

厚生労働科学研究委託費  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 )  
(H26 年度)

日本および台湾におけるデング熱流行状況  
(分担研究報告書)

担当責任者 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 中山絵里、小滝徹、モイ メンリン、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)

2014 年は、日本においてデング熱国内流行が 69 年ぶりに発生した。2014 年は台湾でも高雄市をはじめ台湾南部において 1 万 5 千人を超える大きなデング熱の流行が発生した。日本の代々木公園に端を発したデングウイルスと台湾の主要流行株は共にデングウイルス 1 型遺伝子型 I 型であったが、ウイルスとしては別の株と考えられた。しかし双方のウイルスはそれなりに近いウイルスであった。このようにウイルス学的視点からみると、ウイルス株の病原性が日台双方の大流行に寄与していると考えたくなるのであるが、本研究班を通じての台湾との情報交換および意見交換と分析結果によれば、むしろ人為的な要因の方が大きかったと考えられる。それは、高雄市で 2014 年 7 月 31 日に勃発したパイプラインからのガス漏れに起因するガス爆発という事故である。この事故で 257 人の負傷者と 25 人の死者を出したが、この事故後、野外生活を余儀なくされた避難民が多数発生したことでデング熱流行拡大が大きく関係したようである。このことは、代々木公園での感染拡大とも共通する要因があることから、今後のデング熱対策に重要なポイントである。

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

本年度はデング熱を対象としてモニターしている。特に台湾北部にはデング熱媒介蚊としてヒトスジシマカは生息するがネッタシマカは生息しない。我が国ではヒトスジシマカが、デングウイルスの媒介蚊であ

るので台湾の情報は非常に重要である。当初はデング熱輸入症例を対象を絞って、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を目的としたが、2014年8月に日本国内でデング熱流行が、69年ぶりに発生したため、双方の国内流行株および流行状況に焦点を当てて解析した。

## B. 研究方法

デング熱患者血清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

2014年東京代々木公園を主感染地として発生したデング熱の原因ウイルスは、デングウイルス1型遺伝子I型であった。2014年の東南アジア、中国、台湾の主たるデングウイルス流行株は、やはりデングウ

イルス1型遺伝子I型であった。台湾の主流行株と日本の主流行株を比較検討したところウイルス株としては異なるものであった。しかし、我が国の静岡の症例から分離されたウイルスと台湾の流行株を比較すると99%の相同性を示した。しかし、台湾でのデング熱流行拡大の最大要因は2014年7月31日に高雄市で勃発したパイプラインからのガス漏れに起因するガス爆発という事故であった(図1、図2)。この事故で257人の負傷者と25人の死者を出したが、この事故の後、野外生活を余儀なくされた避難民が多数発生した。高雄市にはデングウイルス媒介蚊としてネッタイシマカとヒトスジシマカが生息している。これらの蚊によって感染者は急増した。その結果、デング熱患者が急増することになった。デング熱患者総数は15,765人(内輸入症例240例)、デング出血熱患者は139(内輸入症例0)であり死者20人であった(表1)。死亡例の多くは高齢者で基礎疾患を持っている人が多かった。一方、日本の流行についても、感染拡大場所が代々木公園というMass gathering placeであった点、公園内に長期滞在者がいた点で高雄市のパイプライン爆発事故後の野外生活の状況で共通点があった。

## D. 考察

日本の代々木公園に端を発したデングウイルスと台湾の主要流行株は共にデングウイルス1型遺伝子型I型であったが、ウイルスとしては別の株と考えられた。しかし双方のウイルスはそれなりに近いウイルスであった。また、日本の代々木公園に関連する主流行株ではないが、静岡のデング熱

患者のウイルスは台湾に由来する株であった可能性も高い。このようにウイルス学的視点からみると、ウイルス株の病原性が日台双方の大流行に寄与していると考えたくなるが、本研究班を通じての台湾との情報交換および意見交換と分析結果によれば、むしろ人為的な要因の方が大きかったと考えられる。それは、高雄市で 2014 年 7 月 31 日に勃発したパイプラインからのガス漏れに起因するガス爆発という事故が発生した。この事故で 257 人の負傷者と 25 人の死者を出したが、この事故の後、野外生活を余儀なくされた避難民が多数発生したこととデング熱流行拡大が大きく関係したようである。高雄には、デングウイルス媒介蚊としてネッタイシマカとヒトスジシマカの両方が生息しているが、公園の breeding site の蚊の卵の調査からはその 8 割がヒトスジシマカであったことから、野外生活者を刺した蚊の多くはヒトスジシマカであったと考えられる。デング熱流行地においては、ネッタイシマカが主たる媒介蚊であるが、ウイルスの拡散に関しては Mass gathering place におけるヒトスジシマカが果たしている役割もかなり大きいのではないかと考えられる。

#### E. 結語

- 1) 日本の代々木公園に端を発したデングウイルスと台湾の主要流行株は共にデングウイルス 1 型遺伝子型 I 型であった。
- 2) デングウイルス媒介蚊としてのヒトスジシマカは、多くの人が集まる公園等の野外における感染拡大に大きな役割を果たしている。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

