

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

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 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 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 MgSO<sub>4</sub>
  - 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 60 分、95 5 分とし、4 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 階段階希釈 ( $10^{-1}$  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.
2. 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.
3. 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.
4. 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

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. Tserennorov, 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、坊園慶信、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)

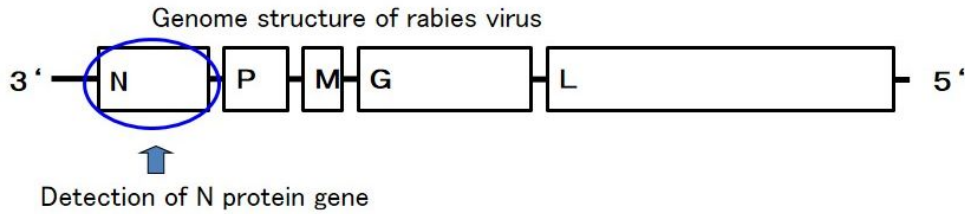
2 × QuantiTectRT-master mix	25 μl
primer F (10pmol)	2 μl
primer R (10pmol)	2 μl
Probe	2 μl
QuantiTect RT mix	0.5 μl
Total RNA	4 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	14 μl
Uracil-Nglycosylase	0.5 μl
Total	50 μl

\*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 RT 反応	50	30min	
	95	15min	
Stage3 PCR 反応	94	15sec	45cycles
	58	60sec	

狂犬病 図 2 a . 使用したプライマーとプローブ

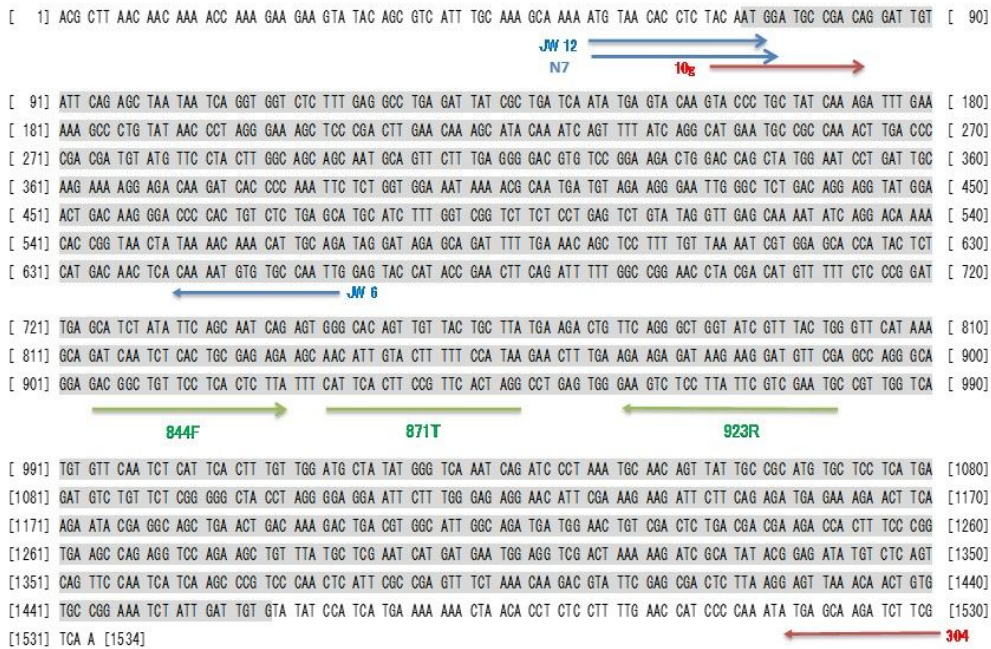


Primer pair /Probe for real-time PCR

Primer/Probe	Nucleotide Sequence
844F	5' -GAGACGGCTGTTCTCACTCTTA-3
923R	5' -GCATTTCGACGAATAAGGAGACTTCC-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



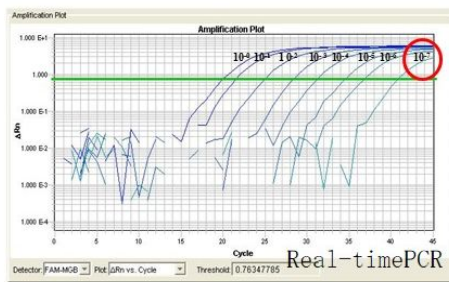
狂犬病 図3 . 構築したリアルタイムPCRの感度

Comparison of the sensitivity of each method

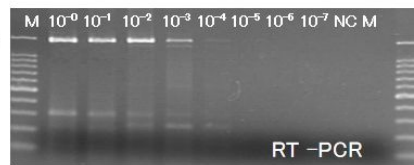
methods	Virus RNA concentration*							
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
RT-PCR**	+	+	+	+	±	-	-	-
Real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+

