pathogens carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase 1 gene (NDM-1) conveying carbapenem resistance is an urgent and global concern. After the first reported case in 2007, multiple countries around the world reported the presence of NDM-1-positive Gram-negative bacteria (1, 2). This novel type of carbapenem resistance enzyme is encoded on a plasmid and easily transmitted among Gram-negative bacteria, including the human intestinal flora (1).

We report two strains of NDM-1-producing bacteria, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, isolated from two patients admitted to a surgical hospital in Vietnam in September 2010. These patients had no history of travel outside Vietnam (Table 1). The first case was a 52-year-old man who developed fever and abdominal pain 2 months after a Bricker operation and did not respond to empirical antibiotic therapy (he did not remember the name of the antibiotic used). He was admitted to the surgical hospital in September 2010, and the urine collected at admission from his ureterostomy was positive for *E. coli* (>10E7 CFU) on day 3 after admission. The strain was susceptible only to fosfomycin and colistin (Table 1). The MIC of meropenem was >128 µg/ml (Table 1). The patient was treated with fosfomycin, his infection cleared, and he was discharged after 8 days.

The second case was a 62-year-old man with a history of benign prostatic hyperplasia who was operated on in a provincial hospital in September 2009. One year later, he returned with symptoms of urinary retention (he was unable to urinate) and was catheterized. The patient was transferred to a specialized hospital on 21 October 2010 due to an ongoing urinary tract infection with *K. pneumoniae*. This strain was resistant to meropenem and sensitive to colistin and amikacin (Table 1). Although this patient was infected with this resistant strain, he recovered from infection after 6 days of treatment with a combination of clindamycin and amikacin and was discharged from the hospital at the end of October 2010 with a catheter inserted in his bladder and with a follow-up appointment scheduled. The patient was, however, lost to the follow-up.

We identified the metallo-beta-lactamase in these strains by PCR using the specific primers of *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes encoding metallo-beta-lactamase (3) and specific primers NDM1-F (5'-atgcaccggctcgcgaagctgag-3') and NDM1-R (5'-ttcgaccagccattggcggcga-3') targeting the New Delhi metallo-beta-lactamase 1 gene for PCR (2). The *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes were absent. However, PCR did show the presence of the NDM-1 gene, which was also confirmed by sequence analysis of the PCR products (GenBank accession no. FN396876.1).

TABLE 1 Key characteristics of the two patients and their NDM-1-positive strains

Parameter	Patient 1	Patient 2
Sex	Male	Male
Age (yr)	52	62
Admission to Vietduc hospital	10 September 2010	12 October 2010
No. of hospitalization days	8	6
Outcome	Alive at discharge	Alive at discharge
Travel abroad	No	No
Reason for admission	Fever and abdominal tenderness, unresponsive to antibiotics	Urinary retention
Medical history	Bricker operation	Prostatic hyperplasia
Microbiology	Urine: <i>E. coli</i>	Urine: <i>K. pneumoniae</i>
Susceptibility	Resistant to meropenem (>128 µg/ml), ceftazidime (>512 µg/ml), cefotaxim (>128 µg/ml), and ciprofloxacin (>256 µg/ml); susceptible to fosfomycin and colistin	Resistant to meropenem (>8 µg/ml), ceftazidime (>32 µg/ml), cefotaxim (>256 µg/ml), and ciprofloxacin (>328 µg/ml); susceptible to colistin and amikacin

In conclusion, this is the first report of NDM-1-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from patients in Vietnam. These bacteria are a threat to the health care system in Vietnam, where multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria are a major concern (4). Therefore, good surveillance of resistance and proper infection control, as well as monitoring the emergence and spread of the resistant strains, are needed to reduce the impact of resistance.

Published ahead of print 24 October 2012

Address correspondence to Nguyen Tran Hien, ngtrhien@yahoo.com.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02322-12

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this work was received as a research grant from the National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. Heiman Wertheim is funded by the Wellcome Trust, United Kingdom, and the U.S. Global Antibiotic Resistance Partnership.

