

## 1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis.* (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
- 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013
- 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
- 5) Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
- 6) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
- 7) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
- 8) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2013
- 9) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
- 10) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 43, 50-51, 54-59, 2013
- 11) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 12) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 13) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
- 14) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 15) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
- 16) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 17) 増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之. 国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
- 18) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
- 19) 武知茉莉亜、乾未来、福島若葉、中野貴司、清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査(2010年分) —中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
- 20) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
- 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
- 22) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of

enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011

- 23) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)

## 2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
- 4) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 5) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆字、Jeffrey M. Bergelson、清水博之: エンテロウイルス 71 と受容体 PSGL-1 との結合: VP1-145 は受容体特異性を制御する分子スイッチである。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 6) 飯塚節子、清水博之: RD-A 細胞を用いた Human enterovirus A の分離。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 7) 片岡周子 西村順裕 鈴木忠樹 小谷治 岩田奈織子 永田典代 網康至 清水博之: エンテロウイルス 71 のカニクイザルにおける病原性の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11 月 10~12 日, 2013
- 8) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状。第 87 回日本感染症学会学術講演会・第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」。横浜市、6 月 5 日、2013
- 9) 町田早苗、清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会。大阪、11 月 14 日, 2012
- 10) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 11) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 12) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 13) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

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)

分担研究報告書

アジアの感染症担当機関とのラボラトリーネットワークの促進と

共同研究体制強化に関する研究

ベトナム NIHE における麻疹、風疹ウイルス遺伝子診断技術の確立と

ベトナム北部に流行する麻疹ウイルス、風疹ウイルスの解析

Establishment of molecular diagnosis for Measles and Rubella in NIHE, Viet Nam  
and molecular analysis of measles circulated in the northern part of Viet Nam.

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究分担者 Trieu Thi Thanh Van National Institute of Hygiene and Epidemiology

研究協力者 森 嘉生 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究要旨 WHO では麻疹の排除、風疹、CRS の減少、根絶を目指している。そのための要件として、高いワクチン接種率の維持とともに実験室診断による質の高いサーベイランス体制の確立を求めている。また麻疹排除の定義から流行株の起源の鑑別が求められておりウイルスの遺伝子解析の手法が必須になっている。ベトナムにおいては、麻疹、風疹の検査診断は WHO が標準法とする IgM ELISA 法で行われているが、遺伝子検出による診断技術、解析技術はまだ十分に確立されていない。本研究はベトナム北部の National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) と協力して、ベトナムにおける遺伝子検出による診断技術、ならびに遺伝子解析技術を確認する事、そしてまた患者検体や過去に採集された血清検体からウイルス遺伝子を検出し、過去から現在において流行したウイルスの変遷を調査する事を目的としている。本研究では、1) NIHE に遺伝子解析技術の移転をはかり、2) 2006 年～2012 年までに流行したウイルスの遺伝子解析し、遺伝子型 H1 株が流行している事、また、その流行株は同じ遺伝子型 H1 でありながら、流行年ごとに少しずつ異なる事、また 3) 2013 年春からベトナム北部山岳地域で流行し始めたウイルスは隣国、ラオスで流行した株を起源とする可能性が高い事、を示した。

#### A. 研究目的

国際連合は 2000 年に、21 世紀の国際目標として、より安全で豊かな世界をつくるための国際協力を約束した「国連ミレニアム宣言」を採択し、その共通目標としてミレニアム開発目標(MDGs)を設定した。MDGs の 8 つの目標の一つ、MDG4 では「乳幼児の死亡率の削減」を掲げ、乳幼児死亡率を 2015 年までに 1990 年の 1/3 にする事を目標とした。当時、麻疹は開発途上国の乳幼児の死因の上位を占めた事、またすぐれたワクチンがある事等から、MDG4 の進捗を計る指標として麻疹ワクチ

ンの接種率を定めている。WHO もこれに呼応して 2000 年に「Measles Initiative」を採択し、天然痘、ポリオについて、麻疹の排除、さらには根絶を目指す事を決定した。

WHO は麻疹排除を「質の高いサーベイランスが存在するある一定の地域内において、常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が 12 ヶ月間以上ないこと」と定義とし、麻疹の排除達成には症例数を減少させるだけではなく、検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制の確立を求め、さらに麻疹排除が近づいた時には、検出された麻

