

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）との狂犬病および炭疽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

研究分担者：	井上 智	国立感染症研究所・獣医科学部
研究協力者：	奥谷晶子	国立感染症研究所・獣医科学部
	野口 章	国立感染症研究所・獣医科学部
	加来義浩	国立感染症研究所・獣医科学部
	Bazartseren Boldbaatar	IVM・ウイルス部
	飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部
	阿戸 学	国立感染症研究所・免疫部
	Nguyen Thi Kieu Anh	NIHE・ウイルス部
	Hoang Thi Thu Ha	NIHE・細菌部

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）との狂犬病及び炭疽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を行うために、NIHEの狂犬病ラボ（ウイルス部・Dr.Nguyen Thi Kieu Anh）と炭疽ラボ（細菌部・Dr.Hoan Thi Thu Ha）と共同して、当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学、ベトナムの地域ラボ・ネットワーク強化の促進を行った。

狂犬病：（1）ベトナムで流行しているウイルス株を簡易かつ迅速に検出できる LAMP 法の確立、（2）診断ラボのネットワーク強化に必要となる検査系の検証法を検討、（3）NIHEと地域ラボとのネットワーク強化を目的に、北部の流行地域で狂犬病の臨床・検査・疫学等を網羅したモデル研修を試みた。

炭疽：（1）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から分離した菌株についてNIIDで構築した80-SNP（Single Nucleotide Poolymorphism）を利用して系統解析を行い、ベトナム株はアジア分離株の多数含まれる A3 クラスターに所属するが日本株（A3a クラスター）やモンゴル株（A3b クラスター）と異なるクラスターを韓国分離株と形成することを明らかにした。（2）また、流行地域で発生する患者の感染源を特定する方法について調査・検討を継続した。

- English -

The study for the strengthening and enhancing of laboratory network and collaborative research of rabies and anthrax with National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)

Unit of research

NIID	Satoshi Inoue Akira Noguchi Yoshihiro Kaku Akiko Okutani Boldbaatar Bazartseren Minoru Tobiume Manabu Ato	(Rabies and Anthrax)
NIHE	Nguyen Thi Kieu Anh Hoang Thi Thu Ha	(Rabies unit) (Anthrax unit)

Abstract: This study is for the strengthening and enhancing of laboratory network and collaborative research of rabies and anthrax with NIHE. This year, we focused on the diagnostics, molecular epidemiology and the laboratory network on rabies and anthrax in Vietnam.

Rabies. (1) the development of RT-LAMP for rabies, (2) the capacity building of laboratory diagnosis by the proficiency test according to the quality assessment scheme and (3) the trial of training course for the laboratory network in the local.

Anthrax. (1) the molecular analysis of *B.anthraxis* isolated from a patient in Vietnam (2011 June). This strain was classified into a cluster with a strain isolated in Korea and distinguished from the clusters of A3a (Mongolian strains) and A3b (Japanese strains) by the 80-SNP (Single Nucleotide Polymorphism) method and (2) the analysis of the infection sources in the environment around patients.

A. 研究目的

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) との狂犬病及び炭疽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を行うために、NIHE の狂犬病ラボ (ウイルス部・Dr. Nguyen Thi Kieu Anh) と炭疽ラボ (細菌部・Dr. Hoan Thi Thu Ha) と共同して当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学、ベトナムの地域ラボ・ネットワーク強化の促進について行った。

B. 研究方法

狂犬病

ベトナムで流行している狂犬病ウイルスを検出可能な RT-LAMP 法の確立

ベトナム北部・中央高地・南部の三地域 (図 1) から代表的な 11 株を選択後、N 遺伝子の塩基配列を特定して RT-LAMP に使用するプライマーを 16 種類設計して (表 1)、プライマーセットを 20 種類構築した (表 2)。

RT-LAMP の反応条件は既報 (Boldbaatar B., and et al. Jpn.J.Infect.Dis. 62:187-191, 2009) を利用して至適条件を検討した。