We report no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 10:597–602.
2. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5046–5054.
3. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. 2007. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-β-lactamases. *Antimicrob. Chemother.* 59:321–322.
4. GARP-Vietnam. 2011. Situation analysis on antibiotic resistance use in Vietnam. Global Antibiotic Resistance Partnership (GARP)-Vietnam, Hanoi, Vietnam.

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 24 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

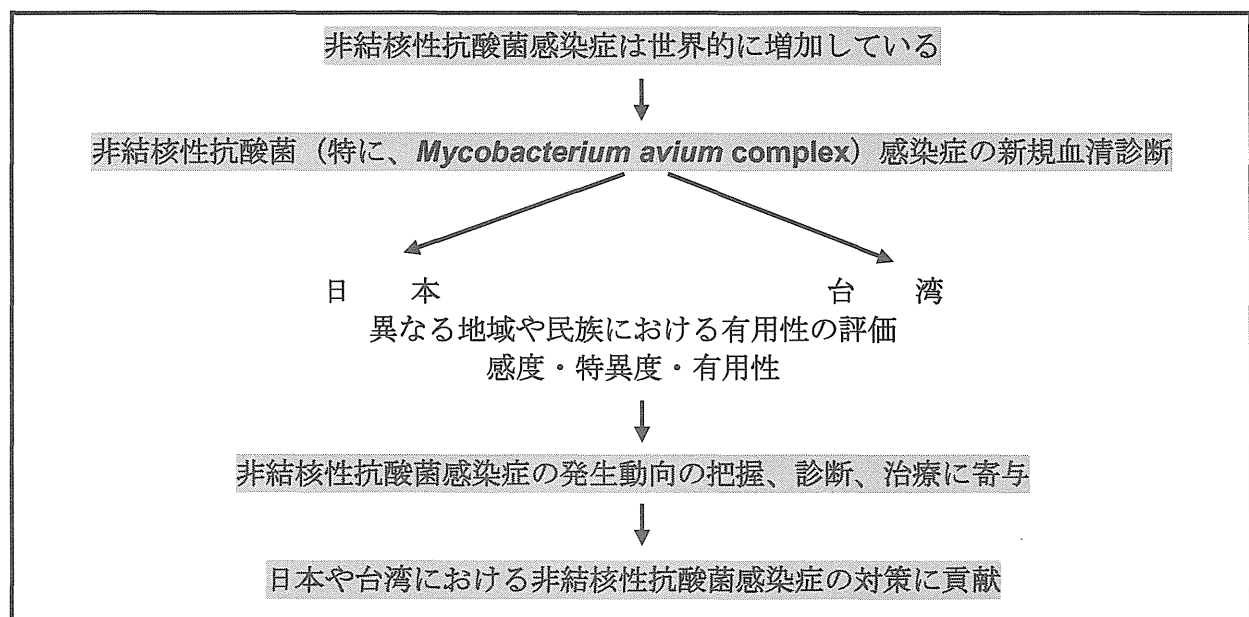
研究協力者： 大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学准教授 松本 壮吉

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-日本（台日）共同研究を推進した。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、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。平成 24 年度の共同研究成果として、1) 台日でヒトを対象とする医学研究倫理審査の承認、2) 台湾の MAC 感染症患者血清を収集、3) MAC 抗体価を測定し、感度：59%、特異度：91%であった。今後、症例を蓄積し、血清診断キットの性能を評価する。



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 10-20%（世界：100-200 万人、日本：2,500-5,000 人/年）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）患者の血清を収集する。

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、カットオフ値：0.7 U/mL、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、国立感染症研究所や国立台湾大学病院で申請書を作成、機関承認を得る。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。現在まで、診断基準（2007 年）に合致した活動性肺 MAC 感染症：42 症例、MAC 混入（contamination）：11 症例、その他の肺疾患（細菌性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、肺がんなど）：10 症例から血清を収集した。

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

活動性肺 MAC 感染症で血清抗体陽性は 25、陰性は 17 症例、MAC 混入（contamination）：陽性は 1、陰性は 10 症例、その他の肺疾患で陽性は 2、陰性は 8 症例であり、血清診断キットの感度は 59%、特異度は 91%であった。

