

**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**
(課題番号：H23- **新興** - **指定** - 020)

平成 23-25 年度総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 **新興・再興感染症研究事業**)

研究代表者 倉根 一郎

国立感染症研究所

平成 25(2013)年 3月

目 次

1. 平成 23-25 年度 総括研究報告書

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 1

研究代表者 倉根 一郎 国立感染症研究所
研究協力者 渡邊 治雄 "

2. 平成 23-25 年度 総合分担研究報告書

プロジェクト 1 : 中国

手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析
Epidemiology of HFMD and genetic characterization of HEV71 and CVA16

研究分担者 清水 博之 国立感染症研究所
研究協力者 Xu Wenbo 中国 CDC
Zhang Yong "

侵襲性肺炎球菌感染症由来肺炎球菌の疫学的解析および
呼吸器感染症起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子解析

研究分担者 倉 文明 国立感染症研究所
研究協力者 前川 純子 "
常 彬 "

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症) の
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所

Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections

研究分担者 松山 州徳 国立感染症研究所

薬剤耐性淋菌の分子タイピング・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	中山 周一	国立感染症研究所
研究協力者	志牟田 健	〃
	大西 真	〃

腸内細菌の molecular typing に関する研究 - 中国

研究分担者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所
--------------	--------------	-----------------

V. cholerae non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する研究 - 中国

研究分担者	荒川 英二	国立感染症研究所
--------------	--------------	-----------------

・・・・・・・・・・・・・・・・

プロジェクト 2 : 台湾

赤痢アメーバに関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	津久井 久美子	国立感染症研究所
--------------	----------------	-----------------

日本および台湾における Dengue 熱輸入症例からの Dengue ウイルス遺伝子解析・・

研究分担者	高崎 智彦	国立感染症研究所
--------------	--------------	-----------------

研究協力者	小滝 徹	〃
--------------	-------------	----------

	モイ メンリン	〃
--	----------------	----------

	田島 茂	〃
--	-------------	----------

	中山 絵里	〃
--	--------------	----------

	舒佩芸	台湾行政院衛生署疾病管制局
--	------------	----------------------

	鄧華真	〃
--	------------	----------

結核菌の薬剤耐性 (台湾 CDC)

NDM-1 型薬剤耐性菌 (ベトナム NIHE)・・・・・・・・

研究分担者	柴山 恵吾	国立感染症研究所
--------------	--------------	-----------------

研究協力者	森 茂太郎	〃
--------------	--------------	----------

	金 玄	〃
--	------------	----------

	松井 真理	〃
--	--------------	----------

鈴木 仁人	〃
鈴木 里和	〃
和知野純一	名古屋大学医学部

非結核性抗酸菌感染症の研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	小林 和夫	国立感染症研究所
	阿戸 学	〃
研究協力者	松村 隆之	〃
	松本 壮吉	新潟大学大学院医歯学総合研究科
	前倉 亮治	国立病院機構刀根山病院
	北田 清悟	〃
	周 如文	台湾行政院衛生署疾病管制局
	王 振源	国立台湾大学医学院附設医院

ハンセン病の病原性と薬剤耐性に関する日台共同研究・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	甲斐 雅規	国立感染症研究所
研究協力者	牧野 正彦	〃
	前田 百美	〃
	中田 登	〃

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・・・・・・・・

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所
研究協力者	朴 英斌	〃
	戸高 玲子	〃

ブルセラ症の診断法の開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所
研究協力者	木村 昌伸	〃
	鈴木 道雄	〃
	水谷 浩志	東京都動物愛護相談センター
	山本 智美	〃
	久保田 菜美	〃

齋藤 隆一	〃
岡本 その子	栃木県保健環境センター
山本 明彦	国立感染症研究所
柳井 徳廣	岐阜大学
慕 善善	台湾行政院衛生署

台湾および日本の蚊相の違いと蚊によって媒介される病原体の遺伝的關係
蚊相ならびに採集蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果・・・・・・・・・・

研究分担者	津田 良夫	国立感染症研究所
研究協力者	金 京純	鳥取大学農学部
	鄧 華眞	台湾 CDC
	陳 典爐	〃

アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行調査と病原性解析・・・・・・・・

研究分担者	蒲地 一成	国立感染症研究所
研究協力者	鯉坂 裕美	〃
	大塚 菜緒	〃
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	鍋島 民	〃
	松本 道明	〃
	岡田 賢司	国立病院機構福岡病院
	吉野 修司	宮崎県衛生環境研究所
	河野喜美子	〃
	姚淑滿	台湾 CDC
	江春雷	〃
	渡邊峰雄	北里大学

プロジェクト3：インド

コレラ菌のゲノム進化と病原性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	森田 昌知	国立感染症研究所
研究協力者	泉谷 秀昌	＼
	大西 真	＼

汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究・・・・・・・・

研究分担者	三戸部 治郎	国立感染症研究所
研究協力者	志半田 健	＼
	小泉 信夫	＼
	Hemanta Koley	インド国立コレラ腸管感染症研究所
	Ritam Sinha	＼

腸管系寄生虫症の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	野崎 智穂	国立感染症研究所
--------------	--------------	-----------------

エイズの流行とウイルス変異に関する研究・・・・・・・・

研究分担者	俣野 哲朗	国立感染症研究所
研究協力者	石川 晃一	＼

プロジェクト4：ベトナム

腸内細菌の molecular typing に関する研究- ベトナム.....

研究分担者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

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.....

研究分担者 小泉 信夫 国立感染症研究所

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
Epidemiology and molecular characteristics of the hand, foot, and mouth disease in the North of Vietnam
.....

研究分担者 清水 博之 国立感染症研究所

研究協力者 片岡 周子 "

中島 一敏 "

Dr. Nguyen Thi Hien Thanh

**The National Institute of Hygiene and Epidemiology,
Hanoi (NIHE)**

ベトナム NIHE における麻疹、風疹ウイルス遺伝子診断技術の確立と
ベトナム北部に流行する麻疹ウイルス、風疹ウイルスの解析.....

研究分担者 駒瀬 勝啓 国立感染症研究所

研究協力者 森 嘉生 "

Dr. Nguyen Thi Hien Thanh

**The National Institute of Hygiene and Epidemiology,
Hanoi (NIHE)**

ベトナム国立衛生疫学研究所 (National Institute of Health and Environments : 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
 化に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

研究分担者	井上 智	国立感染症研究所
研究協力者	野口 章	国立感染症研究所
	奥谷晶子	〃
	加来義浩	〃
	濱本紀子	〃
	飛梅 実	〃
	阿戸 学	〃

Bazartseren Boldbaatar IVM

Nguyen Thi Kieu Anh

Hoang Thi Thu Ha

**The National Institute of Hygiene and Epidemiology,
 Hanoi (NIHE)**

ヒストプラスマ症の基礎的、臨床的研究におけ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・・・・・・・・

研究協力者	大野 秀明	国立感染症研究所
研究協力者	田辺 公一	〃
	梅山 隆	〃
	山越 智	〃
	宮崎 義雄	〃

Nanthawan Mekha, Natteewan Poonwan

(The National Institute of Health, Thailand)

Pojana Sriburee (Chiang Mai University, Thailand)

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)

Clostridium difficile 感染症の信頼性の高い細菌学的検査システムの確立と
アジアにおける *C. difficile* 感染実態調査

研究分担者	加藤 はる	国立感染症研究所
研究協力者	妹尾 充敏	"
	福田 靖	"
	柴山 恵吾	"

Vu Thi Thu Huong

Tăng Thị Nga

Lê Thị Trang

Tham Chi Dung

**The National Institute of Hygiene and Epidemiology,
Hanoi (NIHE)**

3. 平成 23-25 年度 業績

研究成果の刊行に関する一覧表 (業績)

学会発表一覧表 (業績)

平成 23-25 年度厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

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

研究代表者：倉根 一郎（国立感染症研究所 副所長）

研究協力者：渡邊 治雄（国立感染症研究所 所長）

概要：グローバル化が進むにつれ、アジア等で発生した多くの感染症が、ヒトや物の流通を通して我が国に入り込んでくる機会が増加してきている。それらの侵入をできるだけ食い止める、あるいは入り込んだ場合にもその拡散を最小限にするための方策が必要になる。その一つは、アジア等の感染症の情報やそこで発生している病原体の特徴を普段から知り、危機発生の時に迅速にそれら情報を利用できるようにしておくことである。その目的のため H23-25 年間に、アジアの感染症専門の国立研究機関との間で、共同研究契約を締結し、その地域で発生している感染症の疫学情報や病原体の遺伝学的特徴の解析を行う基盤の確立を行った。対象機関としては、中国 CDC、台湾 CDC、ベトナム NIHE(National Institute of Health and Epidemiology)、インド NICED(National Institute of Cholera and Enteric Diseases)とし、対象疾病としては、腸管系下痢症、麻疹、インフルエンザ等の呼吸器系感染症、ベクター媒介性疾患等の新興感染症、とした。各研究機関の機関長同士の打ち合わせ後、共同研究契約書を締結したことにより、共同研究ばかりでなく人的交流も促進され、危機対応時に機関同士および個人レベルにおける情報交流ができる体制が出来上がってきたといえる。特に、中国で 2009 年に SFTS が発生後、わが国でも発生しているのではとの危惧で、中国 CDC から論文発表前のデータとウイルス情報の提供を感染研が受けた。感染研として検出系の確立を行い、2013 年の我が国における最初の SFTS 患者発生への迅速対応に結びつけることができたのは、当該交流の一つのよい事例であったといえる。今後いかなる新興および再興感染症がアジア等で発生するかもしれない。その場合に、各国を代表する国の感染症に携わる研究機関同士の連携が、感染症対策の迅速なる貢献に大きな役割を果たすものと思われる。

中国 CDC: Center for Disease Control と の共同研究	倉 文明	細菌第一部
	中山 周一	細菌第一部
清水 博之	ウイルス第二部	
	駒瀬 勝啓	ウイルス第三部
森川 茂	ウイルス第一部	
	泉谷 秀昌	細菌第一部
松山 州徳	ウイルス第三部	
	2)台湾 CDC との共同研究	

津久井久美子	寄生動物部
津田 良夫	昆虫医科学部
小林 和夫	免疫部
高崎 智彦	ウイルス第一部
柴山 恵吾	細菌第二部
甲斐 雅規	ハンセン病研究セン ター
片山 和彦	ウイルス第二部
今岡 浩一	獣医科学部
蒲地 一成	細菌第二部
小泉 信夫	細菌第一部
3) インド NICED: National Institute of Cholera and Enteric Disease との共同研究	
森田 昌知	細菌第一部
三戸部治郎	細菌第一部
野崎 智義	寄生動物部
俣野 哲朗	エイズ研究センター
4) ベトナム NIHE: National Institute of Health and Epidemiology との共同研究	
泉谷 秀昌	細菌第一部
清水 博之	ウイルス第二部
井上 智	獣医科学部
駒瀬 勝啓	ウイルス第三部

大野秀明	生物活性物質部
小泉 信夫	細菌第一部
柴山 恵吾	細菌第二部
5) 国際協力の調整	
宮川昭二	国際協力室

A. 研究目的：

高病原性鳥インフルエンザ、デング熱、下痢性疾患等のアジアで発生している感染症が旅行者等を通しわが国に進入する危険性が常に存在している。それらの発生状況を常時に把握し、わが国への侵入あるいは拡散を防止する事前対応が必要である。そのため、感染研では東アジア地区（中国、韓国、台湾）やインド等に存在する感染症を専門とする国立の研究機関（国立感染症研究所と同じような機能を持つ機関を対象にする）や ASEAN 機構との共同研究契約（MOU）を締結してきている。問題となる病原体の正確な情報、および特徴を日常的に把握し監視していくために当該研究機関とのネットワークを構築し、感染症情報および病原体情報の交換を行う。本研究においてはアジアで問題となっている感染症、腸管系下痢症、麻疹、インフルエンザ等の呼吸器系感染症、ベクター媒介性疾患等の新興感染症を対象に研究プロジェクトを組織し、アジア地域とのネットワークを構築し、病原体検査法の標準化および共通のマニュアルの作成、病原体の分子疫学的解析の共同研究、病原体情報の効率的交換の促進を図る。さらにアジアの各地域の研究機関に研究委託を行い、そこで分離される病原体の分布、病原体の遺伝学的特徴等

の調査・解析、そのデータ・ベースの構築を行う。今までに、コレラ菌、デング熱ウイルスを用いて、アジア・環太平洋諸国のCDC 様研究機関との共同研究により、ゲノムの多様性を解析する手法の標準化、その制度管理“いわゆる PulseNet Asia”や“パルボネット”の構築を行ってきた実績がある。病原体を各国から手に入れるのは国際的に非常に難しい状況にある。原則的には各国で分離される病原体は委託して各国で解析してもらい、わが国では輸入感染症として分離される病原体を解析しそれらの比較解析、データベース化を行うことを基本とする。また、連携各国との国際シンポジウムを定期化し、情報の交換、人的交流を図る。それらが総合的に、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に貢献することに繋がるであろう

B. 研究方法

対象国；中国 CDC,台湾 CDC,インド NICED,ベトナム NIHE

全体計画：腸管系感染症、呼吸器系感染症、ベクター媒介性感染症および新興感染症の病原体を中心に、東アジアの CDC 様機能を持つ感染症の国立の専門研究機関（中国 CDC, 韓国 CDC/NIH, 台湾 CDC）およびインド（NICED）、ベトナム（NIHE）との共同研究を促進する。これらの研究所は、今までに感染研との間で共同研究契約（MOU）を締結してきた機関であり、実質的な共同研究体制の確立に繋がる。プロジェクト間の連携は、毎年少なくとも1回以上会合を持ち、進捗状況、意見交換を行う。現在は、病原体の移動・輸入が難しい状況にあるので、各国

で患者、あるいは動物等から分離される病原体を解析し（委託研究）、そのデータベースを、国立感染症研究所を中心に集積することを原則とする。

共通目標：各研究機関との共同研究プロトコルの作成を行った。各病原体の分離・検査法の確立と統一、検査マニュアルの作成、分子疫学的手法の開発と統一化、解析マニュアルの作成をH23年度から開始した。統一された方法に基づき各国で分離される病原体の疫学マーカーの解析を行い、わが国のものとの比較検討を行う。結果のデータベース化を行い、共通に利用できる体制を構築する（H24, 25年度）。新しい解析手法の開発に成功した場合には、お互いの国間での技術移転を行う。人的な交流も促進し、健康危機の発生時には迅速に情報の交換が行える体制を構築する。主任研究者が全体の進捗を調整する。分担研究者は研究組織に記載した病原体を担当する

各論：

中国CDC+韓国CDC/NIH：(1)腸管感染症として細菌（赤痢菌、コレラ菌）、ウイルス(EV71)の病原体の分子疫学手法の開発、病原体のgenotypeの比較解析、(2)ウイルス性出血熱；最近中国でダニを媒介とするブニヤウイルスが新規に発見された。その検査法の確立および媒介蚊、ウイルスの分布域を共同で調査する。また、新しいウイルスの存在に関する調査を行う。(3)呼吸器感染症：レジオネラ、麻疹、インフルエンザ等の病原体疫学調査、分子疫学調査をおこなう。一定のGenotypingにより病原体のデータベ

ース化、

台湾CDC: (1)ベクター媒介性ウイルス感染症:台湾ではデング熱が流行している。その媒介蚊、ウイルスのgenotypeの疫学調査、(2)腸管病原体;赤痢アメーバ、下痢性ウイルス疾患の疫学調査、genotypingの比較、(3)結核菌の薬剤耐性:薬剤耐性パターン及び病原体のgenotypeの比較による国を超えての菌の伝播の調査、(4)らい菌の薬剤耐性調査、(5)希少感染症としてのレプトスピラ、ブルセラの調査、診断法の開発。

インドNICED: (1)インドで問題となっている下痢性疾患の迅速診断法の開発、新規の遺伝型の発生メカニズムの解析;病原体としてコレラ、赤痢、原虫症ジアルジアを扱う。(2)インドではHIV感染症が重要な課題。HIVウイルスのgenotypeの比較解析。ウイルスゲノムの変異とHLAとの関連性の進化的解析。

ベトナムNIHE: (1)ベトナムで流行しているEV71, HFMDの解析、(2)国境を越えて移動する狂犬病ウイルスの解析、(3)真菌の中重症のヒストプラズマ症の疫学、(4)麻疹、風疹の分子疫学、(5)コレラの流行解析と分子疫学、(6)炭疽菌の分子遺伝学的解析、(7)増加する耐性菌NDM-1の解析

C. 研究結果:

1. **全体としての活動:** 研究代表者、研究協力者(倉根、渡邊 宮川)

2011年に各研究機関との連携の締結を結び、毎年(2011-2013),相互の国において研究発表会を行い、研究の進捗状況の把握、研究の方向性の相談、確認を行った。相互の

機関長の出席のもとに行われ、機関と機関の間での共同研究を進めるという方針で遂行した。これにより、感染症危機管理の面からも相互の連携が強化されることとなった。

1)中国 CDC との連携:

中国では、2008年5月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。2008~2012年にかけて、約720万人の手足口病症例、2000名強の死亡例が報告された。手足口病症例報告体制とともに、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークによる実験室診断体制が整備され、手足口病症例の約3.7%について実験室診断が行われた。中国全土のEV71分離株の分子疫学的解析を行い、1996~2012年にかけて中国で検出されたEV71分離株のほとんどが遺伝子型C4に属し、遺伝子型C4は、C4aとC4bに細分類されることが明らかとなった。WHO西太平洋地域事務局、感染研、CCDCを含む専門家の協力の下、WHO手足口病ガイドライン”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)”を作成・公開した。(清水)

中国CDCのYuelong Shu博士と情報を共有し、インフルエンザ以外のARIウイルスについて、原因不明病原体の解析、ウイルス分離技術の向上を試みた。まず、ARIの検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みた。肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼTMPRSS2を利用して細胞に感染することが報告されており、

TMPRSS2 の発現した細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス(229E、NL63、SARS)と新型コロナウイルス(MERS-HCoV)に対する感受性を比較した。TCID50、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。(松山)

2009 年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)の原因ウイルスは、ブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス(SFTS ウイルス: SFTSV)であることが 2011 年に中国 CDC によって報告された。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず、日本を含めアジア、太平洋地域に広く生息していることから、中国 CDC から情報を入手して、組換えウイルス蛋白による血清診断系の開発、組換えウイルス蛋白に対する抗体作成、患者診断用の RT-PCR 等を準備した。2013 年 1 月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。患者の実験室診断には、1)患者診断用 RT-PCR が有効であった、2)ウイルス分離同定や、免疫組織学的染色に、組換えウイルス蛋白に対する抗体が極めて有用であった。2012 年 11 月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に分与された SFTS ウイルス HB29 株を用いて作製した抗体検出法は感度が高く、そ

の後の動物の血清疫学調査等に活用された。マダニからのウイルス遺伝子検出は、MGB プローブによるリアルタイム RT-PCR 法を確立し、反応が陽性対照コンタミによるのか否かを同時に確認できる系へと改良された(森川)

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、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析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行った。また、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* お対象に 0 血清型別ならびに病原因子の探索を行い、その発生と流行の傾向についての調査を行った。共同研究にあたり中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、赤痢菌の分子タイピング、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する共同作業を行った(泉谷 荒川)。

中国における *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 164 株(冷却塔水由来 96 株、温泉由来 42 株、水道水由来 26 株)の遺伝子型別の結果も、ST1 が 49.4% を占め、次いで ST154 が中国(6%)でも日本(3%)でも多く、中国と日本で同様の傾向があることがわかった。温泉分離株の遺伝子型が多様であることも同様の結果だったが、冷却塔水分離株の多くが共通、あるいは似た遺伝子型であったのに対し、浴槽水・温泉分離株で共通の遺伝子型は、見られなかった。日本と中国で共通の遺伝子型に

についても、それぞれ独自の遺伝子型についても、臨床からも分離される遺伝子型が多くあり、それらの菌が生息する環境水が感染源となりうる危険性が示唆された。(倉)

日本国内の IPD 由来肺炎球菌の MLST 解析を行った結果、アジアを含む世界各国で多く分離されている多剤薬剤耐性 ST320 型 19A 肺炎球菌は日本の特定な地域に分離された。欧米では、ST320 型 19A 肺炎球菌は PCV7 が導入された後、多剤耐性 ST320 型 19F 肺炎球菌の capsular switching によって変換されたタイプで、ワクチンによるセレクションされたと報告されている。しかし、中国では、日本と同様に、PCV7 が導入される前から ST320 型 19A 肺炎球菌の分離がみられた。(常)

台湾 CDC との連携

日本では、現在、家畜における家畜ブルセラ菌感染は清浄化しており、同菌に感染する患者も輸入患者に限られている。台湾においても感染家畜の報告はなく、また、患者も過去 33 年間報告されていなかったが、2011 年初めに輸入患者 2 例が報告された。そこで、2011 年度は、日台における共同研究の端緒として、台湾 CDC におけるブルセラ症検査体制構築のために、抗体検出法として日本で標準的に用いられている試験管内凝集反応 (TAT) と我々の作成したマイクロプレート凝集反応 (MAT) を、遺伝子検出法として同じく我々の作成した Combinatorial PCR 法を移転し、

診断技術の共有を行った。2012 年度からは、日本・台湾のイヌにおける *B. canis* 感染状況調査として、同一の手技により、その抗体保有状況を検討し、比較を行った。*B. canis* に対する抗体は、国内のイヌでは、2,318 頭中 115 頭 (5.0%) が抗体陽性、すなわち感染歴を持つことがわかった。台湾については、63 検体調査して抗体陽性 1 頭、陽性率 1.6% と、日本よりも低くなっていた。(今岡)

今回台湾より供与された非病原性赤痢アメーバ株はハムスターに対して ALA 形成能を有していた。これはヒトへの病原性とハムスターへの病原性が異なる、または腸管と肝臓への病原性が異なるという二つの可能性があると考えている。今後腸管への病原性の評価方法を確立する必要がある。台湾で無症候性患者からの赤痢アメーバ株が確立できるようになったことは大きな進歩であった。今後ヒトに症状を示さない赤痢アメーバ株の解析を、特に AIG1-17 に注目しながら展開していきたいと考えている。(津久井)

百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し、台湾 CDC と共同でアジアにおける *B. holmesii* の流行状況を調査した。百日咳疑い患者 (日本 920 名, 台湾 495 名) を対象に遺伝子検査を実施した結果、*B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名 (0.3%) であった。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名 (10.1%)、台湾が 90 名 (18.2%) であり、日本の検査陽性率は台湾より低い値を示した。

日本では調査を実施した 2012-13 年は百日咳の非流行期にあったことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された（蒲池）

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・性能評価に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局 周 如文 博士、国立台湾大学病院医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源 博士と日台共同研究を推進した。本キットの異なる地域や民族における有用性に関する国際評価は未了である。共同研究の成果として、1）台湾の MAC 感染症患者血清を収集、2）MAC 抗体価を測定し、感度：61%、特異度：91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であることが示された。（阿戸）台湾 CDC との共同研究として、ハンセン病の血清診断及びハンセン病の起原菌であるらい菌の薬剤耐性に関する研究を実施した。台湾のハンセン病患者血清を用い、らい菌由来抗原 MMP-I 及び MMP-II の血清診断を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。らい菌の薬剤耐性に関する研究では 13 例の検体から抽出した DNA を用い、9 例でらい菌由来 DNA を検出し、そのうち 2 例がダブソン耐性変異を示した。（甲斐）。蚊媒介性病原体の自然の侵入経路のひとつとして、渡り鳥による持ち込み（侵入）・定着に関する検討を行った。台

湾の調査地では 2011 年～2013 年に、20 種類 13,373 個体、石垣島では 24 種類 7,499 個体の蚊成虫を採集し、鳥マラリア原虫の検出を行った。その結果、台湾で採集された 20 種の蚊のうち、9 種類の蚊から鳥マラリア原虫が検出された。3 つの系統は 3 年連続して原虫が検出されており、調査地に生息するクシヒゲカ的一种と *Cx. murrelli* などの蚊によって感染サイクルが維持されていると推測された。これに対して、これら 3 系統以外の系統は、いずれも 3 年間の調査で 1 回しか検出されておらず、感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生息していた蚊の吸血を通じて一時的に取り込まれた系統であると推測された。本研究の調査結果は、渡り鳥による病原体の持ち込みが実際に行われていることを示唆している（津田）

台湾で分離された INH 耐性結核菌で、*katG* 遺伝子の変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A の変異、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C 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。台湾を始めアジア各国で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。（柴山）

3) ベトナム NIHE との連携

日本、台湾、フィリピンおよびベトナム

ムで分離された *Leptospira interrogans* および各血清型基準株の分子タイピングを MLVA により行った。これらの国に分布する *L. interrogans* と保有動物の多様性および普遍性、動物種特異的な血清群の存在が明らかになった。ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) とともに、タインホア地域の熱源が不明の発熱患者および一般健常人の血清疫学、ネズミ、ブタおよび土壌からのレプトスピラ検出を行った。熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM が検出され、9% の患者血液からレプトスピラ DNA が検出された。また同地域の健常人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG が検出され、農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。(小泉)

ベトナム NIHE がハノイ市内の 4 医療機関と *Clostridium difficile* 感染症 (CDI) の研究をするためにネットワーク構築を行い、NIHE において *C. difficile* の分離培養が開始された。ハノイの医療機関は、抗菌薬適正使用が行われていない、病棟で複数患者が 1 ベッドを共有するなど過密な状況で感染管理が難しい等により、*C. difficile* 高病原性株の発生源・温床となりやすいと考えられた。ベトナムにおける CDI の感染実態調査および疫学調査は急務であると考えられた。新しい細菌学的検査法として、RT-PCR 法を用いた *C. difficile* 毒素遺伝子検出法の開発・評価を行った。検討検体数を増やす必要があるが、本法は、臨床検査として使用でき、さらに *C.*

difficile による感染と無症候キャリアを区別できる画期的検査法と考えられた。(加藤)

ベトナムに生息する翼手目(コウモリ)が RV を含むリッサウイルス属の自然宿主あるかを調べるために NIID で保有している 5 株 (RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) を利用した簡易中和抗体検出系を確立した。平成 24 年度は、ベトナムで流行しているウイルス株を簡易かつ迅速に検出できる LAMP 法の確立、診断ラボのネットワーク強化に必要となる検査系の検証と臨床・検査・疫学等を網羅したモデル研修を北部の流行地域で試みた。平成 25 年度は、より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるように分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現シュードタイプを利用した中和試験法の開発を試みて従来法 (RFFIT 法) 等同様の成績で感度・特異性の高いことが示された。

ベトナムの北部山岳地帯で発生した皮膚炭疽の集団発生事例の炭疽菌 DNA を抽出して MLVA と SNP による系統解析を行い分離株が西ヨーロッパや北アメリカの菌株と同じ遺伝学的クラスター (A1 クラスター) に分類されることを明らかにした。皮膚炭疽から分離した菌株を 80-SNP で系統解析してベトナム株がアジア分離株の多数含まれる A3 クラスターに所属するが日本株 (A3a クラスター) やモンゴル株 (A3b クラスター) と異なるクラスターを韓国分離株と形成することを明らかにした。市販食肉分離株について解析を行

い西ヨーロッパや北アメリカで分離される菌株と同じ遺伝学的クラスター (A1 クラスター) に分類されることを明らかにした。(井上)

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。主として 2011-2012 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行い以下の結果を得た。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った。2011～2012 年にかけて、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た。2011～2012 年の手足口病検体から EV71 (C4 が主) に次いで高頻度にコクサッキー A6 型 (CVA6) が検出された。日本やアジア諸国同様、ベトナムでも、CVA6 による手足口病症例の増加傾向が認められた。(清水) NIHE に麻疹遺伝子解析技術の移転をはかり、2006 年～2012 年までに流行したウイルスの遺伝子解析し、遺伝子型 H1 株が流行している事、また、その流行株は同じ遺伝子型 H1 でありながら、流行年ごとに少しずつ異なる事、2013 年春からベトナム北部山岳地域で流行し始めたウイルスは隣国、ラオスで流行した株を起源とする可能性が高い事、を示した。(駒瀬)

NDM 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 10 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。ベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 12 株について、Multilocus sequence typing 法により遺伝子型を調べたところ、うち 11 株は非流行タイプだった。ベトナムでは院内感染に関する対策が十分でないことが背景として考えられる。日本国内においては、途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者について、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要があると考え。(柴山) 2009 年初夏のコレラ流行が小さな第一波と大きな第二波からなることが示唆された。

コレラの流行に対応するために環境中の *V. cholerae* の動向を調査することは重要である。定量性を加味するために MPN-PCR 法の導入を行った。2013 年 3-8 月の間に、約 100 検体を試験し、20 検体が陽性であった。5-7 月にかけては菌数が低く、3, 4 月および 8 月には菌数が高かったことから、*V. cholerae* 分布に関する季節変動の可能性が示唆された。本結果については、ポイントの整理などを行い、また継続して調査を行うことで *V. cholerae* の消長が定期的に発生するかどうかを見ていく必要がある。(泉谷)

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では、提出された 258 検体中 9 検体がヒストプラズマ属特異的 PCR 法で陽性を示した。また、血清中の抗ヒストプラズマ抗体の保有状況の検討では、144 検体中 26 検体で抗体陽性と判定された。我々の検討から、ベトナムは他の東南アジア地域と同様にヒストプラズマ症の流行地域であり、決して稀な真菌症ではないことが伺われた。(大野)

4) インド NICED との連携

ジアルジア症に関する重要な知見は約 10% の人の下痢症例からジアルジアが発見され、下痢の主要な原因病原体であった。人の感染は主に 15 才以下の小児に検出され、小児の栄養不良・身体と知育の成長阻害の要因となる可能性が確認された。酪農場のウシ並びに労働者から高い感染が確認され、コルカタ周辺地域でも動物由来感染症としての像が確認された。赤痢アメーバはインドにおける臨床株の遺伝的多様性が初めて明らかにされた。インドにおける赤痢アメーバ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、極めて高い遺伝的多様性を示していた。更に、これまで未同定の多くの遺伝子型が発見された。このことは南アジアにおいて特殊な種内分化・多様化が起こった可能性を示していた。(野崎)

赤痢菌群に共通する病原蛋白の発現が増加する一方、ストレス応答の低下により病原性が低下する変異体を分離し

た。これが血清型を超えた防御効果を示すユニバーサル・ワクチンとして利用できないか調べるため、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を活用し、モルモットの腸管感染モデルを初めて開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を行った。*S. flexneri* で作製したワクチン候補株は、病原性が高度に減少する一方、血清型が異なる強毒株である志賀菌(*S. dysenteriae* type 1) 並びに現在の流行株である *S. sonnei* に対し明確な防御効果が認められた(三戸部)。

V. cholerae 01 の流行株変遷について基盤情報を得るため、El Tor variant 型 *V. cholerae* 01 に着目し、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供されたゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの遺伝子配列の比較解析及び MLVA による分子疫学解析を行った。さらには El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* 01 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。(森田)

アジアの HIV 感染流行地域の一つとして重要なインド国の国立コレラ腸管感染症研究所(NICED)との共同研究で、HLA 関連 HIV 変異同定に向け、インド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定法を確立し、解析を開始した。解析結果では、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見出された。このうち、ベトナムでも頻

度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異候補を HIV gag MA 遺伝子領域に見出した。(俣野)

D. 考察:

アジアの特定な地域で発生している感染症が、旅行者、食材(食品)、動物等を介してアジア地域全域に拡散し、それが我が国にも侵入する機会は増大してきている。そのような時期に、各国の感染症の制御に責任を持っている国の研究機関との連携を深め、情報の共有化を図るためのネットワーク化に向けた試みを行うことは時期を得ている。特に、各地域、各国において発生している病原体の表現型(生物型、薬剤耐性等)および遺伝型(塩基配列の差による型別)の解析結果の情報の収集を図る基盤的研究成果は、アジア地域における新規病原体の発生の迅速検知、その制御に向けたアジア地域での協力体制の確保を図ることに多大なる貢献をすることが期待できる。

1990年代後半以降、東アジア地域で、小児急性死症例を含む重症 EV71 エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し大きな社会問題となっているが、中国本土では、2008年以來、多数の死亡例を含む手足口病流行が報告されている。中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁

に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、中国で伝播している EV71 の分子疫学的特徴と考えられる。アジア地域では EV71 による髄膜炎等の重症事例や死者が可なり発生している。そのため、中国、台湾、ベトナム等においては、自前でワクチン開発を行ってきている。中国においては臨床試験も終え実用化を目指しており、その対策が進行している。我が国においては、EV71 の事例はあるが、社会問題化するほどの死亡事例数までには至っていない。同じ遺伝型の株が流行しているが、病態に大きな違いが見られる。その理由がどこにあるのかは判明していない。環境の問題なのか、ヒトの遺伝的要因に起因するのか、今後の課題である。

2009年ごろに中国でマダニ媒介性疾患として SFTS が見いだされた。2013年には我が国においても、また韓国においても見いだされてきており、少なくとも東アジア一帯に存在する可能性があることが判明した。SFTSV のゲノム解析の結果からは、かなり以前からそれらの地域に定着して、独自の進化をしてくれていることが判明した。それらを解析できるきっかけも中国 CDC との共同研究契約の締結と実際の共同研究の開始による連携の強化が図られてきた結果であった。お互いの研究所の正式のパイプができてきた成果は大きなものがある。それは H7N9 インフルエンザ発生時においても、情報の交換がスムーズにいき、また H7N9 インフルエンザの解析成果を中国 CDC が世界に向けて発表する会合時にも、感染研に最敬礼の招聘が行われたことから明らかである。政治的な問題とはかけ離れて、科

学的事項に関して研究所間の太いきずなが維持されていく努力を行っていく必要がある。

感染症の伝播には国境はない。いつどのような病原体の勃発、その拡散が起こるか予期できない。その発生を迅速に検知するためにも、近隣諸国との連携、および病原体の検出技術の標準化が重要である。幸いにも我が国は科学的にも技術的にもアジア諸国のなかでは先んじている。我が国がリーダーシップをとり、アジア諸国の感染症対応の責任を担う国立の研究機関とのネットワークを構築し、人的、技術的な交流を深めておくことが、強いては我が国への新規病原体の侵入防止、および拡大の迅速把握に結びつき、我が国の感染症対策に役立つこととなる。構築されつつあるネットワークのさらなる発展および維持に当該研究の果たす役割は大きいと考える。

E. 結論：

一国で発生した感染症の原因となる病原体は、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。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、予期することが難しい感染症に対しては、常時に監視体制をする仕組みを構築していくことが必要である。そのためには国を越えての協力体制が求められる。アジア諸国を中心として感染症対策に関与する各国の国立の研究機

関と国立感染症研究所とのネットワークを構築し、研究促進を図ると共に、感染研との人的交流及び情報の交換を促進し、迅速に対応できる仕組みがこの3年間の研究事業を通して確立された。

F. 健康危機情報

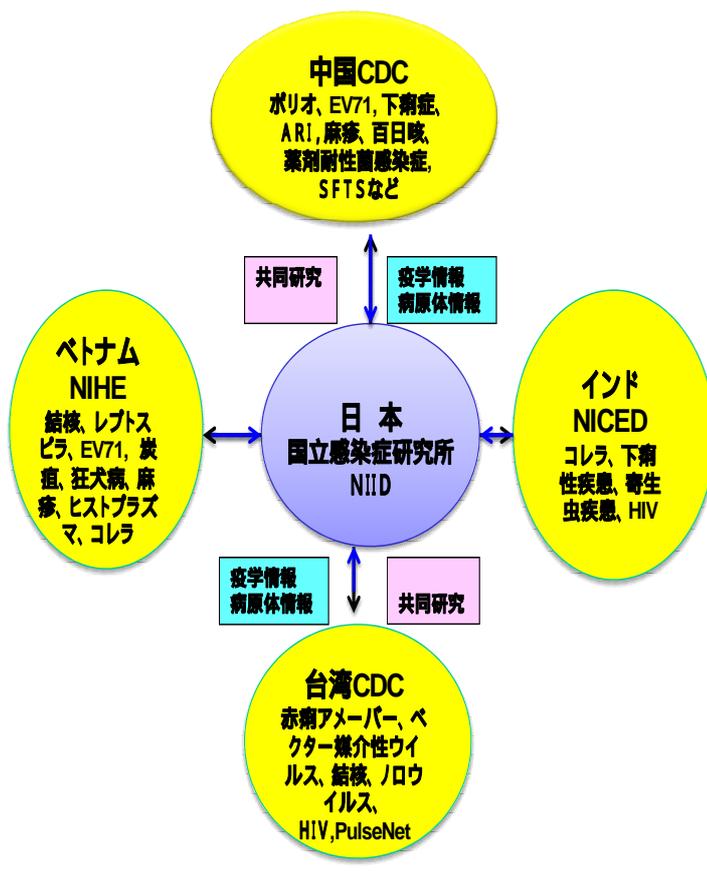
1) 中国において 2009 年にブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス (SFTS ウイルス: SFTSV) による重症発熱性血小板減少症 (SFTS) が発見され、現在も患者が発生している。

2) 中国、ベトナム等で EV71 による重症髄膜炎が流行しており、中国等では予防のために不活化ワクチンを開発し、臨床試験を行った。近い将来実用化される見込みである。

3) ベトナム等のアジア地区ではカルバペネム耐性の腸内細菌の分離率が上昇している。処方箋無しで、市中で薬をたやすく買えることが、耐性菌が選択される一因となっている。途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に再入院する患者については NDM-1 等のカルバペネム耐性菌のことに留意する必要がある。

4) 中国、ベトナム等では、狂犬病罹患犬が食用として交易している。家畜からの狂犬病の淘汰が難しい事情にある。東南アジアへの旅行時には狂犬病が存在することに注意が必要である。

図1. アジア各国の国立研究機関等との連携強化・共同研究の促進



・ アジアで流行する感染症の患者情報、病原体情報の迅速な解析、情報収集が可能となり、我が国への病原体の侵入を未然に阻止する。
・ 侵入した場合の被害を最小限にする。

厚生労働科学研究費補助金

平成 23 - 25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (アジア指定研究)

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
総合研究報告書

Epidemiology of HFMD and genetic characterization of HEV71 and CVA16
手足口病の疫学とエンテロウイルス 71 およびコクサッキーウイルス A16 の遺伝子解析

研究分担者： 清水博之 国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究分担者： Xu Wenbo Chinese Center for Disease Control and Prevention
研究協力者： Zhang Yong Chinese Center for Disease Control and Prevention

研究要旨

中国本土では、2008 年以来、多数の死亡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。2010 年には、中国全土で 900 例以上の手足口病死亡例が発生し公衆衛生上の大きな問題となっており、ワクチン開発が進められている。中国 CDC 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体制を基盤として、中国で伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) 中国では、2008 年 5 月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。2008～2012 年にかけて、約 720 万人の手足口病症例、2000 名強の死亡例が報告された。
- 2) 手足口病症例報告体制とともに、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークによる実験室診断体制が整備され、手足口病症例の約 3.7%について実験室診断が行われた。手足口病実験室診断は、咽拭液や糞便等の臨床検体を用いた培養細胞を用いたウイルス分離、RT-PCR 法、real-time PCR 法による遺伝子検出により行われている。
- 3) 中国全土の EV71 分離株の分子疫学的解析を行い、1996～2012 年にかけて中国で検出された EV71 分離株のほとんどが遺伝子型 C4 に属し、遺伝子型 C4 は、C4a と C4b に細分類されることが明らかとなった。
- 4) 中国で検出される EV71 株のほとんどすべては遺伝子型 C4 であるが、遺伝子型に反映されない少数のカプシドアミノ酸変異により、EV71 のウイルス学的性状が大きく変化することが示唆された。
- 5) カプシド領域の塩基配列、EV71 特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析した EV71 標準株パネルを調整し、中国 CDC へ分与した。
- 6) WHO 西太平洋地域事務局、感染研、CCDC を含む専門家の協力の下、WHO 手足口病ガイドライン "A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)" を作成・公開した。

中国では、重症 EV71 感染症を含む手足口病流行が断続的に発生しており、現在、EV71 不活化ワクチンの国内開発が進められている。中国における EV71 ワクチン開発・導入にあたっては、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が、きわめて重要となる。

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1つである。しかし、1990年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) 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、大きな社会問題となっている。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、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。中国本土では、2008年に手足口病の大流行が発生し、126例の死亡例が報告された。重症例・死亡例の多くで EV71 が検出されており、重症例の臨床像は、台湾等における EV71 急性脳炎症例と類似していた。中国本土では、その後も、重症例を伴う手足口病流行が継続し、2009年および2010年には、それぞれ、353例および905例の死亡例が報告されており、公衆衛生上の大きな問題となっている。

EV71 の伝播様態を解析するため、また、強い神経病原性を有する特定の遺伝子型の EV71 が伝播している可能性を検討するため、EV71 分離株の分子系統学的解析が進められている。カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かれ、さらに B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990年代後半以降、おもに、B3 および B4、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。中国の手足口病重症例からは遺伝子型 C4 が検出され、2008年以降の中国の EV71 株は、ほとんど C4 型であるとされているが、詳細については、引き続き解析が必要とされる。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、多数の重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生している中国本土で分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイ

ルス学的解析は、きわめて重要である。本研究では、中国 CDC 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体制を基盤として、EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析を行う。

B. 研究方法

中国における手足口病流行および病原体サーベイランスに関する最新情報は、中国 CDC 側研究分担者である Dr Xu Wenbo および研究協力者である Dr Zhang Yong から情報提供を受けた。

中国では、手足口病は、2008年5月より、全国レベルのサーベイランスによる全数届出対象疾患となり、2008~2012年の期間で、約720例の手足口病症例が報告された。手足口病報告例のうち、約3.7%について実験室診断が行われた。手足口病実験室診断は、中国国内エンテロウイルス実験室ネットワークにおいて実施されており、咽頭拭い液や糞便等の臨床検体を用いた、培養細胞を用いたウイルス分離、RT-PCR法、あるいは real-time PCR 法による遺伝子検出が行われている。

現在中国で伝播している EV71 株 (遺伝子型 C4) と分子系統学的な近縁な遺伝子型 C4 株を含む、これまで報告されている全ての遺伝子型の EV71 標準株パネルを作成し、遺伝子解析、および、受容体特異性・抗原性等のウイルス学的性状の解析を行った。ウイルス力価やカプシド領域の塩基配列、EV71 特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析し、EV71 遺伝子型標準株パネルを調整し、中国 CDC へ分与した。

C. 研究結果

1) 中国で分離された EV71 株の分子疫学解析

手足口病サーベイランスにより得られた中国全土の EV71 分離株の分子疫学的解析を行い、1996~2012年にかけて中国で検出された EV71 分離株のほとんどが遺伝子型 C4 に属することが確認された。中国の EV71 分離株の、より詳細な系等解析によると、中国の遺伝子型 C4 は、C4a と C4b に細分類される。遺伝子型 C4b 株は、1998~2004年にかけて深圳や上海等中国の一部地域で検出され、台湾やタイでも近縁株が報告されているが、中国では2005年以降検出されていない。遺伝子型 C4a 株は、遺伝子型 C4b 株と入れ替わるように、2003年以降出現し、現在中国全土

で、ほぼ唯一の EV71 遺伝子型として広範に伝播している。2007 年以降、中国では重症 EV71 感染症症例からの EV71 検出事例が増加しているが、これらの近年の重症例には遺伝子型 C4a 株が関与している。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム(2011~2013 年)、カンボジア(2012 年)等でも近年報告されており、ベトナムおよびカンボジアでは、死亡例を含む EV71 感染症重症例の流行に関与している。

2) 異なる EV71 遺伝子型株のウイルス学的性状の解析

現在報告されている 11 種類の EV71 遺伝子型 A、B1~B5 および C1~C5 について、標準ウイルス株を収集した。新たにウイルスストックを調整するとともに、ウイルス力価やカプシド領域の塩基配列、EV71 特異的受容体結合性等、基本的ウイルス学的性状を解析し、EV71 遺伝子型標準株パネルを調整し、中国 CDC へ分与した。EV71 標準株パネ

ルは、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解

ルは、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解

中国における手足口病サーベイランス体制の整備

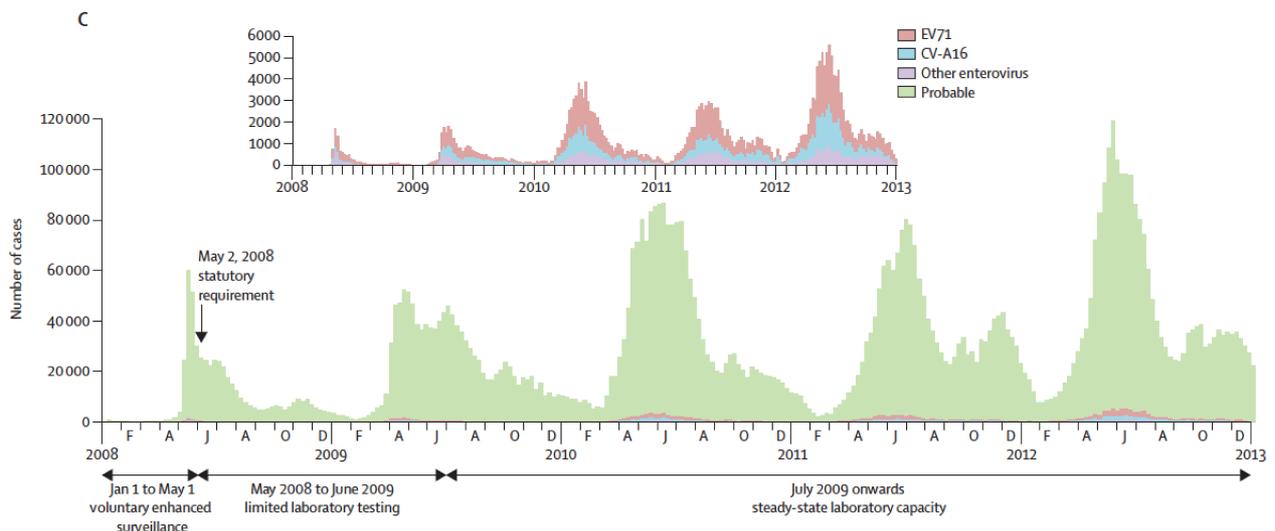
Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study

Lancet Infect Dis 2014

Published Online
January 31, 2014
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70342-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6)

Weijia Xing*, Qiaohong Liao*, Céline Viboud*, Jing Zhang*, Junling Sun, Joseph T Wu, Zhaorui Chang, Fengfeng Liu, Vicky J Fang, Yingdong Zheng, Benjamin J Cowling, Jay K Varma, Jeremy J Farrar, Gabriel M Leung, Hongjie Yu

- 2007-2008年に死亡例・重症例を伴う手足口病流行が発生(安徽省等)
- 2008年5月から手足口病は全数報告対象疾患(ヘルペンギーナは対象外)
- 2008-2012年の手足口病報告数(臨床鑑別例)は720万症例
- 手足口病報告例のうち3.7%について実験室診断を実施
- 2008-2012年のcase-fatalityは0.03% (2000人強)、case-severityは1.1% (7万人強)