NIID: プライマーデザインと反応系の構築および検出成績の分析。

NIHE: ウイルス株の供与と反応系の検証。

検査系の技能等に関する検証方法の検討

NIHE はベトナムで流行している狂犬病の実験室内検査を行うベトナムの中央ラボであり、将来的に地域ラボと連携したラボラトリーネットワークの構築を目指している。

将来、地域ラボに検査系を普及したときに検査系の精度を維持するための取り組みが必要になると考えて EQAS (外部精度評価プログラム) を利用した検査手技等の検証方法を検討し

た。

EQAS は、NIHE で行われた EQAS セミナー (資料 1) に参加して講師として招かれた Lai-king Ng 博士 (International Activities Advisor, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada) の助言を受けながらブライントテストを試みた。

検証の手順

- (1) NIID で準備した検体を NIHE に送付。
- (2) NIHE で抗原および遺伝子を検出。
- (3) NIID から NIHE に正解を開示。
- (4) NIHE から NIID に成績等を報告。
- (5) NIID/NIHE で成績の分析と課題を検討。

ベトナムの地域ラボ等に対する研修・実習モデルの構築

平成 24 年 9 月、狂犬病の発生が増加しているベトナム北部の Thai Nguyen 省で、所属 Thai Nguyen 衛生疫学研究所を中心に、医療関係者、獣医師、行政担当者も加えて、狂犬病の基礎知識、疫学、免疫・予防、発症病理、臨床、検査を網羅するモデル研修を行った (資料 2)。

なお、本研修は平成 23 年 9 月に NIHE がベトナムの基幹ラボ等に対して行った研修 (資料 3) に引き続くものであり、NIID 専門家による研修プログラムの作成支援、資料提供および技術協力等が行われた。

炭疽

ベトナム流行株の遺伝子診断法と簡易な遺伝子型別法の確立

昨年度 (平成 23 年 6 月)、本研究班を利用して構築した地域ラボと連携した炭疽ネットワークを活用して患者からの炭疽菌分離と野外事例からの遺伝子検出に成功した。今年度、分離菌株のゲノム解析を進めてベトナム株に特異的な SNP 検索を継続しつつ、ベトナム株のアジアにおける系統分類と遺伝子型別を行った。

平成 24 年に、北部の炭疽流行地 (Dien Bien) で発生した炭疽アウトブレイクから新たに患

者 6 名を特定して菌の分離に成功し、平成 25 年 2 月下旬に日越共同研究報告会 (NIHE-NIID meeting) で事例の検討とゲノム解析の準備を行った。

ベトナムで流行している炭疽の感染源特定に関する調査等

過去、ベトナムで発生した炭疽の診断は臨床診断が中心であったが、本研究班の成果として NIHE で実験室内検査 (遺伝子診断) が可能になった。本研究では、ベトナムでの炭疽の流行機序を明らかにするため、炭疽ネットワークを利用して患者の検査検体と同時に患者と接触履歴のある家畜や土壌から検体を採取して NIHE に移送して菌分離と遺伝子検出を行って感染源・経路等についての調査を行った。

C. 研究結果

狂犬病

ベトナムで流行している狂犬病ウイルスを検出可能な RT-LAMP 法の確立

設計した 16 種類のプライマーを利用して 20 種類のプライマーセットを準備して RT-LAMP を行ったところ、No13 のプライマーセットがベトナムで流行している代表的な 11 ウイルス株をいずれも増幅可能であった (表 2)。

RT-LAMP の反応条件について実験株 (CVS-1 株) を用いて検討を行ったところ、58-62 で最も増幅効率が高く、検出感度は 10^0 FFU であり、実験的に Namdinh virus、Japanese encephalitis virus から抽出したゲノムからは遺伝子の増幅が見られなかった (図 2)。

