定感度以下、もしくはSDSによる変性状態では血清中の抗体に反応しないことを示唆している。

そのため、抗モルモット蛍光抗体を用いた菌体の免疫染色を行う予定である。具体的には病原蛋白を発現しない*S. sonnei*の*invE*欠損株で一般的な細菌の外膜蛋白を吸収する。また、具体的にどの蛋白に対する抗体が出来ているか調べるため、*S. sonnei*のIII型分泌装置遺伝子群、*virG*ならびに*icsP*遺伝子の欠損株で吸収した血清を用いてこれらの外膜蛋白に対する抗体が出来ていることを証明する予定である。これまでの結果から、少なくとも*S. sonnei*では複数の膜蛋白に対する抗体が検出されており、血清型の壁を超えた抗体が産生されている可能性を示している。

E．結論

汎赤痢菌群に効果があるワクチンの候補として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株の効果を判定した。過去に行われた角結膜炎・腸管感染モデルと同様に*hfq*欠損株は乳飲みマウスモデルで、母乳免疫を誘導し血清型が異なる3種類の赤痢菌に対して有意なワクチン効果を示した。また、モルモットの腸管ループモデルでも病原性が減弱していることが示された。ワクチン効果の論理的背景を明らかにするため、赤痢菌外膜蛋白に対する抗体を検出する系を作製した。

F．健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G．研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1．論文発表 なし

2．学会発表

○Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第87回日本細菌学会総会 2014年3月26-28日タワーホール船堀：Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system.

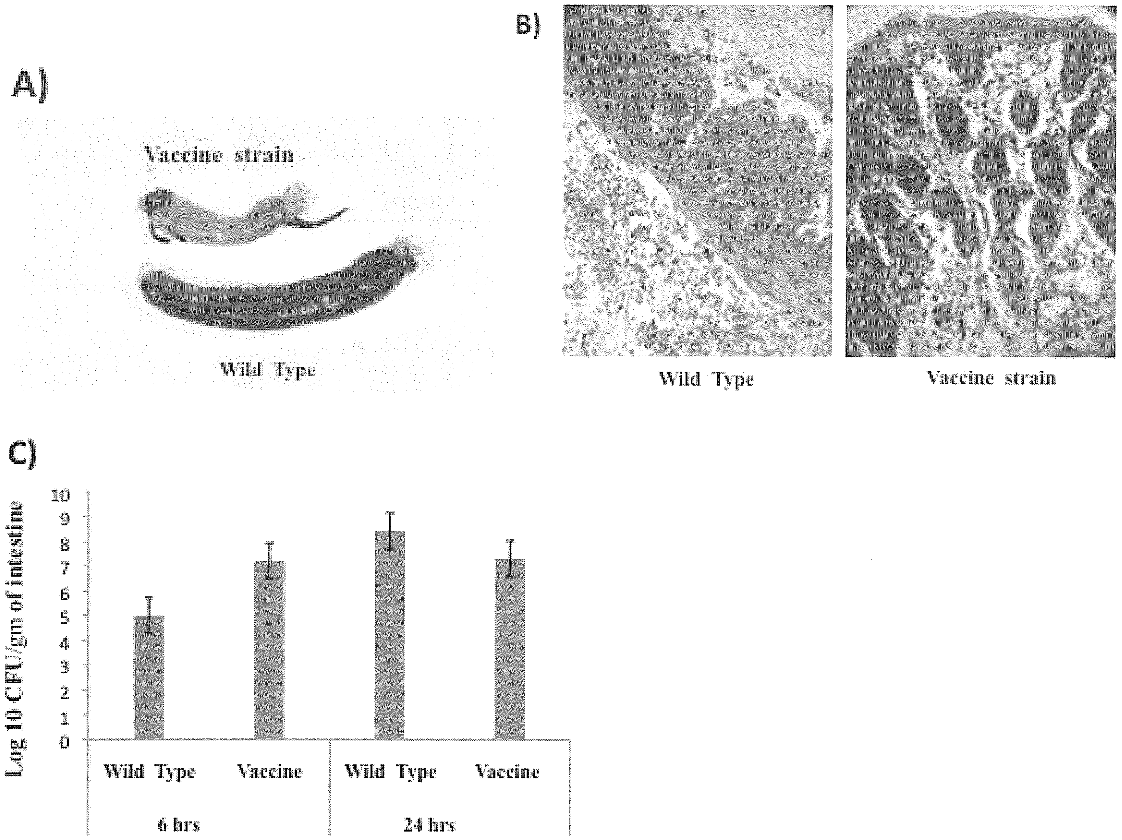
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<参考文献>

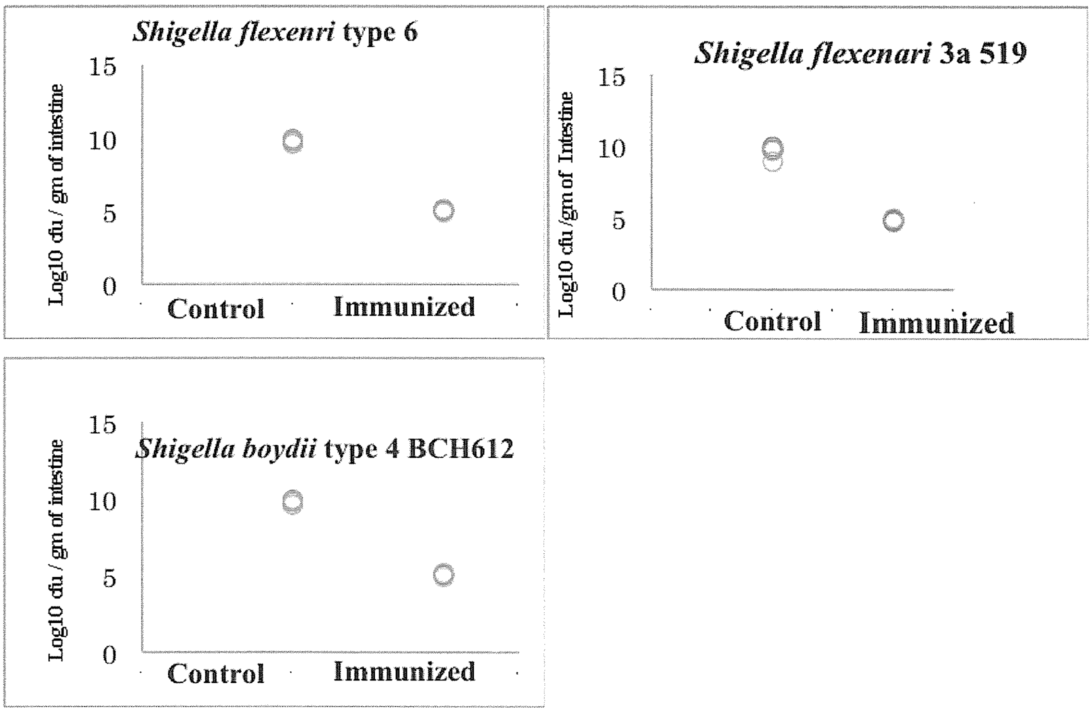
1. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies.* Bull World Health Organ, 1999. 77(8): p. 651-66.
2. Mitobe, J., et al., *Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of invE gene expression in Shigella sonnei.* BMC Microbiol, 2009. 9: p. 110.
3. Barman, S., et al., *Development of a new guinea-pig model of shigellosis.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. 62(3): p. 304-14.

図1



A)
Vaccine strain
Wild Type
B)
Wild Type
Vaccine strain
C)
Log 10 CFU/gm of intestine
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Wild Type
Vaccine
Wild Type
Vaccine
6 hrs
24 hrs

図2



Shigella flexenri type 6
Log10 cfu / gm of intestine
15
10
5
0
Control
Immunized
Shigella flexenari 3a 519
Log10 cfu /gm of Intestine
15
10
5
0
Control
Immunized
Shigella boydii type 4 BCH612
Log10 cfu / gm of intestine
15
10
5
0
Control
Immunized

表1

Challenge strain	Challenge dose	Experimental group	Experimental neonatal	% of survival after first challenge	Protective efficacy (%) a
S. flexenari 6	$2\pm1\times10^7$/ ml	Control	5	0(0/5)	80
		Immunized	5	80(4/5)	
S. flexenari 3a	$3\pm1\times10^7$/ ml	Control	5	20 (1/5)	75
		Immunized	5	80 (4/5)	
S. boydii type 4	$2\pm1\times10^7$/ ml	Control	5	20 (1/5)	75
		Immunized	5	80 (4/5)	

図3

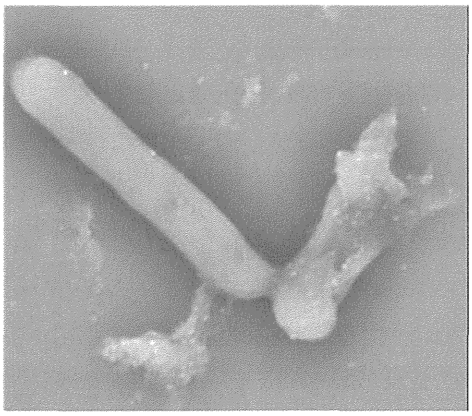
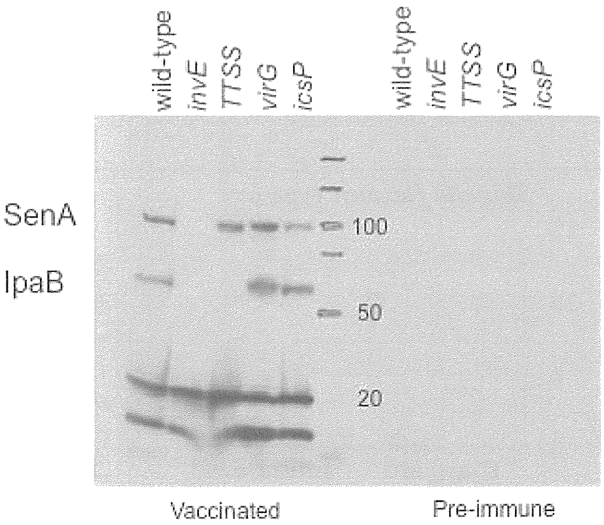


図4



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(業務項目)

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

腸管系寄生虫症の解析

担当責任者　野崎　智義　国立感染症研究所　部長

研究要旨　ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究はインドNICEDとの共同研究を通じて、日印の国際共同研究の基盤を確立することを目的に研究を展開している。本年度はインドで流行する赤痢アメーバの集団としての遺伝的多様性を理解することを目的に、3種類のタンパク質コード遺伝子と3種類の非コード領域(イントロン及び遺伝子間領域)の遺伝子配列解析を通じた赤痢アメーバの遺伝的多型解析を行った。

A. 研究目的

本研究は主要な死亡原因のひとつである下痢症を対象とした研究を行う。消化管感染症は全死亡の約4%(216万人)を占める重要な感染症であり、HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める(WHO Report, 2009)。消化管感染症のうち原生生物による感染症として重要なのは、赤痢アメーバ症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、ブラストシスチス症などであり、これらが原虫が原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約1%に感染し、年間10万人の死者を生む重要な原虫である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を与え、高いDALYの原因となる。

我々は、インドコルカタにあるNational Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED)、Indian Council of Medical Research (ICMR)と腸管原虫症に関する共同研究を行った。その目的は、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強化し、情報ネットワークを構築することであった。更に、人的交流と人材育成を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築することを目的とした。初年度はインド国内の赤痢アメーバ症例、特に便検体及び肝膿瘍穿刺液を用いて、3種類のタンパク質コード遺伝子と3種類の非コード領域(イントロン及び遺伝子間領域)の遺伝子配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 臨床検体

51例の赤痢アメーバ検体を解析に用いた。内訳は26例の下痢症例、20例のアメーバ肝膿瘍例、5の無症状症例であった。

2. 遺伝子型別解析

糞便または肝膿瘍穿刺液から顕微鏡法、抗原捕捉法(E. histolytica II kit, Techlab)で陽性と診断された検体に関して、DNA stool mini kitでDNAを抽出した。すべての検体に関してcoding領域としてはlysine glutamate rich protein 1 (kerp1), lysine glutamate rich protein 2 (kerp2), amoebapore C (apc)の3

種の座位、non-coding 領域に関しては Intron (AY956435)、遺伝子間領域では AY956439 の 2 箇所の領域を用いて PCR による増幅と直接配列解析を行った。方法は既出の方法（Bahattacharya et al., 43, 4815-9, J Clin Microbiol 2005）に記述された方法を用いた。

2.　配列・クラスター解析

遺伝子配列は Clustal W、MEGA によりアラインし、SeaView Graphical Interface により可視化した後、Epi-Info で評価した。

（倫理面への配慮）本研究に関わる病原体の取扱に関する許可、ヒト臨床検体の取り扱いに関する許可は当該研究機関にて得られている。

C．研究結果

1.　タンパク質コード領域の多様性

51 種の臨床検体から kerp1, kerp2, apc に関してそれぞれ 1, 18, 2 種類の single nucleotide polymorphism (SNP)が検出された。それぞれの SNPs の位置、アミノ酸の置換の有無を表 1, 2 に示した。

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitution
kerp1 (XM_648537)	K1	329A/G	110 N/S
kerp2 (XM_648547)	Kp1	155A/G	52 K/R
	Kp2	204A/C	X
	Kp3	500A/G	167 E/G
	Kp4	549 A/T	183 K/N
	Kp5	168 T/G	56 D/E
	Kp6	393A/G	X
	Kp7	137 C/T	46 S/F
	Kp8	174A/C	X
	Kp9	202A/C	68 T/P
	Kp10	277A/C	93 T/P
	Kp11	308 A/T	103 Y/F
	Kp12	83 A/G	28 K/R
	Kp13	356 T/C	119 F/S

表 1　coding region の SNPs

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitutions
kerp2 (XM_648547)	Kp14	489A/G	X
	Kp15	543A/G	183 K/T
	Kp16	88 A/C	30 T/P
	Kp17	160G/C	54 A/P
	Kp18	303A/C	101 K/N
apc (X76903)	A1	296 T/C	X
	A2	640 T/C	X

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitutions
Intron (AY956435)	Itr1	283 T/G	------
	Itr2	298 A/T	------
	Itr3	303G/A	------
Intergenic region (AY956439)	Igc1	328G/A	------
	Igc2	613 G/T	------

表 3 non-coding region の SNPs

3.　特定の病型にのみ見られる SNPs

赤痢アメーバ症はその臨床症状に従い、赤痢・腸炎型(D)・肝膿瘍型(LA)・無症状(AS)とに分けられる。図 4 にそれぞれ D 型・LA 型・AS 型だけに見られる SNPs、並びに、LA と AS 型に共通して見られる SNPs、更にすべての病型において見られる SNPs とが存在した。これらの SNPs をまとめた(表 4)。

Disease outcome	Target loci				
	kerp1 (XM_648537)	*kerp2* (XM_648547)	*apc* (X76903)	Intron (AY956435)	Intergenic region (AY956439)
Sole D		Kp12 (83 A/G)	A1 (296 T/C)		
		Kp13 (356 T/C)			
		Kp14 (489 A/G)			
		Kp15 (547 A/G)			
Sole LA		Kp5 (168 T/G)			Igc1 (328 G/A)
Sole AS		Kp6 (393 A/G)			
		Kp8 (174 A/C)			
		Kp9 (202 A/C)			
		Kp10 (277 A/C)			
		Kp11 (308 A/T)			
		Kp16 (88 A/C)			
		Kp17 (160 G/C)			
		Kp18 (303 A/C)			
LA+AS	K1(329A/G)	Kp1 (155 A/G)		Itr2 (298 A/T)	
		Kp3 (500 A/G)		Itr3 (303 G/A)	
		Kp4 (549 A/T)			
		Kp2 (204 A/C)			
		Kp7 (137 C/T)			
Common			A2 (640 T/C)	Itr1 (283 T/G)	Igc2 (613 G/T)

表 4 各病型に特異的に見られた SNPs と横断して見られた SNPs

D．考察及び結論

我々は前研究班より、インドのNICEDとの研究連携を深めると同時に、赤痢アメーバにおける腸管原虫症全般の分子疫学的情報を収集することを目的として共同研究を進めている。赤痢アメーバ症の分子疫学研究に関しては、これまでタンパク質をコードしない高度に多型を示す領域tRNA近傍短反復配列(t-RNA-linked short tandem repeat、以下tRNA-STR)の5種の座位を標的として、インドから臨床検体から得られた赤痢アメーバの遺伝的な多様性に関して、解析を行ってきた。この結果、インドにおける赤痢アメーバの臨床株の遺伝的多様性は、野崎らが日本のMSM(男性同性愛者)で示した赤痢アメーバ株において示したと同様に、極めて高いことが確認された。同時にtRNA-STR遺伝子座の特定の遺伝子型が腸炎・肝膿瘍・無症候等の病型と相関していることが示された。この研究成果の問題点は、tRNA-STRがタンパク質をコードする領域になく、その多型と表現型（臨床像）との相関を結びつける病原性や免疫などに関与しうるタンパク質分子の相違に原因を帰結できなかった点にあった。

そこで本研究では、他の研究で示された病原性に関与することが示されているタンパク質遺伝子の内で細胞接着や細胞穿孔に関与することのsられているkerp1, kerp2, apcを用いた解析を行った訳である。その結果、特にkerp2に際だったヌクレオチドレベルでの多型性が存在することが、世界で初めて明らかとなった。それぞれのSNPsが病型と相関するかを今後統計解析により検証するとともに、kerp2のSNPsの変異に伴うタンパク質の機能の転換の観点から、生化学的・細胞生物学的観点から検証する予定である。以上の成果は、同時にNICEDとの連携を更に強化することに貢献をした。

E．健康危険情報

該当せず

F．研究発表

1．論文発表

(i) Mukherjee, A. K., Chowdhury, P., Bhattacharya, M. K., Rajendran, K., Nozaki, T., and Ganguly. S. Association between *Giardia duodenalis* and co-infection with other diarrhea-causing pathogens in India. BioMed Res Int, Volume 2014, Article ID 786480, http://dx.doi.org/10.1155/2014/786480.

Anwar, S., Dikhit, M. R., Singh, K. P., Kar, R. K., Zaidi, A., Sahoo, G. C., Roy, A. K., Nozaki, T., Das, P., and Ali, V. Interaction between Nbp35 and Cfd1 proteins of cytosolic Fe-S cluster assembly reveals a stable complex formation in *Entamoeba histolytica*. PLoS One 9, e108971, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0108971.

2．学会発表

なし

G．知的所有権の出願・登録状況

1．特許取得

該当せず。

2．実用新案登録

該当せず

プロジェクト４：ベトナム

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（業務項目）

「腸内細菌の molecular typing に関する研究－ベトナム」

担当責任者　泉谷　秀昌　国立感染症研究所　細菌第一部

研究要旨　　本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系腸管細菌性感染症を対象に遺伝子をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。本年度はベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）の腸内細菌部門と共同してコレラ菌、赤痢菌、サルモネラなどの解析を行った。

A. 研究目的

コレラ菌、赤痢菌、サルモネラといった、食水系腸管感染症起因菌を中心に研究を行う。当該感染症の流行地域であるアジア各国において、流行菌種あるいは菌型を把握するための分子タイピング法の検討を行う。起因菌の検出および同定試験を補助する遺伝子検査法の検討を行う。さらに必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

使用する分子タイピング法としては、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）、multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)および multilocus sequence typing (MLST) などであり、対象菌種に応じて適宜活用する。得られた結果は感染研細菌第一部の in house データベースと比較照合しデンドログラム、minimum spanning tree (MST) などを用いて解析する。

LAMP 法は市販の増幅キットおよび蛍光・目視検出試薬を用いた。

C. 研究結果および考察

コレラはコレラ菌（コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* O1/O139）によって発生する経口感染症である。上下水道等、いわゆるインフラ整備が不十分な途上国では、コレラの流行は公衆衛生上の脅威である。本研究のカウンターパートであるベトナムでは、しばらくの休眠期間の後、2007 年から 2010 年にかけてコレラの流行が発生した。コレラの流行は当該国において非常な脅威であり、当該国の感染症対策において上位に位置づけられている。また、ベトナムは現在、我が国との交易も盛んな国であることから、当該国でのコレラの流行はわが国にとってもリスクとなりえる。こうした背景から、本研究においてはベトナムにおけるコレラ流行の把握と制御に向けた共同研究を遂行している。

具体的にはベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）の腸内細菌部門・コレ

ラセンターと共同して、コレラ菌のサーベイランスシステムの構築を検討している。

当該国では2010年以後、コレラの流行は沈静化しているが、コレラ菌の検出法の普及は当該国の主要命題の一つである。そこで、本年度はLAMP法の導入について検討した。LAMP法は65℃前後の一定温度でDNAを増幅する技術であり、PCRと異なりサーマルサイクラーを必要としない。そのため、試験設備の脆弱な地方での医療センターにおいても実施可能である。既報のプライマー情報(BMC Microbiol. 2008 Jun 12;8:94.)に基づいて当該カウンターパートのラボで実施可能であることを確認した。

なお、本法はコレラ毒素遺伝子(*ctx*)を標的としており、純培養であれば1コピー程度から検出可能である(図1)。現在、*V. cholerae*の環境調査を実施しており、その検出法はMPN-PCRによる定量を行っている。LAMP法を組み合わせて最初に定性試験を行い、陽性のものについてMPN-PCR法にて定量を行う系を計画している。そのために、*ctx*以外の遺伝子を標的とするLAMP法の開発検討を考案中である。

2014年11月にディエンビエン省にて集団事例が発生した。詳細は不明だが、患者数は10名前後と見られ、死亡者が1名発生した。本事例関連者から赤痢菌およびサルモネラが検出された。本件については、当所赤痢菌が患者および食品から3株検出されたが、遺伝子検査から2株は赤痢菌ではないことが判明した。1株について、MLVAを実施し*S. flexneri* 2a/2bを含むクラスターに分類されることが判明した(図2)。また、サルモネラは無症状者から2株分離された。遺伝子検査からこれらはいずれも*Salmonella* I 4:-で血清型Typhimuriumの単相菌であることが推測された。当該菌のMLSTの結果は両株ともST34であり、MLVAにおいても一致し、単相菌が含まれるクラスターに分類された(図3)。本事例は当該カウンターパートのアウトブレーク発生時の対応について、検討の余地があることを示唆するものであった。また、遺伝子検査により、菌種同定、血清型推定、菌株間の関連性を示すなど、今後の体制構築に関して貴重な情報となった。

D. 結論

LAMP法の有用性が示された。今後*V. cholerae*の検出法を中心にLAMP法の拡充を図っていき、環境調査および患者調査への利用を目指す。コレラ菌以外の腸管細菌感染症起因菌について、アウトブレーク対応を主眼においた試験研究体制の構築について検討していく。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

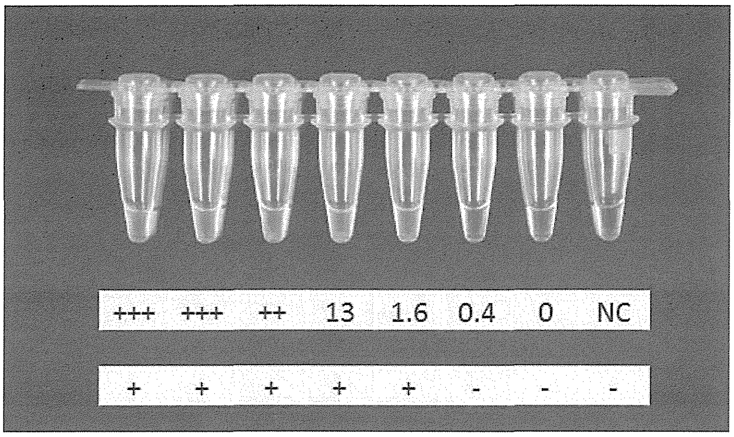


図１．ctx-LAMP 法の実施例。上段は各チューブに接種した菌量を表す。下段は試験の判定結果；陰性（－）、陽性（＋）を表す。

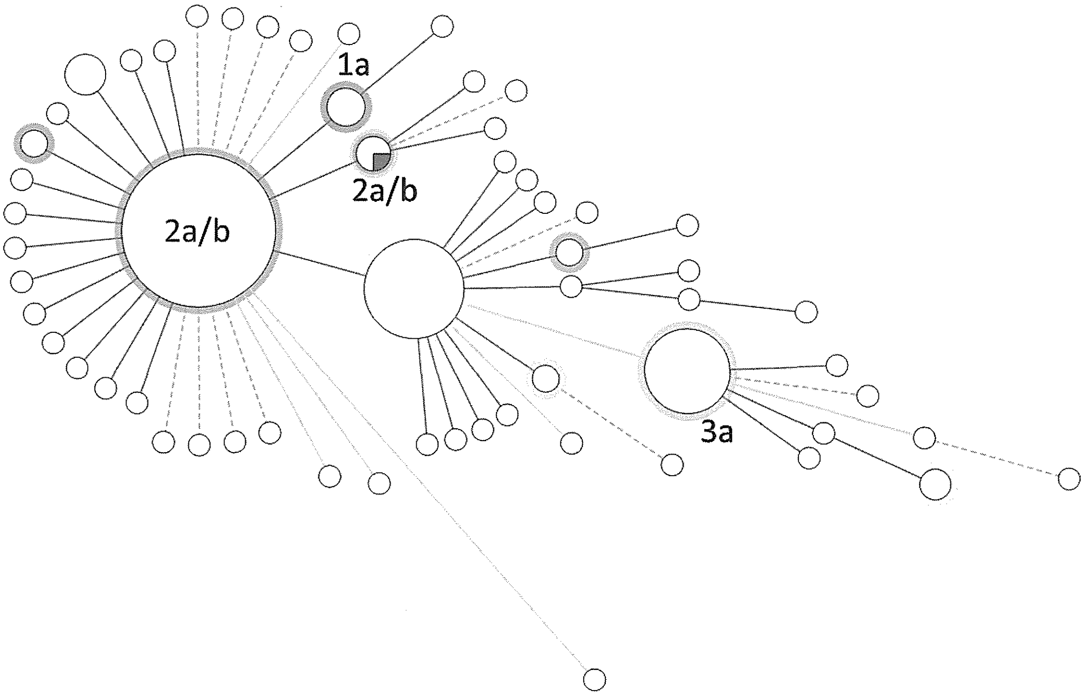


図２．赤痢菌（*S. flexneri*）MLVA24。2014 年ベトナム分離株を赤で示す。double locus variant を１つのクラスターにまとめてある。”2a/b” などはクラスターで大勢を占める血清型を表す。

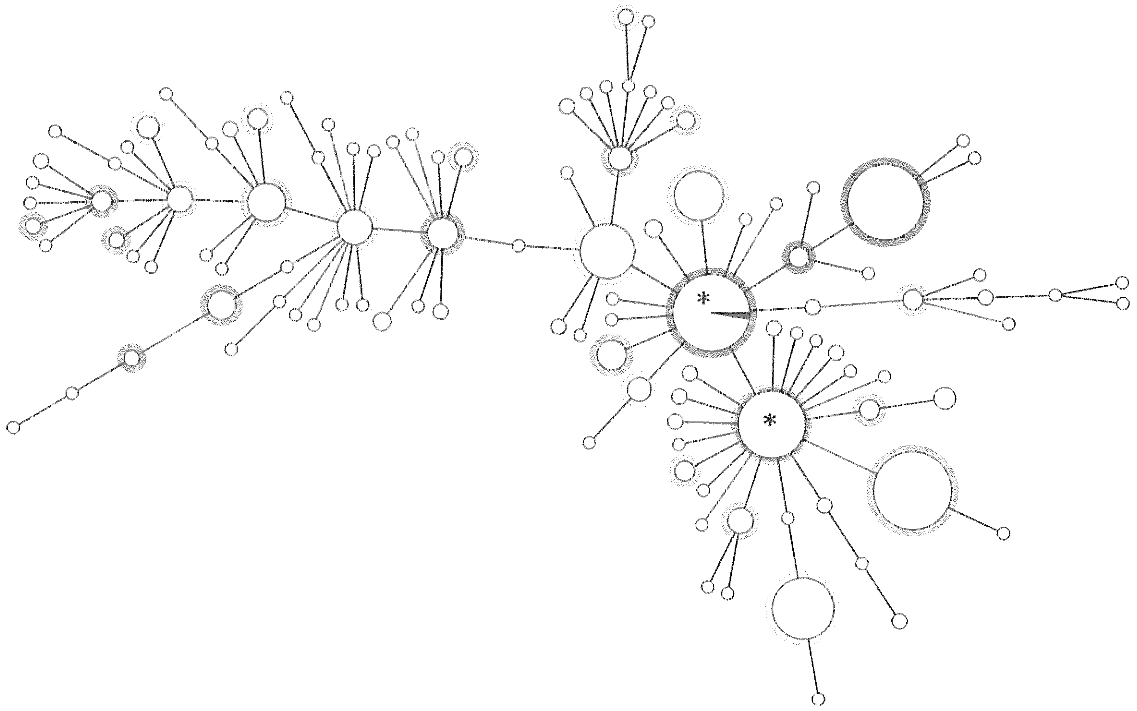


図 3. サルモネラ MLVA6。2014 年ベトナム分離株を赤で示す。single locus variant を 1 つのクラスターにまとめてある。*、主要な *S.* Ⅰ 4:i:-を含むクラスター。

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レプトスピラ症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
Collaborative study on leptospirosis with Vietnam NIHE

担当責任者　小泉信夫　国立感染症研究所　細菌第一部　主任研究官
Nobuo Koizumi: Senior Researcher, Department of Bacteriology I, NIID
Hoang Thi Thu Ha: Chief, Bacteriology Department, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam

研究要旨

1. ベトナム・ハノイのレプトスピラ症の現状を明らかにするために，ベトナム国立衛生疫学研究所と疫学調査に関する研究打ち合わせを行うとともに，全菌体 IgG ELISA および LigA-IgG ELISA の技術移転を行った．
2. ゲノムワイドにレプトスピラの病原因子を探索するために，トランスポゾンを利用したランダム挿入変異法を *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株で確立した．またレプトスピラの溶血活性を測定するアッセイ法を構築し，溶血活性を指標としてトランスポゾンランダム変異株のスクリーニングを行った．

1. To reveal the current status of leptospirosis in Hanoi, Vietnam, seroprevalence of healthy people in Hanoi was planned to perform. For that, a technical transfer of whole cell-based and LigA-based IgG ELISA assays to Bacteriology Department, NIHE was conducted.
2. To perform a genome-wide screening of virulence factors in *Leptospira interrogans*, transposon-mediated random mutagenesis in *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID was established. An assay for determining hemolytic activity of UP-MMC-NIID was constructed and then, *Leptospira* mutants in hemolytic activity were screened.

研究目的

レプトスピラ症は，病原性レプトスピラ（*Leptospira* spp.）の感染によって起こる人獣共通感染症である．本症はアジアの多くの国で流行しているが，ベトナムでは南部メコンデルタ地域での患者報告があるものの，国レベルでの実態は明らかになっていない．これまで我々は，ベトナム北部・タインホア地域で熱源不明の発熱患者および一般健常人の血清疫学を行い，発熱患者の 20%からレプトスピラ特異的 IgM を，また健常人の 49%からレプトスピラ特異的 IgG を検出し，同地域の農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延を明らかにした．本研究では，ハノイにおけるレプトスピラ症の実態を明らかにするため

に，まずは同地域の健常人の血清疫学を行うこととし，そのための検査法の技術移転をベトナム国立衛生疫学研究所（NIHE）に行った．

レプトスピラでは特定の遺伝子を選択的に破壊・相補する遺伝学的ツールが欠如しており，分子レベルでの病原性メカニズムの解明が行えなかった．近年 *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により，遺伝子をランダムに欠損させたレプトスピラ変異体の作製を行うことが可能となった [1]．しかしこの方法の形質転換効率は非常に低いため，本研究では変異体作製法の改変を行うとともに，レプトスピラの溶血活性を測定するアッセイ系を構築し，ランダム変異法によるレプトスピラの溶血活性変異体のスクリーニングを行った．

研究方法

1．レプトスピラ全菌体および LigA-IgG ELISA

全菌体抗原プレートおよび LigA 抗原の調整は文献 2 および 3 の通り行った．ヒト血清中の IgG 測定は文献 3 の通り行った．

2. トランスポゾンを利用したランダム挿入変異法

変異体の作製には *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株を使用した．*mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法は文献 1 の方法を改変して行った．レプトスピラと大腸菌の接合のため各溶液を混合し，遠心分離（4000×*g*, 15 分間）を行い菌を沈殿させ，上清を 600 µl 残して除去した．菌を再懸濁後，アスピレーターを用いてフィルター上に菌を濃縮した．接合後のレプトスピラ培養のための EMJH 寒天培地には 1%の Noble agar (Difco) を使用した．また菌のプレーティングには Bac'n roll beads（ニッポンジーン）を使用した．

3．溶血試験

UP-MMC-NIID 株および非病原性レプトスピラ *L. biflexa* serovar Patoc Patoc I 株の溶血活性を以下の通り測定した．各株を EMJH 培地で培養し，420 nm の吸光度が 0.2～0.3 となった培養液 1.6 ml（4.8×10^8 細胞）を 4000×*g* で 15 分間遠心分離し，沈渣を 1.6 ml の PBS で懸濁した．懸濁液を再び 4000×*g* で 15 分間遠心分離を行い，沈渣を PBS 70 µl に懸濁した．ウシ赤血球溶液は，ウシ血液 50 ml を遠心分離（800×*g*, 10 分間）後，上清を捨て沈渣（赤血球）を PBS 40 ml で 4 回洗浄した．最終遠心後，沈渣と等量になるまで上清を捨て，これを再懸濁してウシ赤血球溶液とした．120 mM NaCl を含む EMJH 培地でウシ赤血球溶液を終濃度 10%となるように調整し，これを RBC 溶液とした．RBC 溶液 70 µl とレプトスピラ懸濁液 70 µl を 1.5 ml マイクロチューブに加え，1000×*g* で 5 分遠心分離をした後 30℃で培養した．赤血球溶液 7 µl に水 133 µl を加えて赤血球を完全に溶血したものを陽性コントロール (PC)，RBC 溶液 70 µl に PBS 70 µl を加えたものを陰性コントロール (NC) とした．培養１８時間後に 1000×*g* で 5 分間遠心分離を行い，上清 70 µl を回収して 540 nm の吸光度を測定した．溶血活性は以下のように求めた．

$$\text{溶血活性} = \frac{(\text{レプトスピラ懸濁液}+\text{RBC溶液の540 nmの吸光度}) - (\text{NCの540 nmの吸光度})}{(\text{PCの540 nmの吸光度}) - (\text{NCの540 nmの吸光度})} \times 100$$

また UP-MMC-NIID 培養液 1.6 ml を 16900×*g*, 3 分間の遠心分離を 2 回行い，上清を孔径 0.2 µm フィルター (Merk Millipore) に通してレプトスピラを完全に除去した．この培養上清 7.5 µl, 15 µl, 30 µl（それぞれ UP-MMC-NIID 2.3×10^6 細胞, 4.5×10^6 細胞, 9.0×10^6 細胞の培養液量に相当）を用いて RBC 溶液を調整し，上記の通り溶血活性を測定した．

4. レプトスピラ変異体の溶血試験

レプトスピラ変異体の各コロニーを，25 μl/ml カナマイシン，100 mg/ml 5 フルオロウラシルを含む EMJH 培地 500 μl で 2 回植え継ぎ，5〜7 日間培養したものを実験に使用した．培養は 96 Well Masterblock (grenier bio-one) で行い，上記 3 の通り PBS で洗浄を行い，RBC 溶液 70 μl を加え 12 時間培養した後，415 nm の吸光度を測定し溶血活性を求めた．

研究結果および考察

1. ベトナム・ハノイにおけるレプトスピラ症疫学研究

ベトナムでは，南部メコンデルタ地帯でレプトスピラ症の蔓延が報告されているが，北部におけるレプトスピラ症の発生実態はほとんど明らかになっていない．これまで我々は，ベトナム北部・タインホア地域で熱源不明の発熱患者および一般健常人の血清疫学を行い，発熱患者の 20%からレプトスピラ特異的 IgM を，また健常人の 49%からレプトスピラ特異的 IgG を検出し，同地域の農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延を明らかにした．本研究では，ハノイにおけるレプトスピラ症の実態を明らかにすることを目的とした．ベトナム NIHE 所長および担当責任者である Dr Hoang との話し合いの結果，まずは同地域の健常人の血清疫学調査を行うこととした．10 月に NIHE を訪問し，血清疫学調査に必要な検査法である全菌体 IgG ELISA および LigA-IgG ELISA の技術移転を行った．今後これらの診断法を用いてハノイ地域の健常者のレプトスピラ特異的 IgG の検出を行う．また上述のタインホア地域での調査は市販のキットを使用したが，本研究では自作の ELISA と市販品との比較を行う．健常者を対象とした本調査でレプトスピラ症の発生実態を明らかにし，今後は患者調査につなげていく．

2. トランスポゾンを利用した病原性レプトスピラのランダム挿入変異体の作製

レプトスピラでは特定の遺伝子を選択的に破壊・相補する遺伝学的ツールが欠如しており，分子レベルでの病原性メカニズムの解明が行えなかった．近年 *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により，遺伝子をランダムに欠損させたレプトスピラ変異体の作製を行うことが可能となった [1]．しかしこの方法の形質転換効率は非常に低く，ゲノムワイドな解析に用いることはできない．また Wuthiekanun らは，平板培地上で病原性レプトスピラのコロニー形成率を向上する培養条件を報告した．本研究では上記 2 報を参考に *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株で *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法を構築した．

文献 1 ではレプトスピラと大腸菌培養混合液をそのままフィルター吸着に用いたが，混合液を遠心濃縮することにより操作時間の短縮とコロニー形成率の向上がみられた．また平板培地の寒天を Bacto agar から Noble agar に変更し，Bac'n roll beads を用いて平板培地にプレーティングすることで得られるコロニー数が増加した．これらを組み合わせることにより文献 1 では $1/8.5\times10^{-8}$ であった変異体取得効率が，$1/1.6\times10^{-6}$ に改善した．一方，Wuthiekanun らは平板培地へのウサギ血清の添加や 5% CO2 下で初期培養することによりコロニー形成の向上がみられることを報告したが，本研究ではこれらの効果はみられなかった．使用した菌株の違いあるいは大腸菌存在下での培養のため，本研究では効果がみられなかったのかもしれない．

3. レプトスピラ溶血活性の測定

細菌の溶血活性の測定には通常血液寒天培地が用いられる．しかしながら，レプトスピラは寒天培地中にコロニーを形成し，またコロニーを形成するまでに 10 日以上を要するため，血液寒天培地を用いて溶血活性を測定

することができなかった．そこで上記方法 3 の液体中での溶血活性測定法を構築し，病原性 UP-MMC-NIID および非病原性 Patoc I の溶血活性を調査した．その結果，本測定系で非病原性 Patoc I でも約 20%の溶血活性がみられたものの，病原性 UP-MMC-NIID は赤血球を完全に溶血した（図 1A）．UP-MMC-NIID の溶血活性の経時変化を調べた結果，培養 1 時間後から溶血活性がみられ，3 時間でほぼ完全に赤血球を溶血することが明らかとなった（図 1B）．更に，UP-MMC-NIID の溶血活性が菌の分泌物に由来するかを明らかにするため，培養上清の溶血活性を調査した．その結果，培養上清の量に依存して溶血活性がみられた（図 1C）．一方，陽性コントロールに用いた菌数を含む培養液量に相当する培養上清 30 μl でも，菌懸濁液の約 70%の溶血活性しかみられなかった（図 1C）．しかしながら，非病原性株でも 20%の溶血活性がみられることから，病原性レプトスピラの溶血活性の本体は菌からの分泌産物であると考えられた．

この測定系を用いて現在までにレプトスピラトランスポゾン挿入変異体 960 クローンのスクリーニングを行ったが，溶血活性が失われた変異体を得ることはできなかった．今後，実験条件の検討を行いつつスクリーニングを継続していく．

1. Slamti L & Picardeau M. Methods Mol Biol. 859:169, 2012.
2. WHO. Human leptospirosis. 2003.
3. Koizumi N & Watanabe H. Vaccine. 22:1545, 2004.
4. Wuthiekanun V et al. Antimicrob Agents Chemother. 57:297, 2013.

論文発表

1. Koizumi N, Mizutani Muto M, Izumiya H, Suzuki M, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and clinical characterization of *Leptospira interrogans* canine isolates. J Med Microbiol. in press
2. 小泉信夫，大西真．レプトスピラ症．月刊公衆衛生情報．44: 22-23, 2014.
3. 小泉信夫，大西真．レプトスピラ症．感染症内科．2: 159-164, 2014.

学会発表

1. 水谷麻紀，小泉信夫，泉谷秀昌，川原一芳，大西真．MLVA genotyping and clinical characterization of *Leptospira interrogans* canine isolates. 第 88 回日本細菌学会総会，岐阜市，2015 年 3 月．

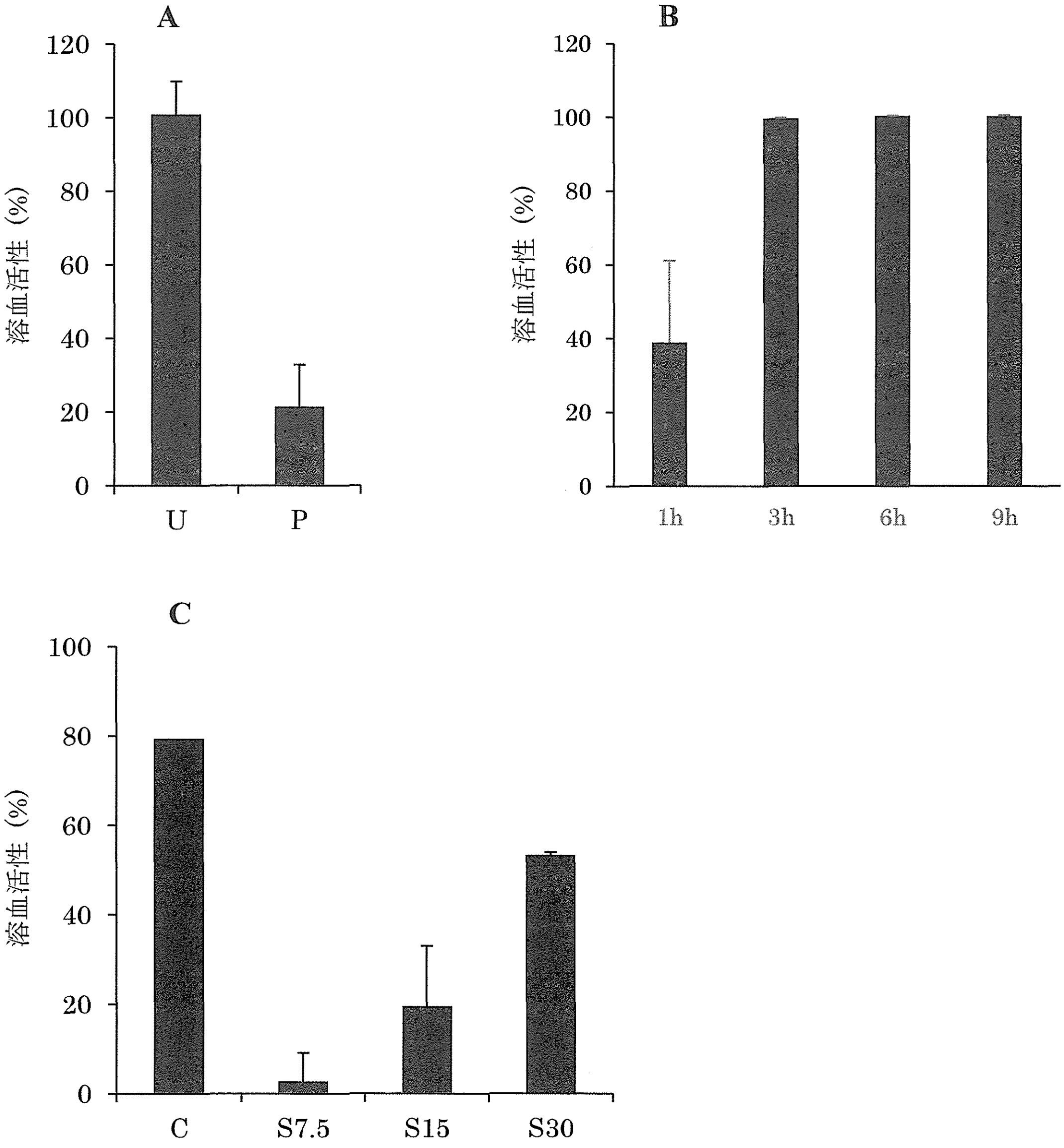


図 1. レプトスピラ溶血活性の測定. A: UP-MMC-NIID (U)および Patoc I (P) 4.8×10⁸細胞の溶血活性（18 時間）. B: UP-MMC-NIID の溶血活性の経時的変化. C: UP-MMC-NIID 培養上清の培養の溶血活性（18 時間）. C, UP-MMC-NIID 4.8×10⁸細胞; S7.5, 培養上清 7.5 μl; S15; 培養上清 15 μl; S30, 培養上清 30 μl. 溶血活性は以下の式で求めた.

$$\text{溶血活性(\%)} = \frac{\text{（PBS 溶液+RBC 溶液の 540 nm の吸光度）} - \text{（NC の 540 nm の吸光度）}}{\text{（PC の 540 nm 吸光度）} - \text{（NC の 540 nm の吸光度）}} \times 100$$

厚生労働科学研究費委託費
平成26年度　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
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

Epidemiology and molecular characteristics of the hand, foot, and mouth disease in the North of Vietnam
北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

担当責任者： 清水博之 国立感染症研究所　ウイルス第二部
研究分担者： Nguyen Thi Hien Thanh National Institute of Hygiene and Epidemiology
研究協力者： Tran Thi Nguyan Hoa National Institute of Hygiene and Epidemiology
研究協力者： 片岡周子 国立感染症研究所　ウイルス第二部
研究協力者： 中村朋史 国立感染症研究所　ウイルス第二部

研究要旨
ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス71(EV71)感染症の流行が報告されている。2011-2012年には、ベトナム全土で、死亡例を含む多くの重症例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。本研究では、主として、2011年と2012年の北部ベトナムにおける手足口病流行について、手足口病患者検体と疫学情報を用いてEV71の分子疫学解析を行った。
エンテロウイルス陽性症例の約半数からEV71が検出され、その他のエンテロウイルスの中ではコクサッキーウイルスA6型(CVA6)およびクサッキーウイルスA16型(CVA16)が比較的多く検出された。2011～2012年のEV71株の分子疫学的解析を行ったところ、EV71サブジェノグループはB5、C4、C5であり、主な流行株はC4であった。2012年にはB5の検出率が上昇した。重症EV71感染症の流行が断続的に発生しているベトナムでは、手足口病関連エンテロウイルスの病原体サーベイランスは引き続き重要であり、EV71遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も解析が必要である。

A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちのひとつである。手足口病の主要な原因ウイルスは、従来、コクサッキーウイルスA16型(CVA16)、および、エンテロウイルス71(EV71)であったが、近年、コクサッキーウイルスA6型(CVA6)による手足口病流行が、日本やアジア地域を含めた世界各地で報告されている。EV71による手足口病流行時には、無菌性髄膜炎や急性脳炎、神経原性肺水腫などの中枢神経合併症の発生頻度が高くなる。とくに東アジア地域では、重症例・死亡例をともなう大規模なEV71感染症流行が大きな問題になっているが、EV71感染症重症化を規定するウイルス側・宿主側要因は、まだ分かっていない。

1990年代後半以降、とくに東アジアの広範な地域で、EV71感染症による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、1990年代後半には、マレーシアおよび台湾で、EV71脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000年代に入ってからは、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム, 日本等アジア各国で、EV71等による手足口病流行が報告されている。ベトナムでも、近年、重症例・死亡例を含む手足口病流行が報告されている。南部を中心としたベトナムでは、2005年以来、中枢神経系合併症を伴う手足口病流行が報告されており、2011-2012年に発生した大規模な手足口病流行の際には、200例以上の死亡例が報告されている。また、隣国カンボジアで2012年に発生した小児急性死症例流行の際には、死亡例から高頻度にEV71が検出された。

本研究では、ベトナムNational Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナム北部における手足口病の疫学的解析および　手足口病由来エンテロウイルス同定および

EV71 分離株の分子疫学的解析を行う。本年度は、手足口病の大きな流行のあった2011年と2012年の北部ベトナムにおける手足口病流行の原因ウイルスを把握するとともにEV71の分子疫学解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

2011 年と 2012 年に NIHE に集められた手足口病患者情報とその臨床検体を用いた。NIHE には北部ベトナム 28 省から 2011 年は 1052 人（患者への接触者 121 人も含む）、2012 年は 742 人分の臨床サンプル（主に便・咽頭拭い液・水疱拭い液）が送られており、実験室診断を実施している。入手可能な患者情報と NIHE における診断結果を照合し、流行時期や伝播ウイルス株に関わる情報を解析した。

一部の EV71 陽性検体（44 株）については、RD-A 細胞を用いてウイルスを分離し RNA を抽出したのち、VP1 全領域の塩基配列を決定した。VP1 塩基配列の系統樹解析には MEGA version 6 を使用し、Neighbor-joining 法にて解析を行った。

（倫理面への配慮）提供された臨床疫学情報は、整理番号が付与され、研究実施者は匿名化された臨床情報のみを受け取るため、患者を特定することはできない。また、いかなる研究成果の公表においても個人名および関連情報を想起させることのないように留意する。

C. 研究結果

本年度は、JICA プロジェクト「高危険度病原体に係るバイオセーフティ並びに実験室診断能力の向上と連携強化」の一環として、2014 年 7 月 13 日〜7 月 23 日にかけて、NIHE において開催されたバイオセーフティワークショップおよび手足口病実験室診断技術研修会に参加する機会を得たため、NIHE を含む四カ所の基幹国立研究所からの研修参加者に対して、手足口病および関連ウイルス実験室診断に関する講義および技術指導を実施した（清水、片岡、中村）。JICA 手足口病実験室診断技術研修会終了後、NIHE 担当者と、本研究課題に関する研究打合せを行うとともに（清水、片岡、中村、Thanh、Hoa、他）、2011-2012 年の手足口病流行時の疫学およびウイルス学的解析データの確認・整理を行った（片岡、中村、Hoa、他）。

ベトナムでは、近年の大規模手足口病流行と重症例の多発を受けて、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となった。全国的手足口病サーベイランスの結果、2011〜2012 年の期間で、約 28 万人の手足口病症例、および、223 名の死亡例が報告されている。北部ベトナムの手足口病症例の解析結果においても、これまでの報告と同様、手足口病患者は 5 歳以下が 9 割以上を占めた。本研究で使用した北部ベトナムにおける手足口病症例の疫学情報からは重症患者は見いだされなかった。

手足口病と診断された患者のうちエンテロウイルス陽性症例は 2011 年と 2012 年でそれぞれ 64.2％と 60.0％、陰性であった患者は 34.4％と 38.4％であった。エンテロウイルス陽性患者のうち EV71 陽性症例は 2011 年と 2012 年でそれぞれ、44.1％と 58.2％、CVA16 陽性は 17.2％と 12.1％、CVA6 陽性は 29.1％と 17.1％であった。その他のエンテロウイルスは 6.4％と 7.9％の割合で検出され、両年共に EV71 が主な手足口病の原因ウイルスであることが明らかとなった。さらに EV71 のサブジェノグループを解析したところ、EV71 陽性検体のうち、2011 年および 2012 年では、それぞれ 84.2％と 61.7％でサブジェノグループ C4 が検出され、7.4％と 5.2％でサブジェノグループ C5、8.5％と 33.1％でサブジェノグループ B5 が検出された。それぞれのサブジェノグループ内での塩基配列は、B5（18 株）では 98.5-99.9％、C4（22 株）は 96.2- 99.9％、C5（4 株）は 92.6-100.0％の相同性があった。またアミノ酸配列では B5 では 99.0-100.0％、C4 は 98.6- 100.0％、C5 は 99.3-100.0％の相同性があった。2011-2012 年にかけて北部ベトナムの手足口病患者から分離された EV71 株は、重症例が多く報告されている南部ベトナムやカンボジアで分離された EV71 株の一部と相同性が高かった。

D. 考察および今後の研究方針

ベトナムでは、2005 年以来、重症例・死亡例を含む手足口病流行が断続的に報告されている。北部ベトナムでは、これまで、手足口病サーベイランス体制は十分整備されておらず、重症例を含む手足口病流行の実態は必ずしも明らかではなく、原因ウイルスの解析結果も報告されていない。近年の大規模手足口病流行と重症例の多発を受けて、ベトナムでは、2011 年から手足口病が全国サーベイランスによる届出対象疾患となり、手足口病由来の一部検体について、NIHE においてエンテロウイルス検出・同定が実施された。

本研究では、2011年と2012年に北部ベトナムにおいて流行した手足口病の疫学情報をもとに流行状況を明らかにすることを目的とした。1990 年代後半以降、おもに、EV71 サブジェノグループ B3 および B4, B5, C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997 年のマレーシア、1998年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。

2011～2012 年に北部ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 サブジェノグループは、以前ベトナムにおいて主流であったジェノグループ C5 からサブジェノグループ C4 に置き換わっていた事が明らかとなった。また 2012 年にはジェノグループ B5 の検出頻度が 2011 年に比べて増加していた。VP1 の遺伝子配列解析から北部ベトナムにおいて流行している EV71 は南部で流行している株と相同性が高い事から、ベトナム国内においては地域固有の EV71 サブジェノグループの伝播はないと考えられた。南部および北部ベトナムでは、重症 EV71 症例の発生頻度が異なるという報告もあるが、EV71 サブジェノグループのみでその病原性を比較する事は難しく、更なる検討が必要であると考えられる。

EV71 感染による小児急性死症例が多く報告されている東アジア地域では、EV71 感染症の流行が大きな公衆衛生上の問題となっている。このような背景からベトナムにおいても 2011 年から手足口病が届出疾患に指定され、現在 JICA プロジェクトによる支援のもと、手足口病実験室診断の国内ラボネットワークを整備しつつあり、2014 年 7 月にはベトナム・ハノイにおいて、JICA 手足口病実験室診断ワークショップが開催された。その結果、四カ所の基幹研究所における手足口病検査手法は統一されておらず、また、サーベイランスおよび検査体制の整備状況は地域・施設ごとに異なることが明らかとなった。さらに、どのような手足口病症例(通常の手足口病症例、中枢神経合併症例、EV71 脳炎重症例・死亡例等)由来の臨床検体について検査を実施するのかについて、国内手足口病実験室ネットワークとしてのコンセンサスが必要と思われる。

E. 結論

1 2011-2012年の北部ベトナムにおける手足口病患者は主に5歳以下の小児であった。
2 手足口病の流行時期は、2011 年は後半に、2012 年は前半であった。
3 手足口病の原因ウイルスは EV71 が主流であり、次いで CVA6、CVA16 であった。
4 EV71 の流行サブジェノグループは B5、C4、C5 であり、主な流行株は C4 であった。2012 年には B5 の検出率が上昇した。
5 今回分離したウイルス株の同サブジェノグループ内での塩基配列は、B5 では 98.5-99.9%、C4 は 96.2- 99.9% 、C5 は 92.6-100.0%の相同性であった。
6 今回分離したウイルス株の同サブジェノグループ内でのアミノ酸配列では B5 では 99.0-100.0%、C4 は 98.6-100.0% 、C5 は 99.3-100.0%の相同性であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizu H. Development and introduction of inactivated poliovirus vaccines derived from Sabin strains in Japan. Vaccine (in press)
2) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, et al. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. Neuropathology (in press)
3) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. Lancet Infect Dis 14(4), 262-3, 2014
4) Arita M, Kilpatrick DR, Nakamura T, Burns CC, Bukbuk D, Oderinde SB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA, Shimizu H. Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts. J Clin Microbiol 53: 73-78, 2015
5) Naeem A, Hosomi T, Nishimura Y, Alam MM, Oka T, Zaidi SS, Shimizu H. Genetic diversity of circulating Saffold viruses in Pakistan and Afghanistan. J Gen Virol 95: 1945-1957, 2014
6) Shirato H, Someya Y, Ochiai M, Horiuchi Y, Takahashi M, Takeda N, Wakabayashi K, Ouchi Y, Ota Y, Tano Y, Abe S, Yamazaki S, Wakita T, sIPV Evaluation Group of NIID Virology II. A national reference for inactivated polio vaccine derived from Sabin strains in Japan. Vaccine 32: 5163-5169, 2014

7) 清水博之. ライノウイルスの分類と疾患への関与. 日本医事新報 4689: 53-55, 2014
8) 清水博之: 急増した手足口病 感染・炎症・免疫 44,94-96, 2014
9) 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, 2014
10) 清水博之、「消化器ウイルス篇 エンテロウイルス-ポリオウイルスおよび非ポリオエンテロウイルス」の項を担当、臨床医のための呼吸器・消化管ウイルス感染症 (堤裕幸、中野貴司、寺田喜平、編)、103-109, 診断と治療社、東京、2014

2. 学会発表等

1) Shimizu H. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Enteroviruses). (Poster). The First Regional Forum of WHO Collaborating Centres in the Western Pacific, Manila, the Philippines, 13-14 November, 2014
2) Shimizu H. Molecular basis of virus-host interaction and pathogenesis of enterovirus 71 infection. Monto Ho Memorial Lectures on Enterovirus 71, 2014 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, Tainan, Taiwan, 2 November, 2014
3) Shimizu H. The molecular basis of the interaction between EV71 and PSGL-1 from structural and functional standpoints. TLL Seminar, Temasek Life Science Laboratory, Singapore, 25 September, 2014
4) Shimizu H. Structural and functional basis of the interaction between enterovirus 71 and a cellular receptor, PSGL-1. Protein Island Matsuyama International Symposium, Matsuyama,Ehime,17 September, 2014
5) Shimizu H. Virology of Enterovirus 71. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014
6) Shimizu H. Overview of hand, foot, and mouth disease and enterovirus infections. JICA Training Workshop on Biosafety and HFMD Laboratory Diagnosis, Hanoi, Viet Nam, 14-18 July 2014
7) 吾郷昌信、北川由美香、松本文昭、吉川亮、陣内久美子、森内浩幸、永田典代、清水博之、森田交一. 新生児重症感染を惹起したコクサッキーウイルス B2 型の性状解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10〜12 日、2014
8) 町田早苗、清水 博之. ヒトパレコウイルス(HPeV)3 型の増殖機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10〜12 日、2014
9) 中村 朋史、有田 峰太郎、清水 博之. ウイルス受容体特異性を応用したポリオウイルス直接検出法の開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10〜12 日、2014
10) 小谷治、藤井健、鈴木忠樹、岩田奈織子、網康至、須崎百合子、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代. カニクイザルを用いた Saffold virus の神経病原性の病理学的解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10〜12 日、2014
11) 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 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、11 月 10〜12 日、2014
12) 吾郷昌信、陣内久美子、高柳俊光、森内浩幸、清水博之: コクサッキーウイルスB2型垂直感染による新生児重症感染例. 第55回日本臨床ウイルス学会. 札幌市、6 月 14 日〜6 月 15 日, 2014
13) 藤本嗣人、花岡希、藤巻明日香、萩美貴、清水博之: 兵庫県で脳炎を引き起こしたエンテロウイルス 71(EV71)の分子疫学. 第 55 回日本臨床ウイルス学会. 札幌市、6 月 14 日〜6 月 15 日, 2014