疹ウイルスがその土地に常在した株なのか、あるいは輸入によってもたらされた株なのかを鑑別する事を求めている。またそこで解析されたウイルス遺伝子の情報は、世界のウイルスの分布状況の把握や伝播コースのトレースにも有用である事から、各国の麻疹検査を担う研究所では、優れた麻疹ウイルスの遺伝子解析力が期待されている。

現在、日本では年間の麻疹報告数が300症例を下回り、また、2006-8年の麻疹の流行の原因ウイルスであった遺伝子型D5のウイルスの検出が全くない状態となっている。この事は実質的に日本は麻疹排除状況にあることを示唆している。一方、近年の麻疹患者の多くからは遺伝子型D4, D8, D9, B3, G3, H1などの海外に起源を持つと考えられるウイルスが検出されている。麻疹ウイルス、風疹ウイルスはともに呼吸器感染し、感受性者にはたやすく感染する。これはとりもなおさず、日本での麻疹排除、風疹排除の達成および維持には、周辺国の流行が大きく関係する事を示す。本研究はベトナムにおける遺伝子診断技術、解析技術の確立を目指している。これらはWPR、あるいは世界ににおける麻疹、風疹排除の推進の有用である。

## B. 研究対象と方法

- 1) ベトナムの麻疹、風疹に関する情報の収集およびウイルス遺伝子検出技術の供与  
ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)の Dr. Trieu Thi Thanh Van、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査状況を確認した。また、日本で用いられている高感度の遺伝子検出法の技術供与を行った。
- 2) 過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析  
NIHEに保管されていた2006年、2008年、2009年の麻疹 IgM 抗体陽性血清から

Qiagen Viral RNA mini kit RNA を用いて RNA を抽出し、麻疹ウイルス遺伝子型鑑別領域増幅用の RT-PCR を実施し、麻疹ウイルスゲノムの検出を試みた。増幅された遺伝子の塩基配列を決定し系統樹解析を実施した。

- 3) 2013年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

ベトナム北部の山岳地域では2013年春から麻疹の流行があった。麻疹患者より咽頭拭い液、血液を採取し、PCR による遺伝子検出を試みた。ウイルスの系統樹解析を行った。

## C. 研究結果

### ・ ベトナムの麻疹、風疹の流行状況

ベトナムにおける麻疹は2008年から2009年にかけて全土にわたるアウトブレイクがあり約5200例の麻疹が報告されたが、2010年9月～11月に1～5才の子供を対象とした全国的な補足的ワクチン接種を実施したことから、2010年は1826例、2011年は750例、2012年637症例と減少傾向にあった。しかし2013年には800例が報告されやや増加している。2013年はここ数年、報告のなかった北部の山岳地域を中心に麻疹の報告が相次ぎ、最近ではハノイでも増加傾向にある。一方、風疹は2008年にはおよそ646例の報告であったが、2009年、2010年と増加し、2011年には7259例となったが、2012年12月までに120例前後となり流行は収まりつつある。しかし月齢12ヶ月未満の心臓、白内障、難聴を持つ乳児を対象にCRSサーベイランスを行った結果、2011年では161例が、2012年も9月までにおよそ300例のCRS児が確認されている。麻疹症例報告数、風疹症例報告数のすべてが検査診断されたわけではないが、検査方法はWHOのプロトコールに従い、発疹、発熱患者を対象にELISA法で麻疹IgM抗体を測定、陰性だっ

た場合には風疹の IgM 抗体測定を実施している。

・ 過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

2006 年、2008 年、2009 年の麻疹 IgM 抗体陽性患者血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法により麻疹ウイルスゲノムの増殖を試みた。2006 年 6 検体、2008 年 17 検体、2009 年 20 検体から麻疹ゲノムの回収に成功した。これらの塩基配列を決定し系統樹解析を行ったところ、すべて遺伝子型 H1 型に分類された。また 2006 年と 2008 年、2009 年の株は同じ遺伝子型 H1 でも異なるブランチに属し、塩基配列で 450 塩基中 10～11 の変異があった。また 2008、2009 年の流行株間の塩基配列の変異は 0～3 であった(図1)。