ルは、遺伝子検査による手足口病実験室診断に関する解

3) EV71 カプシド VP1 amino acid polymorphism とウイルス学的性状の関連性

PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であることが明らかとなった。現在、多くの EV71 分離株のカプシド VP1 遺伝子情報が、データベースに報告されているため、ウイルス学的性状に寄与する可能性が高いアミノ酸部位の VP1 amino acid polymorphism を解析した。データベース上の EV71 分離株のカプシドアミノ酸配列解析によると、VP1-145E を有する EV71 株の頻度がもっとも高く、VP1-145G あるいは VP1-145Q も認められたが、VP1-145E と比較すると検出頻度は低かった。以上の結果から、Non-PB 株の頻度が高いものの、VP1-145G あるいは VP1-145Q を有する PB 株も、ある程度の頻度で認められることが明らかとなった。中国で近年分離されている EV71-C4 株のほとんどは VP1-145E を有しており、中国の EV71 株の多くは Non-PB 株であることが示唆される。しかし、頻度は低いものの、VP1-145G/Q 株の検出も報告されており、VP1-145 の多様性とその意義について、さらなる解析が必要とされる。

4) WHO 手足口病ガイドラインの作成・公開

1990 年代後半より、東アジア地域では、手足口病および EV71 感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、諸外国との疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO 西太平洋地域事務局、感染研、中国 CDC、台湾 CDC ベトナムパスツール研および NIHE 等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン "A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)" を作成した。本ガイドラインは、2011 年に公開され、手足口病、ヘルパンギーナ、および関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法等に関する基盤情報の共有が可能となった。

D. 考察および今後の研究方針

1990 年代後半以降、東アジア地域で、小児急性死症例

を含む重症 EV71 エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し大きな社会問題となっているが、中国本土では、2008 年以来、多数の死亡例を含む手足口病流行が報告されている。中国で近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、すべての EV71 株が、中国本土固有の遺伝子型 C4 に属することが明らかとなった。中国で分離された遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外の、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。他の地域では、異なる遺伝子型の流行・伝播が頻繁に認められるのに対し、中国本土で検出される EV71 株は、ほとんどすべて遺伝子型 C4 しか検出できない点は、中国で伝播している EV71 の分子疫学的特徴と考えられる。

中国における EV71 を含めたエンテロウイルス感染症実験室診断では、遺伝子検査が汎用されている。エンテロウイルス遺伝子検査の標準化と精度管理のため、感染研ウイルス二部で保有している、異なる遺伝子型の EV71 標準株パネルを中国 CDC に分与した。中国エンテロウイルス実験室ネットワークにおける遺伝子検査標準化のためのレファレンスパネルとしての活用が期待できる。

PSGL-1 受容体結合性を規定する主要なアミノ酸は VP1-145 であり、VP1-145 のアミノ酸の種類がスイッチとなり VP1-244 リシン側鎖の向きを変え、PSGL-1 結合性を制御することが明らかとなった。VP1-244 リシンは、ほとんどの EV71 分離株で保存されているが、VP1-145 は高頻度に変異し、高度のアミノ酸多様性を有している。我々は最近、VP1-98/145 が EV71 中和抗体結合に関与する主要な抗原エピトープのひとつであることを明らかにした。このことは、EV71 遺伝子型に反映されない、ひとつ、あるいは、少数のカプシドアミノ酸変異により、抗原性や受容体特異性等 EV71 のウイルス学的性状が大きく変化することを示唆している。中国では現在、数施設により、不活化 EV71 ワクチン開発が進められている。一部のワクチン候補については、現在、臨床試験が終了し、近い将来の導入が期待されている。EV71 の遺伝的・ウイルス学的多様性および抗原性の違いについての解析が、今後のワクチン開発・導入にとって重要となる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis.* (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
- 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013
- 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
- 5) Kobayashi, M., Makino, T., Hanaoka, N., Shimizu, H., Enomoto, M., Okabe, N., Kanou, K., Konagaya, M., Oishi, K., Fujimoto, T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
- 6) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
- 7) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
- 8) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2013
- 9) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
- 10) 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, 2013
- 11) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 12) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 13) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
- 14) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 15) 清水博之: 手足口病. 特集「感染症動向 2013」. *メディカル朝日* 1, 28-30, 2012
- 16) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 17) 増本久人, 南亮仁, 野田日登美, 江口正宏, 古川義朗, 鶴田清典, 中田恵子, 左近(田中)直美, 山崎謙台, 高尾信一, Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未, 吉田弘, 清水博之. 国内外における手足口病流行に關与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
- 18) 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田弘, 清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
- 19) 武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび咽頭結合併症の入院症例に關する全国調査(2010年分) 中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
- 20) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
- 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
- 22) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011
- 23) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)
- 24) Zhang Y, Wang J, Guo W, Wang H, Zhu S, Wang D, Bai

R, Li X, Yan D, Zhu Z, Tan X, An H, Xu A, Xu W. Emergence and transmission pathways of rapidly evolving evolutionary branch c4a strains of human enterovirus 71 in the central plain of china. PLoS One 6: e27895, 2011

- 25) Tan X, Huang X, Zhu S, Chen H, Yu Q, Wang H, Huo X, Zhou J, Wu Y, Yan D, Zhang Y, Wang D, Cui A, An H, Xu W. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008. PLoS One 6: e25662, 2011

2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
- 4) 有田峰太郎, 小島宏建, 長野哲雄, 岡部隆義, 脇田隆字, 清水博之: OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 11月10~12日, 2013
- 5) 西村順裕, Hyunwook Lee, Susan Hafenstein, 片岡周子, 脇田隆字, Jeffrey M. Bergelson, 清水博之: エンテロウイルス71と受容体PSGL-1との結合: VP1-145は受容体特異性を制御する分子スイッチである. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 11月10~12日, 2013
- 6) 飯塚節子, 清水博之: RD-A 細胞を用いた Human

enterovirus Aの分離. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 11月10~12日, 2013

- 7) 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61回日本ウイルス学会学術集会. 神戸市, 11月10~12日, 2013
- 8) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状. 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会, シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」. 横浜市, 6月5日, 2013
- 9) 町田早苗, 清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 11月14日, 2012
- 10) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 11) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 12) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIE 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 13) Urami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIE 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
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
平成 23-25 年度 分担研究報告書

**侵襲性肺炎球菌感染症由来肺炎球菌の疫学的解析および
呼吸器感染症起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子解析**

研究分担者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

研究協力者

前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部
常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部

A. 研究目的

レジオネラ属菌は湖沼や土壌に生息する環境細菌だが、冷却塔水や浴槽水などの衛生管理が不十分だと増殖し、そこから生じる本菌を含んだエアロゾルを人が吸い込んだ場合に経気道感染し、レジオネラ肺炎やポンティアック熱などの呼吸器感染症を引き起こすことがある。予防ワクチンはなく、人が吸入する可能性のあるさまざまな水利用施設の水を適切に衛生管理することが重要である。

侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) は、ワクチン接種により予防可能な疾患となっている。7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)は、日本には 2010 年 2 月に導入され、2013 年 4 月 1 日から定期接種の対象となり、さらに 2013 年 11 月 1 日からは PCV7 に新たに 6 種類の血清型ポリサッカライドを加えた 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に定期接種用ワクチンは変更された。一方、65 歳以上の高齢者またはハイリスクの 2 歳以上の個人には、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン (PPSV23) の使用は可能であった。各ワクチンの当該ワクチンに含まれる血清型肺炎球菌が引き起す IPD に対する予防効果が期待され

ている。一方、ワクチンに含まれない血清型による侵襲性感染罹患率の増加 (serotype replacement) の懸念がもたれている。ワクチン導入後のワクチンに含まれる血清型の肺炎球菌の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型の遺伝子と置き換わる現象、いわゆる capsular switching (遺伝子組み換え) は serotype replacement の重要な原因といわれている。Multi Locus Sequencing Type (MLST) 法は capsular switching を観測できる有効な方法である。さらに、MLST 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。レジオネラ属菌の代表菌種である *Legionella pneumophila* についても MLST 法と同様の手法で、用いる遺伝子の種類が異なる Sequence-Based Typing (SBT) 法が行われている。MLST 法および SBT 法は、データベースも完備しているので、中国を初め、世界各国の菌株との比較が容易である。我々は本研究で、レジオネラ症を引き起こす可能性のある日本国内の環境に生息する *L. pneumophila* の SBT、および IPD 由来肺炎球菌の MLST を調べ、基礎疫学データを蓄積し、中国の分離株と比較を行った。

B. 研究対象と方法

1 *L. pneumophila* 血清群 1 の解析

日本国内の様々な環境から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 分離株 141 株について、

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、sequence type (ST)を決定した。7 遺伝子のアリル配列が決まった分離株を EWGLI のデータベースに登録すると、新しいアリル配列の組み合わせについては新たな ST ナンバーが付与される。

2 IPD 由来肺炎球菌に関する解析

2011 年から 2014 年 2 月現在まで、日本国内 IPD 由来肺炎球菌 441 株の血清型および MLST 解析を行った。血清型は、Statens Serum Institut 製血清を用い、莢膜膨脹法により決定した。薬剤感受性試験は微量液体希釈法で測定した。MLST 解析では、分離株の 7 つのアリル (*aroE*、*gdh*、*gki*、*recP*、*spi*、*xpt*、*ddl*) の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net> にて検索を行い、sequence type (ST) を決定した。7 つ遺伝子のうち、5 つ以上の遺伝子は同じである場合、同一の clonal complex (CC) に分類する。本報告書のすべての集計は症例数をもとに行った。

C. 研究結果

1 : *L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株の解析結果

冷却塔水由来 90 株、浴槽水由来 20 株、噴水・修景水由来 18 株、シャワー水由来 8 株、給湯水由来 3 株、土壌由来 2 株の遺伝子型を決定したところ、合わせて 141 株は 39 種類の遺伝子型に分かれた。ST1 が 85 株と全体の 60% を占めた。冷却塔水由来株の 74%、噴水・修景水由来株の 72% が ST1 だった。シャワー水では 38%、給湯水では 33% が ST1 で、浴槽水では 5% が ST1 で、由来により ST1 の頻度は異なっていた。2 種類の環境にまたがって検出された ST は 5 種類あった。冷却塔水あるいは浴槽水からそれぞれ複数株検出された ST が 7 種類あり、残りの 26 種類の ST は 1 株のみの検出だった。ST1 が環境分離株の優占 ST だったが、それ以外の遺伝子型は多様であった。

2 : 肺炎球菌の解析結果

1) : IPD 由来肺炎球菌の ST 型

肺炎球菌は血清型によって、違った ST 型を示すことが多く見られた。世界中多くの地区から分離される ST 型 (血清型 3 型の ST180、15A 型の ST63、19F 型の ST236、22F 型の ST433 など) は日本でも分離された。同一血清型の肺炎球菌でも異なる ST 型を示すケースが多くみられた (H25 年度分担研究報告書「レジオネラおよび肺炎球菌の分子疫学」を参照)。

2) : 19A 型肺炎球菌に関して解析

19A 型肺炎球菌は PCV7 が導入後 replacement serotype として、世界各国で注目されていた。日本国内においても 19A 型肺炎球菌による小児 IPD 症例の増加がみられた (IASR 34: No.3 特集肺炎球菌感染症 2013 年 3 月現在)。本研究で収集した IPD 由来肺炎球菌 441 株のうち、19A 型は 103 株 (23.4%) で、最も多かった。

19A 型肺炎球菌は ST(CC)3111、ST320、ST(CC)2331、3 つのグループに分けられた。CC3111 は 75 株 (72.8%)、ST320 は 21 株 (20.4%)、CC2331 は 7 株 (6.8%) であった。CC3111 および CC2331 型肺炎球菌は日本各地の症例より分離されたが、ST320 型肺炎球菌は沖縄県のみでの分離であった。本研究で解析を行った 21 株の ST320 型 19A 肺炎球菌も β -lactam 抗菌薬のペニシリン G に 2-4 μ g/mL、セフトキシムに 1-8 μ g/mL、メロペネムに 0.5-1 μ g/mL の $\square\square\square\square$ を示した。CC3111 および CC2331 型 19A 肺炎球菌の各抗菌薬に対する MIC より高く、低感受性や耐性であった (図 1)。

現在まで、日本国内から ST320 型 19F 肺炎球菌が分離された報告がなく、さらに PCV7 が日本に導入される前の 2009 年に ST320 型 19A は沖縄県の症例から分離されたことから、日本国内に分離された ST320 型 19A 肺炎球菌は 19F の

capsular switching による変換されたタイプではなく、もともと存在していた可能性が示唆された。

D. 考 察

中国における *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 164 株 (冷却塔水由来 96 株、温泉由来 42 株、水道水由来 26 株) の遺伝子型別の結果も、ST1 が 49.4% を占め (Appl Environ Microbiol doi:10.1128, 2014) 次いで ST154 が中国 (6%) でも日本 (3%) でも多く、中国と日本で同様の傾向があることがわかった。日本の環境分離株の SBT 解析の結果、冷却塔水分離株は大きく 2 つのグループ (ST1 を含む C1 グループ、および ST154 を含む C2 グループ) に分かれた (Appl Environ Microbiol 12:4263, 2012) が、中国でも同様だった。温泉分離株の遺伝子型が多様であることも同様の結果だったが、冷却塔水分離株の多くが共通、あるいは似た遺伝子型であったのに対し、浴槽水・温泉分離株で共通の遺伝子型は、この 2 つの論文の比較では見られなかった。日本と中国で共通の遺伝子型についても、それぞれ独自の遺伝子型についても、臨床からも分離される遺伝子型が多くあり、それらの菌が生息する環境水が感染源となりうる危険性が示唆された。

本研究は、日本国内の IPD 由来肺炎球菌の MLST 解析を行った結果、アジアを含む世界各国で多く分離されている多剤薬剤耐性 ST320 型 19A 肺炎球菌は日本の特定な地域に分離された。欧米では、ST320 型 19A 肺炎球菌は PCV7 が導入された後、多剤耐性 ST320 型 19F 肺炎球菌の capsular switching によって変換されたタイプで、ワクチンによるセレクションされたと報告されている (BMC Genomics 10:642, 2009)。しかし、韓国 (Emerg Infect Dis 14:275, 2008)、中国 (PLOS ONE 8:e82361, 2013) では、日本と同様に、PCV7 が導入される前から ST320 型 19A 肺炎球菌の分離がみられた。欧米と異なって、ST320 型 19A 肺炎球菌による感染症の増加は抗菌薬によるセレク

ションされたと推測された (PLOS ONE 8:e82361, 2013)。

E. 結 論

SBT (MLST) 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。データベースも完備しているので、世界各国の菌株との比較が容易である。レジオネラ症は旅行に関連して発症することが知られており、日本と中国で菌株の情報を共有することが重要であると考えられた。肺炎球菌においては、血清型、ST 型および薬剤感受性の結果を総合的に解析することによって、capsular switching、serotype replacement および薬剤耐性菌の発生を観測し、早期に対策を講じることができるようデータの蓄積を行う必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

Oishi T, Wada A, Chang B, Toyabe S, and Uchiyama M. 2011. Serotyping and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the blood and posterior nares of Japanese children prior to the introduction of 7-Valent pneumococcal conjugate vaccine. Jpn. J. Infect. Dis. 64:341-344.

西山明宏, 石田直, 興梶陽平, 小西聡史, 坪内和哉, 伊賀知也, 國政啓, 岩破将博, 福山一, 仲川宏昭, 伊藤明広, 生方智, 吉岡弘鎮, 橋洋正, 有田真知子, 橋本徹, 前川純子. 2011. *Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例. 感染症学雑誌 85:373-379.

Tanaka J, Ishiwata N, Wada A, Chang B, Hishiki H, Kurosaki T, and Khono Y. 2012. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan.

Epidemiol. Infect. 140:1111-1121.

Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 12:4263-70.

Ueno M, Ishii Y, Tateda A, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, and Nishiwaki Y. 2013. Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 66:22-25.

Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K, the Japanese IPD Study Group. 2013. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. Vaccine. 31:845-849.

Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. 2013. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. J. Med. Microbiol. 62:1868-1875.

Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M,

Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79(13):3959-3966.

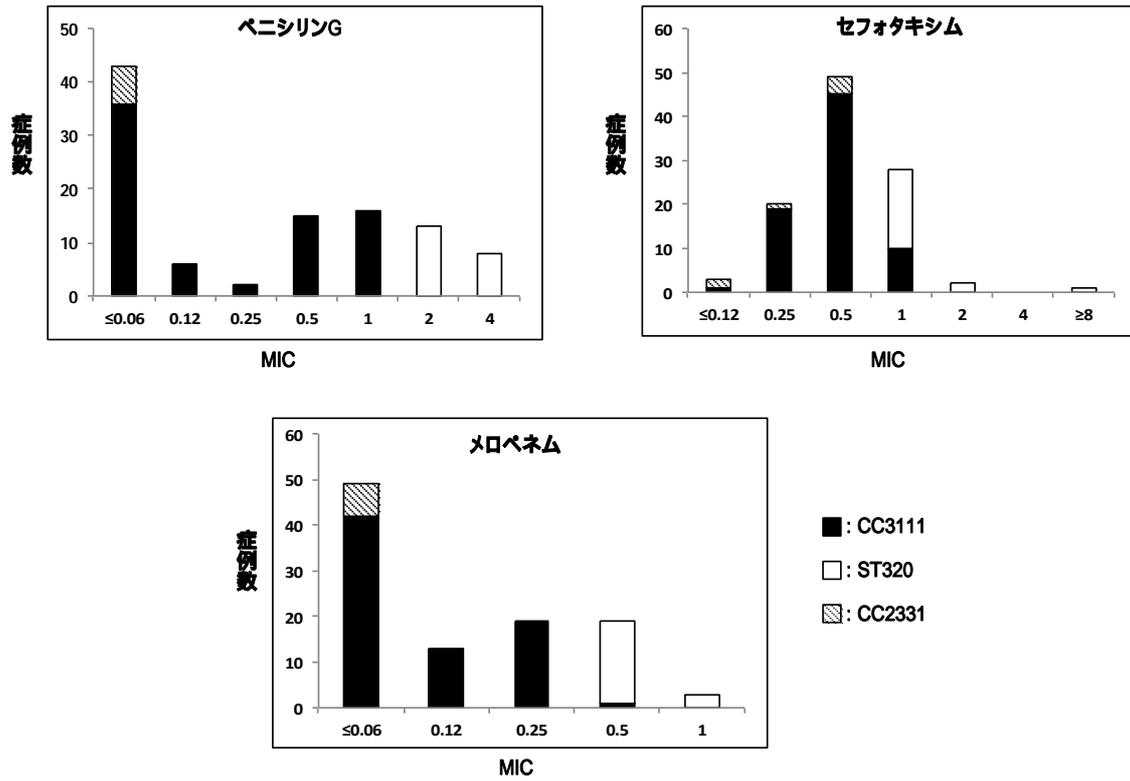
Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19:644-52,

Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. 2014. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the nasopharynx of Japanese children after inoculation with a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. Jpn. J. Infect. Dis. 67:40-43.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1:血清型19A分離株のシーケンスタイプと β -lactam 抗菌薬感受性の関係 (n=103)



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合分担研究報告書

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（H23 - 新興—指定—020）

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 （国立感染症研究所 獣医科学部）

研究要旨：2009年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)の原因ウイルスは、ブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス(SFTS ウイルス: SFTSV)であることが2011年に中国 CDC によって報告された。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず、日本を含めアジア、太平洋地域に広く生息していることから、中国 CDC から情報を入手して、組換えウイルス蛋白による血清診断系の開発、組換えウイルス蛋白に対する抗体作成、患者診断用の RT-PCR 等を準備した。予備調査で組換え抗原により動物の血清疫学調査を行ったが、2012年時点では抗体陽性動物は検出できなかった。また、ダニからのウイルス遺伝子も検出できなかった。2013年1月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。患者の実験室診断には、1)患者診断用 RT-PCR が有効であった、2)ウイルス分離同定や、免疫組織学的染色に、組換えウイルス蛋白に対する抗体が極めて有用であった。一方、組換えウイルス蛋白による血清診断系とダニからのウイルス遺伝子検出法は、感度が充分でないことがわかった。2012年11月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に分与された SFTS ウイルス HB29 株を用いて作製した抗体検出法は感度が高く、その後の動物の血清疫学調査等に活用された。マダニからのウイルス遺伝子検出は、MGB プローブによるリアルタイム RT-PCR 法を確立し、反応が陽性対照コンタミによるのか否かを同時に確認できる系へと改良された。

研究協力者：宇田晶彦、木村昌伸、加来義浩、野口章、今岡浩一（同、獣医科学部）、福士秀悦、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同、ウイルス第1部）、新倉綾（同、実験動物管理室）

A. 研究目的

重症発熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは2011年に中国で同定された新規ブニヤウイルスである。このウイルスに感染したヒトの症状は、発熱、消化器症状、血小

板減少、白血球数減少等を特徴とし、年齢が高いほど重症例と死亡率が高くなる傾向がある。本研究の目的は、患者の実験室診断を整備して患者発生に備えること、動物の血清疫学を行うための抗体検出法を開発すること、マダニから効率よく SFTS ウイルス遺伝子を検出するリアルタイム RT-PCR を開発することである。

まず、2011年にはウイルスの入手が困難であったため、初年度は、遺伝子配列情報

を中国 CDC より入手し、N 蛋白質(NP) cDNA を化学合成し、各種組換え系によりウイルス蛋白を発現し、血清診断系を作製することを目的とした。また、組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清を作製した。

二年度には、作製した血清診断系を用いてシカなどの血清疫学を予備的に開始した。また、2012 年 11 月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に SFTS ウイルス HB29 株が分与された。これを受けて、ウイルス感染細胞を用いた血清診断系を作製した。血清診断 ELISA を組換え抗原と SFTS ウイルス抗原で比較した結果、組換え蛋白免疫ウサギ血清の抗体検出感度は 30 倍以上後者が優れていることが明らかとなった。このため、SFTS ウイルス感染細胞を用いた ELISA 抗原、感染細胞を用いた間接蛍光抗体法用抗原を調整した。また、2013 年 1 月に国内の SFTS 患者が確認されたが、この実験室診断には、初年度に整備していた RT-PCR が有効であった。現在では RT-PCR 法による患者の診断検査体制が全国に整備されている。また、病理組織学的解析には、初年度に作製した組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清が極めて有効であった。その後の死亡患者の免疫組織学的解析にも、本抗体が用いられている。

中国においてフタトゲチマダニ (5.4%) およびオウシマダニ (0.6%) から SFTS ウイルス遺伝子が検出され、SFTS はマダニ媒介性の感染症であると考えられている。初年度にはヒトの実験室診断に用いている RT-PCR 法でマダニの予備的調査を行ったが、陽性マダニは検出できなかった。最終

年度の 2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、三年度は、マダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立と陽性対照由来のコントラミをモニターできる方法を最適化した。

B. 研究方法

SFTSV 特異的プライマーセット(患者診断用)

セット 1 :

SFTSV NP-1F: 5'-ATC GTC AAG GCA
TCA GGG AA-3'

SFTSV NP-1Rd: 5'-TTC AGC CAC TTC
ACC CGR A-3'

セット 2 :

SFTSV NP-2F: 5'-CAT CAT TGT CTT
TGC CCT GA-3'

SFTSV NP-2R: 5'-AGA AGA CAG AGT
TCA CAG CA-3'

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP 調製

SFTSV NP cDNA (Invitrogen 社で合成) をバキュロウイルストランスファーベクター-pAcYM1 にクローニングし、バキュロウイルス DNA とともに昆虫細胞 Tn5 にトランスフェクション後、昆虫細胞抽出液から組換え SFTSV NP を調製した。

哺乳動物細胞での SFTSV NP 発現

SFTSV NP cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター-pKS336 にクローニングし、HeLa 細胞にトランスフェクションし、プラスト

サイジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択した。NP 遺伝子非導入細胞と混合後、スライドガラス上に塗布し乾燥、固定させ IFA 抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清の調製

バキュロウイルス発現系で調整、精製した SFTSV NP をウサギに免疫し、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を調製した。

陽性コントロールプラスミドの構築

SFTS ウイルス YG1 株由来部分 S セグメント cDNA のリアルタイム RT-PCR 標的領域に両端に制限酵素サイト (BamHI、EcoRV) を有する 36bp の挿入配列を導入したプラスミドを作製した。

リアルタイム RT-PCR

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を使用した。このリアルタイム RT-PCR には SFTSV-S2-237 プライマー : GCA ACA AGA TCG TCA AGG CAT CAG G、SFTSV-S2-400a プライマー : TGC TGC AGC ACA TGT CCA AGT GG、SFTSV-S2-317MGB プローブ (FAM 標識) : CTG GTT GAG AGG GCA を用いた。陽性対照由来 DNA のコンタミを判別するためには、PosiContTaqman プローブ (HEX 標識) : CAT CCT GCA CCA CCAACT GCT TAG CC を用いた。

リアルタイム RT-PCR の増幅産物の特異性

確認試験

制限酵素処理を行わない場合にはリアルタイム RT-PCR 反応液を電気泳動しウイルス由来増幅産物 (164bp) および陽性対照プラスミド由来増幅産物 (201bp) を識別した。制限酵素処理を行う場合には PCR 産物を制限酵素 (BamHI または EcoRV) 処理後、4%アガロースゲルでウイルス由来増幅産物 (164bp) およびプラスミド由来増幅産物 ((157+44 bp または 126+75bp) を確認した。

C. 研究結果

SFTSV NP の発現とウサギ抗 SFTSV NP 血清の作製

2011年時点には、中国側の規制で SFTSV 遺伝子は入手出来なかったため、SFTSV NP cDNA を化学合成し、バキュロウイルス発現系を用いて組換え SFTSV NP を調製した。これをウサギに免疫し、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を作製した (図 1)。

SFTSV NP ELISA

バキュロウイルス発現系で調製した SFTSV NP を抗原として IgG-ELISA を行ったところ、SFTSV NP はウサギ抗 SFTSV NP 血清 (anti-SFTSV NP) に反応した (希釈倍率 6,400 倍以上)。しかし、SFTS ウイルス感染細胞から調整した抗原による ELISA では、20 万倍以上の希釈でも反応したことから、後者の感度が 30 倍以上高いことがわかった。この原因の一つは、精製組換え抗原が失活しやすいためであることがわかった。一方、同じフレボウイルスに属するリフトバレー熱ウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-RVFLV NP) およ

び、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-CCHFV NP, anti-LASV NP, anti-JUNV NP) は SFTSV の NP に反応しなかった (図 2)。

IFA による SFTSV NP 検出

SFTSV NP を HeLa 細胞で発現させ、細胞塗抹標本をアセトン固定し IFA 抗原とした。ウサギ anti-SFTSV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に特異的に反応し、RVFV 感染細胞には反応しなかった。一方、ウサギ anti-RVFV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に反応しなかった (図 3)。

陽性コントロールプラスミドの構築

リアルタイム RT-PCR のコピー数を算出するための陽性コントロールプラスミドの構築を試みた。最初に構築したプラスミドはリアルタイム RT-PCR で増幅するウイルスの塩基配列 164bp を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入した (図 4 左)。しかし、このプラスミドを陽性コントロールが増幅して得られた塩基配列と、ダニに含まれる SFTS ウイルス由来の増幅産物の塩基配列は一致するためコンタミネーションを識別することが困難である。そこで、新規の陽性コントロールプラスミドではリアルタイム RT-PCR で増幅する領域に、2 種類の制限酵素サイト (BamHI : GGATCC、EcoRV : GATATC) と TaqMan プローブ標的配列 (ggctaagcagttggtggtgcaggatg) を含む配列を挿入した。この結果、リアルタイム RT-PCR による増幅がウイルス由来の PCR 産物か、プラスミドのコンタミか否かが迅速に判定可能となった (図 4 右)。

電気泳動によるコンタミネーションの判定法の確認

最初に作出したプラスミド (旧陽性コントロールプラスミド) とウイルス由来の PCR 増幅産物のサイズは両者ともに 164 bp であり、電気泳動によるコンタミ識別は不可能であった (図 5)。一方で新プラスミド由来の PCR 増幅産物のサイズ (201 bp) はウイルス由来の増幅産物 (164 bp) よりも 37bp 大きく、4% アガロースゲルによる電気泳動でコンタミ識別が可能となった。更に新プラスミドの増幅産物は BamHI (157 および 44 bp) または EcoRV (126 および 75 bp) 制限酵素によって消化されるが、ウイルス由来の増幅産物には両制限酵素サイトは存在しない為、制限酵素処理を行っても 164 bp のままであるのでコンタミネーションを容易に判定可能となった (図 5)。

2 色法リアルタイム RT-PCR によるコンタミネーションの判定法の確認

新しい陽性コントロールプラスミドを用いたリアルタイム RT-PCR 法では、反応液にウイルス配列と相補する FAM 標識 MGB プローブ (SFTSV-S2-317MGB) と陽性コントロールプラスミドと特異的に相補する HEX 標識 TaqMan プローブ (PosiContTaqman) を同時に添加すると、ウイルス由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブしか増幅されないが、プラスミド由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブおよび HEX 標識 PosiContTaqman probe の増幅が認められ、コンタミネーションをリアルタイム RT-PCR 反応中にモニタリング可能となった (図 6)。

リアルタイム RT-PCR 法に用いる増幅試薬の選択

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を各々の推奨反応条件に改編を加え施行した (図 7)。両試薬の性能比較検討を行うにあたり同一のプライマー (SFTS-S2-237s、SFTS-S2-400a) と 10^3 から 10^1 コピー/反応に段階希釈した陽性コントロール用プラスミドを用意し解析を行った (図 8)。この結果、TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit では確実に 10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドを検出することができたが、40 サイクル以降で鋳型を添加していない陰性コントロールでも偽増幅が観察された。一方で、RNA-direct Realtime PCR Master Mix 場合には陰性コントロールの義増幅は観察されないが、10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドで 1/3 の割合で増幅が見られなかった。これらの結果から RNA-direct Realtime PCR Master Mix はやや増幅効率は劣るが非特異増幅が見られないことから、ダニサンプルの SFTS ウイルス検出に適していると推測された。

D. 考察

SFTS はその高い致死率と、ヒト-ヒト感染を起こす可能性があることから、公衆衛生上重要な新興ウイルス感染症として注目されている。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず日本全国に分布し、

多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、我が国においてもマダニ類が SFTSV あるいは近縁のウイルスを保有するかどうか調査することが必要である。また、2011 年の時点で SFTS が輸入感染症として持ち込まれる可能性を考慮して、SFTSV 抗体検出等の実験室診断法を整備することとした。そこで、ウイルスの NP cDNA を化学合成して組換え蛋白を作製し、ELISA あるいは IFA による SFTS ウイルス抗体検出系を作製した。しかし、2012 年 11 月に中国 CDC より SFTS ウイルスの分与を受け、ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA を開発し、組換え抗原による ELISA と比較した結果、後者が 30 倍以上高感度であることがわかった。精製組換え抗原が失活しやすいことが原因の一つであると考えられた。その後の動物の血清疫学や回復患者の抗体検出に後者が用いられている。

疑い患者の血中 SFTS ウイルスの検出には、初年度に開発した RT-PCR が有効であることがわかり、地方衛生研究所での疑い患者の実験室診断にも採用されている。一方、マダニからのウイルス遺伝子検出には、この RT-PCR では感度が充分でないことが、予備実験及び中国 CDC の Prof. Mifang Liang、Prof. Li-Dexin らとの協議でわかった。そこで、より高感度なリアルタイム RT-PCR を開発した。当初開発した方法で、フタトゲチマダニやタカサゴキラマダニ等複数種のマダニから SFTS ウイルスを検出できたが、一部の機器では非特異反応が出ること、陽性対照のコンタミを識別できない等の問題があった。そこで、最終年には、これらの問題を解消できる改良を加えた。そこで陽性対照には、2 種類の制限酵

素サイトと TaqMan プロブサイトを含む 37bp の DNA 断片を挿入したプラスミドを作製した。この陽性コントロールプラスミドを用いれば陽性対照のコンタミネーションによる反応の有無を迅速かつ簡単に判定できた。今後本研究で確立したプロトコルを用いて日本国内の SFTS 陽性ダニの種、ウイルス陽性率、個体あたりのウイルス量、ウイルス陽性ダニの季節性変動性、国内分布等を調査に行いたい。また、複数の機器で非特異反応が出ないことも確認していることから、地方衛研や大学等でマダニの分子疫学調査を行う際にも本リアルタイム RT-PCR 法は、有用である。

E. 結論

SFTS 疑い患者の実験室診断、血清診断が確立された。また、多くの動物種の血清疫学調査を行う抗体検出系も開発された。国内のマダニから SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法を確立、改善した。今後の国内での種々の調査が可能となった。

F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年 3 月からの患者が 40 名確認されている。国内では複数種のマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出されている。

1. 論文発表

- 1) Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T,

Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. *J Infect Dis.* 2013 Nov 14. in press

- 2) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.
- 3) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、獣医疫学雑誌 17(2)142-143, 2014.

2. 学会発表

- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳磨、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術

- 集会 2013.9.20～22 岐阜大学
- 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鎌田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからのSFTSウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナルPCRの評価、及びリアルタイム定量PCRとの比較 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 8) 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された11名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTSウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 11) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 12) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、西條政

幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

- 13) 高橋徹、亀井敏昭、前田健、水谷哲也、下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の日本における初症例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 14) 前田健、濱崎千菜美、久保翔太郎、遠藤泰之、寺田農、鍬田流星、高野愛、下田宙、森川茂 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 組換えバキュロウイルスによる SFTSV-NP の発現・精製とウサギ免疫血清の作製

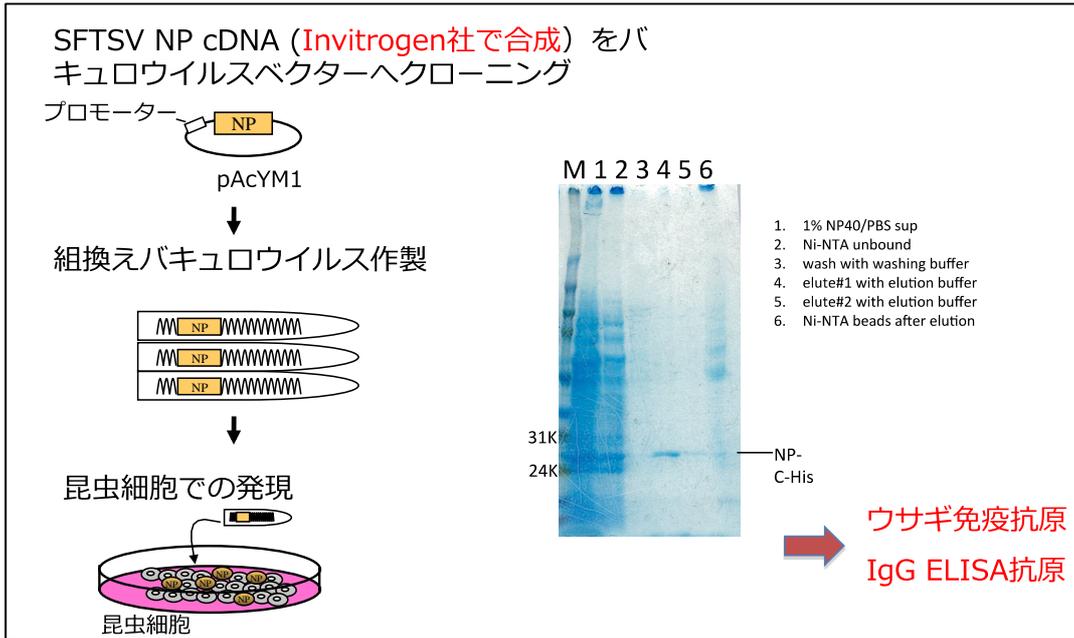


図2-1. 組換え抗原による ELISA

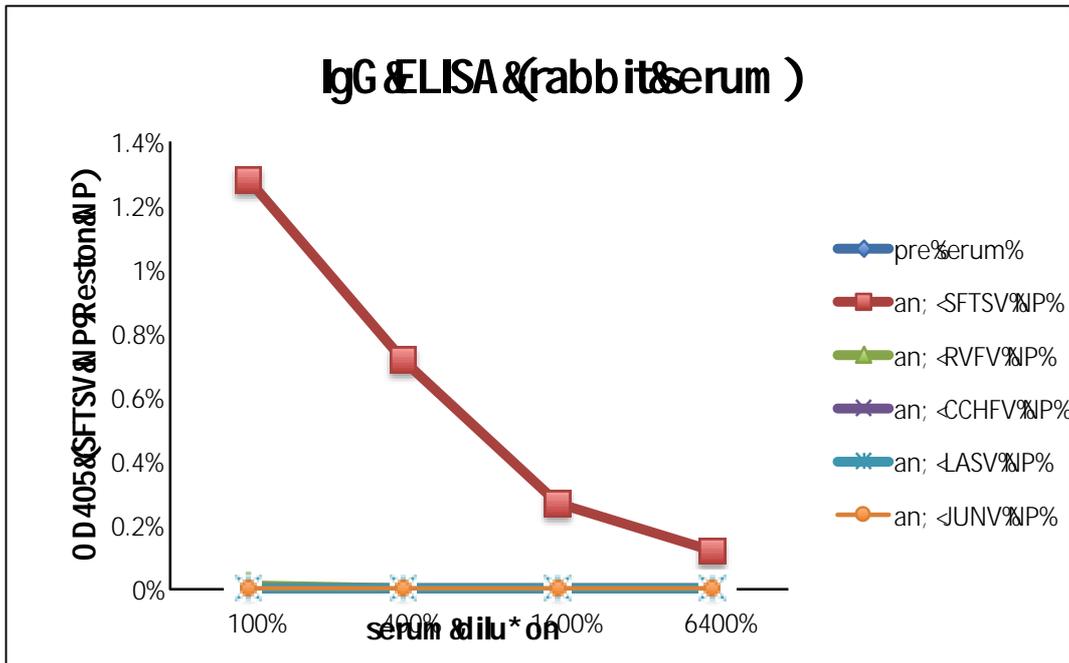


図2-2. SFTS ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA

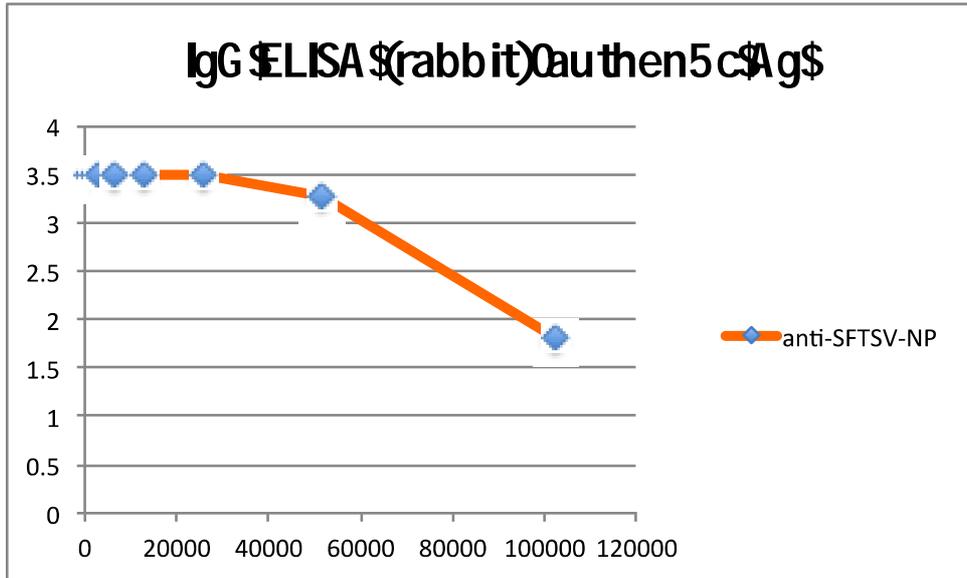


図2-1の組換え抗原による ELISA と比較して30倍以上感度が高い。

図3. SFTSV-NP 発現 HeLa 細胞を抗原とする間接蛍光抗体法

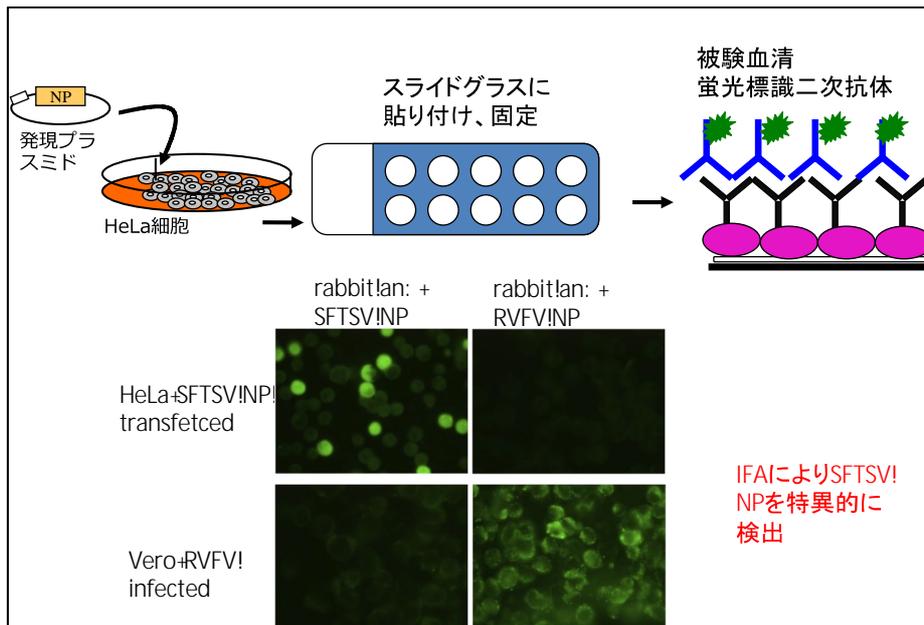


図4. 陽性コントロールプラスミド構築の概要

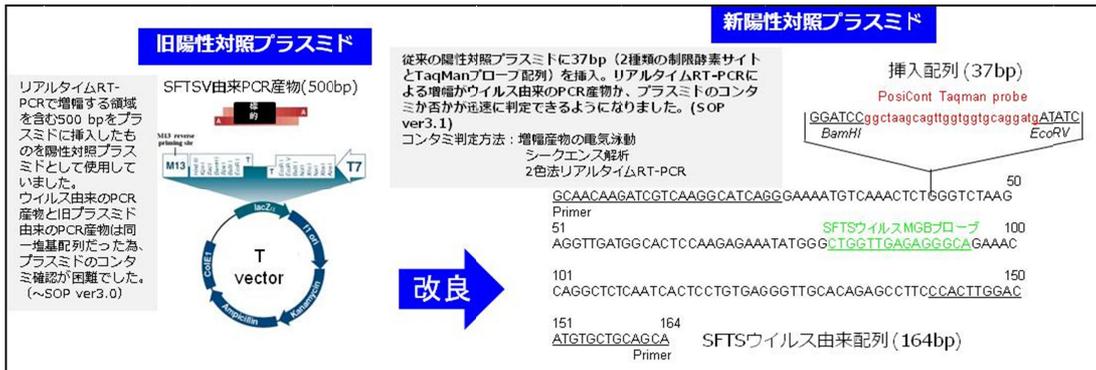


図5. 電気泳動を用いたコンタミネーションの判定

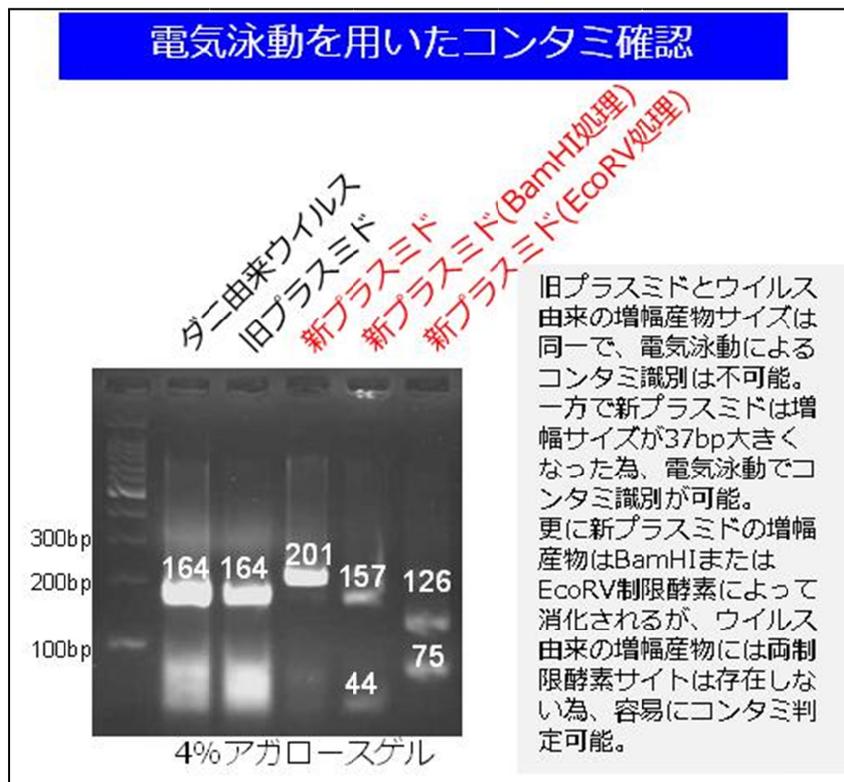


図6. 2色リアルタイム RT-PCR 法を用いたコンタミネーションの判定

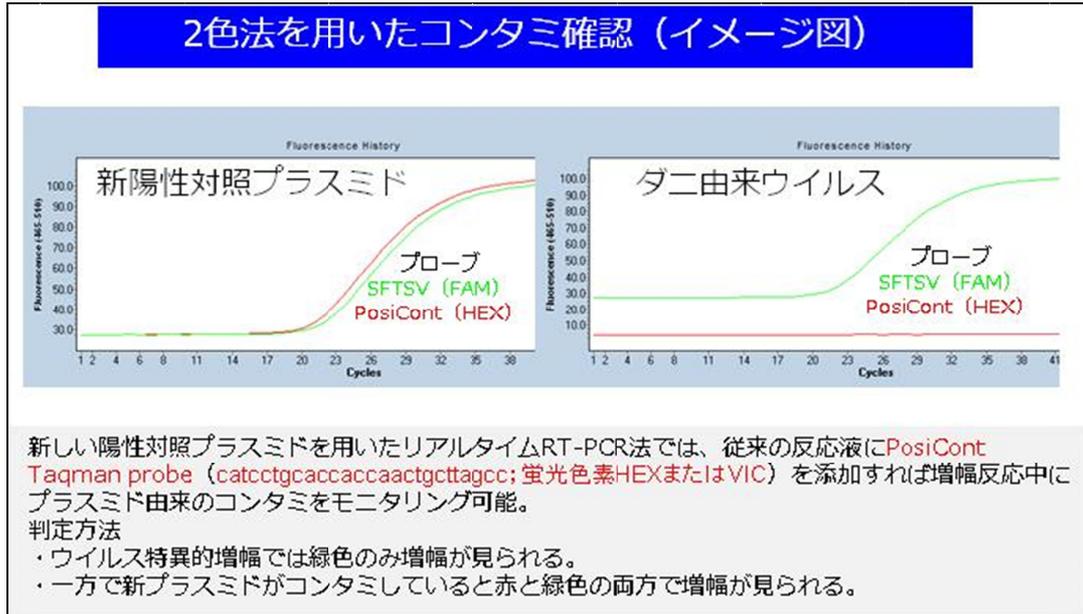
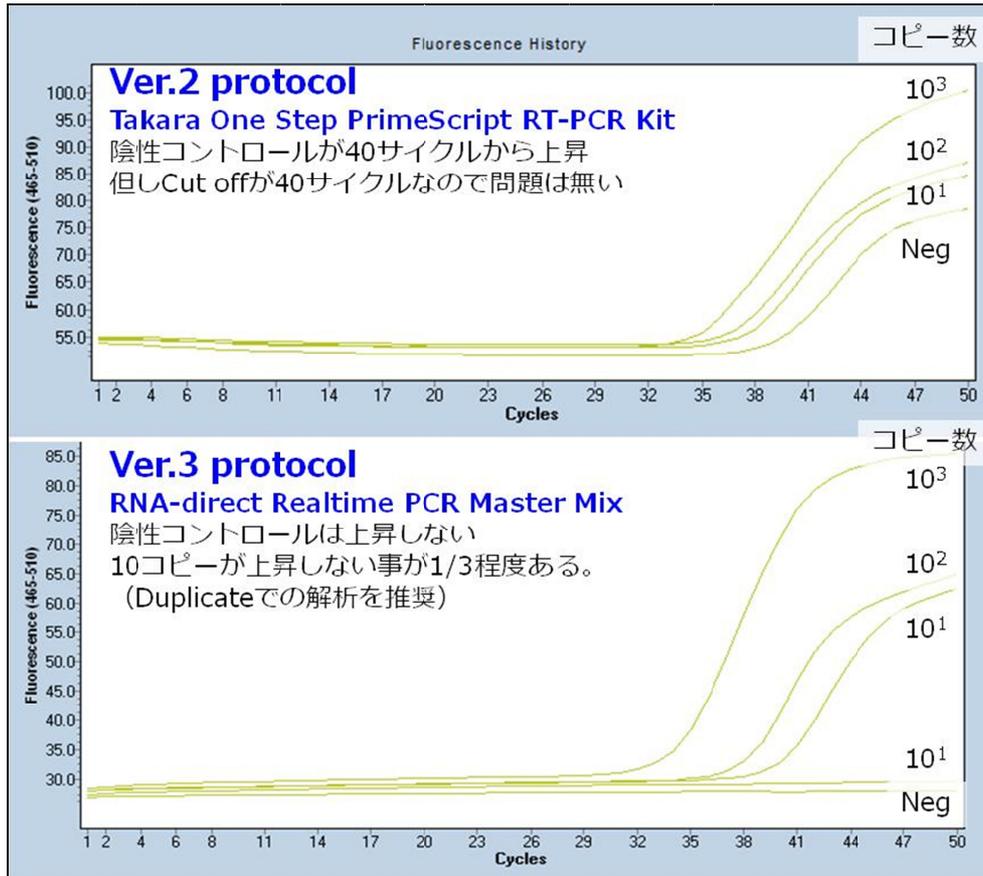