狂犬病が疑われた患者から採取された唾液と脳脊髄液 (65 検体) について RT-PCR に対する RT-LAMP の感度を調べたところ 100% であり、特異性が 96.8% であった (図 3)。

今回、RT-PCR 陰性で RT-LAMP 陽性となった検体について患者を追加検索したところ特徴的な狂犬病の臨床症状を呈して発症 17 日目に死亡していた。また、RT-LAMP で増幅され

た遺伝子の配列決定を行ったところベトナムで流行している狂犬病ウイルスの塩基配列であった。

検査系の技能等に関する検証方法の検討 EQAS に準じて以下を行った。

- 1 : NIID で準備した検体を NIHE に送付
・送付した検体のリスト (資料 4)
- 2 : NIID から NIHE に正解を開示
・送付した検体の正解 (資料 4)
- 3 : NIHE で抗原および遺伝子を検出
・NIHE と NIID の成績比較 (資料 5)
- 4 : NIHE と NIID で成績・課題を分析
・成績報告書 (資料 6)

ベトナムの地域ラボ等を対象にした研修・実習モデルの検討

現場に精通した Thai Nguyen 省の地域ラボ等と連携して科学的知見を集積し、これに基づく効果的な対策を確立するために、正確な狂犬病の啓発、診断、疫学調査等に必要な技術研修・実習を NIHE が行った。

タイトル: 狂犬病の病原体検査に必要な基礎知識と検査手技等に関する研修

研修では、病原体検査ラボを構築するために必要なバイオセーフティの基礎、臨床診断・疫学、および予防法等について、NIID で準備した研修資料と映像媒体 (DVD) が効果的に利用された。

参加者: ベトナム狂犬病コントロールプログラムの疫学専門家、北部 4 省 (Thai Nguyen、Ha Giang、Cao Bang、Son La) の PCPM スタッフ・医療従事者、ワクチン接種担当者、医師、看護師、獣医師

人数: 60 名以上

- ・研修受講者（49名）
- ・事務局（15名）
- ・特別招待演者および顧問

研修の前後に狂犬病に関する基礎テストを行い、本研修の成果（参加者の狂犬病に対する正しい理解、LabNet 構築の意義、検査ラボ確立に必要な臨床診断、バイオセーフティに基づいた検査材料の採取・検体の移送・検査手技等）を評価したところ、研修によって担当者の意識と知見が著しく向上したことが明らかとなった。

よって、地域に普及可能な検査系や流行形態を把握するために必要な分析手法が導入されると科学的知見による正確で効果的な公衆衛生対策が可能になると考えられた。

炭疽

ベトナム流行株の遺伝子診断法と簡易な遺伝子型別法の確立

本研究班を利用して構築した地域ラボと連携した炭疽ネットワークによって、昨年度（平成 23 年 6 月）は患者から炭疽菌を分離して野外事例を利用した遺伝子検出に成功した。今年度、分離菌株のゲノム解析を進めてベトナム株に特異的な SNP 検索を継続しつつ、ベトナム株のアジアにおける系統分類と遺伝子型別を行った。

平成 24 年に北部の炭疽流行地（DienBien）で発生した炭疽アウトブレイクから、新たに患者 6 名を特定して菌の分離に成功し、平成 25 年 2 月下旬に NIID で開催された日越共同研究報告会（NIHE-NIID meeting）で事例の検討とゲノム解析の準備を行った。

ベトナムで流行している炭疽の感染源特定に関する調査等

昨年度（平成 23 年 6 月）、炭疽ネットワークを利用して NIHE が患者から分離した炭疽菌 6 株についてゲノム解析を行い、NIID で構築した 80-SNP 法を利用して系統解析を行った。

ベトナム株はアジア分離株が多数含まれる

A3 クラスターに所属するが日本株（A3a クラスター）やモンゴル株（A3b クラスター）と異なるクラスターを韓国分離株とともに形成することが明らかになった（図 4）。

