

分担研究総合報告書（H23-25 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、中山絵里、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。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。その結果、日本と台湾からの輸入症例からの分離ウイルスは渡航先により同様の傾向を示し、インドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分けすることが可能であった。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、4 型流行も発生していたことが明らかになった。これは 2012 年、2013 年フィリピンのデング熱の致死率は 0.5%、0.32%と高かったことと関係する可能性が示唆された。インドネシアでも 4 型による流行は発生しているようであるが、2013 年はインドネシアからの 4 型感染輸入症例は日本、台湾ともになくインドネシアでは 4 型による流行は発生していなかったか、大きくなかったと考えられた。デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、有用な情報をもたらすことが確認された。

#### 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、デング熱輸入症例を対象を絞った。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

2011 年から 2013 年にフィリピン、インドネシアからの輸入症例から分離されたウイルスは 1 型が最も多く、インドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分け出来た (図 1)。2 型ウイルスはフィリピンからは 10 株と少なく、インドネシアは 33 株であった。2 型もグループ分け出来た (図 2)。3 型ウイルスもインドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分け出来た (図 3)。4 型ウイルスは、フィリピン由来が 2 グループ、インドネシア由来 1 グループに分かれた。また、2013 年はインドネシアからの 4 型ウイルスはなく、4 型ウイルスによる流行はフィリピンで拡大していると推測された (図 4)。

#### 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。台湾 CDC は我が国と異なり検疫所と一体化しており、入国後の患者追跡も厳しいことがその要因であり、日本のデング熱輸入症例は実際には台湾以上の可能性が高い。

この 3 年間フィリピン、インドネシアとも 1 型～4 型までのウイルスを検出した。ただし、1 型

ウイルスの検出数が多く。両国ともデングウイルス 1 型が主たる流行株と考えられる。

フィリピンの 2012 年、2013 年のデング熱患者数は、それぞれ 178,644 例、166,107 例で致死率が 0.5%、0.32% と高かったことから、流行規模が大きく主流行株は 1 型であったが、日本と台湾の輸入症例からも明らかなようにフィリピンでは 4 型が流行しており、4 型による 2 度目の感染が CFR を高めている可能性がある。ただし、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、インドネシア必ずしも捉えているとは限らないが、2013 年は少なくとも 4 型ウイルスによる流行は発生していないか、大きくはないと考えられる。

デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、日本と台湾で同様の傾向をしめし、輸出流行地に関して非常に有用な情報をもたらすことが確認された。

#### 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のほとんどは、近似なウイルスであった。フィリピンもインドネシアも主たる流行株は 1 型ウイルスであるが、4 型ウイルスの流行が拡大している可能性があり、その傾向はフィリピンに強いと考えられる。デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、有用な情報をもたらすことが確認された。

#### E. 健康危機情報

なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Kotaki A, Ikeda M, Harada F, Ito M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus non-structural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travellers. *Journal of Travel Medicine*, 20,3,185-193,2013.
2. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Takasaki T. Diagnosis of viral haemorrhagic fevers in travelers returning from West Africa. *Journal of Travel Medicine*, 20(1), 63-64, 2013.
3. Tochitani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. Ross River virus - Japan ex Australia: (VI). ProMed, promed archive no. 20130616.1776324, 2013.
4. 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
5. of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. Fifth Informal Japanese Encephalitis Laboratory Meeting. (Tokyo) November, 2013.
2. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
3. Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013
4. Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013.
5. 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)

### 2. 学会発表

#### 1) 国際学会

1. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application
- 2) 国内学会
1. 高崎智彦、モイメンリン、網康至、須崎百合子、大松勉、平山隆則、田島茂、林昌宏、中村紳一郎、片貝裕子、吉田友教、明り宏文、白井顕治、北浦一孝、藤井克樹、鈴木隆二、

- 西條政幸、倉根一郎. 第3回マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析 (九州) 2013年12月
2. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
  3. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
  4. 栃谷健太郎、清水恒広、篠原浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン. オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症1例. 第56回日本感染症学会西日本地方学会学術集会 (大阪) 2013年11月
  5. Moi ML, Lim CK, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. Towards a safe and effective dengue vaccine: assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using a novel assay by FcγR-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
  6. 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)
  7. 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)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1 デングウイルス1型の遺伝子系統樹 (2011-2013年)

図2 デングウイルス2型の遺伝子系統樹 (2011-2013年)

図3 デングウイルス3型の遺伝子系統樹 (2011-2013年)

図4 デングウイルス4型の遺伝子系統樹 (2011-2013年)