・ 2013 年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

ベトナム北部の山岳地域である Lai Chau 県、Lao Cai 県、Ha Giang 県から4月ごろから麻疹の報告されている。少なくとも4月～6月の間にLai Chau 県では52例が実験室診断、あるいは臨床診断より麻疹と診断されている。Lai Cai 県より4株、Lai Chau 県より3株、Ha Giang 県より1株の遺伝子型決定部位の遺伝子配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、各県内で検出されたウイルスは同一であるが県間では異なっていた。また、これらの麻疹ウイルスは遺伝子型 H1 に属していた。またその塩基配列は隣国、ラオスの Phongsaly 県、Luangnamtha 県で 2011～2012 年に検出されたウイルスと同一、あるいはよく似ていた(図2)。一方、隣接する中国、雲南省でも 2013 年には麻疹の流行があったが、遺伝子型 D9 のウイルスであった。

#### D. 考察

麻疹、風疹はともに感染力が強いウイルス性呼吸器感染症である。麻疹は罹患者の免疫を低下させることから、患者のおよそ 1/3 が合併症を併発

する。特に肺炎、脳炎を合併した場合は死亡率が高く、先進国でも 0.1- 0.2 %程度が死に至るといわれている。また、途上国では時として 10% 近い死亡率を示す事がある。一方、麻疹には有効性、安全性にすぐれたワクチンが存在するにも関わらず、今だ乳幼児死亡率の高い感染症である。ワクチン接種率を高めれば確実に乳幼児の死亡率を減少しうる。国連が進める MDG4 の指標に麻疹ワクチンの接種率が掲げられているのもそのためである。また WHO では麻疹だけでなく風疹の排除もすすめている。妊婦が風疹に罹患した場合、胎盤を通じて胎児に風疹ウイルスが感染し、出生する子供に CRS と呼ばれる障害を残す事が知られている。麻疹同様に風疹にも有効なワクチンがあり、麻疹、風疹混合ワクチンとして同時に接種できる事から、麻疹排除と同時に風疹の排除も計画している。これらの排除計画は人類の公衆衛生上、医療経済上からも大きな意義を持っている。

ベトナムでは麻疹ワクチンは 1982 年から導入されている。当初は接種率が低かったが 1990 年頃から 90%以上の接種率を維持している。また、2002 年以降、数回にわたる大規模な補足的ワクチン接種を実施したことから、2003 年以降、麻疹は暫時減少し 2007 年の麻疹の発生率は人口 100 万人当たり 0.2 人になったが、その後、ワクチン不足により接種率が 83%に減少したためか 2009 年には 59 人/人口 100 万人の麻疹のアウトブレイクが報告されている。その後は 95%を超える高いワクチン接種率を維持しているにも関わらず 5 人～20 人/人口 100 万人程度で麻疹の流行が継続している。

一方、風疹は現在までワクチンが導入されておらず、4～5 年のサイクルで流行を繰り返している。2009 年ごろから風疹の流行のきざしがみられ、2011 年には 7000 人を超す風疹が報告されている。これに伴い CRS を持つ子供の出生数も増加しており、2012 年では三カ所の定点病院でサーベイランスを実施したところ 300 以上の CRS 確

定例が報告されている。現在、予定を早めて 2013 年から風疹ワクチンを含むワクチン(MR or MMR ワクチン)の導入を計画している。風疹予防の主たる目的は小児への感染防御ではなく、妊婦への感染を防ぎ、CRS の発生を防ぐ事にある。小児へのワクチン接種により、風疹が減少し、ワクチンの接種機会のなかった年代がそのまま妊娠可能年齢になり、逆に CRS が増えた事例がある。成人への感染のコントロールはより困難である。小児への高い接種率を維持し、風疹の流行そのものを減少させることが CRS の予防に重要となるだろう。

前述のように 2007 年には麻疹の発生率が人口 100 万人当たり 0.2 人にまで減少した。2006 年以前と 2007 年以降の麻疹ウイルスの違いは興味深い。過去の検体からの麻疹ゲノムの検出、解析から、2006 年のウイルスと 2008 年以降のウイルスでは同じ遺伝子型 H1 であるが、異なるブランチに属する事が明らかになった。2006 年ウイルスと 2009 年ウイルスでは麻疹ウイルス N 遺伝子末端の遺伝子型決定部位 450 塩基中に 10~11 塩基、アミノ酸配列で 4~5 アミノ酸の変化がみいだされ、異なる由来のウイルスである可能性が考えられた。麻疹の排除は「質の高いサーベイランスが存在するある一定の地域内において、常在する麻疹ウイルスによる麻疹の伝播が 12ヶ月間以上ないこと」と定義されており、排除の最終段階では流行する麻疹ウイルスが定着株か輸入株かの鑑別が必要となってくる。遺伝子型別のみではウイルスの鑑別には不十分な事が考えられ、ウイルス学的、疫学的により慎重に麻疹症例を観察する必要がある。