ヒトを対象とする医学研究倫理審査

血清検体の収集や抗体価の測定に先立ち、台日の双方において研究計画に関するヒトを対象とする医学研究倫理審査が承認された。

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 10-20% 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 は遅発育性（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、MAC 感染症の確定診断に約 1 か月が必要となる。

この血清診断キットは MAC 特異的細胞壁抗原（GPL）を用い、特異的血清 IgA 抗体応答を指標としている。日本国内の多施設共同研究による性能評価では感度（84%）、特異度（100%）、迅速性（所要時間：3 時間）など、高い有用性を示している。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。

目標症例数には達していないが、台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 59%、特異度は 91%であった。この成績は日本国内の多施設共同研究による性能評価に比し、特に、感度が低下していた。その可能性として、1）人種による抗体免疫応答の差異、2）臨床的背景の差異（喀痰培養で 2 回以上陽性の時間的間隔や臨床像など）や 3）カットオフ値の再考が考えられた。なお、MAC の微生物学的性状には差異はなかった。今後、さらに、症例を蓄積し、性能評価を進める。

E. 結論

- 活動性 MAC 感染症の血清診断に関し台日の双方において研究計画に関するヒトを対象とする医学研究倫理審査が承認された。
- 目標症例数には達していないが、台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 59%、特異度は 91%であった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, **K. Kobayashi**, and S. Matsumoto. 2012. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. *J. Bacteriol.* 194: 6336.
- 2) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and S.

- Matsumoto. 2012. A novel mechanism underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 287: 27743-27752.
- 3) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto. 2012. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. *PLoS One* 7: e42505.
- 4) 松村隆之、阿戸 学、小林和夫. 2012. 解説. 結核および非結核性抗酸菌感染症の診断. *リウマチ科* 47 : 427-435.
- 5) 小林和夫、松村隆之、阿戸 学. 2012. 解説. 結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題. *JBSA Newsletter* 2 (3) : 6-10.

2. 学会発表

- 1) 佐藤法仁、山崎利雄、小林和夫、大原直也. 2012. ストレプトマイシン依存性結核菌 18b 株の依存性に関与する遺伝子変異の解明と新たなストレプトマイシン耐性を誘導する遺伝子発見の発見. *結核*, 87 : 231, 2012. 第 87 回日本結核病学会総会 (広島、6 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 |
| 3. その他 | 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
研究協力者 中田 登 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 台湾 CDC との共同研究として、ハンセン病の血清診断法の開発と評価及び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を実施しているが、本年はらい菌の薬剤耐性に関する研究で、検出された薬剤耐性変異の詳細な解析を中心に共同研究を行った。耐性変異解析のために13例の検体から抽出したDNAを用い、9例でらい菌由来DNAを検出し、そのうち2例がダブソン耐性変異を示した。この検体は症例情報から耐性が疑われる難治例であることがわかった。その変異と耐性の相関を明らかにするために速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を挿入し、その薬剤に対する影響をみることで証明することができた。

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、ミャンマー、インドネシア、フィリピン、ベトナムなどでは患者の多い地域が存在し、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。台湾との協力研究では第1に、我々がこれまで確立してきたハンセン病の血清診断法を用い台湾のハンセン病患者由来血清の試験を実施してきた。また第2に、各国から報告が散見される薬剤耐性菌調査を台湾の患者由来DNAで実施してきた。その中で、薬剤耐性の存在が疑われる患者由来のらい菌における遺伝子変異を数例検出してきた。それらの変異が実際に耐性をもたらすという直接的な証拠は、らい菌が人工培養できないことからこれまで得ることができなかったのが現状である。この点を明らかにする目的で我々が開発してきた速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を入れ、その薬剤に対する影響をみることで証明するという方法を台湾で得られた耐性変異に応用する。

B. 研究方法

MDT で用いられているダブソン、リファンピシシ及び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シ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)における変異を台湾で得た13検体を用いて検出する。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。変異と耐性の相関を明らかとする実験では、らい菌 *folP1* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、*M. smegmatis* に導入した。次に *M. smegmatis* の *folP1* 遺伝子を破壊するための温度感受性ファージを作製し、らい菌 *folP1* 遺伝子導入 *M. smegmatis* にこれを作用させて、染色体上に存在する *M. smegmatis folP1* の破壊を試みた。また、らい菌 *folP1* に変異を加えたものと加えないものを使用して同様の実験を行い、得られた菌株を用いてダブソン感受性を試験した。