図1. デングウイルス1型(D1)の遺伝子系統樹

グレー:フィリピン  
 黒:インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

2011-2013 D1

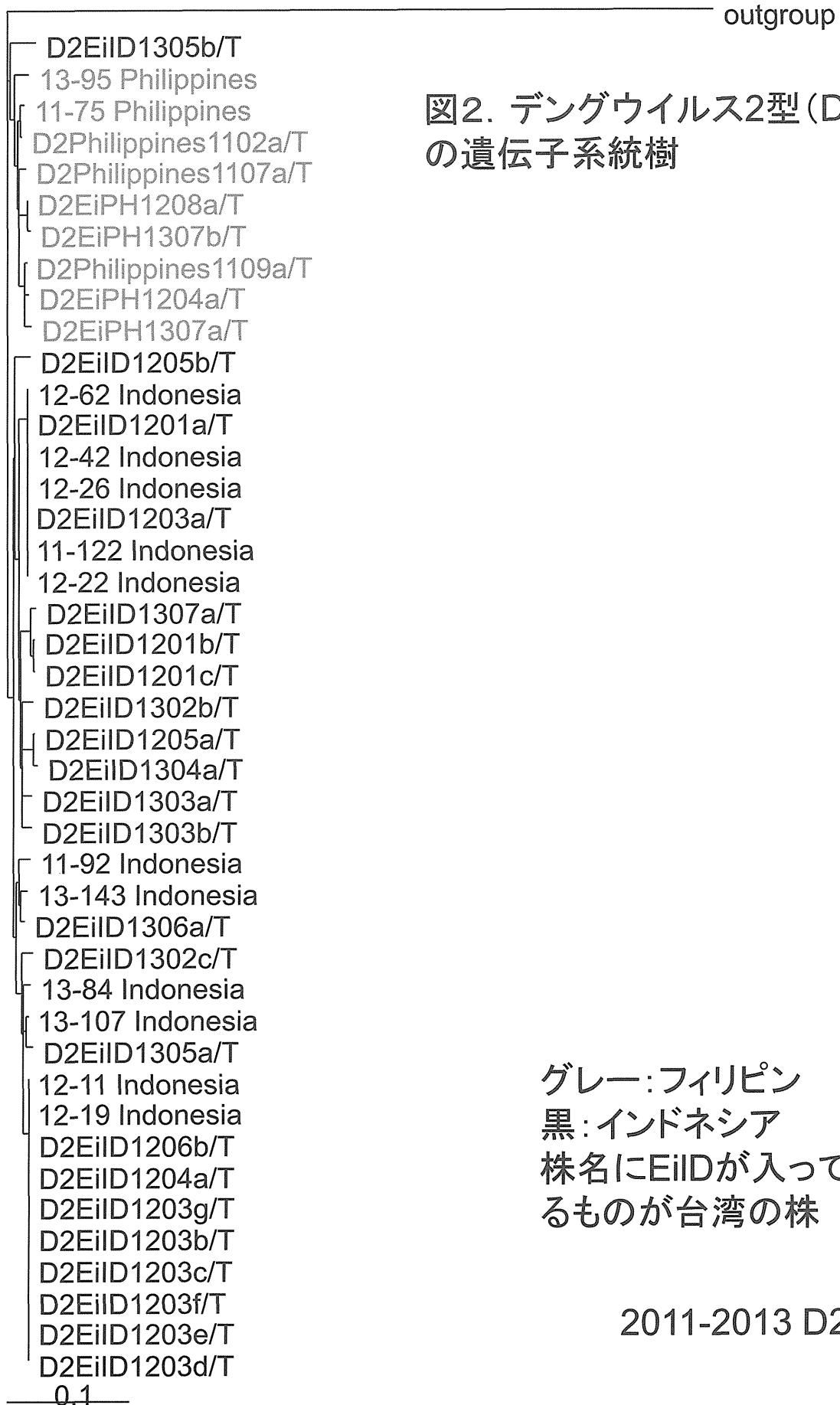


図2. デングウイルス2型 (D2) の遺伝子系統樹

グレー: フィリピン  
 黒: インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

2011-2013 D2

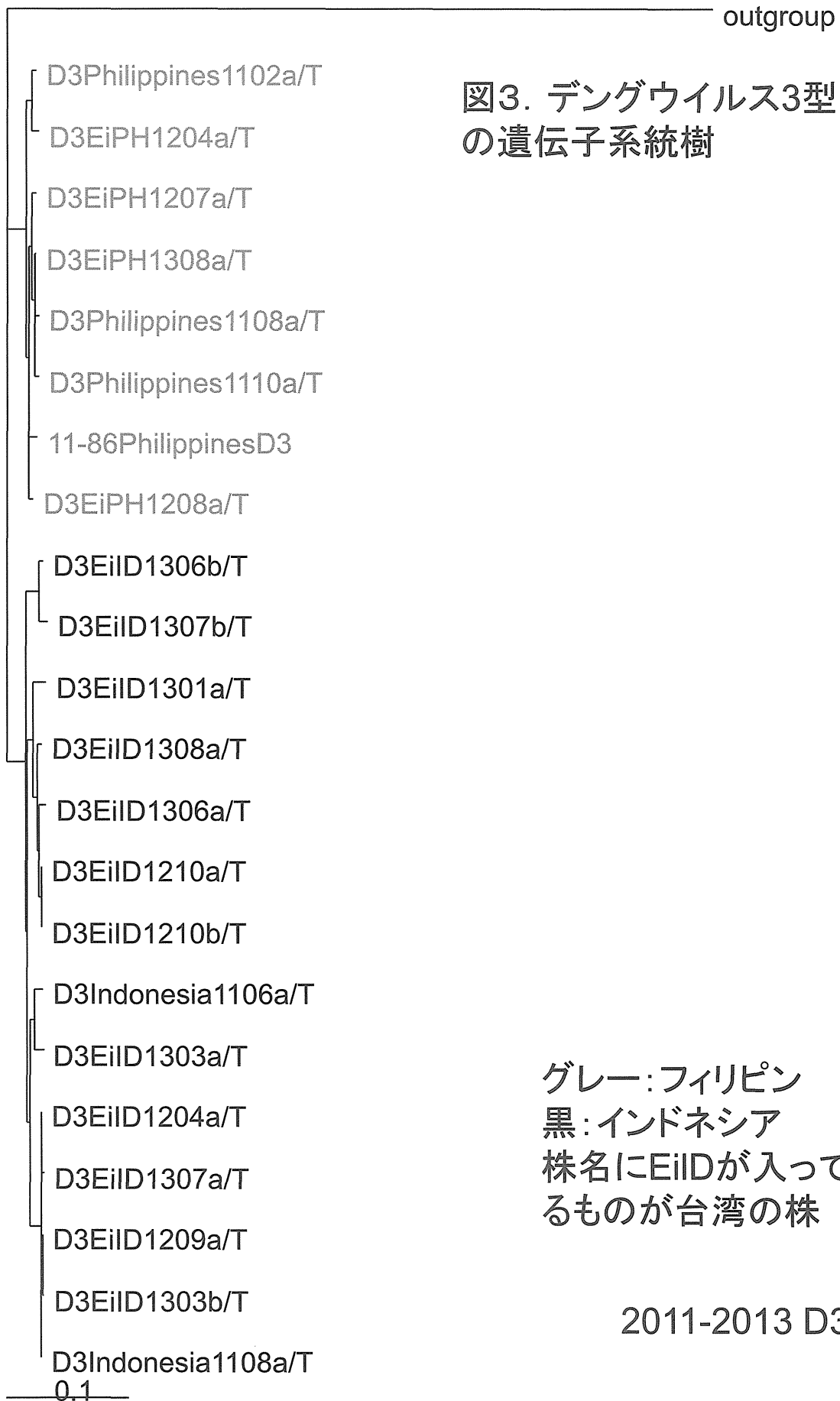


図3. デングウイルス3型(D3)の遺伝子系統樹

グレー: フィリピン  
 黒: インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

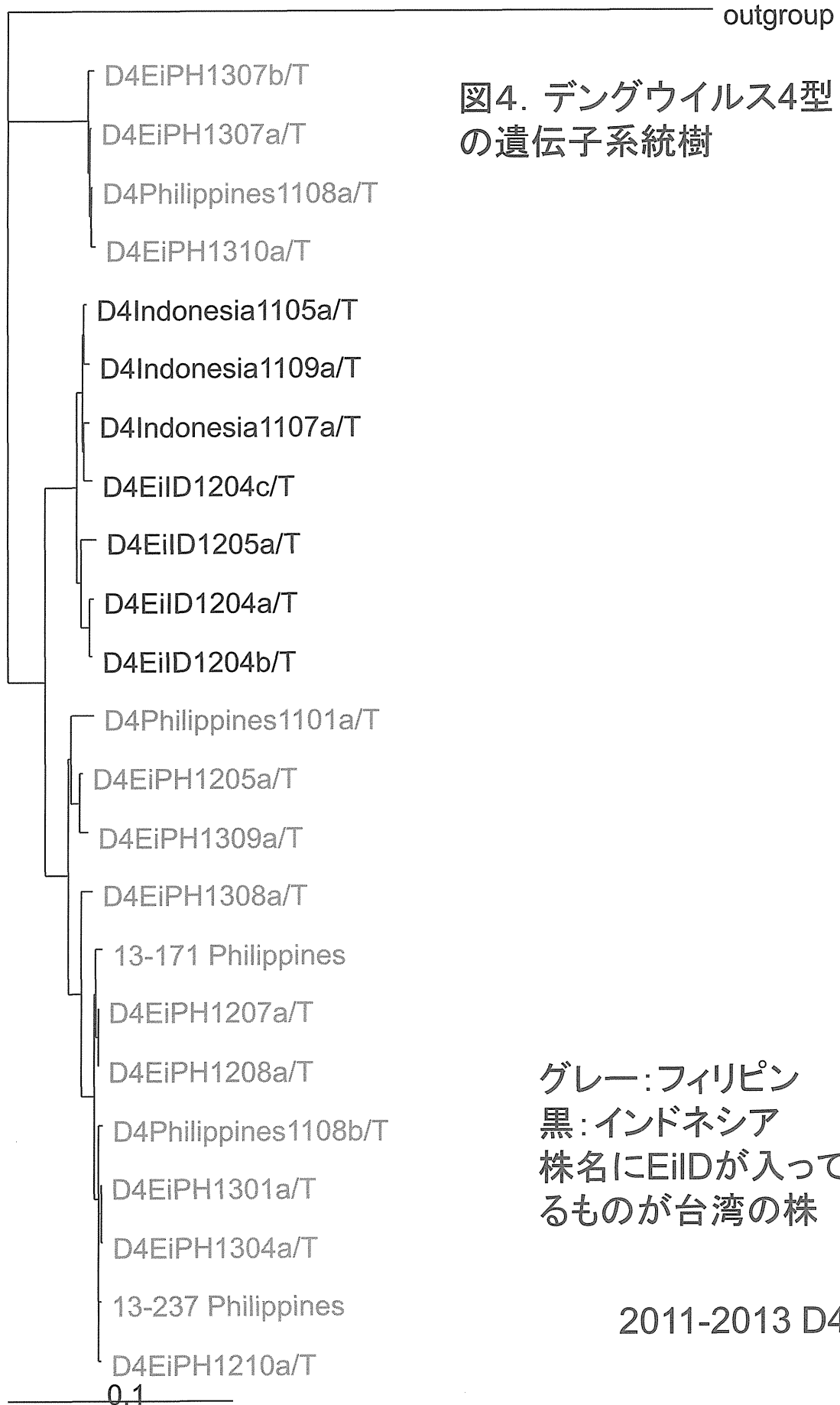


図4. デングウイルス4型(D4)の遺伝子系統樹

グレー: フィリピン  
 黒: インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

2011-2013 D4



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

結核菌の薬剤耐性 Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Taiwan CDC)  
NDM-1 型薬剤耐性菌 NDM-1 carbapenemase-producing bacteria (Vietnam NIHE)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)  
Keigo Shibayama (Department of Bacteriology II, NIID)

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 *katG* 遺伝子の変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A の変異、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異を見出した。