2013 年に麻疹の流行の端緒となった Lai Chau 県、Lai Cai 県、Ha Giang 県の北部山岳地域では少数民族が暮らし、また交通のアクセスが悪い事もありワクチン接種等の公衆衛生上のサービスが必ずしも十分に行き渡っていない可能性が考えられた。また、今回の麻疹ウイルスの遺伝子解析から、2011 年ごろからラオスの麻疹患者から検出されているウイルスと近い事がわかった。北

部山岳地域はラオス国境と接しており、何らかの接触が両国民の中であった可能性が考えられた。

一般的な問題であるが、ワクチン接種率の把握は先進国でも困難である。特に途上国の地方においては人口の正確な把握そのものが難しい事が多く、ワクチン接種率に表示された数字の信頼性が高くないと思われる。ベトナムでもワクチンが不足した 2007 年以外は 95%以上のワクチン接種率が公式には報告されているが、信頼性が低い可能性は否定できない。ワクチン接種率だけではなく血清疫学の併用によって感受性者の集団を見つけ出していく事も今後麻疹の排除を達成するためには必要かもしれない。

容易に国外旅行ができる現在では、麻疹排除、風疹排除を達成し、その状態を維持していくには、ある特定の国だけでの排除達成では不可能で、少なくとも WPR 等の様にある一定の広さを持つ地域からの排除が必要になってくる。事実、日本においては麻疹症例が減少した 2010 年以降、検出された麻疹ウイルスの大部分は、疫学的、ウイルス学的に海外に由来すると考えられており、またこれらが国内で小規模なアウトブレイクを起こす事もある。また 2012~2013 年に風疹の流行を引き起こしたウイルスも東南アジアで流行していた遺伝子型 2B のウイルスと類似のウイルスであった。国内の麻疹、風疹の排除の達成、維持は国外、おもに近隣の状況と無関係ではない。特に中国、韓国、東南アジア等のように比較的人口が多い国の中心的な研究室と技術、情報の交換等の緊密な連携とれる体制を確立しておくことは今後重要になると考えられる。

## E. 結論

麻疹、風疹のような感染性の強いウイルスは容易に国境を超えて伝播する。この事は日本において麻疹、風疹の排除を達成、維持していくためには、少なくとも関係の深い周辺の諸国の麻疹、風疹の状況を把握し、可能ならばその改善

に協力できる体制を構築する事が重要である。事実、2013年暮れから2014年においてフィリピンで麻疹が流行した事により、昨年の約2倍のペースで日本において麻疹が検出されている。周辺諸国での公衆衛生を向上させ、共通の目標としてこれらの感染症対策を実施していけるような協力関係を継続していく事は、対象の途上国だけではなく、日本にとっても重要である。その意味でも本研究班は大変意義深いものであると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tran DN, Vu MP, Ha MT, Giang TPL, Komase K, Mizuguchi M, Ushijima H. Viral molecular characterization of the first congenital Rubella syndrome case in Vietnam. *Clin Lab.* 2011;57(5-6): 397-401.
- 2) Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, Hübschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukenya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN, Bellini WJ, Featherstone D. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis.* 2011 Jul; 204. Suppl 1: S514-23.
- 3) Abernathy ES, Hübschen JM, Muller CP, Jin L, Brown D, Komase K, Mori Y, Xu W, Zhu Z, Siqueira MM, Shulga S, Tikhonova N, Pattamadilok S, Incomserb P, Smit SB, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Lim WW, Woo GK, Triki H, Jee Y, Mulders MN, de Filippis AM, Ahmed H, Ramamurty N, Featherstone D, Icenogle JP. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S524-32.
- 4) Featherstone DA, Rota PA, Icenogle J, Mulders MN, Jee Y, Ahmed H, de Filippis AM, Ramamurty N, Gavrilin E, Byabamazima C, Dosseh A, Xu W, Komase K, Tashiro M, Brown D, Bellini WJ, Strebel P. Expansion of the global measles and rubella laboratory network 2005-09. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S491-8.
- 5) Phengxay M, Hayakawa Y, Phan TG., Tanaka-Taya K, Ueno-Yamamoto K., Vongphrachanh P, Komase K, Ushijima H. Seroprevalence of rubella and measles virus antibody in Lao PDR. *Clin Lab.* 2011; 57(3-4);237-244.
- 6) Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K. Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3) 268-70, 2012
- 7) Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H. Phylogenetic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010. *J Med Virol.* 84(4):705-10, 2012
- 8) Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 3; 418(1): 38-43, 2012
- 9) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. (2013) Lethal canine

- distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114.
- 10) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87:7170-5.
  - 11) Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K and Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 87:666-675.
  - 12) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M. (2013) The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol.* 87:3583-6.
  - 13) Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. (2013) Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol.* 87:4683-93.
  - 14) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. (2013) Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol Immunol.* 57:246-51.
  - 15) 駒瀬勝啓 麻疹検査診断法とその問題点、小児科 金原出版 52 (9):1273-1280 (2011)
  - 16) 竹田誠、駒瀬勝啓、社会情勢の中で変わりゆく麻疹という感染症、*BIO Clinica*, 26、1198-1202 (2011) 駒瀬勝啓 Q&A 麻疹検査診断法 日本医事新報 2012 4605: 57-59.
  - 17) 駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状、臨床と微生物 2012 39(6): 656-662.
  - 18) 駒瀬勝啓 麻疹ワクチン、風疹ワクチンの品質管理 臨床とウイルス 2012 40(5):334-341.
  - 19) 染谷健二 駒瀬勝啓 竹田 誠、2012年の海外の麻疹情報、病原微生物検出情報、2013,34 (2); 24-25
  - 20) 駒瀬勝啓、竹田誠 ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題、病原微生物検出情報 33(2); 29-30 (2012)
  - 21) 駒瀬勝啓 麻疹排除の進捗と麻疹輸入例の増加 -麻疹排除に向けた今後の課題- 小児科 金原出版 53 (1):105-112 (2012)
  - 22) 駒瀬勝啓 染谷健二 竹田 誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009～2012、病原微生物検出情報、2013, 34(2); 36-37
  - 23) 倉田貴子 上林大起 駒野 淳 西村公志 加瀬哲男 高橋和郎 大平文人 松井陽子 伊達啓子 熊井優子 久保英幸 改田 厚 後藤 薫 長谷 篤 大阪市保健所 廣川秀徹 吉田英樹 内野清子 三好龍也 田中智之 森 嘉生 大槻紀之 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、大阪府内における2012年の風疹患者発生状況、病原微生物検出情報、2013,34 (4); 97-98
  - 24) 森嘉生 大槻紀之 岡本貴世子 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、風疹ウイルスの遺伝子型別動向と検査診断マニュアル改訂、病原微生物検出情報、2013, 34 (4); 99-100 (2013)
  - 25) 梶山桂子 古川英臣 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 田村和夫 駒瀬勝啓 タイからの B3型麻疹ウイルス輸入例—福岡市、病原微生物検出情報、2013, 34 (7); 201-202
  - 26) 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) Tran Nguyen、駒瀬勝啓、早川智、牛島廣治、  
Phylogenetic analysis of rubella viruses found in  
Vietnam in 2009-2010 第 52 回日本臨床ウ  
イルス学会 津市三重県総合文化センター、  
2011 年 6 月 11 日～12 日
- 2) 倉田貴子、井澤恭子、西村公志、加瀬哲男、  
高橋和郎、大平文人、松井陽子、梯和代、  
久保英幸、改田厚、後藤薫、長谷篤、内野  
清子、三好龍也、田中智之、駒瀬勝啓、森  
嘉生、竹田誠、大阪府内における 2011 年の  
風しん発生状況 第 15 回日本ワクチン学会  
学術集会 東京都日本教育会館、2011 年  
12 月 10 日～11 日
- 3) 小川知子、堀田千恵美、小倉惇、福嶋得忍、  
平野憲朗、小山早苗、駒瀬勝啓、中山哲夫、  
和山行正、MR ワクチン接種後、約 4 ヶ月を  
経て麻疹ワクチン株が検出された症例につ  
いて 第 15 回日本ワクチン学会学術集会  
東京都日本教育会館、2011 年 12 月 10 日～  
11 日
- 4) Hiroko Minagawa, Teruo Yamashita, Yoshihiro  
Yasui, Mami Hata, Shinichi Kobayashi,  
Hirokazu Adachi, Emi Mizutani, Miyabi Ito,  
Noriko Fujiwara, Akira Fujiura, Katsuhiko  
Komase. COLLECTION/PRESERVATION  
CONDITIONS OF SAMPLES FOR MEASLES  
VIRUS DETECTION TO IMPROVE  
LABORATORY DIAGNOSIS FOR  
CASE-BASED MEASLES SURVEILLANCE.  
XV International Congress of Virology, 札幌  
市札幌コンベンションセンター、2011 年 9 月  
11 日～16 日
- 5) 駒瀬 勝啓、高崎智彦、竹田誠 デング熱  
患者における麻疹 IgM 抗体の検出、第 86  
回日本感染症学会学術講演会 長崎 2012  
年 4 月 24 日～25 日
- 6) Khamla Lerdsaway, K. Thammavongsa, P.  
Ounnaphone, B. Khamphaphongphanh, V.  
Somoulay, P. Vongphrachanh, K. Komase, K.  
Yamamoto, S. Archkhawong, P. Ketmayoon,  
M. Phengxay, T. Chanthapaseuth, K. Feldon,  
J. Denny, H. Lewis, Rubella Susceptibility  
Study among Women of Child-bearing Age -  
Vientiane Capital, Lao PDR, 2010, 15<sup>th</sup>  
International Congress on Infectious  
Diseases, Bangkok, 2012 年 6 月 13 日～16  
日
- 7) 中山哲夫、改田厚、駒瀬勝啓、麻疹ウイルス  
野生流行株とワクチン株との鑑別、第 53 回  
日本臨床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16  
日～17 日
- 8) 駒瀬勝啓、秋吉京子、伊藤正寛、麻疹 IgM  
抗体価測定による麻疹検査診断-偽陽性と  
感度の関係-、第 53 回日本臨床ウイルス学  
会、堺 2012 年 6 月 16 日～17 日
- 9) 点状出血で発症したパルボウイルス感染症  
の臨床とウイルス学的検討～麻疹 IgM 抗体  
との交叉反応について～、第 53 回日本臨  
床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16 日～17  
日
- 10) 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中  
津祐一郎、大槻紀之、福原英雄、福士秀悦、  
吉川智城、西條政幸、森川茂、前仲勝美、  
山口良二、駒瀬勝啓、竹田誠、カニクイザル  
で致死感染症を起こしたジステンパーウイ  
ルスのサルレセプターの効率的な利用:ジ  
ステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得る  
のか? 第 60 回日本獣医学会 岩手 2012  
年 9 月 14 日～16 日
- 11) 中津 祐一郎、鈴木 忠樹、駒瀬 勝啓、竹  
田 誠、極性上皮細胞におけるリサイクリン  
グエンドソーム経路を利用した麻疹ウイルス  
RNP 複合体の細胞膜への輸送と感染性ウイ  
ルス粒子の産生:第60回ウイルス学会学術  
集会 大阪、2012 年 11 月 13 日～15 日
- 12) 田原 舞乃、Melinda A. Brindley、福原 秀

