

201447025A

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

海外研究機関等との感染症に関する共同研究
および連携強化に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 倉根 一郎

平成27 (2015) 年 3 月

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

海外研究機関等との感染症に関する共同研究 および連携強化に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 倉根 一郎

平成27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の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）による委託業務として、倉根一郎が実施した平成26年度「海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- 海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化に関する研究・・・1
倉根一郎（国立感染症研究所）

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. インフルエンザ実験室診断の精度向上に関する海外機関との共同研究に関する研究・9
小田切孝人（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）
2. 蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発に関する研究・・・13
高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
3. 下痢原性病原細菌に関する研究・・・17
大西 真（国立感染症研究所 細菌第一部）
4. 下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究・・・21
片山和彦（国立感染症研究所 ウイルス第二部）
5. 海外研究機関研究員の研修に関する研究・・・23
大石和徳（国立感染症研究所 感染症疫学センター）
6. アジア地域の研究者向け薬剤耐性菌の検出、分子疫学、ゲノム解析の研修・・・25
柴山恵吾（国立感染症研究所 細菌第二部）
7. 病原体ゲノム情報の取得とデータベース運用・・・55
黒田 誠（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター）
8. チクングニアウイルス遺伝子型間共通迅速診断法の開発・・・61
西條政幸（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
9. アジアにおける感染症病理診断レファレンス・コンサルテーションネットワークの
形成に関する研究・・・73
長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部）
10. 新興再興感染症制御プロジェクトにおける若手研究者等の研修システムの構築・・・75
宮川昭二（国立感染症研究所 国際協力室）

III. 学会等発表実績・・・77

I. 委託業務成果報告（総括）

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（総括）

海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化に関する研究

業務主任者 倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

研究要旨

多くの新興・再興感染症が発生しており我が国への脅威となっている。特に、インフルエンザ、デング熱、薬剤耐性菌感染症、下痢性感染症は我が国にとって近年大きな問題となっている感染症である。これら各感染症に対して新たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が求められている。本研究においては、インフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌およびノロウイルスに関して、アジア各国と日本を結び付ける体制を確立し、アジアにおいて流行して病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し、さらにデータベースが継続的に維持されるための技術協力・共同研究の基盤を確立することを目的とした。この目的達成のため、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)の海外拠点研究機関、アジア各国の国立研究機関との連携・共同研究、国内においては各地の地方衛生研究所との連携を行った。海外拠点と国立感染症研究所間において、各病原体カウンターパート研修、感染症制御セミナー開催、FETP 初期導入コースへの参加、国内感染症専門家の海外研修等の研修プログラムを実施した。また、本研究で整備されるゲノムデータベースは、これら各感染症に対しての新たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が促進されるとともに、我が国の感染症対策に大きく貢献する。

研究分担者：

大石和徳 国立感染症研究所感染症疫学
センター センター長

大西真 国立感染症研究所細菌第一部
部長

小田切孝人 国立感染症研究所インフル
エンザウイルス研究センター
センター長

片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第
二部室長

黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノ
ム解析研究センター・センター
長

西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第
一部部長

柴山恵吾 国立感染症研究所細菌第二部

部長

高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第
一部室長

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理
部部長

宮川昭二 国立感染症研究所国際協力室
長（平成 26 年 10 月 19 日まで
研究分担者）

A. 研究目的

多くの新興・再興感染症が発生しており我が国への脅威となっている。このうち、インフルエンザ、デング熱、薬剤耐性菌感染症、下痢性感染症は特に近年我が国にとって大きな問題となっている感染症である。これら各感染症に対して新

たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が求められている。ゲノム科学の進展を生かし、新薬開発を加速させていくためには、各病原体のゲノム情報の整備が必須であるが、そのためのゲノムデータベースは整備されていない。特に、これらの各感染症はアジアにおける発生が問題となることから、アジアにおいて分布するこれら各種病原体のゲノム情報が特に重要となる。