図7. ダニからの SFTS ウイルス検出に用いたリアルタイム RT-PCR 用試薬と温度条件

Takara One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)				TOYOBO RNA-direct Realtime PCR Master Mix		
RT						
			Denature	90°C	30sec	
RT	42°C	5min	RT	61°C	20min	
Denature	95°C	10sec	Denature	95°C	30sec	
PCR						
50 cycles			50 cycles			
Denature	95°C	5sec	Denature	95°C	5sec	
Annealing & elongation	60°C	35sec	Annealing & elongation	64°C	60sec	

図8. リアルタイム RT-PCR 反応試薬の比較



厚生労働科学研究費補助金「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」分担報告書

「Molecular analysis and control of acute respiratory virus infections」

分担研究者 松山州徳 国立感染症研究所 ウイルス第三部四室

研究要旨

急性呼吸器感染症 (ARI) ウイルスの多くは、咳を介して感染することから感染力が強く、瞬間に世界中に広がる可能性を内包している。このような感染症に立ち向かうために、研究者は国際的なネットワークを構築し、情報を交換できる環境をつくることが必要不可欠であると考え。ARI ウイルスにはインフルエンザ、RS、パラインフルエンザ、メタニューモ、コロナ、アデノ、ライノ、ボカウイルスが知られており、95%はこれらを原因とするが、残り5%の原因は未だに不明である。今回、中国 CDC の Yuelong Shu 博士と情報を共有し、インフルエンザ以外の ARI ウイルスについて、原因不明病原体の解析、ウイルス分離技術の向上を試みた。まず、ARI の検査に利用するための、ウイルス高感受性細胞の作成を試みた。数種の ARI ウイルス (インフルエンザ、メタニューモ、コロナ) は肺に特異的に発現している膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 を利用して細胞に感染することが報告されており、TMPRSS2 の発現した細胞を作成し、既存のヒトコロナウイルス (229E, NL63, SARS) と新型コロナウイルス (MERS-HCoV) に対する感受性を比較した。TCID50、ウイルス増殖、感染細胞の免疫染色を行ったが、いずれのウイルスでも TMPRSS2 発現細胞の方が非発現細胞よりも感受性が高かった。特に新型コロナウイルスでは 100 倍もの高い感受性が見られた。またウイルス増殖が非常に低いと考えられている NL63 において、51 倍の増殖が見られた。TMPRSS2 細胞はコロナウイルスの研究とサーベイランスの分野に貢献できるものと考えられる。一方、近年の検査技術の向上、例えばウイルス高感受性細胞の開発や、マルチプレックス検査法、次世代シーケンサーの導入により、不明とされてきた病原体が明らかになる可能性がある。しかし、最新の技術を駆使してもなお、検出できない病原体があることも事実である。中国側の研究でも今のところ新規病原体の検出には成功していない。本年度我々は、実際に地方衛生研究所より原因不明の上気道炎検体を入手し、病原体の分離精製及び同定を行った。その結果検出された病原体は風疹のワクチン株であり、急性呼吸器感染症とは無関係の予防接種に由来するウイルスであることがわかった。本結果は、不明病原体の分離同定の難しさとリスクを示す一例である。

A. 研究目的

ARI ウイルスの研究を難しくしている原因は様々あるが、その一つは、肺胞の性質を維持している良い培養細胞株が無いことにある。培養細胞で増殖が可能なウイルスは研究が良く進み、

不可能なウイルスは研究が遅れる傾向がある。ヒト肺胞上皮細胞の初代培養は難しく、数代の継代で肺胞の性質が無くなってしまふことが知られている。最新の初代培養法を用いれば、肺胞の性質とインフルエンザウイルスの感受性を維

持したまま長時間培養できることが報告されているが、特殊な技術であり、簡単に扱えるものではない。また、よく研究に利用されている肺由来の細胞株は、肺胞の性質をある程度維持しており、低いながら様々な ARI ウイルスに感受性があるが、増殖が遅く性状が不安定であり、培養も難しい。肺胞の性質を維持しつつ扱いやすい培養細胞があれば、新たな ARI ウイルスの分離や既存の ARI ウイルスの基礎研究が劇的に進展することが期待できるだけでなく、病原体診断やサーベイランスの分野でも利用できるはずである。最近の我々の研究から、コロナウイルスは、肺胞特異的プロテアーゼ (TMPRSS2) を利用して感染することがわかっている。この知見を他の ARI ウイルスにも広げて、呼吸器ウイルスに対する高感受性細胞を樹立したい。一方、急性呼吸器感染症の検査の結果、原因を特定できない検体は多数存在する。このような検体を入手し、詳細に検査することで、新しい病原体を発見することが、本共同研究の目的である。我々は実際に、地方衛生研究所で診断できなかった患者由来の検体を入手し、病原体の特定をおこなうことで、ウイルスの分離同定を行う上で問題点を明確にした。

B. 研究方法

・呼吸器ウイルス高感受性細胞作成の試み
VERO 細胞に TMPRSS2 を発現させた細胞 (Shirogane Y J Virol. 2008) を譲り受け、感染実験に用いた。また HeLa 細胞でも同様に TMPRSS2 発現細胞を作成した。様々なヒトコロナウイルス (229E, NL63, OC43, SARS, EMC) を感染させ、細胞変性効果、TCID50、ウイルス増殖を比較した。また、細胞変性を示さなかった NL63 については、抗スパイク蛋白抗体を用いて免疫染色をおこない、感染価を比較した。

・不明病原体の解析

山形県衛生研究所より提供を受けた不明病原体について、500ml の培養上清を用い、常法の PEG 沈殿法にて濃縮後、PBS にて溶解し、ショ糖密度勾配遠心分離法 (15%、40% ショ糖) にて濃縮精製を行った。続いて濃縮画分の感染価を確認後、電子顕微鏡と次世代シーケンシングを行い、病原体を決定した。

C. 研究結果

・高感受性細胞について

HCoV-EMC は TMPRSS2 非発現細胞では感染 48 時間で細胞のラウンディングが起こるのに対し、発現細胞では 16 時間程度で、著しく大きい細胞融合が見られた。同じ感染価のウイルスを用いて TCID50 で比較した場合、TMPRSS2 発現細胞ではウイルス感受性が 100 倍程度高くなっていた (表)。SARS-CoV については、既に 2010 年に報告している結果と同様であるが、TMPRSS2 発現細胞で、TCID50 は 7.9 倍、ウイルス増殖は 2.5 倍であった (表)。鼻風邪、上気道炎のコロナウイルス NL63 については、細胞変性効果は見られなかったが、免疫染色による感染細胞の計測結果 (FFU) では TMPRSS2 発現細胞では 5.1 倍感受性が高くなっていた (表)。また他の鼻風邪、上気道炎コロナウイルス 229E には 1966 年に分離され、長年研究室で継代されているラボ株と、2008 年に分離された臨床株があるが、ラボ株で 1.4 倍、臨床株で 11.5 倍の HeLa/TMPRSS2 での感受性が見られた (表)。さらに、鼻風邪上気道炎コロナウイルスの OC43 は HeLa では全く細胞変性効果が見られなかったが HeLa/TMPRSS2 では細胞の浮遊が見られた。感受性細胞として知られる RD 細胞との比較では、HeLa/TMPRSS2 の方が 10 倍程度ウイルス感受性が高くなっていた (表)。

・不明病原体について

電子顕微鏡像では、エンベロープを有する直径 90nm 前後の円形粒子が見られた。さらに次世代シーケンスの結果、風疹ウイルスが、4796 read 検出された。この配列は風疹ワクチン株に 3つの変異が含まれるものであった。RK 細胞での細胞変性の形態と、風疹抗体による中和、ウイルス増殖の温度感受性の試験の結果は、いずれもこの病原体が風疹ワクチン株であることを示すものであった。

D. 考察

・呼吸器ウイルス高感受性細胞について

コロナウイルスのスパイク蛋白の活性化にはプロテアーゼが必要と考えられており、本研究で用いた細胞では TMPRSS2 がスパイクを活性化したと考えられる。呼吸器ウイルスの多くがウイルスは肺胞特異的なプロテアーゼ、特に TMPRSS2 を利用して感染すると考えられるので、コロナウイルスと同様に、ARI ウイルスを分離するためには、TMPRSS2 発現細胞を使うことが望ましいと思われる。

・不明病原体の解析について

実際のウイルス分離作業に際して、まずは患者情報の詳細な検討の末に、可能性のある病原体を詳細に解析した後に、次世代シーケンス解析を行うべきである。本検体の採取から 22 日前に MR ワクチンが接種されていたことが分かっており、一回目の次世代シーケンスデータか

ら、風疹ウイルスを疑うことは可能であったと思われる。病原体検出の際には患者情報の事前の精査が重要である。一方、病原体不明と判断された検体であっても、そのほとんどが検体採取のタイミングや現行検査法の感度の限界による、既知のウイルスの検査漏れであると考えられ、詳細な病原体解析に進む前段階で、適切に検体をふるい分けするための経験の蓄積とそのプロトコル化が重要であると思われる。

E. 結論

1 . HeLa 及び Vero の TMPRSS2 発現細胞はコロナウイルスの分離に有効な細胞である。

2 . 本研究では次世代シーケンス、細胞培養、病原体精製、電子顕微鏡などで多くの人員と費用を費やしたが、得られた結果は取るに足らないものであった。しかし行った過程は不明病原体を明らかにするためには必要な作業であり、さらに我々がワクチン株の特定に至ったことは、今回、新規病原体の検出システムを構築できたことを意味する。

F. 研究発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

カウンターパートの研究計画

中国インフルエンザサーベイランスネットワーク
(441インフルエンザ実験室、556定点病院)

10~15臨床検体(インフルエンザ様疾患) / 年 / 定点病院

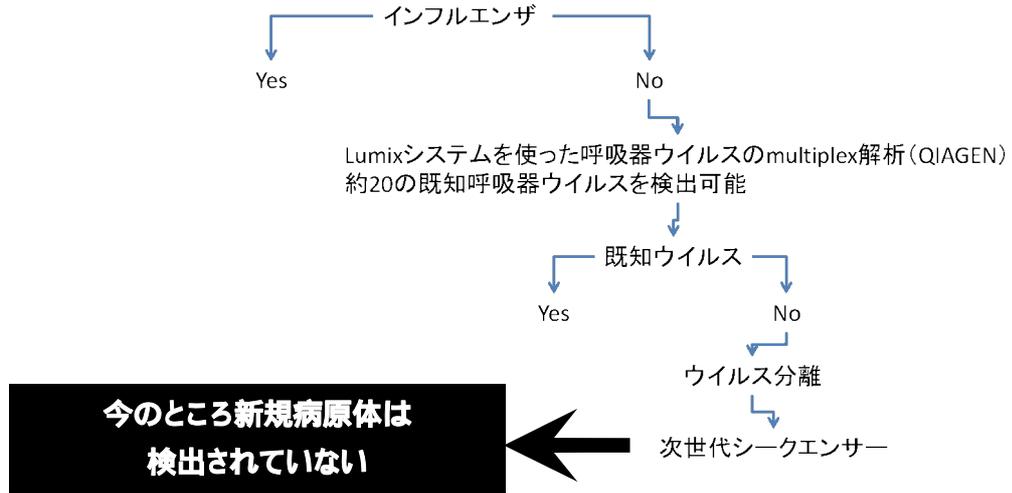


図1 中国 CDC インフルエンザセンター (Dr. Yuelong Shu) との共同研究
インフルエンザサーベイランスネットワークで得られる検体の中から、道の病原体を検出する試み。

表 . TMPRSS2 発現細胞のコロナウイルス感受性

Virus	Assay	VERO	VERO/TMPRSS2	倍率
EMC	T CID 50	4.3 ± 0.5	6.3 ± 0.5	100
	growth @ 24h	3.8 ± 0.4	4.3 ± 0.7	3.2
SARS	T CID 50	6.3 ± 0.5	7.2 ± 0.9	7.9
	growth @ 48h	5.7 ± 0.3	6.1 ± 0.2	2.5
NL63	FFU	2.1	3.8	51
	growth	Not done	Not done	-

Virus	Assay	HeLa	HeLa/TMPRSS2	倍率	
229E	ラボ株	growth @ 48h	5.0	5.1	1.4
	臨床株	growth @ 48h	3.7	5.0	11.5
OC43	T CID 50	No CPE	4.5	RD細胞の10倍	
	growth	Not done	Not done	-	

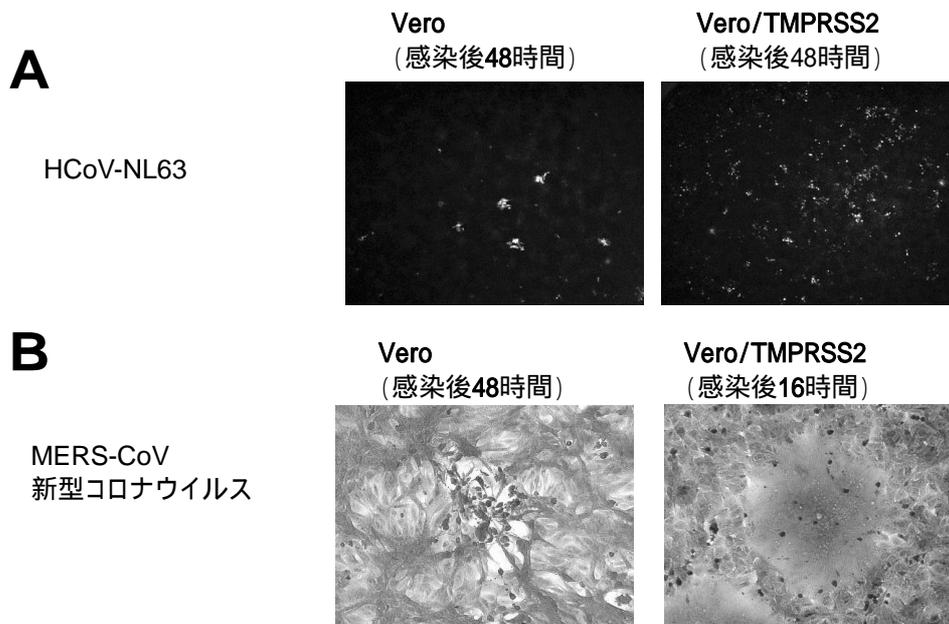


図2 . TMPRSS2 発現細胞へのコロナウイルスの感染

- A. HCoV-NL63 感染細胞は、抗スパイク蛋白抗体で検出した
 B. 新型コロナウイルスの感染細胞の光学顕微鏡写真

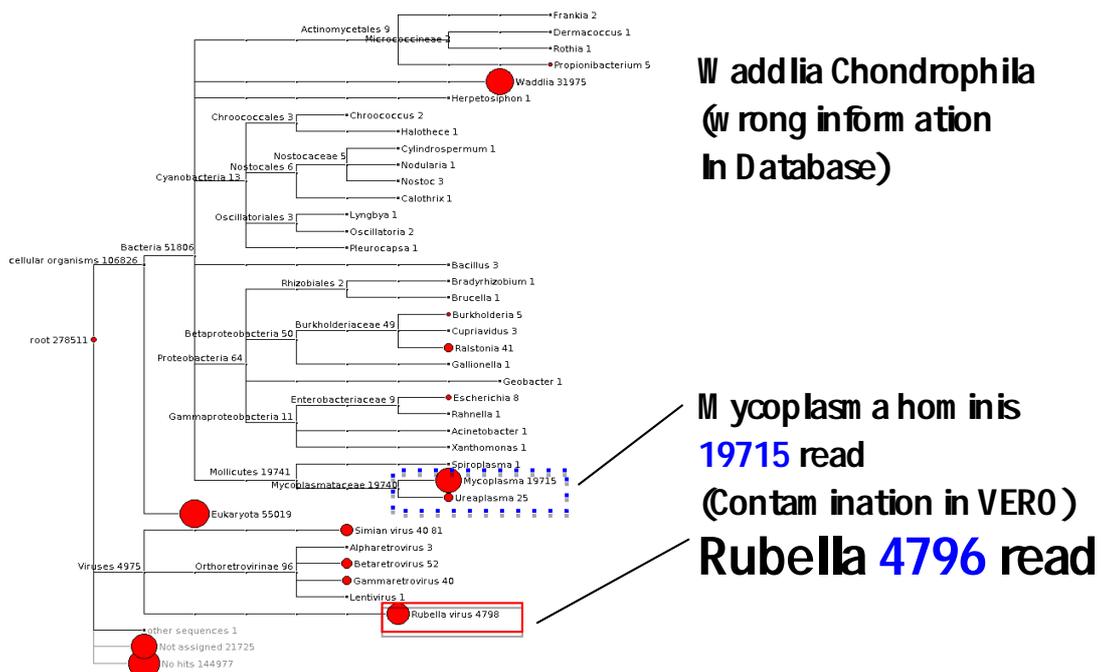


図3 不明病原体の次世代シーケンス

山形県衛生研究所から提供された VERO-E6 細胞でよく増殖する病原体は、発熱、呼吸器症状を示す小児の咽頭拭い液に由来する。この不明病原体を精製し同定したところ、MR ワクチンに由来する風疹のワクチン株であった。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

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

薬剤耐性淋菌の分子タイピング

研究分担者	中山 周一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	志牟田 健	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨：最後の有効薬剤、セフトリアキソンに耐性の淋菌の出現と拡散動向を把握することを中心に分離株サーベイランスとその分子タイピングを行った。既に出現した *penA* 遺伝子変異による耐性株の顕著な拡散は認められなかった。また、 β -lactamase の基質拡張型変異の一步手前となるタイプの淋菌の存在をタイ、日本で確認していたことを受け、 β -lactamase 保有淋菌分離株の多い中国で、そのような株の存在を検討し、極めて高い存在比率を確認した。前者の拡散を今後とも封じこめるとともに、後者の動向を今後注意深くモニターする必要がある。2007 年以降日本でアジスロマイシン耐性株が出現、増加していることを初めて体系的に示した。

A．研究目的

薬剤耐性の獲得とその拡散が非常に早い淋菌では、継続的な分離株サーベイランスにより、よりタイムリーな治療ガイドライン改定を行う必要がある。従来、国、地域毎に行われてきたこの作業を近隣国と行うことで、より有効なアクションを取れることが期待される。そこで中国との共同での分離株サーベイランスと分子タイピングのプロジェクト開始を目指している。このため、モデルケースとして、近年特に危惧されている、最後の有効薬剤と目されるセフトリアキソンに耐性な淋菌の出現と拡散のモニタリングを兼ねる形で、世界初のセフトリアキソン耐性菌 (*penA* 変異

型) 出現を見た日本の関西地域でのその後の分離株解析と、今後危惧される β -lactamase の基質拡張型変異によるセフトリアキソン耐性菌出現の可能性評価のため、タイの β -lactamase 保有淋菌を解析し、結果を中国の研究者にアナウンスした。これを受け、中国の β -lactamase 保有淋菌を解析する。近隣国と共同での最新の分離株サーベイランス結果の結果の国間比較により、耐性プロファイル、菌系統の類似点、相違点を継続的に把握することで、国間のクローナル拡散の傾向について基礎的データが得られる。このことは、将来、新規な耐性がどちらかの国で発生した場合の他方への到来の時期を予測する根拠とな

るため、両国での治療ガイドラインのよりタイムリーな改定法の確立に向け有用である。このための基礎データ収集を中国との間で確立するための交渉でモデルデータとして使う実例を作製する。

B. 方法

1) 分離株：

日本国内株は、今年度については、Retrospective な解析を企図して、2005~2011年に首都圏で分離した 147 株を使用し、分子タイピングを行った。

中国側株のβ-lactamase 保有淋菌 1 株、不明淋菌株 1 株を用いて、変異型β-lactamase 遺伝子検出 PCR のプロトコルチェックを兼ね、現地でこの 2 株を検討した。株の分離年等の情報は知らされなかった。

1) MIC 測定：

E test シート (AB bioMerieux, Solna, Sweden) を用いて、仕様書に従って測定した。

2) NG-MAST タイピング：

確立している Martin らの方法¹⁾に従った。

3) 変異型β-lactamase 遺伝子、TEM-135 検出 PCR

我々が開発した方法⁴⁾に従った。

C. 研究結果

1) 首都圏 2005 年~2011 年分離株のサーベイランス、NG-MAST タイピング：

全体として ST2958(19 株)と ST1407(16 株)とで主流を占めていた。他の ST は 5 株以下であっ

た。

日本での体系的な NG-MAST 解析は、2008 年の福岡での検討⁵⁾、2010~2012 年の京都・大阪での検討^{6)、7)}、

があり、この 2 タイプで主流を占める傾向は今回と一致している。しかし、今回は 2005 年からの retrospective 解析を行ったことで、既報のようなスナップショットデータでは得られない知見も得た、即ち、この現在主流の 2 タイプ ST2958、1407 はいずれも 2006 年に初例が検出され、いずれも 2008 年に prevalence のピークを示し、その後漸減しながらも 10% 以上の分離率を維持していること。2008 年、2009 年では ST2958 が有為に ST1407 より多いのに対して、2010 年、2011 年ではそれが逆転していること。この 2009 年と 2010 年での相変異が日本国内で有ったと考えると 2008 年の福岡での検討⁵⁾では ST2958 の方が多く、2010~2011 年の京都・大阪での検討⁶⁾では ST1407 の方が多かったことを説明できること。

以上より世界流行型であり、多剤耐性と強い相関が見られる ST1407 の日本での初検出から主流型となるまでの過程の一端を明らかにできた。

また、2009 年に日本においても使用が可能となったアジスロマイシンに対する耐性淋菌株のサーベイをこの株集団を対象にして行った。その結果、2007 年より程度耐性株が検出され始め、2011 年には 4 株に増加、またそれらが前述の ST1407 型として有為な clonarity を示す集団として存在したことを明らかにした⁸⁾。アジスロマイシン使用は耐性を生じ易く、注意が必要なことは分かっていたが、経

口薬である有利点から、使用認可された。今回のデータは耐性株出現を実際に示した点で有意義であった。

2) 中国に於けるβ-lactamase 保有淋菌（以下、PPNG と呼ぶ）の解析：

PPNG の保有するβ-lactamase は近年まで、プロトタイプの TEM-1 以外は発見されていなかったが、2009 年タイと日本で、初めて TEM-135 型を保有するものが検出された^{2,3)}。TEM-135 は基質拡張型β-lactamase ではないが、1 塩基置換変異のみで基質拡張型の TEM-20 となり得るタイプである。対して、TEM-1 は知られているいかなる基質拡張型になるにも最低 2 塩基の変異を必要とする。そこで、TEM タイプの決定をも含めて、2005 年～2008 年に分離されたタイの 96 株の PPNG の分子タイピングを行った。結果、以下のことが分かった。96 株中、TEM-135 は 9 株（9.4%）、他の 87 株はすべて（90.6%）TEM-1 であった。この 2 つのタイプ以外は発見されなかった。1 塩基置換のみで基質拡張型となり得るものがマイナー、～10%の比率ながら、タイでサーキュレーションしていることが初めて示された⁴⁾。

これを受け、PPNG の分離率が全淋菌株 30% をも占める中国での TEM-135 のサーベイランスが重要と考えカウンターパートの南京 CDC 施設で中国株解析を共同で行った。実際には実際にはカウンターパート側に意向で、今回はプロトコルチェックを主眼として、淋菌株 2 株、うち 1 株が PPNG を解析したが、その 1 株は TEM-135 型の PPNG であった。これ以降の南京 CDC 施設での中国国内の

PPNG 解析により、2007 年及び 2012 年の PPNG に占める TEM-135 の比率がいずれも 58%にも上ることが判明した⁹⁾。

D．考察

国内でのサーベイランス結果から、多剤耐性という性状と強く相関し、世界的に流行している ST1407 は、日本では 2006 年に初検出され、その後 2009 年まで ST2958 に次ぐ分離率で推移し、2010 年から最頻型となっていったプロファイルを明らかにできた。その多剤耐性という性状からも今後の監視が重要である。さらには 2007 年以降、アジスロマイシン耐性株が検知され、2011 年にはこの ST1407 型の耐性株が複数検出された。今後この型の拡散が危惧され、監視体制強化が望まれる。セフトリアキソン耐性に関連して、今後、出現に備えるターゲットは、基質拡張型β-lactamase を保有する PPNG である。前述のように、これに関しては基質拡張型の前駆体、中間体とも言うべき TEM-135 の存在が確認され、そのタイに於ける prevalence も約 10%、という具体的な数字を我々は算出していた⁴⁾。予備検討で中国の PPNG 株 1 株を解析し、それが TEM-135 であったことから、中国での TEM-135 存在率はタイ以上であることも考えられた。また、中国では PPNG の全分離淋菌に占める割合自体が～30%にも及ぶため、TEM-135 の総数は非常に多いと懸念されたが、実際に今回の 2007 年と 2011 年の解析結果で、いずれの年も PPNG 中 58%もの TEM-135 が検知されたことにより、基質拡張型β-lactamase によるセフトリアキソン耐性出現が近い将来に起こりえると危惧されるデータ

を得た。中国に於ける、TEM-135 のサーベランス、prevalence の調査とその上昇の監視に加え、それからの基質拡張型、TEM-20 の新生を注意深くモニターしていく必要があると思われる。

E . 結論

日本及びフランスで確認された変異型 *penA* 遺伝子によるセフトリアキソン耐性は現在、顕著な拡散状況にないが、今後その動向を引き続き観察する必要がある。日本国内で、セフトリアキソン MIC が上昇傾向にある NG-MAST ST1407 型菌が増加している。日本でのその発生から最頻型となっていく過程を推定することができた。この型の一部はアジスロマイシン耐性を獲得していることが判明した。今後この動向を注視すべきである。基質拡張型 β -lactamase によるセフトリアキソン耐性菌出現が危惧されている。基質拡張型の前駆体タイプの PPNG がタイでマイナー集団ながら存在確認されたことから、中国での PPNG についても検討し、中国でもこれが現存すること、タイでの存在率よりさらに高く過半数であるという危惧すべき状況が確認された。このタイプの prevalence 上昇と基質拡張型の新成をモニターしていく必要がある。このプロジェクトは元来、中国との共同研究であるが、中国側の正式合意が未決であるため、現在共同研究の形では進行できていない。今後、PPNG の多い中国でのそれらの株の解析の重要性をさらに説明し、たとえ自発的な形であってもプロジェクトを本格始動させる必要がある。

謝辞

今回解析した国内菌株を分与くださった、(株)医学生理学研究所の高山美奈子先生に感謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**:1497-15015.
- 2) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of *Chlamidia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility:an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:467-470.
- 3) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:3021-3023.
- 4) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.
- 5) Tanaka, M, et al. 2011. Anti-biotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria*

- gonorrhoeae isolates in Japan: Identification of strain clusters with multidrug-resistant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) 志牟田健、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、上田朋宏、亀岡博、古林敬一、川畑拓也、大西真。2012。「京都府と大阪府における 2010 年-2011 年に分離された淋菌株の性状解析」日本性感染症学会誌. **23**:83-89.
- 7) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobiol resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 8) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* Accepted.
- 9) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.* **40**:872-876. (Ohnishi, M. は協力研究者)
1. 学会発表
- 1) 井戸田一朗、中山周一、石原朋子、志牟田健、大西真:「梅毒トレポネーマの DNA 検出法と蛍光抗体法の検討」日本性感染症学会第 25 回学術大会、岐阜、2012 年 12 月
2. 論文発表
- 1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.
- 2) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobiol resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 3) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. *J. Infect. Chemother.* Accepted.
- 4) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo, M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. *Sex Transm. Dis.*
- G . 研究発表

40:872-876. (Ohnishi, M. は協力研究者)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23-25 年度 分担研究報告書

研究課題名：「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」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

「腸内細菌の molecular typing に関する研究 - 中国」

研究分担者 荒川英二

国立感染症研究所 細菌第一部

「*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する研究 - 中国」

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、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析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行った。また、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* お対象に 0 血清型別ならびに病原因子の探索を行い、その発生と流行の傾向についての調査を行った。共同研究にあたり中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、赤痢菌の分子タイピング、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する共同作業を行った。

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。また、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。

コレラ流行地においては、コレラ菌 *V. cholerae* 01, 0139 以外に *V. cholerae* non-01/non-0139(以下、ナグビブリオ)による下痢症も発生しており、また、その選択分離培地である TCBS 寒天培地に *V. cholerae* と同様の黄色集落を形成する *V. fluvialis* も検出される。コレラ流行地以外においても、ナグビブリオによるコレラ様の下痢症の報告もあり、O 血清型別による発生の疫学解析が大いに有効であることが示されている。本研究はナグビブリオ及び *V. fluvialis* の血清型分布とその病原因子保有状況について、中国における状況調査を主たる目的とする。

B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

中国においてヒト及び環境水から分離されたナグビブリオ及び *V. fluvialis* を中国側カウンターパートの Dr. Biao Kan よりそれぞれ 30 株、10 株分与してもらい、生化学性状試験と簡易同定キット EB20 による菌種の同定、菌種特異的検出 PCR により各菌株の確認試験を行った。*V. cholerae* の病原因子の探索のため、

ctx、*nag-st*、*hly*、T3SS、MARTX についてそれぞれの遺伝子検出 PCR を行った。

C. 研究結果および考察

I.

赤痢菌 (*Shigella* spp.) は細菌性赤痢の起因菌であり、当該菌によって汚染された飲料水および食品を摂取することによって感染する。わが国では海外渡航者による輸入例が多く、その渡航先のほとんどがアジアである。

赤痢菌は4つの種からなるが *S. sonnei* による赤痢が最も多い。赤痢菌の分子タイピングの手法としては、標準法である PFGE が使われることが多いが、*S. sonnei* に関しては MLVA も有用であることが示されている。こうした解析法の標準化は PFGE に関しては米国パルスネットを中心として進められているが、MLVA に関しては発展途上の段階にある。そこで、本研究では CCDC と我々との間で、*S. sonnei* MLVA に関する harmonization ができるかを検討した。

電子メールによる情報のやり取りから、双方が台湾のグループが開発した8遺伝子座を使った MLVA を行っていることがわかり、互いに DNA を交換、それぞれのラボで解析し、最終結果(リピート数に換算したもの)を送付しあい、結果を照合した。

CCDC サンプルの結果：我々のもとで CCDC からの 30 株について解析した結果、Ss11 遺伝子座においてすべて1リピートずつずれていたが、これらについては修正がなされ、最終的には一致した。それ以外の遺伝子座を含めた 8 遺伝子座 30 株、計 240 箇所中 233 箇所 (97%) について一致した。

NIID サンプルの結果：CCDC のラボで我々

(NIID)からの供与サンプル 32 株について解析したところ、当初は 256 箇所中 201 箇所(79%)について一致した(表 3)。上記 CCDC サンプルの解析結果よりも一致率が低かったため、CCDC から解析前の泳動ファイルを電送してもらい、我々の手法でファイルを解析した。その結果、すべての箇所でリピート数が一致した。

MLVA は最終結果が、各遺伝子座に関する遺伝子構造のリピート数に換算されるため、結果がデジタル化されており、比較するのが容易である。一方で、換算手法がラボによって異なる可能性があり、今回の CCDC との harmonization においても同様のことが明らかとなった。リピート数の算出は、観察された増幅産物の泳動上のサイズを本来の塩基配列からのサイズに置換し、そこからリピート数を整数として計算することからなる。また、PCR による非特異な増幅産物を解析時に排除しなければならない。こうした細かい点は、意外と見過ごされがちなので、今回実施したように実際に DNA サンプルや解析ファイルをやり取りして、各ステップを確認する必要があることが示された。

分子タイピングの harmonization はラボ間の連携を深め、また流行が発生した際に正しい情報交換を行うためにも重要な工程である。機会をみて、こうした活動を継続していく必要があると考えられる。

II.

菌株リストは表 1 の通り。ナグビブリオは患者下痢便由来が 10 株、環境水由来が 20 株の計 30 株、*V. fluvialis* は患者下痢便由来が 9 株、魚由来株が 1 株であった。分離年はナグビブリオが 2007~2010 年、*V. fluvialis* が 1963~2010

年であった。

まず常法に従い、ビブリオ属菌の選択分離培地である TCBS 寒天培地に接種したところ、約 1/4 が全く発育しないか、発育不良であった。特に *V. fluvialis* は 6 株(60%)が発育不良であった。それらの株は、非選択培地の TSA 培地に接種しなおし、全てが発育することを確認し、そこで発育したものを再度 TCBS 寒天培地に接種したが、やはり同様に発育不良であった。

それぞれの菌株を、TCBS 寒天培地で発育したものはそこから発育の良い黄色集落を、それ以外は TSA から任意の集落を 1 つ選択し、TSI 培地、LIM 培地、NaCl 濃度 0、0.1、3、8 %の Nutrient broth に接種し、また日水製薬の簡易同定キット EB20 にも接種し一夜培養した。

生化学的性状から得られた成績を表 1 に示した。その結果、ナグビブリオとして送付された VUN7 は *V. parahaemolyticus*、VUN21、22 は *Aeromonas sobria*、MJ-34、35 は *A. hydrophila* として同定された。*V. fluvialis* は 1 株を除き、*V. fluvialis* として同定された(後述)。

V. parahaemolyticus は極めて稀に白糖分解菌が分離される例があるが、VUN7 は白糖非分解菌であった。また、*Aeromonas* は白糖分解菌ではあるが、通常 TCBS 寒天培地には発育しない。実際 VUN21、22、MJ-34、35 は、我々の試験では TCBS 寒天培地には発育しなかった。培地メーカーによっては抑制力が弱く、*Aeromonas* 等が発育する場合もあるという。中国におけるこれらの培地や生化学的性状試験のやり方については、今後連絡を取り合って同定の精度管理として進めていくべきであると考えられた。

コレラの流行地においては、ナグビブリオによる下痢症も多発しており、また、それと同時

に *V. fluvialis* による下痢症の発生も見られる。患者便からのコレラ菌の選択分離には通常 TCBS 寒天培地をもちいるため、白糖分解菌である両者を区別することは出来ない。そこで、迅速簡便に両者を区別する PCR をすでに開発してあったので、今夏にの分離株についてもこれを行ったところ、表 1 に示すようにナグビブリオのみ *ompW* 陽性で、*V. fluvialis* のみ *VftoxR* 陽性の成績が得られた。この PCR の系についても今後中国側に検討を依頼する予定である。

ナグビブリオに関しては、ヒトに対する病原因子の有無が下痢症との関連から重要な点である。表 2 に示すように、VUN3 は *ctx* 陽性で、コレラ毒素産生性であることが考えられる。また、ZJ201-1 は環境水からの分離菌であるが、*nag-st* 陽性であった。その他は、III 型分泌機構が VUN1 を除くすべての患者株で陽性であり、同様に MARTX も VUN1 を除くすべての患者株で陽性であった。環境水からの分離菌で III 型分泌機構や MARTX 陽性の株はヒトに対する病原株である可能性が高いことが推測される。

生化学的性状がオキシダーゼを除き *V. fluvialis* に一致する 1 株(JS2)と TCBS 寒天培地に発育しなかった株(VF12)をハウスキーピング遺伝子である *gyrB* の塩基配列について、参照株やデータベース上の他の菌種との比較を行った。図 1 に示すように、JS2(93gyrB)、VF12(92gyrB)は参照株の *VflugyrB* とほとんど同一の配列であり、オキシダーゼ陰性の *Vibrio* である *V. metschnikovii* とは異なることが明

らかになり、JS2(93gyrB)、VF12(92gyrB)は *V. fluvialis* と同定された。

D. 結論

MLVA 等の菌株の解析手法の共通化、標準化、harmonization は、流行時における迅速な情報交換につながり、ラボ間のネットワークを構築していくうえで重要である。

今回中国との共同研究において、中国での分離株を日本側に分与してもらうことが出来、共同研究の基本となる材料の共有ができたことは、今後の共同研究を行う上でも非常に重要な点である。

菌種の同定に関して一部問題が見られるが、情報の共有を行うことや技術の支援を行うことでこれからさらに発展が見込まれるものと期待される。

中国側からは *V. fluvialis* の血清型について、非常に興味を持って取り組みたいと申し入れがあり、今後さらに発展させていくことが両国ラボラトリーの共通認識である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

strain	Consistency (CCDC-NIID)								
	SS1	SS3	SS6	SS9	SS10	SS11	SS13	SS23	
#1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#3	-3	0	-1	0	0	0	1	0	0
#4	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#5	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#6	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#7	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#9	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#10	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#11	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#12	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#13	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
#14	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#15	-2	0	-1	0	0	0	0	0	0
#16	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#18	0	0	0	0	-1	0	0	4	0
#19	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#20	-1	0	0	0	0	0	1	0	0
#21	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#23	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#25	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0
#26	-1	-1	-1	0	-1	3	0	0	0
#27	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	0
#28	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#29	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#30	-5	-1	-1	0	0	0	1	0	0
#31	0	0	0	0	0	0	0	4	0
#32	-1	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3 . NIID サンプルの解析結果の比較。CCDC から返送されたレポート数と我々のラボで得られたレポート数との差を表す。0 は両者で一致したことを示す。

[GENETYX-MAC: Evolutionary Tree]
 Date : 2014.02.14
 Method: UPGMA

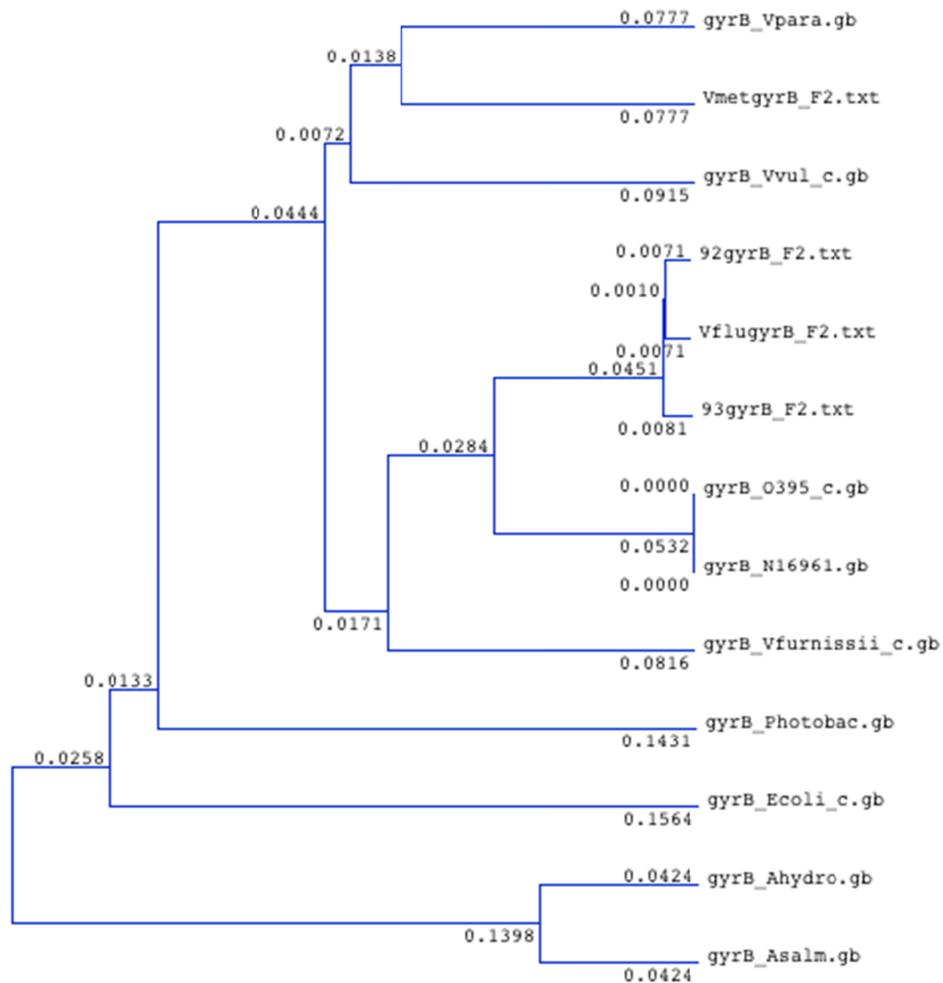


図1 オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis* の *gyrB* シークエンスによる解析。

92gyrB: TCBS で発育しない *V. fluvialis*、93gyrB: オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis*、VflugrB: *V. fluvialis* 参照株、VmetgyrB: *V. metschnikovii* 参照株、gyrB_: データベースに登録されている *gyrB* 遺伝子(Vpara: *V. parahaemolyticus*, Vvul: *V. vulnificus*, O395: *V. cholerae* O395, N16961: *V. cholerae* N16961, Vfurnissii: *V. furnissii*, Photobac: *Photobacterium damsela*, Ecoli: *E. coli*, Ahydro: *A. hydrophila*, Asalm: *A. salmonisida*)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23-25 年度 分担研究報告書

研究課題名：「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」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

「腸内細菌の molecular typing に関する研究 - 中国」

研究分担者 荒川英二

国立感染症研究所 細菌第一部

「*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する研究 - 中国」

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、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析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行った。また、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* お対象に 0 血清型別ならびに病原因子の探索を行い、その発生と流行の傾向についての調査を行った。共同研究にあたり中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、赤痢菌の分子タイピング、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する共同作業を行った。

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。また、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。

コレラ流行地においては、コレラ菌 *V. cholerae* 01, 0139 以外に *V. cholerae* non-01/non-0139(以下、ナグビブリオ)による下痢症も発生しており、また、その選択分離培地である TCBS 寒天培地に *V. cholerae* と同様の黄色集落を形成する *V. fluvialis* も検出される。コレラ流行地以外においても、ナグビブリオによるコレラ様の下痢症の報告もあり、O 血清型別による発生の疫学解析が大いに有効であることが示されている。本研究はナグビブリオ及び *V. fluvialis* の血清型分布とその病原因子保有状況について、中国における状況調査を主たる目的とする。

B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

中国においてヒト及び環境水から分離されたナグビブリオ及び *V. fluvialis* を中国側カウンターパートの Dr. Biao Kan よりそれぞれ 30 株、10 株分与してもらい、生化学性状試験と簡易同定キット EB20 による菌種の同定、菌種特異的検出 PCR により各菌株の確認試験を行った。*V. cholerae* の病原因子の探索のため、

ctx、*nag-st*、*hly*、T3SS、MARTX についてそれぞれの遺伝子検出 PCR を行った。

C. 研究結果および考察

I.

