

- 12) 岡本貴世子、森嘉生、落合雅樹、庵原俊昭、大槻紀之、海野幸子、竹田誠、駒瀬勝啓 抗風疹 IgG 国内標準品の作製、および ELISA 法による IgG 抗体価 (国際単位) と HI 抗体価の相関性の解析 臨床化学、2013, 42; 146-150
2. 学会発表
- 1) 駒瀬勝啓, 竹田誠、庵原俊昭、皆川洋子、安井善宏、山下照夫、改田厚、秋吉京子 麻疹ウイルス流行株の推移とウイルス鑑別方法の検討、第 54 回日本臨床ウイルス学会、倉敷、2013 年 6 月 8 日～9 日
- 2) 酒井宏治、關文緒、網康至、染谷健二、田原舞乃、大槻紀之、西条政幸、森川茂、山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠、犬ジステンパーウイルスのヒト SLAM 利用応獲得に必要な変異、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 3) 田原舞乃、酒井宏治、駒瀬勝啓、前仲勝実、竹田誠、受容体結合領域を含む複数の主要エピトープを変化させた麻疹ウイルスの解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 4) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子、ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系の応用、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 5) 内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、田中智之、森嘉生、駒瀬勝啓、竹田誠、堺市における風疹の流行状況と検査結果の解析、評価、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 10 日～12 日
- 6) 竹田誠、田原舞乃、駒瀬勝啓、麻疹ウイルスの抗原性の安定性は強固に保証されているか 第 17 回日本ワクチン学会、津、2013 年 11 月 30 日～12 月 1 日
- 7) Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Progress towards measles elimination after introduction of supplementary immunization in Japan, Sitges, Spain 7th Vaccine & ISV congress, 2013 年 10 月 27 日～29 日
3. その他
- 1) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の状況と検査診断について、衛生微生物技術協議会第 34 回研究会 名古屋 2013 年 7 月 11 日～12 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

ベトナムにおける
麻疹流行株の解析
(2013)

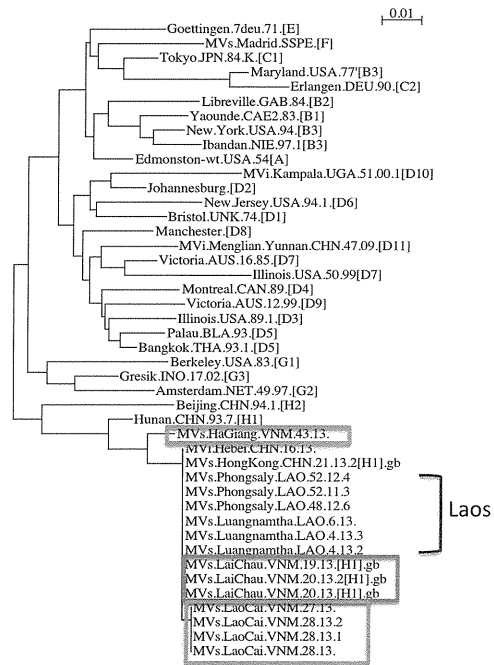


図 1

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

ベトナムの北部山岳地域で散発的に発生がみられる炭疽の分子遺伝学的解析方法の確立のための共同研究について

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

研究要旨：昨年度に引き続き、ベトナムの北部山岳地帯で 2011 年から 2013 年に発生した炭疽の発生事例から分離された炭疽菌株から抽出された DNA を用いて、80 カ所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) による系統解析を行った。その結果、患者分離株は日本やモンゴルなどのアジア諸国で分離される A3 クラスタに分類される一方、市販食肉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 (A1 クラスタ) に分類された。系統解析とともに疫学情報を加えることで詳細かつ実態を反映した感染源対策および感染経路の探索が可能となると思われることから常に最新の情報を基に調査結果を考察していく必要があると思われる。

A. 研究目的

これまでにベトナム北部山岳地帯で発生した集団発生事例の患者分離株由来 DNA を用いて、我々が日本で分離された炭疽菌株が菌株レベルで識別を目的に選定した 80 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を用いて系統解析を行ってきた。

ベトナム分離株の遺伝子解析における SNP タイピングの有用性を確認するため、今回は三件の発生事例からの患者分離株および市販食肉から抽出された DNA を用いて系統解析を行った。

B. 研究方法

事例 1) 2011 年 6 月 Lai chau、Dien Bien、Cao Bang 省の発生事例からの患者分離株、事例 2) 2012 年 Dien Bien 省発生事例からの皮膚炭疽患者皮膚生検材料分離株および事例 3) 2012 年から 2013 年における Dien Bien 省で発生した炭疽患者および患者周辺土壌と市販食肉から炭疽菌分離用の培養と DNA の抽出を行った。DNA 抽出には QIAGEN DNAeasy kit を NIHE において行い、本邦へ搬入した。

炭疽菌特異的遺伝子を保有する抽出済み DNA 検体を用いて、我々が以前に選定した菌株識別用の 80 カ所の SNP を特定し、詳細な系統解析

を行った。

C. 研究結果

事例 1) と 3) の患者検体から菌培養および DNA が抽出できた。一方、事例 2) の皮膚生検からは菌分離はできなかったものの、DNA は抽出された。また事例 3) の市販食肉から得られた DNA から炭疽菌特異的遺伝子を確認できたが菌の培養ができなかった。事例 3) の土壌からは菌分離されず、抽出された DNA からも炭疽菌特異的な遺伝子は検出されなかった。

患者由来および市販食肉から分離された炭疽菌 DNA から 80 カ所の SNP を特定して詳細な系統解析を行った結果、事例 1)、2) および 3) の患者由来菌株 DNA は他のアジア諸国分離株で多く分類される A3 クラスタに分類された。一方、市販食肉由来菌株は西ヨーロッパ地域由来株が多く分類される A1 クラスタに分類された。

D. 考察および結論

今回、患者発生地域における市販食肉から抽出された炭疽菌 DNA の遺伝子型が患者由来のものとは異なることが明らかとなった。ベトナム炭疽発生地域では複数の菌株が浸淫している可能性が示唆されたものの市販食肉の搬入

元や輸送経路などが明確ではないため詳細な疫学調査はできなかった。昨年度に解析した患者由来菌株は A1 クラスターに分類されたが今回は A3 クラスターに分類された。前回より複数の地域で発生した菌株が加わったことで、系統解析に用いた解析株数が増加し、より詳細な分類が可能となったと考えており、解析数は今後も増えることが予想されることから系統解析結果は常に最新のものを反映したもので検討していく必要があると思われる。

