

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で行い、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（Dien Bien）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 クラスタに所属するが日本株（A3a クラスタ）やモンゴル株（A3b クラスタ）と異なるクラスタ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、Duvnhage 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行え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（A1 クラスタ）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（Dien Bien 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（Dien Bien）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。獣疫学・第 2 版 (Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣疫学会編。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., Suguiira 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. Conferaence 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., 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.

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関与している。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