赤痢菌 (*Shigella* spp.) は細菌性赤痢の起因菌であり、当該菌によって汚染された飲料水および食品を摂取することによって感染する。わが国では海外渡航者による輸入例が多く、その渡航先のほとんどがアジアである。

赤痢菌は4つの種からなるが *S. sonnei* による赤痢が最も多い。赤痢菌の分子タイピングの手法としては、標準法である PFGE が使われることが多いが、*S. sonnei* に関しては MLVA も有用であることが示されている。こうした解析法の標準化は PFGE に関しては米国パルスネットを中心として進められているが、MLVA に関しては発展途上の段階にある。そこで、本研究では CCDC と我々との間で、*S. sonnei* MLVA に関する harmonization ができるかを検討した。

電子メールによる情報のやり取りから、双方が台湾のグループが開発した8遺伝子座を使った MLVA を行っていることがわかり、互いに DNA を交換、それぞれのラボで解析し、最終結果(リピート数に換算したもの)を送付しあい、結果を照合した。

CCDC サンプルの結果：我々のもとで CCDC からの 30 株について解析した結果、Ss11 遺伝子座においてすべて1リピートずつずれていたが、これらについては修正がなされ、最終的には一致した。それ以外の遺伝子座を含めた 8 遺伝子座 30 株、計 240 箇所中 233 箇所 (97%) について一致した。

NIID サンプルの結果：CCDC のラボで我々

(NIID)からの供与サンプル 32 株について解析したところ、当初は 256 箇所中 201 箇所(79%)について一致した(表3)。上記 CCDC サンプルの解析結果よりも一致率が低かったため、CCDC から解析前の泳動ファイルを電送してもらい、我々の手法でファイルを解析した。その結果、すべての箇所でもリポート数が一致した。

MLVA は最終結果が、各遺伝子座に関する遺伝子構造のリポート数に換算されるため、結果がデジタル化されており、比較するのが容易である。一方で、換算手法がラボによって異なる可能性があり、今回の CCDC との harmonization においても同様のことが明らかとなった。リポート数の算出は、観察された増幅産物の泳動上のサイズを本来の塩基配列からのサイズに置換し、そこからリポート数を整数として計算することからなる。また、PCR による非特異的な増幅産物を解析時に排除しなければならない。こうした細かい点は、意外と見過ごされがちなので、今回実施したように実際に DNA サンプルや解析ファイルをやり取りして、各ステップを確認する必要があることが示された。

分子タイピングの harmonization はラボ間の連携を深め、また流行が発生した際に正しい情報交換を行うためにも重要な工程である。機会をみて、こうした活動を継続していく必要があると考えられる。

II.

菌株リストは表1の通り。ナグビブリオは患者下痢便由来が 10 株、環境水由来が 20 株の計 30 株、*V. fluvialis* は患者下痢便由来が 9 株、魚由来株が 1 株であった。分離年はナグビブリオが 2007~2010 年、*V. fluvialis* が 1963~2010

年であった。

まず常法に従い、ビブリオ属菌の選択分離培地である TCBS 寒天培地に接種したところ、約 1/4 が全く発育しないか、発育不良であった。特に *V. fluvialis* は 6 株(60%)が発育不良であった。それらの株は、非選択培地の TSA 培地に接種しなおし、全てが発育することを確認し、そこで発育したものを再度 TCBS 寒天培地に接種したが、やはり同様に発育不良であった。

それぞれの菌株を、TCBS 寒天培地で発育したものはそこから発育の良い黄色集落を、それ以外は TSA から任意の集落を 1 つ選択し、TSI 培地、LIM 培地、NaCl 濃度 0、0.1、3、8%の Nutrient broth に接種し、また日水製薬の簡易同定キット EB20 にも接種し一夜培養した。

生化学的性状から得られた成績を表1に示した。その結果、ナグビブリオとして送付された VUN7 は *V. parahaemolyticus*、VUN21、22 は *Aeromonas sobria*、MJ-34、35 は *A. hydrophila* として同定された。*V. fluvialis* は 1 株を除き、*V. fluvialis* として同定された(後述)。

V. parahaemolyticus は極めて稀に白糖分解菌が分離される例があるが、VUN7 は白糖非分解菌であった。また、*Aeromonas* は白糖分解菌ではあるが、通常 TCBS 寒天培地には発育しない。実際 VUN21、22、MJ-34、35 は、我々の試験では TCBS 寒天培地には発育しなかった。培地メーカーによっては抑制力が弱く、*Aeromonas* 等が発育する場合もあるという。中国におけるこれらの培地や生化学的性状試験のやり方については、今後連絡を取り合って同定の精度管理として進めていくべきであると考えられた。

コレラの流行地においては、ナグビブリオによる下痢症も多発しており、また、それと同時

に *V. fluvialis* による下痢症の発生も見られる。患者便からのコレラ菌の選択分離には通常 TCBS 寒天培地をもちいるため、白糖分解菌である両者を区別することは出来ない。そこで、迅速簡便に両者を区別する PCR をすでに開発してあったので、今夏にの分離株についてもこれを行ったところ、表 1 に示すようにナグビブリオのみ *ompW* 陽性で、*V. fluvialis* のみ *VftoxR* 陽性の成績が得られた。この PCR の系についても今後中国側に検討を依頼する予定である。

ナグビブリオに関しては、ヒトに対する病原因子の有無が下痢症との関連から重要な点である。表 2 に示すように、VUN3 は *ctx* 陽性で、コレラ毒素産生性であることが考えられる。また、ZJ201-1 は環境水からの分離菌であるが、*nag-st* 陽性であった。その他は、III 型分泌機構が VUN1 を除くすべての患者株で陽性であり、同様に MARTX も VUN1 を除くすべての患者株で陽性であった。環境水からの分離菌で III 型分泌機構や MARTX 陽性の株はヒトに対する病原株である可能性が高いことが推測される。

生化学的性状がオキシダーゼを除き *V. fluvialis* に一致する 1 株(JS2)と TCBS 寒天培地に発育しなかった株(VF12)をハウスキーピング遺伝子である *gyrB* の塩基配列について、参照株やデータベース上の他の菌種との比較を行った。図 1 に示すように、JS2(93gyrB)、VF12(92gyrB)は参照株の *VflugyrB* とほとんど同一の配列であり、オキシダーゼ陰性の *Vibrio* である *V. metschnikovii* とは異なることが明

らかになり、JS2(93gyrB)、VF12(92gyrB)は *V. fluvialis* と同定された。

D. 結論

MLVA 等の菌株の解析手法の共通化、標準化、harmonization は、流行時における迅速な情報交換につながり、ラボ間のネットワークを構築していくうえで重要である。

今回中国との共同研究において、中国での分離株を日本側に分与してもらうことが出来、共同研究の基本となる材料の共有ができたことは、今後の共同研究を行う上でも非常に重要な点である。

菌種の同定に関して一部問題が見られるが、情報の共有を行うことや技術の支援を行うことでこれからさらに発展が見込まれるものと期待される。

中国側からは *V. fluvialis* の血清型について、非常に興味を持って取り組みたいと申し入れがあり、今後さらに発展させていくことが両国ラボラトリーの共通認識である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

strain	Consistency (CCDC-NIID)								
	SS1	SS3	SS6	SS9	SS10	SS11	SS13	SS23	
#1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#3	-3	0	-1	0	0	0	1	0	0
#4	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#5	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#6	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#7	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#9	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#10	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#11	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#12	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#13	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
#14	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#15	-2	0	-1	0	0	0	0	0	0
#16	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#18	0	0	0	0	-1	0	0	4	0
#19	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#20	-1	0	0	0	0	0	1	0	0
#21	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#23	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#25	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0
#26	-1	-1	-1	0	-1	3	0	0	0
#27	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	0
#28	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#29	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#30	-5	-1	-1	0	0	0	1	0	0
#31	0	0	0	0	0	0	0	4	0
#32	-1	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3 . NIID サンプルの解析結果の比較。CCDC から返送されたレポート数と我々のラボで得られたレポート数との差を表す。0 は両者で一致したことを示す。

[GENETYX-MAC: Evolutionary Tree]
 Date : 2014.02.14
 Method: UPGMA

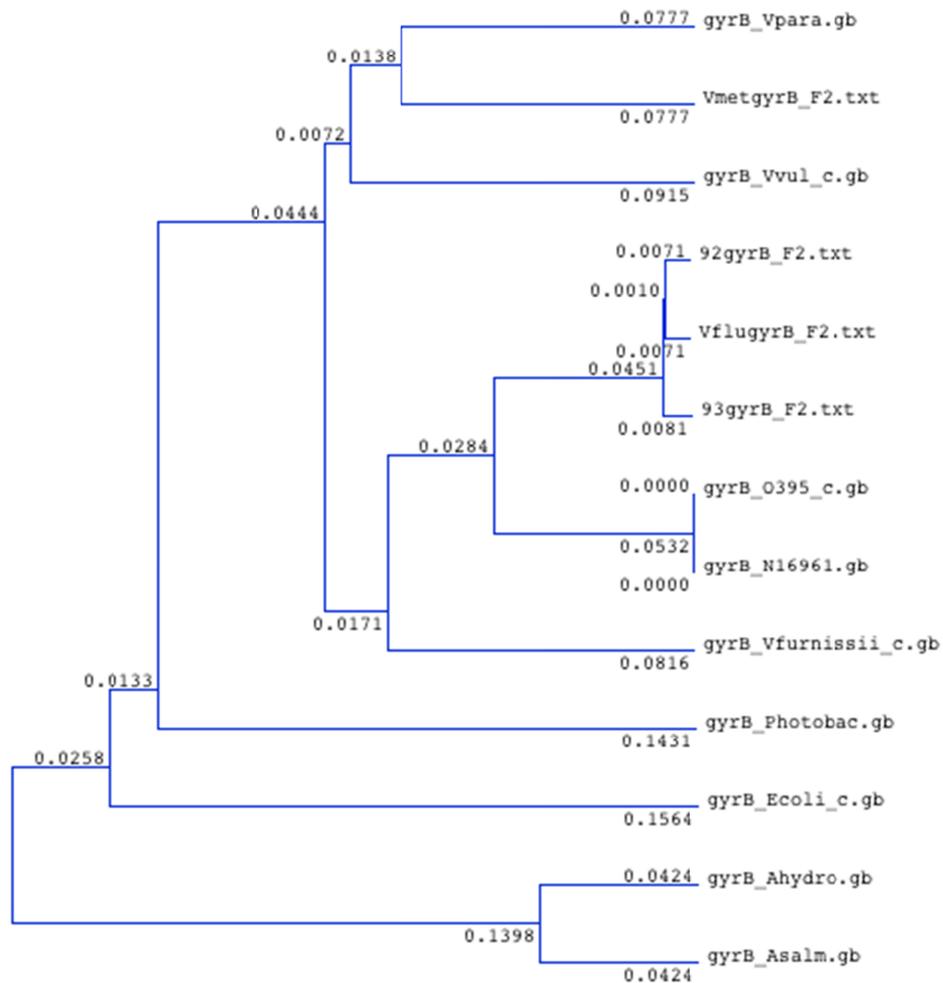


図1 オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis* の *gyrB* シークエンスによる解析。

92gyrB: TCBS で発育しない *V. fluvialis*、93gyrB: オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis*、VflugrB: *V. fluvialis* 参照株、VmetgyrB: *V. metschnikovii* 参照株、gyrB_: データベースに登録されている *gyrB* 遺伝子(Vpara: *V. parahaemolyticus*, Vvul: *V. vulnificus*, O395: *V. cholerae* O395, N16961: *V. cholerae* N16961, Vfurnissii: *V. furnissii*, Photobac: *Photobacterium damsela*, Ecoli: *E. coli*, Ahydro: *A. hydrophila*, Asalm: *A. salmonisida*)

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業） 総合分担研究報告書

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（H23 - 新興 指定 020）

赤痢アメーバに関する研究

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により起こるアメーバ症は近年日本においても報告が増加している重要な原虫感染症である。本研究では日本と感染様式が類似している台湾と共同研究を行うことで、東アジアにおけるアメーバ症の分子疫学調査方法の確立と病原性を規定する遺伝子の発見を目指す。

A. 研究目的

赤痢アメーバにより発症するアメーバ症は毎年 10 万人の死者を出す、世界的に重要な原虫感染症である。アメーバ症は飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国においては下痢の主要原因の一つであるが、日本を含めた先進国では渡航者の他、自己の衛生環境を保てない障害者や老人施設、糞口感染の可能性がある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) や commercial sex worker の女性が主なリスク群となる。また、*E. histolytica* 感染を疑う場合、形態学的に見分けられない、非病原性の *E. dispar* 感染との鑑別が問題となる。*E. dispar* であれば便中に栄養体やシストが検出されても治療の必要はないとされるが、無症候性の *E. histolytica* 感染者も多く存在するため確実な鑑別と適正な治療が必要である。欧米では MSM におけるアメーバ感染は *E.*

histolytica と *E. dispar* の両方が同定されるため特に鑑別が重要とされている。しかし日本においては *E. dispar* が同定されることはほとんどない。この事実は日本に独特な要因が存在することを示唆しているが、研究対象とすることが可能な症例数が限られる状況では研究を進めることが困難であった。また、現在の日本では症状のある患者が来院した場合にアメーバ症と診断され、検体を得る機会が生じるが、無症候性のキャリアからの検体を募るのは非常に難しくなっている。一方同じ東アジアにある台湾ではアメーバ症のリスク群は日本と同じであり、*E. dispar* 感染がほとんど見られないという状況も一致している。しかし台湾では外国人労働者に寄生虫検査を課していることから検査対象が非常に広く、多様な遺伝子型や株の取得が可能である。本研究では台湾 CDC と共同研究から東ア

ジアの赤痢アメーバ症の疫学調査方法と新たな病原因子の発見を目指す。

B. 研究方法

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

日本、台湾で得られた臨床株について6種類の tRNA sort tandem repeat (STR) を指標とした方法により遺伝子型別を行った。さらに系統解析を行い日本株、台湾株の特徴、病原性との関連を示した。さらに日本の臨床分離株を使った比較ゲノミクスで見出された、病原性と関与すると予想される ORF (AIG1-17) について、台湾株さらに日本株についても病原性との関与が見出されるか、評価を行った。

2) 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF (AIG1-17) の機能解析

2-1) AIG1-17 強発現株の作成。

E. histolytica HM1:cl6 株に pEhExHA, pEhExHA-AIG1-17 プラスミドをリポフェクション法により導入し、G418 による薬剤選択を行い、AIG1-17-HA, HA 株を樹立した。

2-2) AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。
AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、形態を観察した。すると突起 (protrusion) が AIG1-17-HA 株で多く形成されているように観察された。そこで突起の幅 0.8 μ m 以上、突起の長さ 0.7 μ m 以上、さらに長さが幅の 1.5 倍以上という条件で各細胞種につき 60 個の細胞を観察する実験を 3 回行った。

2-3) AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、共焦点顕微鏡 (LSM510META, Zeiss) で観察し、その運動の様子を画像デ

ータとして取得した。40 倍対物レンズを用い、1.57 秒/フレームの速度で一画像を撮り、5 秒ごとに 10 分、合計 120 フレームの画像としてデータを得た。この画像を ICY (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) の Active Contours と Track Manager Plug In を用いて解析した。

2-4) AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を通常の BIS 培地またはシステインを除去した BIS 培地で培養し、増殖速度を検討した。各細胞 1 \times 10³/mL を各培地に調製し、24 時間ごとにトリパンブルー染色にて生細胞のみ計測した。

3) 台湾での臨床分離株の確立と解析

台湾 CDC に送られてくる外国人労働者からの便検体は寄生虫調査のために採取されるためアメーバ症の症状がないシストキャリアーサンプルを見出すことが比較的容易である。日本では健康な人物から便検体の供与を受けることや、そこにシストキャリアを見つけることはほぼ不可能であり、台湾 CDC の赤痢アメーバ検体は非病原性赤痢アメーバ株の研究に必須な材料である。よって台湾 CDC における臨床分離株の確立とその解析を行った。

3-1) 台湾での臨床分離株確立

日本からプロトコールの提供と YIMDAH 培地用の試薬 (Yeast Extract) の供与を行い、台湾 CDC での臨床分離株の確立を行った。

3-2) 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

2 種類の台湾由来非病原性臨床分離株 (TC1446 株, TC1198 株) について、ハムスターを用いた肝膿瘍形成実験を行った。

TC1146 株と TC1189 株と陽性コントロールとしてアメーバ肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)から回収して病原性を増強した HM1 株 (ALA 株) をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹で摂取し、7 日後の ALA の大きさを評価した。

C. 研究結果

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

1-1) 臨床株の遺伝子型別

台湾株 132、日本株 37 に関して 6 つの tRNA STR を指標とした遺伝子型別を行い、系統解析を行った。大きく 3 つのグループに分類されたことからこれをクラス A, B, C とした。クラス A には 52 株 (うち日本株 6)、クラス B には 62 株 (うち日本株 17)、クラス C には 18 株 (うち日本株 14) が含まれた。また臨床症状はクラス A では無症候 42、下痢症状 2、肝膿瘍 3、下痢と肝膿瘍 2、その他 3、クラス B では無症候 36、下痢症状 13、肝膿瘍 11、その他 2、クラス C では無症候 1、下痢症状 7、肝膿瘍 7、下痢と肝膿瘍 1、その他 2 であった。

クラス A, B, C を比較するとクラス C は日本株が大半を占め、さらに無症候は 1 しかないことから、日本に多い病原性の高い遺伝子型が存在することが示唆された。また日本由来の非病原性株はクラス A に分類され、このクラスは無症候株が一番多いことから、日本の無症候株はアジアに広く存在する無症候株の一つであることが示唆された。

1-2) 病原性関連 ORF の解析

日本国内で分離された非病原性株と病原性株との比較ゲノミクスにより以前我々の

研究室で見出した、AIG1 family protein (EHI_176590): 以降 AIG1-17、の ORF が台湾株にどの程度存在するのか、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により検討した。AIG1-17 は非病原性株に存在していない ORF として同定されたため、台湾株でも無症候性株には存在せず、患者由来の株に存在がみられることが期待された。クラス A, B, C それぞれから DNA サンプルが残っているものを優先に 14、20、4 サンプルから PCR を行ったところ、各クラスで 1、5、2 の陽性クローンが確認された。この結果を症状別に整理すると無症候 29、下痢症状 5、肝膿瘍 2、その他 2 のサンプルのうち、陽性であったのは無症候 4、下痢症状 2、肝膿瘍 0、その他 2 であり、%で見ると無症候 14、下痢症状 40、肝膿瘍 0、その他 100 であった。

以前無症候株で欠損しているとして同定された AIG1-17 の ORF を PCR にて確認したところ、台湾の無症候株から 14%検出された。よってすべての無症候株に共通の特徴ではないと考えられた。しかしクラス A に関しては PCR を行った 14 サンプル中 1 サンプルのみポジティブであり、20 サンプル中 5 サンプルがポジティブだったクラス B とは差があると考えられた。よって AIG1-17 の存在が赤痢アメーバの系統に依存する可能性が示唆された。今後サンプル数を増やし、検討を重ねる必要がある。

2) 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

2-1) AIG1-17 強発現株の作成。

トランスフェクションと薬剤 (G418) 選択により $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ G418 に耐性の HA 株、AIG1-17-HA 株を確立した。

2-2)AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。
AIG17-HA 株には多くの protrusion が観察された (図 1)

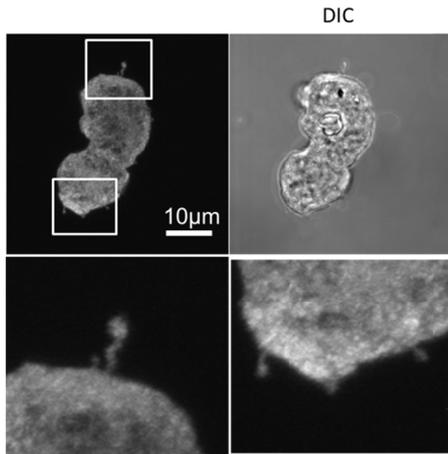


図 1 . AIG1-17-HA の protrusion

そこで研究方法に記述した基準に合った protrusion の数を 60 細胞について 3 回計測した。この結果、HA 株に比べ AIG1-17-HA 株で有意に protrusion の数が増していたことが明らかとなった ($P < 0.01$) (図 2.)
よって AIG1-17-HA 発現は細胞骨格の制御に関与があると考えられた。

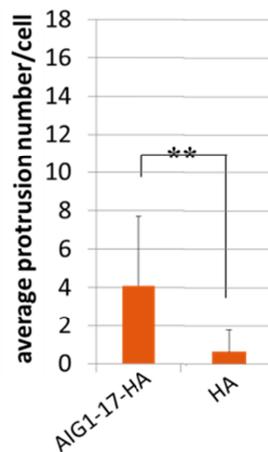


図 2 . 一細胞当たりの protrusion 数

2-3)AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。
AIG1-17-HA 株と HA 株の細胞運動を数値

化し、20 細胞程度の観察を 4 回行い比較した。しかし HA, AIG1-17-HA 株どちらも $0.6\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の移動能力を示し、有意差は見られなかった。よって AIG1-17 は細胞運動への関与は少ないと考えられた。

2-4) AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

通常培地とシステイン除去培地での細胞増殖を検討した。下に示すように通常培地で HA 株、AIG1-17-HA 株に差は見られなかったが、システイン除去培地で 120 時間の培養の後、AIG1-17-HA 発現株で HA 株より増殖が改善する傾向が見られた (図 3)

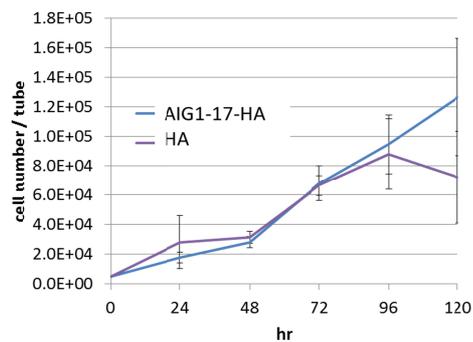
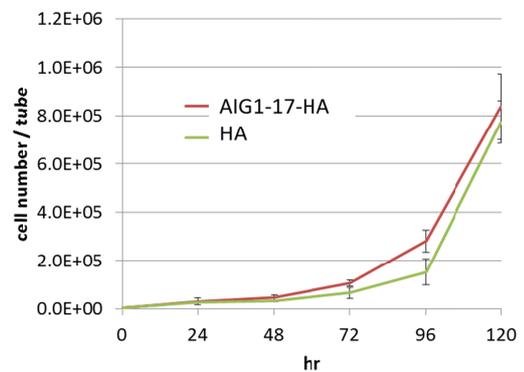


図 3. 通常培地 (上) とシステイン除去培地 (下) での増殖曲線

よって AIG1-17-HA 強発現により酸化ストレス条件下での増殖が改善する可能性が示された。

以上より、AIG1-17の強発現は細胞運動に関与はないものの、protrusion形成が促進されること、システイン除去培地での増殖が改善する傾向を示すことが明らかとなった。赤痢アメーバの病原性にはさまざまな表現型が関与することが知られている。AIG1-17が全ての表現型を強く変化させるわけではないが、ストレスに強い傾向や細胞骨格の活性が強い傾向が協調的に働き、宿主組織内での生存に有利であったり、侵襲性を増す表現型へと向かわせることが考えられた。引き続き細胞骨格の変化が関与すると考えられる表現型、貪食・細胞接着について検討を行う。

3) 台湾での臨床分離株の確立と解析

3-1) 台湾での臨床分離株確立

2013年10月、台湾で分離培養に成功した二株の供与を受けた。TC1146株とTC1198株。両者とも*Criethidia fasciculata*(Cf)と共培養されていた。

日本での培養も順調に開始され、ゲノム解析に向け、Cfを除いた培養を確立すべくCf量を減らした培地での培養を開始している。

3-2) 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

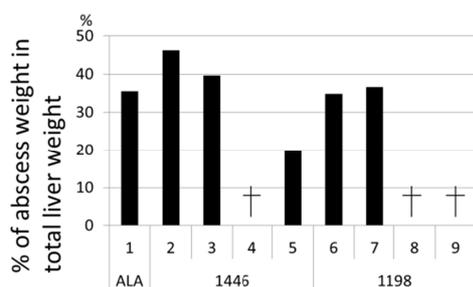


図4. TC1446株、TC1198株のALA形成

TC1146株とTC1189株をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹摂取し、7日後のアメーバ肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)の大きさを評価した(図4)。

陽性コントロールであるALA株が肝臓の35%程度の大きさの膿瘍を形成した一方、二つの台湾株もTC1446株の一つが20%程度であった以外、全ての動物で35~45%程度のALAを形成した。図4で十字で示した動物は手術翌日に志望した個体であり、摂取した株の病原性が高かったことを示すと考えられる。

以上より、今回台湾より供与された非病原性株はハムスターに対してALA形成能を有していた。これはヒトへの病原性とハムスターへの病原性が異なる、または腸管と肝臓への病原性が異なるという二つの可能性があると考えている。今後腸管への病原性の評価方法を確立する必要がある。一つはマウスの盲腸へ接種して腸アメーバ症を模した病態を作らせるマウス腸管モデルでの評価、もう一つはまだ確立途中であるが、屠殺されたブタの大腸を用いたex-vivoでの評価系があり、これらを用いた検討を考えている。

台湾で無症候性患者からの赤痢アメーバ株が確立できるようになったことは大きな進歩であった。今後ヒトに症状を示さない赤痢アメーバ株の解析を、特にAIG1-17に注目しながら展開していきたいと考えている。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Kumiko Tsukui: Unique genomic features of an *avirulent Entamoeba histolytica* strain found in Japan

The eighth Japan-Taiwan symposium on Antibiotics resistance and foodborne diseases, October, 2011, Tokyo, Japan

Kumiko Tsukui, Genomic features of *Entamoeba histolytica* Japanese clinical isolates The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster, September, 2013, Taipei, Taiwan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in *comparative* genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases & Cooperative Project Report, September 12-13, 2013, Tokyo, Japan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi

Nozaki, 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases, February, 9-13, Dhaka, Bangladeshi

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

分担研究総合報告書（H23-25 年度）

日本および台湾におけるデング熱輸入症例からのデングウイルス遺伝子解析

分担研究者 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 小滝徹、モイ メンリン、中山絵里、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）

研究要旨 デング熱の流行地域および流行は年々拡大増加する傾向にある。台湾では毎年、デング熱が流行しているが、わが国同様海外からの輸入症例も多い。フィリピンおよびインドネシアからの輸入症例から、ウイルスを分離し、配列を決定したウイルス遺伝子情報を交換し解析した。その結果、日本と台湾からの輸入症例からの分離ウイルスは渡航先により同様の傾向を示し、インドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分けすることが可能であった。フィリピンではデングウイルス 1 型が主流株であったが、4 型流行も発生していたことが明らかになった。これは 2012 年、2013 年フィリピンのデング熱の致死率は 0.5%、0.32%と高かったことと関係する可能性が示唆された。インドネシアでも 4 型による流行は発生しているようであるが、2013 年はインドネシアからの 4 型感染輸入症例は日本、台湾ともになくインドネシアでは 4 型による流行は発生していなかったか、大きくなかったと考えられた。デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、有用な情報をもたらすことが確認された。

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デング熱を対象とした。台湾ではデング熱が毎年流行しているが、日本では国内発生がない。そこで、デング熱輸入症例を対象を絞った。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した。

B．研究方法

フィリピン、インドネシアからの発熱患者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

2011年から2013年にフィリピン、インドネシアからの輸入症例から分離されたウイルスは1型が最も多く、インドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分け出来た(図1)。2型ウイルスはフィリピンからは10株と少なく、インドネシアは33株であった。2型もグループ分け出来た(図2)。3型ウイルスもインドネシア由来株とフィリピン由来株をグループ分け出来た(図3)。4型ウイルスは、フィリピン由来が2グループ、インドネシア由来1グループに分かれた。また、2013年はインドネシアからの4型ウイルスはなく、4型ウイルスによる流行はフィリピンで拡大していると推測された(図4)。

D. 考察

日本と台湾のデング熱輸入症例報告数は、例年台湾の方がやや多い。台湾CDCは我が国と異なり検疫所と一体化しており、入国後の患者追跡も厳しいことがその要因であり、日本のデング熱輸入症例は実際には台湾以上の可能性が高い。

この3年間フィリピン、インドネシアとも1型~4型までのウイルスを検出した。ただし、1型

ウイルスの検出数が多く、両国ともデングウイルス1型が主たる流行株と考えられる。

フィリピンの2013年、2013年のデング熱患者数は、それぞれ178,644例、166,107例で致死率が0.5%、0.32%と高かったことから、流行規模が大きく主流株は1型であったが、日本と台湾の輸入症例からも明らかのようにフィリピンでは4型が流行しており、4型による2度目の感染がCFRを高めている可能性がある。ただし、ウイルスが強毒化した可能性も考えられるので、日台双方の分離株に関して全ゲノム解析を実施し、比較解析する必要がある。

一方、日本人のインドネシアへの観光は、バリ島が多く、ジャカルタなど比較的渡航先が限定されているため、インドネシア必ずしも捉えているとは限らないが、2013年は少なくとも4型ウイルスによる流行は発生していないか、大きくはないと考えられる。

デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、日本と台湾で同様の傾向をしめし、輸出流行地に関して非常に有用な情報をもたらすことが確認された。

D. 結論

日本および台湾のフィリピン、インドネシアからのデング熱輸入症例からの分離ウイルスのほとんどは、近似なウイルスであった。フィリピンもインドネシアも主たる流行株は1型ウイルスであるが、4型ウイルスの流行が拡大している可能性があり、その傾向はフィリピンに強いと考えられる。デング熱輸入症例から、分離されるウイルス情報は、有用な情報をもたらすことが確認された。

E. 健康危機情報

なし。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Kotaki A, Ikeda M, Harada F, Ito M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus non-structural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travellers. *Journal of Travel Medicine*, 20,3,185-193,2013.
2. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Takasaki T. Diagnosis of viral haemorrhagic fevers in travelers returning from West Africa. *Journal of Travel Medicine*, 20(1), 63-64, 2013.
3. Tochitani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. Ross River virus - Japan ex Australia: (VI). ProMed, promed archive no. 20130616.1776324, 2013.
4. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2047-2052
- of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. Fifth Informal Japanese Encephalitis Laboratory Meeting. (Tokyo) November, 2013.
2. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
3. Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013
4. Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013.
5. Tomohiko Takasaki. Dengue vaccine development in the world: overview and status update. Scientific Meeting on Infectious Diseases, Advance Update on Pathogenesis of Viral Infection: Hepatitis, Dengue, Coxsackie, Epstein Barr, and HIV. 2012/Oct/24th. FMUI (Jakarta, Indonesia)

2 . 学会発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application

2) 国内学会

1. 高崎智彦、モイメンリン、網康至、須崎百合子、大松勉、平山隆則、田島茂、林昌宏、中村紳一郎、片貝裕子、吉田友教、明り宏文、白井顕治、北浦一孝、藤井克樹、鈴木隆二、

- 西條政幸、倉根一郎．第3回マーマセツトを用いたデングウイルス感染病態解析（九州）
2013年12月
2. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月
 3. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦．日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討．第61回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013年11月
 4. 栃谷健太郎、清水恒広、篠原浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン.オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症1例．第56回日本感染症学会西日本地方学会学術集会（大阪）2013年11月
 5. Moi ML, Lim CK, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. Towards a safe and effective dengue vaccine: assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using a novel assay by FcγR-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
 6. 高崎智彦．デング熱、チクングニア熱など昆虫媒介性ウイルス感染症の現状と今後．平成24年度新興再興感染症講演会．2012年10月16日（名古屋市）
 7. 高崎智彦．デング熱など昆虫媒介ウイルス感染症．第111回日本皮膚科学会総会．2012年6月1-3日（京都市）
- G．知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 デングウイルス1型の遺伝子系統樹（2011 - 2013年）

図2 デングウイルス2型の遺伝子系統樹（2011 - 2013年）

図3 デングウイルス3型の遺伝子系統樹（2011 - 2013年）

図4 デングウイルス4型の遺伝子系統樹（2011 - 2013年）

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
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

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 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)
Keigo Shibayama (Department of Bacteriology II, NIID)

研究要旨

これまでに台湾で分離された INH 耐性結核菌で、既存の耐性検出用 DNA プローブに含まれていない *katG* 遺伝子の変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A の変異、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異を見出した。C317T、G332A の変異は、*in silico* の解析から酵素の活性中心のアミノ酸残基を置換させることで酵素活性を低下させ、INH の活性化を阻害して耐性化に関与していることが分かった。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。台湾を始めアジア各国で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。

NDM 型カルバペナーゼ産生菌は、日本においてはこれまで輸入事例を中心に 10 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りに分離されている。ベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性菌株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法として用いられてきた SMA ディスク法が NDM 型カルバペナーゼ産生菌に応用できるか検証した。メロペネム、セフトジジム、及び SMA ディスクの組み合わせで検出が出来ることが分かった。またベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 12 株について、Multilocus sequence typing 法により遺伝子型を調べたところ、うち 11 株は非流行タイプだった。ベトナムでは院内感染に関する対策が十分でないことが背景として考えられる。日本国内においては、途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者について、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要があると考えられる。

The emergence of drug resistant tuberculosis is a public health concern. The resistance to isoniazid (INH) can be detected by a convenient PCR-based amplification and reverse blotting assay. However, discordant results have been observed for several resistant strains isolated in Taiwan. Some INH resistant strains carried new mutations, C-10T of *ahpC* gene, C1436A, C317T, G332A, and insertion of GA at 235 of *katG* gene, and T203C of *ndh*. Among them, C317T and G332A of *katG* gene were shown to be associated with alteration of enzyme activity by *in silico* analysis.

The collaborative study with NIHE aimed at evaluating the SMA test for detecting NDM-1 producers among *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. A collection of 16 NDM-1-positive bacterial isolates (5 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter freundii*, and 4 *A. baumannii*), obtained from hospitals in Vietnam in 2010, and 1 *K. pneumoniae* isolated in Japan in 2010, were used. SMA test using both MPM and CAZ disks was shown to be the most suitable for screening carbapenem-resistant isolates for NDM-type MBL producers. We further determined genotype of NDM-type carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in hospitals in Vietnam by multilocus sequence typing (MLST). Among 12 NDM-positive *A. baumannii* strains examined, 11 belonged to MLST types different from the clonal complex 92 which is known as the worldwide epidemic lineage. This is in contrast to the situation in Japan where OXA-type carbapenemase-producing CC92 type strains are dominant and cause nosocomial infections.

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)

和知野純一 (名古屋大学医学部・細菌学)

Collaborators in Japan:
Shigetarou Mori, Department of Bacteriology II, NIID
Hyun Kim, Department of Bacteriology II, NIID
Mari Matsui, Department of Bacteriology II, NIID
Masato Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID
Satowa Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID
Jun-ichi Wachino, Department of Bacteriology, Nagoya

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。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、2008 年にインド、パキスタンで見いだされてから世界中に拡散している。NDM 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 10 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る。発展途上国では医療機関だけでなく環境中にも蔓延していることが報告されている。ベトナム NIHE との共同研究では、これまでメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に検出する SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌にも応用できるかどうか検証することとした。また収集した NDM 型カルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の遺伝子型別を行い、どのような型が拡散しているのかを調べる事とした。

B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、加熱死菌を感染研に送付し、感染研ではゲノム DNA を抽出したのち、*katG*、*ndh* 遺伝子の変異を調べ、過去に報告がないものを選び出した。

ベトナム NIHE においては、医療機関からカルバペネム耐性菌を収集し、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を分離した。分離された NDM 型遺伝子陽性の *A. baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本国内で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法として用いられてきた SMA ディスク法で SMA による阻害効果が見られるかを観察し、この方法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌に応用できるか検証した。また、NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 12 株について Multilocus sequence typing (MLST)により遺伝子型別を行った。

倫理面への配慮 該当なし。

C. 研究結果

台湾 CDC で収集した結核菌で、INH 耐性のものについて遺伝子の変異のスクリーニングを実施し、

過去に耐性との関連が証明された変異部位以外の変異を持つ株について加熱死菌を感染研に送付してもらった。感染研にて、ゲノム DNA を抽出した後、*katG* 遺伝子、*ndh* 遺伝子の変異をスクリーニングした。結果を Table 1 に示す。これまでに報告が無い新規の変異で新たに見つかったのは、*katG* 遺伝子の 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異だった。うち、*katG* 遺伝子で挿入によるものは frame shift、塩基の mutation のものではアミノ酸残基で Ala106Val、Gly111Asp の変異に相当する。*In silico* 解析で、これらのアミノ酸残基は、蛋白の活性中心に存在することが分かった(図 1 A, B)。



図 1 A、KatG 全体像

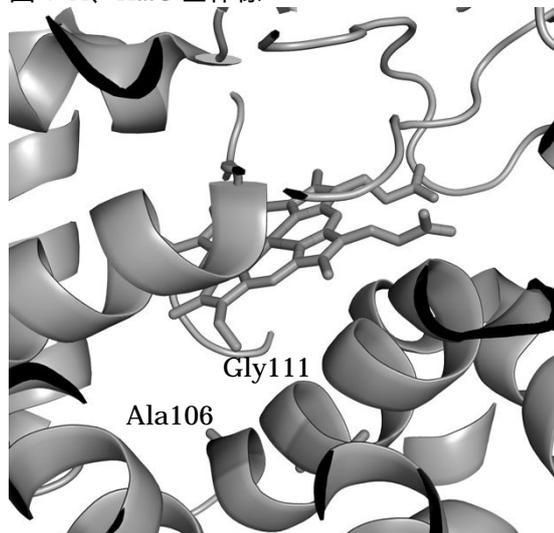


図 1 B KatG の活性中心部分

このことから、これらの変異は KatG 蛋白の酵素活性に影響を与えていることが推測された。

ベトナムハノイ市内の医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌及び *A. baumannii* を用いて、SMA ディスク法の評価を行った。通常、SMA ディスク法で推奨されているセフトラジジム(CAZ)ディスクの他、イミペネム(IPM)ディスク、メロペネム(MPM)ディスクと SMA ディスクによる組み合わせの結果を Table 2 に示す。CAZ では、16 株中 7 株でのみ SMA の阻害効果が認められ、検出可能であった。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、多くの場合 SMA ディスクに阻害を受けない他のタイプのβ-ラクタマーゼも同時に産生することが報告されており、このため検出率が低かったと考えられる。IPM では 14 株、MPM では 15 株で SMA による阻害効果が認められ、陽性と判定された。MPM 及び IPM で陰性と判定された株では CAZ で陽性と判定された。この株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も同時に持っていた。OXA-48 型カルバペネマーゼは、SMA により阻害を受けないため、この影響で IPM、MPM いずれでも検出できなかったと考えられる。そして OXA-48 型カルバペネマーゼは CAZ の分解能が低く、NDM 型カルバペネマーゼの SMA による阻害が CAZ でのみ観察されたと考えられる。また、ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 12 株の MLST 型別を行った。*A. baumannii* は、MLST により世界的な流行タイプ CC92 とそれ以外のものに分けられる。CC92 は、多剤耐性株が多く、また特に院内感染を起こしやすいという特徴がある。日本国内で院内感染によるアウトブレイクを起こすのは、ほとんどの場合 CC92 タイプである。ベトナムで分離された NDM 産生株 12 株の MLST 型を調べたところ、11 株が non-CC92 タイプだった。

D. 考察

結核菌の INH 耐性株で、これまでに報告がない *katG* 遺伝子の変異を見いだした。INH は菌体内に取り込まれた後、KatG 蛋白により代謝され活性形に変換される。*In silico* による 3 次元構造の解析から、これらの変異により KatG 蛋白の活性が失われることで INH 耐性が誘導されていると推測された。今後、実際に蛋白を精製し、活性の測定を行う予定である。これらの変異が実際に耐性に関与していることを確認した上で、現行の INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良につなげる予定である。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、従来推奨されていた CAZ ディスクに加えて MPM ディスクを使用する事で、検出が出来る事が分かった。ここで、SMA ディスク法は NDM 型カルバペネマーゼ産生菌だけでなく、IMP 型や VIM 型など他のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌も陽性となる。SMA ディスク法は安価で簡便なため、本法をまずスクリーニングとして用い、PCR 等で遺伝子を確定することで、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を効率的に検出出来ると考えられる。NDM 型耐性菌については、

日本ではまだ稀であるものの、ベトナムでは医療機関で蔓延状態にあることが分かった。これらの株は、流行タイプ CC92 ではなかった。ベトナムではベッドは、複数の患者が共有しているようであるし、グローブや予防衣の着用などの基本的な感染対策も十分にされていないようなので、一旦耐性菌が病棟に持ち込まれると速やかに院内に拡散し、蔓延してしまうと推測される。また、市中の薬局で処方箋なしで抗菌薬が購入出来るので、国民は比較的頻繁に抗菌薬を服用しているようである。このようなことも、耐性菌を社会で拡散させる一因であると考えられる。

E. 結論

台湾で分離された INH 耐性結核菌において *katG* 遺伝子に新たな遺伝子変異を見いだした。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに、SMA ディスク法が応用出来る事が分かった。ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* は、ほとんどが非流行タイプであり、様々な遺伝子型株が混在していたこのタイプは、仮に日本国内に持ち込まれても通常の感染対策がしっかりと実施されていれば、大きな院内感染を起こす可能性は低いと思われるが、日本において医療機関が海外渡航歴のある患者を受け入れる場合には注意を払う必要があると考えられる。

F. 健康危機情報

途上国を旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者については、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. *J. Clin. Microbiol.* 2013 Jan;51(1):373-4.
- 2) わが国における NDM 型および KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離状況、2012 年現在。
鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子 吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾
病原体微生物検出情報 (IASR) 34(1):8-9, 2013.

- 3) Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii.

Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):66-8.

- 4) わが国における NDM 型および KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離状況(2013 年 7 月現在)

鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子
吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾
病原体微生物検出情報 (IASR) 34:238-9,
2013.

2. 学会発表

- 1) SMA ディスク法を使った NDM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株スクリーニング方法の検討
松井真理 和知野純一 鈴木里和 柴山恵吾
第 25 回日本臨床微生物学会総会、平成 26 年 2 月、名古屋

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.

No. of isolates	Mutation		Codon	Amino Acid	Notes
	Gene	Nucleotide No.			
1	<i>katG</i>	G→T position 388	CGG→CTG	Arg463Leu	
2	<i>katG</i>	T→C position 271	TGG→CGG	Trp91Arg	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
3	<i>katG</i>	G and A inserted after position 235 -		Frameshift	novel mutation
7	<i>katG</i>	A→G position 413	AAC→AGC	Asn138Ser	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
8	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
	<i>katG</i>	C→A position 1436	GCG→GAG	Ala479Glu	novel mutation
	<i>ndh</i>	T→C position 203	ATC→ACC	Ile68Thr	novel mutation
10	<i>katG</i>	A→C position 884	CAG→CCG	Gln295Pro	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
11	<i>katG</i>	C→T position 317	GCG→GTG	Ala106Val	novel mutation
		G→A position 332	GGC→GAC	Gly111Asp	novel mutation
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
12	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
13	<i>katG</i>	C→T position 357	CGC→CGT	Arg119Arg (silent)	
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	

Table 2. Inhibitory activity of sodium mercaptoacetate (SMA) disks for New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1-producing bacterial isolates

Bacterial isolates	Antibiotic disks		
	Ceftazidime (CAZ)	Imipenem (IPM)	Meropenem (MPM)
<i>E. coli</i> V-22	+	+	+
<i>E. coli</i> V-48	+	+	+
<i>E. coli</i> V-91	-	+	+
<i>E. coli</i> V-102	-	+	+
<i>E. coli</i> V-134	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> MRY10-722	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> V-17	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-21	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-90	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-182	-	+	+
<i>E. cloacae</i> V-87	+	-	-
<i>C. freundii</i> V-868	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-275	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-303	+	+	+
<i>A. baumannii</i> V-320	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-357	-	+	+

(+), positive; (-), negative; *E. coli*, *Escherichia coli*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; *C. freundii*, *Citrobacter freundii*; *A. baumannii*, *Acinetobacter baumannii*

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 23 年度-平成 25 年度総合分担研究報告書

研究課題：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（H23 - 新興—指定—020）

研究代表者：国立感染症研究所・副所長 倉根 一郎

分担研究課題：非結核性抗酸菌感染症の研究

研究分担者：国立感染症研究所・免疫部長 小林 和夫(H23-24)、阿戸 学(H25)

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

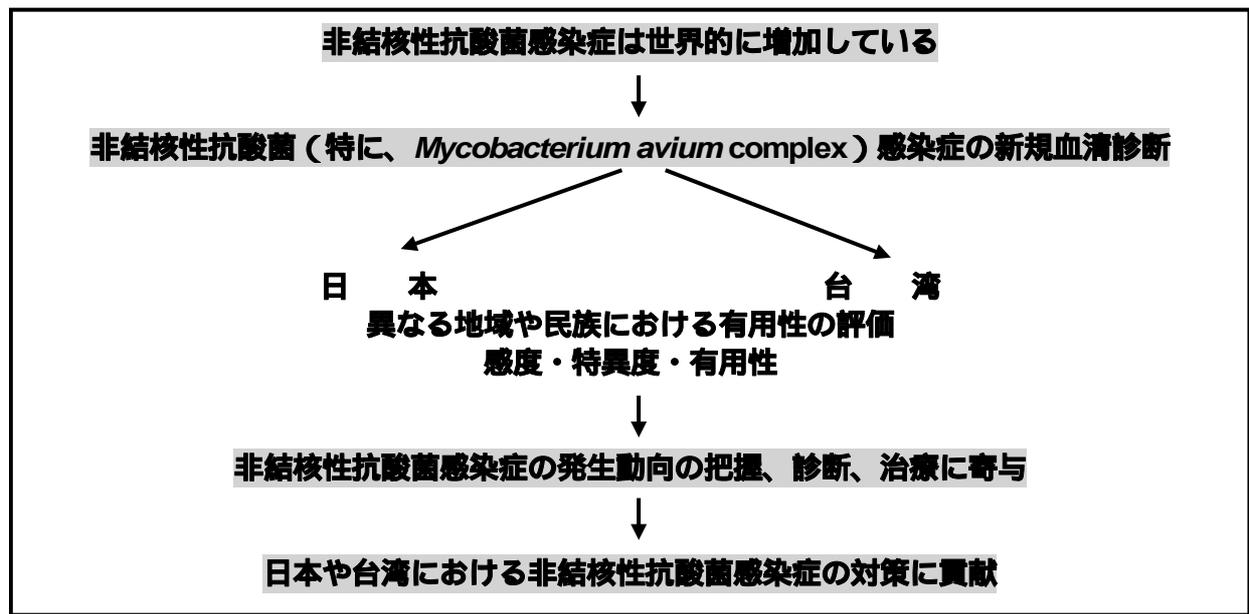
研究協力者：新潟大学大学院医歯学総合研究科・細菌学教授 松本 壮吉

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・性能評価に関し、台湾行政院衛生署疾病管制局 周 如文 博士、国立台湾大学病院医学院附設医院内科部・主治医師 王 振源 博士と日台共同研究を推進した。研究分担者は血清診断キット（キャピリア® MAC 抗体 ELISA タウンズ）の開発に寄与し、本キットは体外診断用医薬品製造販売承認（厚生労働省）され、保険医療対象検査項目となった。さらに、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。しかし、本キットの異なる地域や民族における有用性に関する国際評価は未了である。共同研究の成果として、1）台湾の MAC 感染症患者血清を収集、2）MAC 抗体価を測定し、感度：61%、特異度：91%であった。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であることが示された。



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。日本では、年間約 9000 人を越える新規患者が発生してい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。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、高い臨床の有用性を示し、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、人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。加えて、非結核性抗酸菌感染症は地域により、原因菌種の頻度が異なることが知られている。

本診断キットの国際的有用性を検証するため、日本と異なる地域や民族 (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

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、国立感染症研究所や国立台湾大学病院で機関承認を得ている。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

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、2012 年 2 月 07-09 日に渡台し、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と最終協議し、大筋合意した。その後、台日の双方において研究計画に関するヒト

を対象とする医学研究倫理審査が承認された。

引き続き、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。診断基準 (2007 年) に合致した活動性肺 MAC 感染症: 57 症例、MAC 混入 (contamination): 11 症例、*M. kansasii* 感染症: 14 症例、迅速発育型 GPL 保有非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*、*M. abscessus*、*M. fortuitum* など) 感染症: 26 例、活動性結核: 48 症例、結核患者の濃厚接触者: 42 症例から血清を収集した。

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

活動性肺 MAC 感染症で血清抗体陽性は 34、陰性は 23 症例、MAC 混入 (contamination): 陽性は 1、陰性は 10 症例、*M. kansasii* 感染症ではすべて陰性であり、迅速発育型非結核性抗酸菌感染症: 陽性は 7、陰性は 19 症例、活動性結核陽性: 5、陰性は 10 症例、結核患者の濃厚接触者: 陽性は 2、陰性は 42 例、血清診断キットの感度は 61%、特異度は 91% であった。

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、宿主抗体応答は人種による免疫応答の差異が臨床的有用性に影響を与える可能性がある。

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。この成績は日本や米国における性能評価に比し、特に、感度 (日本: 84% や米国: 77%) が低下していた。この原因として、台湾では GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌感染症が高頻度であること、本調査での活動性肺 MAC 感染症患者に免疫不全患者が比較的多い (32%) 大学病院で実施されたことが示唆された。本血清診断は非侵襲性、簡便、迅速であり、人種や地域を超越し、有用であったといえる。

今後の課題として、台湾の多施設共同研究 (市中病院を含む) によるキットの性能評価、カットオフ

値の検討や GPL 保有迅速発育型非結核性抗酸菌 (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* など) 感染症の感度・特異度の解析を進め、台湾における血清診断キットの有用性を最終的に検証することなどが挙げられる。

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実施で合意し、台日の双方において研究計画に関するヒトを対象とする医学研究倫理審査が承認された。
- 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、人種や地域を超越し、有用であった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shu, C.C.*, **Ato, M.***, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., **Kobayashi, K.**, Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work). 2013. Sero-diagnosis of *Mycobacterium avium* complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan. PLoS One 8(11): e80473.
- 2) **Kitada, S.**, A. Levin, M. Hiserote, R. J. Harbeck, C. A. Czaja, G. Huitt, S. H. Kasperbauer, and C. L. Daley. 2013. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease in the United States. Eur. Respir. J. 42: 454-460.
- 3) Fukuda, T.*, Matsumura, T.*, M. **Ato, M.** Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, **S. Matsumoto, K. Kobayashi,** Kinoshita T, Y.S. Morita (*T.F. and T.M. contributed equally to this work). 2013. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. mBio. 4(1):e00472-12.
- 4) Tateishi, Y., **S. Kitada,** K. Miki, **R. Maekura,** Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2012. Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain *Mycobacterium intracellulare* M.i.198. J. Bacteriol. 194: 6336.
- 5) Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2012. A novel mechanism

underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J. Biol. Chem. 287: 27743-27752.