本研究においては、近年特に大きな問題となるインフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌およびノロウイルスに関して、アジア各国と日本を有機的に結び付けるシステムを確立し、アジアにおいて流行している病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し、さらにデータベースが継続的に維持されるため基盤を確立することを目的とする。この目的達成のためには、アジア各国に存在する研究施設との共同研究が必須である。本研究において、アジア各地に展開する、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)に参加している海外拠点研究機関、及びアジア各国の国立研究機関との連携・共同研究、国内においては各地の地方衛生研究所との連携を行う。

B. 研究方法

ゲノムデータベースを確立するため、J-GRIDに参加海外拠点研究機関、及びアジア各国の国立研究機関(ベトナム、インド等)、国内地方衛生研究所との連携・共同研究を行った。特に、J-GRID海外拠点機関の若手研究者に対して国立感染症研究所における研修機能を整備し継続的な研修が可能となる体制を確立した。一方、国立感染症研究所や地方衛生研究所の職員を、海外研究拠点に派遣し海外拠点での研修と共同研究を可能とする体制を整備した。

1. 研修全体計画

1) カウンターパート研修等：J-GRID海外拠点若しくは海外国立感染症研究機関等から若手研究者を感染研に招き、共同

研究及び技術指導を行う。国内の若手研究者をJ-GRID海外拠点若しくは海外国立研究機関等へ派遣し、共同研究等を行った。さらに、研修実施に資するため、村山庁舎内の研修用ラボに次世代シーケンサーなどの試験検査機器を整備した。

2) 感染症制御セミナー開催：J-GRID海外拠点若しくは海外国立感染症研究機関等から若手研究者等を、感染研等が開催する「感染症制御セミナー」に招へいし、感染研等が行う病原体ゲノム情報の収集・解析等の研究、感染症流行予測及び対策、診断、治療等開発の講習を行った。

3) 国内感染症専門家の海外研修：地方衛生研究所等の感染症専門家をJ-GRID海外拠点、海外国立感染症研究機関、WHO等に派遣し、現地での研究、技術協力、人材育成を行い、我が国に侵入する恐れのある新興・再興感染症等の疫学状況などについて研修を行った。

2. カウンターパート研修

1) ゲノム解析法：次世代シーケンサー解読および情報解析の技術指導を通して主要担当者を養成する。さらに、海外拠点の現場でバイオインフォマティクス情報解析をメインにした技術講習、病原体ゲノム情報の活用法の研修を行った。

2) ノロウイルス：次世代シーケンシング技術を研修して、アジア地域の網羅的全ゲノム塩基配列解析を実地研修する。次世代シーケンシング用ライブラリー構築、次世代シーケンサー使用方法、出力されたデータの解析ワークフロー習得、時系列分子系統解析法を研修した。

3) 下痢原性病原細菌：次世代シーケンサーを用いて下痢原性病原細菌(大腸菌等)の全ゲノム配列を取得し、系統解析、病原因子プロファイリング、抗原合成遺伝子系の体系的解析を研修した。既存の分子タイピングの実験を経験し効率のよいゲノム解析を実施する技術を研修した。

4) 薬剤耐性菌：耐性菌、耐性遺伝子、臨床的および公衆衛生学的意義、検出法について講習を行い、また実際に実験室で実習を行った。海外拠点の研究者に対

しては特に、薬剤感受性試験、及び遺伝子タイピングの研修を行った。知識技術の習得後、各機関で分離された耐性菌のゲノム情報を収集し、共通データベースを構築した。

5) 蚊媒介性ウイルス感染症：新たな蚊媒介性ウイルスに対するリアルタイム RT-PCR 法、血清診断法を評価した。

6) インフルエンザ：インフルエンザ実験室診断の精度向上に関する研修、及び鳥インフルエンザの調査および鳥インフルエンザウイルス感染に関する疫学調査研修を行った。

(倫理面への配慮)

研究遂行の過程で患者の個人情報や疫学情報を扱う必要が生じた場合には、各施設の研究倫理委員会の承認を得たうえで研究を遂行した。

C. 研究結果

1. 海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化のための基盤構築

(1) エボラウイルス感染症実験室診断技術研修

2014年12月15～19日、ザンビア、ガーナ、インドネシア、フィリピン、タイ、ラオス及びベトナムの7カ国の研究機関(J-GRID拠点など)から18名の専門家を招聘し、感染研村山庁舎においてエボラウイルス感染症実験室診断技術研修(Laboratory Diagnosis of Ebola Virus)を行った。研修には東京大学医科学研究所及び長崎大学から2名の専門家も参加した。

(2) 感染症制御セミナー

2015年1月22～23日、中国、タイ、インドネシア、フィリピン、ザンビアなど7カ国の研究機関(J-GRID拠点など)及び地方衛生研究所から計73名の研究者を招聘し、池袋サンシャインシティ内会議室において、感染症制御セミナー(NIID International Seminar on Infectious

Diseases)を開催した。同セミナーでは、インフルエンザ、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌及びノロウイルス等の感染研が行う病原体ゲノム情報の収集・解析等のほか、それらを活用した感染症の流行予測、診断・治療等について、最新の研究状況等を研修した。また、海外からセミナーに参加した専門家は、1月24日に国立ハンセン病資料館を訪問し、我が国のハンセン病対策の歴史等について研修を行った。

(3) カウンターパート研修

インフルエンザウイルス、薬剤耐性、細菌性下痢症(コレラ)、E型肝炎及びウイルス性下痢症について、J-GRID拠点等から若手研究者(7カ国、18名)を感染研に招聘し、1～2週間の研修を実施した。

ウイルス性下痢症、蚊媒介性感染症及び人獣共通感染症について、感染研及び地方衛生研究所の若手研究者(5名)をJ-GRID拠点等(3カ国)に派遣し、1～2週間の研修を実施した。

(4) その他

感染研が主催する「感染症危機管理研修会」及び「希少感染症診断技術研究会」にJ-GRID拠点から若手研究者(邦人)が参加した。

2. インフルエンザ実験室診断の精度向上に関する海外機関との共同研究に関する研究

海外の季節性インフルエンザウイルスおよび鳥インフルエンザウイルス株の収集および性状解析について共同研究を行う事を目的とし、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)の神戸大学 新興・再興感染症 国際共同研究拠点のアイランガ大学熱帯病研究所から研究者を招聘し技術研修会を行った。また、モンゴルの National Influenza Center である National Center for Communicable Diseases と同様に共同研究を行う事を目的とし、研究者を現地に派遣して技術研修会を開催した。

3. 蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発

に関する研究

日本国内で流行のなかったデング熱が、東京都で国内発生した。地方の衛生研究所においては、デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR は4つの型に関して実施する必要もあり、従来の PCR を使用しているところも多かった。そこで、我々の設計したデングウイルス 1 型~4 型を1つのチューブで検査できるように Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay の構築を試みた。その結果、94.6%の一致率を示した。今後、改良し海外の研究機関でも評価する。

4. 下痢原性病原細菌に関する研究

下痢原性病原細菌に関し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を取得し、系統解析、病原因子プロファイリング、抗原合成遺伝子系の体系的解析の研究を企画し、実行した。コレラ菌、赤痢菌に関して、ベトナム、タイ、インド、フィリピンの研究者を国立感染症研究所に招いて、ゲノム DNA 調整ならびに次世代シーケンサー解析のためのライブラリー作りを研修した。また、既存の分子タイピングの実際を経験し効率のよいゲノム解析を実施する技術を研修した。

5. 下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス）の全ゲノム配列解析技術の研修と、配列解析の共同研究を J-GRID 拠点を通じて実施するための研修を中心に行った。大阪大学タイ J-GRID 拠点を通じ、タイ NIH 職員2名を受け入れた。同時にタイ NIH からは下痢症ウイルス感染者の便検体48サンプルが持ち込まれた。研修は、コンベンショナルな RT-PCR によるノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスの検出、次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列解析を実施した。

6. 海外研究機関研究員の研修に関する研究

急性胃腸炎患者の起因ウイルス検査診断および食品中に含まれるウイルスの検出に関する国際研修プログラムの構築ならびに研修を実施するための先進的な病原体検出系の構築を行った。その結果、水系感染を引き起こす主要ウイルスの国際研修プログラムが完成した。また、次世代シーケンサーを導入し、経口感染症の原因となる病原体の網羅解析に関する検出系の一部構築を行った。また、NGS を用いた英語による研修プログラムの作成・構築も一部完成した。

7. アジア地域の研究者向け薬剤耐性菌の検出、分子疫学、ゲノム解析の研修

アジア各国の研究者を招聘し、薬剤耐性菌の検出やサーベイランスに関する技術研修を行い、各国での薬剤耐性菌対策のレベルの向上を図り、また今後の共同研究体制を構築することを目的とした。国立感染症研究所細菌第二部第一室にて、アジア各国の研究者向け研修プログラムを作成した。プログラム内容は主に、現場ですぐに活用できることを目指して作成した。アジア各国で拡散しており、かつ特に注意を要する耐性菌について、検出法や着目すべき点などについて講義と実習を行った。研修は単なる実験技術の習得だけでなく、実験結果と菌株の疫学情報とを合わせて総合的に解釈し、実際に感染対策に資するようにすることを目指した。また、今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる作業や、感染研で行なう解析についても研修を行った。中国、フィリピン、韓国、ベトナム、台湾から1名ずつ、ミャンマーから3名の研究者が来所し研修を受けた。

8. 病原体ゲノム情報の取得とデータベース運用

近年特に大きな問題となっているデングウイルスの感染伝播状況を把握するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) database から計7,933株分のデングウイルス・ゲノム配列

を取得し、serotype, genotype 毎に分類して Google Maps にて分布地図を作成した。世界各国で分離されるデングウイルスの genotype には特徴的な地理的要因が背景にあり、それはデングウイルスの蚊を媒介とする感染伝播ライフサイクルに起因するものと推測された。

9. チクングニアウイルス遺伝子型間共通迅速診断法の開発

チクングニアウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の+鎖 RNA ウイルスである。チクングニアウイルスにはアジア型、中央・東・南アフリカ型、西アフリカ型の遺伝子型が存在する。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しておりチクングニアウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。より迅速かつ全ての遺伝子型のウイルスを検出することを目的とした RT-PCR 法の開発を行った。アジア型および中央・東・南アフリカ型のチクングニアウイルスを検出できる特異性の高い Real time RT-PCR 法を開発した。

10. アジアにおける感染症病理診断ネットワークに関する研究

国立感染症研究所感染病理部で開発したマルチウイルスリアルタイム PCR 検索システムによる、不明感染症病理検体に対する網羅的ウイルス解析法について、マレーシアのマラヤ大学医学部において講演を行った。レファレンス症例として解析依頼を受け、病原体検索と報告を行った。さらに帰国後に共同研究依頼を受け、慢性扁桃炎あるいは扁桃過形成として同大学医学部病院で過去に外科的手術により摘出された扁桃 22 例についてレファレンス症例としてウイルスの網羅的解析を行った。これらの検体から、パルボウイルス B19 とメルケル細胞ポリオーマウイルスがそれぞれ 1 例ずつ検出された。

D. 考察

感染症には国境はなく、一国で発生した感染症の病原体は、ヒトあるいは物を

介して瞬く間に世界中に拡散し、時には莫大なる被害をもたらす。従って、我が国における感染症対策においても、海外特にアジアにおける病原体の情報を常に把握し、侵入を未然に阻止する対策が求められる。いつ発生するか、またはどのような状況で伝播するかわからない感染症に対しては、常時監視体制の確立と迅速なる対応が最も効果的阻止法である。また、病原体は常に変異を繰り返していることから、各種病原体のゲノム情報の整備は感染症対策の根幹をなすものである。本研究では、特にインフルエンザ、デング熱、薬剤耐性菌感染症、下痢性感染症に関し国立感染症研究所、J-GRID 参加各機関、アジアの国立研究機関、及び地方衛生研究所をネットワーク化した感染症データベースの整備を行う基盤を確立した。本研究で整備されるゲノムデータベースは、これら各感染症に対しての新たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が促進されるとともに、我が国の感染症対策に大きく貢献する。そのため、J-GRID 各研究機関や関連するアジア各国国立研究機関との継続的な共同研究が必要となることから、海外拠点機関の若手研究者に対して国立感染症研究所における研修機能を整備し研修体制を確立した。一方、国立感染症研究所や地方衛生研究所の職員を、海外研究拠点に派遣し海外拠点での研修やゲノム解析を可能とする体制も整備した。

本研究で得られるゲノム情報を利用することにより、病原体の侵入あるいは拡散を未然に防止する対策に結びつけることが可能であり、健康被害を最小限に食い止めることができる。また、本研究での共同研究基盤は、他の病原体に対しても応用可能であり、我が国における感染症研究基盤を大きく進展させた。

E. 結論

近年特に大きな問題となるインフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌およびノロウイルスに関して、アジア各国と日本を有機的に

結び付けるシステムを確立し、アジアにおいて流行している病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し、さらにデータベースが継続的に維持されるため基盤を確立することを目的として研究を遂行した。この目的達成のためには、アジア各国に存在する研究施設との共同研究が必須である。本研究においては、アジア各地に展開する、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)に参加している海外拠点研究機関、及びアジア各国の国立研究機関との連携・共同研究、国内においては各地の地方衛生研究所との連携体制を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.

Kuroda M, Niwa S, Sekizuka T, Tsukagoshi H, Yokoyama M, Ryo A, Sato H, Kiyota N, Noda M, Kozawa K, Shirabe K, Kusaka T, Shimojo N, Hasegawa S, Sugai K, Obuchi M, Tashiro M, Oishi K, Ishii H, Kimura H. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep* 2015 Feb 2;5:8185. doi: 10.1038/srep08185.

高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・脳症の病理 *Neuroinfection* 19:32-39, 2014

2. 学会発表

国際学会

Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)

Tomohiko Takasaki. Local Transmission of Dengue in Japan, August to October 2014. NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22-23rd, January, 2015 (Tokyo)

Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

国内学会

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

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 18-19 日 (東京)

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 23-25 日 (岡山市)

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 10-12 日 (横浜市)

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)

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)

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)

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹
不明脳炎症例の臨床検体からの原因ウイルスの網羅的検索。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014/11/10-12、パシフィコ横浜

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹
不明脳炎症例の病理組織検体からの原因ウイルスの網羅的検索。第 19 回日本神経感染症学会、金沢、2014/9/4-6、金沢歌劇座

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹
不明脳炎症例の臨床検体における原因ウイルスの網羅的検索。第 18 回日本神経ウイルス研究会、浜松、2014/6/20-21、アクトシティ浜松

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹
不明脳炎における原因ウイルスの網羅的検索。第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2014/6/5-7、学術総合センター

西條政幸. 日本における重症熱性血小板減少症候群とダニ媒介性脳炎の流行. 第 19 回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014 年 9 月 4-6 日.

西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷秀樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Singh H、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統

学的特徴とその地理的分布. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

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

II. 委託業務成果報告（業務項目）

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）

インフルエンザ実験室診断の精度向上に関する海外機関との共同研究に関する研究

担当責任者	小田切孝人	国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター センター長
研究協力者	影山 努	国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長
	高山 郁代	国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官
	中内 美名	国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官
	渡邊 真治	国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長

研究要旨 新興・再興感染症対策として、アジア各国に存在する研究施設との共同研究によりアジアで流行するインフルエンザウイルスの収集および詳細解析を行う事は、ウイルスゲノムデータベースの充実に繋がり、データベースを利用した診断法、治療薬、ワクチン等の開発にも役立つ。今回は、海外の季節性インフルエンザウイルスおよび鳥インフルエンザウイルス株の収集および性状解析について共同研究を行う事を目的とし、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)の神戸大学 新興・再興感染症 国際共同研究拠点のアイランガ大学熱帯病研究所から研究者を招聘し技術研修会を開催した。また、モンゴルの National Influenza Center である National Center for Communicable Diseases とも同様に共同研究を行う事を目的とし、研究者を現地に派遣して技術研修会を開催する予定である。

A. 研究目的

H5N1 亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルスは 2003 年以降、ヨーロッパ、中東、アフリカ、アジア地域で流行しており、家禽への感染によりこれらの地域では甚大な経済被害がもたらされている。一方、高い死亡率を伴ったヒトへの感染例も各地で発生しており、特に東南アジア地域のベトナム、インドネシア、カンボジア、中東地域のエジプトでは他の地域に比べて、多数のヒト感染例が報告されている。2003 年以降 2015 年 1 月までに 16 カ国 694 人の感染者および 402 人の死者が確認されている。高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染は、このウイルスに感染した家禽などの鳥との直接的な接触等によ

って起きるが、遺伝子再構成あるいは遺伝子変異により、ヒトからヒトへの感染が起きやすい性質へ変異してパンデミックとなる事が危惧されている。

また、H7N9 亜型 鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が、2013 年 3 月に世界で初めて中国で報告され、以降 2015 年 2 月までマレーシア、台湾、カナダでの輸入感染例を含め 489 の感染例が確認されている。H7N9 亜型 鳥インフルエンザウイルスは、家禽への病原性が低いため、家禽が感染しても死亡せず追跡が非常に困難であり、ウイルスに感染した鳥を同定する事が非常に難しい。既にモンゴルと国境を接している中国広西壮族自治区でこのウイルスが検出されている事から、モンゴ

ルへの流行が懸念されている。

他にも近年では H9N2、H6N1、H10N8、H5N6 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例も報告されており、これらのウイルスを起源とする新型インフルエンザウイルスの発生も危惧されている。

これら鳥インフルエンザウイルスは季節性インフルエンザウイルスと遺伝子再構成を起こして、新型インフルエンザウイルスが出現する可能性もあり、季節性インフルエンザウイルスを含めた鳥インフルエンザウイルスの監視は重要である。

本研究では、アジアで流行するインフルエンザウイルスの収集および詳細解析を行い、ゲノムデータベースを構築して、診断や治療薬、ワクチン開発に役立てることを目標に、アジア各国に存在する研究施設との共同研究を行う事を目的とする。

B. 研究方法

今回は、高病原性鳥インフルエンザ発生国におけるサーベイランス拡充を行う事を目的に、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム (Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases: J-GRID) の神戸大学 新興・再興感染症 国際共同研究拠点であるアイルランガ大学熱帯病研究所 (インドネシア スラバヤ市) と海外の季節性インフルエンザウイルスおよび鳥インフルエンザウイルス株の収集および性状解析を行う事を目的とした共同研究を行うため、2014 年 12 月 8 日～19 日の間、同研究所より 1 名の研究員 (Ms. Edith Frederika) を国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターに招聘し、インフルエンザウイルスの分離培養法、遺伝子解析法、遺伝子診断法、インフルエンザウイルス株サーベイランスの現状と課題等についてなど、実験室診断の精度向上を図るための技術研修会を開催した。

また、モンゴル国で National Influenza Center として WHO の Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) に参画し、インフルエンザウイルス株のサーベイランスを行っている National Center for Communicable Diseases へ、2015 年 3 月 5 日～12 日の間、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 中内 美名 主任研究官を派遣して、インフルエンザウイルスの性状解析などの実験室診断の精度向上を図るため、現地にてインフルエンザウイルスの分離培養法、遺伝子解析法、遺伝子診断法等の技術研修会を実施する予定である。

C. 研究結果

アイルランガ大学熱帯病研究所はインドネシア東ジャワ州スラバヤ市東スラバヤ区に位置し、地域の中核ラボとして機能している。これまで、同研究所ではインフルエンザの診断およびインフルエンザウイルス株サーベイランスを地域の病院や保健センターなどと共同で行っていたが、予算不足や技術不足により、必ずしも体系的なインフルエンザウイルスサーベイランス態勢の構築は行われていなかった。今回のウイルス収集の基本となる診断およびサーベイランスの基本技術の移転を行ったことにより、今後、サーベイランスの拡充と効率のよいウイルス収集が可能になり、ゲノムデータベースに供するためのデータ蓄積が進む事が期待される。

なお、モンゴル国でも今後、インフルエンザウイルスの分離培養法、遺伝子解析法、遺伝子診断法等の技術研修会を実施する予定である。

D. 考察

今後、データベースを活用して、より簡便に鳥インフルエンザウイルスを含むインフルエンザを診断できる検出系を構築する予定で

ある。新しい診断システムは、Direct RT-LAMP法をベースとした、核酸精製操作が不要で臨床現場でも利用可能な蛍光核酸検査法を利用し、病院や保健センターなどの臨床現場でも、簡便かつ迅速に検査が行えるようにする予定で、この診断システムをアイルランガ大学熱帯病研究所でも扱えるようにすることで、周辺の病院や保健センターとの共同作業により、現地におけるウイルス株の精度の高い情報収集がさらに進むと考えられる。

なお、アイルランガ大学熱帯病研究所と神戸大学との共同研究により、家禽における鳥インフルエンザウイルスの感染源調査も継続的に行われており、生鳥市場では非常に多くのアヒルや鶏などの家禽から、H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが検出されている。今後は、これらウイルス株の遺伝子情報も入手し、診断系の精度向上に役立てる予定である。

また、モンゴル国でも、現地にてインフルエンザウイルス収集の基本となる診断およびサーベイランスの基本技術の移転を行う予定で、これによりサーベイランスの拡充と精度が高く効率の良いウイルス株の情報収集が進み、ゲノムデータベースに供するためのデータ蓄積が進む事が期待され、同時に診断系の精度向上、ワクチン株の開発等にも役立つ事が期待される。

E. 結論

インドネシアでは、国内の体系的なインフルエンザサーベイランス網がまだ未発達であり、また特に地方では必ずしもウイルスの診断技術が整備されていないため、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの家禽での流行状況やヒト感染例など、まだ不明な点

が多い。インドネシアを含むアジア諸国における新興・再興感染症のコントロールの必要性については、我が国への病原体侵入防止の観点からだけではなく、我が国だけでは得難い知見の収集および感染症対策への活用においても重要である。

今後は、ワクチンや治療薬の開発、診断法の構築などに応用するためにも、アジア各国に存在する研究施設に対して、診断やサーベイランスに関する技術移転や新しい診断技術の導入を図るなどして共同研究を推し進め、インフルエンザウイルスおよびその性状や流行状況などの情報収集を強化し、遺伝子データベースの充実を図る事が重要である。今後海外研究機関と緊密な研究協力にかかる取組みについてはさらなる強化が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発に関する研究

担当責任者 高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨 2014年8月に1945年以来、日本国内で流行のなかったデング熱が、東京都で国内発生した。多くの感染者は代々木公園でデングウイルス感染蚊に刺されており、代々木公園が感染地であった。代々木公園では多くの行事が行われていたことから、他府県からの訪問者が、地元に戻って発病し、東京都以外に9道府県で患者が報告された。地方の衛生研究所においては、デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR は4つの型に関して実施する必要もあり、従来の PCR を使用しているところも多かった。そこで、我々の設計したデングウイルス1型～4型を1つのチューブで検査できるように Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay の構築を試みた。その結果、94.6%の一致率を示したが、デングウイルス2型に関して誤判定が発生していた。今後、改良し海外の研究機関でも評価してもらう予定である。

A. 研究目的

デングウイルスには4つの血清型があり、型別リアルタイム逆転写 PCR 法を実施するには4つの反応系で実施しなければならない。したがって、検査系としては煩雑である。そのため、デングウイルス1～4型のウイルス遺伝子検出を一つの反応系（One tube アッセイ系）を開発した。

B. 研究方法

リアルタイム RT-PCR は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004) のプライマーおよびプローブの配列により、Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築し、7500 リアルタイム PCR シス

テム (ABI 社) を用いて検討した。本論文内の各血清型別 TaqMan による結果と比較解析した。

C. 研究結果

過去に国立感染症研究所ウイルス第一部で診断した輸入デング熱患者37検体(血清)を用いた。その内訳はデングウイルス血清型1型が8、2型が10、3型が8、4型が9検体、非デング熱発熱患者血清2検体であった。37検体中2検体が後判定であった。一致率は94.6%であった。2検体ともデングウイルス2型を3型、4時型に誤判定したものであった。判定に間違いはなかったが、他の血清型に対しても非特異的にカーブが

上昇した検体がデング熱陽性 35 検体中 17 検体 (48.6%) であった。

D. 考 察

リアルタイム逆転写 PCR 法 TaqMan 法は、増幅された遺伝子産物に蛍光標識したプローブが結合することによって遺伝子産物を検出する高感度ウイルス遺伝子検出法である。デングウイルスの場合、4 つの血清型があるため検査が煩雑となり、デング熱検査件数が少ない施設には普及していないのが現状である。そこで One tube で 4 つの型が検出できる Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築したが、tube あたりのプライマープローブが増えると非特異反応がでることが確認された。しかし、判定結果の一致率は 94.6%であり、誤判定をきたした 2 型のプローブ配列を改良すれば型特異性の向上が期待できる。そのうえで次年度以降、台湾 CDC にも協力を依頼して評価してもらおう予定である。

E. 結 語

One tube で 4 つの型が検出できる Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築した結果、94.6%の一致率をみた。ただし、個別に詳細を検討すると 48.6%で非特異的な反応を示していた。

F. 健康危険情報

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 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Local Transmission of Dengue in Japan, August to October 2014. NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22-23rd, January, 2015 (Tokyo)
3. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th 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 18-19 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 23-25 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 10-12 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 10-12 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 10-12 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 γ 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 10-12 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 ～70 年の時を経て～ (特別講演). 第 21 回リケッチア研究会. 平成 26 年 12 月 20-21 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

下痢原性病原細菌に関する研究

国立感染症研究所 細菌第一部

担当責任者 氏名 大西 真

研究協力者 森田昌知

研究協力者 泉谷秀昌

研究要旨 下痢原性病原細菌に関し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を取得し、系統解析、病原因子プロファイリング、抗原合成遺伝子系の体系的解析の研修を企画し、実行した。コレラ菌、赤痢菌に関して、ベトナム、タイ、インド、フィリピンの研究者を国立感染症研究所に招いて、ゲノム DNA 調整ならびに次世代シーケンサー解析のためのライブラリー作りを研修した。また、既存の分子タイピングの実際を経験し効率のよいゲノム解析を実施する技術を研修した。

A. 研究目的

下痢原性病原細菌の国際間伝播の様式を理解することが、国内の細菌性下痢症の制御に重要である。細菌の分離・同定、それに続く性状解析技術から得られた情報を比較解析することが主となってきた。近年、DNA 塩基配列決定とその比較解析や、より簡便な DNA 塩基配列多型を DNA 増幅とサイズ比較等で行うことが主流となりつつある。前者の比較解析は、血清型、ファージ感受性型、薬剤感受性型等があり従来からの知見が蓄積されている利点がある。一方で後者は系統を反映することから、変化速度を詳細に設定出来る可能性があり、より詳細な世界的な拡散の様子をトレースすることが可能となりうる。地域内、地域間の菌株比較が可能となることで、各地での対策、地域を超えたより国際的な対策立案に資することが可能となる。

DNA 塩基配列多型を最も広範に実施することが、DNA 塩基配列決定の技術革新（次世代

シーケンサーと一般には称される）により可能となってきた。また、ランニングコストの低減で、ハイスループット化も可能となりつつあり、海外研究機関との大型共同研究も各地で進められている。本研究では、JGRID 拠点をもつ複数の大学との連携を強化する目的で、下痢症細菌のゲノム調整プロトコルの共通化とその技術研修を実施すること、次世代シーケンサーの共通利用促進のための技術研修を実施すること、さらに解析対象菌株の選定のための従来法での比較解析について、研修を実施することを目的とした。

B. 研究方法

菌株は、国立感染症研究所に保存されているコレラ菌、赤痢菌を利用した。常法に従い培養を行った。

コレラ菌ゲノム DNA は、LB 寒天培地で培養した菌体を DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) キットを用いて調整した。菌量と、