ベトナムで流行している炭疽の感染源特定に関する調査等

ベトナム北部の炭疽流行地域をモデル調査地とした。今年度は、DienBien 省（図 5）の地域ラボと連携して発生した炭疽患者から検査検体を採取すると同時に、患者と接触のある家畜や近隣の土壌から検体採取を行って NIHE で菌分離と遺伝子検出を試みた。

現在まで、患者からの菌分離には成功しているが家畜・環境からは炭疽菌は分離されていない。

D. 考察

狂犬病

ベトナムで流行している狂犬病ウイルスを検出可能な RT-LAMP 法の確立

ベトナムで流行している主要なウイルス株を簡易かつ迅速に検出できる LAMP 法を開発した。今後は、近隣国からの輸入ウイルス株を含めた検討されていない流行ウイルス株についても調べる必要があると考えられた。

今回、RT-LAMP によって既存の RT-PCR でウイルス検出ができなかった発症早期の患者から標的のウイルス遺伝子を増幅できたことは特記すべきことである。これまで、困難とされてきた狂犬病の早期診断を可能にできることが期待された。

検査系の技能等に関する検証方法の検討

NIHE が、地域ラボと連携したラボラトリーネットワークを構築する際に必要となる検査系の精度を維持手法を検討する目的で、EQAS（外部精度評価プログラム）に準じたブラインドテストを NIID と NIHE で行った。

抗原検出、遺伝子検出のいずれについても同

じ成績を得ることができた。課題として、NIID から NIHE に送付した抗原スライドの塗沫量に増減があり、塗沫方法の検討が必要なことが明らかとなった。

NIHE と NIID では検査方法・手技に違いがあるが、これは施設の設備や入手可能な試薬等の違いを反映しており、地域ラボで検査系を確立して普及するためには各ラボの状況を十分に把握・理解して柔軟性のある標準手技等を提案する必要のあることが示された。

EQAS セミナー講師の Lai-king Ng 博士との議論で、EQAS の本来の目的は現行法の課題点を見つけ出して改良・改善を行うことであり、必ずしも評価のみが目的ではないことが明確となった。本法は、ラボ間のみならずラボ内の標準手技等の確立と精度維持に有益な方法論であることが分かった。

ベトナムの地域ラボ等に対する研修・実習モデルの構築

狂犬病の流行を制御するためには、流行を維持しているイヌの狂犬病を制御する必要がある。また、狂犬病に感染した疑いのあるヒトに対する速やかなワクチン接種が徹底されなければならない。

狂犬病の流行と分布を正確に把握して適切なワクチン接種を確実に行うためには(1)臨床診断による正しい鑑別と(2)実験室内検査による正確な同定、さらには(3)地域の狂犬病の流行形態を分子疫学等によって正確かつ詳細に把握することが重要である。

ベトナム北部の Thai Nguyen 省では毎年 1-3 名が狂犬病で死亡していると報告されているが、臨床診断が主であり正確な数字は明らかでない。また、狂犬病の予防ワクチン・免疫グロブリン接種者数は毎年増加しており平成 23 年(2011)は平成 21 年(2008)の倍近い件数(4,093 件)となっている。一方、Thai Nguyen 省のイヌは 286,000 頭と試算されているが、平成 24 年度の予防接種頭数は 106,222 頭であり接種率が 37%と著しく低く、予防接種の効果について全く検証が行われていない。

本研究では、狂犬病の発生が増加しているベ

トナム北部の Thai Nguyen 省で、所属 Thai Nguyen 衛生疫学研究所を中心に、医療関係者、獣医師、行政担当者も加えて、狂犬病の基礎知識、疫学、免疫・予防、発症病理、臨床、検査を網羅するモデル研修を行った。