- 雄、酒井 宏治、大野 真治、駒瀬 勝啓、Paul A. Rota、Richard K. Plemper、前仲 勝実、竹田 誠、麻疹ウイルス単一血清型決定の分子基盤:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日～15日
- 13) 酒井 宏治、關 文緒、網 康至、田原 舞乃、中津 祐一郎、大槻 紀之、福原 秀雄、福士 秀悦、吉河 智城、西條 政幸、森川 茂、前仲 勝実、山口 良二、駒瀬 勝啓、竹田 誠、カイクイザルで致死的感染症を起こしたジステンパーウイルスのサルレセプターの効率的な利用:ジステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得るのか?:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日～15日
- 14) 内野 清子、三好 龍也、森 嘉生、駒瀬 勝啓、田中 智之、いわゆる臨床検体三点セットを用いた風疹ウイルス検出状況:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日～15日
- 15) 田原舞乃、駒瀬勝啓、竹田誠、麻疹ウイルスH 蛋白質全エピトープの詳細な解析、第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17日～18日
- 16) Kouji Sakai, Fumio Seki, Maino Tahara, Noriyuki Otsuki, Yasushi Ami, Masayuki Saijo, Ryoji Yamaguchi, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda and Shigeru Morikawa、Canine distemper virus intrinsically uses monkey receptors and readily adapts to use human receptors as well, 15<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Singapore 2013年3月11日～13日
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- その他
- 1) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の疫学、実験室検査診断、衛生微生物技術協議会第33回研究会 横浜 2012年6月28日～29日
- 2) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹、風疹ウイル