ベトナム北部山岳地帯はラオスおよび中国との国境付近であり、これらの地域の物流や交通手段など詳細な情報は入手が困難な状況である。

感染源や感染経路の探索には詳細な疫学情報が必須であることから今後の発生に備えて NIHE のカウンターパートである Ha 博士には菌および DNA そのものの確保と共に丁寧な聞き取り調査を依頼している。発生地域は険峻な山間地帯で交通の便が著しく不便であることから現地における迅速診断および DNA の確保を可能とする体制作りも必要であると考えている。

本研究の最初の目的であったベトナムでの炭炭疽菌の分子遺伝学的解析は我々が選定した 80 カ所の SNP を特定することで可能であることが明らかとなったことから、今後も SNP による遺伝子解析および感染源や感染経路調査のための共同研究体制を維持していきたいと考えている。

E. 研究発表

- 1 Petsophonsakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul C., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. IMED

2013. 15-18 Feb, 2013. Vienna, Austria.

- 2 Hoang H. T. T., Okutani A., Inoue S., Pham H. T., Dang A. D., Nguyen T. T., Dang H. N., and Nguyen H. T. Anthrax outbreaks and *B. anthracis* isolation in Vietnam, issues of public health. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
- 3 Okutani A., Tungalag K., Tserennorov D., Bazartseren B., Hoang H. T. T., Nguyen H. T., and Inoue S. Novel genotyping by SNPs selected from genome-wide analysis of *B. anthracis* isolation in Japan and Mongolia. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.

F. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

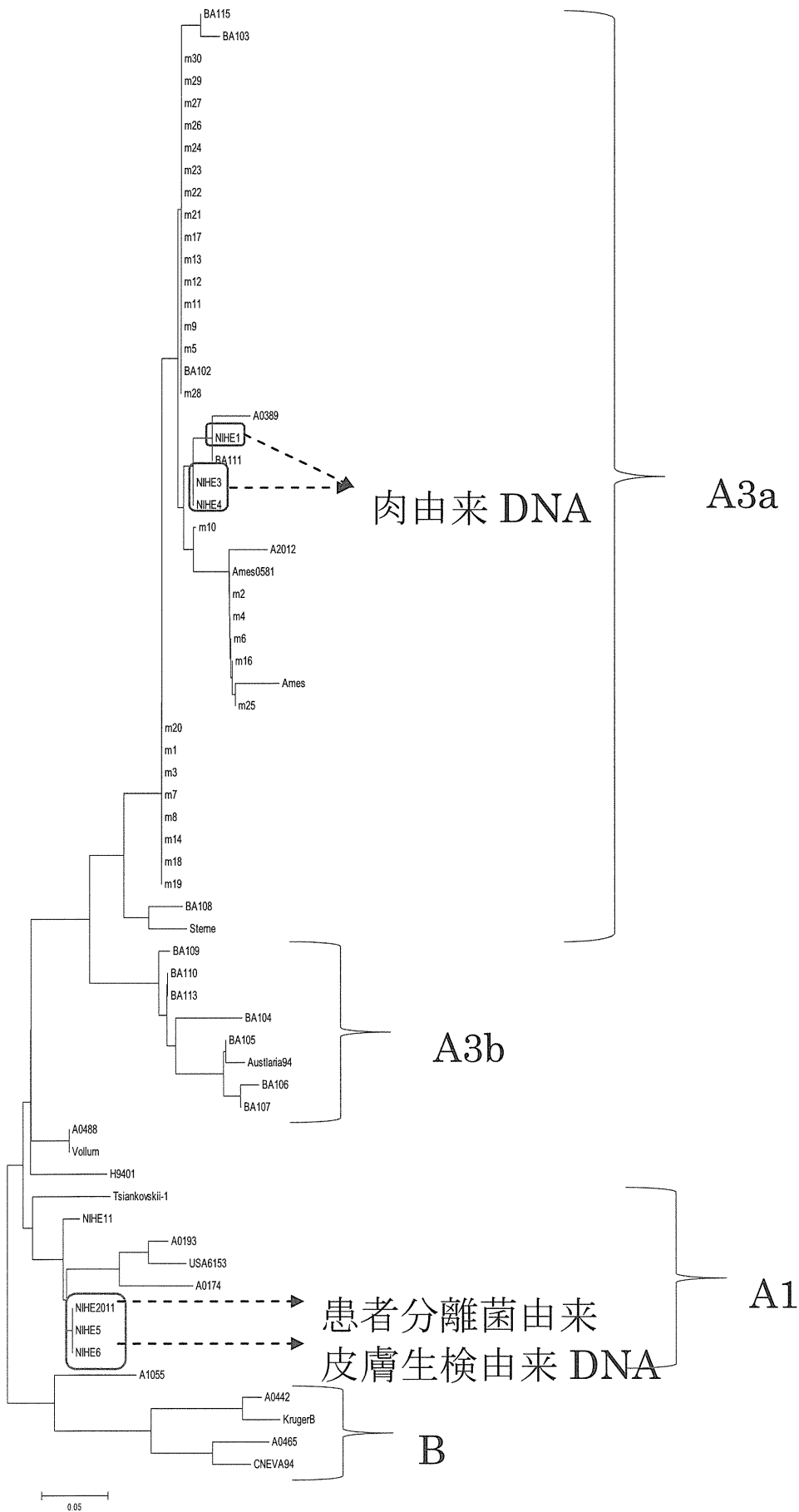
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

80SNP による炭疽菌株の系統解析 NJ tree analysis by MEGA



アジアネット
平成 25 年度 分担研究報告書

分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現型シュードタイプ VSV を利用した
狂犬病ウイルス中和試験法の開発

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：加来義浩 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
濱本紀子 国立感染症研究所獣医科学部、研究生