(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

薬剤耐性変異については、これまでに、ダブ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、リファンピシシ耐性の *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。

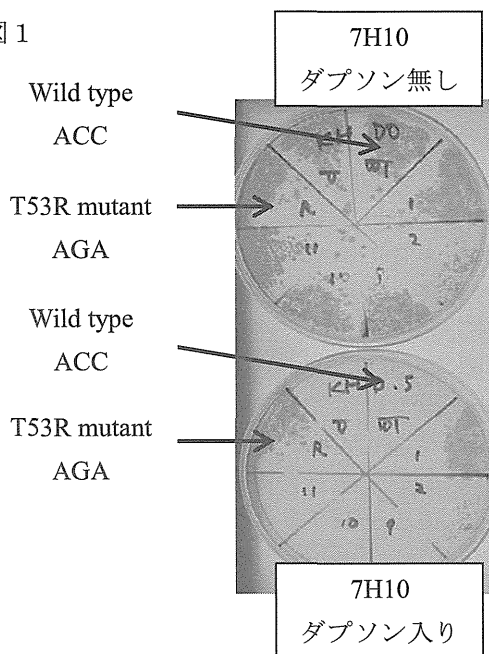
表 1

Sample	Type	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	MB	wt	wt	wt
NTU002	MB	wt	wt	wt
NTU003	MB	wt	wt	wt
NTU004	MB	T53R★	wt	wt
NTU006	MB	NA	NA	NR
NTU007	MB	wt	NA	NA
NTU011	MB	wt	NA	NA
NTU012	PB	T53I	wt	NA
NTU013	PB	wt	wt	NR

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

13 検体を用い、台湾と日本で数度にわたる実験及び結果の照合から前回よりコンセンサスが増え、9 検体の結果を得た (表 1)。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じた。この変異によって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。

図 1



そこで、*folP1* 遺伝子の 53 位が ACC の wild タイプと AGA の NTU004 タイプの遺伝子を作成し、*M. smegmatis* の染色体に挿入し、*M. smegmatis* が自然に持っている *folP* 遺伝子を破壊した。得られた *M. smegmatis* で、53 位が

wild タイプのらい菌 *folPI* 遺伝子持つ菌 (Wild type ACC) と NTU004 タイプを持つ菌 (T53R mutant AGA) の増殖をダブソン入り培地及び薬剤無しの培地での増殖の違いを検討した結果、図 1 で見られるように、薬剤の入った 7H10 培地でも T53R mutant AGA は増殖できることを確認した。すなわち NTU004 で見られた変異が明らかにダブソン耐性をもたらすことが示された。

D. 考察

13 検体中、ダブソン耐性変異が 2 つ検出された。そのうちの NTU004 で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。同じコドンにおいても耐性変異が 1 塩基変異で生じている例と今回のように 2 つの塩基が変化している例があることからそれらの違いが耐性の度合いに影響する可能性も示唆され、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、この変異検出の有用性をお互いに再認識することができた。

E. 結論

今年度は新たなサンプルのテストができなかった、血清診断については、前回好成績が得られていることから、今後パートナーである台湾でハンセン病患者血清を収集してもらい、さらに健康人コントロール及び結核患者血清等の多数の検体も用いて血清診断法の評価を必要があるだろう。

薬剤耐性変異の検出では 13 例中 9 例の結果を得ることができ、得られた変異が確かに耐性と相関していることが証明できたが、耐性菌の動態を把握するためには、やはりさらに多くの菌を調べる必要があるだろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria.

US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.

- 2) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 3) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 5) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 6) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative

Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.

- 7) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦：らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析。第 85 回日本ハンセン病学会総会、札幌市、2012 年 6 月
- 8) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular Studies on *M. leprae* and Ser-diagnosis of Leprosy. The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster. Taipei, Sep. 20-21. 2012.

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

なし

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

カウンターパート：Taiwan CDC, Ms. Fang-tzy Wu.