- 6) Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, **R. Maekura,** Y. Ozeki, H. Ogura, **K. Kobayashi,** Y. Suzuki, and **S. Matsumoto.** 2012. Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific *Mycobacterium tuberculosis* clones in Osaka prefecture, Japan. PLoS One 7: e42505.
- 7) **松村隆之, 阿戸 学, 小林和夫.** 2012. 解説 . 結核および非結核性抗酸菌感染症の診断 . リウマチ科 47 : 427-435.
- 8) **小林和夫, 松村隆之, 阿戸 学.** 2012. 解説 . 結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題 . JBSA Newsletter 2 (3) : 6-10.
- 9) **Kobayashi, K., M. Ato, and S. Matsumoto.** 2011. Global threats and the control of multidrug-resistant tuberculosis. J. Disaster Res. 6: 443-450.
- 10) Takatsuka, M., M. Osada-Oka, E. F. Satoh, K. Kitadokoro, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura-Niki, M. Inoue, K. Iwai, T. Arakawa, Y. Shimoji, H. Ogura, **K. Kobayashi,** A. Rambukkana, and **S. Matsumoto.** 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. PLoS One 6: e20985.
- 11) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, **K. Kobayashi, and S. Matsumoto.** 2011. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Vaccine 29: 6881-6887.
- 12) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, **K. Kobayashi,** H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 193: 5766-5774.
- 13) Naka, T., S. Maeda, R. M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J.-i. Maeyama, H. Ogura, **K. Kobayashi,** and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. J. Biol. Chem. 286: 44153-44161.

2. 学会発表

- 1) 佐藤法仁、山崎利雄、**小林和夫**、大原直也 . 2012 . ストレプトマイシン依存性結核菌 18b 株の依存性に関する遺伝子変異の解明と新たなストレプトマイシン耐性を誘導する遺伝子発見の発見 . 結核、87 : 231、2012 . 第 87

- 回日本結核病学会総会（広島、6月）。
- 2) **小林和夫**、光山 正雄。2011。結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）。学術講演要旨 246、2011。第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）。
 - 3) **松本壮吉**、岡 真優子、**北田清悟**、**前倉亮治**、**小林和夫**。2011。結核研究の最先端（シンポジウム 10-S-4）。学術講演要旨 246、2011。第 28 回日本医学会総会（東京、4月—>誌上開催）。
 - 4) **小林和夫**。2011。感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究（Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症）。日臨免誌、34：268、2011。第 39 回日本臨床免疫学会総会（東京、9月）。

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

**Kazuo KOBAYASHI
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.

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「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」)

(H23-新興-指定-020) 分担研究

報告書(3年間のまとめ)

ハンセン病の病原性と薬剤耐性に関する日台共同研究

研究分担者 甲斐 雅規 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 第3室長
研究協力者 牧野 正彦 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 部長
研究協力者 前田 百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 主任研究官
研究協力者 中田 登 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
感染制御部 主任研究官

研究要旨 台湾 CDC との共同研究として、ハンセン病の血清診断及びハンセン病の起原菌であるらい菌の薬剤耐性に関する研究を実施した。台湾のハンセン病患者血清を用い、らい菌由来抗原 MMP-I 及び MMP-II の血清診断を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりもいい成績を得た。らい菌の薬剤耐性に関する研究では 13 例の検体から抽出した DNA を用い、9 例でらい菌由来 DNA を検出し、そのうち 2 例がダブソン耐性変異を示した。検出した変異と耐性の相関を明らかにするために速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を挿入し、その薬剤に対する影響をみることで証明することができた。さらに、らい菌の薬剤耐性の検出に新しい簡易遺伝子変異検出法 (Hp-rPCR 法) を検討した。

A. 研究目的 ハンセン病対策は世界保健機関 (WHO) が

1981 年より推奨してきた多剤併用療法が効を奏して感染者の発症数は激減してきた。しかし、今なお世界の登録患者数及び新患発症数は約 20 万人を数え、最近では新患発生の減少傾向も見られなくなっているのが現状である。また薬剤耐性菌の関与が疑われている再燃や再発などの難治例も無視できない状況である。多くの東南アジア諸国は登録患者の数値ではハンセン病流行国としての登録からは外れた国も多いが、未だにインド、ミャンマー、インドネシア、フィリピン、ベトナムなどでは患者の多い地域が存在し、それぞれの国全体の感染症対策においてもまだ重要な対象感染症となっている。この現状を踏まえ、新患数を減少させ、さらには難治性ハンセン病を治療するためには、ハンセン病の早期診断、治療経過のモニタリング、薬剤耐性菌の調査、

発生源となりうる感染者の発見と感染予防、発症前予防などが必要と考えられる。台湾との協力研究では第1に、我々がこれまで確立してきたハンセン病の血清診断法を用い台湾のハンセン病患者由来血清の試験を実施してきた。また第2に、各国から報告が散見される薬剤耐性菌調査を台湾の患者由来 DNA で実施してきた。その中で、薬剤耐性の存在が疑われる患者由来のらい菌における遺伝子変異を数例検出してきた。そこで第3にその変異が実際に耐性をもたらすということを確認するために速発育性抗酸菌であるスメグマ菌 (*M. smegmatis*) にらい菌の耐性関連遺伝子を入れ、その薬剤に対する影響をみた。第4に耐性変異の迅速検出法を開発し検討を加えた。以上の協力研究を通じ、日台での技術共有を目指した。

B. 研究方法

精製したら い菌膜タンパク抗原 Major membrane protein-I (MMP-I)と MMP-II のハンセン病患者血清との反応性を ELISA 法で確認後、精製を行った。その精製抗原を用い、台湾のハンセン病患者血清 98 検体について ELISA 試験を行った。本血清は台湾市郊外にある元ハンセン病療養所を持つ病院、楽生療養院が保存している患者血清である。特異性や感度あるいは病型、臨床症状との相関性について解析した。

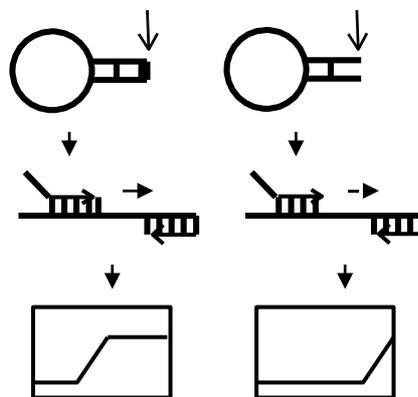
抗らい菌薬のダブソン、リファンピシン及びオフロキサシンに対する薬剤耐性を惹起する遺伝子変異は、*folP1*、*rpoB* そして *gyrA* 遺伝子で、その耐性とかかわる遺伝子変異が集中する領域を Drug Resistance Determining Region (DRDR)と呼ぶ。台湾で得た 13 検体を用いて DRDR における変異を検出を試みた。ハンセン病患者由来の生検材料は台湾 CDC が収集し DNA 抽出を行い、その一部を分与された。DNA から各遺伝子を個別に PCR 増幅し、DRDR における変異の有無を直接シーケンスすることにより検出した。

変異と耐性の相関を明らかとする実験では、台湾サンプルで検出された *folP1* 遺伝子の変異を試験した。まず、らい菌 *folP1* 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、*M. smegmatis* に導入した。次に *M. smegmatis* の *folP1* 遺伝子を破壊するための温度感受性ファージを作製し、らい菌 *folP1* 遺伝子導入 *M. smegmatis* にこれを作用させて、染色体上に存在する *M. smegmatis folP1* の破壊を試みた。また、らい菌 *folP1* に変異を加えたものと加えないものを使用して同様の実験を行い、得られた菌株を用いてダブソン感受性を 7H10 培地を用いて試験した。

耐性変異の迅速検出のために今回用いた方法は結核菌の薬剤耐性変異検出のために以前報告された方法で、リアルタイム PCR 法を一部改変した方法を用いている。PCR 産物である 2 本鎖 DNA がサイバークリーンで蛍光標識される反応系を用い、ABI の Step One Plus を用いて測定を行った。Forward Primer はそれ自身が構造的にヘアピンを形成するような配列にするのが特徴である。Reverse Primer は通常の PCR に使用するような配列にする。Forward Primer の 3' 末端の塩基が変異の有無

を調べる標的部位にくるように設計する。その標的部位の塩基が 4 種の塩基 G, A, T, C のいずれかを知るために、その 3' 末端が異なる 4 つの塩基となる 4 つの Forward Primer を作成する。ここでは本法を Hp-rPCR (Hairpin primer real time PCR)法と呼ぶ(図 1)。それぞれを Reverse Primer と PCR を行い、いずれの PCR がもっとも効率良く PCR 産物を産生するかを見ることでサンプルの持つその標的部位の塩基を決定し変異の有無を判定するものである。

図 1 Hp-rPCR(Hairpin-primer realtime PCR)法



(倫理面への配慮) 本研究は動物実験を含まない。分担研究、共同研究者の所属する両施設の倫理委員会の承認を得て行った。検体の採取は通常の菌検査において実施される方法であり、その方法は特段の侵襲性を有するものではなく、菌の解析は患者のプライバシーには抵触しない。患者に対しては目的を説明し、同意が得られた場合にのみ検体の採取を実施した。

C. 研究結果 台湾のハンセン病患者由来血清サンプル 98

検体の ELISA を 3 種の抗原を用いて行った。カットオフ値は我々が保存している陽性血清コントロールの値の 10%とし、それ以上の値を示すものを陽性とした。その結果、表 1 のように従来法で用いられる抗原 PGL-1 で 62% 陽性であるのに対し、MMP-II で 87%と高

い陽性率を示した。また、新しく調整した抗原 MMP-I では 91%と最も高い陽性率を示した。

表 1

Antigen	No. of positive	No of sera	Positive rate
PGL-I	61	98	62%
MMP-II	85	98	87%
MMP-I	89	98	91%

台湾で採取及び DNA 抽出された 13 検体について薬剤耐性変異を調べた。これまでに、ダブソン耐性をもたらすことが知られている *folP1* 遺伝子のコドン 53 位と 55 位、リファンピシン耐性の *rpoB* 遺伝子 4 カ所(441 位、451 位、456 位、458 位)及びキノロン耐性の *gyrA* 遺伝子 2 カ所(89 位、91 位)の変異の有無を検出した。

表 2

Sample	Type	<i>folP1</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>
NTU001	MB	wt	wt	wt
NTU002	MB	wt	wt	wt
NTU003	MB	wt	wt	wt
NTU004	MB	T53R ★	wt	wt
NTU006	MB	NA	NA	NR
NTU007	MB	wt	NA	NA
NTU011	MB	wt	NA	NA
NTU012	PB	T53I	wt	NA
NTU013	PB	wt	wt	NR

★T53R: *folP1* 遺伝子の 53 位トレオニンがアルギニンに変異

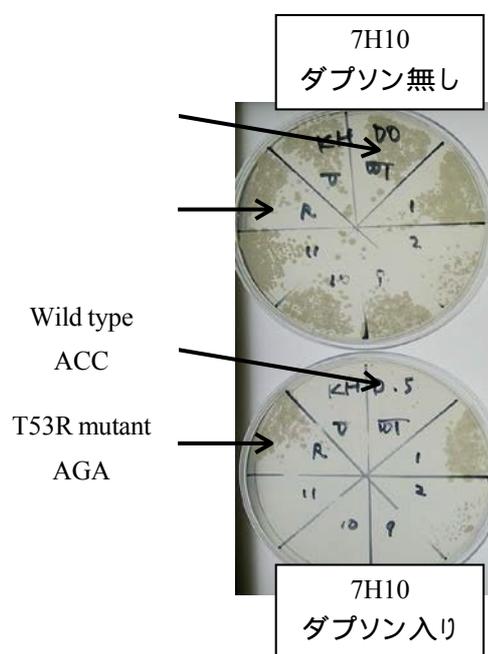
NA: not amplify, NR: could not read

13 検体を用い、9 検体の結果を得た(表 2)。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じた。この変異によってダブソン耐性をもたらすことが推察された。他は変異が認められず、各薬剤に対して感受性であることがわかった。NTU012 の変異は再現性がなく、次の実験では対象外とした。

folP1 遺伝子の 53 位が ACC の wild タイプと AGA の NTU004 タイプの遺伝子を作成し、*M. smegmatis* の染色体に挿入し、*M. smegmatis* が自然に持っている *folP* 遺伝子を破壊した。得られた *M. smegmatis* で、53 位が wild タイプのらい菌 *folP1* 遺伝子持つ菌(Wild type ACC)

と NTU004 タイプを持つ菌(T53R mutant AGA)の増殖をダブソン入り培地及び薬剤無しの培地での増殖の違いを検討した結果、図 2 で見られるように、薬剤の入った 7H10 培地でも T53R mutant AGA は増殖できることを確認した。すなわち NTU004 で見られた変異が明らかにダブソン耐性をもたらすことが示された。

図 2. 組換え *M. smegmatis* を用いた薬剤感受性試験

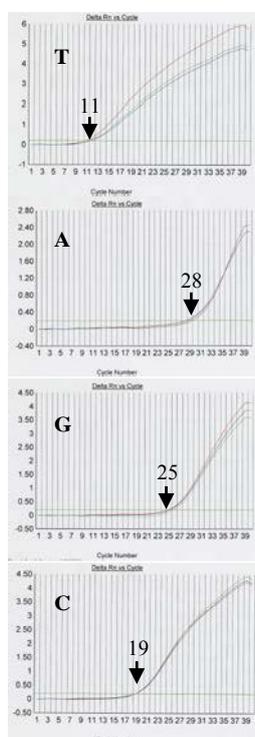


薬剤耐性変異の多数迅速同時検出において図 3 は Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位コドンの 2 番目の塩基を標的とした Hp-rPCR 法を示した。Forward プライマーの 3' 末端が T のプライマーの Ct 値が最も小さいことから Zensho-2 の *folP1* 遺伝子 55 位のコドンは CTC であり、ダブソン耐性変異であることが確認できた。同様に Thai-53 を用いて行った *folP1* 遺伝子 3 カ所の結果は 53 位の 1 番目の塩基は A、2 番目は C、そして 55 位の 2 番目が C であり、確かに感受性菌での配列であることが確認できた。*rpoB* 及び *gyrA* の結果は示していないが、いずれも本法により標的部位の塩基の判定ができた。

次に前述の表 2 にあるように耐性変異を示した NTU004 を用い、本法を試みた。最初は

臨床検体から得た DNA であることから非常に DNA が少なくクリアな結果が得られなかったため、マルチプレックス PCR 法を行い、その後 Hp-rPCR 法を行うこととした。その結果、クリアな結果を得ることができた。NTU004 は *folP1* 遺伝子の 53 位のアミノ酸トレオニンに変異がありアルギニンとなり、そのコドンは ACC から AGA に 2 塩基に変異が生じていたことはこれまでに確認されている。この変異によってダブソン耐性をもたらすことが推察された。

図3. *folP1* 遺伝子 55 位のコドン 2 番目の塩基 c の変異を持つらい菌 Zensho-2



数字は Ct 値

D. 考察

血清診断試験では、従来法に使用する PGL-I での値に比べ MMP-II はより高い陽性率であり、他の東南アジア諸国で得られた結果とほぼ同様であった。血清の少菌型、多菌型の区別がわからないので従来法より少菌型が高い値を示したかどうかはまだ判定できないが、いい結果が期待できるだろう。MMP-II よりいい結果を MMP-I が示したことは大変興味深く、また期待もできそうであるが、結核患者や健康人のデータを揃え特異度を検討し、今

後正確な評価をする必要がある。

13 検体中、明らかなダブソン耐性変異が NTU004 で検出された。このトレオニンからアルギニンへの変異はコドンの ACC が AGA に変わる変異であった。同じコドンにおいても耐性変異が 1 塩基変異で生じている例と今回のように 2 つの塩基が変化している例があることからそれらの違いが耐性の度合いに影響する可能性も示唆され、大変興味深い結果であった。また、患者データからも NTU004 は多菌型患者であり、臨床的にも薬剤耐性が疑われた例であることが台湾 CDC からの情報でわかり、この変異検出の有用性をお互いに再認識することができた。

Hp-rPCR 法が標的である 9 カ所の変異の有無を確実に判定できることを、コントロールの菌においても臨床由来の菌においても可能であることが明らかとなった。DNA 回収が非常に悪いことが多い臨床検体においてもマルチプレックス PCR 法との併用により非常に高感度に判定することができた。マルチプレックス PCR 法と Hp-rPCR 法を併用した場合に要した時間は DNA 抽出から判定までで、約 5 時間であり、迅速性についても良好な結果だったと考えられる。NTU004 の持つ ACC から AGA の変異はトレオニンからアルギニンの変異であるが、Hp-rPCR 法で判定されるのは 2 番目の C が G であっただけであることになり、その場合アミノ酸の変異はトレオニンからセリンへの変異になる。この場合の変異と耐性の関係は証明されていないので、厳密には判定に間違いを冒す可能性があることになる。これは今後の課題である。

E. 結論 台湾ハンセン病患者血清を用い、血清診断

法の評価を行った結果、従来法で用いている PGL-I 抗原での結果よりも MMP-II 及び MMP-I でより好成績を得た。今後、健康人及びらい菌と同じ抗酸菌である結核菌による感染で生じる結核患者の血清を用いて、本法のハンセン病血清診断法としての特異度・感度を測定する予定である。

薬剤耐性変異の検出では 13 例中 9 例の結果を得ることができ、得られた変異が確かに

耐性と相関していることが証明できた。

Hp-rPCR 法をらい菌の耐性変異検出のために利用することが可能であることが証明出来た。マルチプレックス PCR 法との併用で迅速・簡便に多数標的箇所の同時判定ができた。

上記、結果を台湾のパートナーと共有し、使用した様々な技術に関しても共有することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. Jpn J Infect Dis. Vol. 64: 246-248, 2011.
 - 2) Nakata N., Kai M., Makino M. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. Doi:10.1128/AAC.05831-11, 2012
 - 3) Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. J Clin Microbiol. Vol. 50: 742-753, 2011
 - 4) Kai M., Nakata N, Matsuoka M, Sekizuka T, Kuroda M, Makino M. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution Vol. 19, 200-204, 2013.
 - 5) 甲斐雅規. Hp-rPCR 法を用いたらい菌薬剤耐性変異の検出. 日本ハンセン病学会雑誌. 2014 年 (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦: 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第 83 回日本ハンセン病学会総会, 岡山市, 2011 年 5 月
 - 2) Amako, K., K. Iida, M. Kai, M. Matsuoka, and S. Yoshida. *In vitro* cultivation of *Mycobacterium leprae* in microaerophilic or anaerobic conditions. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 3) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 4) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 5) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
 - 7) Tsukamoto, Y., E. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology

- and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 8) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
 - 9) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 10) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
 - 11) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦:らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析。第 85 回日本ハンセン病学会 総会、札幌市、2012 年 6 月
 - 12) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular Studies on *M. leprae* and Ser-diagnosis of Leprosy. The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster. Taipei, Sep. 20-21. 2012.
 - 13) P. S. Rosa, S. M. Diório, A. F. F. Belone, I. M.F.D. Baptista, P. N. Suffys, L. R V Fachin, L. M. Trino, B. G. C. Sartori, L. R. De Lamano, M. I. de Araujo, W. F. B. Delanina, F. B. Marques, S. Ura, C. T. Soares, M. B. Xavier, M. T. Mira, M. O. Moraes, M. Matsuoka, M. Kai, M. C. L. Virmond. Evidence of active transmission of drug resistant *Mycobacterium leprae* strain in Brazil. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 14) Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of *Mycobacterium leprae*. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 15) N. Nakata, M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of *Mycobacterium leprae* genes and drug resistance using cultivable mycobacteria. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 16) Kai M, N. Nakata^a, G. T. Chae^b, P. Saunderson^c, A. A. Maghanoy^c, M. F. Balagon^c, M. Matsuoka^a, T. Sekizuka^d, M. Kuroda^d, and M. Makino. Characteristic SNPs in *Mycobacterium leprae* isolated in Japan. 18th International Leprosy Congress, 16-19 September, 2013, Brussels, Belgium.
 - 17) 天児和暢, 飯田健一郎, 斉藤光正, 甲斐雅規, 松岡正典, 吉田真一:ライ菌の培養、マウス組織抽出物・ヒト血漿の効果。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 18) 宮本友司, 松岡正典, 福富康夫, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 牧野正彦: *Mycobacterium leprae* のメタボローム解析。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 19) 中田登, 甲斐雅規: 培養可能抗酸菌を用いたらい菌薬剤耐性変異解析法のフルオロキノロン耐性変異解析への応用。第 86 回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013 年 5 月
 - 20) 甲斐雅規、中田登、松岡正典、関塚剛史、黒田 誠、牧野正彦: SNPs の解析により

示されたい菌日本株ゲノムの特徴。第 86
回日本ハンセン病学会総会、大宮市、2013
年5月

- 21) M. Kai, Y. Maeda, M. Makino. Molecular
detection of drug resistant *M. leprae* and
genotyping of *M. leprae*. The 10th Japan-
Taiwan Symposium on Vaccine Preventable
Diseases and Vector-Borne Diseases &
Cooperative Project Reports. Tokyo, Sep. 12-
13. 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 な
し

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録 な

し

3. その他 著書

- 1) 著者名 Kai M. 編集・分担執筆
Edited by Makino, M., M. Matsuoka,
M. Gotoh, and K. Hatano.
書名 Leprosy chapter 9 Serology.
Tokai University Press, Kanagawa,
Japan Total page 274 (partial page
108-115) 2011

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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 (H23 - 新興 指定 020)

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

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨： ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、新たな流行を起こすと考えられている。Genotype の変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC (TCDC) と、両国における 2010 年以降 2012 年度末までの 3 年間で得られた NoV 陽性を呈した臨床検体を用いて、初年度：簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法の検討、評価、次年度：実検体の解析、最終年度：Universal RT-PCR system によるノロウイルスサイエンティフィックコミッティー推奨法に適合した genotyping と、NoV の固体内進化の解析を行った。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) は、非細菌性胃腸炎の原因ウイルスである。NoV, SaV には、それぞれ抗原性の異なる 30 種類以上の genotype が存在しており、宿主免疫機構から逃れた genotype が、毎年新たな流行を繰り返すと考えられている。Genotype の全世界的変遷を経時的、地域別に追跡し、分子疫学的解析を行うことは、両ウイルスの流行メカニズムを解明する上で重要である。本研究では、台湾 CDC と、両

国における 2010 年以降 2012 年度末まで、3 年間、両ウイルスの流行状況、流行株の変遷を経時的に解析し、ウイルス流行のメカニズムを研究することに取り組んだ。また、簡便かつ高精度なウイルス genome 検出法と、分子疫学解析手法の開発も開始した。本研究のカウンターパートは、TCDC: Director, Research & Diagnostic Center Director, National Influenza Center Centers for Disease Control, DOH, Taiwan, Ho-Sheng Wu, Ph.D. (吳 和生), Head, Viral Enteric

& Emerging Disease Lab Research & Diagnostic Center, Fang-Tzy Wu, Ms.(呉 芳姿) の2名である。

具体的には、新規迅速診断システムとして、Super rapid real-time RT-PCR, multiplex RT-PCR, long distance RT-PCRの構築、ELISA, イムノクロマトグラフィー(IC)を用いた抗原検出システムの評価、応用、NoV, SaVのキメラに対応した新規genotyping system構築と評価を行う。疫学調査として、台湾における流行の把握、genotype, 流行の経時的変化を日本と比較検討する。これらの検討を、TCDC職員を長期研修として感染研に受け入れ、技術の共同開発、共同研究を行う。

B. 研究方法

1. 材料と方法

< NoV 陽性検体 >

TCDCによって2010年から2011年にかけて収集された、ウイルス性下痢症患者検体をNoV, SaVのコンベンショナルなRT-PCR (Kojima et al. JVM, 2002. NoV: G1SKF & R, G2SKF & R, SaV Okada et al primer sets) によって検査し、NoV 陽性を呈した糞便検体 169 検体を用いた。

また、埼玉県衛生研究所によって検査された、1990年から2000年にかけて埼玉県近傍で発生した集団食中毒事例の糞便検体 132 検体を新手法の評価用レファレンス NoV 陽性糞便パネルとして用いた。これらの検体は、埼玉県衛生研究所より国立感染症研究所ウイルス第二部第一室が分与を受け、すべての genotype の約 90% をカバー

する糞便レファレンスパネルとして管理運用している。

NoVの固体内進化を調べるため、NoV 感染患者 A - P の 15 名から経時的にサンプリングされた便検体を、次世代シーケンスシステム : NGS (イルミナ MiSeq) による解析に用いた。

< コンベンショナル RT-PCR >

NoVの検出には、Kojima et al. JVM, 2002. によって報告された G1SKF & R, G2SKF & R プライマーセットを用いた RT-PCR を行った。

< Real-time RT-PCR >

NoVのRNAゲノム定量には、Kageyama et al. JCM, 2004 によって報告され、現在も世界のゴールドスタンダードとして位置づけられている COG primer set と RING probe を用いた real-time RT-PCR を用いた。本方法で得られた RNA 定量値を基準として、Super rapid RT-PCR, BLEIA を評価した。

< Universal primer RT-PCR >

ノロウイルスサイエンティフィックコミッテーターによって提唱された新規 genotyping を行うため、本タイピングに必要とする領域を増幅可能な全ての NoV に適合した第3世代 Universal primer set をデザインした。HuNoV 全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1 にコードされたプロテアーゼ切断モチーフ付近に、新規 Universal primer set (Uni3KY primers) を設計した。設計した新規 primer set と、Takara PrimeStar GXL を用いて約 4.5 kb の long

distance RT-PCR を実施し、PCR amplicons が得られなかった場合、Uni1KY primers を用いた nested PCR を実施した。1st step RT-PCR amplicon, 2nd step amplicon 共に、完全長の polymerase region (RdRp) から Capsid N/S region をカバーし、ORF2(VP1) 全長をカバーする。

<塩基配列解析>

NoV の塩基配列解析は、RT-PCR で得られた PCR アンプリコンを鋳型としたダイレクトシーケンスとプライマーウォーキングによって行った。ゲノム量末端の塩基配列解析は、5' RACE および 3' RACE を用いて決定した。

<NGS による塩基配列解析>

便検体から抽出した RNA より、NEB 社の NEBnext Ultra キットを用いて、cDNA ライブラリーを調整し、MiSeq に用いた。得られた塩基配列は、CLC 社 Genomics work bench によって De Novo assemble および standard sequence に対する Mapping を行い NoV genome 上の核酸変異、アミノ酸変異を検出した。

<分子系統解析>

得られた NoV ゲノムシーケンスは、Clustal W version 1.8 でアライメントし、kimura の 2 パラメーターによって genetic distance を算出した。その後、NJ 法によって分子系統樹を作成し、解析した。

C. 研究結果

1. Super rapid RT-PCR は、10%糞便乳剤からの RNA 抽出が、試薬添加と 1min

の加熱だけで修了する。これに加え、逆転写反応、PCR まで、試薬を加えることで実施可能であった。従来法では、RNA の抽出操作に約 1 時間半の操作が必要であったが、本法では、試薬準備時間も含め、約 10 分で実施可能であった。

2. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 16 検体、GII 単独感染 78 検体、GI, GII の混合感染 37 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、14 / 16 (87.5%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、67 / 79 (85.9%)、混合感染検体の陽性率は、32 / 37 (86.5%) であった。検出不能であった検体の genotype に特筆すべき特徴はなかった。
3. TCDC の検体 169 検体の内訳は、GI 単独感染 39 検体、GII 単独感染 123 検体、GI, GII 混合感染 7 検体であった。これを基準に Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、7 / 39 (18%) と極めて低かった。陰性を示した検体は、そのほとんどが 10⁴ copies / uL を示した。GII 単独感染検体に対する陽性率は、93 / 123 (75.6%) であったが、

結果 2 に示したレファレンスパネル試験で示した 85.9% に比較して、約 10% 程度低い値を示した。混合感染検体の陽性率は、0/7 (0%) であった。

4. レファレンス 132 検体は、すべてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、得られた PCR 産物を用いて、塩基配列を決定後、genotyping が明らかにされた NoV 陽性検体である。その内訳は、GI 単独感染 18 検体、GII 単独感染 76 検体、GI, GII の混合感染 38 検体であった。これらの値を基準に、Super rapid RT-PCR の陽性率を検討したところ、GI 単独感染検体に対する陽性率は、17/18 (94.4%)、GII 単独感染検体に対する陽性率は、72/76 (94.7%)、混合感染検体の陽性率は、GI 18/38 (47.4%)、GII 37/38 (97.4%) であった。
5. TCDC の GI 陽性サンプルを除き、他の全てのサンプルにおいて、Super rapid RT-PCR と BLEIA は良い相関関係を示した。BLEIA の定量値である COI は、ELISA における OD value に相当する。Standard real-time RT-PCR と BLEIA の COI の相関関係は 1 に近く、非常に強い相関関係が認められた。
6. NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、全ての genotype を検出可能で有り、全ての genotype において、その COI は RNA titer と強い相関関係を保っていた。
7. TCDC より持ち込まれた GII.4 の 2011/12 シーズンの流行株 4 株の全塩基配列を決定したところ、TCDC#5, 6 は 2012 年に日本で大規模な流行を示した GII.4 2012 変異株と同じクラスターに属することが明らかになった。しかし、TCDC#8, 9 は互いに 100% 同じ配列を有しており、さらに GII.4 2008 クラスタに属していた。2012/13 シーズンにおいて台湾では GII.4 2012 年変異株と従来の変異株の混合流行が認められた。この傾向は、2012 年変異株が流行の 9 割を占める日本、ヨーロッパ、USA と異なる傾向であり、GII.4 のバリエーションの流行は、日本よりも遅れる傾向にあることが明らかになった。
8. Super rapid RT-PCR で検出可能であった検体は、Universal primer RT-PCR 検出系で 100% 検出可能であった。つまり、Super rapid RT-PCR にて陽性を示した検体は、Universal primer RT-PCR で増幅し、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が可能であることが明らかとなった。
9. NoV 陽性糞便レファレンスパネル検体を用いた比較検討において、Universal primer RT-PCR は、全ての genotype を検出可能で有り、全ての既報の genotype において、提唱された新規 genotyping が可能であった。
10. TCDC より提供を受けた NoV 感染患者の時系列サンプルは、全例が GII.4 感染

者であった。これらのサンプルを NGS に向け、全塩基配列を決定したところ、患者 A, D, F, G, H, I, J, K において 2 ポイントの全塩基配列比較データを得ることに成功した。ゲノム全長に渡る塩基およびアミノ酸残基の時系列変異を比較検討したところ、下表に示した結果が得られた。

Patient	Sample ID	Interval	Nucleotide	Amino acid	dS/dN ratio
A	120,121	5 days	16	8	0.5
D	126,127	13 days	2	1	0.5
F	131,132	8 days	2	1	0.5
G	135,136	8 days	4	2	0.5
H	137,138	8 days	8	4	0.5
I	140,141	3 days	2	1	0.5
J	143,144	8 days	4	2	0.5
K	146,147	6 days	4	2	0.5

患者 A は GII.4 2006b variant と GII.4 2009 variant の混合感染であった。他の患者は GII.4 2006b variant の単独感染であった。患者 A を除外し、遺伝子変位速度を算出したところ、0.48nt/0.24aa/day/genome の変異速度であった。この速度は、これまでに通常の PCR sequence で得られた報告の 1/4 程度の速度であった。同義置換/非同義置換 (dS/dN ratio) を計算すると、A を除く全ての患者で負の淘汰が起きていたことが明らかになった。つまり、患者体内で発生した塩基配列変化が NoV の生存に不利であったため除外される負の淘汰が繰り返されることにより、NoV が進化していると考えられた。

D. 結論

従来のコンベンショナルな RT-PCR 法に変わる Super rapid RT-PCR を確立し、簡便かつ高感度に NoV, SaV の分子疫学に用いることのできる検出法を開発、構築した。本検出法の感度は、1990 年代にサンプリングされた GI, GII レファレンス検体を用いた場合、両者ともに 85%以上を示し、十分な感度を有していた。テストあたりに含まれる 10%糞便懸濁液量は、コンベンショナル RT-PCR が 1.7 μ L であるのに対し、Super rapid 法は、1 μ L と、約 40%持ち込む NoV RNA 量が異なると思われる。この条件下で、15%の感度低下にとどまっていたのは、評価に値する。

2010 年から 2011 年に台湾でサンプリングされた検体で比較検討した場合、GI の検出率が極めて低い値を示した。レファレンスには、多種多様な GI genotype が認められるとともに、多様な GI genotype の混合感染も認められた。しかし、2010 年から 2011 年にサンプリングされた台湾 CDC の検体では、GI.1, GI.4, GI.8 などの単一 genotype の感染事例であった。

Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く大規模なスクリーニングには、適していると思われる。しかし、増幅領域がコンベンショナルな RT-PCR とは異なる、COG primer set のターゲット領域 (ORF1-2 ジャンクション領域) であり、genotyping を行うには、陽性検体について、改めてコンベンショナルな RT-PCR を施行し、PCR 増幅産物を得て、塩基配列を決定

する必要がある。また、検出感度においても、改良が必要である。

RNA titer が 10^4 copies/uL と低値を示したことから、Super rapid RT-PCR は、 10^5 copies/uL 以下の検体は検出が困難であると考えられた。しかし、Super rapid RT-PCR は、抽出操作が簡便で、操作性が高く、大規模なスクリーニングを施行し、素早く結果を得るなど、迅速な NoV 流行解析に適していると思われる。

TCDC の GII.4 変異株解析の結果、日本や Europe, USA で観察された GII.4 2012 年変異株の流行は、まだ始まったばかりであり、従来型 2008 年変異株と勢力を分かち状態である事が明らかになった。台湾での NoV 流行は、日本、Europe, USA, Australia よりも遅れて始まる事が示唆された。

Universal primer RT-PCR システムは、 10^4 copies /uL 以下の RNA titer を示す低濃度の検体に対しては、増幅成功率が低かったが、それ以上の RNA titer を示した検体は遺伝子型にかかわらず 100%増幅、塩基配列決定が可能であった。本システムは、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティーによって提唱された新規 genotyping が実施できるため、今後の TCDC とのデータ共有のみならず、グローバルな配列データ共有に有用である。

TCDC の有する同一個体から時系列でサンプリングしたノロウイルス陽性検体を用い、ノロウイルスの個体内進化について NGS を

用いて研究したところ、 $0.48\text{nt}/0.24\text{aa}/\text{day}/\text{genome}$ の進化速度（負の淘汰）であり、これまでに報告された速度の約 1/4 の進化速度であることが示唆された。ノロウイルスの個体内進化はホストによる強い選択圧に依存することが明らかになった。

健康危険情報

なし

F. 論文発表

Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, **Katayama K**, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

ブルセラ症の診断法の開発に関する研究

研究分担者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室長
研究協力者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
研究協力者	水谷 浩志	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	山本 智美	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	久保田 菜美	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	斎藤 隆一	東京都動物愛護相談センター	城南島出張所	獣医師
研究協力者	岡本 その子	栃木県保健環境センター	微生物部	主任研究員
研究協力者	山本 明彦	国立感染症研究所	細菌第二部	主任研究官
研究協力者	柳井 徳磨	岐阜大学	応用生物科学部	獣医病理学教室 教授
台湾側研究分担者	慕 蓉蓉			
		台湾行政院衛生署	疾病管制局研究検験中心	腸道及新感染症細菌実験室

研究要旨： ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (genus *Brucella*) の感染を原因とする人獣共通感染症である。世界では日本や台湾など一部の国を除いて、多くの国々で家畜における感染が知られ、家畜衛生ひいては人の公衆衛生上も大きな問題となっている。

1) 日本では、現在、家畜における家畜ブルセラ菌感染は清浄化しており、同菌に感染する患者も輸入患者に限られている。台湾においても感染家畜の報告はなく、また、患者も過去33年間報告されていなかったが、2011年初めに輸入患者2例が報告された。

そこで、2011年度は、日台における共同研究の端緒として、台湾CDCにおけるブルセラ症検査体制構築のために、抗体検出法として日本で標準的に用いられている試験管内凝集反応 (TAT) と我々の作成したマイクロプレート凝集反応 (MAT) を、遺伝子検出法として同じく我々の作成した Combinatorial PCR 法を移転し、診断技術の共有を行った。また、本方法を用いて、技術移転時にすでに報告されていた3例の輸入患者の同定を行った。さらに、その後、本方法により新たに2名の患者が台湾CDCにおいて同定された。

2) 一方、イヌブルセラ菌 (*Brucella canis*) については、日本と同様に、台湾国内のイヌでも *B. canis* 感染報告が過去にあることから、ヒトへの感染も起きていることが懸念される。そこで、2012年度からは、日本・台湾のイヌにおける *B. canis* 感染状況調査として、同一の手技により、その抗体保有状況を検討し、比較を行った。*B. canis* に対する抗体は、国内のイヌでは、2,318頭中115頭 (5.0%) が抗体陽性、すなわち感染歴を持つことがわかった。また、500検体前後調査した中では、神奈川県は2.5%に比較して、栃木県は6.3%、東京都は7.9%と陽性率が高くなっていった。ただ、栃木県、東京都とも近年は、陽性率の低下傾向が認められるようであった。その理由については、イヌのプロファイルを元に検討中であるが、結論は得られていない。台湾については、63検体調査して抗体陽性1頭、陽性率1.6%と、日本よりも低

くなっていた。また、国内のイヌについて *B. canis* が尿中に排菌されイヌ間での感染経路となっている可能性を検討するため、膀胱尿、尿道（雄）・膣（雌）スワブを採取し、ブルセラ菌特異的遺伝子検出を行った。その結果、抗体陽性イヌ2頭の尿、抗体陰性イヌの膣スワブ、血清、各1頭ずつより、*B. canis* 特異的遺伝子が検出された。尿が感染源となる可能性が示唆された。

本研究を通じて、台湾 CDC への技術移転が良好に行われ、台湾 CDC でブルセラ症の検査が可能となったこと、また台湾 CDC においてブルセラ病診断用菌液等を日本より入手するルートが構築できたことにより、台湾では、2012年2月7日より、ブルセラ症が新たに届出疾患となった。台湾 CDC におけるブルセラ症の検査診断体制の構築、患者診断および感染症対策構築に寄与した。

A . 研究目的

ブルセラ症 (Brucellosis) は世界では、毎年新規患者が50万人以上発生していると言われる重要な人獣共通感染症であり、日本では感染症法によって4類感染症（全数把握）に指定されている。人に感染するものは病原性の強い順に *Brucella melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* があるが、このうち前3つはすべて家畜が自然宿主となっている。

国内の家畜はこれら家畜ブルセラ菌に対して清浄であり、国内の家畜から感染するリスクはない。そのため、ブルセラ症が4類感染症に指定された1999年4月1日以降の感染者7例はすべて輸入感染例である（表1）。その内訳は、*B. melitensis* 感染が5例、*B. abortus* 感染が2例で、最初の2例を除き残りの5例はすべて外国人であり、それぞれの母国で感染し日本国内で発症・診断されている。一方、*B. canis* はイヌを自然宿主とし、現在も国内の、3~5%のイヌが感染歴を持つと考えられている。ごくまれに人にも感染することもあり、国内では、*B. canis* 感染患者13例が届け出られている（表2）。

一方、台湾では、1987年に最後の感染例（実験室感染）が報告されて以降、患者の報告はなかった。台湾国内の家畜でもブルセラ菌感染報告はなく、状況としては日本と非常に似通っている。ところが、台湾CDCにおいて、ブルセラ症の診断方法を確立すべく、我々と共同研究を行うこととなっていた矢先の、2011年5月に、2例の輸入患者（北アフリカ、マ

レーシア）が報告され、7月にさらに1例、マレーシアからの輸入患者が報告された。そこで、2011年度は、日本において実施している検査診断法について、必要な抗原、陽性抗体、遺伝子検査用プライマー他を持参して台湾CDCに赴き、台湾で見つかった患者検体を用いた検証や、同技術の台湾CDCへの移転を行った。

国内のイヌのブルセラ病については、1970年代の実験用イヌ繁殖施設での集団発生を始めとして、近年でもペット用イヌの繁殖施設における集団発生がしばしば報告されており、さらに、報告されていない物も多々あると考えられている。台湾でも、2001年に、イヌの*B. canis* 感染に関する論文報告がある。そこで、2012年度からは、日本および台湾のイヌにおける*B. canis* 感染状況調査として、双方同一の手技により、その抗体保有状況を調査・検討することとした。ブルセラ菌特異的抗体検出方法については、MAT（マイクロプレート凝集反応）もTAT（試験管凝集反応）とともに、本共同研究初年度に台湾CDCにその検査手技について技術移転を実施済みであることから、TATよりも少量の抗原・血清ですみ、また多くのサンプルを一度に検査することを可能にする、MATを用いることとした。

また、イヌ間における感染伝播に、感染イヌの尿の関与が推測されている。そこで、その可能性を検証するため、今回、国内のイヌより、尿および尿道・膣スワブを採取し、*B. canis* 特異的遺伝子検出を試みた。

B . 研究方法

1 . 供試検体： 台湾において確認された 3 名の患者 (No.1~3) および、感染疑いの者 1 名 (No.4) の血清。合計 4 検体。

2 . 試験管凝集反応 (TAT) による抗ブルセラ抗体の検出： 家畜ブルセラ菌に対する抗体を測定するための TAT は、*B. abortus* 凝集反应用菌液 (農業・食品産業技術総合研究機構) を用い、添付のプロトコールに従い実施した。すなわち血清サンプルを 5 倍から 2 倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、37、18~24 時間感作後、サンプルの最終希釈倍数 1:40 以上で 50% 以上の凝集を示すものを陽性と判定した。イヌブルセラ菌に対する抗体は、*B. canis* 凝集反应用菌液 (北里研究所) を用いた。すなわち血清サンプルを 10 倍から 2 倍段階希釈し、凝集反应用菌液を等量加え、50、24 時間感作後、サンプルの最終希釈倍数 1:160 以上で 50% 以上の凝集を示すものを陽性と判定した。

3 . マイクロプレート凝集反応 (MAT)： 家畜ブルセラ菌に対する抗体を測定するための MAT は、*B. abortus* 凝集反应用菌液と 0.25% サフラニン染色液を 50:1 の比率で混合し、抗原とした。96 穴 U 底プレートを用い、サンプルをフェノール加生理食塩水で 5 倍から 2 倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗原を混合・攪拌し、37、18~24 時間感作後、凝集反応を判定した。抗イヌブルセラ菌抗体については、*B. canis* 凝集反应用菌液を同様に用いたが、サンプルはリン酸緩衝生理食塩水で 10 倍から 2 倍段階希釈し、同量の凝集反应用抗原を混合・攪拌し、50、24 時間感作後、凝集反応を判定した。肉眼で凝集像が確認されたものを陽性と判定した。

4 Combinatorial PCR によるブルセラ遺伝子の検出： この PCR では、4 セットのプライマーによる増幅パターンの違いにより、ヒトに感染しうる主要 4 菌種を鑑別することが可能である。ただ、台湾 CDC の

保有する患者血清の量が少なく、DNA を抽出し検査するのは困難なため、各種ブルセラ菌抽出陽性対照コントロール DNA 等を用いて、台湾 CDC に遺伝子検査法を実際に実施・検証してもらうこととした。

5 . イヌ血液サンプル： 2007 から 2013 年度に東京都動物愛護相談センターに收容されたイヌ 605 頭、栃木県動物愛護指導センターに收容されたイヌについては 2012 年度の 65 頭ほか 2002~2005 年度の検体を含めて 603 頭の実験用血清を検討に用いた。イヌの殺処分直後に心臓採血を行い、血清を分離し、使用まで -40 にて冷凍保存した。その他、沖縄から北海道にかけて、猟犬 631 頭の実験用血清を検討に用いた。検査結果については、すでに実施済みの神奈川の結果と併せて、解析を行った。総検査数は、26 都道府県、2,318 頭である。