研修の前後に狂犬病に関する基礎テストを行って、本研修の成果(参加者の狂犬病に対する正しい理解、LabNet 構築の意義、検査ラボ確立に必要な臨床診断、バイオセーフティに基づいた検査材料の採取・検体の移送・検査手技等)を評価したところ、参加した担当者の意識と知見が著しく向上しており、地域に普及可能な検査系や流行形態の把握に必要な分析手法等が導入できれば科学的知見に基づく正確で効果的な公衆衛生対策が確立可能になると考えられた。

また、本研修で NIID 専門家から提供した研修資料、教材および技術的な協力等が狂犬病発生国で行う研修等に大変有益であることが明らかとなった。国内での発生は希少であるが、発生時に大きな社会的混乱が予想される狂犬病(輸入動物由来感染症)について、最新の流行形態や課題、検査法の確立、公衆衛生対策に必要な啓発手法等の開発において、近隣の感染研相当機関と連携したラボラトリーネットワークを活用して必要な調査・研究等を行うことの意義とその重要性が明らかとなった。

炭疽

近年、わが国では炭疽の発生報告はないが、貿易等の流通拡大によって近隣アジア諸国からの輸入感染症事例が懸念されるため、これを監視・把握できる検査法や疫学手法の開発は大変重要である。また、炭疽菌は芽胞の状態環境中に長期間生存が可能であり、過去に発生があった地域では自然や社会環境等の変化で偶発的な発生が起こりえる。

したがって、発生の見られなくなったわが国で炭疽の流行形態や感染リスク等を明らかにして公衆衛生における脅威に備えるためには、近隣の発生国とラボラトリーネットワークを構築して研究を進めることに大きな意義があ

る。

今年度も昨年同様にベトナム NIHE と共同して、炭疽発生地 の地域ラボ等と連携して、炭疽と臨床診断された患者の実験室内診断の普及と、感染源と流行形態を明らかにするために患者と接点のあった家畜・環境について炭疽菌の分離等を行った。

遺伝子診断を行った炭疽事例について、分離菌された 6 株の遺伝子学的解析を行ったところ、同一地域から分離された菌株はほぼ 100% の相同性を持ち、80-SNP 法で同じ A3 クラスタに分類されることを確認した (図 4)。

NIID で開発した 80-SNP 法は MLVA25 法と同等の解析納涼区のあることをすでに示している。昨年度、MLVA8 法でベトナム株が A1 クラスタに分類されることを示したが、近年は MLVA8 法でなく解析の標的遺伝子を増やして解析能力を高めた MLVA25 法が使用されており、ベトナム株は A3 クラスタに分類されるのが妥当であると考えられた。

ベトナム北部の炭疽流行地域 (DienBien 省) をモデル調査地として、患者の感染源調査を行っているが、家畜・環境から炭疽菌を分離できていない。患者からの菌分離には成功していることから、環境からの検出法の改良と、炭疽発生時にどのように家畜や環境検体を採取するかについて検討を行っている。

今後は、平成 24 年に北部の炭疽流行地 (DienBien) で発生した炭疽の患者から分離した菌株とともに、ベトナム近隣のアジア諸国で発生している炭疽についても同様の解析を行うことで、ベトナム北部の炭疽多発地域における感染源や流行形態の詳細を明らかにしていきたいと考えている。

E . 結論

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) との狂犬病及び炭疽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を行うために、NIHE の狂犬病

ラボ (ウイルス部・Dr.Nguyen Thi Kieu Anh) と炭疽ラボ (細菌部・Dr.Hoan Thi Thu Ha) と共同して、当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学、ベトナムの地域ラボ・ネットワーク強化の促進を行った。

本研究により、国内での発生は希少であるが、発生時に大きな社会的混乱が予想される狂犬病や炭疽等の動物由来感染症では、最新の流行形態や課題、検査法の確立、公衆衛生対策に必要な啓発手法等を開発するために、近隣の感染研相当機関と連携してラボラトリーネットワークを活用した調査・研究等を展開することの意義とその重要性が示された。