C317T、G332A の変異は、*in silico* の解析から酵素の活性中心のアミノ酸残基を置換させることで酵素活性を低下させ、INH の活性化を阻害して耐性化に関与していることが分かった。今後、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輸入事例を中心に 10 例ほど報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離されている。ベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性菌株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法として用いられてきた SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌に応用できるか検証した。メロペネム、セフトジジム、及び SMA ディスクの組み合わせで検出が出来ることが分かった。またベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 1 2 株について、Multilocus sequence typing 法により遺伝子型を調べたところ、うち 1 1 株は非流行タイプだった。ベトナムでは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。

The emergence of drug resistant tuberculosis is a public health concern. The resistance to isoniazid (INH) can be detected by a convenient PCR-based amplification and reverse blotting assay. However, discordant results have been observed for several resistant strains isolated in Taiwan. Some INH resistant strains carried new mutations, C-10T of *ahpC* gene, C1436A, C317T, G332A, and insertion of GA at 235 of *katG* gene, and T203C of *ndh*. Among them, C317T and G332A of *katG* gene were shown to be associated with alteration of enzyme activity by *in silico* analysis.

The collaborative study with NIHE aimed at evaluating the SMA test for detecting NDM-1 producers among *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. A collection of 16 NDM-1-positive bacterial isolates (5 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter freundii*, and 4 *A. baumannii*), obtained from hospitals in Vietnam in 2010, and 1 *K. pneumoniae* isolated in Japan in 2010, were used. SMA test using both MPM and CAZ disks was shown to be the most suitable for screening carbapenem-resistant isolates for NDM-type MBL producers. We further determined genotype of NDM-type carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in hospitals in Vietnam by multilocus sequence typing (MLST). Among 12 NDM-positive *A. baumannii* strains examined, 11 belonged to MLST types different from the clonal complex 92 which is known as the worldwide epidemic lineage. This is in contrast to the situation in Japan where OXA-type carbapenemase-producing CC92 type strains are dominant and cause nosocomial infections.