スと検査診断について、第26回公衆衛生情報研究協議会、研究会 沖縄 2013年1月24日～25日

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

- 3) 講演 駒瀬勝啓、麻疹、風疹発生状況、ウイルス検査の概要と精度管理、平成24年度地方衛生研究所東海、北陸ブロック微生物部門専門家会議 名古屋 2012年10月18日～19日
- 4) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の状況と検査

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

図1. 2006年、2008年、2009年の血清より検出された麻疹ウイルスゲノムの系統樹解析



ベトナムにおける麻疹流行株の解析 (2013)

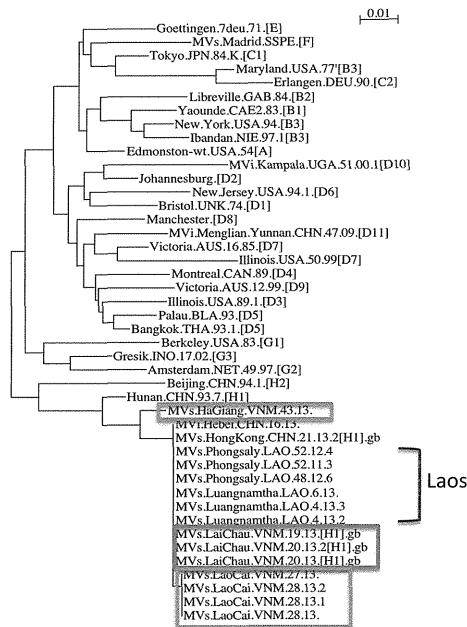


図2.

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
	濱本紀子	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：**平成23年度は、ベトナムに生息する翼手目（コウモリ）がRVを含むリッサウイルス属の自然宿主あるかを調べるためにNIIDで保有している5株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系を確立した。平成24年度は、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、診断ラボのネットワーク強化に必要な検査系の検証と臨床・検査・疫学等を網羅したモデル研修を北部の流行地域で試みた。平成25年度は、より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるように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て従来法（RFFIT法）等同様の成績で感度・特異性の高いことが示された。

**炭疽：**平成23年度は、ベトナムの北部山岳地帯で発生した皮膚炭疽の集団発生事例の炭疽菌DNAを抽出してMLVA（Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis）とSNP（Single Nucleotide Polymorphism）による系統解析を行い分離株が西ヨーロッパや北アメリカの菌株と同じ遺伝学的クラスター（A1クラスター）に分類されることを明らかにした。平成24年度は、皮膚炭疽から分離した菌株を80-SNP（Single Nucleotide Polymorphism）で系統解析してベトナム株が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。平成25年度は、市販食肉分離株について解析を行い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ー（A1クラスター）に分類されることを明らかにした。

## 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**：ベトナム北西部 Hoa Binh、東北部 Long Song、Phu Tho、Yen Bai、Tuyen Quang に生息するコウモリを捕獲して血清採取を行って、NIID で保有している狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）による簡易中和抗体検出系の確立と中和活性測定を行った。

ベトナム北部・中央高地・南部の三地域から代表的な 11 株を選択して 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設計の後に既報（Boldbaatar B., and et al. Jpn. J. Infect. Dis. 62:187-191, 2009）を利用して反応の至適条件を検討した。

NIHE が、地域ラボに狂犬病の検査系を普及したときに検査系の精度を維持するために必要となる検査手技等の検証方法を EQAS（外部精度評価プログラム）を利用して検討した。

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。

より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるように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て、従来法（RFFIT 法）と比較検討

した。

**炭疽**：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を行い、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。

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・経路等について検討した。

## C. 研究結果

**狂犬病**：狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系の実際的な手技を共同して行い、技術的な知見共有と課題等の確認が可能になった。

設計した RT-LAMP プライマーはベトナム北部・中央高地・南部の三地域の代表的な 11 株をいずれも増幅可能であり、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 法と比較したところ感度が 100%、特異性が 96.8%であった。

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、（2）NIID から NIHE に正解を開示、（3）NIHE で抗原および遺伝子を検出、（4）NIHE と NIID で成績・課題を分析。