F . 研究発表

1. Manalo D.L., Tuason L., Jarilla B., Avenido E., Demetria C., Quiambao BP., Acosta L.P., Noguchi A., Bazartseren B., Sugaira N., Kaku Y. and Inoue S. Optimization Procedures of the Production of Rabies Polyclonal Antibodies as Reagent for Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT). Conference for Laboratory Animal Sciences and Technologies 2012. 24-26 May, 2012. . Beppu international convention center, Japan.
2. Inoue S., Shigematsu, M., Sato M., Muranaka S., Masukawa H., Sugiyama K., Kobayashi M., Imabayashi A., Watanabe T., Suzuki A., Minami, H. Surveillance: Encompassing public health to your animal companion! 15th International Congress on Infectious Diseases. Organized by the International Society for Infectious Diseases. 13-16 June, 2012. Bangkok, Thailand.
3. Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of central

- nervous system in CVS-11 infected mice showing signs of paralysis. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japna-US Cooperative Medical Science Program. 19-20 June, 2012. Beppu, Japan.
4. Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of CNS in mice showing signs of paralysis after the intramuscular inoculation of RV (CVS-11 strain). The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Neurovirology. Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in The Asia-Pacific Region". 30-31 Aug, 2012. NIID, Tokyo, Japan.
 5. Thi Thu Ha Hoang, Satoshi Inoue, Akiko Okutani, Dang Duc Anh, Thanh Hai Pham, Thuy Tram Nguyen, and Tran Hien Nguyen. Anthrax cases report in Vietnam - An update. 1-2 Dec, 2012. SAOHUN (The southeast Asian One Health university network) executive board meeting supported by RESPOND-USAID, Bali, Indonesia.
 6. Inoue, S. Zoonosis: Rabies. Conference and workshop on "From zoonosis to the Chiang Mai model towards rabies free zone", 26-27 April 2012, Chiang Mai University, Thailand.
 7. Inoue, S. "The prevention of rabies in Japan". A Contingency Plan of Rabies in Japan. 2012 Rabies Conference in China, 17-18 May 2012, Beijing, China.
 8. Inoue, S. Clinical signs and symptoms of rabies in animals (Theory and video on dog rabies, the notes of clinical diagnosis). Enhancement of quality of rabies control and prevention. National program for rabies control and prevention - NIHE and JICA project on enhancement of communicable disease control and prevention for PMS with NIID and WHO experts. 4-6 July 2012, Thai Nguyen Province, Vietnam.
 9. 奥谷晶子。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的解析について。シンポジウム：忍び寄る人獣共通病原体。第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月、千葉県
 10. 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。特集：人と動物の共通感染症最前線 9。獣医畜産新報 (JVM)。65:374-376、2012
 11. 杉下摩由璃、山田健太郎、小宮尚之、久保達也、小嶋大亮、Boonsriroj Hassadin、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。病原性の異なる狂犬病ウイルス (強毒株 1088-N0 と弱毒株 1088-N30) を筋肉内接種した ddY マウスの末梢神経系 (脳を除く頭部) に関する比較病理学的研究。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県
 12. 朴 天鎬、山田健太郎、小宮尚之、久保達也、小嶋大亮、井上 智、西園 晃。病原性の異なる狂犬病ウイルス (強毒株 1088-N0 と弱毒株 1088-N30) を筋肉内接種した ddY マウスの中樞神経系に関する比較病理学的研究。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県
 13. 加来義浩、野口 章、濱本紀子、Bazartseren Boldbaatar、佐藤 豪、森川茂、井上 智。分泌型アルカリフォスファターゼ発現 VSV シュードタイプを利用した狂犬病ウイルス中和試験法の開発。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県

14. 飛梅 実、井上 智、野口 章、濱本紀子、長谷川秀樹。狂犬病ウイルス抗原の口腔内局在の病理学的探索。第 60 回ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-15 日、大阪国際会議場、大阪府

G . 知的所有権の取得状況

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