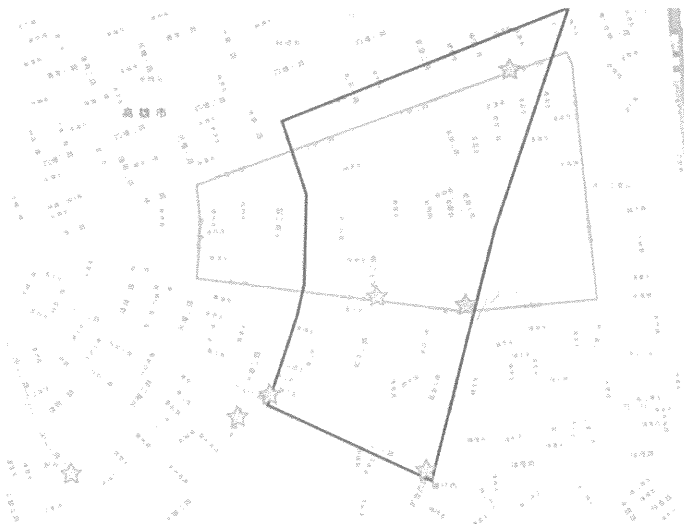
1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27–29 Jun 2015)

国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26 年 6 月 30 日 (東京)
3. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)

4. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
  5. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第 46 回日本小児感染症学会. 平成 26 年 10 月 18ー19 日 (東京)
  6. 高崎智彦. 緊急企画: 70 年を経ての再来ーデング熱国内流行 2014. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成 26 年 10 月 23ー25 日 (岡山市)
  7. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10ー12 日 (横浜市)
  8. MoiMeng Ling, 白井顕治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10ー12 日 (横浜市)
  9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10ー12 日 (横浜市)
  10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. Fc $\gamma$ R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10ー12 日 (横浜市)
  11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るためにー忍び寄る地球温暖化ー」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
  12. 高崎智彦. ー市民公開講座ーデング熱 これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
  13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー. 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
  14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ー70 年の時を経てー (特別講演). 第 21 回リケッチャ研究会. 平成 26 年 12 月 20ー21 日 (東京 国立感染症研究所)
  15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし.

図1、



台湾高雄市でパイプライン爆発地区を示す。このガス漏れに起因する爆発により、25人が死亡し257人が負傷した。爆発後、多くの住民が野外生活を余儀なくされた。

図2



パイプライン爆発現場を見る人々



パイプラインの爆発で陥没した道路



陥没した道路に落ち込んだ車

表1 台湾におけるデング熱患者数（輸入症例を含む）

台湾におけるデング熱患者報告数 (2014年)	デング熱	デング出血熱
Total	15,765	139
Imported cases	240	0
Death	0	20

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）  
委託業務成果報告書  
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

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(担当責任者) 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部 部長)

#### 研究要旨

現在、世界各国で様々な薬剤耐性菌が拡散し公衆衛生上大きな問題になっている。台湾 CDC とは、結核菌の薬剤耐性に関する共同研究を行っている。これまでに台湾で分離されたイソニアジド(INH)耐性結核菌で、既知の遺伝子変異を持たない株 1 株を見出し、感染研で全ゲノムを決定し、SNP 解析を行った。その結果、Mycobacterial membrane protein Large の遺伝子 (*mmpL* 遺伝子) に 10 カ所の新規の変異を見出した。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。アジアの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。ベトナム NIHE とは、世界的に増加が問題となっているカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (*carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*; CRE) に関する共同研究を行っている。ベトナムの医療機関から腸内細菌科細菌 4,096 株を収集し、薬剤耐性を調べたところ 69 株 (1.7%) がカルバペネム耐性だった。69 株のうち 47 株 (68%) で NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、うち 5 株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も保有していた。その他、6 株 (9%) で OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子、1 株 (1%) で KPC 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、14 株 (20%) は検出を試みたカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズは、50kb~150kb と様々であり、Inc type は、Inc FIIs、IncA/C、IncN、non typable が含まれた。NDM 型、KPC 型、OXA-48 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数十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。海外からの帰国症例の場合は、NDM 型のような日本で分離が少ない耐性遺伝子が検出される可能性も念頭におくことが重要と考えられた。

#### 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)  
筒井 敦子 (国立感染症研究所・細菌第二部)

#### 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。

また、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (*carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*; CRE) につ

いては、世界的に増加しており、臨床で大きな問題となっている。2008 年にインドで見出された NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、数年の間に急速に世界中へ広がった。ベトナムでは、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の分離は多く、医療機関のみならず環境中にも広く分布することが報告されている。一方、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の日本での分離はごく少ないが、分離された症例のほとんどに海外渡航歴、特に海外の医療機関受診歴があった (Table 1)。本研究では、ベトナムの医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の分子疫学解析をベトナム NIHE と共同で実施し、今後日本に持ち込まれる可能性がある薬剤耐性菌の情報を得ることを目的とした。

#### B. 研究方法

台湾 CDC から送付された、既知の遺伝子変異を持たない 11 株の INH 耐性結核菌のゲノム DNA を抽出した後、次世代シーケンサーによりゲノム解析を行った。得られたゲノム情報に基づいて、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 株をレファレンス株とした SNP 解析を行い、変異箇所を同定した。