研究要旨：狂犬病ウイルス (RABV) の中和抗体検査は、イヌの輸出入検疫、地域における免疫保有率の調査等で行われている。現在一般的に行われている RABV 中和抗体検査は、1) 感染性ウイルスを用いる必要がある、2) 蛍光抗体および蛍光顕微鏡を必要とする、3) 測定に手間がかかる、等の課題がある。そこで、より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるよう、分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現シュードタイプを利用した中和試験法の開発を試みた。被検血清として狂犬病ワクチン接種イヌ・ヒト血清、対照血清としてイヌ・ヒトの非免疫血清を用いた。Threshold 値、cut-off 値等の陰性／陽性判定の基準を定め、各検体に本法を実施した。得られた SEAP 減少曲線を用いて中和抗体価を算出し、従来の中和抗体測定法である RFFIT 法の結果と比較した。その結果、本法の感度・特異性は高く、抗体価についても高い相関を示した。これらから、本法は、安全・簡便かつ多検体処理が可能な中和試験法として期待され、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に応用可能だと考えられる。

A. 研究目的

狂犬病は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される狂犬病ウイルス (Rabies virus; RABV) を原因とする神経疾患である。RABV は、あらゆる哺乳類に感染することが知られているが、ヒト症例の大半は、発症したイヌからの咬傷に由来する。これまで治療法は確立しておらず、発症後の致死率はほぼ 100%であることから、本症の対策の基本はワクチン接種となる。ヒトでは、感染直後の適時のワクチン接種 (曝露後免疫) により発症阻止が可能であるとともに、流行地に渡航する際は事前のワクチン接種が有効な対策となる。またイヌでは、日本の狂犬病予防法では、生後 90 日以上全てのイヌに、毎年ワクチン接種を義務づけており、イヌの輸出入時には血清検査を行い、基準値以上の中和抗体価を保持している必要がある。

狂犬病の中和抗体価の測定は、現在、Rapid

Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) や Fluorescent Antibody Virus Neutralization (FAVN) 等の感染性ウイルスを用いた方法が広く行われており、イヌの輸出入時の抗体検査や、研究目的でヒトのワクチン接種後の抗体モニタリング等に利用されている。これらの方法の基本的な流れは、1) ウイルスを被検血清と混和し、2) 細胞に接種し、3) ウイルス蛋白質を蛍光抗体で染色し、4) 感染細胞を確認する、というものである。しかし、これらの方法には、「作業者に感染リスクがある」「蛍光顕微鏡が必要となる」「96-well プレート上で 1 ウェルずつ観察するため、多検体処理が困難である」といった問題がある。そこで、我々は感染性ウイルスの代わりに、RABV-G 蛋白質を外套したシュードタイプ VSV を用いて、安全・簡便かつ多検体処理可能な中和試験法を確立することを目指した。

B. 研究方法

1) シュードタイプの作製

RABV 固定毒 CVS11 株の表面糖蛋白質 (RABV-G) を外套した SEAP 発現シュードタイプ VSV (“VSV-CVS11-SEAP”) を、以下の要領で作製した。まずヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞に、RABV-CVS11 株 G 蛋白質の発現プラスミドを transfection した。48 時間後に、VSV の G 蛋白質を外套した SEAP 発現 VSV シュードタイプ (“VSV-dG-SEAP”) を接種した。MEM 培地で 3 回洗浄後、2% FCS-MEM を加え、24 時間培養し、上清を回収した。上清は遠心 (1,600g, 10 分) 後、0.45mm フィルターを通して細胞塊を除き、 -80°C に保存した。

2) 中和試験

i) 血清

イヌ血清は、被検血清として a) 東京都動物愛護相談センター城南島出張所より提供された収容犬の血清 111 検体、b) 民間の実験動物繁殖施設より購入したワクチン未接種ビーグル犬血清 10 検体を使用した。a) は、提供を受けた数百の検体について、まず RFFIT 法で中和抗体価を算出したうえで、さまざまな抗体価を含むよう配慮して 111 検体を選択した。

ヒト血清は、国立感染症研究所職員からボランティアを募り、提供を受けた血清を使用した (国立感染症研究所「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」により承認済み)。この中には、同一ボランティアより提供された、採血時期の異なる血清も含まれる。提供血清はナンバリングして匿名化し、これまでのワクチン接種歴の有無に関する情報以外は検体に付与しなかった。上記のイヌ血清同様、まず RFFIT 法で中和抗体価を算出したうえで、さまざまな抗体価を含むよう配慮して 32 検体を選択した。このうち、10 検体がワクチン未接種提供者の血清であった。

ii) 中和試験

適正濃度に調製したシュードタイプを、2 倍階段希釈した被検血清と混和し、 37°C で 1 時間反応させた後、96 穴プレート上のマウス神経芽腫由来 MNA 細胞に 3 ウェルずつ接種した。各プレートには、無血清対照 (適正濃度に希釈したシュード

タイプのみ) を 3 ウェルずつ、培地対照 (培地のみ) を 3 ウェルずつ配置した。24 時間後に培養上清を回収し、発色基質 (Sigma 社、SIGMAFAST p-Nitrophenyl phosphate Tablets) を加えた。 37°C で 2 時間静置後、ELISA プレートリーダーで OD 値 (OD_{405}) を測定した。

iii) 中和抗体価の算出・比較

まず被検血清/無血清対照の OD 値から、培地対照ウェルの OD 値の平均を差し引いたうえで、被検血清の OD 値を、無血清対照の OD 値を 100 としたときの相対値で表わした。次にグラフ作成ソフト (Graphpad 社、Prism 5) を利用して、横軸に血清の希釈倍率を、縦軸に OD 相対値をプロットし、反応曲線を作成した。被検血清の OD 値が、無血清対照ウェルの OD 値と比較して 75% 減少したとき、すなわち「無血清対照ウェル OD 値の 25%」の血清希釈 (cut-off 値) を中和抗体価とした (後述)。双方で得られた中和抗体価を比較するため、表計算ソフト (Microsoft 社 Excel 2007) を用いて相関係数を算出した。

C. 研究結果

1) cut-off 値/threshold 値の設定

cut-off 値は、以前構築した SEAP 発現型シュードタイプ VSV によるニパウイルス (NiV) 中和試験のプロトコール (Kaku et al. J. Virol. Methods 179, pp. 226-32, 2012) を参考にして、暫定的に「無血清対照ウェルの OD_{450} 値の 25%」と定めた。まずこの値を用いて threshold 値の検討を行い、矛盾が生じた場合に cut-off 値を見直す、という方針をとった。

続いて、ヒトの陰性血清のうち、ワクチン未接種の 10 検体を用いて threshold 値の設定を行った。これは、中和抗体を含まないはずの検体で、どのくらいの非特異反応が想定されるかをあらかじめ検証し、「中和抗体価の算出に利用する血清希釈」の範囲を設定するためのものである。その結果、ワクチン未接種血清でも、低希釈ではシュードタイプの感染を阻害するものがあり、もともと顕著なものでは、血清希釈 10 倍で cut-off 値 (無血清対照ウェル OD 値の 25%) を下回っていた (data not shown)。反応曲線が cut-off 値を下回ると中和抗体陽性と判断されてしまうた

め、これらの血清を陰性と判断できるように、threshold 値を「血清希釈 20 倍」に設定した。すなわち、20 倍以下で認められる反応は、非特異反応と定義付け、中和抗体価の算出には利用しないこととした。続いてワクチン未接種のイヌ血清に対しても同様の解析を行い（data not shown）、threshold 値を「血清希釈 5 倍」に設定した。

2) RFFIT との比較

まず RFFIT 法により中和抗体価を算出し、international unit =IU 0.1 を cut-off 値として陰性・陽性血清に分けた。続いて、シュードタイプを用いた中和試験を行い、中和抗体価を算出した。上述の threshold 値の血清希釈（ヒト血清×20、イヌ血清×5）までに cut-off 値を下回ったものが陽性、そうでないものを陰性と判定した。

i) イヌ血清

シュードタイプ法で得られた結果を RFFIT 法の結果と比較すると、感度は 100%、特異性は 96.9%であった（図 1）。全 111 検体のうち、双法の結果が食い違ったのは 1 検体であり、これは RFFIT 法の cut-off 値 0.1 にきわめて近い検体であった。双法の抗体価を比較したところ、RFFIT 陽性全 79 検体では、相関係数の 2 乗は 0.773 であった。これを $IU < 10$ の 55 検体に絞ると 0.889 という高い値が得られた（図 2）。

ii) ヒト血清

ヒト血清では、RFFIT 法とシュードタイプ法の結果は全て一致しており、感度／特異性はともに 100%であった（図 3）。双法の抗体価を比較したところ、RFFIT 陽性全 21 検体では、相関係数の 2 乗は 0.657 だったが、これを $IU < 5$ の 14 検体に絞ると 0.886 という高い値が得られた（図 4）。

iii) cut-off 値、threshold 値の評価

上述のとおり、本法と RFFIT 法の結果を比較した場合、感度／特異性がともに高く、抗体価の相関も高かったことから、「無血清対照ウェル OD 値の 25%」を cut-off 値に、1:5（イヌ血清）／1:20（ヒト血清）を threshold 値とすることは妥当であると考えられた。

D. 考察

本課題では、SEAP 発現型シュードタイプ VSV を用いて、新たな RABV 中和試験を構築するにあたり、初めに中和試験のパラメーターとして、「陽性／陰性の境界となる血清希釈」（cut-off 値）と、「中和抗体価の算出に利用する最低血清希釈」（threshold 値）の設定を行った。まず cut-off 値について、以前構築した SEAP 発現型シュードタイプ VSV によるヘニパウイルス中和試験のプロトコール（Kaku et al., 2012）を参考にして、「無血清対照ウェルの OD_{450} 値の 25%」としたうえで、threshold 値を検討した。その結果、ヒト血清については 1:20、イヌ血清については 1:5 の threshold 値を得た。ヒト／イヌの threshold 値の違いの原因については不明だが、ヒトは長年にわたる種々の病原体の自然感染のほかに、多種類のワクチン接種を受けていることから、イヌに比べて保有抗体のレパートリーが豊富である可能性があり、その中に RABV 中和抗体と一部交差反応を示すものが含まれていると推測された。

本法をイヌ血清 111 検体、ヒト血清 32 検体に応用し、上記のパラメーターを用いて RABV 中和抗体の有無を判定した結果を、従来の中和抗体測定法（RFFIT 法）の結果と比較したところ、きわめて高い特異性と感度が得られた（図 1, 図 3）。また、シュードタイプ法で得られた中和抗体価と、RFFIT 法で得られた中和抗体価（IU）を比較すると、きわめて高い相関が得られた（図 2, 図 4）ことから、本法は新たな RABV 中和抗体測定法の候補になりうると考えられた。しかし、検査機関での実用化に向けては、現在の国際標準である RFFIT 法あるいは FAVN 法との間で、より詳細な感度／特異性の検討が必要となる。たとえば、RABV 中和抗体測定法がもっとも一般的に使用され、かつ抗体価が重要な意義をもつのは、イヌの輸出入時における検疫であろう。これまで経験的に、感染防御には $IU > 0.5$ の中和抗体価が必要と考えられてきたことから、日本の動物検疫においては $IU = 0.5$ を指標として輸出入の可否を判定してきた。シュードタイプ法を当該目的で使用するためには、現行法との中和抗体価の相関についても入念に調べる必要がある。本課題においては、RFFIT 法で得られた IU 値を比較対照とし、相関

係数を求めた。RFFIT 法の IU 値は、実際の試験において得られた被検血清の「50% end-point を示す血清希釈」と、陽性対照血清の「50% end-point を示す血清希釈」の比を用いて、陽性対照血清を IU=2.0 として IU に換算したものである。これは、同一被検血清の中和抗体価が試験ごとにばらつくのを防ぎ、データの比較を容易にすることを目的としているが、その一方で、保存・管理条件によっても陽性対照血清の実際の中和抗体価が変動してしまうと、そのまま被検血清の IU 値に反映されてしまう側面がある。そのため、RFFIT の結果として、IU 値ではなく実際に得られた (IU 値に換算する前の) 「50% end-point を示す血清希釈」を用いた場合、本法と RFFIT 法の結果にどのような相関が見られるかについて、現在解析を進めている。

かつて我々は SEAP 発現型シュードタイプを用い、NiV 中和抗体測定試験を構築した際に、シュードタイプ法が (感染性 NiV を用いた) 既存の中和試験に比べて検出感度が高いことを示した。すなわち、結果として表示される中和抗体価を比較した場合、既存法よりもシュードタイプ法のほうが数十倍から数百倍高かった (Kaku et al. 2012)。しかし、今回の RABV 中和試験においては、本法で得られた抗体価と、RFFIT 法で得られた「50% end-point を示す血清希釈」との間に大きな違いは認められなかった (data not shown)。これは、NiV 中和試験と RFFIT 法のシステムの違いによるものと考えられる。NiV 中和試験においては、感染の有無は細胞変性効果 (CPE) の有無で判断され、1 ウェル中に CPE が観察されれば、感染の程度とは無関係に (つまり、CPE が 1 か所でも複数個所でも一様に) そのウェルは「感染陽性」と判定される。一方、CPE を起こすほどには感染が進行していない場合、たとえウイルスが細胞内にエンターし、ウイルス蛋白が合成されていたとしても「感染陽性」とは判定されない。このため、中和抗体陽性と判定されるためには、ウェル全体の CPE を防ぐための多量の中和抗体が必要となることから、結果的に中和抗体価が低く表示される傾向にある。これに対し、RABV は一般的に CPE を起こさないため、RFFIT 法では細胞内のウイルス蛋白を蛍光抗体で検出する。ま

た、同法の基本的な考え方はコロニーリダクション法であるため、ウイルス蛋白の合成レベル (コロニーの数) を減少させる抗体量がそのまま中和抗体価に反映されることから、中和抗体価は高く表示される傾向にある。SEAP 発現型シュードタイプを用いた中和試験は、感染によって合成される蛋白質 (SEAP) 量を減少させる抗体の量が、そのまま中和抗体価に反映されるシステムであり、考え方としては RFFIT 法と同様である。このため、本法と RFFIT 法との比較では、NiV 中和試験との比較で見られたような検出感度の大幅な差異が認められなかったと考えられる。

以上を考えると、SEAP 発現型シュードタイプを用いた RABV 中和抗体測定法のメリットは、感染性ウイルスを必要としない「安全性」、と ELISA プレートリーダーを用いて測定できる「定量性」にある。とくに後者については、ELISA プレートリーダーは途上国の地方検査機関でも普及していることから実用性は高く、また簡便・迅速に測定可能であることから多検体処理も可能にする。本法は、安全・簡便かつ多検体処理が可能な中和試験法として期待され、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に应用可能だと期待できる。

E. 結論

SEAP 発現型シュードタイプ VSV を用いた RABV 中和試験法は、感染性 RABV を用いず、一般的な ELISA プレートリーダーで簡便に感染価を計測できるため、日本のみならず流行地域でも普及しうる安全で迅速な試験法として期待できる。多検体処理も可能であることから、将来的にはイヌや野生動物の抗体サーベイ等に应用可能だと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1 Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi,

- A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. PLoS Ne.Trop.Dis., 7 e2144
- 2 Nguyen, A.T.K., Nguyen, T.T., Noguchi, A., Nguyen, D.V., Ngo, G.C., Thong, V.D., Olowokure, B., Inoue, S. (2014) Bat Lyssaviruses, Northern Vietnam. EID, 20:161-163.
- 2 口頭発表
- 1 Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornwisedsirikun S., Munepo M., Atuntee T., Noguchi A., and Inoue S. A Chiang Mai model for the humane management of rabies control at borders between the forest and city. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 2 Nguyen A.T.K., Nguyen T.T., Noguchi A., Nguyen D.V., Ngo G.C., Thong V.D., Olowokure B., and Inoue S. Survey for bat lyssaviruses in northern Vietnam. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.
- 3 Park, C.H., Yamada, K., Kojima, D., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27-31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.
- 4 濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-26 株) で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に参与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 5 飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県
- 6 グエン トゥイズオン、河原 正浩、加来 義浩、井上 智、長棟 輝行。増殖誘導型キメラ受容体を用いた狂犬病ウイルス核タンパク質に対するイントラボディ選択。第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日-20 日、広島国際会議場、広島県
- 7 小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-N4#14) に感染後耐過した ddY マウスの中枢神経系に関する病理学的研究。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 8 君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス (1088-N0) を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中枢神経系および末梢組織病変。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県
- 9 Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 イヌ血清 結果