ベトナムの地域ラボ等を対象にした研修・実習を Thai Nguyen 省の地域ラボ等と連携して行った。研修内容：バイオセーフティの基礎、臨床診断・疫学、および予防法等。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（60 名以上）。

炭疽：地域ラボと連携した炭疽ネットワークを利用して患者からの炭疽菌分離と遺伝子検出に成功した。分離菌株のゲノム解析によってベトナム北部の炭疽流行地（DienBien）で発生した炭疽アウトブレイク患者 6 名の特定と菌分離に成功し、ゲノム解析を行って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。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 クラスターに分類された。

#### D. 考察

狂犬病：NIID で保有している 5 株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系を確立し、ベトナムのコウモリから採取した血清を利用して NIHE と NIID のラボラトリー間で手技および検査成績を検証し概ね同じ成績であることを明らかにした。コウモリ等の野外調査を進めながら、NIHE と NIID のラボラトリー間で血清等の検体を共有して、検査系の比較検証を行い、狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス属のベトナムにおける分布と自然宿主の疫学を明らかにすることで、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が期待された。

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り、狂犬病の早期診断をより確実に進めることが期待された。

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維持を検証するために 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行い抗原検出、遺伝子検出のいずれについてもよい成績を得ることができた。課題として、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があることが示された。

炭疽：ベトナム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ー（A1 クラスター）に分類され、日本やモンゴルなど他のアジア諸国で分離される炭疽菌が分類される A3 クラスターとは異なることが明らかになった。今後、ベトナム分離株のフルゲノム解析を行いベトナム分離株をより特異的に解析可能な SNP タイピングを確立して感染経路の推定や詳細な分子疫学を可能にすることが重要と考えられた。

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の検討が必要と考えられた。また、北部の炭疽流行地（DienBien）はラオスと中国に隣接しており近隣国で発生している炭疽についても同様の解析を行って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くことが重要と考えられた。

#### E. 結論

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、分離株の分子疫学による当該感染症の流行形態や発生状況の解析等を行った。

本研究により、日本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

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K. X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). Jpn. J. Infect. Dis. 64:391-396.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G., Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., Nguyen T.H. (2010) Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006-2009", Journal of Preventive Medicine, Vietnam. Volume XX, 6:164 - 170.

Inoue, S. The clinical signs and diagnosis of animal rabies. Training Program for Rabies Laboratory Diagnosis. ESRM in NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

Inoue, S. Brain operation of rabies suspected dog for taking samples, packaging and transporting to the laboratory. ESRM in

NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

井上 智。事例 3：狂犬病の発生様式、5：感染症の疫学事例、16 章：感染症の疫学。獣医疫学・第 2 版 (Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣医疫学会編。近代出版。p131、2011

井上 智。18. ラブドウイルスと感染症。第 3 章 II. ウイルス学各論。獣医微生物学 (第 3 版)。監修：見上 彪。編集：関崎 勉、高井 伸二、堀本泰介、望月雅美。文永堂出版、p231-238、2011

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について。第 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2011、11 月 5 日、国立感染症研究所、東京都

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.

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.

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. 46<sup>th</sup> Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japna-US Cooperative Medical Science Program. 19-20 June, 2012. Beppu, Japan.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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

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

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

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

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

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.

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.

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.anthraxis 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.

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.anthraxis 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.

Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornvisedsirikul 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.

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.

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.

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

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

グエン トウイズオン、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

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 マウスの中樞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

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樞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

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

## 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

平成23年度-25年度

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）」班

総合研究報告書

ヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究におけるアジアの感染症研究機関との  
共同研究ネットワークの構築

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）、  
Nanthawan Mekha, Natteewan Poonwan (The National Institute of Health, Thailand),  
Pojana Sriburee (Chiang Mai University, Thailand),  
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：地域流行型真菌症であるヒストプラズマ症に関して、タイ国立衛生研究所、ベトナム国立衛生疫学研究所との基礎的、臨床的共同研究を行った。ヒストプラズマ属生息調査として、タイ・バンコク周辺で収集したコウモリ糞汚染土壌から PCR 法でヒストプラズマ属 DNA が検出され、本症の重要な感染源の一つと疑われた。一方、ベトナム・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、ベトナムは他の東南アジア地域と同様にヒストプラズマ症の流行地域であり、決して稀な真菌症ではないことが伺われた。

A. 研究目的  
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  
ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともい