

厚生労働科学研究費補助金  
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」

平成26年度 委託業務成果報告書

ベトナムで流行した麻疹ウイルス解析

担当責任者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室室長  
研究協力者 Phuong Loan NIHE Respiratory Virus Laboratory  
T. T. T. Van NIHE Respiratory Virus Laboratory

研究要旨 2011年～2013年にベトナムで報告された麻疹症例数は1,000例を下回っていたが、2013年夏より増加の兆候が現れ、2014年には5585件となった。特にハノイの小児病院ではNICU内で麻疹感染が広がり、多くの乳幼児が死亡したことから社会問題となった。流行した麻疹ウイルスは、ハノイ市を含む北部では2系統の遺伝子型 H1 株であったが、ホーチミン市等南部では遺伝子型 D8 型ウイルスが主流であり、複数のウイルス株を起源とした麻疹流行であった。また、B3 型株も中部で検出されている。D8 型、B3 型ウイルスの報告が過去においてベトナムではないこと、世界各地で D8 型、B3 型の流行があった事、さらに同じ配列のウイルスが世界の多くの地域で検出されている事等から、海外からベトナムに侵入した株である可能性が考えられた。2014年7月以降、麻疹の流行は下火になったが、世界で麻疹排除を目指している現在、麻疹ウイルス流行株を解析し情報を把握していく事は麻疹排除達成には重要であると考えられた。

A. 研究目的

WHO は麻疹、風疹の排除を目指している。日本、中国、東南アジア等が所属する WHO 西太平洋地域(Western pacific region :WPR)では2012年までに麻疹の排除を目指していたが、WPR での麻疹排除は達成されておらず、また現在のところ新たな目標年は定められていない。WHO は麻疹排除の定義を「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」としており、麻疹の排除達成には症例数を減少させるだけでなく、検査診断に基づくサーベイランス体制、さらに麻疹の原因ウイルスがその土地に常在した株なのか、あるいは輸入された株なのかの鑑別を求めている。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。

日本においては2008～2012年に10代に対して実施した補足的ワクチン接種により、2009年以降の麻疹報告数は激減し、2013年には300症例を下回った。2014年はフィリピン、ベトナム、中国等における麻疹の流行の影響を受け436例が報告されたが、2006-8年の麻疹の全国的流行の原因ウイルスであった遺伝子型 D5 (常在株)のウイルスが検出されない状態は継続しており、実質的には日本は麻疹排除状況にあると考えられる。

麻疹ウイルスは非常に強い感染力を持ち、免疫が不十分なヒトは容易に麻疹に感染する。国境を超えた往来が日常化している現在では、日本が麻疹排除を達成し、またその状態を維持していくには周辺国における麻疹の流行も制御されている状態にあることが望ましい。

本研究はベトナムにおける遺伝子診断技術、解析技術の確立に協力する事で、サーベイランス体制の面でベトナムにおける麻疹排除に協力するとともに、常在ウイルスの鑑別に資する情報を蓄積する事を目標としている。また、これらはWPRにおける麻疹排除の推進にも有用である。

## B. 研究方法

### 1. ベトナムの麻疹に関する情報の収集ベトナム

National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) の Respiratory virus laboratory を訪れ、ベトナムにおける麻疹の流行状況、検査状況を確認した。

### 2. 2014 年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

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

### 1. ベトナムの麻疹の流行状況

ベトナムにおける麻疹は、2008 年から 2009 年にかけて全国的なアウトブレイクが発生し、約 5200 例の麻疹が報告された。それ以降は高いワクチン接種率(1期)と、数回のわたる補足的ワクチン接種等を実施したことから麻疹症例数は、2010 年は 1826 例、2011 年 750 例、2012 年は 637 症例と減少傾向にあったが 2013 年では北部の山岳地域を中心に麻疹の報告が相次ぎ 895 例とやや増加した。2014 年には麻疹の流行が全国へ広がり、5568 件が報告されている。特にハノイの国立小児病院では新生児救急管理室(NICU)で麻疹が発生し、100 名を超える子供が合併症により死亡した。うち半数はワクチン接種前の 9 ヶ月未満であった。対応として補足的ワクチン接種を全国的に実施した事から、流行は 7 月以降下火になり現在に至っている。

### 2. 2014 年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

2013 年以降に検出された遺伝子型 H1 ウイルスは 2 つの系統に大別された。2014 年にハノイ市や Son La 等で検出された麻疹ウイルスは、ベトナムと隣接している中国の雲南省やラオス Phongsaly 県、Luangnamtha 県で検出された遺伝子型 H1 ウイルスと同一、あるいは高い相同性を示した。また、2013 年、2014 年に Hai Gang 県やハノイで検出された遺伝子型 H1 ウイルスは 2006 年に流行していたウイルスと近い系統にあった。一方、ベトナム南部では遺伝子型 D8 のウイルスが検出された。D8 型ウイルスは 2013 年以降、南部のホーチミン市から検出されているが、北部の Phu Tho 県や Hai Duong 県でも検出されている。これらはすべて同じ配列であった。2012 年以前にベトナムでは D8 型ウイルスの報告はない。また中部の Quang Nam では遺伝子型 B3 のウイルスが検出されている(図 1)。

## E. 結論、考察

麻疹は麻疹ウイルスによる呼吸器感染症であり感染力が強い事が知られている。また麻疹は罹患者に免疫抑制を誘発することから、患者のおよそ 1/3 が合併症を併発し、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。途上国では時として 20% 以上の死亡率を示す事がある。一方、麻疹には有効性、安全性のすぐれたワクチンが存在することから、WHO は麻疹の排除をすすめている。麻疹排除は国連が策定、決議したミレニアム開発目標(MDG)の一つである「乳幼児死亡数を 2015 年には 1990 年の 1/3 にする」の達成にも密接に関連しており、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。導入した当初の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。その後、ワクチン不足により接種率が 83%に低下したためか 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。それ以後は 95%を超える高いワクチン接種率を維持し、徐々に麻疹症例数と減少させたが 2013 年夏頃から麻疹の増加がみられ 2014 年には 5000 例を超える全国的な麻疹の流行となった。2013 年にある特定のワクチン接種による死亡事故が頻発し、ワクチンへの不信から、接種を控えた親があったとされている。こういった動きが 2014 年の麻疹の流行の引き金となった可能性がある。

2014 年の流行は、少なくとも 2 系統の遺伝子型 H1 ウイルスと遺伝子型 D8 ウイルスの 3 系統の麻疹ウイルスを原因としていた。ベトナムは南北に長い事から地域ごとに異なるウイルスが流行しそれが全国的に広がっていったためだと考えられる。H1 型ウイルスの麻疹は、2010 年に 9 ヶ月から 14 歳児およそ 1 億人を対象にした麻疹ワクチン接種のキャンペーンを行い、麻疹症例数を低く制御していた、ベトナムの隣国である中国で、麻疹症例数が再び増加した事にも大きく影響をうけていると思われる。一方、ホーチミン市を含む南部では遺伝子型 D8 型ウイルスによる麻疹の流行があった。遺伝子型 D8 型ウイルスは B3 型ウイルスとともにベトナムでは過去に報告がない事、2014 年では世界中で流行しているウイルスであった事から海外からの侵入した可能性が強い。ベトナムにおける麻疹の流行は 7 月以降、小康を得ている。これは流行地域において補足的ワクチン接種等の適切な対応によってなされた。麻疹の制御にはワクチン接種、サーベイランスとともに即時的な適切な対応も重要である。

海外旅行が容易にできる現在では、麻疹を排除し、その状態を維持していくには、周辺国の麻疹の流行を減少させる事も必要になってくる。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、ウイルス学的に解析から海外に由来する株かそれらから国内で伝播した海外関連株と考えられている。国内の麻疹の排除の達成、維持は、国外、おもに近隣の状況と無関係ではない。海外の中心的研究室と技術、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日本だけでなく、WPR 地域の麻疹排除達成にも貢献すると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Takahashi T, Arima Y, Kinoshita H, Kanou K, Saitoh T, Sunagawa T, Ito H, Kanayama A, Tabuchi A, Nakashima K, Yahata Y, Yamagishi T, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Arai S, Satoh H, Tanaka-Taya K, Komase K, Takeda M, Oishi K, Ongoing increase in measles cases following importations, Japan, March 2014: times of challenge and opportunity. *Western Pac Surveill Response J* 16; 5(2) 31-3 (2014)
2. Abo H, Okamoto K, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y. Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *Journal of Virological Methods*. 207, 73-77. (2014)
3. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a

major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 88: 5608-5616. 2014.

4. 駒瀬勝啓 竹田誠 海外の麻疹の情報 2013 病原微生物検出情報 35 (4) ; 97-98 (2014)
5. 山岸拓也、伊東宏明 八幡裕一郎 中島一敏 松井珠乃 高橋琢理 木下一美 砂川富正 奥野英雄 多屋馨子 大石和徳 駒瀬勝啓 三崎貴子 丸山絢 大嶋孝弘 清水英明 岩瀬耕一 岡部信彦 小泉祐子 平岡麻理子 瀬戸成子 杉本徳子 荷見奈緒美 熊谷行広 大塚吾郎 杉下由行 甲賀健史 鈴木理恵子 阿南弥生子 舟久保麻理子 弘光明子 坂本洋 阿部勇治 氏家無限 潜在的な疫学リンクが疑われた D8 型ウイルスによる麻疹広域散発事例 病原微生物検出情報 35 (4) ; 100 - 102 (2014)
6. 古川英臣 梶山桂子 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 井出瑤子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川温 高田 徹 猪狩洋介 駒瀬勝啓 フィリピン渡航者への D9 型麻疹ウイルスの検出-福岡市 病原微生物検出情報 35 (5) ; 132 (2014)
7. 竹田誠 駒瀬勝啓 輸入麻疹と国内伝播感染症 44(6) 206-217 (2014)

#### 学会発表

##### 国際学会

1. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Toru Kubota, Masaki Anraku, Noriko Nakajima, Tsuyoshi Sekizuka, Katsuhiko Komase, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda, The host protease TMPRSS2 is essential for influenza A virus pathogenicity 13<sup>th</sup> Awaji International forum on infection and immunity. 2014年 9.23-26

##### 国内学会

1. 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、関塚剛史、駒瀬勝啓、長谷川秀樹、黒田誠、河岡義裕、田代真人、竹田誠、宿主プロテアーゼ TMPRSS2 は、インフルエンザウイルスの生体内活性化酵素である、第 157 回日本獣医学会学術集会、平成 26 年 9 月 9 日~12 日、札幌
2. 酒井宏治、關文緒、田原舞乃、網康至、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 利用に必要な受容体側の因子 第 157 回日本獣医学会学術集会、平成 26 年 9 月 9 日~12 日、札幌
3. 北沢実乃莉、酒井宏治、田原舞乃、安部昌子、中島勝紘、網康至、中島典子、安楽正輝、駒瀬勝啓、長谷川秀樹、竹原一明、田代真人、加藤篤、竹田誠、宿主プロテアーゼ TMPRSS2 はセンダイウイルスの病原性決定因子のひとつである、第 157 回日本獣医学会学術集会、平成 26 年 9 月 9 日~12 日、札幌
4. 酒井宏治、關文緒、加納和彦、網康至、田原舞乃、駒瀬勝啓、前仲勝美、山口良二、竹田誠、野生型イヌジステンパーウイルスのヒト SLAM 利用能獲得に必要な変異、第 62 回日本ウイルス学会学術集会 平成 26 年 11 月 10 日~12 日 横浜
5. 岡部信彦、駒瀬勝啓、砂川富正、竹田 誠、多屋馨子、中野貴司、蜂谷正彦、三崎貴子、吉倉 廣、渡瀬博敏、国内の麻疹排除 (measles elimination) 状況に関する考察、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日~7 日 福岡
6. 多屋馨子、佐藤弘、奥野英雄、新井智、神谷元、八幡裕一郎、伊東宏明、福住宗久、砂川富正、駒瀬勝啓、竹田誠、大石和徳、麻疹・風疹に関する最近の国内疫学情報について、第 18 回日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日~7 日 福岡

##### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

図1.ベトナムに於ける麻しんウイルス流行株の推移 (2000-2014)



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

分担研究報告書

ベトナムにおける狂犬病と炭疽に関する研究

担当責任者 井上 智 国立感染症研究所 獣医科学部

研究協力者 畠山 薫 東京都健康安全研究センター 微生物部  
水越文徳 栃木県保健環境センター 微生物部  
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

研究要旨 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を行うために、当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学に関する研究を NIHE の狂犬病ラボと炭疽ラボと共同して行った。（1）狂犬病：我が国で過去に分離された国内株を利用してリアルタイム PCR 法を新たに構築した。現在、ベトナムで発生している狂犬病ウイルスのゲノム RNA を利用して現地で可能な検出系の確立を行っている。（2）炭疽：国立感染症研究所（感染研）に保存されている炭疽菌国内分離株とベトナムの臨床検体から抽出された DNA を用いて LAMP 法による遺伝子検出系の構築と検証を行い炭疽が発生しているベトナム北部山岳地域での遺伝子検出に安定した電力供給や高度な機器を必要としない LAMP 法の有益性が示された。現在、フルゲノム解析を可能にするゲノム遺伝子の調整とライブラリ作成法について検討を行っている。

A. 研究目的

本研究の目的は、ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）の狂犬病ラボ（ウイルス部・Dr. Nguyen Tyet Thu）および炭疽ラボ（細菌部・Dr. Hoan Thi Thu Ha）と、検査・同定法の開発、分離株の分子疫学に関する共同研究を行うことによって、狂犬病と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ことである。

B. 研究方法

1. 狂犬病

狂犬病ウイルス RC-HL 株 N 遺伝子配列をもとに、リアルタイム PCR プライマーおよびプローブの設計を行って、ABI PRISM7900HT を使用してリアルタイム PCR の構築と検証を行った。

構築したリアルタイム PCR 系の概要を“狂犬病 図 1”に示した。リアルタイム PCR 用に設計したプライマーとプローブの N 遺伝子における位置を“狂犬病 図 2 ab”に記載した。

リアルタイム PCR 反応の検証には、1950

年代に都内の動物から分離された狂犬病ウイルス株 10 株 (RVS57、RVS58、RVS70、RVS121、RVS40、RVS41、RVS125、RVS145、RVS170、RVS208) ならびに小松川株、西ヶ原株から抽出した RNA を使用した。

## 2. 炭疽

国立感染症研究所 (感染研) に保存されている炭疽菌国内分離株とベトナムで分離された菌株を用いて LAMP 法による遺伝子検出系の構築と検証を行った。

検体：感染研に保存されている *Bacillus anthracis* BA103 株の 10 倍階段希釈 DNA ( $10^{-1}$  から  $10^{-8}$ ) 溶液を使用して検出限界の測定を行った。Salmon sperm DNA をキャリア DNA にして、濃度の薄い DNA 溶液中の DNA 断片化と使用チューブへの付着による DNA 量の減少を防止した。陰性対照は *Bacillus cereus* 臨床分離株 (血液) 由来 DNA を使用した。ベトナム北部の山岳地帯に位置する Dien Bien 省で 2013 年に発生した炭疽牛の皮膚と膿汁等 (4 検体) から抽出した DNA を LAMP 法の検証に使用した。陽性対照に炭疽菌 17JB 株から抽出した DNA、陰性対照に *Bacillus cereus* と *Bacillus subtilis* (NIHE 保管株由来) から抽出した DNA を使用した。

LAMP 用プライマー：炭疽菌病原性プラスミド内の *pag* および *cap* 遺伝子を検出するために設計した FIP、BIP、F3、B3 各プライマーを使用した (炭疽 表 1)。

LAMP 試薬：

### 感染研

LAMP DNA 増幅試薬および蛍光試薬 (栄研化学) と下記試薬を用いた。

- 10×LAMP Buffer
  - 200mM Tris-HCl (pH8. 8)
  - 100mM KCl
  - 100mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 1% Tween 20
- プライマーミックス
  - Bst* DNA polymerase (NEB) 8U/uL
  - dNTPs (ニッポンジーン) 各 10mM
  - 5M Betaine
  - 100mM  $\text{MgSO}_4$
  - Carsein (蛍光試薬)

### NIHE

LAMP DNA 増幅試薬と蛍光試薬 (栄研化学) を使用した。反応条件は 65°C60 分、95°C5 分とし、4°C維持後にイルミネータで蛍光を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 狂犬病

現在、ベトナムで使用している RT-PCR 用のプライマーは「N7 と JW6」、感染研で推奨しているプライマーは「JW12 と JW6」、「10g と 304」である。いずれのプライマーも WHO、フランスパスツール、米国 CDC が推奨しており、海外で分離されているほとんどの狂犬病ウイルス株を検出可能であるが、より高感度かつ特異性の高い遺伝子検出系を確立する目的で、リアルタイム PCR のプライマーとプローブの設計を行った。

構築したリアルタイム PCR は既存の RT-PCR と比較して 1000 倍以上の感度で標的遺伝子を検出することが明らかとなった “狂犬病 図 3”。また、東京都健康安全研究センターが保存していた 1950 年代に東京で流行していたウイルス株は検出感度に差異 (Ct 値：17-31) が見られたが、いずれの株も検出可能であった。



## 2. 炭疽

*Bacillus anthracis* BA103 株から抽出した DNA を 10 段階希釈 ( $10^{-1}$  から  $10^{-8}$ ) して、炭疽菌の病原性遺伝子である *pag* 遺伝子および *cap* 遺伝子を標的とする LAMP プライマーセットの遺伝子検出限界を調べたところ、両プライマーセットとも炭疽菌の芽胞 10 個相当 ( $10^{-6}$  希釈) を検出できることが明らかとなった (炭疽 図 1)。

NIHE において、ベトナム北部の山岳地帯に位置する Dien Bien 省で 2013 年に発生した炭疽牛の皮膚と膿汁等 4 検体から DNA 抽出を行い、蛍光試薬 (栄研化学) を使用して LAMP 法を行ったところいずれも蛍光による陽性を確認することができた。

## D. 考察

### 1. 狂犬病

新しく構築したリアルタイム PCR は既存の RT-PCR 法よりも 1000 倍高感度で、1950 年代に東京で流行していたウイルス株を検出可能なことが明らかとなった。現在、NIHE の共同研究者と共にベトナムで発生しているウイルス株について本リアルタイム PCR の反応性について検討を進めている。

リアルタイム PCR のプライマーとプローブの設計に使用した RC-HL 株と反応性を検討した国内分離株ならびに CVS 株はともにヨーロッパ・中近東、アフリカ、日本・中国、北米、メキシコ、南米、ロシアでの分離株を含む広域クラスター (クラスター 1) に属している。しかしながら、ベトナムで発生している狂犬病ウイルスは、この広域クラスターとはことなるクラスター (東南アジア、中国、台湾等) に属しているため、ベトナムで発生しているウイルス株についてはウイルスゲノムの解析を行ってプライマーおよびプローブを再検討する必要がある

と考えられた (狂犬病 図 5)。

## 2. 炭疽

ベトナム北部山岳地域の地方検査施設で簡易に炭疽菌の遺伝子検出を行うために LAMP 法の確立を検討して、芽胞 10 個相当の検出感度と、野外検体から直接 DNA を抽出して行う簡易な方法を可能にした。また、炭疽患者や発症動物は菌血症 ( $10^8$  から  $10^9$  CFU) を呈することから、構築した LAMP 法は野外検体について十分に検査可能であると考えられた。

炭疽が発生しているベトナム北部山岳地域では、安定した電力供給や高度な機器を整備することが困難であり、これらを必要としない LAMP 法は極めて有望である。現在、供試検体 DNA を利用したフルゲノム解析を可能にするためにゲノム遺伝子の調整とライブラリ作成法について検討を行っている。

## E. 結論

ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) と狂犬病および炭疽について高感度の新規検査・同定法を開発することによって、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を可能とした。

本研究によって、アジアで問題となっている動物由来感染症である狂犬病と炭疽についてベトナムにおける病原体の正確な情報・特徴を日常的に把握し監視する体制強化が可能となると考えられた。

今後、NIHE と同等の立場でネットワークを継続的に維持して病原体の分子疫学的解析とデータベース化を連携して行うことによって、感染症情報および病原体情報の交換が容易となり、アジア地区への我が国の国際貢献、および感染症コントロールへ

の貢献に繋がるものと期待された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 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.
2. Kentaro Tohma, Mariko Saito, Taro Kamigaki, Laarni T. Tuason, Catalino S. Demetria, Jun Ryan C. Orbina, Daria L. Manalo, Mary E. Miranda, Akira Noguchi, Satoshi Inoue, Akira Suzuki, Beatriz P. Quiambao, Hitoshi Oshitani (2014) Phylogeographic analysis of rabies viruses in the Philippines. *Infection, Genetics and Evolution*, 23:8694.
3. Hamamoto, N., Uda A., Tobiume, M., Park, C.-H., Noguchi, A., Kaku, Y., Okutani, A., Morikawa, S., Inoue, S. (2015) Association between RABV G Proteins Transported from the Perinuclear Space to Cell Surface Membrane and Nglycosylation of the Sequon at Asn204. *JJID*, In press.
4. Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) presents the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 26-27 Jan, 2015. Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
5. Chang, S.-S., Tsai, H.-J., Chang, F.-Y., Lee, T.-S., Huang, K.-C., Fang, K.-Y., Wallace, R.M., Inoue, S., Fei, C.-Y. Rabies surveillance and contingency actions of ferret-badger rabies in Taiwan, 1999 to 2014. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) presents the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 26-27 Jan, 2015. Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
6. Hassadin, B., Kimitsuki, K., Manalo, D.M., Inoue, S., Park, C.-H., A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) presents the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 26-27 Jan, 2015. Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
7. Hamamoto, N., Uda A., Noguchi, A., Okutani, A., Kaku, Y., Park, C.-H., Morikawa, S., Inoue, S. Different

##### 学会発表

##### 国際学会

1. Park, C. H., Yamada, K., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central
4. Hamamoto, N., Uda A., Noguchi, A., Okutani, A., Kaku, Y., Park, C.-H., Morikawa, S., Inoue, S. Different

intracellular localization of G protein between Kyoto strain (street virus) and CVS-26 strain (fixed virus) was associated with N-glycosylation of G protein at the site of 204. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP) presents the 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). 26-27 Jan, 2015. Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

5. Bacillus ACT2013. “The novel genotyping by SNPs selected from genome-wide analysis of B. anthracis isolated in Japan and Mongolia” A. Okutani, K. Tungalag, D. Tserenmorov, B. Bazartseren, H. Thi Thu Ha, T.N. Hien, S. Inoue.

#### 国内学会

1. 高橋有里花、篠崎春美、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj, Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬。狂犬病発病犬の唾液腺に関する病理学的研究。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日、北海道大学高等教育推進機構、札幌市、北海道
2. 篠崎春美、高橋有里花、矢野川祥子、君付和範、Hassadin Boonsriroj, Daria L. Manalo、井上 智、朴天鎬。狂犬病発病犬の口唇皮膚におけるウイルス抗原の局在と診断的有用性。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日、北海道大学高等教育推進機構、札幌市、北海道

3. 山田健太郎、渡辺一平、アハメド カムルディン、Daria L. Manalo、Miranda Mary、Lapiz Stella、Tapdasan Emerson、Petspophonsakul Wilaiwan、井上 智、朴天鎬、Khawplod Pakamat, 西園 晃。イムノクロマト法をベースにした狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検出キットのイヌ血清を用いた多国的評価。第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-12 日、北海道大学高等教育推進機構、札幌市、北海道

4. 松浦真翔、鶴田一郎、坊菌慶信、山田健太郎、井上智、三澤尚明。官学連携による狂犬病診断体制の構築。平成 26 年度獣医学術九州地区学会、2014 年 10 月 4 日、鹿児島県民交流センター、鹿児島市、鹿児島県

5. 景岡美穂、李松熹、加来義浩、井上 智、長棟輝行、河原正浩。細胞増殖を指標とした細胞内抗体選 択法の開発。2014 年度細胞アッセイ研究会シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」、2015 年 1 月 13 日、東京大学生産技術研究所コンベンションホール、東京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

狂犬病 図1. 構築したリアルタイムPCRの概要

■ 使用機器：ABI PRISM7900HT

■ プライマー：

844F 5' -GAGACGGCTGTTCTCACTCTTA-3'  
 923R 5' -GCATTGACGAATAAGGAGACTTC-3'

■ MGB プローブ：

871T 5' -FAM-ATTCACCTCCGTTCACTAGG-MGB-3'

■ 試薬：QuantiTect Probe RT-PCR(QIAGEN)

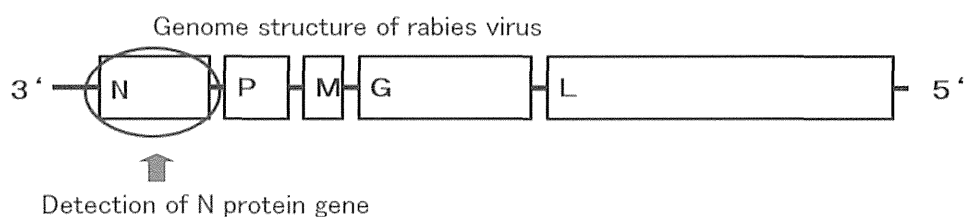
2×QuantiTectRT-master mix	25 μl
primer F (10pmol)	2 μl
primer R (10pmol)	2 μl
Probe	2 μl
QuantiTect RT mix	0.5 μl
Total RNA	4 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	14 μl
Uracil-Nglycosylase	0.5 μl
Total	50 μl

\*Uracil を添加しない場合は、dH<sub>2</sub>O 14.5 μl

■ 反応条件 (RT および PCR)：

Stage1, 2	50°C	30min	
RT 反応	95°C	15min	
Stage3	94°C	15sec	45cycles
PCR 反応	58°C	60sec	

狂犬病 図 2 a. 使用したプライマーとプローブ

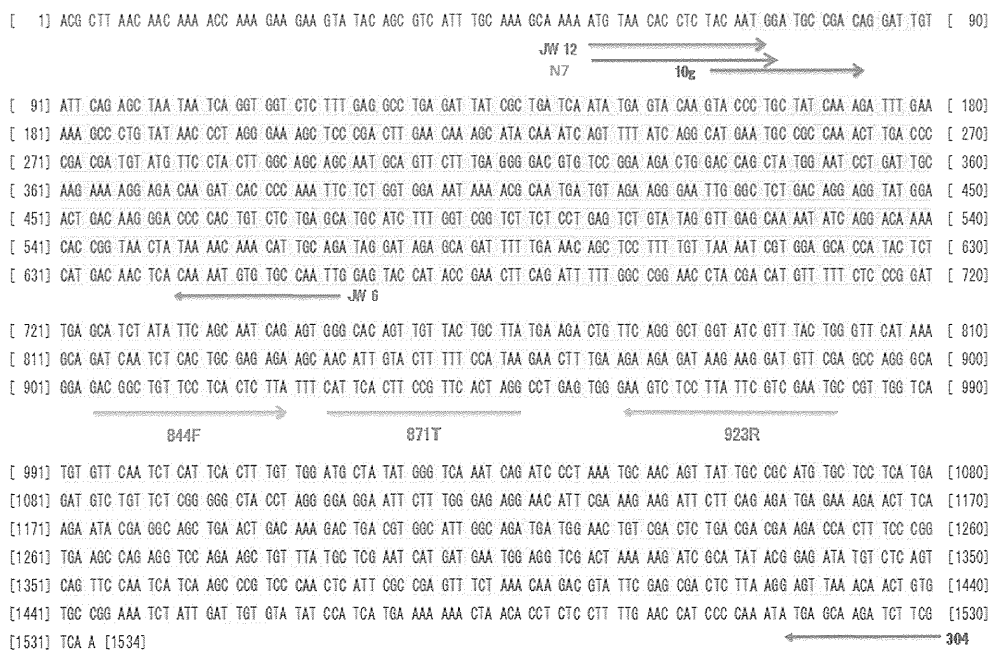


Primer pair /Probe for real-time PCR

Primer/Probe	Nucleotide Sequence
844F	5' -GAGACGGCTGTTCCCTCACTCTTA-3
923R	5' -GCATTGACGAATAAGGAGACTTCC-3
871T	5' -FAM-ATTCACTTCCGTTCACTAGG-MGB-3'

狂犬病 図 2 b. 使用したプライマーとプローブ

Gene Position of real-time PCR primer/Probe sets and RT-PCR primers in rabies virus genome



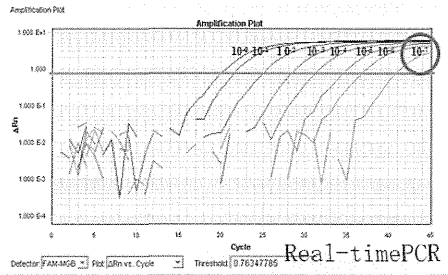
狂犬病 図3. 構築したリアルタイムPCRの感度

Comparison of the sensitivity of each method

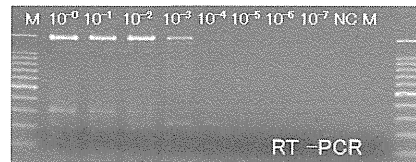
methods	Virus RNA concentration*							
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
RT-PCR**	+	+	+	+	±	-	-	-
Real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+

\*≥ 10<sup>8.5</sup> TCID<sub>50</sub>

\*\*Conventional RT-PCR method(10g/304)

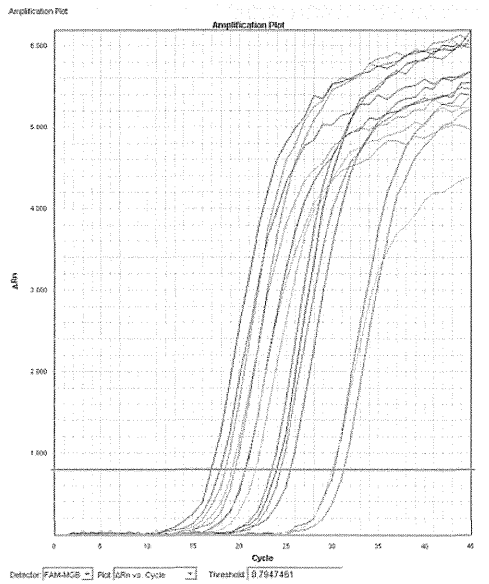


1,468 bp→



狂犬病 図4. 日本分離株のリアルタイムPCR反応成績

Detection of rabies viruses isolated from animals in Tokyo in the 1950s

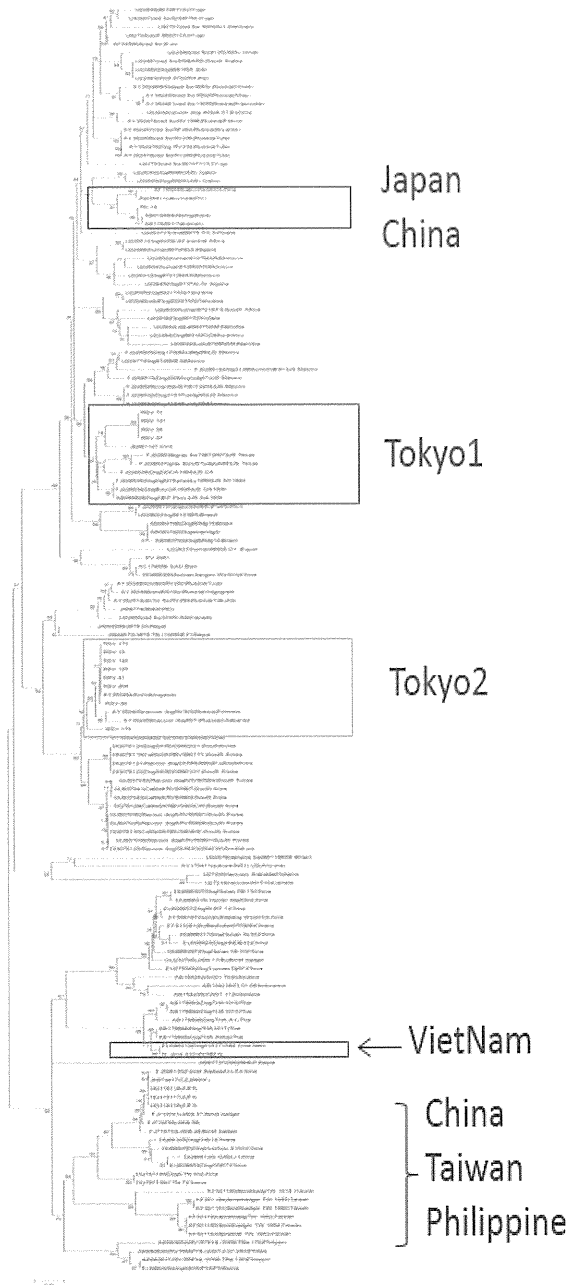


Cluster	Strain
Tokyo1	RVS57, RVS58, RVS70, RVS121
Tokyo2	RVS40, RVS41, RVS125, RVS145, RVS170, RVS208 Komatsugawa
Japan/ China	RC-HL Nishigahara

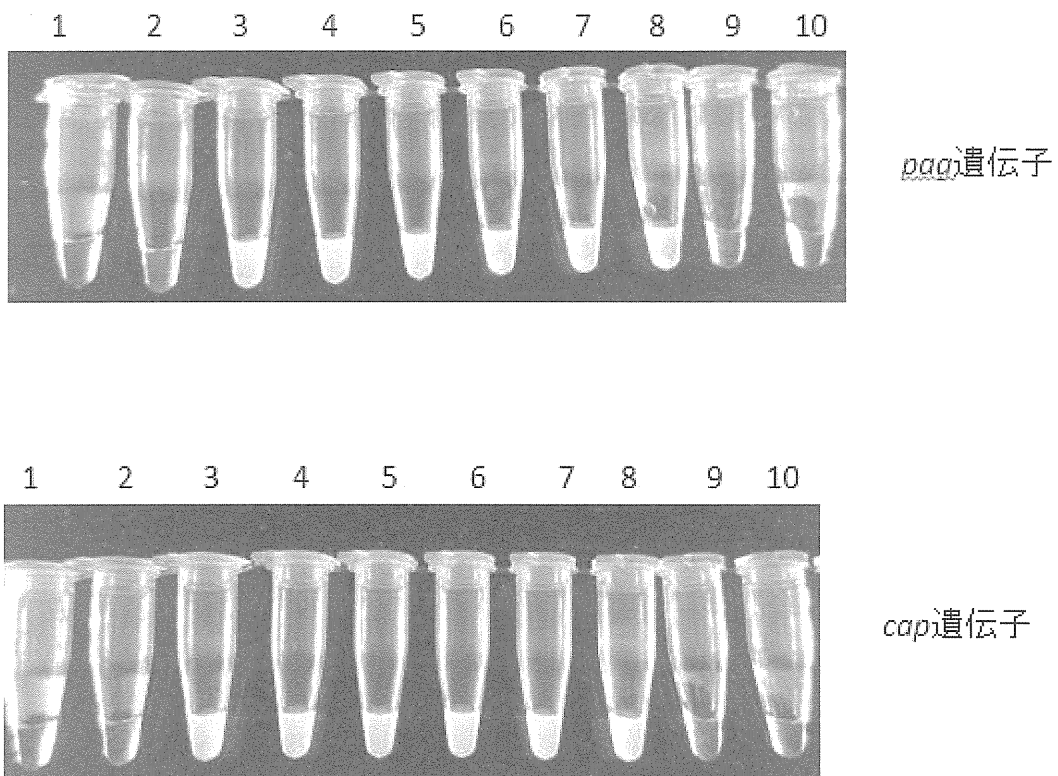
Real-timePCR :ABI PRISM 7900HT  
Sequence Detection System (ABI)

狂犬病 図5. アジアで流行している狂犬病ウイルスの系統樹

Phylogenetic tree of  
the nucleoprotein (N) gene  
of Rabies virus



炭疽 図1. LAMP法の結果



1. Negative control (DW)
2. *B. cereus* DNA
3. *B. anthracis* DNA  $10^{-1}$  希釈
4. *B. anthracis* DNA  $10^{-2}$  希釈
5. *B. anthracis* DNA  $10^{-3}$  希釈
6. *B. anthracis* DNA  $10^{-4}$  希釈
7. *B. anthracis* DNA  $10^{-5}$  希釈
8. *B. anthracis* DNA  $10^{-6}$  希釈
9. *B. anthracis* DNA  $10^{-7}$  希釈
10. *B. anthracis* DNA  $10^{-8}$  希釈



炭疽 表 1. LAMP 反応に使用したプライマー

Name	Sequence (5' -3')
pag-F3-Qiao	ATACTTCTACAAGTAGGACACAT
pag-B3-Qiao	ATTGGCATTTAATCTTGCTGTA
pag-BIP-Qiao	CCTGCAGATACACTACCACCAATATGAAGTACATGGAAATGCAGAA
pag-FIP-Qiao	CGGTCGCAATTGATCATTCACTGTATTTAAACCCATTGTTTCAGC
cap-F3-Qiao	GCGGATAATTCTAGAATTTCAGAAG
cap-B3-Qiao	ATGTTGATGAGGGATCATTCCG
cap-BIP-Qiao	GCTGTTTCCTCATCAATCCCAAGATGATTACATGGTCTTCCCAGA
cap-FIP-Qiao	CGGATCCAGGAGCAATGAGAATACCATTTACGAAGAACGCAG

・ Reference : Qiao et al. Biotechnology Letters. 2007, vol29(12) p1939-46

・ プライマーの標的

pag 遺伝子: pag-F3-Qiao、 pag-B3-Qiao、 pag-BIP-Qiao、 pag-FIP-Qiao.

cap 遺伝子: cap-F3-Qiao、 cap-B3-Qiao、 cap-BIP-Qiao、 cap-FIP-Qiao.

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（総括）

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推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）

市中感染型真菌症の基礎的、臨床的研究にかかわる  
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

担当責任者：宮崎義継（国立感染症研究所 真菌部 部長）

研究協力者：田辺公一、名木 稔、梅山 隆、山越 智（国立感染症研究所真菌部）

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), Pojana sriburee (Chiang Mai University), Nanthawan Mekha (NIH, Bangkok)

研究要旨：平成25年度までに、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を行い、複数のヒストプラズマ抗体陽性検体を確認した。同様の検討を NIHE との共同研究に加えて、タイ王国チェンマイ大学、タイ王国 NIH との共同研究にて行い、コウモリや家禽類の糞で汚染された土壤中にヒストプラズマ DNA を検出した。ベトナム、タイともにヒストプラズマが環境中に生息しており、ヒストプラズマ症は決して稀な真菌症ではないことが伺われた。

#### A. 研究目的

ヒストプラズマ症は別名「洞窟熱」ともいわれ、高病原性真菌（BSL3）であるヒストプラズマ属（*Histoplasma capsulatum*）を原因真菌とし、HIV感染者など免疫不全者に加え、健常人にも発病が認められる真菌感染症である。ヒストプラズマ属は通常土壤中に生息し、コウモリや鳥類の糞中で盛んに増殖する真菌

で、世界的に広く生息が確認されているが、なかでも米国ミシシッピ川流域や中南米、西アジア、東南アジア、オーストラリアが大きな侵淫地域であり、本感染症は地域流行型真菌症の性格をもつ。日本人のヒストプラズマ症患者は年々増加傾向を示し、その多くは北中米と東南アジアでの感染であることが考えられているが、東南アジア地域でのヒスト

プラズマ症の実態、流行状況、感染源、危険因子等については未解明な点が多く、日本人現地在住者、日本人旅行に対する適切な感染危険情報も少ない。このような状況を鑑み、本研究では、東南アジア地域での本症の実態把握、流行状況調査、診断能力の向上ならびに分離されたヒストプラズマ属の各国での疫学的解析や基礎研究の推進・発展主な内容として、それぞれの国の感染症研究機関との共同研究ネットワークを構築することを目的とした。

また、今年度は北米で集団感染が認められた *Cryptococcus gattii* についてタイ王国における疫学調査および生息環境調査を開始した。クリプトコックス症は一般的に *C. neoformans* によって引き起こされると考えられているが、*C. gattii* による感染症の流行地である熱帯・亜熱帯地域では *C. gattii* 感染が見過ごされている可能性が高い。そこで、すでにクリプトコックス症患者より分離された菌を収集し、*C. gattii* の存在を検討した。また、土壌や植物表面から採取したサンプルより分離されたクリプトコックス属についても *C. gattii* の存在を検討した。

## B. 研究方法

昨年度と同様に、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE, Vietnam) の希少細菌研究室と、ハノイ市の Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital との共同研究として検討を行った。検討内容としては、呼吸器感染症疑い患者での肺ヒストプ

ラズマ症 (急性、慢性) の状況調査 (疫学調査)、診断支援、ヒストプラズマ属生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定を行った。

### 1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

前年度と同様、NIHE ならびにハノイ市 Bach Mai Hospital、103 Hospital、National Lung Hospital の感染症部門検査部が主体となり、これら医療機関を受診した (不明熱) 患者で、ヒストプラズマ症を含めた侵襲性真菌症が疑われる患者から診断目的で検査に提出された臨床検体を用いて研究を遂行した。今年度は多検体を迅速に処理し、培養検査による生菌分離を主目的とした。患者のエントリー基準として、1) 無症状だが胸部 X 線検査で肺野に陰影を認める、2) 急性呼吸器症状を呈する (発熱、胸痛、倦怠感、咳嗽など)、3) 結核様の慢性の呼吸器症状を呈し徐々に悪化する症例 (結核は否定する)、4) 免疫不全、口腔内潰瘍、中枢神経症状を呈した症例を対象とした。対象検体は喀痰、気管支洗浄液、髄液、胸水、血液、生検組織などで、状況に応じ培養法、遺伝子診断法 (PCR 法) を行った。PCR 法については我々が行っているヒストプラズマ属検出用 PCR 法 (Ohno H, et al. *J Infect Chemother*, 2013) を行った。

### 2) タイ王国におけるヒストプラズマ属生息状況に関する調査

バンコク周辺地域のコウモリが生息する寺院において、コウモリや家禽類の糞で汚染された土壌検体を対象としてサンプリングを行った。チェンマイでは主に家禽類の糞で汚染

された土壌を対象とした。得られた土壌検体は冷蔵保存の上 NIHE へ運搬し、以後のヒストプラズマ属培養法、PCR 法へ供した。

### 3) タイ王国における *Cryptococcus gattii* の疫学および生息状況調査

チェンマイおよびタイ王国内共同研究先あるいは医療機関より収集したクリプトコックス属真菌について CGB 寒天培地による発育試験により、*C. gattii* のスクリーニングを行った。CGB 培地で *C. gattii* 陽性となった菌株について、ゲノム DNA をチェンマイ大学にて抽出し、国立感染症研・真菌部においてリボソーム遺伝子の塩基配列決定により菌種同定を行った。

(倫理面からの配慮について)

本検討においては NIHE の倫理委員会 (No.01 IRB) ならびに国立感染症研究所倫理委員会 (No.365, No.460) の承認を受けた。

## C. 研究結果

### 1) 北部ベトナム地域におけるヒストプラズマ症の疫学調査

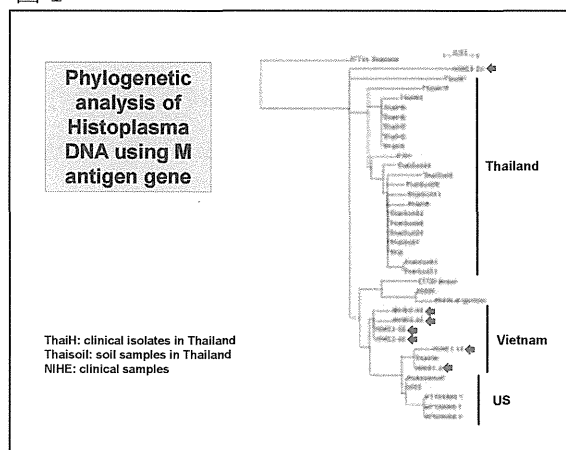
2014 年度は喀痰 150、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 66 検体が NIHE へ検査目的にて供された。喀痰および BALF について培養法、PCR 法を行い、培養法陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性は計 6 例 (3.5%) で認めた。

(図 1)

### 2) タイ王国におけるヒストプラズマ属生息状況に関する調査

バンコク NIH ではコウモリ糞汚染土壌検体計 36 検体を採取し、これらを対象に検討した結果、培養法で陽性例は認めなかったが、PCR 法陽性が 14 例 (39%) で確認された。増幅された M 抗原遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹を作成すると、ベトナムで分離された株とタイで分離された株は異なるクレードに分類されることが明らかになった。

図 1



### 3) タイ王国における *Cryptococcus gattii* の生息状況調査

タイで分離されたクリプトコックス株 81 株について CGB 寒天培地による試験を行ったところ、6 株が *C. gattii* の可能性が高いと判定された。6 株のゲノム DNA を用いてリボソーム遺伝子解析を行ったところ、2 株の臨床分離株と 1 株の環境分離株が *C. gattii* であると判定された。

## D. 考察

ヒストプラズマ症は、わが国では海外で感染し国内で発病する、いわゆる輸入真菌症と