\* $\geq 10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>

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

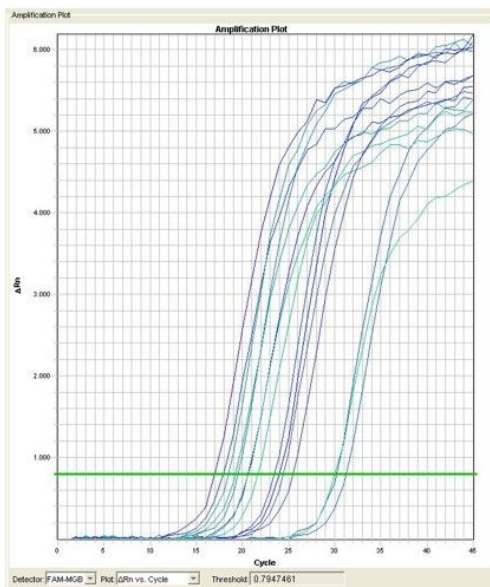


1,488 bp→



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



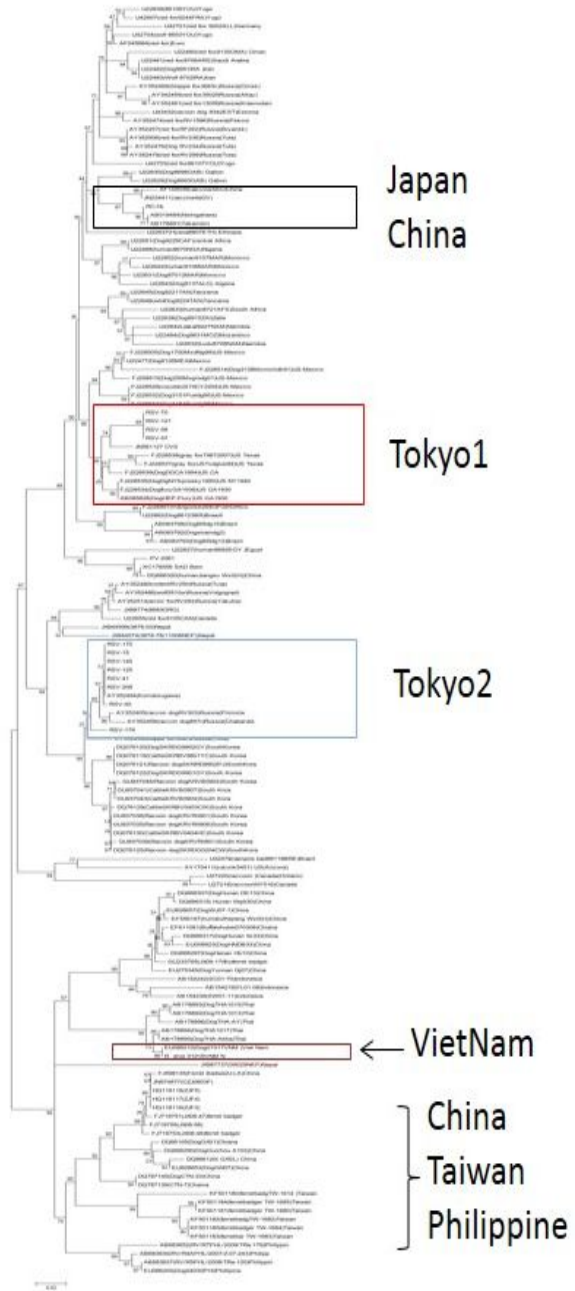
Cluster	Strain
Tokyo1	RVS57, RVS58, RVS70, RVS121
Tokyo2	RVS40, RVS41, RVS125, RVS145, RVS170, RVS208 Komatsugawa
Japan/ China	RC-HL Nishigahara

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

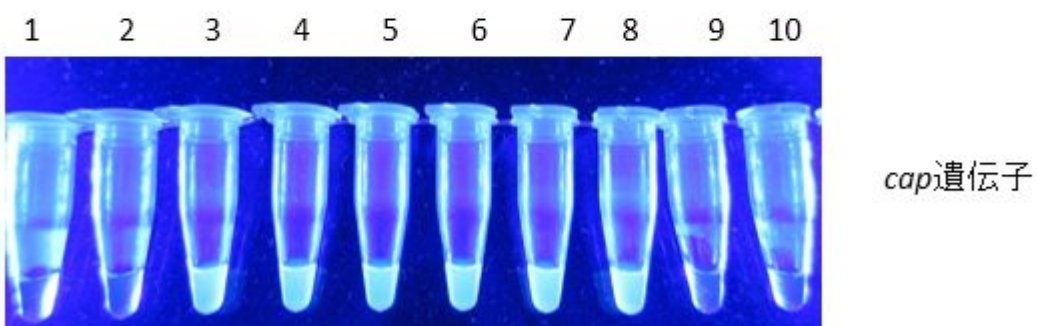
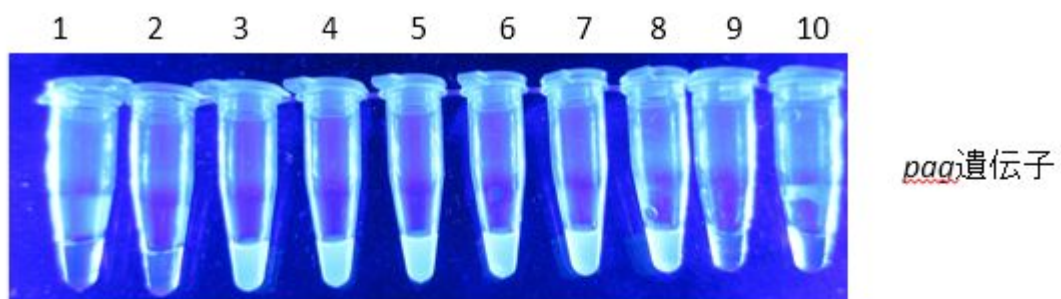


狂犬病 図5 . アジアで流行している狂犬病ウイルスの系統樹

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	GCGGATAATTCTAGAATTTTCAGAAG
cap-B3-Qiao	ATGTTGATGAGGGATCATTG
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.