6 . 膀胱尿及びスワブの採取： イヌの殺処分直後に、膀胱尿は膀胱から直接、尿を採取した。スワブは、雄では膀胱と尿道の境目近辺に前立腺、射精口が開いているため、膀胱から尿道方向に綿棒を挿入して採取し、雌では外陰部から膣に綿棒を挿入して採取した。綿棒で採取した検体は、生理食塩水に溶解し、検査まで -40 にて冷凍保存した。

7 . DNA の抽出と遺伝子検出： 血清、膀胱尿、スワブ (溶解液) から、DNA 抽出剤 (SepaGene, エーディア) を用いて、DNA を抽出した。*bcs31* および *omp2* を標的遺伝子として、ブルセラ特異的遺伝子検出を行った。*bcs31* は、ブルセラ属菌体表面タンパクの 31kDa 抗原 (BCSP31) をコードする遺伝子で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp2* はブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 の遺伝子であるが、その中でも *B. canis* に特徴的な配列を持つ領域を標的とした。それぞれの増幅領域内に特異的なハイブリダイゼーションプローブを作成し、これを使用したリアルタイム PCR を Light-cycler (ロシユ) を用いて実施し、特異的遺伝子を検出した。*bcs31* と *omp2* *canis-type* が両方検出された検体を陽性とした。

C . 研究結果

1 . 試験管凝集反応 (TAT) による抗ブルセラ抗体の検出: *B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1~3 の検体はそれぞれ、1:160 以上を示し、陽性であった。No.4 は 1:10 未満で陰性となった。図 1)には、抗原 *B. abortus*、血清希釈 1:40 の結果を示している。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、いずれの検体も 1:160 未満の陰性であった。No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 は現時点では感染していないことがわかった。

2 . マイクロプレート凝集反応 (MAT): 当初、総反応液量 50ul の系で実施したが、視認性がやや悪かったため、100ul にして追試験を実施した。*B. abortus* を抗原として用いた場合、No.1~3 の検体はそれぞれ、1:160、1:320、1:160 を示し、陽性であった。No.4 は 1:10 未満で陰性となった(図 2)。一方、*B. canis* を抗原に用いた場合は、1:80、1:40、1:80、1:20 未満と、いずれの検体も 1:160 未満の陰性であった。以上の結果より、No.1~3 はいずれも確かに家畜ブルセラ菌に感染していることが確認された。また、No.4 では感染は確認されなかった。*B. melitensis* 感染の場合は、*B. canis* に対しても(陽性までとはいかないまでも)反応性を示すことがある。このことから、本 No.1~3 の患者は、*B. melitensis* 感染と思われた。

3 Combinatorial PCR によるブルセラ遺伝子の検出: 予定される通りの結果が得られたので、問題なく我々の方法は、台湾でも実施可能で、PCR によるブルセラ特異的遺伝子検出法の共有は完了した。

4 . イヌ血液サンプルにおける抗体保有状況: 国内のイヌでは、2,318 頭中 115 頭が陽性、5.0%が抗体陽性、すなわち感染歴を持つことがわかった。また、500 検体前後調査した中では、神奈川県は 2.5%に比較して、栃木県は 6.3%、東京都は 7.9%と陽性率が高くなっていた。ただ、栃木県、東京都とも近

年は、陽性率の低下傾向が認められ、東京都ではここ 3 年間については 5%台となっていた(表 3、4)。

猟犬については、各都道府県それぞれの検体数が少ないため、県ごとに結果を判断することはできないが、まとめると、陽性は 17/631 (2.7%)と、神奈川県と同程度であった(表 3)。

B. canis はその自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高いが、参考として東京都のネコを調査した結果では 2/280 (0.7%)が抗体陽性であった(表 4)。

5 . 台湾のイヌにおける抗体保有状況: MAT 法で愛護センターのイヌのうち 63 検体を調査したところ、陽性 1 頭、陽性率 1.6%と、日本よりも低くなっていた。

6 . 膀胱尿およびスワブからのブルセラ菌特異的遺伝子検出: 抗体陽性イヌ 2 頭(1:320, 1:640)の尿、抗体陰性イヌの膣スワブ、血清、各 1 頭ずつより、*B. canis* 特異的遺伝子が検出された(図 3)。それ以外にも、*bccsp31* のみ陽性の検体も散見された。

D & E . 考察・結論

今回、日本で用いられている抗体検査法及び遺伝子検出法について、それぞれ日本から抗原、陽性対照血清等を持参し、台湾 CDC と検査法の共有を行った。その検査法の検証は、まず我々がデモンストレーションを行い、その後、台湾 CDC 担当者がこれを再試する形式で、実際に台湾で確認された患者サンプルを用いて行った。日本国内と同様に台湾でも有効な検査法であることが明らかとなった。日本では、感染症法における届出基準による検査法として TAT が記されていることと、民間の臨床検査機関でも TAT が保険適用下で実施されていることから、TAT が、患者診断に主として用いられている。しかしながら、TAT は使用する抗原や抗体の量が多く、また溶血の影響を受けやすいことが知られている。一方、台湾ではブルセラ症に対する検査法が規定されておらず、今回の結果も良好であったことから、

100ul 系の MAT を使用するよう、台湾 CDC に対して提案した。移転後(9、10月)本検査法を用いて、4例目の患者(3例目と同一地域・マレーシアへの渡航歴あり)および5例目の患者(中国への渡航歴あり)が、確定診断された(表5)。このことから、本検査法の有用性と台湾 CDC への技術移転が良好に行われたことがわかった。また、台湾では、2012年2月7日より、ブルセラ症が新たに届出疾患となった(表6)。

ブルセラ菌は細胞内寄生菌であるため、抗体は菌の排除には余り役に立たない。つまり抗体が存在すると言うことは、「菌がどこか(リンパ節など)に潜んでいて、時折、抗原刺激を与えている=感染が継続している」と考えることもできる。そのため、抗体保有状況はそのときの感染状況を直接反映すると考えられている。今回、国内のイヌにおける抗体保有状況を調査したところ、5.0%が抗体陽性であった。この結果は、他のグループによる、国内の動物病院を受診しているイヌにおける抗体保有状況調査結果3.0%よりも、若干高くなっていた。

本調査では東京、栃木、神奈川についてはそれぞれの動物愛護センターに収容されたイヌ、それ以外の県については猟犬となっている。猟犬は特殊な用途のイヌグループではあるが、その陽性率は2.7%と全体平均よりも低く、神奈川県と同程度であった。このことは、飼育犬の用途(愛玩用か猟犬か)に陽性率はあまり関わらないと言うことを表している。また、本調査における全体平均は、先に示した動物病院調査よりも高値を示したが、これは、神奈川県や猟犬では2.5、2.7%であるのに対し、栃木県と東京都の結果が、全体平均を押し上げていることによる。神奈川県の調査も2003~2006年度であり、ほぼ栃木県、東京都の調査時期と重なるにもかかわらず、なぜ栃木県や東京都で高い抗体保有率を示したのか、理由は定かではない。ただ、近年は、両地域ともに抗体保有率に低下傾向が見えている。その理由が、何によるのかは推測の域を出ないが、2006年頃から一時期、イヌのブルセラ病そのものについてや、繁殖施設における集団発生の情報が、マスコミ等にも取り上げられたことで、本疾患がより認知され、予

防措置(個人ブリーダーも含めて、繁殖施設内への保菌動物の侵入阻止や繁殖に供する動物の事前検査の実施など)が、徐々に実施されるようになってきているのかもしれない。

B. canis は、その自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高い。また、ヒトに感染しても発症しない、または発症しても軽微な力ゼ様で自然治癒すると言われる。ただ、2008年の繁殖犬による施設従業員への感染例のように比較的強い症状を示したものや、その他の報告例のような長期にわたる不明熱を示し、診断まで時間がかかったものなどがあり、患者数が少ないとはいえ公衆衛生学的に無視して良い物ではない。またイヌにおける繁殖障害による経済的被害は業者にとっては甚大である。本疾患は明らかに国内のイヌで感染が維持されており、2~5%が感染・保菌している。一般飼育者を含めたイヌを取り扱う者に対して、本疾患及びその予防・対処法に関する情報を提供し、より一層、認知・実践してもらう必要があると考えられる。

ブルセラ症に関して、日本と同様の状況にある台湾について、検査頭数は少ないものの、陽性率1.6%と、日本よりも低くなっていた。2001年の調査では5/38(13.2%)の抗体陽性(感染)イヌが報告されている。現在、その抗体保有率が本当に低下しているのかどうか、興味深い点である。台湾では、日本と同じく家畜ブルセラ菌は国内の家畜からは清浄化していると考えられる。そのため、今後も家畜ブルセラ菌感染患者は輸入感染者であると思われる。ただ、日本と同様に、台湾国内のイヌでもイヌブルセラ菌感染が認められることから、ヒトへの感染も起きていることが疑われる。

日本では、イヌ繁殖施設で時折、*B. canis* 感染流行が起きており、実際にペットとして飼育されているイヌで見られる抗体陽性の原因の一つ(感染イヌの市中への流入)とも考えられている。ただ、それ以外にも、市中において感染イヌから、別のイヌへの感染伝播が起きている可能性が否定できない。また、実験的 *B. canis* 感染イヌの尿中に菌が排出されることが知られている。そこで、今回、尿および尿道(雄)・膣(雌)スワブを採取し、その中の *B. canis*

特異的遺伝子の検出を実施したところ、抗体陽性イヌの尿、抗体陰性のイヌではあるが膣スワブから、特異的遺伝子が検出された。これは、実際に尿等を介して、市中で感染が拡大していることを示していると考えられる。これについては、今後も検討を続け、例数を増やしていく予定である。

謝辞： イヌ血清サンプルの採取・提供、データ解析のご協力について、東京都動物愛護相談センター城南島出張所の皆様、栃木県保健環境センターの皆様、岐阜大学応用生物科学部獣医病理学教室の皆様に感謝いたします。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表等

1. 論文・総説等

(1) 麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優二, 手塚貴文, 塚田弘樹. 血液培養から分離された *Brucella melitensis* の一症例. 医学検査, 61(5): 902-907, 2012

(2) Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Hanazato, M., Tobiume, M., Horiuchi, M., Atarashi, R., Nishida, N., Watarai, M., Imaoka, K. and Ohno, H. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J. Immunol., 189:1540-1544, 2012

(3) 今岡浩一, 木村昌伸. 日本におけるブルセラ症 - 感染症法施行前 (1999年3月31日) まで -. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 186-187, 2012

(4) 今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉. 台湾におけるブルセラ症 - 33年ぶりの患者報告と届出疾患へ -. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 193-194, 2012

(5) 今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋. ブルセラ症 - ブルセラ症検査マニュアル-2012. in: 病原体検査マ

ニュアル (国立感染症研究所, 地方衛生研究所全国協議会 編), [http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/brucellosis_2012.pdf], 2012

(6) 今岡浩一. ブルセラ症の現状. in: 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 28(12): 138-148, 2012

(7) 今岡浩一. 犬ブルセラ症 - 特集・診断シリーズ・感染症. in: SA Medicine, インターズー, pp.53-56, 2013

(8) 水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳子, 松村藍, 山本智美, 木村昌伸, 今岡浩一. 東京都における犬の抗 *Brucella canis* 抗体保有状況. 日本獣医師会雑誌, 67(3): , 2014 (in press)

2. 学会発表・講演等

(1) Koichi Imaoka. Brucellosis in Japan. 8th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Oct. 12-14, 2011

(2) Koichi Imaoka. Bacterial infection from dogs and cats - Brucellosis and *Capnocytophaga canimorsus* infection-. Workshop I: Zoonoses transmitted from pet animals in daily life. The 2nd International Conference on Animal Care in KOBE 2012, Kobe, Feb. 18-19, 2012

(3) Gaku Nakato, Koji Hase, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Manabu Ato, Misaho Hanazato, Minoru Tobiume, Motohiro Horiuchi, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida, Masahisa Watarai, Koichi Imaoka, Hiroshi Ohno. Cellular prion protein on Peyer's patch M cells could serve as an invasive receptor for *Brucella abortus*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Sep. 11-14, 2012

(4) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. *Brucella abortus* は腸管パイエル板からの侵入に M 細胞上のプリオン蛋白質 (PrPc) を利用する. 第155回日本獣医学会学術集会, 東京, 2013年3月

(5) Koichi Imaoka. Development of diagnostic methods for brucellosis - Sero-epidemiology of *Brucella canis* infection in dogs in Japan. 10th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne

Disease, Tokyo, Sep. 12-13, 2013

(6) 今岡浩一. 犬猫から感染する動物由来感染症
について～カプノサイトファーガ・カニモルサス感
染症、ブルセラ感染症など～. 厚生労働省平成 25
年度動物由来感染症対策(狂犬病予防を含む)技術
研修会 東京 2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1) 国内の家畜ブルセラ属菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1 ~ 2014.1.31)

Date of diagnosis	age group	Reporting prefecture	Suspected place of infection	Suspected route of infection	Symptoms	Ab test (SAT)		Isolation	Identification by PCR
						abortus	canis		
2005.6	30-39 yrs	Tokyo M.	Syria (Travel to)	Foodborne (Sheep meat)	Fever, exanthema, splenomegaly, swelling of abdominal lymph nodes, arthralgia	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2006.2	50-59 yrs	Tokyo M.	Egypt (Travel to)	Unknown (Inhalation?)	Fever, headache, hepatomegaly, splenomegaly	(+)	(-)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2006.7	20-29 yrs	Hokkaido P.	Egypt (Visit from)	Foodborne (Milk)	Fever, headache	(+)	(-)	(-)	Negative (Blood)
2008.7	60-69 yrs	Shizuoka P.	Peru (Visit from)	Foodborne	Fever, back pain, lack of energy	(+)	(-)	(-)	<i>B. abortus</i> (Blood)
2009.10	10-19 yrs	Tokyo M.	India (Visit from)	Foodborne (cheese)	Fever, splenomegaly, lymphadenopathy, arthritis, hepatomegaly	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2010.4	40-49 yrs	Aichi P.	Peru (Visit from)	Foodborne (cheese)	Fever, gastroenteritis, abdominal pain (iliopsoas abscess)	(+)	(+)	(+)	<i>B. melitensis</i>
2011.11	40-49 yrs	Niigata P.	China (Homecoming to)	Unknown (Inhalation?)	Fever, headache, occipital ache	(+)	(-)	(+)	<i>B. melitensis</i>

表 2) 国内のイヌブルセラ菌感染事例 (感染症法指定後、1999.4.1 ~ 2014.1.31)

Date of diagnosis	age group	Reporting prefecture	Suspected place of infection	Suspected route of infection	Symptoms	Ab test (SAT)		Isolation	Identification by PCR
						abortus	canis		
2002.1	40-49 yrs	Tokyo M.	Tokyo M.?	Pet dog	Fever, loss of appetite	(-)	(+)	(-)	Not tested
2005.12	10-19 yrs	Nagano P.	Nagano P.?	Unknown	Fever, muscle pain, abdominal pain	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum)
2006.6	20-29 yrs	Nagano P.	(Italy)	Unknown	Fever, muscle pain	(-)	(+)	(-)	Negative (Blood)
2006.9	60-69 yrs	Nagano P.	Nagano P.	Unknown	Fever, splenomegaly	(-)	(+)	(-)	Not tested
2006.10	70-79 yrs	Miyagi P.	Miyagi P.	Unknown	Fever, central nervous system abnormalities	(-)	(+)	(-)	Not tested
2007.4	40-49 yrs	Osaka P.	Osaka P.	Pet dog	Lymphadenopathy, lack of energy	(-)	(+)	(-)	Not tested
2008.6	10-19 yrs	Saitama P.	Saitama P.	Pet dog	Fever, arthritis, myositis	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum)
2008.8	70-79 yrs	Aichi P.	Aichi P.	Breeding dog	Fever, splenomegaly, hepatomegaly	(-)	(+)	(+)	<i>B. canis</i>
2008.8	40-49 yrs	Aichi P.	Aichi P.	Breeding dog	Fever	(-)	(+)	(+)	<i>B. canis</i>
2009.4	30-39 yrs	Saitama P.	Saitama P.	Breeding dog	(reported as an asymptomatic case)	(-)	(+)	(-)	Not tested
2010.6	60-69 yrs	Tochigi P.	Tochigi P.	Unknown	Fever	(-)	(+)	(-)	Not tested
2011.11	60-69 yrs	Shimane P.	Shimane P.	Unknown	Fever, central nervous system abnormalities (encephalomyelitis)	(-)	(+)	(-)	Negative (Serum + Spinal fluid)
2013.7	40-49 yrs	Kanagawa P.	Kanagawa P.	Pet dog	Fever, joint pain, muscle pain, lymphadenopathy	(-)	(+)	(-)	<i>B. canis</i> (Blood)

表3) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況

Prefecture	Samples (Tested)	Positive		Prefecture	Samples (Tested)	Positive				
		No.	(%)			No.	(%)			
Hokkaido	35	1	2.9	Gifu	36	3	8.3			
Aomori	23	0	0.0	Shizuoka	46	1	2.2			
Iwate	16	0	0.0	Aichi	15	0	0.0			
Miyagi	28	0	0.0	Mie	56	0	0.0			
Akita	9	0	0.0	Shiga	5	0	0.0			
Yamagata	20	3	15.0	Hiroshima	47	0	0.0			
Fukushima	16	1	6.3	Kagawa	8	0	0.0			
Tochigi	603	38	6.3	Kochi	10	0	0.0			
Tokyo	605	48	7.9	Nagasaki	20	0	0.0			
Kanagawa	479	12	2.5	Kumamoto	20	0	0.0			
Niigata	24	2	8.3	Miyazaki	20	1	5.0			
Toyama	9	0	0.0	Kagoshima	110	2	1.8			
Nagano	23	1	4.3	Okinawa	35	2	5.7			
Tochigi: 2003-2005, 2012 (in animal care center)				Total				2318	115	5.0
Tokyo: 2007-2013 (in animal care center)				Kanagawa: 2003-2006 (in animal care center)						
				Others: 2009-2013 (hunting dogs)						

表4) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況の経年変化

Tokyo: Dog				Cat		
Year	Samples (Tested)	Positive		Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)		No.	(%)
2007	50	5	10.0	-	-	-
2008	89	12	13.5	98	1	1.0
2009	106	9	8.5	102	0	0.0
2010	70	6	8.6	80	1	1.3
2011	125	7	5.6	-	-	-
2012	113	6	5.3	-	-	-
2013	52	3	5.8	-	-	-
Total	605	48	7.9	280	2	0.7

Tochigi: Dog			
Year	Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)
2002	245	18	7.3
2003	64	5	7.8
2004	99	7	7.1
2005	130	7	5.4
2012	65	1	1.5
Total	603	38	6.3

表 5) Imported brucellosis cases in Taiwan after unseen for 33 years

Year	Age	sex	Disease onset	Symptoms	Confirmed date	Affected region	Infection route
2011	54	F	24-Apr	fever, abnormal liver function	17-May	Morocco, Algeria	raw meat, dairy products
2011	72	F	April (2010)	fever, spinal pain	24-May	Malaysia	goat's milk
2011	59	F	28-Apr	fatigue	5-Jul	Malaysia	goat's milk
2011	28	M	30-Aug	fever	14-Sep	Malaysia	goat's milk
2011	58	M	19-Jul	fever sweating	21-Oct	China	unknown

by Taiwan CDC

表 6) Notifiable Infectious Diseases in Taiwan

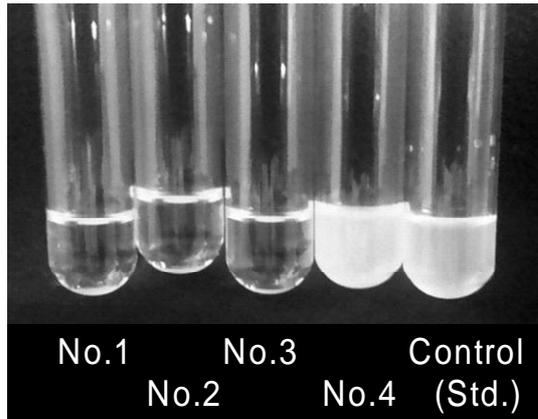
Classification	Infectious Diseases
Category I	Anthrax
	Plague
	SARS
Category II	Acute Flaccid Paralysis and Poliomyelitis
	Amoebiasis
	Cholera
	Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome
	Enterohemorrhagic E. coli Infection
	Hantavirus Pulmonary Syndrome
	Malaria
	Meningococcal Meningitis
	Paratyphoid Fever
	Rubella
Typhoid fever	
Category III	Acute Viral Hepatitis type B
	Acute Viral Hepatitis type D
	Acute Viral Hepatitis untype
	Congenital Rubella Syndrome
	Gonorrhea
	Hansen's Disease
	Japanese Encephalitis
	Mumps
	Pertussis
	Tetanus
Category IV	Botulism
	Cat-scratch Fever
	Creutzfeldt-Jakob Disease
	Herpesvirus B Infection
	Leptospirosis
	Melioidosis
	Q Fever
	Toxoplasmosis
	Varicella
	Category V
Marburg Hemorrhagic Fever	
Yellow Fever	
	H5N1 Influenza
	Rabies
	Smallpox
	Acute Viral Hepatitis type A
	Chikungunya Fever
	Dengue Fever
	Diphtheria
	Epidemic Typhus Fever
	Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome
	Measles
	Multi-drug Resistant Tuberculosis
	Poliomyelitis
	Shigellosis
	West Nile Fever
	Acute Viral Hepatitis type C
	Acute Viral Hepatitis type E
	AIDS
	Enteroviruses Infection with Severe Complications
	Invasive Haemophilus Influenzae Type B Infection
	HIV Infection
	Legionellosis
	Neonatal Tetanus
	Syphilis
	Tuberculosis
	Brucellosis
	Complicated Influenza
	Endemic Typhus Fever
	Invasive Pneumococcal Disease
	Lyme Disease
	New Delhi metallo- β -lactamase -1 Enterobacteriaceae
	Scrub Typhus
	Tularremia
	Lassa Fever
	Rift Valley Fever

Conduct based on the "Communicable Disease Control Act" amended and promulgated on July 18, 2007, and the "Category 4 and Category 5 Communicable Diseases Preventive and Control Measures" announced on October 9, 2007.

図1) 台湾 CDC での試験管凝集反応 (TAT) による家畜ブルセラ菌特異的抗体の検出

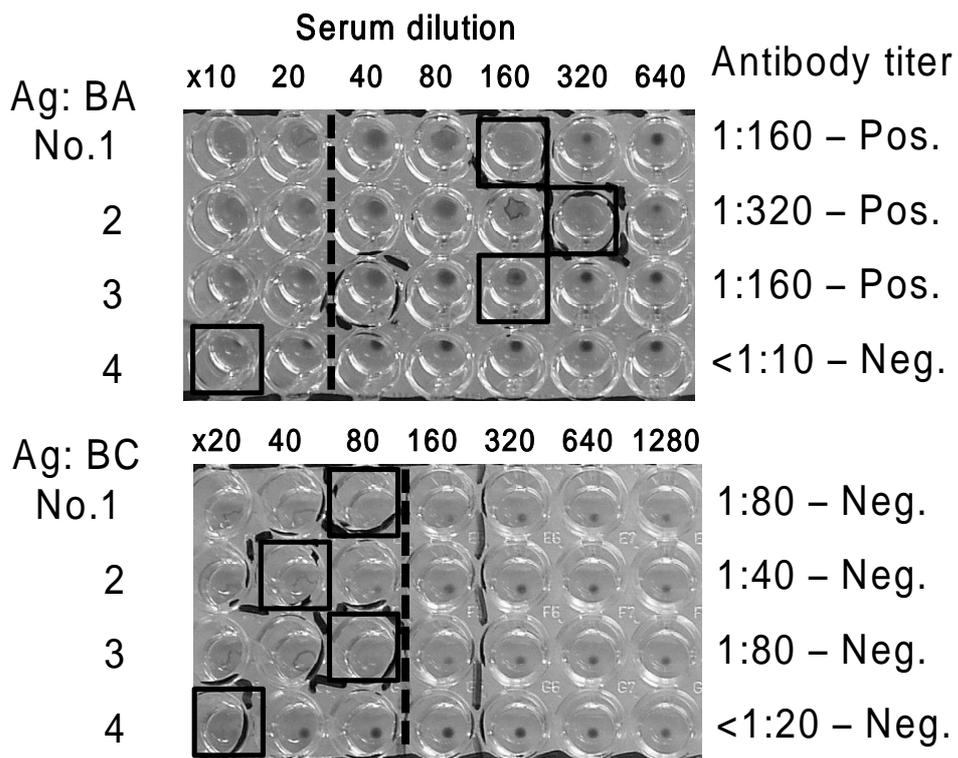
Samples : Brucellosis patients 3 (No.1-3)
 Suspected 1 (No.4)
 Ag : *B. abortus*

Serum dilution = 1:40



Results :
 No.1 Pos.
 No.2 Pos.
 No.3 Pos.
 No.4 Neg.

図2) 台湾 CDC でのマイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ属菌抗体の検出



BA : 使用抗原 *B. abortus*、1:40 以上が陽性

BC : *B. canis*、1:160 以上が陽性

図3) 国内のイヌにおける *B. canis* 遺伝子の検出

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D1	<x10 (-)						
D2	x20 (-)			+		+	+
D3	x320 (+)	+	+			+	
D4	x10 (-)						
D5	x10 (-)						
D6	x10 (-)						
D7	<x10 (-)						
D8	x10 (-)						
D9	<x10 (-)						
D10	x10 (-)						
D11	x640 (+)	+	+	+			
D12	x20 (-)						
D13	<x10 (-)						
D14	<x10 (-)						
D15	x10 (-)	+		+			
D16	x10 (-)						
D17	<x10 (-)						
D18	<x10 (-)						
D19	x10 (-)						
D20	x10 (-)						

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D21	x10 (-)						
D22	<x10 (-)						
D23	x10 (-)			+			
D24	x10 (-)						
D25	x10 (-)						
D26	<x10 (-)						
D27	x10 (-)						
D28	x10 (-)						
D29	<x10 (-)						
D30	x40 (-)						
D31	x10 (-)						
D32	x10 (-)	+					
D33	x10 (-)						
D34	x20 (-)						
D35	x10 (-)						
D36	x10 (-)						
D37	<x10 (-)						
D38	x1280 (+)					+	
D39	x10 (-)						
D40	x10 (-)						

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca	bcbp31	omp2ca
D41	<x10 (-)						
D42	<x10 (-)						
D43	<x10 (-)						
D44	<x10 (-)						
D45	<x10 (-)						
D46	<x10 (-)			+	+		
D47	<x10 (-)			+		+	
D48	<x10 (-)						
D49	<x10 (-)						
D50	<x10 (-)						
D51	<x10 (-)						
D52	<x10 (-)						
D53	nt						
D54	nt						
D55	nt						
D56	nt						
D57	nt						
D58	nt						

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
H23～H25 総合研究報告書

台湾および日本の蚊相の違いと蚊によって媒介される病原体の遺伝的關係
蚊相ならびに採集蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

研究分担者	津田良夫	国立感染症研究所
研究協力者	金 京純	鳥取大学農学部
	鄧 華眞	台湾 CDC
	陳 典煌	台湾 CDC

蚊媒介性病原体の自然の侵入経路のひとつとして、渡り鳥による持ち込み（侵入）・定着に関する検討を行った。野鳥由来の蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫に着目して、台湾と石垣島の調査地で蚊を採集し、蚊からの鳥マラリア原虫の検出を行った。台湾の調査地では2011年～2013年に、20種類13,373個体、石垣島では24種類7,499個体の蚊成虫を採集した。これらの蚊サンプルから、チトクロームb遺伝子をターゲットとしたPCR法によって鳥マラリア原虫の検出を行った。その結果、台湾で採集された20種の蚊のうち、9種類の蚊から鳥マラリア原虫が検出された。検出された鳥マラリア原虫は、チトクロームb遺伝子の塩基配列の相同性によって9つの遺伝的系統に分類された。このうち3つの系統は3年連続して原虫が検出されており、調査地に生息するクシヒゲカ的一种と*Cx. murrelli*などの蚊によって感染サイクルが維持されていると推測された。これに対して、これら3系統以外の系統は、いずれも3年間の調査で1回しか検出されておらず、感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生息していた蚊の吸血を通じて一時的に取り込まれた系統であると推測された。本研究の調査結果は、渡り鳥による病原体の持ち込みが実際に行われていることを示唆している。

A. 研究目的

蚊が媒介する病原体がある地域に侵入する経路には、大きく2つを区別することができる。ひとつは、病原体に感染した人（患者）やペット、家畜、あるいは感染した蚊が人為的な手段によって移動することによる侵入である。このような経路は、ある程度コントロールすることが可能であり、検疫によって侵入が阻止されている。もうひとつの侵入経路として、自然の経路が考えられる。これは、感染した蚊が強風によって長距離を移動したり、感染した野生動物、例えば渡り鳥が飛来することによって病原体が持ち込まれる経路である。この自然の経路による蚊媒介性病原体の侵入が、実際にどの程度頻繁に起きているのかはよくわかっていない。

日本列島と台湾はユーラシア大陸の東沿岸に位置し、千島列島、フィリピン、ボルネオ島、インドネシア、オーストラリア大陸とともに、渡り鳥の重要な渡りルートを形成している。そのため、渡り鳥による病原体の侵入に関する調査研究に適した位置にあるということが出来る。蚊によって媒介される病原体の場合、ある地域に病原体に感染した人や動

物が移動してきても、そこに媒介可能な蚊が生息していなければ病気の伝播は起こらない。したがって、蚊媒介性病原体の侵入や伝播の実態は、その地域に生息している蚊から病原体の検出を行うことによって明らかにすることが可能である。

本研究は、蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫を対象として、台湾と石垣島の調査地で媒介蚊の現地調査を行い、蚊相と蚊から検出される鳥マラリア原虫の種類を比較考察することによって、渡り鳥による蚊媒介性病原体の侵入・定着の実態を明らかにすることを目的に行われた。

B. 研究方法

台湾における現地調査：台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳，無尾港水鳥保護区）を調査地として2011年から2013年の3シーズンに疾病媒介蚊の現地調査を行った。調査は渡り鳥が飛来する5月と9月または10月に各1回ずつ実施した。成虫調査は1kgのドライアイス誘引源とするトラップ10台を設置して、連続した2日間採集を行った。捕獲された成虫は毎日回収し、台湾CDCの実験室

に持ち帰って種類同定を行った。サンプルはその後の分析のために冷凍で保存した。

石垣島における現地調査：台湾北東部の蚊相と比較するために石垣島南部の水田地帯で、2011年6月、8月、2012年3月と9月の計4回の現地調査を実施した。成虫調査はドライアイストラップ15台を用いて、連続した3日間行った。

蚊からの病原体の検出：台湾の調査で捕獲されたコガタアカイエカ成虫サンプルは、台湾CDCで日本脳炎ウイルスの分離を試みた。それ以外の成虫サンプルを用いて、鳥マラリア原虫の検出を行った。石垣島のサンプルと台湾の2011年および2012年のサンプルからの鳥マラリア原虫の検出は国立感染症研究所昆虫医科学部で行い、2013年の台湾のサンプルは台湾CDCで分析した。蚊からの鳥マラリア原虫の検出は、チトクロームb遺伝子をターゲットとしたPCR法によって行い、陽性サンプルは遺伝子の塩基配列を決定して種類を同定した。

吸血蚊の吸血源動物の同定：トラップ採集及び捕虫網採集によって採集された吸血蚊からは、DNAを抽出して、吸血源動物の同定と鳥マラリア原虫の検出を行った。

蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の検出は台湾のサンプルについてはほぼ終了したが、石垣島の2012年のサンプルはまだ分析が済んでいない。そのため、分析が済んだ台湾のサンプルの結果を中心に報告する。

C. 研究結果

台湾と石垣島の現地調査によって採集された蚊の種類とその個体数を表1にまとめて示した。台湾では合計20種類、13,373個体、石垣島では合計24種類、7,499個体の成虫が採集された。このうち台湾と石垣島の両方の調査地で採集されたのは、12種類であった。これら12種類のほとんどは捕獲個体数が多く、いわゆるふつうに採集される種類であった。石垣島の調査地で採集されていない種類の中には、キンパラナガハシカやアカツノフサカ、サキジロカクイカ、ミナミハマダライエカのように、生息しているのだが発生量が少ないために本調査では採集されなかった種類が含まれていた。

台湾で採集されたコガタアカイエカのサンプルからは日本脳炎ウイルスの検出を試みたが、検出できなかった。

台湾の調査地で採集されたコガタアカイエカ以外の蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の

検出結果を表2~4に示した。分析を行った16種について、鳥マラリア原虫の感染率を表2に示した。鳥マラリア原虫は9種類の蚊から検出され、プール単位で求めた感染率は2.4%から50%であった。1つの陽性プールに感染個体が1個体だけ含まれていたと仮定して、感染率を分析した総個体数に対する1000分率(MIR)で表現すると、2.8から200であった。分析個体数が10以上の種類に限ると、クシヒゲカの種類とカラツイエカの感染率がMIR=43.8、25.5とかなり高い感染率を示した。これら2種の蚊は我国にも生息しており、我国で採集されたサンプルからも鳥マラリア原虫が検出されている。石垣島で採集された蚊の中で、これまでに鳥マラリア原虫が検出されているのは、ネツタイエカとムラサキヌマカの2種類である。我国のサンプルで鳥マラリア原虫が検出されておらず、台湾のサンプルでのみ陽性個体が見つかっている蚊の種類は、ヨツホシエカと*Cx. murrelli*、アシマダラヌマカの3種類であった。

台湾産の蚊から検出された原虫の遺伝的系統と陽性プール数を表3に示した。合計10系統が検出され、そのうち4つはこれまで全く報告のない新規の系統であった(Yilan01, Yilan02, Yilan03, Yilan04)。陽性サンプルの総数が5以上の系統は3つあり、いずれも3年続けて陽性個体が見つかっている。このうち*P. rouxi*と*P. elongatum*は全北区、東洋区、エチオピア区と広範囲に分布している系統で、*P. rouxi*は石垣島のサンプルからも検出されている。*P. tacyi*は埼玉県のルリビタキで最初に報告された系統で、地理的分布の詳細は不明である。これら3系統以外の7系統は、いずれも1回の調査でしか検出されていないが、*P. juxtannucleare*は広範囲に分布する種類で石垣島や新潟県で採集された蚊からも検出されている。また、*P. gallinaceum*は本州のいくつかの地域で蚊から検出されている種類である。

本研究で検出された鳥マラリア原虫の系統ごとに、検出された蚊の種類を整理して表4に示した。毎年検出されている3つの系統について見てみると、*P. elongatum*は合計5つの陽性サンプルはすべてクシヒゲカの種類から得られている。*P. rouxi*は8個の陽性サンプルのうち4個が*Cx. murrelli*から毎年検出されており、カラツイエカとサキジロカクイカからそれぞれ1回だけ見つかっている。*P. tacyi*は3年つづけて検出されているが、検出され

た蚊の種類は調査によって異なり、合計 7 種類の蚊からそれぞれ 1 回検出されている（カラツイエカからは 2 回）。

D. 考察

台湾北東部と石垣島の地理的な位置関係から予想されるように、両地域の蚊相、鳥マラリア原虫感染蚊の種類および蚊から検出された鳥マラリア原虫の系統には、少数だが共通するものが含まれていた。それぞれの地域に飛来する渡り鳥の種類とその個体数には違いがあるはずであり、したがって感染した渡り鳥によって持ち込まれる鳥マラリア原虫の系統にも地域による明らかな違いがあると推測される。さらに、飛来した感染野鳥から吸血して鳥マラリア原虫を受け取る蚊の種類にも、地域による違いがあるので、これらの違いを反映してそれぞれの地域に固有の鳥マラリア原虫の感染サイクルが形成されているように思われる。

本研究で台湾の調査地に感染サイクルが成立していると推測されるのは、毎年継続的に検出されている *Pelongatum*, *Prouxi* さらに *Ptacy7* の 3 系統である。前者の 2 系統は主要な媒介蚊種も決まっており、*Pelongatum* はクシヒゲカ的一种、*Prouxi* は *Cx. murrelli* によって伝播されている可能性が高い。これに対して、*Ptacy7* は毎年検出されているのだが、検出される蚊の種類はばらばらで、7 種類もの蚊から検出されている。このように、多数の媒介蚊種が鳥マラリア原虫の感染サイクルに関与している事例はこれまで報告がないことから、非常に興味深い。

3 年間 6 回の調査で 1 回しか検出されていない系統も、別の意味で重要である。それぞれの系統が 5 月と 9-10 月のどちらで検出されているかを調べてみると、5 月に検出されているものが 4 系統、9-10 月に検出されているものが 3 系統とほぼ半々に分かれている。これら 2 組の系統は、恐らく 5 月に飛来する鳥を宿主とする系統と 9-10 月に飛来する鳥を宿主とする系統を意味していると考えられる。つまり、これらの系統はそれに感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生

息していた蚊の吸血を通じて一時的に取り込まれた系統であると推測される。このような系統が蚊から検出されるという本研究の調査結果は、渡り鳥による病原体の持ち込みが実際に行われていることを示唆しており、病原体の渡り鳥による拡散を支持する重要な結果であるといえる。

E. 結論

台湾と北部の調査地で 2011 年～2013 年に、20 種類 13,373 個体、石垣島南部で 24 種類 7,499 個体の蚊成虫を採集した。これらの蚊サンプルから、チトクローム b 遺伝子をターゲットとした PCR 法によって鳥マラリア原虫の検出を行った。台湾で採集された 20 種の蚊のうち、9 種類から鳥マラリア原虫が検出された。検出された鳥マラリア原虫は、チトクローム b 遺伝子の塩基配列の相同性によって 9 つの遺伝的系統に分類された。このうち 3 つの系統は 3 年連続して採集蚊から鳥マラリア原虫が検出されており、調査地に生息するクシヒゲカ的一种と *Cx. murrelli* などの蚊によって感染サイクルが維持されていると推測された。これに対して、これら 3 系統以外の系統は、3 年間の調査で 1 回しか検出されておらず、感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生息していた蚊によって一時的に取り込まれた系統であると推測された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 台湾北東部宜蘭県および石垣島の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査結果 (2011 年 ~ 2013 年のまとめ)

Species	Taiwan			Ishigakijima	
	2011	2012	2013	2011	2012
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	565	5223	2755	1081	884
<i>Cx. murrelli</i>	151	325	351		
<i>Ma. uniformis</i>	38	305	26	246	278
<i>Ae. albopictus</i>	217	49	269	332	71
<i>Ar. subalbatus</i>	23	210	171	32	18
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	90	129	95	27	359
<i>Cq. crassipes</i>	27	182	144	150	204
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	161	27	31	239	327
<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	28	100	49		
<i>Cx. sitiens</i>	69	38	874	474	563
<i>Cx. vishnui gr</i>	1	13	557	1016	202
<i>Cx. pseudovishnui</i>	2	10		747	132
<i>Cx. nigropunctatus</i>		9	8	11	5
<i>Cx. malayi</i>			23		
<i>Lt. fuscans</i>	5		3		
<i>Cx. rubithoracis</i>		5	6		
<i>Cx. sinensis</i>		3			
<i>Tr. bambusa</i>		2			
<i>Culex sp</i>	2				
<i>Ur. novobscura</i>	1	1			1
<i>Cx. cinctellus</i>					50
<i>Ae. riversi</i>				13	7
<i>Or. anopheloides</i>				5	2
<i>An. yaeyamaensis</i>				6	
<i>Ve. iriomoptensis</i>				6	
<i>Ae. vexans nipponii</i>				3	2
<i>An. sinensis</i>				1	
<i>Ur yaeyamana</i>				1	
<i>An lesteri</i>					1
<i>Cx. fuscocephala</i>					1
<i>Aedes sp</i>				1	
<i>Uranotaenia sp</i>					1
Total collected	1380	6631	5362	4391	3108
Total number of species	15	17	15	19	19

表2 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地で採集された蚊の
鳥マラリア原虫の感染率

Species	No. examined	No. pool	positives	%	MIR/1000
<i>Cx. sitiens</i>	952	96	8	8.3	8.4
<i>Cx. murrelli</i>	839	86	7	8.1	8.3
<i>Ae. albopictus</i>	442	47	0	0	0
<i>Ma. uniformis</i>	368	41	1	2.4	2.7
<i>Ar. subalbatus</i>	354	39	1	2.6	2.8
<i>Cq. crassipes</i>	342	36	2	5.6	5.8
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	314	33	8	24.22	25.5
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	221	24	1	4.2	4.5
<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	137	17	6	35.3	43.8
<i>Cx. malayi</i>	23	3	0	0	0
<i>Ur. novobscura</i>	2	2	0	0	0
<i>Cx. rubithoracis</i>	11	2	0	0	0
<i>Lt. fuscans</i>	5	2	1	50.0	200
<i>Cx. nigropunctatus</i>	8	2	0	0	0
<i>Tr. bambusa</i>	1	1	0	0	0
<i>Cx. pseudovishnui</i>	4	1	0	0	0
Total	4023	432	35	8.1	8.7

表3 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地における2011年～2013年の調査で採集された蚊からの
鳥マラリア原虫の検出結果

<i>Plasmodium</i> lineage	2011		2012		2013		Total
	May	Sep	May	Oct	May	Oct	
<i>P. tacy7</i>		1	1	1		8	11
<i>Plasmodium rouxi</i>		2	5		1		8
<i>Plasmodium elongatum</i>	1		2		2		5
<i>Plasmodium juxtannucleare</i>						3	3
Yilan02	3						3
<i>Plasmodium gallinaceum</i>					2		2
Yilan01		1					1
Yilan03			1				1
Yilan04				1			1
<i>Plasmodium lutzi</i>					1		1
Total	4	4	9	2	6	11	36

Yilan01 = GQ141560 と DQ241525 と 97% 一致

Yilan02 = GWR06 と 99%一致

Yilan03 = EF380158 と 98%一致

Yilan04= DONANA02 と 99%一致

表 4 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地の蚊から検出された鳥マラリア原虫と蚊の種類の関係：2011年～2013年のまとめ

<i>Plasmodium</i> lineage	Mosquitoes	2011		2012		2013		Total
		May	Sep	May	Oct	May	Oct	
GRW6- <i>P. elongatum</i>	<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	1		2		2		5
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Cq. crassipes</i>					2		2
<i>P. juxtannucleare</i>	<i>Culex sitiens</i>						2	2
	<i>Lt. fuscans</i>						1	1
<i>P. lutzi</i>	<i>Cx. murrelli</i>					1		1
<i>P. rouxi</i>	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>			3				3
	<i>Cx. murrelli</i>		1	2		1		4
	<i>Lt. fuscans</i>		1					1
<i>P. tacyi</i>	<i>Ar. subalbatus</i>						1	1
	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>			1			1	2
	<i>Cx. murrelli</i>						1	1
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>				1			1
	<i>Cx. sitiens</i>						4	4
	<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>						1	1
Yilan01	<i>Cx. sitiens</i>		1					1
Yilan02	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	3						3
Yilan03	<i>Cx. murrelli</i>			1				1
Yilan04	<i>Ma. uniformis</i>				1			1
Total		4	4	9	2	6	11	36

Yilan01 = GQ141560 と DQ241525 と 97% 一致

Yilan02 = GWR06 と 99%一致

Yilan03 = EF380158 と 98%一致

Yilan04=DONANA02 と 99%一致

厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

（総合）研究報告書

アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行調査と病原性解析

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し、台湾 CDC と共同でアジアにおける *B. holmesii* の流行状況を調査した。百日咳疑い患者（日本 920 名、台湾 495 名）を対象に遺伝子検査を実施した結果 *B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名（0.3%）であった。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名（10.1%）、台湾が 90 名（18.2%）であり、日本の検査陽性率は台湾より低い値を示した。また、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質について解析を行った。その結果、高分子タンパク質は定着因子 BipA (*Bordetella* intermediated phase protein A) と同定され、血液由来株では 1 塩基欠失または負の転写調節により発現が抑制されていることが判明した。日本では調査を実施した 2012-13 年は百日咳の非流行期にあったことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。

研究協力者

鱒坂裕美、大塚菜緒（国立感染症研究所・細菌第二部）
藤戸亜紀、鍋島民、松本道明（高知県衛生研究所）
岡田賢司（国立病院機構福岡病院）
吉野修司、河野喜美子（宮崎県衛生環境研究所）
Shu-Man Yao, Chuen-Sheue Chiang（Taiwan CDC）
渡邊峰雄（北里大学大学院・感染制御科学府）

B. holmesii 感染者の呼吸器症状は百日咳菌と等しいことから、両菌を臨床症状から区別することは不可能である。そこで、本研究事業では *B. holmesii* に特異的な遺伝子検査法（LAMP 法）を開発し、台湾 CDC と共同して遺伝子検査を用いた病原体サーベイランスを行った。さらに、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、本菌の呼吸器と血液由来株のタンパク発現を比較解析した。

A. 研究目的

Bordetella holmesii は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫系に基礎疾患を持つ患者に感染し、敗血症・心内膜炎などの起原菌となる。近年では基礎疾患を持たない青年・成人に感染し、百日咳と同様な呼吸器症状を引き起こすことが報告されている。これまで *B. holmesii* の症例報告は主に米国に限られていたが、わが国でも 2009 年に初の成人感染例が確認された。2010~11 年には百日咳地域流行で 6 名の感染者が認められ、2011 年には気管支炎を発症した幼児の *B. holmesii* 感染症例も確認された。これらの感染症例は *B. holmesii* がすでにアジア地域に広がっていることを示唆するが、本菌の病原体サーベイランスが実施されていないためその実態は明らかとなっていない。

B. 研究方法

B. holmesii-LAMP: Primer Explorer V4 ソフトウェアを用いて *B. holmesii* の *recA* 遺伝子(216~425 bp, GenBank, AF399661)に対し 5 種類の LAMP プライマーを設計した。LAMP 反応は Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学）を用い、25 μ l の反応系に 12.5 μ l の reaction mixture, 1 μ l の *Bst* DNA polymerase, 40 pmol の BH-FIP と BH-BIP プライマー, 5 pmol の BH-F3 と BH-B3 プライマー, 20 pmol の BH-LB プライマーを添加した。DNA 検体(4 μ l)は 95 °C で 5 分間加熱し、急冷後添加した。増幅反応は 67 °C で 1 時間行い、吸光度 650 nm の増加を濁度計 LA-320C（栄研化学）により測定した。
検査体制：百日咳様患者の鼻腔スワブを検査材料とした。遺伝子検査は *B. holmesii*-LAMP またはリアルタイム

ム PCR により実施し、TaqMan プローブは既報 (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010) のものを一部改変して使用した。福岡県の患者検体は国立感染症研究所・細菌第二部、高知県の検体は高知県衛生研究所、台湾の検体は台湾 CDC において検査を行った。百日咳菌の遺伝子検査は LAMP 法またはリアルタイム PCR 法により行った。なお、高知県衛生研究所では百日咳強化サーベイランス事業の一環として遺伝子検査が実施された。

解析菌株：*B. holmesii* 患者の呼吸器から分離された 2 株 (BH2, BH6) と呼吸器以外から分離された 2 株 (BH7, BH ATCC51541) を供試した。BH7 株は心外膜炎患者の心嚢液 (Nei et al., J Clin Microbiol, 2012), BH ATCC51541 株は敗血症患者の血液から分離された菌株であり、両株を血液由来株とした。菌株は BG 培地で培養し、菌体の全タンパク質を 10-20% SDS-PAGE に供試した。

細菌学的解析：血液由来株に特異的に認められた高分子タンパク質は質量分析により同定した。タンパク質の発現はイムノプロット法により解析し、一次抗体には BH2 株の全菌体に対するマウス抗血清 (抗 wBH2) およびマウス BipA 抗血清 (R1, R3) を用いた。*bipA* 遺伝子のシーケンス解析は非翻訳領域を含めた 4.8 kb について実施し、*bipA* mRNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は百日咳診断を目的に国立感染症研究所・細菌第二部に搬入されたものを供試した。患者検体は医療機関において連結可能匿名化され、患者個人が特定出来ないよう配慮した。

C. 結果

B. holmesii-LAMP：*B. holmesii* 臨床分離株の DNA を用いて LAMP 検出系の感度を検討したところ、検出限界は 50 fg DNA/tube と判断された。次に *Bordetella* 族細菌 6 菌種 21 株を用いて本法の特異性を評価したところ、*B. holmesii* 以外の *Bordetella* 族細菌は 1 ng/tube という高濃度でも検出されず、本法は *B. holmesii* に高い感度と特異性を示した。

患者 DNA 検体を用いて本法の臨床感度を評価したところ、既報のリアルタイム PCR 法で陽性となった 6

患者検体はすべて陽性と判定された。同様にリアルタイム PCR 法で陰性となった 82 検体はすべて陰性と判定され、その一致度は 100% を示した。

病原体サーベイランス：百日咳様患者 (日本 920 名、台湾 495 名) について遺伝子検査を実施した結果、*B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名 (0.3%) であった (表 1)。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名 (10.1%)、台湾が 90 名 (18.2%) であり、日本の陽性率は台湾より低い値を示した。

病原性解析：*B. holmesii* の呼吸器由来株と血液由来株を比較した結果、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 (2 本の蛋白バンド) を認めた (図 1)。この高分子タンパク質は抗 wBH2 抗体に強く交差するとともに、抗 BipA 抗体にも強く交差した。この蛋白質を質量分析に供試したところ、2 本の蛋白バンドともに *Bordetella intermediated protein A* (BipA) と同定された。なお、血液由来の BH7 株では低分子の位置に 2 本のバンドが確認され、この低分子タンパク質を truncated BipA と命名した。

血液由来株において BipA 発現が認められなかった原因を考察するため、*bipA* 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果、truncated BipA が認められた BH7 株では *bipA* 遺伝子に 1 塩基欠失 (c.1961delG) が確認された。この遺伝子欠失は終止コドンを新たに形成し、不完全長の truncated BipA を産生することが示された。なお、血液由来株 BH ATCC51541 に遺伝子変異が確認されなかったことから、*bipA* 転写量について検討を加えた。その結果、BH ATCC51541 では *bipA* mRNA がほとんど検出されず、負の転写調節を受けていることが判明した。

D. 考察

過去に米国とカナダで実施された大規模調査では百日咳様患者の 0.1~0.3% に *B. holmesii* が検出され、本菌が百日咳の起因菌となることが示された。また、フランスの調査では百日咳と診断された青年患者の 20% に *B. holmesii* 遺伝子が検出されている。これらの病原体サーベイランスは近年 *B. holmesii* 感染が世界的に広がるとともに、百日咳菌と *B. holmesii* の鑑別の必要性を指摘する。本研究で開発した *B. holmesii*-LAMP は操作が

簡便であることから、*B. holmesii* の病原体サーベイランスに有用な手段となると期待された。

本研究事業では百日咳様患者(日本 920 名,台湾 495 名)を対象に遺伝子検査を実施し,台湾で 1 名の *B. holmesii* 陽性者を確認したが,日本では陽性者を確認できなかった。台湾における感染者は小学生であり,本菌の感染者が乳幼児よりも 10 歳代に多いという報告に一致した。日本では 2012 年の百日咳菌の検査陽性率は 13.1%(64/487)であったが,2013 年には 6.7%(29/433)と減少した。わが国では 2008~10 年に大規模な百日咳流行が発生し,調査開始の 2012 年以降は百日咳の非流行年であったと考えられる。米国では *B. holmesii* の菌血症患者は 2010~11 年の百日咳流行時に増加したことから(Tartof et al., Clin Infect Dis, 2014), *B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。百日咳菌の流行周期は約 4 年であることから, *B. holmesii* については今後も継続的な病原体サーベイランスが必要である。

米国では百日咳流行時に *B. holmesii* による菌血症患者が増加したが,本菌の血流感染と呼吸器感染の関係は不明である。本研究では呼吸器由来株と血液由来株を比較し,呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 BipA を同定した。菌体の表層タンパク質である BipA は高い抗原性を持つこと,さらに気管支敗血症菌の BipA は BcfA (*Bordetella* colonization factor A) と共同して菌の定着に働くことが知られている。そのため, BipA が呼吸器感染症例の増加に関与する可能性は高く,今後 BipA に焦点を当てた研究が必要となる。また,百日咳流行時に *B. holmesii* が流行する可能性は否定出来ないため, BipA の高い抗原性を利用したワクチン開発も重要な検討課題となる。

E. 結論

百日咳類縁菌 *B. holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し,台湾 CDC と共同で病原体サーベイランスを実施した。本菌が百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆されるとともに,近年の呼吸器症例の増加に定着因子 BipA の関与が指摘された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K. Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection. J Infect Chemther, 2013; 19: 534-7.
2. Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay. Microbiol Immunol, 2012; 56:486-9.
3. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012; 7(2): e31985.
4. Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, 2012; 18: 272-5.