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)

Collaborators in Japan:  
Shigetarou Mori, Department of Bacteriology II, NIID  
Hyun Kim, Department of Bacteriology II, NIID  
Mari Matsui, Department of Bacteriology II, NIID  
Masato Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID  
Satowa Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID  
Jun-ichi Wachino, Department of Bacteriology, Nagoya University

## 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 で収集されたこれらの株を用いて感染研で新たな遺伝子変異を見出すとともに、それらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかについても感染研で解析することとした。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、2008 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輸入事例を中心に 10 例ほど報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離される。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、これまでメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に検出する SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌にも応用できるかどうか検証することとした。また収集した NDM 型カルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の遺伝子型別を行い、どのような型が拡散しているのかを調べる事とした。

## B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、加熱死菌を感染研に送付し、感染研ではゲノム DNA を抽出したのち、*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、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を分離した。分離された NDM 型遺伝子陽性の *A. baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本国内で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法として用いられてきた SMA ディスク法で SMA による阻害効果が見られるかを観察し、この方法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌に応用できるか検証した。また、NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 1 2 株について Multilocus sequence typing (MLST)により遺伝子型別を行った。

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、過去に耐性との関連が証明された変異部位以外の変異を持つ株について加熱死菌を感染研に送付しても

らった。感染研にて、ゲノム DNA を抽出した後、*katG* 遺伝子、*ndh* 遺伝子の変異をスクリーニングした。結果を Table 1 に示す。これまでに報告が無い新規の変異で新たに見つかったのは、*katG* 遺伝子の 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異だった。うち、*katG* 遺伝子で挿入によるものは frame shift、塩基の mutation のものではアミノ酸残基で Ala106Val、Gly111Asp の変異に相当する。*In silico* 解析で、これらのアミノ酸残基は、蛋白の活性中心に存在することが分かった(図 1 A, B)。