2010 年 8 月から 2012 年 12 月にベトナム ハノイの医療機関で腸内細菌科細菌を収集しカルバペネム



耐性を調べた。カルバペネム耐性が確認された69株について、PCR法で $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を同定した。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出された株については、S1-PFGEとSouthern blot法によりNDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドバンドサイズを決定した。PCR-based replicon typingによりプラスミドをタイピングした。また、2010年から2014年11月にかけて国立感染症研究所細菌第二部に日本国内の医療機関から送付された株のうちNDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出された19株のカルバペネム系薬剤に対する感受性を調べた。

倫理面への配慮 該当なし。

### C. 研究結果

台湾で分離されたINH耐性結核菌のゲノムのSNP解析の結果から、INH耐性に関わるものがこれまでに報告されている遺伝子上で新しい変異を16カ所同定した。特にINH耐性に重要な*katG*遺伝子と*ndh*遺伝子上でそれぞれ5カ所と1カ所の新規変異を見出した (Table 2)。一方で、*katG*遺伝子や*ndh*遺伝子上などに変異がないINH耐性株も存在した。そこで、INH耐性に関わる遺伝子として新たにMycobacterial membrane protein Large (*mmpL*) をコードしている遺伝子 (*mmpL* 遺伝子) に着目してSNP解析を行った。その結果、10カ所の新しい変異を同定した (Table 3)。

ベトナムの医療機関で分離された腸内細菌科細菌4,096株のうち、69株 (1.7%) がCREだった。69株のうち47株 (68%) でNDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、うち5株はOXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子も保有していた。その他、6株 (9%) でOXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子、1株 (1%) でKPC型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、14株 (20%) は検出を試みたカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった (図1)。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズは、50kb~150kbと様々であり、Inc typeは、Inc FIIIs、IncA/C、IncN、non typableが含まれた。また、NDM型検出株47株のうち、イミペネムに非感性 (MIC 2  $\mu$ g/ml以上) の株は87%、メロペネムに非感性 (MIC 2  $\mu$ g/ml以上) の株は83%を占めた。

日本の医療機関で分離されたNDM型カルバペネマーゼ産生株19株のイミペネム、メロペネムMIC分布を図2に示す。全て2  $\mu$ g/ml以上であるものの、イミペネムのMICがメロペネムより低い傾向が見られた。

### D. 考察

今回SNP解析を行ったINH耐性結核菌で見出された*katG*遺伝子の新規変異は、INH耐性と関わっていることが示唆された。また、*katG*遺伝子や*ndh*遺伝子上に変異が存在しない株では、*mmpL*遺伝子上

に変異が見られた。*mmpL*は結核菌において細胞壁構造の形成に重要な役割を果たしていることから、この*mmpL*がINHの作用機序に関わっており、かつINH耐性に*mmpL*遺伝子の変異が関わっていることも考えられた。これらの知見は、新しいDNAプローブを用いたINH耐性結核菌の迅速検出法の開発に寄与することが期待される。

カルバペネマーゼ遺伝子の分布は、国によって異なることが知られているが、ベトナムの医療機関で分離されたCREのカルバペネマーゼ遺伝子として、NDM型が最も多く検出され、日本で多いIMP型は検出されなかった。同一医療機関分離株であってもNDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズやInc typeは様々であり、既にベトナム国内にNDM型カルバペネマーゼを含む様々なタイプのプラスミドを有する株が広がっていることが示唆された。

NDM型カルバペネマーゼ産生株のカルバペネム系抗菌薬に対するMIC値は、ベトナム分離株、感染研保有株ともにMIC 2  $\mu$ g/ml以上の株が多かったが、イミペネムのMIC値がメロペネムに比べてやや低い傾向が見られた。

### E. 結論

INH耐性結核菌を用いたSNP解析結果より、INH耐性に関わると予想される新規遺伝子変異を見出した。

ベトナム国内には、NDM型カルバペネマーゼを含む様々なタイプのプラスミドが既に広がっていることが示唆された。海外からの帰国症例の場合は、NDM型のような日本で分離が少ない耐性遺伝子が検出される可能性も念頭に検査を行うことが重要と考えられた。

### F. 健康危機情報

海外で入院歴のある患者を受け入れる場合には、海外で蔓延しているNDM型などの耐性菌を保菌している可能性を念頭に置き、感染対策に十分注意する必要がある。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Common isolation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam.

Hoang TH, Ehsani S, Shibayama K, Matsui M, Suzuki S, Minh BN, Duong NT, Phuong VT, Linh DT, Thu HN, Anh DD, Son HT, Hien NT, Wertheim H. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, in press.

2) 外来型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の検出状況

鈴木里和、松井真理、鈴木仁人、柴山恵吾 病原微生物検出情報 (IASR) 35(12):287-288

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 国立感染症研究所細菌第二部に送付された NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌  
(2010 年～2014 年 11 月)

カルバペネマーゼ型	送付施設数	菌種 (株数)	海外渡航先
NDM 型	16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12) <i>Escherichia coli</i> (13)	インド、インドネシア、 バングラデシュ、スリラ ンカ、中国、ベトナム