2. 学会発表

1. *Bordetella holmesii* に対する無細胞ワクチンの開発. 山口哲矢, 鈴木英里, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰雄. 第 87 回日本細菌学会総会, 平成 26 年 3 月, 東京.
2. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.
3. 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, 蒲地一成. *Bordetella holmesii* に対する新規ワクチンの開発. 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月, 幕張
4. 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, 蒲地一成. 国内で分離された *Bordetella holmesii* に対する DPT ワクチンの効果. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会, 平成 24 年 11 月, 横浜
5. 蒲地一成. 百日咳の実験室診断, 困難な青年・成人患者の診断. 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会

合同地方会，平成 23 年 10 月，山形。

6. 大塚菜緒，吉野修司，豊泉(鰺坂)裕美，大平文人，蒲地一成 . 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発 . 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会，平成 23 年 10 月，山形 .
7. 大塚菜緒，吉野修司，河野喜美子，豊泉(鰺坂)裕美，柴山恵吾，蒲地一成 . LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発 . 第 94 回日本細菌学会関東支部総会，平成 23 年 10 月，東京 .

G . 知的所有権の出願・登録状況

1 . 特許取得 :

1. 百日咳の血清診断法 (特願 2013-77138 , 平成 25 年 4 月出願)
2. LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット . 特許第 4806749 号 .
- 2 . 実用新案登録 : なし
- 3 . その他 : なし

表 1 . 百日咳様患者における *Bordetella holmesii* と百日咳菌の検出状況

	調査年	検体数	<i>B. holmesii</i> 陽性数 (%)	百日咳菌陽性数 (%)
日本	2012-13	920	0	93 (10.1%)
台湾	2011-12	495	1 (0.3%)	90 (18.2%)

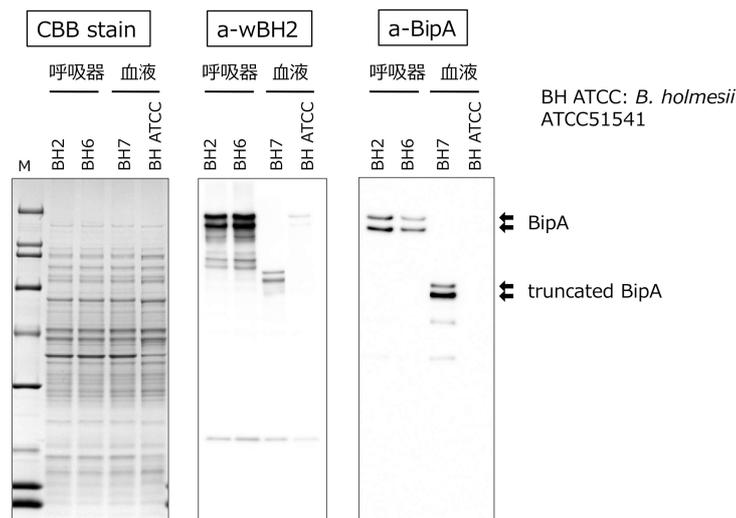


図 1 . *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に発現する高分子タンパク質

呼吸器由来株 (BH2 , BH6) と血液由来株 (BH7 , BH ATCC51541) から全タンパク質を抽出し , SDS-PAGE (10-20% gradient) により分離した。呼吸器由来株に認められる 2 種類の高分子タンパク質は BipA , 血液由来の BH7 株に認められる低分子タンパク質は不完全長の truncated BipA を示した

平成 23～25 年度 総合分担研究報告書

分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

研究分担者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

1990年代以降アジア地域で分離される *Vibrio cholerae* O1 は、全て El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 であったが、2000 年代中頃から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も分離されており、両者が現在の流行株であると考えられる。共に溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、それらの出現機序は明らかとなっていない。そこで本研究では *V. cholerae* O1 の流行株変遷について基盤情報を得るため、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 に着目し、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供されたゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの遺伝子配列の比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis による分子疫学解析を行った。さらには El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

Genetic variation and pathogenicity of *Vibrio cholerae* O1

Masatomo Morita, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

Novel variant of *Vibrio cholerae* has been emerging by continuing to mutate and it is thought that all pandemic strains of cholera is originated from Bay of Bengal. Therefore, a molecular epidemiological analysis of Indian *V. cholerae* isolates would provide important information, which allowing us to trace the evolutionary process of epidemic *V. cholerae*. Here, we performed sequence of CTX prophage and multilocus variable number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* strains from National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India to characterize the pandemic strain of cholera. Additionally, we validated the availability of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *Vibrio cholerae* to distinguish between past pandemic strains and current pandemic strains.

A. 研究目的

Vibrio cholerae は200以上の血清群に分類され、

自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす

原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在する。1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* O1 によるコレラの流行は世界中に広がり、現在の世界のコレラはすべて El Tor 型による。

しかしながら 1990 年代以降、アジア地域で分離されるほとんど全ての El Tor 型 *V. cholerae* O1 が、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (375 bp) の 115 番目と 203 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae* O1 (El Tor variant 型 *V. cholerae* O1) であることが明らかとなり、流行株の遷移が確認された。さらには、2010 年に起きたハイチにおけるコレラの流行を契機に上記 2 カ所の変異に加え、58 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae* O1 (Haitian variant 型 *V. cholerae* O1) が発見された。その後の研究により Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 は 2000 年代に出現したことが明らかとなり、現在アジア地域においては El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 の両者が分離されている。

新規コレラ流行株は溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、その出現には、自然環境中におけるファージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播が関与していると考えられる。自然形質転換では大規模な遺伝子変換が起きる可能性を考慮すると、新規流行株の出現機序の解明には、CTX ファージだけでなく全ゲノムを対象とした大規模な系統解析が必要である。一方でコレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑みると、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases, NICED) に保存されている *V. cholerae* 分離株の分

子疫学情報を蓄積することで、流行株の変遷について基盤情報を得ることができる。

そこで本研究ではコレラ流行株の進化系統を明らかにすることを目的とし、NICED より提供された El Tor variant 型 *V. cholerae* ゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) による分子疫学解析を行った。また現行の流行株の検出、型別法の構築を目指し、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型 (SNPs) の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

B. 研究方法

1. CTX ファージの遺伝子配列の比較解析

El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX ファージについて全塩基配列を決定した。*V. cholerae* は染色体が 2 つあるため、それぞれのファージ挿入位置に対して特異的なプライマーを設計した。増幅遺伝子をシーケンスし、classical 型 CTX ファージ及び El Tor 型 CTX ファージと配列を比較した。

2. MLVA による分子疫学解析

インドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 のゲノム DNA を NICED より提供してもらい、実験に用いた。PCR により *ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅が確認された試料について、7 遺伝子座を用いた MLVA を行い、Bionumerics ソフトウェアによる分子疫学解析を行った。

3. 流行株疫学マーカーの開発

NICED より提供された *V. cholerae* O1 のゲノム DNA のうち、*ctxB* 遺伝子の配列から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された株について、15 ヶ所の SNPs の配列を決定した (表)。

C. 研究結果

1. CTX フェージの遺伝子配列の比較解析

El Tor 型 CTX フェージと classical 型 CTX フェージには 97 ヶ所の 1 塩基多型が存在し、生物型特異的な CTX フェージが溶原化している。今回供試した El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 では両方の染色体に CTX フェージが溶原化していた。chromosome 1 上の CTX フェージはコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) のみ classical 型であった。また chromosome 2 上の CTX フェージでは *ctxB* 遺伝子が classical 型であったのに加えて、フェージの溶原サイクルに関与する RS2 領域 (*rstR*, *rstA*, *rstB* 遺伝子) では El Tor 型と classical 型が入り組んだ状態であった (図 1)。

2. MLVA による分子疫学解析

NICED 由来 29 株のクラスター解析の結果から、供試菌株は単一の MLVA 型を示さず、遺伝的多様性は比較的高いことが明らかとなった (図 2)。また当研究所に保存されている日本国内で分離されたアジア各国からの輸入事例に由来する *V. cholerae* 菌株を含めたクラスター解析をおこなったところ、NICED より提供された菌株を含むインド関連の菌株は遺伝的に多様性があるものの、他のアジア各国に関連する菌株とは異なるクラスターを形成した (図 3)。

3. 流行株疫学マーカーの開発

ctxB 遺伝子の配列から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された 1 株について、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の SNPs の配列を決定したところ、全ての遺伝子座において、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と同一の配列であった (表)。

D. 考察

V. cholerae は自然環境中において溶原性フェージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播に

より、病原性に関わる因子や環境中での生存に有利な因子のやりとりをしている。その過程において、新たなコレラ流行株が出現したことが考えられる。流行株の一株ではあるが、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX フェージの遺伝子構成がキメラ型であった。これはフェージの感染、溶原化では説明できない状態であり、キメラ型 CTX フェージの生成にも、自然形質転換の寄与が考えられる。この過程においては CTX フェージの構造遺伝子だけでなく、ゲノム DNA の大規模な組換えも起きている可能性が高い。つまりコレラ流行株の成り立ちについて知見を得るためには、ゲノム情報を元にした分子疫学解析が肝要である。今回は流行株として、インドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* を用いて、MLVA を実施した。しかしアジア地域におけるコレラの現状を把握し、流行株の変遷を明らかにするためには、以前の流行株である El Tor 型 *V. cholerae* O1、及び現在の流行株の一つである Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も同様に解析し、コレラ流行株の分子疫学情報を蓄積、データベース化する必要がある。そのためにも今後も継続して NICED から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の基盤情報の共有化を図りたい。

一方、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の SNPs の配列は Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と共通であったが、過去の流行株とは異なっていた。これらの SNPs を対象とした mismatch amplification mutation assay を構築し、流行地域におけるコレラ流行株の現状を把握し、新規コレラ流行株の発生監視に努めたい。

F. 健康危機情報

特に該当なし。

G. 研究発表

Morita, M., Yamamoto, Y., Arakawa, E., Alam, M.,

Ohnishi, M., Izumiya, H., Watanabe, H. Transfer of genes for type III secretion system in *Vibrio cholerae* via natural transformation. 46th U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Kolkata, India, Dec. 2011.

Morita, M., Yamamoto, S., Hiyoshi, H., Kodama, T., Okura, M., Arakawa, E., Alam, M., Ohnishi, M., Izumiya, H. and Watanabe, H. Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 57: 334-339.

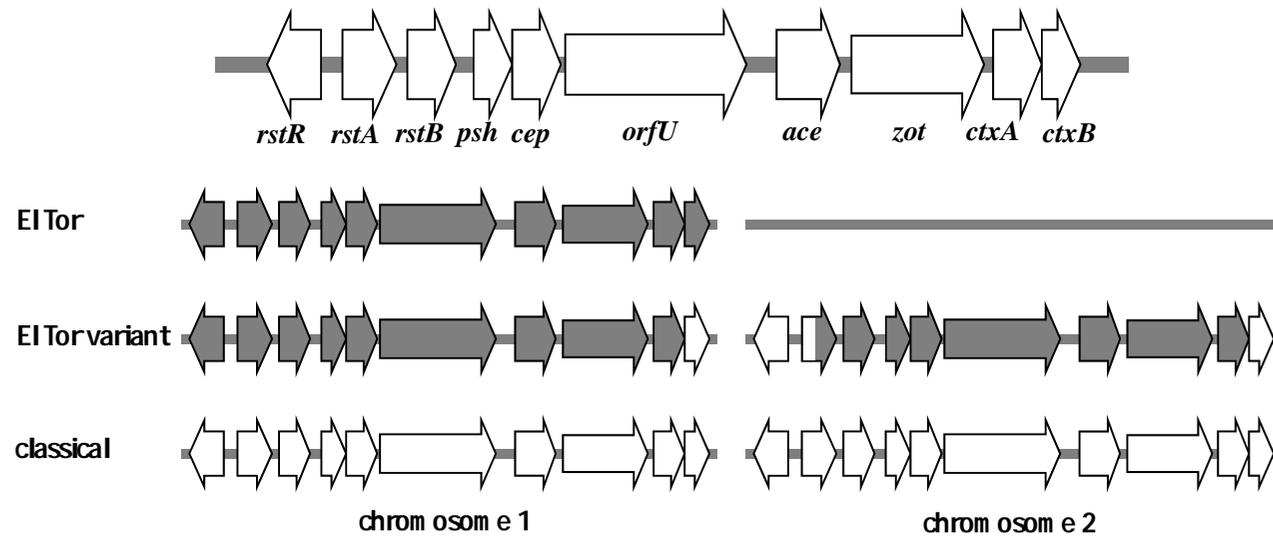


図1 CTX ファージの構造。El Tor variant 型 *V. cholerae* に溶原化している CTX ファージは El Tor 型と classical 型のキメラ型ファージであった。

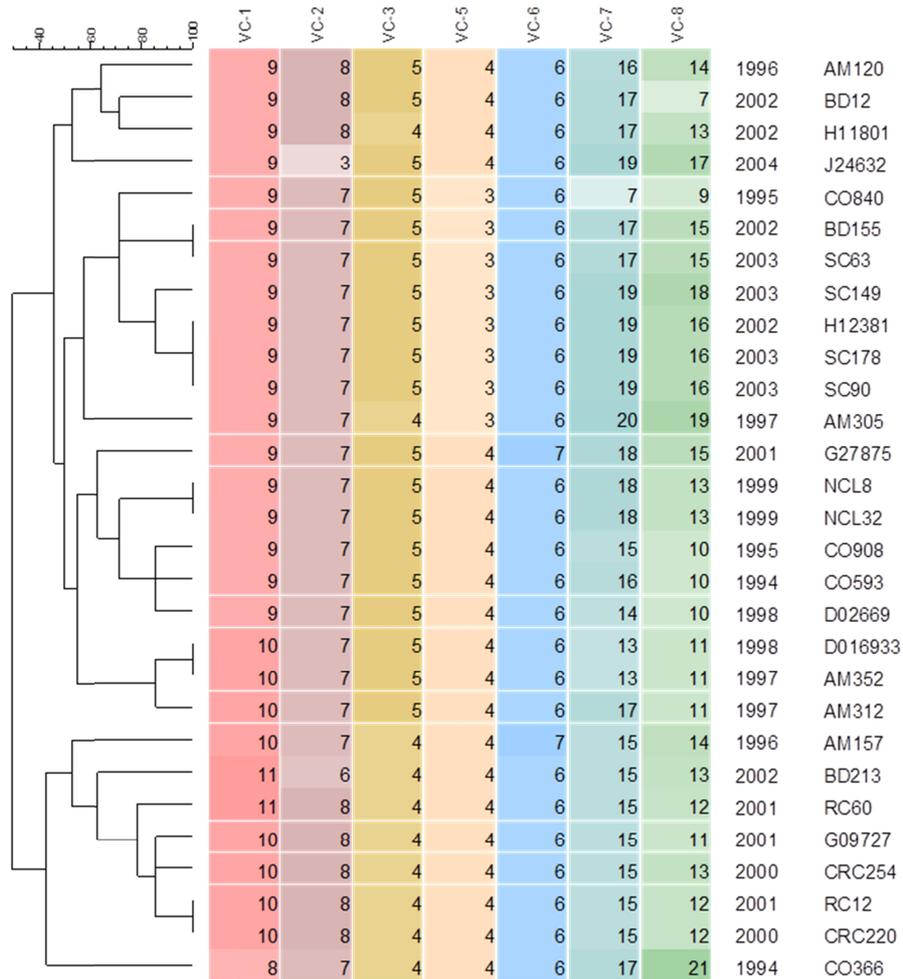


図2 Niced より提供された *V. cholerae* 29 菌株の MLVA クラスター解析。各遺伝子座 (VC-1、VC-2、VC-3、VC-5、VC-6、VC-7) のリピート数、分離年及び菌株名を示す。

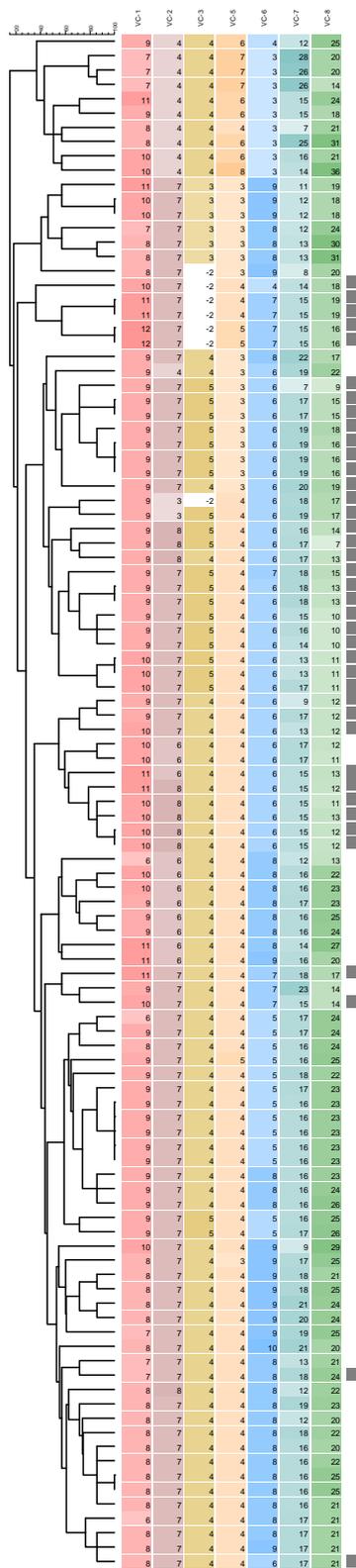


図3 アジア地域由来 *V.cholerae* の MLVA クラスタ解析。NICED より提供された菌株を含むインド由来の菌株を四角で示す。

表 SNPs の遺伝子座情報と配列比較

SNPs	Gene	El Tor	Classical	Elt-var.	Hai-var.
1	phosphoribosylamine--glycine ligase	g	g	A	A
2	arginine/ornithine antiporter	g	g	A	A
3	DNA mismatch repair protein	t	t	C	C
4	nitroreductase A	c	c	T	T
5	preprotein translocase subunit YajC	g	g	T	T
6	outer membrane protein OmpV	a	a	T	T
7	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	c	c	A	A
8	ribonuclease E	t	t	C	C
9	ferrous iron transport protein B	c	c	T	T
10	flagellar capping protein	t	t	C	C
11	2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	c	c	T	T
12	cholera toxin secretion protein EpsM	g	g	A	A
13	dihydropteridine reductase	g	g	A	A
14	Chitodextrinase	g	g	A	A
15	methyl-accepting chemotaxis protein	g	g	A	A

平成23-25年度 総合分担研究報告書

分担課題名：汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究

研究事業名：「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」(H23-新興-指定-020)

分担研究者：三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部

協力研究者：小泉信夫、志牟田健 国立感染症研究所・細菌第一部

Ritam Sinha, Hemanta Koley インド国立コレラ腸管感染症研究所・細菌部

研究要旨：

毒素蛋白を免疫源としたトキシイドを除いて、多様な血清型で構成される病原菌群に共通に効果を示すワクチンは実用化されていない。分担者は基礎的な研究から、赤痢菌群に共通する病原蛋白の発現が増加する一方、ストレス応答の低下により病原性が低下する変異体を分離した。これが血清型を超えた防御効果を示すユニバーサル・ワクチンとして利用できないか調べるため、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を活用し、モルモットの腸管感染モデルを初めて開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を行った。*S. flexneri* で作製したワクチン候補株は、病原性が高度に減少する一方、血清型が異なる強毒株である志賀菌(*S. dysenteriae* type 1)並びに現在の流行株である *S. sonnei* に対し明確な防御効果が認められた。

A. 研究目的

細菌性赤痢は東南アジアを中心に年間9千万人近くが罹患し、小児を中心に約40万人が犠牲になっていると推定されている。赤痢に対して、種々のワクチン候補が開発され、トライアルが行なわれている。これらのワクチン株は赤痢菌に代謝系の変異を導入して弱毒化したものか、赤痢菌の病原遺伝子を欠損させ弱毒化したものである。一般的な細菌に対するワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として抗原性の高い血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤

痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている機構が考えられる。ワクチン開発という側面から赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は重要であり、分担者は細菌のRNA結合蛋白として知られているHfqが赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でもその発現が起こることが分かった。また、通常TTSSが発現する高温(37℃)ではその発現が増大することで、HeLa細胞に対する侵入性が野生型の5~30倍以上に増加することが示された[2]。

一方、Hfqは細菌のストレス応答に関わる遺

伝子群の転写因子である *rpoS* や *rpoE* というシグマ因子の発現に必須であり、赤痢菌以外の病原細菌であるサルモネラ、コレラ、レジオネラの *hfg* 欠損株では動物に対する病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfg* 欠損株も同様に動物実験における病原性が低下していた[2]。逆にワクチンとしての利用を考えるならば、病原蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している *hfg* 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。

分担者はこれまで、*S. flexneri* 血清型 2a の *hfg* 欠損株を用いて *S. sonnei* に対するワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価し有意な防御能を認めた。一方、感染の場が腸管である赤痢菌に対して眼球の感染で評価することは困難であった。赤痢菌はこれまで、腸管感染の動物実験系が確立していなかったが、近年、胃酸を抑制し、盲腸を結索することでモルモット腸管でも赤痢を発症させることができる[3]。当研究ではこの方法を開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所(NICED)のDr. Koleyらと共同で実験を行い、*S. sonnei* のみならず、志賀毒素遺伝子を持ち毒性が強い志賀菌(*S. dysenteriae* Type 1, 以下 *Sd1* と表記)に対する効果を調べた。

B. 研究方法

ワクチン候補株とコントロールの野生型株 2457T は、細菌第一部よりインド国立コレラ腸管感染症研究所(NICED)に分与した。実験に先立って、NICEDの実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認された。実験はNICEDの動物実験

施設のP2A区画で飼育、感染実験を行った。

実験(1): 3群計18匹の6週齢モルモットに、ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a の *hfg* 欠損変異株(6頭)、コントロールとして *S. flexneri* 2a の野生型(6頭)、およびPBS(6頭)を二週間隔で 1×10^9 個を計4回、鎮静下で左眼球に投与した(図1)。4週目、鎮静下で右眼球に *Sd1* 株 1×10^9 個を計2回、投与したのち、6日間症状を観察した。さらに全身的な免疫誘導を調べるため、*Sd1* 投与の2週間後、同じ個体に、開腹下で結腸に *S. sonnei* 株 1×10^9 個を、投与したのち、閉腹し48時間症状を観察した(図1)。

実験(2): 経口免疫系の再実験として3群計18匹の6週齢モルモットに、ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a の *hfg* 欠損変異株を 1×10^7 個(6頭)、コントロールとして *S. flexneri* 2a の野生型 1×10^6 個(6頭)、およびPBS(6頭)を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図1)。免疫終了後、開腹下で結腸に *Sd1* 株 1×10^9 個を投与したのち、閉腹し48時間症状を観察した。

C. 研究結果

平成23年度からNICEDで予備実験を開始したが、ワクチン効果が一定の頻度でばらついていることが判明した。そこで急遽平成24年度初頭に渡印し、ワクチン株の検査を行った。

現地で保存されていたワクチン株は保存が悪く、LBプレート上でコロニーを生育させると小型のS型のコロニーがほとんど出現せず大多数が大型のR型のコロニーを形成した。R型からは、赤痢の病原性プラスミドに存在する *ipaB*, *virF*, *invE* 遺伝子群のPCRが陰性であり、保存中に病原性プラスミドが脱落しており、最終的にストック株から正しいワクチン

株を分離するのは不可能であった。

以上のことより感染研よりワクチン株を再分与し、それをを用いた免疫後の感染実験に立ち会うスケジュール(図1)で免疫してもらい、平成24年11月末に再度渡印し、ワクチン効果を判定した。

* * *

実験(1)：全身的な免疫誘導を確認し志賀菌(*Sd1*)に対する効果を判定するため、眼球へのワクチネーションと*Sd1*によるチャレンジを再度行った。これまでの予備実験から眼球へのワクチネーションは動物個体に強い免疫を与えることが明らかであり、左眼球に2週間おきに2回ワクチネーションを行い、4週後、右眼球に*Sd1*をチャレンジした。

野性型菌投与群は初回免疫後に全てが角結膜炎を発症した。予想外に、6頭のうち1頭は全身に感染が拡大し2週間後に死亡した。他の3頭は完全に回復し2回目の免疫時の症状は軽微であった。残り2頭は4週間後のチャレンジまで左目の症状が持続した。

ワクチン投与群も角結膜炎を発症したが、野性型と比較して症状は非常に軽微であり、6頭全てで角膜炎の形成と膿汁を含む流涙は認められず、2回目の免疫時には症状は認められなかった。死亡例1頭を含む免疫群計12頭の観察では左目から右目への感染の拡大は見られなかった。

分担者も参加した防御効果判定は免疫した眼球と反対側の右目に*Sd1*の感染を行った。PBS投与群は3日以内に6頭すべてが角結膜炎を発症した。野性型投与群は残った5頭中2頭に軽微な結膜炎が認められた。左目に角結膜炎が持続している2頭を含む残り3頭には肉眼的な症状は認められなかった。ワクチン投与群は6日間に及ぶ観察期間中、6頭全

てに肉眼的な症状は認められなかった(図2)。

さらに*Sd1*の感染の2週間後、全身的な免疫誘導を調べるため、同じ個体に、開腹下で結腸に*S. sonnei*株 1×10^9 個を接種したのち、閉腹し48時間症状を観察した。

PBS投与群は6頭すべてが血性下痢を発症し48時間以内に死亡した。ワクチン投与群は6頭中2頭(33%)が水様性下痢を発症したが、血性下痢と比較して症状は非常に軽微であり、死亡例はなかった。野生型投与群も同様に5頭中2頭(40%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表1)。

実験(2)：これまで行った予備実験では野生型菌を用いたコントロール群に 1×10^7 個の野生型菌を経口投与したところ、全頭が赤痢症状で死亡したためオーバードーズと考えられた。今年度に行った再実験では野生型株は10%に減量し 1×10^6 個の投与とし、ワクチン候補株はこれまで通り 1×10^7 個を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図3)。

Hfq変異による弱毒化は初回免疫時のバイタルサインに明確に現れた。今回は野生型投与群に死亡例は無かったが炎症反応を伴う下痢が激しく、39.5 付近の体温上昇と10%近い体重の減少が観察された。対照的にワクチン投与群は野生型菌の10倍の菌量が投与されているにも関わらず実質的に無症状であった(図4)。

初回免疫後ワクチン株接種群は有意な症状を示さなかったが血清中のtotal IgGは4週目までに野生型投与群と同レベルまで誘導された。またワクチン投与群では液性免疫の誘導を示すインターフェロン が免疫期間にわたって増加しており、有効に免疫が誘導されている可能性が示唆された(図5)。

免疫終了後、開腹下で結腸に*Sd1*株 1×10^9 個を注入したのち、閉腹し48時間症状を観察した。PBS投与群は6頭すべてが血性下痢を発症し48時間以内に死亡した。ワクチン投与群は6頭中1頭(16%)が水様性下痢を発症したが、血性下痢と比較して症状は非常に軽微であり、死亡例はなかった。野生型投与群も同様に6頭中2頭(33%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表2)。

感染後3日間定量した便中の菌量はPBS投与群と比較して免疫群では1000倍以上少なく、期間を通じて減少傾向であった。大腸組織へのコロナイゼーションも免疫群が有意に少なく、その中でもワクチン投与群の菌量が少ない結果が得られた(図6)。

D. 考察

ワクチン株が保存中に変質したことに対しては、今後薬剤耐性マーカーを病原性プラスミドに挿入するなどの対策が必要だと考えられた。当座の対策として小型のS型コロニーから新たに多数のシードストックを作製し保存することにした。その結果平成24年度に新たに送付したワクチン株は、その後の実験では安定した効果を示した。

ワクチン効果の判定では、以前に感染研で行った両目に免疫した実験のように、免疫後に症状の持続している個体への介入的治療(テトラサイクリンの点眼)は行わなかった。その結果、野生型投与群では予想以上に症状が重く、1頭は全身的な感染に移行し死亡した。このように初回免疫の症状からも*hfq*変異株は病原性が減弱していることが示された。

今回は左目に免疫して*Sd1*を用いて右目で判定を行なうことで、血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対しても局所的ではないワクチン効果

があることが示された。さらに引き続き同一の個体群を用いて血清型が異なる*S. sonnei*の腸管感染実験で防御効果が示されたことから、ワクチン投与群と野生型投与群では全身的な液性免疫が誘導されていることが示された。

経口ワクチネーションの実験(2)でもワクチン効果の再現性と*hfq*変異による高度な病原性の減弱が認められた。初回免疫時の観察ではワクチン株は10倍量での免疫でも症状を起こさないこと、体温・体重の推移からも、明らかに*hfq*変異によって病原性が減弱していることが示された。また、今年度は血清中のサイトカインの測定を積極的に行い、血中IgGとIFN- γ の推移から免疫群、特にワクチン接種株で有効に免疫が獲得されていることが示された。

結果的に経口でのワクチネーションでも血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対しても同様なワクチン効果があることが示された。これらの結果から、このワクチンは少なくとも*Sd1*と*S. sonnei*に関して血清型の壁を超えた免疫を誘導するポテンシャルが高い可能性を示した。

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*の欠損変異株を用いて、モルモットで効果を判定した。過去に行われた角結膜炎モデルと同様に*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、全身的な免疫を誘導し血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対してワクチン効果が再現された。

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, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M, 2012 Dec.12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第86回日本細菌学会総会 2013年 3月 18-20日 幕張メッセ : Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system.

Mitobe J, Yamamoto S, and Yanagihara I 2013 June.4-8 3rd Conference on regulating

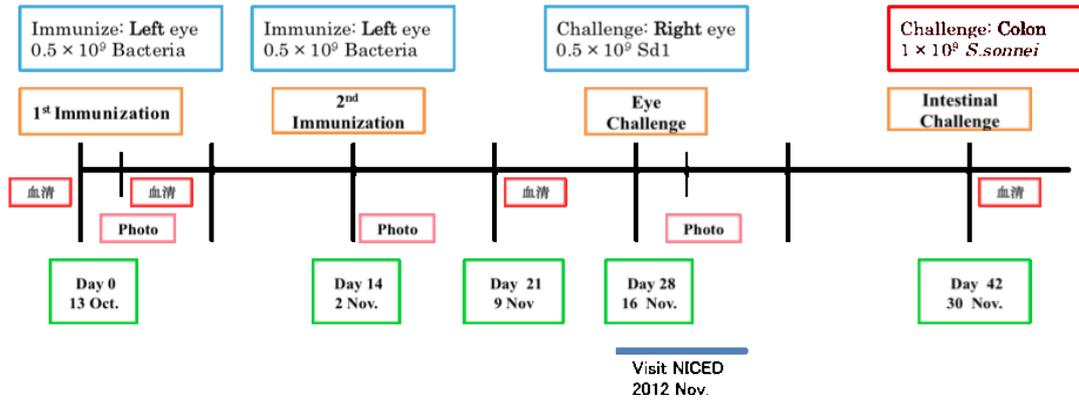
with RNA in bacteria. Wurzburg, Germany. : Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

< 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.

☒ 1

CONTROL 1 (PBS): 6 Animals
 CONTROL 2 BY *S. flexneri* 2a wild-type: 6 Animals → 1 dead.
 VACCINATION BY *S. flexneri* 2a Δhfq : 6 Animals



☒ 2

Effect of vaccination (Photo: 3 days after infection)

Control 1	Control 2	Vaccine
PBS Sd1	Wild-type <i>S. flexneri</i> Sd1	Δhfq , <i>S. flexneri</i> Sd1
		
6 / 6 +++	2 / 5 + 3 / 5 -	0 / 6 -

表 1

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	<i>S. sonnei</i>	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	<i>S. sonnei</i>	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	<i>S. sonnei</i>	5	40% (2/5)	0% (0/5)	0% (0/5)

图 3

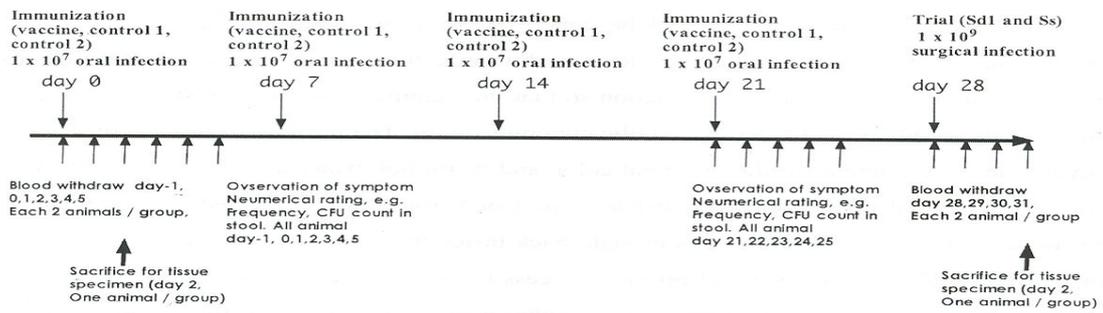
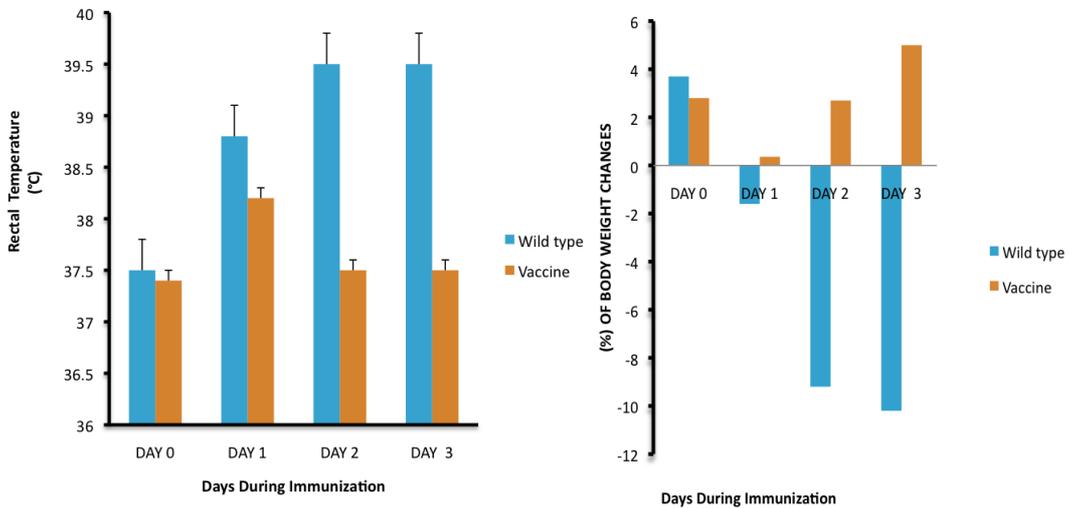


图 4



☒ 5

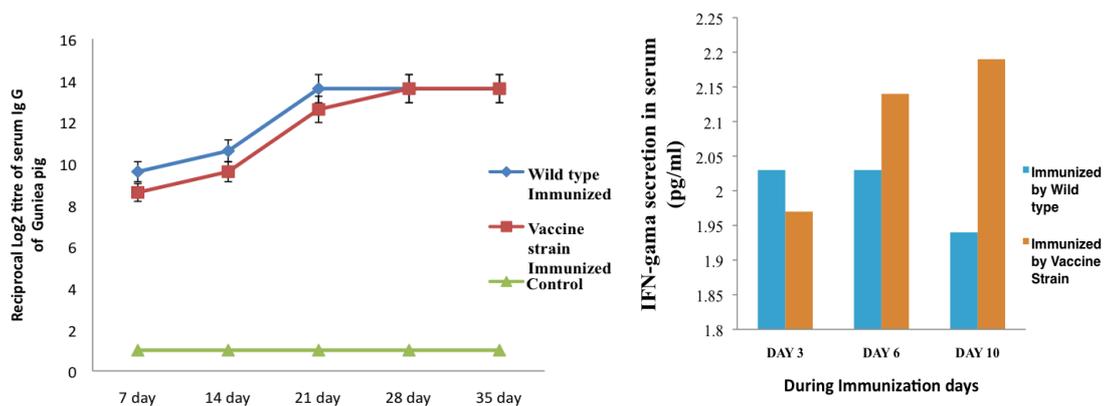
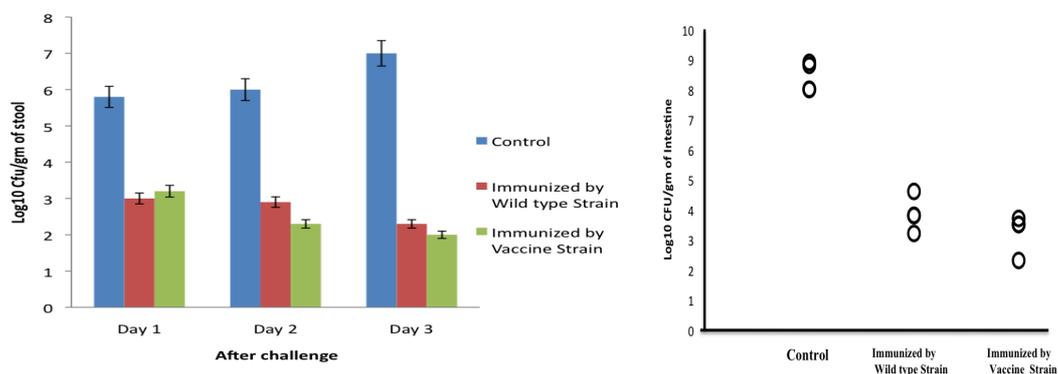


表 2

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	Sd1	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	Sd1	6	16% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	Sd1	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)

☒ 6



厚生科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業)
総合分担研究報告書(23-25 年度分)

腸管系寄生虫症の解析

分担研究者 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分子疫学、病原・寄生機構等の解明の研究を展開している。初年度はコルカタ、西ベンガル州におけるジアルジア症の感染実態を明らかにするために、疫学・分子疫学的情報を獲得した。本年度の研究成果により、ジアルジア症の感染浸淫度、季節消長、遺伝子多様性、動物由来感染症としての重要性などが明らかにされた。2年度は、ジアルジアからの感染ウイルスの特定を目指すために、西ベンガル州におけるジアルジア症の病原株の確立を目指すと共に、赤痢アメーバにおける抗酸化機構の分子機構を明らかにした。最終年度は分子疫学的手法を用いた赤痢アメーバ症の分子疫学調査を実施した。詳細な分子疫学手法に基づき、インド赤痢アメーバ分離株の解析を行い、成果を挙げた。

A . 研究目的

腸管感染症は世界の死亡の約 4% (216 万人) を占める重要な感染症である (WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める。腸管感染症のうち原虫症として重要なのは、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、マイクロスポリジウム症、イソスポーラ症などであり、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。

本研究では、インドコルカタにある Indian Council of Medical Research (ICMR) の感染症研究所のひとつである National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) 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にある。更に、人的交流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する。本研究では 3 年間に渡って、疫学調査、分子疫学解析、酸化ストレス応答解析といった複数の研究内容について研究を行った。

B . 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6 (Louis Buddy Diamond の分離による) の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. 検体

毎週無作為に抽出された 2 曜日に、NICED に近接する Infectious Disease Hospital (IDH) に、下痢で来院し入院した患者のうち、毎 5 人目の患者、合計 2421 人を対象とし、そのうち

Giardia lamblia 陽性者 253 人のうちの無作為抽出された 30%(58 名)を対象とした。更に、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30%(17 名)を抽出した。これらの計 75 の糞便を対象とした。以下の PCR による確認の他に、糞便中抗原を特異的 ELISA(TechLab, Blacksburg)により検出されたことを条件に、確定診断とした。

ウシの便はインド西ベンガル州の酪農場の 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された。更に、51 人の酪農場労働者からも糞便を採取した。下痢症状の有無は聴取しなかった。

赤痢アメーバの遺伝子型別解析に関しては、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。

3. 遺伝子型別解析

糞便からの核酸の抽出は Stool DNA mini kit (Qiagen)を用いた。PCR は Giardia lamblia の beta giardin, glutamate dehydrogenase, triose phosphate isomerase 遺伝子を標的とし、既報のオリゴヌクレオチドプライマーと条件を用いて行った(Khan 2011)。赤痢アメーバの型別解析に関しては Chitinase および tRNA-linked STR (tRNA に挟まれた短反復配列多型=short tandem repeats)の 3 種の座位 (DA-H, NK2-H, R-R)に関して nested PCR を行った。方法は Escueta-de Caz Parasitol Int 2010 に記述した。得られた PCR 産物を直接シーケンシングにより配列決定した。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。データの優位性は Student t test、ANOVA、Epi-Info 等にて検定した。

3. 配列・クラスター解析

(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。

4. メタボローム解析

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析法 (CE-ToFMS)により行った。方法の詳細は Husain J Biol Chem 2010 に詳述した。Anion, Cation モードでの計測で、約 90 の中間代謝産物を定量した。

5. 赤痢アメーバ過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1) 及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポフェクションを用い、常法に従った。