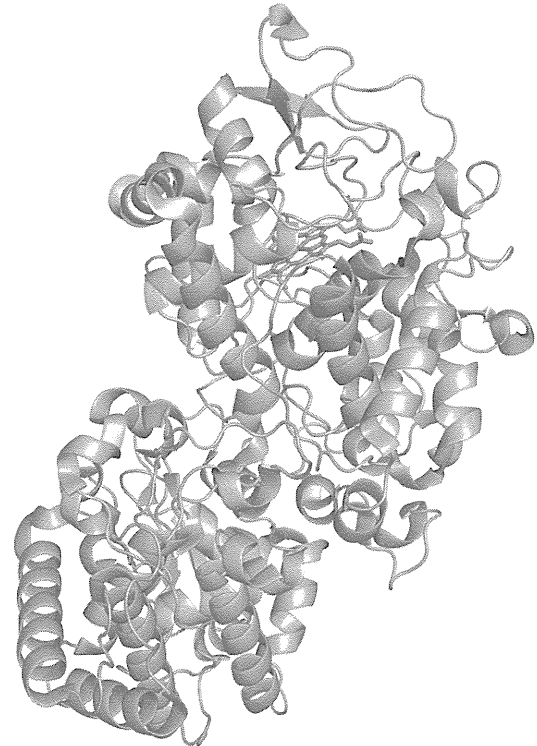


図 1 A、KatG 全体像

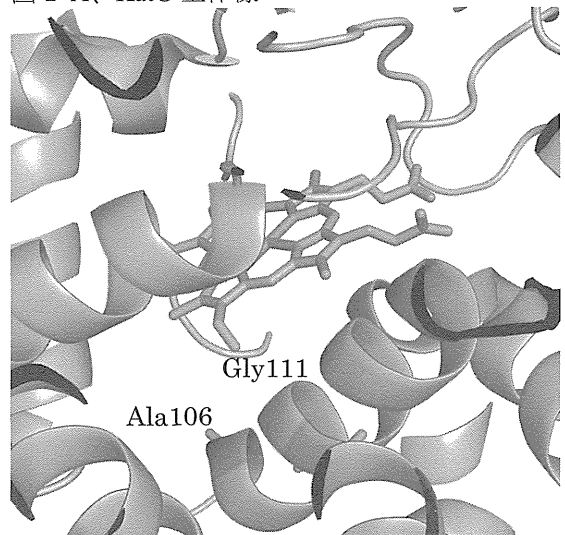


図 1 B KatG の活性中心部分

このことから、これらの変異は KatG 蛋白の酵素活性に影響を与えていることが推測された。

ベトナムハノイ市内の医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌及び *A.*

*baumannii* を用いて、SMA ディスク法の評価を行った。通常、SMA ディスク法で推奨されているセフトジジム(CAZ)ディスクの他、イミペネム(IPM)ディスク、メロペネム(MPM)ディスクと SMA ディスクによる組み合わせの結果を Table 2 に示す。CAZ では、16 株中 7 株でのみ SMA の阻害効果が認められ、検出可能であった。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、多くの場合 SMA ディスクに阻害を受けない他のタイプのβ-ラクタマーゼも同時に産生することが報告されており、このため検出率が低かったと考えられる。IPM では 1 4 株、MPM では 1 5 株で SMA による阻害効果が認められ、陽性と判定された。MPM 及び IPM で陰性と判定された株では CAZ で陽性と判定された。この株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も同時に持っていた。OXA-48 型カルバペネマーゼは、SMA により阻害を受けないため、この影響で IPM、MPM いずれでも検出できなかったと考えられる。そして OXA-48 型カルバペネマーゼは CAZ の分解能が低く、NDM 型カルバペネマーゼの SMA による阻害が CAZ でのみ観察されたと考えられる。また、ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 1 2 株の MLST 型別を行った。*A. baumannii* は、MLST により世界的な流行タイプ CC92 とそれ以外のものに分けられる。CC92 は、多剤耐性株が多く、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 CC92 タイプである。ベトナムで分離された NDM 産生株 1 2 株の MLST 型を調べたところ、1 1 株が non-CC92 タイプだった。

#### D. 考察

結核菌の INH 耐性株で、これまでに報告がない *katG* 遺伝子の変異を見いだした。INH は菌体内に取り込まれた後、KatG 蛋白により代謝され活性形に変換される。*In silico* による 3 次元構造の解析から、これらの変異により KatG 蛋白の活性が失われることで INH 耐性が誘導されていると推測された。今後、実際に蛋白を精製し、活性の測定を行う予定である。これらの変異が実際に耐性に関与していることを確認した上で、現行の INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良につなげる予定である。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、従来推奨されていた CAZ ディスクに加えて MPM ディスクを使用する事で、検出が出来る事が分かった。ここで、SMA ディスク法は NDM 型カルバペネマーゼ産生菌だけでなく、IMP 型や VIM 型など他のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌も陽性となる。SMA ディスク法は安価で簡便なため、本法をまずスクリーニングとして用い、PCR 等で遺伝子を確定することで、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を効率的に検出出来ると考えられる。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 CC92 ではなかった。ベトナムではベッドは、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の基本的な感染対策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、蔓延してしまうと推測される。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

台湾で分離された INH 耐性結核菌において *katG* 遺伝子に新たな遺伝子変異を見いだした。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに、SMA ディスク法が応用出来る事が分かった。ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* は、ほとんどが非流行タイプであり、様々な遺伝子型株が混在していたこのタイプは、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と思われるが、日本において医療機関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. 論文発表

- 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 型カルバペネマ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.
- 3) Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting

NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii.

Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):66-8.

- 4) わが国におけるNDM型およびKPC型カルバペネマーゼ産生菌分離状況(2013年7月現在)

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) 34:238-9, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) SMA ディスク法を使ったNDM型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株スクリーニング方法の検討  
松井真理 和知野純一 鈴木里和 柴山恵吾  
第25回日本臨床微生物学会総会、平成26年2月、名古屋

## 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. of isolates	Mutation		Codon	Amino Acid	Notes
	Gene	Nucleotide No.			
1	<i>katG</i>	G→T position 388	CGG→CTG	Arg463Leu	
2	<i>katG</i>	T→C position 271	TGG→CGG	Trp91Arg	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
3	<i>katG</i>	G and A inserted after position 235 -		Frameshift	novel mutation
7	<i>katG</i>	A→G position 413	AAC→AGC	Asn138Ser	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
8	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
	<i>katG</i>	C→A position 1436	GCG→GAG	Ala479Glu	novel mutation
	<i>ndh</i>	T→C position 203	ATC→ACC	Ile68Thr	novel mutation
10	<i>katG</i>	A→C position 884	CAG→CCG	Gln295Pro	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
11	<i>katG</i>	C→T position 317	GCG→GTG	Ala106Val	novel mutation
		G→A position 332	GGC→GAC	Gly111Asp	novel mutation
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
12	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
13	<i>katG</i>	C→T position 357	CGC→CGT	Arg119Arg (silent)	
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	

Table 2. Inhibitory activity of sodium mercaptoacetate (SMA) disks for New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-1-producing bacterial isolates

Bacterial isolates	Antibiotic disks		
	Ceftazidime (CAZ)	Imipenem (IPM)	Meropenem (MPM)
<i>E. coli</i> V-22	+	+	+
<i>E. coli</i> V-48	+	+	+
<i>E. coli</i> V-91	-	+	+
<i>E. coli</i> V-102	-	+	+
<i>E. coli</i> V-134	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> MRY10-722	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> V-17	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-21	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-90	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-182	-	+	+
<i>E. cloacae</i> V-87	+	-	-
<i>C. freundii</i> V-868	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-275	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-303	+	+	+
<i>A. baumannii</i> V-320	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-357	-	+	+