Table 2. これまでに INH 耐性との関連が報告されている  
遺伝子において新たに見出した変異

Mutation		
Gene	Nucleotide No.	Amino Acid
<i>Rv1592c</i>	963_964delAAinsGG	Glu321_Ile322delinsGluVal
<i>ndh</i>	T→C position 203	Ile68Thr
<i>katG</i>	G and A inserted after position 235	Frameshift
<i>katG</i>	G→A position 332	Gly111Asp
<i>katG</i>	C→A position 1436	Ala479Glu
<i>katG</i>	C→A position 1683	His561Gln
<i>katG</i>	G→A position 2135	Gly712Asp
<i>Rv1909c</i>	A→G position 109	Thr37Ala
<i>Rv2247</i>	G→A position 19	Glu7Lys
<i>Rv3795</i>	A→G position 916	Met306Val
<i>Rv3795</i>	A→C position 1061	Asp354Ala
<i>Rv3795</i>	G→A position 1216	Gly406Ser
<i>Rv3795</i>	A→G position 1490	Gln497Arg
<i>Rv3795</i>	A→G position 1693	Ser565Gly
<i>Rv3795</i>	G→C position 1807	Gly603Arg
<i>Rv3795</i>	A→A position 3070	Asp1024Asn

Table 3. *mmpl* 遺伝子において新たに見出した変異

Mutation		
Gene	Nucleotide No.	Amino Acid
<i>mmpl1</i>	G→T position 2722	Val908Phe
<i>mmpl3</i>	G→A position 233	Gly78Asp
<i>mmpl3</i>	A→C position 1003	Ile335Leu
<i>mmpl5</i>	G→A position 736	Gly246Ser
<i>mmpl5</i>	G→A position 2299	Asp767Asn
<i>mmpl6</i>	C→G position 473	Ala158Gly
<i>mmpl8</i>	G→A position 1603	Ala535Thr
<i>mmpl11</i>	C→A position 1560	Phe520Leu
<i>mmpl11</i>	C→T position 2122	His708Tyr
<i>mmpl12</i>	T→G position 509	Val170Gly

図1 ベトナムハノイの医療機関で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科 (CRE) 69 株のカルバペネマーゼ遺伝子検出

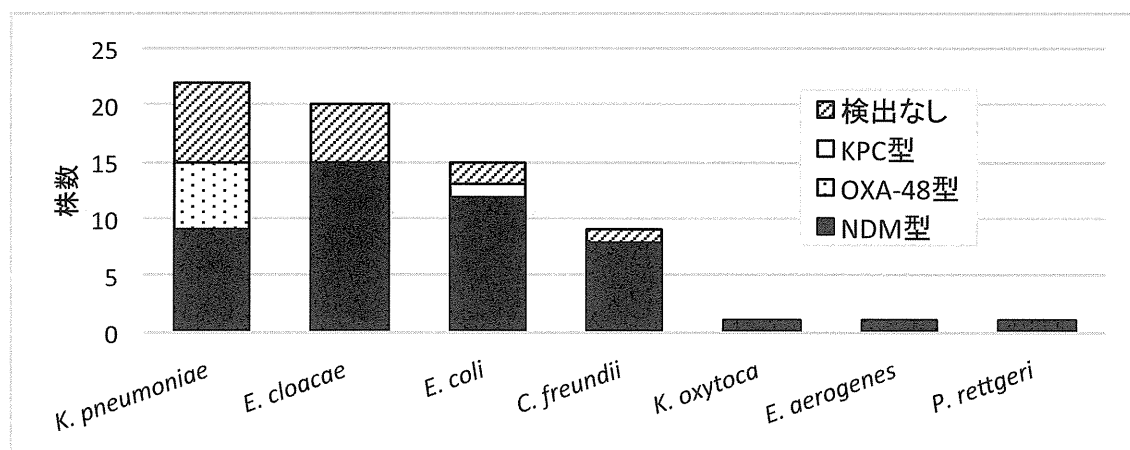
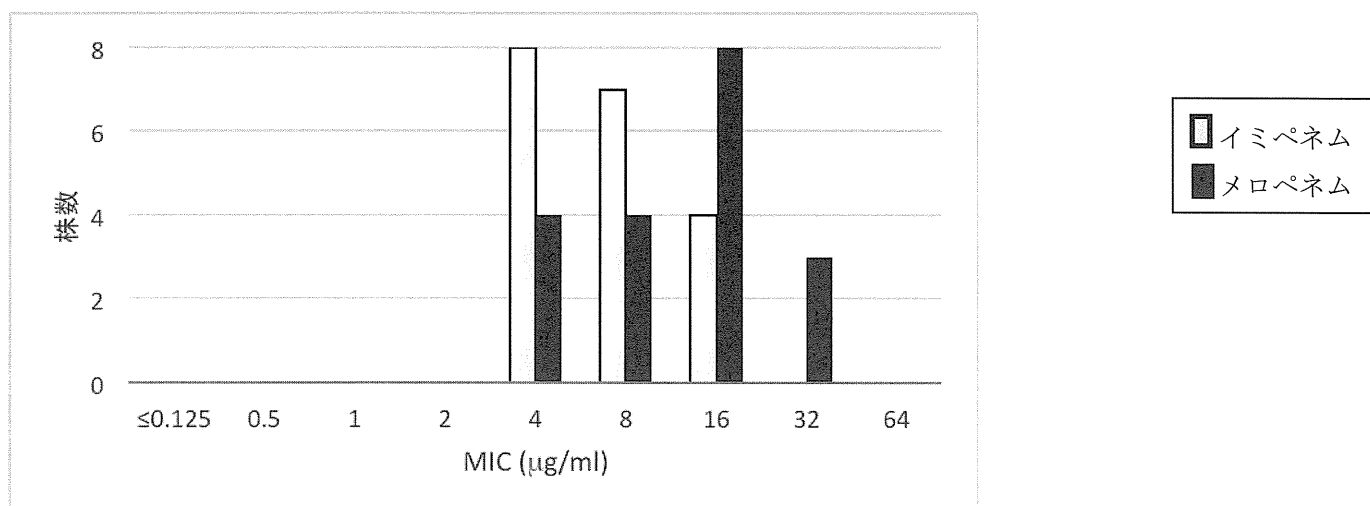


図2 NDM 型カルバペネマーゼ産生株におけるイミペネム、メロペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) 分布 (感染研保有株)



厚生労働科学研究委託費  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
平成 26 年度委託業務成果報告書

委託業務題目： 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

(H26－新興実用化－一般－011)

業務主任者： 国立感染症研究所・副所長 倉根 一郎

業務項目： 非結核性抗酸菌感染症の研究

担当責任者： 国立感染症研究所・免疫部長 阿戸 学

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

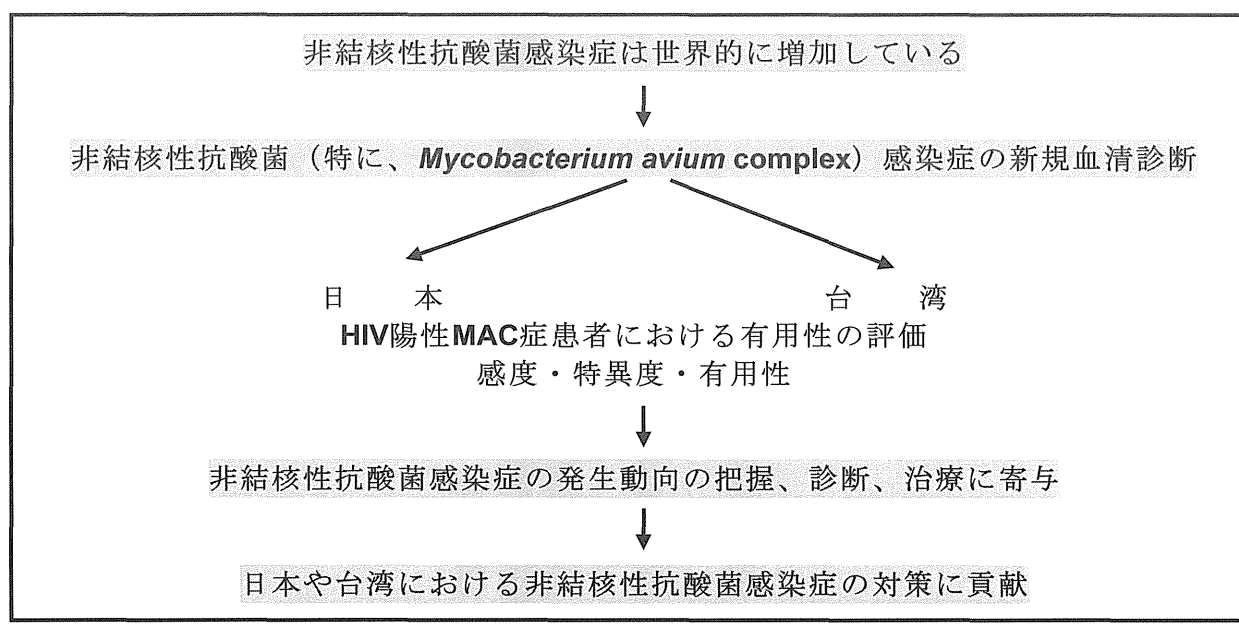
研究協力者： 新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学教授 松本 壮吉

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）の研究開発に関し、台湾-日本（台日）共同研究を推進した。日本で開発された血清診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の有用性が、先行共同研究により台湾でも確認されている。免疫学的診断キットの弱点でもある、免疫不全者における有効性評価を目的として、日本には少なく研究が困難な、HIV 陽性 MAC 症患者に関して、台湾における診断キットの有用性を解析する臨床研究を計画した、現在、国際評価に資するため、ヒトを対象とする医学研究倫理審査を申請中である、承認後、台湾の供試血清を収集、抗体価を測定し、性能を評価する。



## 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。NTM が結核より発生が多い国もあり、日本でも増加傾向にあ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。また、HIV 感染症の合併症としても知られている。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、免疫不全をきたす HIV 感染/AIDS 合併患者で本診断キットの有用性を検証することが課題である。そこで、症例が少ない日本ではなく、比較的多い地域 (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

CD4 陽性細胞数が異なる HIV 陽性抗酸菌感染症 (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、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会 (国立感染症研究所、国立台湾大学医学院附設医院、および台湾行政院衛生署疾病管制局) で申請書を作成、機関で承認を得る。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

CD4 陽性細胞数が異なる HIV 陽性抗酸菌感染症 (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。今後、ヒトを対象とする医学研究倫理審査承認後、登録し、血清を収集する。

## ヒトを対象とする医学研究倫理審査

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、現在申請中である。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部と最終協議し、大筋合意した。2015 年 4 月に渡台し、計画の細部について確認する予定である。