研究要旨：台湾における2010年から2012年のNorovirus感染患者便検体約300検体を解析するため、2012年12月16日から2週間、台湾CDCのMs. Wu Fang-Tzyが来日し、新規genotypingシステムによる流行分析を行った。2011年までの事前調査では、両国のNorovirus流行はGII.4を主要流行株とする流行からGII.4とGII.2, GII.3が同レベルに混在する流行パターンを示していた。2012年度は、日本だけでなくヨーロッパやアメリカでも新規GII.4 2012バリエントが大流行した。台湾では新規GII.4 2012バリエントが大流行の兆しを見せ始めた。

Abstract:

We investigated Taiwan CDC Norovirus (NoV) positive stool specimens using Super rapid RT-PCR and Super high sensitive ELISA method that called BLEIA and evaluated with these two NoV detection system. The BLEIA showed high sensitivity as same as the standard real-time RT-PCR. We also sequenced 4 of Taiwan CDC (TCDC) GII.4 strains #4, 5, 8, 9. TCDC strain 4 and 5 were classified as GII.4 2012 valiant as same as Sydney 2012 valiant. However, number 8 and 9 showed completely identical sequence and they were classified as a GII.4 2008a valiant. GII.4 2012 valiant made big outbreak in Japan, Australia, Europe, USA in this 2012/13 season. However, Taiwan did not have outbreak with GII.4 2012 valiant. We estimate that GII.4 2012 valiant will make a big outbreak in Taiwan next year.

A. 研究目的

便懸濁検体から直接 Norovirus 核酸を検出可能な迅速検出システム (Super rapid real-time RT-PCR)、ルシフェラーゼを用いた超高感度 ELISA (BLEIA) で Norovirus キャプシドタンパク質を検出するシステムを台湾 CDC に供給し、共通の方法によって Norovirus の分子疫学研究を行う。また、陽性を呈した検体の Norovirus は、部分塩基配列、必要に応じて全長塩基配列を決定し、台湾における Norovirus の流行と、我が国における流行を比較検討する。日本、台湾の分子疫学調査結果に基づき、アジア近隣諸国におけるノロウイルス流行のメカニズムを考察し、Norovirus の流行予測に応用する。Norovirus は、遺伝子の ORF1 と ORF2 のジャンクション領域のホットスポットを起点とするゲノム組換えによる高速進化を遂げる。今年度から、このような組換え型ウイルス (キメラウイルス) の genotyping に対応したシステムを感染研が構築し、遺伝子組み換えを考慮に入れた分子疫学研究を行う。

B. 研究方法

1. 材料と方法

<NoV, SaV 陽性検体>

台湾 CDC (TCDC) 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 検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990 年から 2000 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 132 検体を新手法の評価用レファレンス NoV 陽性糞便パネルとして用いた。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管理運用している。

<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。

<Real-time RT-PCR>

NoV の RNA ゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられている COG primer set と RING probe を用いた real-time RT-PCR を用いた。本方法で得られた RNA 定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIA を評価した。

<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°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。

<塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

<分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

C. 研究結果

1. Super rapid real-time RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1 min の加熱だけで修了する。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半、その後の逆転写反応に 1 時間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 40 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 18 検体、GII 単独感染 76 検体、GI、GII の混合感染

38 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、17/18 (94.4%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、72/76 (94.7%)、混合感染検体の陽性率は、GI 18/38 (47.4%)、GII 37/38 (97.4%)であった。

3. TCDC 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、GII 単独感染に関しては完全にコンベンショナル RT-PCR, standard real-time RT-PCR と同様であった。しかし、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7/39 (18%) と極めて低かった。陰性を示した検体は、そのほとんどが 10^4 copies / μ L を示した。

4. TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。

NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、全ての genotype を検出可能で有り、全ての genotype において、その COI は RNA titer と強い相関関係を保持していた。

5. TCDC より持ち込まれた GII.4 の 2011/12 シーズンの流行株 4 株の全塩基配列を決定したところ、TCDC#5, 6 は 2012 年に日本で

大規模な流行を示した GII.4 2012 変異株と同じクラスターに属することが明らかになった。しかし、TCDC#8, 9 は互いに 100% 同じ配列を有しており、さらに GII.4 2008 クラスターに属していた。2012/13 シーズンにおいて台湾では GII.4 2012 年変異株と従来の変異株の混合流行が認められた。この傾向は、2012 年変異株が流行の 9 割を占める日本、ヨーロッパ、USA と異なる傾向であり、GII.4 のバリエーションの流行は、日本よりも遅れる傾向にあることが明らかになった。

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 $1.7 \mu\text{L}$ であるのに対し、Super rapid 法は、 $1 \mu\text{L}$ 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。塩基配列と便検体中の RNA titer を確認したところ、プライマープローブの標的領域に変化は認められなかった。しかし、おしなべて RNA titer が 10^4 copies/uL と低値を示したことから、Super rapid RT-PCR は、 10^5 copies/uL 以下の検体は検出が困難であると考えられた。しかし、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を施行し、素早く結果を得るなど、迅速な NoV 流行解析に適していると思われる。

TCDC の GII.4 変異株解析の結果、日本や Europe, USA で観察された GII.4 2012 年変異株の流行は、まだ味待ったばかりで有り、従来型 2008 年変異株と勢力を分かち状態である事が明らかになった。台湾での NoV 流行は、日本、Europe, USA, Australia よりも遅れて始まることが示唆された。流行株の違いは、ヒトの航空機による移動の頻度に影響されている可能性がある。来年度は、タイ、ベトナム、韓国などの他のアジア諸国における NoV 流行調査を行い、NoV 流行のメカニズムの解明に取り組む予定である。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

なし。

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

ブルセラ症の診断法の開発に関する研究

（含、日本・台湾のイヌにおけるイヌブルセラ菌感染状況調査）

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者	水谷 浩志	東京都動物愛護相談センター 城南島出張所 獣医師
研究協力者	山本 智美	東京都動物愛護相談センター 城南島出張所 獣医師
研究協力者	久保田 菜美	東京都動物愛護相談センター 城南島出張所 獣医師
研究協力者	岡本 その子	栃木県保健環境センター 微生物部 主任研究員
研究協力者	山本 明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
研究協力者	柳井 徳磨	岐阜大学 応用生物科学部 獣医病理学教室 教授

研究要旨： ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (genus *Brucella*) の感染を原因とする人獣共通感染症である。世界では、多くの国々で家畜、ヒトにおける感染が知られ、家畜衛生ひいては人の公衆衛生上も大きな問題となっている。

ただ、現在は日本・台湾ともに家畜ブルセラ菌は国内の家畜からは清浄化していると考えられ、家畜ブルセラ菌感染患者は輸入症例に限られている。一方、イヌブルセラ菌 (*Brucella canis*) については、日本と同様に、台湾国内のイヌでも *B. canis* 感染報告が過去にあることから、ヒトへの感染も起きていることが懸念される。そこで、今年度は、日本・台湾のイヌにおける *B. canis* 感染状況調査として、同一の手技により、その抗体保有状況を検討、比較することとした。

B. canis に対する抗体は、マイクロプレート凝集反応 (MAT) を用いて測定した。東京都、栃木県、東北 6 県より新たに検体を得た。これまでに検討していた結果と併せて、国内のイヌは、4.9%が抗体陽性、すなわち感染歴を持つことがわかった。また、500 検体前後調査した中では、神奈川県は 2.5%に比較して、栃木県は 6.5%、東京都は 7.9%と陽性率が高くなっていた。ただ、栃木県、東京都とも近年は、陽性率の低下傾向が認められるようであった。その理由については、イヌのプロファイルを元に検討中であるが、結論は得られていない。台湾については、現在、調査継続中である。

A. 研究目的

ブルセラ症 (Brucellosis) は世界では、毎年新規患者が50万人以上発生していると言われる重要な人獣共通感染症であるが、家畜が自然宿主である *Brucella*

melitensis、*B. suis*、*B. abortus* については、国内の家畜はこれら家畜ブルセラ菌に対して清浄であり、国内の家畜からヒトが感染するリスクはない。一方、*B. canis* (イヌブルセラ菌) はイヌを自然宿主とし、ごくまれに人にも感染することがあり、国内では、

B. canis 感染患者12例が届け出られている(表1)。国内のイヌのブルセラ病については、1970年代の実験用イヌ繁殖施設での集団発生を始めとして、近年でもペット用イヌの繁殖施設における集団発生がしばしば報告されており(表2)、さらに、報告されていない物も多々あると考えられることから、国内のイヌの数%が感染歴を持つと考えられている。台湾でも、現在は家畜ではブルセラ菌の感染報告はなく清浄化していると考えられるが、イヌでは2001年に、*B. canis* 感染に関する論文報告があり、状況としては日本と非常に似通っている。

一般に、日本では、ブルセラ属菌に対する抗体を測定する際には、不活化ブルセラ属菌を用いた試験管内凝集反応(TAT)が実施されている。しかし、TATは試験管を用いるため検査に必要な抗原量・血清量が多く、また一度に多くのサンプルを検査することも困難である。そこで、より少量の抗原・血清ですみ、また多くのサンプルを一度に検査することを可能にする、マイクロプレートを用いた凝集反応(MAT)を用いて、イヌのスクリーニングを実施することも有用な方法であると考えられる。また、MATによる検査結果がTATによる結果と相関を持つことはすでに我々により報告済みである。

そこで、今年度は、日本および台湾のイヌにおける*B. canis*感染状況調査として、双方同一の手技により、その抗体保有状況を調査・検討することとした。検査方法については、MATもTATとともに、昨年度、本研究班で台湾CDCにその検査手技について技術移転を実施済み(技術移転が良好に行われたことにより、台湾では、2012年2月7日より、ブルセラ症が新たに届出疾患となった)であることから、MATを用いることとした。

B. 研究方法

1. イヌ血液サンプル： 2011 および 2012 年度に東京都動物愛護相談センターに収容されたイヌ 125 および 79 頭、栃木県動物愛護指導センターに収容されたイヌについては 2012 年度の 44 頭ほか 2002~2005 年度の 536 頭の血清を検討に用いた。福

島〜青森県については、猟犬の血清を検討に用いた(表3)。検査結果については、すでに実施済みの結果と併せて、解析を行った。総検査数は、25 都府県、2,176 頭である。

2. マイクロプレート凝集反応(MAT)：*B. canis* 凝集反应用菌液(北里研究所)と0.25%サフラニン染色液を50:1の比率で混合し、MAT用の抗原とした。抗原がプレートへの吸着することによる非特異的反応を避けるために、96穴U底プレートを、あらかじめBlocking One(ナカライテスク)で、室温、1時間、ブロッキングした。ブロッキング溶液を捨てた後、サンプルをリン酸緩衝生理食塩水で5倍から2倍段階希釈して調整した(各ウェルの液量は25ul)。これに等量(25ul)のサフラニン処理した凝集反應用抗原を加え、プレートを攪拌した後、湿潤箱に入れて、50°C、24時間、反応させた。血清希釈1:160以上で、凝集像が確認されたものを陽性と判定した。陽性対照にはホルマリン不活化*B. canis*全菌体を免疫したウサギ血清を用いた。

C. 研究結果

1. マイクロプレート凝集反応(MAT)： 2011 および 2012 年度の東京都の結果は、それぞれ 7/125 (5.6%)、3/79 (3.8%) が陽性であった。これに 2007~2010 年度の結果をあわせると、全 519 頭に対して 41 頭 (7.9%) が陽性を示した。年度ごとの比較では、検体数のばらつきはあるが、2007~2010 年度は 7.6~13.5%の陽性率と、隣接県の神奈川県 2.5% や全数 2,176 頭における陽性率 4.9% (107 頭) に比べて高値を示した。ただ、2011、2012 年度と陽性率は低下傾向が認められ、全数陽性率 4.9% とほぼ同程度であった(表3)。

栃木県の結果は、2002~2004 年度が 7%強、2005 年度が 5.4%の陽性率だったのに対し、2012 年度は 2.3%と、東京都と同様やはり低下傾向が同われ、神奈川県と同程度であった(表3)。ただ、2012 年度に関しては検体数が少ないことから、追加の検体を集めているところである。