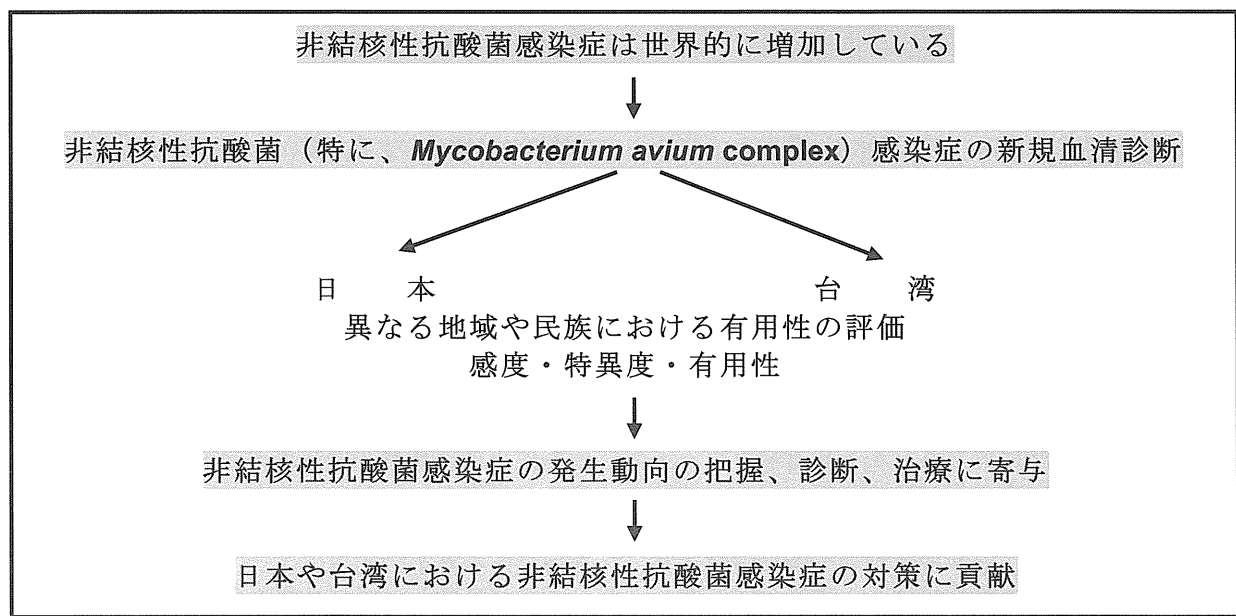
(+), positive; (-), negative; *E. coli*, *Escherichia coli*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; *C. freundii*, *Citrobacter freundii*; *A. baumannii*, *Acinetobacter baumannii*

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 23 年度-平成 25 年度総合分担研究報告書

- 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(H23-24)、阿戸 学(H25)
- 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・免疫部主任研究官 松村 隆之
- 研究協力者： 新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学教授 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・性能評価に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局周 如文 博士、国立台湾大学病院医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源 博士と日台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。さらに、民間検査機関（BML）の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。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。共同研究の成果として、1）台湾の MAC 感染症患者血清を収集、2）MAC 抗体価を測定し、感度：61%、特異度：91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であることが示された。



## 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) を占め、世界的に増加している。日本では、年間約 9000 人を越える新規患者が発生していると推定されている。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)。加えて、2012 年 9 月から民間検査機関 (BML) の受託項目となり、保険診療として広く普及することが期待される。

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機関承認を得ている。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

血清検体の収集に先立ち、ヒトを対象とする医学研究倫理審査申請書の作成について、電子郵便による事前協議を終了し、2012 年 2 月 07-09 日に渡台し、台湾行政院衛生署疾病管制局や国立台湾大学病院附設医院内科と最終協議し、大筋合意した。その後、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。

引き続き、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。診断基準 (2007 年) に合致した活動性肺 MAC 感染症: 57 症例、MAC 混入 (contamination): 11 症例、*M. kansasii* 感染症: 14 症例、迅速発育型 GPL 保有非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum* など) 感染症: 26 例、活動性結核: 48 症例、結核患者の濃厚接触者: 42 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 34、陰性は 23 症例、MAC 混入 (contamination): 陽性は 1、陰性は 10 症例、*M. kansasii* 感染症ではすべて陰性であり、迅速発育型非結核性抗酸菌感染症: 陽性は 7、陰性は 19 症例、活動性結核陽性: 5、陰性は 10 症例、結核患者の濃厚接触者: 陽性は 2、陰性は 42 例、血清診断キットの感度は 61%、特異度は 91% であった。

## 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。

台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91% であった。この成績は日本や米国における性能評価に比し、特に、感度 (日本: 84% や米国: 77%) が低下していた。この原因として、台湾では GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌感染症が高頻度であること、本調査での活動性肺 MAC 感染症患者に免疫不全患者が比較的多い (32%) 大学病院で実施されたことが示唆された。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であったといえる。