VSV-CVS11-SEAPを使用

		陽性	陰性	計
RFFIT を使用	陽性(IU \geq 0.1)	79	0	79
	陰性(IU $<$ 0.1)	1	31	32
	計	80	31	111

RFFIT	VSV-SEAP
0.09	20.61

sensitivity: 79/79=100% specificity: 31/32=96.9%

図2 イヌ血清 抗体価の相関

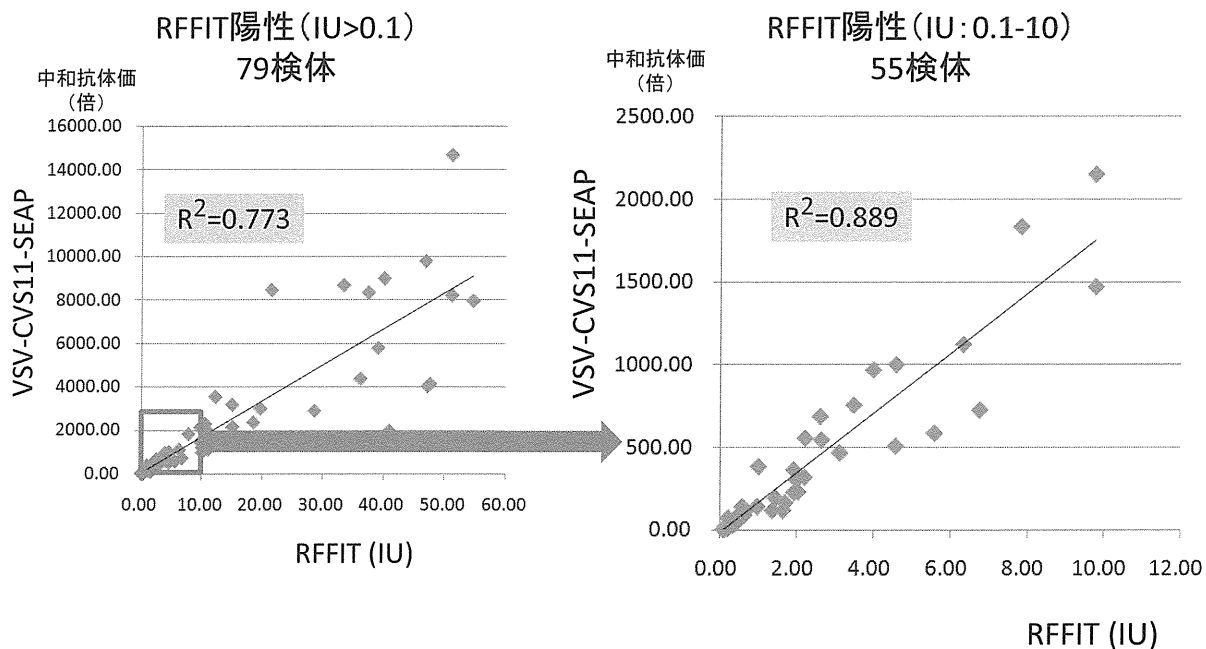


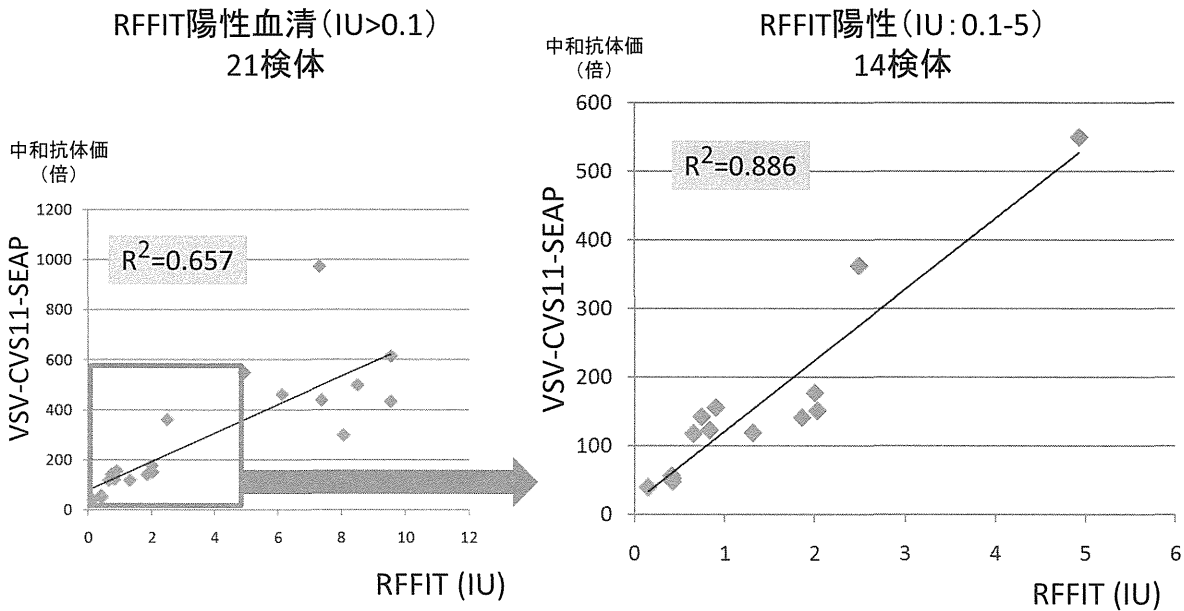
図3 ヒト血清 結果

VSV-CVS11-SEAPを使用

		陽性	陰性	計
RFFIT を使用	陽性(IU \geq 0.1)	21	0	21
	陰性(IU $<$ 0.1)	0	11	11
	計	21	11	32

sensitivity: 21/21=100% specificity: 11/11=100%

図4 ヒト血清 抗体価の相関



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）

ベトナムにおけるヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究

研究分担者：大野秀明

国立感染症研究所 真菌部 室長

研究協力者：田辺公一、梅山 隆、山越 智、宮崎義継（国立感染症研究所真菌部）、
Thi Thu Ha Hoang, Pham Thanh Hai, Nguyen Thuy Tram（National Institute of Hygiene
and Epidemiology, Vietnam）, Nguyen Van Tien, Nguyen Quang Tuan（Bach Mai Hospital,
Vietnam）, Nguyen Thai Son（103 Hospital, Vietnam）, Nguyen Van Hung（National Lung
Hospital, Vietnam）

研究要旨：ベトナムとの真菌症に関する共同研究の一つとしてベトナムにおけるヒストプラズマ症の疫学研究、ヒストプラズマ属の環境中生息状況調査を行った。ハノイ市における医療機関で呼吸器感染症が疑われた症例を対象にしたヒストプラズマ症の疫学調査では、提出された 258 検体中 9 検体がヒストプラズマ属特異的 PCR 法で陽性を示した。また、血清中の抗ヒストプラズマ抗体の保有状況の検討では、144 検体中 26 検体で抗体陽性と判定された。我々の検討から、ベトナムにおいても他の東南アジア地域と同様に、ヒストプラズマ症は決して稀な真菌症ではないことが伺われた。

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、日本人旅行に対する適切な感染危険情報も少ない。このような状況を鑑み、本研究では、東南アジア地域での本症の実態把握、流行状況調査、診断能力の向上ならびに分離されたヒストプラズマ属の各国での疫学的解析や基礎研究の推進・発展主な内容として、それぞれの国の感染症研究機関との共同研究ネットワークを構築することを目的とした。

B. 研究方法

昨年度と同様に、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE, Vietnam) の希少細菌研究室と、ハノイ市の Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital との共同研究として検討を行った。検討内容としては、呼吸器感染症疑い患者での肺ヒストプラズマ症 (急性、慢性) の状況調査 (疫学調査)、診断支援、ヒストプラズマ属生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定を行った。

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

NIHE ならびにハノイ市 Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital の感染症部門検査部が主体となり、これら医療機関を受診した (不明熱) 患者で、ヒストプラズマ症を含めた侵襲性真菌症が疑われる患者から診断目的で検査に提出された臨床検体を用いて培養検査、遺伝子検査、抗体検査を実施した。患者のエントリー基準と

して、1) 無症状だが胸部 X 線検査で肺野に陰影を認める、2) 急性呼吸器症状を呈する (発熱、胸痛、倦怠感、咳嗽など)、3) 結核様の慢性の呼吸器症状を呈し徐々に悪化する症例 (結核は否定する)、4) 免疫不全、口腔内潰瘍、中枢神経症状を呈した症例を対象とした。対象検体は喀痰、気管支洗浄液、髄液、胸水、血液、生検組織などで、状況に応じ培養法、遺伝子診断法 (PCR 法)、血清診断法を行った。PCR 法については我々が行っているヒストプラズマ属検出用 PCR 法 (Ohno H, et al. J Infect Chemother, 2013) を行い、また血清診断法についても我々が診断目的で使用しているキット (Histoplasma DxSelect, Focus Diagnostics, Cypress, CA) を用いて抗ヒストプラズマ抗体の有無を検出した。

2) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査

ハノイ市内ならびに近郊の公共エリア、住宅地、病院周辺、洞窟などでコウモリや家禽類の糞で汚染された土壌検体を対象としてサンプリングを行った。得られた土壌検体は冷蔵保存の上 NIHE へ運搬し、以後のヒストプラズマ属培養法、PCR 法へ供した。

(倫理面からの配慮について)

本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365, No.460) の承認を受けた。

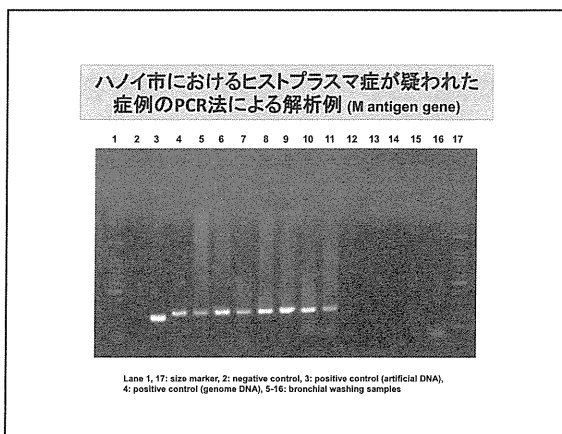
C. 研究結果

1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

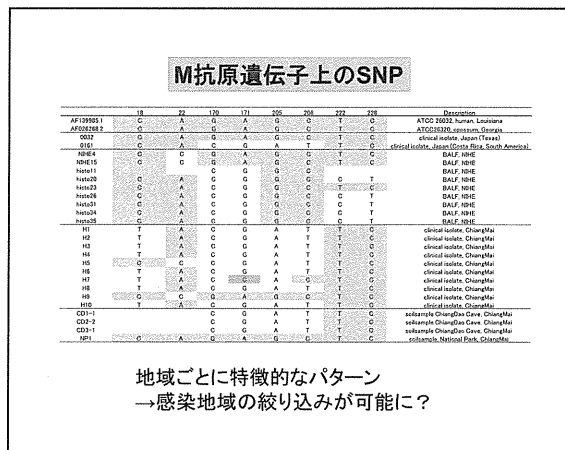
現在まで喀痰、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 258 検体、生検組織 1 検体、血清 144 検体が NIHE へ検査目的にて供された。BALF については培養法、PCR 法を行い、培養法陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性は計 9 例 (3.5%) で認めた (図 1)。また、PCR 法で陽性となった検体について、その増幅産物の塩基配列を確認したところ、*Ajellomyces capsulatus* と 97-99% の相同性が確認された。

さらに、増幅産物の塩基配列の一塩基多型について検討した結果、米国株やタイ株とは違った塩基配列パターンが認められた (図 2)。この塩基配列をもとに、系統樹を作成すると、ベトナムでの検体に含まれていたヒストプラズマ属由来と考えられる DNA は、タイの分離株とは明らかに違うクレードで、むしろ米国株に近いクレードを形成することが伺われた (図 3)。一方、血清についてはすべて血清診断法に供され、26 検体 (18%) が抗ヒストプラズマ抗体陽性と判定された (図 4)。基礎疾患として HIV 感染の有無別で抗体陽性率を検討したところ、HIV 陽性検体 15 検体中 3 検体 (20%)、HIV 陰性検体 129 中 23 検体 (18%) が抗体陽性であった (図 4)。

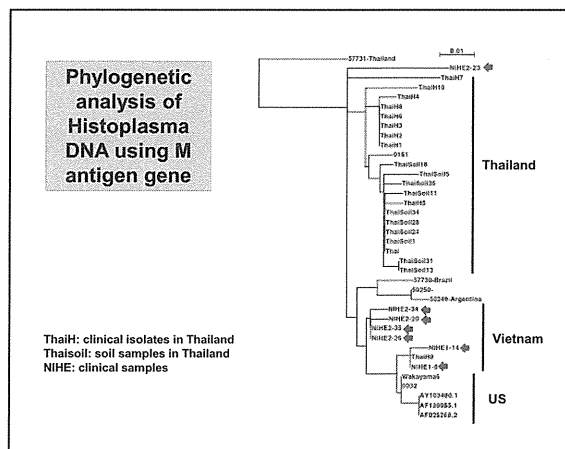
(図 1)



(図 2)



(図 3)



これらを対象に検討した結果、培養法で陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性が 3 例で確認された。

D. 考察

ヒストプラズマ症は、わが国では海外で感染し国内で発病する、いわゆる輸入真菌症とされているが、東南アジア、とくにタイでは HIV 感染者を中心に比較的高い頻度で認められる真菌症である。本感染症は基本的にヒト-ヒト感染がないことや、培養陽性率が極めて低いことから診断が困難であり、ベトナムにおいては本症の疫学情報の不足が認められる。このような背景から、ベトナムにおけるヒストプラズマ症の実態や感染源と考えられる環境の検討を行った。

昨年度までは培養法、PCR 法で陽性となった症例は認めなかったが、本年度は気管支肺胞洗浄液検体から初めて PCR 法でヒストプラズマ属 DNA 陽性となった検体が認められた。これら陽性例はすべて培養法陰性であったが、臨床症状や PCR 産物の解析からヒストプラズマ症と診断できると考えられる。すなわちベトナム北部における、微生物学的検査成績をともなった初のヒストプラズマ症例となる。この事実は、ベトナムにおいても呼吸器感染症としてのヒストプラズマ症は決して稀ではない深在性真菌症であることが伺われ、今回同時に検討した抗体検出率の値もこの点を支持しているものと考ええる。また、M 抗原遺伝子の一塩基多型解析では、タイ型とは離れ、むしろ米国型に近いクレードを形成することが認められることから、東南アジアにお

けるヒストプラズマ属の遺伝的多型性を示唆する結果が認められたことは興味深いと考えられた。今後、更なる症例の蓄積が求められる。

さらに本研究では、ヒストプラズマ属の感染源となりうる環境の検討も行ったが、3 検体のみで PCR 法が陽性であった。これについて一定の見解はまだ付与できないと考えるが、我々のタイでの検討の結果を考慮すると、ベトナムにおいても家禽類の糞汚染土壌が感染源である可能性は高い。

本研究は日本とベトナムとの真菌症に関する共同研究の先駆けであり、今後継続的な研究体制を維持しながら発展させていくことが重要と考えられる。

E. 結論

ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて、急性呼吸器感染症が疑われる症例から得られた臨床検体中に、ヒストプラズマ属の遺伝子が検出された症例を経験した。また、抗ヒストプラズマ抗体保有状況の検討から、この地域におけるヒストプラズマ症は決してまれな真菌症ではないことが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N,

- Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1, 2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol* 51: 385-395, 2013.
- 2) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother* 19 (5): 999-1003, 2013.
- 3) Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2226-2230, 2013.
- 4) Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis* 66: 216-221, 2013.
- 5) Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J Infect Chemother* 19 (6): 1141-1145, 2013.
- 6) Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against Cryptococci. *Mediators of Inflammation*, volume 2013, article ID 465319, 2013.
- 7) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. *Mycopathologia* 176 (5): 395-402, 2013.
- 8) 大野秀明、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. *化学療法の領域* 29 S-1: 1144-1151, 2013.
- 9) 大野秀明. 結核感染症の病態-結核発症の危険因子とは?-. *治療* 95 (6): 1159-1163, 2013.
- 10) 大野秀明、荒岡秀樹、梅山 隆、金子幸弘、宮崎義継. 接合菌症. *臨床検査* 58 (1): 97-103, 2014.
- 学会発表
国際学会
- 1) Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present

status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, Yokohama, 2013.

2) Sriburee P, Puengchan T, Ohno H, Tanabe K, Siriaunkul S, Lamaroon A, Chanwong S, Khamwan C, Khantawa B, Miyazaki Y. Early diagnosis of histoplasmosis by nested PCR. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013.

3) Tanabe K, Ohno H, Hoang Thi Thu Ha, Nguyen Thuy Tram, Miyazaki Y. Histoplasmosis. NIID-NIHE review meeting on collaborative research program, Hanoi, 2013.

国内学会

1) 大野秀明、宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断- (シンポジウム). 第54回日本神経学会学術大会、5月29日-6月1日、東京、2013.

2) 秋根 大、加藤幹朗、辻 浩史、榎村浩一、大野秀明、小林裕幸. 2 cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected healthy patients. 第87回日本感染症学会、第61回日本化学療法学会総会合同学会、6月5日-6日、横浜、2013.

3) 大久保陽一郎、大野秀明、篠崎 稔、宮崎義継、根本哲生、若山 恵、栃木直文、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、安藝恭子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第57回日本医真菌学会総会・学術集会、9月

27-28日、東京、2013.

4) 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、名木 稔、知花博治、亀井克彦、宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 第57回日本医真菌学会総会・学術集会、9月27-28日、東京、2013.

5) 大野秀明、大久保陽一郎、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染書の病態解析 (シンポジウム4). 第57回日本医真菌学会総会・学術集会、9月27-28日、東京、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

Clostridium difficile 感染症の信頼性の高い細菌学的検査システムの確立と
アジアにおける *C. difficile* 感染実態調査
Establishment of a reliable system for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection and molecular
epidemiology of *C. difficile* infection in Asia

研究分担者 加藤はる (国立感染症研究所 細菌第二部)
Haru Kato (Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases)

【研究要旨】 ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)において、ハノイ市内の4医療機関より収集された糞便検体における *Clostridium difficile* 分離培養が開始された。*C. difficile* 17菌株より NIHE において抽出した DNA サンプルにおいて、国立感染症研究所で PCR による毒素遺伝子検出および PCR ribotyping 解析を行ったところ、NIHE による結果と国立感染症研究所における結果に乖離が認められたため、NIHE における実験プロトコルの見直しを行った。Toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性であった5株中3株は異なる3病院における分離株であったが、同一 PCR ribotype と同定され、さらに、そのタイプは日本では頻繁に分離されるタイプではなかった。新しい高病原性株の発生源・温床となる可能性の高いベトナムにおいて CDI の疫学研究は急務と考えられた。また、国立感染症研究所で解析が開始された36株中 toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が13株、toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性株が10株であった。特にアジアで toxin A 陰性 toxin B 陽性株の分離率が高いことが報告されてきたことに鑑み、今後の検討で注目していく必要があると思われた。

新しい細菌学的検査法として、RT-PCR 法を用いた *C. difficile* 毒素遺伝子検出法の開発を行い、44臨床検体を使用して評価を行った。検討検体数を増やす必要があるが、本法は、臨床検査として使用でき、さらに *C. difficile* による感染と無症候キャリアを区別できうる画期的検査法と考えられた。

【Summary】 Stool specimens were collected from 4 healthcare facilities in Hanoi, and *Clostridium difficile* culture was started in National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Viet Nam. DNA samples extracted from 17 isolates in NIHE were sent to National Institute of Infectious Diseases (NIID), where PCR detecting the toxin genes and PCR ribotyping were performed. Discrepancies were found between the results by NIHE and those by NIID, leading to the review of the protocol of experiments in NIHE. Of 5 toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative isolates tested, 3 came from 3 different hospitals and were classified as the same type that is not frequently recovered in Japan. Further study is warranted to clarify CDI epidemiology in Viet Nam, which has a high potential to be a new source and hotbed of hypervirulent strains, such as BI/NAP1/027. Of a total of 36 isolates examined for toxigenicity, 13 were toxin A-positive, toxin B-positive, binary toxin-negative and 10 were toxin A-negative, toxin B-positive, binary toxin-negative. As reported especially in Asia, high isolation rate of toxin A-negative, toxin B-positive should be noted.

A novel method detecting vegetative cells of *C. difficile* from fecal specimens by amplifying the repeating sequences of toxin A gene by reverse transcription PCR (RT-PCR) was established and evaluated using 44 clinical specimens. The method could be used for clinical examination and has potential to distinguish between *C. difficile* infection and asymptomatic colonization with *C. difficile*.

研究協力者

妹尾充敏 Mitsutoshi Senoh	国立感染症研究所 細菌第二部
福田靖 Tadashi Fukuda	Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases
柴山恵吾 Keigo Shibayama	
Vu Thi Thu Huong	Department of Bacteriology National Institute of Hygiene and Epidemiology
Tăng Thị Nga	
Lê Thị Trang	

Tham Chi Dung (NIHE), Hanoi, Viet Nam

A. 研究目的

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。加えて、本菌は医療関連感染の原因として重要であり、院内アウトブレイク発生がしばしば認められ、米国 CDC からは“urgent threat”として警告されている。

ベトナムでは、医師処方箋なしで抗菌薬の購入が