## 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、宿主抗体応答を利用した診断補助法のため、免疫不全をきたす HIV 感染/AIDS 合併患者で本診断キットの有用性を検証することには寛容である。

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。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、台湾においても、日本より感度、特異度は低いものの、有用であったといえる。

今後、台湾で収集した供試血清 (目標: 75 症例程度) を用い、免疫能の指標となる CD4 陽性細胞数によるクラス分けを行い、HIV 感染 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に関する診断感度・特異度・臨床的有用性を評価・検証する。

## 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推進に合意した。
- 日台共同で具体的な研究計画を作成し、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会に申請中である。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishiuchi Y, Tamaru A, Suzuki Y, Kitada S, Maekura R, Tateishi Y, Niki M, Ogura H, Matsumoto S. 2014. Direct detection of Mycobacterium avium in environmental water and scale samples by loop-mediated isothermal amplification. J Water Health. 12:211-9.

2. 学会発表 特になし

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**

**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.



Table 2. Summary of MLVA results of 50 pertussis patients grouped by age

Patient age range	Number of clinical specimen	MLVA result <sup>a</sup>		
		Complete profile	Partial profile	No alleles generated
0 to <1 month	2	1	1	
1 to <2 months	21	11	8	2
2 to <3 months	14	8	5	1
3 to <12 months	8	4	3	1
1 to 4 years	4	2	2	
unknown	1 <sup>b</sup>			1
Total	50	26	19	5

<sup>a</sup> Complete profile, six alleles; partial profile, from one to five alleles.

<sup>b</sup> Patient age was <2 months.

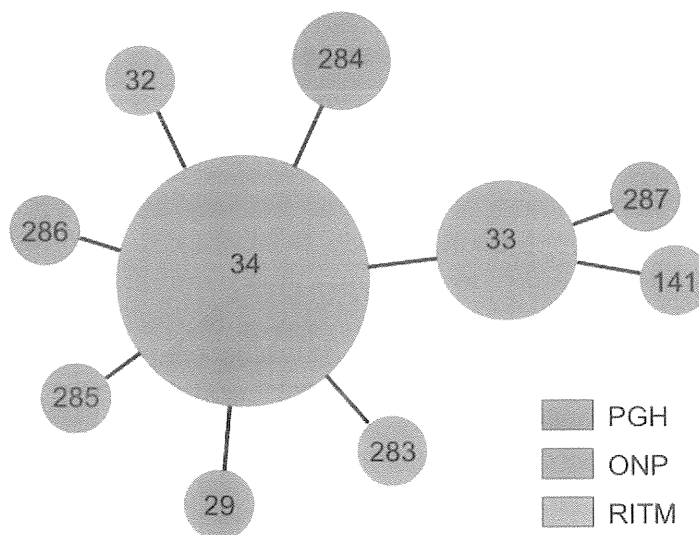


Figure 2. Minimum spanning tree revealing the genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the Philippines during 2012–2014. MLVA types (MTs) were identified from DNA extracts of clinical specimens, collected from 26 patients. Each circle within a tree represents a unique MT, and the number denotes the MT. The sizes of circles are representative of the number of clinical specimens in each group. Lines connecting circles represent single-locus variants. All MTs carried *ptxP1*, *ptxA1*, *prn1*, and *fim3A* alleles. PGH, Philippine General Hospital; ONP, Ospital ng Palawan; RITM, Research Institute for Tropical Medicine.

Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in the Philippines in 2012–2014

担当責任者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

**Objectives:** The present study was designed to determine the genotypes of circulating *Bordetella pertussis* in the Philippines by direct molecular typing of clinical specimens.

**Methods:** Nasopharyngeal swabs (NPSs) were collected from 50 children hospitalized with pertussis in three hospitals during 2012–2014. Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) was performed on the DNA extracts from NPSs. *B. pertussis* virulence-associated allelic genes (*ptxP*, *ptxA*, *prn*, and *fim3*) were also investigated by DNA sequence-based typing.

**Results:** Twenty-six DNA extracts yielded a complete MLVA profile, which were sorted into 10 MLVA types. MLVA type 34 (MT34), rare in other countries, was the predominant strain (50%). Seven MTs (MT29, MT32, MT33, and MT283–286, total 42%) were single-locus variants of MT34, while two (MT141 and MT287, total 8%) were double-locus variants of MT34. All MTs had the combination of virulence-associated allelic genes, *ptxP1-ptxA1-prn1-fim3A*.

**Conclusions:** The *B. pertussis* population in the Philippines comprises genetically related strains. These strains are markedly different from those found in patients from other countries where acellular pertussis vaccines are used. The differences in vaccine types between these other countries and the Philippines, where the whole-cell vaccine is still used, may select for distinct populations of *B. pertussis*.

## 研究協力者

大塚菜緒, 平松征洋, 柴山恵吾(国立感染症研究所・細菌第二部)

Salvacion Rosario L. Galit, Daryl Joy V. Almonia, Lydia T. Sombrero, Rosario Z. Capeding, Socorro P. Lupisan(フィリピン熱帯医学研究所)

古瀬祐気, 齊藤麻理子, 押谷仁(東北大学医学部)

渡邊峰雄(北里大学大学院・感染制御科学府)

Philippine General Hospital (PGH; 26 patients), Ospital ng Palawan (ONP; 17 patients), and the Research Institute for Tropical Medicine (RITM; 7 patients) (Figure 1). Nasopharyngeal swabs (NPSs) were obtained from the patients, and DNA was extracted from the NPSs using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen).

Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) typing was performed on DNA extracted from NPSs. MLVA types (MTs) were assigned using the MLVA typing tool found at <http://www.mlva.net>. Novel MTs were assigned by Dr. H. van der Heide, National Institute for Public Health and the Environment, the Netherlands. To characterize the phylogenetic relationships between the MTs, minimum spanning trees were generated using the FPQuest Software (Bio-Rad). DNA sequence-based typing for *B. pertussis* virulence-associated allelic genes (*ptxP*, *ptxA*, *prn*, and *fim3*) was also performed on DNA extracts that yielded a complete six allele MLVA profile with some modifications. Briefly, PCR cycling conditions were 94°C for 2 min followed by 11 cycles of touchdown PCR (98°C for 10 s, followed by annealing, initially at 65°C for 30 s, and decreasing 1°C/cycle until 55°C, and elongation at 68°C for 45 s) and 25 cycles of standard PCR (98°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 45 s). For *ptxP* and variable region 2 (R2) of *prn*, some DNA extracts that failed to yield DNA sequences were analyzed by nested PCR. PCR primer sets used in this study are listed in Table 1.

(倫理面への配慮)

NPSs were obtained for diagnostic purposes, and were retrospectively and anonymously analyzed for *B. pertussis* genotyping. No patient data beyond classification by age and hospital were stored.

## A. 研究目的

*Bordetella pertussis*, a highly communicable Gram-negative coccobacillus, is the etiological agent of whooping cough (pertussis), a major acute respiratory infection resulting in severe childhood illness and infant death. In the Philippines, pertussis is controlled by the administration of the whole-cell pertussis vaccine (WCV), given as 3 doses at ages of 6, 10, and 14 months. Despite these controls, pertussis infections have sporadically occurred, primarily in unvaccinated children (<6 months of age). The molecular epidemiology of *B. pertussis* populations has been studied in several countries, but no information of the specific strains present in the Philippines has been reported. Molecular typing of the organism can be performed on both bacterial isolates and clinical specimens. We therefore determined the genotypes of the circulating strains of *B. pertussis* in the Philippines by direct molecular typing of clinical specimens.

## B. 研究方法

Between September 2012 and May 2014, 50 children hospitalized with severe respiratory distress (median age, 2 months; range, 0–53 months) were diagnosed with *B. pertussis* infections by PCR targeting IS481. Patients were hospitalized at the

Ethical approval was thus not required.

### C. 研究結果

DNA extracts from NPSs were collected from 50 patients and analyzed by MLVA typing. Twenty-six (52%) samples yielded a complete 6-allele MLVA profile, and the remainder yielded either a partial profile (38%) or a negative MLVA result (10%) (Table 2). The complete MLVA profiles were obtained primarily from patients aged between 1 and <3 months; however, distributions of patient age among the three MLVA groups (complete profiles, partial profiles, no alleles) were not significantly different ( $P = 0.87$ , Fisher's exact test). The MLVA results therefore did not depend on patient age.

Among the 26 DNA extracts that yielded a complete MLVA profile, 10 distinct MLVA types (MTs) were identified, of which 5 were novel (MT283, MT284, MT285, MT286, and MT287). Figure 2 shows a minimum spanning tree that revealed the genetic diversity of the *B. pertussis* population. MT34 was the most prevalent type ( $n = 13$ ) and MT33 was the second most prevalent ( $n = 4$ ). Eight MTs (MT29, MT32, MT141, MT283, and MT284–287) were minor subtypes, appearing only rarely ( $n = 1$  or  $2$ ). All MTs had a combination of *ptxP1-ptxA1-prn1-fim3A* alleles as demonstrated by DNA sequence-based typing. The MT distribution was not statistically different among the three hospitals, PGH, ONP, and RITM ( $P = 0.23$ , Fisher's exact test).

### D. 考察

In the present study, we demonstrated that the *B. pertussis* MT34 strain was the predominant (50%) subtype in the Philippines during 2012–2014. Seven MTs (MT29, MT32, MT33, and MT283–286, total 42%) were single-locus variants of MT34, and two others (MT141 and MT287, total 8%) were double-locus variants of MT34. All MT strains carried the same virulence-associated allelic genes, *ptxP1-ptxA1-prn1-fim3A*. These data suggest that the *B. pertussis* population in the Philippines comprises genetically related strains.

In Australia, Europe, and the US, the *B. pertussis* MT27 strain was the predominant type during the past decade. In Japan, both MT27 and MT186 were the predominant types during 2002–2012, with only one MT34 strain found out of 134 *B. pertussis* isolates tested. The Japanese MT34 strain carried the same virulence-associated genes, *ptxP1-ptxA1-prn1-fim3A*, as the MT34 strain from the Philippines described in this study. MT34 strains have been identified very rarely throughout the world. In Australia, the US, Japan, and most European countries, acellular pertussis vaccines

(ACVs) have been used, whereas a WCV is still used in the Philippines. Thus, the different vaccine types may select for different *B. pertussis* populations.