今後の課題として、台湾の多施設共同研究 (市中病院を含む) によるキットの性能評価、カットオフ



値の検討や GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* など) 感染症の感度・特異度の解析を進め、台湾における血清診断キットの有用性を最終的に検証することなどが挙げられる。

## E. 結論

- 活動性非結核性抗酸菌感染症の血清診断に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局分枝桿菌実験室と国立台湾大学病院で日台共同研究の実施で合意し、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。
- 台湾における活動性 MAC 感染症の血清診断の感度は 61%、特異度は 91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であった。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shu, C.C.\*, **Ato, M.\***, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., **Kobayashi, K.**, Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (\*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work). 2013. Sero-diagnosis of *Mycobacterium avium* complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan. PLoS One 8(11): e80473.
- 2) **Kitada, S.**, A. Levin, M. Hiserote, R. J. Harbeck, C. A. Czaja, G. Huitt, S. H. Kasperbauer, and C. L. Daley. 2013. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease in the United States. Eur. Respir. J. 42: 454-460.
- 3) Fukuda, T.\*, Matsumura, T.\*, M. **Ato, M.** Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, **S. Matsumoto, K. Kobayashi**, Kinoshita T, Y.S. Morita (\*T.F. and T.M. contributed equally to this work). 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 4(1):e00472-12.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) **Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto.** 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.
- 10) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi**, A. Rambukkana, and **S. Matsumoto.** 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- 11) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Vaccine 29: 6881-6887.
- 12) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi**, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193: 5766-5774.
- 13) Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, **K. Kobayashi**, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. J. Biol. Chem. 286: 44153-44161.

### 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）。
- 2) 小林和夫、光山 正雄. 2011. 結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）. 学術講演要旨 246、2011. 第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）。
  - 3) 松本壮吉、岡 真優子、北田清悟、前倉亮治、小林和夫、2011. 結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）. 学術講演要旨 246、2011. 第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）
  - 4) 小林和夫. 2011. 感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究（Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症）. 日臨免誌、34 : 268、2011. 第 39 回日本臨床免疫学会総会（東京、9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

## **Serodiagnosis of active *Mycobacterium avium* complex disease in Taiwan**

**Kazuo KOBAYASHI  
Manabu ATO  
Takayuki MATSUMURA  
Department of Immunology  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan**

**Sohkichi MATSUMOTO  
Department of Bacteriology  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan**

**Ryoji MAEKURA  
Seigo KITADA  
National Hospital Organization Toneyama Hospital, Osaka, Japan**

**Ruwen JOU  
Centers for Disease Control, Taipei, Taiwan**

**Jann-Yuan WANG  
National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan**

Diagnosis of active *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease (MAC-PD) is complicated and time-consuming, because MAC-PD is diagnosed according to the guidelines set forth by the American Thoracic Society 2007, which include clinical and microbiological criteria. A multicenter study from Japan reported the usefulness of a serodiagnostic test to determine serum IgA antibodies against mycobacterial glycopeptidolipid (GPL) core for diagnosing MAC-PD proven by sputum culture (sensitivity: 84%, specificity: 100%) within a few hours. The objective of this study was to evaluate the usefulness of the test in similar patients in Taiwan. Fifty-seven patients with MAC-LD, 11 with MAC contamination, 13 *M. kansasii*-LD, 26 LD due to rapidly-growing mycobacteria (RGM), 48 pulmonary tuberculosis, and 42 household contacts of patients with TB were enrolled into the study at National Taiwan University Hospital. Serum GPL core IgA antibody levels were measured with an enzyme immunoassay kit, and routine clinical evaluations were performed. The sensitivity and specificity (cut off point=0.73 U/mL) of the serodiagnostic test for diagnosing active MAC-PD were 61% and 91%, respectively. The results were lower when compared to previous reports, perhaps due to high proportion of immune-compromized patients in active MAC-PD and RGD-PD patients. We conclude that measurement of serum anti-MAC-GPL IgA level is useful for the diagnosis of MAC-LD in Taiwan.

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（3年間のまとめ）

### 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及びハンセン病の起因菌であるらい菌の薬剤耐性に関する研究を実施した。台湾のハンセン病患者血清を用い、らい菌由来抗原 MMP-I 及び MMP-II の血清診断を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。らい菌の薬剤耐性に関する研究では 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。検出した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。さらに、らい菌の薬剤耐性の検出に新しい簡易遺伝子変異検出法 (Hp-rPCR 法) を検討した。

#### 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国も多いが、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。そこで第 3 にその変異が実際に耐性をもたらすということを確認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入れ、その薬剤に対する影響をみた。第 4 に耐性変異の迅速検出法を開発し検討を加えた。以上の協力研究を通じ、日台での技術共有を目指した。

#### B. 研究方法