This study provides a baseline for future studies on the *B. pertussis* population in the Philippines.

### E. 結論

The *B. pertussis* population in the Philippines comprises genetically related strains. These strains are markedly different from those found in patients from other countries where acellular pertussis vaccines are used. The differences in vaccine types between these other countries and the Philippines, where the whole-cell vaccine is still used, may select for distinct populations of *B. pertussis*.

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassidy PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5:e01074, 2014.
- Allahyar Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting *Bordetella pertussis*. *J Med Microbiol*. [Epub ahead of print]
- 蒲地一成. 微生物 ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2):18-21, 2014.

#### 2. 学会発表

- 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfm structure. 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月, 岐阜.
- 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月, 岐阜.

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

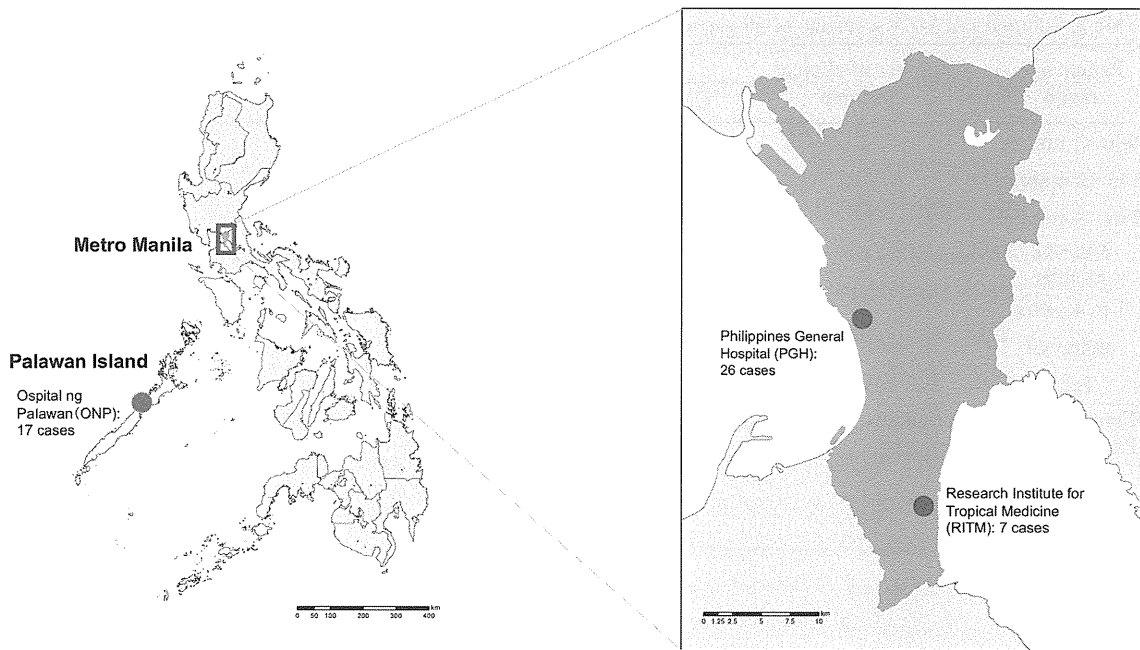


Figure 1. Geographical locations of the three medical institutes (PGH, ONP, and RITM) in the Philippines

Table 1. Primers used for virulence-associated allelic genes

Target gene	Region	Primer name	PCR <sup>§</sup>	Sequence (5' to 3')	Coordinate*	Reference
<i>ptxP</i>		ptxP-PF	1st	AATCGTCCTGCTCAACCGCC	3987811	Mooi et al., Emerg Infect Dis, 2009
		ptxP-PR	1st	GGTATACGGTGGCGGGAGGA	3988365	
		ptxP-innerF	2nd	GCTTCATCGCAGACGAGATCCA	3987924	This study
		ptxP-innerR	2nd	TGTTCTTGCGGTTTGCGAATT	3988275	
<i>ptxA</i>		ptxA-innerF		GACCACGACCACGGAGTATT	3988824	Nakamura et al., Clin Microbiol Infect, 2011
		ptxA-innerR		GTACACGAGAACCATCGCCT	3989021	
<i>prn</i>	R1	prn-innerF		GTCATTGCAGCCGGAAGACC	1098657	Nakamura et al., Clin Microbiol Infect, 2011
		prn-innerR		CCGGTCTCGATGACATTGCC	1099111	
	R2	prnR2-F	1st	GGTCAATACGCTGGCGGGTT	1099512	Miyaji et al., PLoS ONE, 2013
		prnR2-R	1st	CGTGTGACCGCCGCGTT	1099921	
		prnR2-innerF	2nd	TGTTCCGCATGAATGTCTTCGC	1099538	This study
		prnR2-innerR	2nd	ACAACTCCCTGCCCGC	1099894	
<i>fim3</i>	fim3-innerF		CCAGCACCTCAACCATATC	1647738	Nakamura et al., Clin Microbiol Infect, 2011	
	fim3-innerR		GGCTTGCGTGGTTTTGTC	1648055		

\*Coordinates in *Bordetella pertussis* Tohama genome sequence NC\_002929.2

<sup>§</sup> For nested PCR, the order of primer-pairs used is indicated.