C . 研究結果

1. コルカタ地区におけるジアルジアの感染実態調査

コルカタにある感染研様研究所である NICED に併設された IDH に来院した下痢症患者から無作為抽出された計 2421 人の対象のうち、顕微鏡検査、抗原捕捉試験、糞便 PCR のいずれかで Giardia 陽性と判定されたのは 253 人であった。253 人のうち 195 人が有症者、58 人が無症候であった。その年齢内訳、並び年齢別の優位性、Odds Ratio(図 1)は以下の通りである。

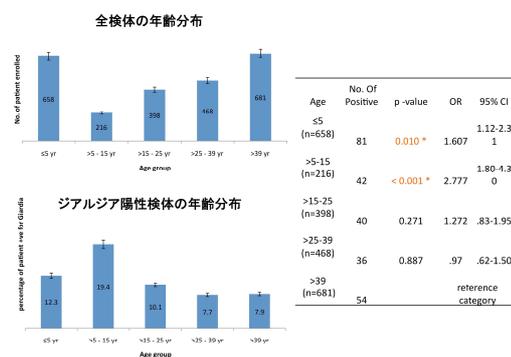


図 1 ジアルジア感染者の年齢分布と年齢別リスク

月毎の全体のモニター数、そのうち Giardia 陽性者数、陽性者の割合を集計した。6-10月の post-monsoon 期に感染数と感染率の上昇が見られた。

Giardia 感染者の 74% に他の細菌或いはウイルスとの混合感染が見られた(図 2)。



図 2 Giardia 感染における混合感染

2. コルカタ地区下痢症患者から分離された Giardia 株の遺伝子型別解析

Giardia 陽性者で有症者から無作為抽出された 30% (58 名)、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30% (17 名) を抽出し、遺伝子型別を行った(表 1)。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A 及び B が検出された。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A では AIII と AIV が、Assemblage B では BIII と BIV が、発見された。サンプルサイズのため特定の遺伝子型への偏りは優位であると証明されなかった。

有症例からの 59 株

	Assemblages					
	A		B		D	E
No. of Samples	21		35			
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV	--	--
No. of Samples	12	9	29	6	1	2

無症例からの 17 株

	Assemblages			
	A		B	
No. of Samples	6		11	
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV
No. of Samples	2	4	7	4

表 1 コルカタで分離された Giardia の遺伝子型別

3. 西ベンガル州の酪農場での家畜と人の感染実態調査

計 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された糞便のうち、全体で、7% (12/180) のウシに Giardia 感染が見られた。特に仔ウシに高い感染 (20/112, 18%) が見られた。検出された Assemblage は主に Assemblage E であったが、A も発見された。複数の Assemblage の同時感染も 3 例検出された。

一方酪農場の労働者でも高い感染が見られた (14/51, 27%)。Assemblage は A および、家畜からは発見されなかった B であった。E は発見されなかった。

4. 赤痢アメーバ分離株における Chitinase の多様性

51 種の臨床検体から 13 種類の遺伝子型が検出された。

Chitinase (CHI)
 ■ GAGAAGTCACCAGATTCTTCT ■ GAATCTAAACATGAATCTTCT
 ■ GAAATTAACCAGATTCTTCT ■ GAAGTTAAACCAGATTCTTCT

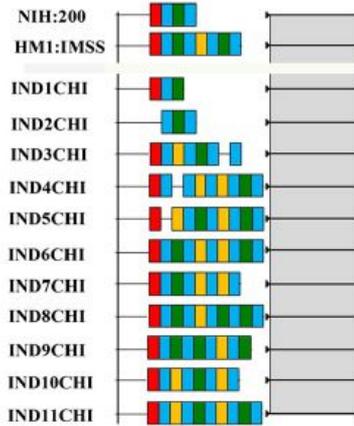


図3 Chitinase の繰り返し配列部分の多型を模式的に示した。NIH:200, HM1:IMSS は既報、IND1-11CHI は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

5. 赤痢アメーバ分離株における tRNA-STR の多型

D-A, R-R, NK2 遺伝子座の遺伝子配列を決定し、反復配列の近似性をもとに分類を行った。代表的な locus NK2 を例に図4に示す。

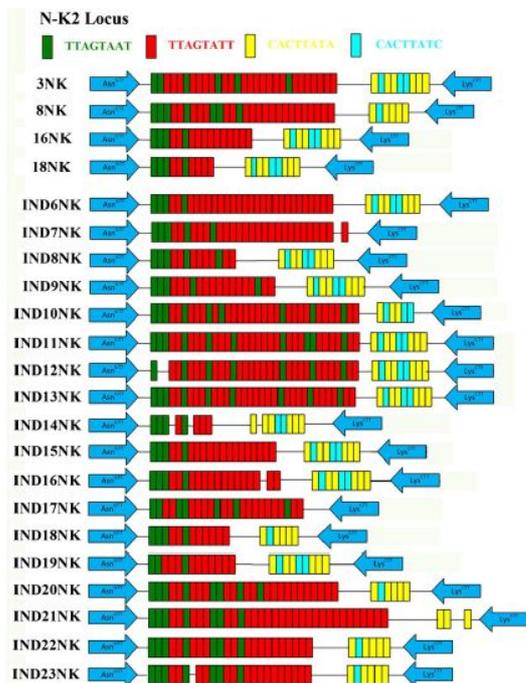


図4 tRNA-STR のNK2 locus の多型を模式的に示した。3NK, 8NK, 16NK, 18NK は既報、IND6-23NK は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

6. 遺伝子型と病型との相関

上記の4遺伝子座に関して、臨床症状(下痢・肝膿瘍・無症状)と遺伝子型との相関が有意に示されるものを抽出した(表3)。

Loci	Repeat pattern	Liver abscess (LA)	Diarrheal (D)	Asymptomatic (AS)
D-AH	6DA	Co-eff: 0.507 ^a p = 0.0026 ^b	Co-eff: -0.385 ^a p = 0.029 ^b	X ^c
	14DA	Co-eff: 0.403 ^a p = 0.0096 ^b	Co-eff: -0.684 ^a p = 0.000004 ^b	Co-eff: 0.281 ^a p = 0.0026 ^b
N-K2	18NK	Co-eff: -0.404 ^a p = 0.0116 ^b	Co-eff ^a : 0.532 p = 0.0008 ^b	X ^c
R-R	IND11RR	X ^c	Co-eff: -0.619 ^a p = 0.0004 ^b	Co-eff: 0.286 ^a p = 0.0082 ^b
Chitinase (CHI)	NIH:200	Co-eff: -0.429 ^a p = 0.0014 ^b	Co-eff: 0.577 ^a p = 0.00001 ^b	X ^c
	HM1:IMSS	X ^c	Co-eff: -0.456 ^a p = 0.0173 ^b	X ^c

表3 それぞれの遺伝子座(Loci)に関して特定の遺伝子型(Repeat pattern)が特定の病型と相関を示したものはp値を示した。相関係数がプラスなものは正の相関、マイナスなものは負の相関を示した。"X"は有意差が見られないもの。

7. 遺伝子型と病型のクラスター解析

系統解析を行い、それぞれの遺伝子座における遺伝型と病型をクラスター解析した。代表例(NK locus 及び DA-H locus)だけを示すが、肝膿瘍と無症候性とで共通のクラスターを形成する亜群が存在することが示された。

8. 赤痢アメーバにおける酸化ストレスによる細胞死と細胞内活性酸素種の産生

赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答をモニターした。パラコートや過酸化水素に対して感受性を示した。更に、1mMのパラコートによる処理により時間依存的に細胞内のROSが上昇することが示された。

9. 代謝産物のプロファイリング

パラコート、過酸化水素を加え、継続的に1, 3, 6, 12時間後の代謝産物を抽出し、CE-ToFMS解析により、全代謝産物を計測した。図5に示すように、パラコート及び過酸化水素の処理により様々な代謝物の増減が観察された。多くの変化はパラコートと過酸化水素に共通していたが、いずれかに選択的に観察された変化も見られた。

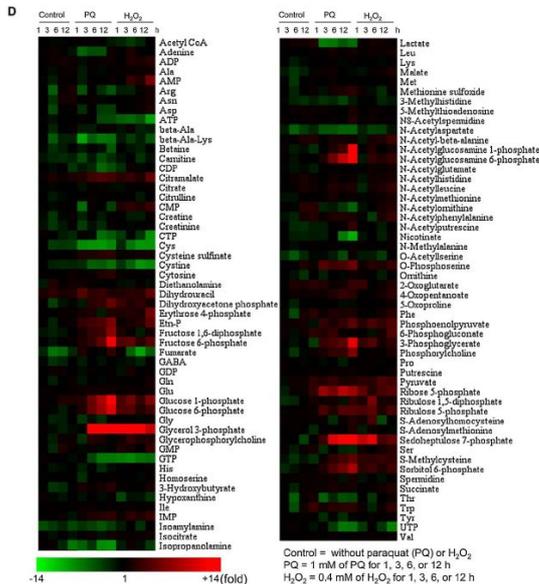


図5 計測された全代謝産物の経時変化(ヒートマップ: time 0を基準に減少を緑で増加を赤で示す) Control(無処理)、パラコート、過酸化水素処理でそれぞれ1, 3, 6, 12時間後の代謝産物の変化を示す

10. 赤痢アメーバの酸化ストレスによる中心炭素代謝、ヌクレオチドリン酸、エネルギー量への影響

図6に上記データのうち、中心代謝(解糖経路を中心として)を示した。パラコートで過酸化水素に比してより高度な変化が見られたが、増減の方向は多く近似していた。解糖経路の中間代謝物、特に上流の代謝物の多くは、酸化剤への暴露により、上昇した。更に Dihydroxyacetone phosphate

(DHAP)が高度に蓄積した。

N-acetylglucosamine 6-phosphateを始めとして中心代謝は多くキチンの生合成経路に redirect されていた。この傾向は特にパラコート処理により顕著で、酸化ストレスが細胞分化の誘因因子であることが示された。

更に Erythrose 4-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Ribose 5-phosphate などペントースリン酸経路への流入が増加していた。

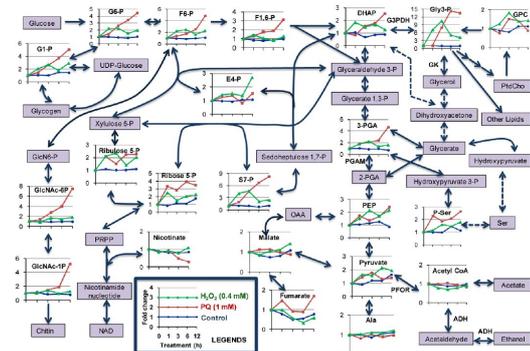


図6 酸化ストレス(赤, パラコート; 緑, 過酸化水素)による中心炭素代謝物の変化を示す

酸化ストレスのヌクレオチドリン酸への影響は、パラコートと過酸化水素で似ていたが、増減は過酸化水素により、より強く見られた。過酸化水素暴露では、特に ATP が増減し、ADP, AMP は時依存的に減少した。同時に Energy charge は過酸化水素処理により、40-50%減少し、細胞内でのエネルギーの枯渇が生じていることが確認された。

11. 酸化ストレスによる解糖経路及び発酵に関する酵素の活性、グリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度への影響

パラコートにより、解糖経路及び発酵(特にエタノール・酢酸発酵)に関する酵素の活性が影響されるか、検証した。特に、Phosphoglycerate mutase 及び Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase が強い活性阻害を受けた。パラコート暴露はエタノール量を約半分に減らした、一方、グリセロ

ールは14倍蓄積した。酢酸量は変化が見られなかった。

D. 考察及び結論

ジアルジア症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症は世界でも国内でも腸管原虫症の中で最も感染者が多く、注視すべき原虫感染症である。しかし、その病原機構・酸化ストレス耐性機構・細胞分化・遺伝子発現制御を始め不明な点が多い。更に、感染後発症を決定する因子・マーカーは特定されていない。従って、分子疫学的解析が極めて重要であり、本研究では東インドコルカタ周辺における腸管原虫症の感染実態を明らかにした。

ジアルジア症に関する重要な知見は第1に、約10%の人の下痢症例からジアルジアが発見され、下痢の主要な原因病原体であった。第2に多くの感染例が他の病原細菌・ウイルスとの混合感染であり、他の病原体の感染の発症や重症度などを修飾する可能性が示唆された。第3に、人の感染は主に15才以下の小児に検出され、小児の栄養不良・身体と知育の成長障害の要因となる可能性が確認された。第4に、酪農場のウシ並びに労働者から高い感染が確認され、コルカタ周辺地域でも動物由来感染症としての像が確認された。しかしながらウシから検出された遺伝子型と酪農場労働者から検出された遺伝子型とは大きな偏りがあり、酪農場でもAssemblage A及びBのヒト-ヒト感染が主要であると考えられた。

更に、赤痢アメーバに関する有意な成果を収めた。特にインドにおける臨床株の遺伝的多様性が初めて明らかにされた。インドにおける赤痢アメーバ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、極めて高い遺伝的多様性を示していた。更に、これまで未同定の多くの遺伝子型が発見された。このことは南ア

ジアにおいて特殊な種内分化・多様化が起こった可能性を示していた。

更に、赤痢アメーバのマーカー遺伝子座の特定の遺伝子型が病型と関連していることは画期的な発見であった。しかしながら、病型との関連の見られた遺伝子型をもつ検体数が少ないため、関連は注意深く今後更に症例数を増やして検討する必要がある。

ジアルジア・赤痢アメーバの病原機構・酸化ストレス耐性機構に関しても日印共同で研究を推進した。CE-ToFMSを用いた代謝産物の網羅的同定により2種類の酸化ストレスに暴露された赤痢アメーバ栄養型から約100の極性を有する代謝物の同定・定量が達成された。代謝物を抽出し、CE-ToFMSを用いて網羅的代謝プロファイリングを行った。これにより、極めて新規性の高い多くの発見をした。第一に、酸化ストレスにより解糖経路が停止し、その代謝フラックスがキチン合成、ペントースリン酸経路へ方向転換されることを発見した。同時に細胞内エネルギー量が減少し、総合すると、酸化ストレスにより、エネルギーを消費するとともに、新規エネルギー合成を解糖経路で行わなくなることが示された。第二に、酸化ストレスにより、グリセロール3リン酸を介したグリセロールの合成、同時にATPの合成が行われることが明らかとなった。これにより、解糖経路、エタノール発酵によるATP合成がグリセロール発酵によるATP発酵に転化されていることが明らかとなった。今後これらの代謝変化が、ジアルジア等他の嫌気的原虫でも見られるかを、同様の方法により、NICEDとの共同研究により確認することができれば、嫌気的腸管原虫全般における代謝の抗酸化ストレス応答を一般化・普遍化できると予想される。

以上、本研究はジアルジア症・赤痢アメーバ症に関して、疫学・分子疫学・酸化ストレス応答の機構解析など様々な分野で優れた成果を挙げるこ

とができた。本研究班により得られた成果を時期研究班で更に発展させることにより、NIID と Niced との原虫症のモニタリングと病原機構解明や代謝解析の基盤的プラットフォームの共有、共同研究の推進を果たしたい。

E . 健康危険情報

該当せず

F . 研究発表

1. 論文発表

- (i) Khan, S. M., Debnath, C., Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, S. (2011) Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 178, 342-345.
- (ii) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.
- (iii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.
- (iv) Das, K., Mukherjee, A. K., Chowdhury, P., Sehgal, R., Bhattacharya, M. K., Hashimoto, T., Nozaki, T., and Ganguly, S. Multilocus sequence typing system (MLST) reveals a significant association of *Entamoeba histolytica* genetic

patterns with disease outcome. *Parasitol Int*, 63, 308-314, 2014.

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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合分担研究報告書

エイズの流行とウイルス変異に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長
研究協力者 石川 晃一 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

研究要旨

HIV 感染症は世界三大感染症の一つであり、その克服は国際的重要課題である。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症制圧に向けた取組みにおいて重要である。各 HLA アレル頻度は人種間で大きく異なるため、世界各地域の流行 HIV 株の HLA 関連変異同定が必要である。そこで本研究では、アジアの HIV 感染流行地域の一つとして重要なインド国の国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) との共同研究で、HLA 関連 HIV 変異同定に向け、インド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定法を確立し、解析を開始した。解析結果では、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見出された。このうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異候補を HIV gag MA 遺伝子領域に見出した。

A. 研究目的

世界三大感染症の一つである HIV 感染症は、宿主免疫によるウイルス複製抑制が困難で慢性持続感染を呈し、エイズ発症に至る致死感染症である。その克服は国際的重要課題であり、HIV 変異の伝播状況の把握は、HIV 感染症制圧に向けた取組みにおいて重要な基盤情報となる。特に HIV ゲノム塩基配列の解析研究は以下のように進められてきた。

(1) 1980年代からの主にenv領域の解析に基づく多様性に関する研究：各種サブタイプが同定され、HIVの各地域への経時的な伝播についての知見が得られてきている。

(2) 1990年代後半の抗レトロウイルス薬治療導入以降の主にpol領域の解析に基づく薬剤耐性変異に関する研究：逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等の抗レトロウイルス薬に対する耐性変異の同定が進められてきた。

(3) 近年の主に gag 領域の解析に基づく HLA 関連

変異に関する研究：HIV 感染病態に最も影響の大きい宿主因子として知られているヒト白血球抗原 HLA (クラス I) の遺伝子型を各々の HIV 感染者について決定し、HIV ゲノム変異の解析結果とあわせて HLA 関連変異を同定するものである。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的抗原エピトープの提示に關与する HLA の遺伝子型の違いは、CTL 標的の違いに直結するので、HLA 関連変異の多くは CTL 逃避変異を反映するものとして、その解析研究が進められている。特に最近、Gag 抗原特異的 CTL の有効性が示唆されていることから、gag 領域の解析が先行している。

本研究は上記(3)の HLA 関連変異に着目するものである。CTL 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。近年、抗 HIV 薬投与により HIV 複製のコントロールが可能となったが、その複製抑制には CTL 反応が不可欠であるこ

とも知られている。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症対策において重要である。各 HLA アレルの頻度は人種間で大きく異なっているため、世界各地における流行 HIV 株の HLA 関連変異を同定することが必要であり、インドはアジアにおける HIV 感染流行地域の一つとして重要な対象地域である。そこで本研究では、インド国立コレラ腸管感染症研究所(NICODE) の Sekhar Chakrabarti 博士との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を進めることとした。NICED より十分な数の検体を得ることが困難であったため、HLA 遺伝子型解析で見出した比較的頻度の高い HLA-A アレルのうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異の同定を試みた。

B . 研究方法

インド国の HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出されたゲノム DNA を用い、HLA タイピング(遺伝子型決定) を行った。また、ベトナムの HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出された DNA を用い、HIV プロウイルスの gag MA 領域の塩基配列解析を行った。これらの結果をもとに統計学的手法を用いて HLA-A*11:01 関連変異同定を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いる研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、国立感染症研究所の倫理委員会の承認のもと推進した。また、インドおよびベトナムの共同研究者所属機関の倫理委員会の承認も得ている。

C . 研究結果

インド国の HIV 感染者 14 名の末梢血リンパ球より得られた DNA を用い、東京医科歯科大学難治疾患研究所の木村先生・成瀬先生の協力のもと HLA-A、HLA-B、HLA-C 遺伝子型を同定した(表 1)。HLA-A アレルでは、A*11:01/02、A*33:03、A*68:01、A*01:01、A*24:02、A*31:01 が 10% を超える頻度

で見出されたが、このうち、インドに関する既報(Immunogenetics 53:1009, 2002)およびベトナムに関する我々の以前の解析で共に 5% 以上の頻度で見出されたものは、A*11:01、A*33:03、A*24:02 であった。その中で A*11:01 に焦点を絞り、A*11:01 陽性者と陰性者における HIV gag MA 領域の塩基配列について統計学的解析に基づき、Gag の第 83 番目のアミノ酸置換を生ずる変異を、HLA-A*11:01 関連 HIV gag 変異候補として同定した。

D . 考察

本研究では、インド人の HLA 遺伝子型同定法を確立し、HIV 感染者検体を用いた解析で、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルを見出した。その中で、インドおよびベトナムの双方で共通して頻度の高い HLA-A アレルを見出し、そのうちの HLA-A*11:01 について関連ゲノム変異候補を、HIV gag MA 領域に同定した。このように HLA 関連 HIV ゲノム変異同定システムを構築できたことから、今後、各 HLA アレルに相関する HIV ゲノム変異情報を収集することが可能となった。

HIV 流行地域では、HIV 感染者集団における HLA 関連変異蓄積の可能性が示唆されている。HLA 関連変異の蓄積は、CTL による抑制がよりかかりにくい感染病態に結びつき、薬剤による治療効果に影響を及ぼす可能性も危惧される。したがって、本研究のようなアジア HIV 流行地域における HLA 関連変異情報の収集は、日本を含むアジア地域の HIV 感染症の制圧に貢献するものである。

E . 結論

インド NICED との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を行った。さらにインドおよびベトナムの双方で比較的頻度の高い HLA-A アレルを複数見出し、そのうちの HLA-A*11:01 関連変異候補を HIV gag MA 領域に見出した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 408:615-619, 2011.
- (2) Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol* 86:738-745, 2012.
- (3) Seki S, Matano T. CTL escape and viral fitness in HIV/SIV infection. *Front Microbiol* 2:267, 2012.
- (4) Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J Virol* 86:6481-6490, 2012.
- (5) Nomura T, Matano T. Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections. *Front Microbiol* 3:234, 2012.
- (6) Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e54300, 2013.
- (7) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. *PLoS ONE* 8:e73453, 2013.
- (8) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2013.

2 学会発表

- (1) Nomura T, Iwamoto N, Inagaki N, Matsuoka S, Yamamoto H, Matano T. Dynamics of viral CTL escape mutations toward higher viral replicative ability in vivo. The 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, Italy, 7/18/2011.
- (2) Nomura T, Yamamoto H, Shi S, Iwamoto N, Matano T. Analysis of viral genome sequences in SIV controllers. The XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, 9/13/2011.
- (3) Matano T. Impact of prophylactic vaccination on post-exposure CTL cooperation against SIV replication in

- rhesus macaques. 12th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/20/2011.
- (4) 中村碧、高原悠佑、阪脇廣美、堀池麻里子、三浦智行、五十嵐樹彦、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗、松岡佐織 . サルエイズモデル感染初期におけるMHCクラスIハプロタイプ別のCTL反応優位パターンの解析 . 第25回日本エイズ学会学術集会、東京、11/30/2011 .
- (5) Takahara Y, Nakamura M, Matsuoka S, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Impact of therapeutic vaccination on CTL immunodominance and viral suppression in SIV-infected rhesus macaques under HAART. The XIXth International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/26/2012.
- (6) Matano T. Stable viral control in the presence of silent proviruses in a macaque AIDS model. The 13th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/24/2012 .
- (7) 野村拓志、山本浩之、明里宏文、俣野哲朗 .SIV複製抑制マカクサルにおける CTL 逃避変異体の選択による複製抑制破綻機構の解析 . 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/14/2012 .
- (8) 高橋尚史、山本浩之、成瀬妙子、木村彰方、俣野哲朗 . サルエイズモデルにおける Nef 抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球反応が関与するウイルス複製制御機序に関する研究 . 第26回日本エイズ学会学術集会、東京、11/24/2012 .
- (9) Matano T. Vif can be a promising CD8 T cell target for HIV/SIV control. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/29/2013 .
- (10) 野村拓志、俣野哲朗 .SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究 . 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013 .
- G. 知的財産権の出願・登録状況
無し。

表 1 . インド人 HIV 感染者検体の解析で見出された HLA アレル

HLA-A	頻度
A*01:01	11 %
A*11:01/02	25 %
A*24:02	11 %
A*31:01	11 %
A*33:03	18 %
A*68:01	14 %

HLA-B	頻度
B*07:02	11 %
B*40:06	14 %
B*44:03	21 %
B*52:01	11 %
B*57:01	8 %
B*58:01	8 %

HLA-C	頻度
C*03:02	8 %
C*06:02	11 %
C*07:01	25 %
C*07:02	14 %
C*12:03	8 %
C*15:02	17 %

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 23-25 年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「腸内細菌の molecular typing に関する研究 - ベトナム」

研究分担者 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、主として食水系由来腸管感染症を対象に遺伝子解析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。本研究で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 *Vibrio cholerae* を中心に分離菌株の解析および環境調査などを行った。

Molecular typing of enteric pathogens

Hidemasa Izumiya

Molecular epidemiological analyses were performed for *Vibrio cholerae* isolates of 2007-2010 from Vietnam in collaboration with National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam. The resulting data revealed the relatedness among isolates. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis identified 24 types which were linked with each other by single locus variations. The analysis suggests that 2010 isolates were more similar to 2007 isolates than to 2009 isolates.

Environmental research was performed for water samples collected from environments in Hanoi and neighboring provinces. Most probable number combined with PCR method (MPN-PCR) was applied to estimate the distribution of *V. cholerae*. Some seasonal variations were suggested though more successive research would be required.

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。また、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

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

本研究における地理的な分布図作成については、地理情報分析支援システム (MANDARA) を使用した。

環境調査においては、生活水路等から採水

し供試検体とする。検体を MPN(最確数)-PCR 法により試験し、検体中の *Vibrio cholerae* の菌数を推定する。

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* 01/0139)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。

本研究においては2つの活動を基点とする。一つはNIHEの能力向上であり、今一つは感染研との共同研究である。ベトナムで流行した、もしくは流行しているコレラ菌の特徴づけを行うべく、感染研とNIHEとで材料および技術をやり取りすることによって2つの活動が回っていくことを期待している。

本研究では上記2007年から2010年に関

て発生したコレラ流行に関連する分離菌株を供試菌株とした。当該菌株に関して分子疫学解析を行い、時系列別の比較を行った。2009年分離株に関しては、分離地の情報と組み合わせにより詳細な解析を行った。

供試菌株(約190株)は24の型に分類された。それぞれの型は1遺伝子座の違い(single locus variant, SLV)によってつなげることができ、流行時の菌の伝播とともにバリエーションが派生していることが窺えた。

なお、PFGEについても比較的マイナーなバリエーションが見られ、年によって大きなクラスタが形成された(図2、A1, B1, D)。

2010年分離株は、MSTからすると2007年株より派生していることが窺えた(図1)。MLVAで使用している7つの遺伝子座のうち2遺伝子座は*V. cholerae*が保有する大小2つの染色体のうち、小染色体にあり、これらはより不安定でバリエーションが出やすい(表1)ことから、大染色体の5遺伝子座のみを使ってMSTを描いたところ、2010年株は2007年株と同じクラスタに分類された。このことは、2010年株が2009年株よりも2007年株に近いことを示唆しており、2010年株が2007年株から派生してきた可能性が示唆された。

実際、2007-2009年はベトナム北部を中心に流行があり、2010年は南部から始まって北部に至ったとされており、2010年が2009年の続きにあるというよりは、近縁だが別の新たな流行波で2010年の流行が生じた可能性が考えられた。

2009年分離株は全体の半数を占め、大きな流行があったことが窺えた。これらの菌株に関する疫学情報を入手し(発症日、発生地)

を入手し、時間 空間推移を検討した。ちなみに 2009 年に多数を占めた MLVA 型は 2007 年流行株のそれとは 2 遺伝子座以上異なっていた (図 1)。

2009 年 4 月 15 日に初発例が出たものの 2 週間は陽性例がなかった。2 週間後の 5 月 2 日から最初のピークが発生した (第一波)。患者の多くはハノイ周辺およびタンホア省であった。5 月 17 日時点の菌陽性例は 36 であった。5 月 18 日より 2 回目のさらに大きなピークが発生した (第二波)。これ以後に発生した菌陽性例は 56 であり、うち 49 例 (88%) がバクニン省で発生した。バクニン省は第一波では 36 例中 17 例 (47%) を占めていた (図 3)。バクニン省はハノイに隣接しており、コレラの流行が起きやすいと言われているハイフォン省への中間にある (図 4)。

上記解析は、ほぼ同一の MLVA 型を示す株の分離状況によるものではあるが、2009 年初夏のコレラ流行が小さな第一波と大きな第二波からなることが示唆された。各症例間のつながりなどを示す情報がないため、第一波と第二波を直接つなげる要素はないが、第二波が第一波から派生した汚染源、たとえば、ある地域の共通の飲料水あるいは食材が原因となって発生した可能性も十分に考えられる。全体的には、図 1 に示すように 2007-2009 年にかけて流行伝播を繰り返しながら、互いに近縁の菌株が派生している状況が窺える。上記 2009 年の解析からも、大小の流行から成り、流行制御が不十分であることが、コレラ菌の伝播、そしてバリエーションの派生につながっていることが推測された。

コレラの流行に対応するために環境中の *V.*

cholerae の動向を調査することは重要である。流行期間でない時期にはいわゆるコレラ菌ではなく、毒素産生のない *V. cholerae* がほとんど大勢を占めるが、環境調査を行うことで、環境中のリスク要因あるいはポイントの検討および流行発生時の調査を円滑に実施できる体制整備につながる。

本調査は NIHE 腸内細菌部門で継続的に実施されていたが、定量性を加味するために MPN-PCR 法の導入を行った。2013 年 3-8 月の間に、約 100 検体を試験し、20 検体が陽性であった。それらの MPN 値の最低および最高値を図 5 に示す。5-7 月にかけては菌数が低く、3 4 月および 8 月には菌数が高かったことから、*V. cholerae* 分布に関する季節変動の可能性が示唆された。本結果については、ポイントの整理などを行い、また継続して調査を行うことで *V. cholerae* の消長が定期的に発生するかどうかを見ていく必要がある。

D. 結論

2007 年から 2010 年にかけてベトナムで発生したコレラの流行に関し、関連菌株を用いた分子疫学解析を通じて互いの関連性および近縁性を明らかにすることができた。

環境調査を定量的に実施することで、環境中の *V. cholerae* の分布および消長をより高い精度で把握することが可能である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

Yamamoto S, Mitobe J, Ishikawa T, Wai SN,

Ohnishi M, Watanabe H, Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2014 Jan;91(2):326-47.

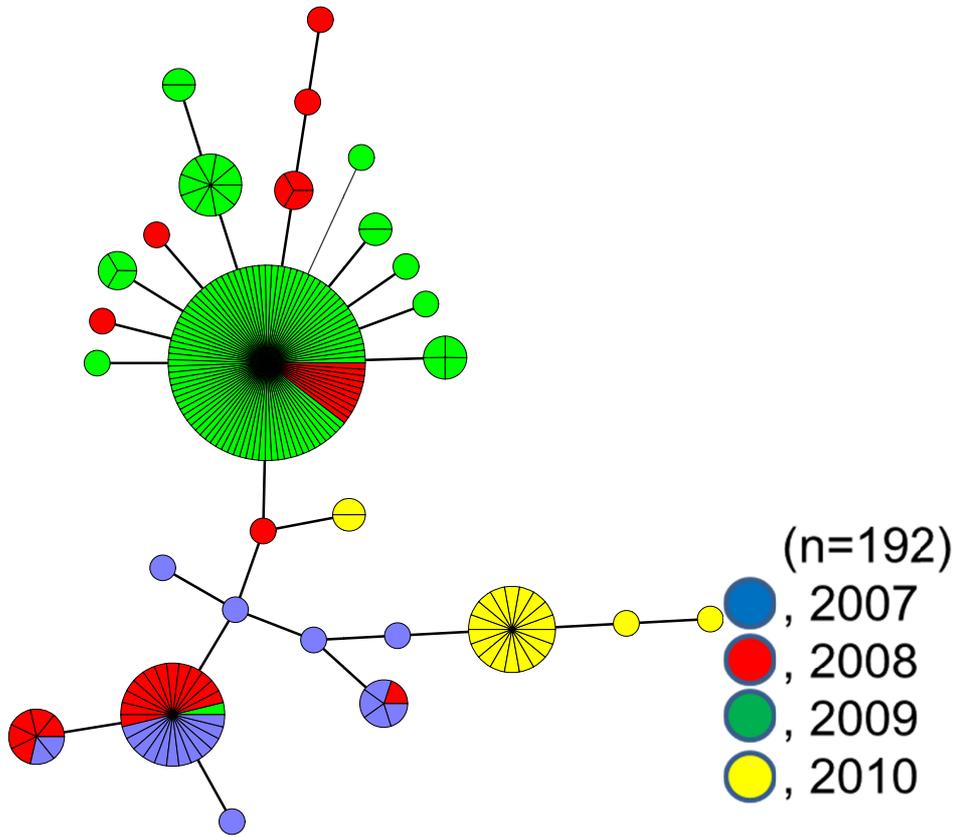
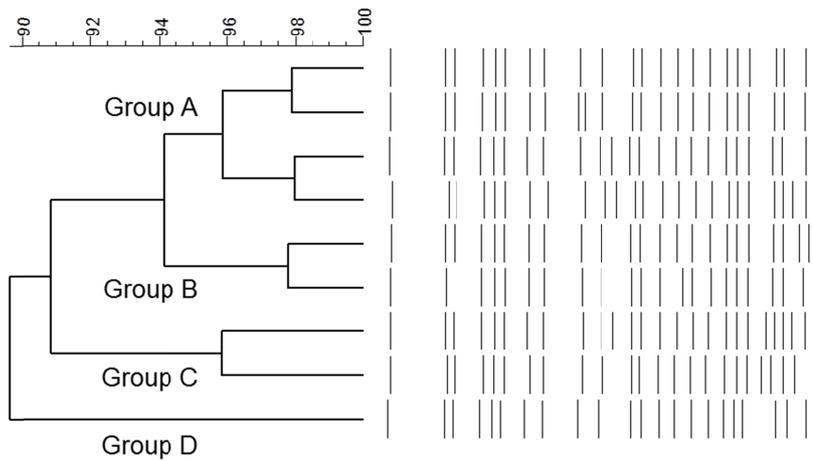


図1 . 2007-2010年コレラ流行株のMLVAによるMST解析

PFGE-VC



PFGE Pulsotype(isolate(s))	No. of	Year/ Region
A1	71	(36)2008/North (35)2009/North
A2	1	2009/North
A3	2	(1)2008/North (1)2009/North
A4	1	2010/South
B1	21	2007/North
B2	1	2009/North
C1	2	2007/North
C2	6	2010/North
D	53	(26)2010/North (27)2010/South

図2 . 2007-2010年コレラ流行株のPFGEによるクラスター解析

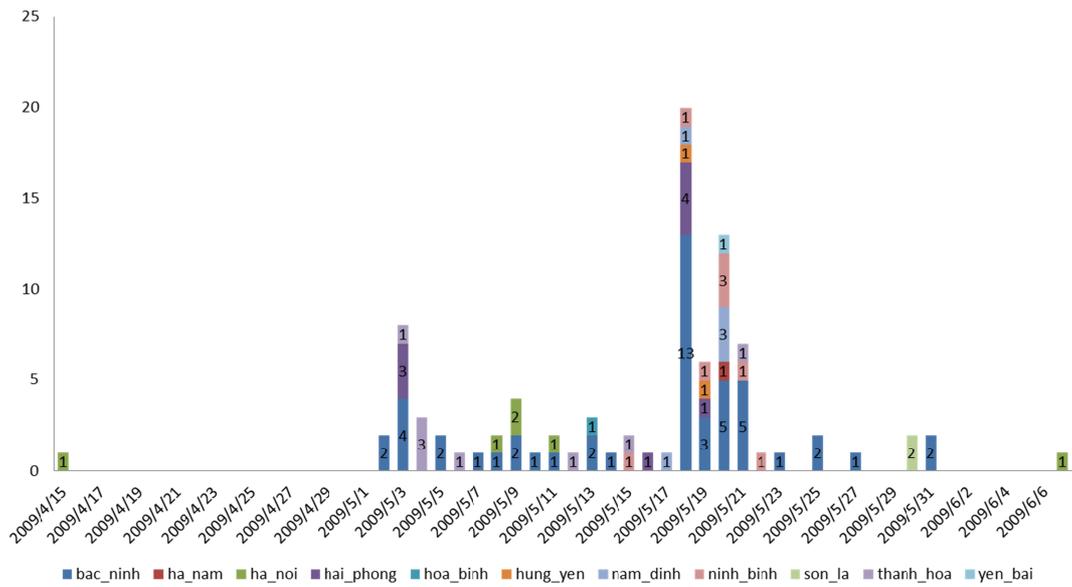


図3 . 2009年4-6月コレラ菌の分離菌株数の推移

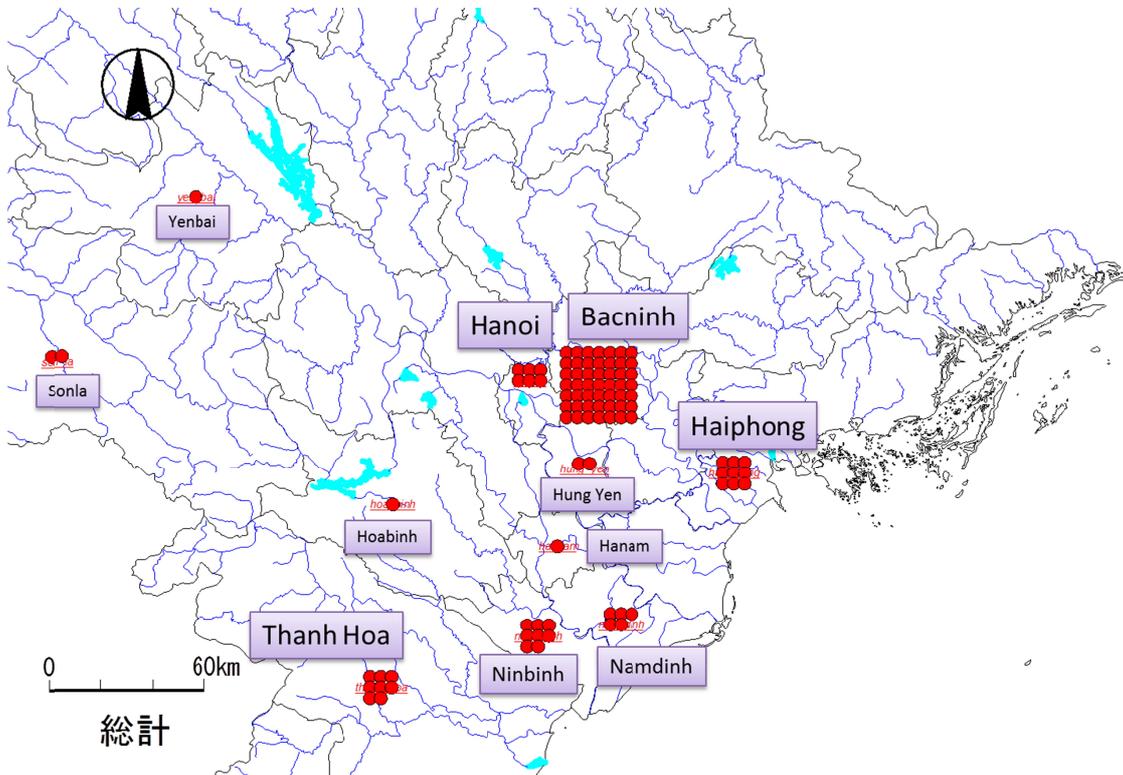


図4 . 2009年4-6月コレラ菌分離株数の地図（ベトナム北部拡大図）

Chromosome	locus	# allele	Diversity
Large	VC-1	3	5.1
	VC-2	1	0
	VC-3	1	0
	VC-5	3	47
	VC-6	1	0
Small	VC-7	7	56.1
	VC-8	8	64.1

表 1 . MLVA の各遺伝子座において観察されたアリル数および分解能 (Diversity)

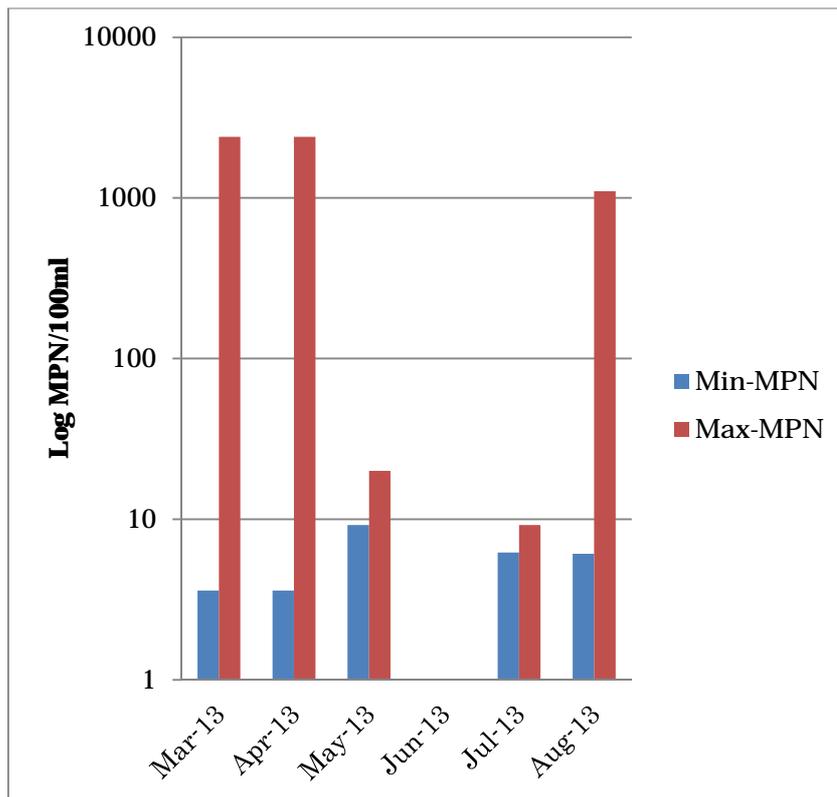


図 5 . ハノイおよび周辺の province における環境調査。検出された MPN 値の最低値および最高値を表す。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総合分担研究報告書（平成 23～25 年度）

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 Taiwan CDC and Vietnam NIHE

研究分担者 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

Jung-Jung Mu: Chief, Bacterial Enteric and Emerging Diseases Laboratory,
Center for Research, Diagnostics and Vaccine Development, Taiwan CDC

Hoang Thi Thu Ha: Chief, Bacteriology Department, National Institute of
Hygiene and Epidemiology, Vietnam

研究要旨

1. 日本，台湾，フィリピンおよびベトナムで分離された *Leptospira interrogans* および各血清型基準株の分子タイピングを multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。MLVA により，他の分子タイピング法で同じ分子タイプと分類された異なる血清群を識別できること，また同じ血清群内の遺伝的多様性が明らかとなった。またこれらの国に分布する *L. interrogans* と保有動物の多様性および普遍性，動物種特異的な血清群の存在が明らかになった。

We performed molecular typing of *Leptospira interrogans* isolated in Japan, Taiwan, Philippines and Vietnam by multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA). MLVA revealed the genetic diversity of strains which belong to the same serogroup and turned out to have more discriminatory power than that of *flaB* sequence typing or multilocus sequence typing. MLVA also revealed the diversity and the universality of the relation between *L. interrogans* and host animals in/across these countries.

2. ベトナム北部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 (NIHE) にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行った。これらの診断法を用いてタインホア地域の熱源が不明の発熱患者および一般健康人の血清疫学，ネズミ，ブタおよび土壌からのレプトスピラ検出を行った。熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM が検出され，9% の患者血液からレプトスピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG が検出され，農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。

To elucidate the current situation of leptospirosis in the northern part of Vietnam, the technical transfer of diagnostic methods of leptospirosis was implemented, and then the seroprevalence study of patients with undifferentiated fever and healthy people and the detection of leptospiral DNA from patients, rats and soil were conducted in Thanh Hoa

area. *Leptospira*-specific IgM and DNA was detected in 20% and 9% of the patients with undifferentiated fever, respectively. *Leptospira*-specific IgG was detected in 49% of healthy people whose occupations were agriculture-related, indicating the epidemicity of leptospirosis among agricultural workers in Thanh Hoa area.

研究目的

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラの感染によっておこる人獣共通感染症である。レプトスピラは、交差凝集素吸収試験により250以上の血清型に分類されるが、本試験法は非常に煩雑で実施できる機関は限られている。近年、血清学的分類に替わる多くの分子タイピング法が開発されてきた。我々はこれまで国内のレプトスピラ分離株について、*flaB* シーケンスタイピング(*flaB*-ST)および multi locus sequencing typing (MLST)を行ってきたが、異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点が明らかとなってきた。そこで本研究では、日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の解析を multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。

レプトスピラ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。そこで本研究では、ベトナム北部におけるレプトスピラ症の実態を明らかにするために、ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、タインホア地域のレプトスピラ症の実態を調査した。

方法、結果および考察

1. 日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の MLVA 各国で分離されたレプトスピラ *L.*

interrogans 263 株の血清群同定を行い(表1)、11種類の VNTR のリピート数をアガロース電気泳動および DNA シーケンシングにより算定した (MLVA)。また *L. interrogans* 各血清型標準株 51 株の MLVA も行った。各分離株のクラスター解析は、各 VNTR のリピート数をもとに Bionumerics を用いて行い、系統樹は UPGMA 法により作成した。

本 MLVA により、*flaB*-ST および MLST で同じシーケンスタイプだった血清群の異なる分離株を、血清群ごとにタイピングすることができた(図1)。また血清型基準株との比較により、血清群 Bataviae, Canicola, Pyrogenes 分離株の血清型をそれぞれ Bataviae, Canicola, Manilae と、また Icterohaemorrhagiae 分離株の血清型を Icterohaemorrhagiae および Naam と同定することができた。したがって、MLVA はこれまでの分子タイピング法よりも解像度が高いことが明らかとなり、血清型推定にも有用である可能性が示された。しかしながら、その他の血清群分離株と同一あるいは近縁の MLVA タイプは今回タイピングを行った基準株から見いだされなかった。このことはこれら分離株の血清型が新規の血清型であることを示唆しているのかもしれない。あるいは同じ血清型が異なる分子タイプ群から構成されている可能性も考えられる。今後、他の地域の分離株の解析を通して血清学的分類と分子タイピングの関連性(普遍性あるいは多様性)をさらに明らかにしていく必要がある。

ドブネズミは世界中に分布しているが、地域により保有している血清群が異なることが明らかとなった(表1)。また他の動物が保有するレプトスピラに比べて、ドブネズミが保

有するレプトスピラの血清群間のゲノムは高度に保存されていた。このことから、保有するレプトスピラ血清群・分子タイプを決定することで、ドブネズミの拡散経路に関する新たな知見が得られる可能性が示唆された。一方で、地域により保有血清群が異なることは、特定の血清群を保有したドブネズミが拡散したのではなく、その地域ごとに新たなドブネズミ・レプトスピラの保有関係が成立したことを示唆しているのかもしれない。今後他の地域のドブネズミ分離株の解析を行い、これら仮説の検証を行っていく。

MLVA により、ヒトへの感染源となっている保有動物の推定に有用なことが明らかとなった。国内の血清群 Autumnalis はアカネズミおよびイヌに特異的なクラスターを形成するが、ヒト患者分離株はイヌと同じクラスターに分類されることが明らかとなり、イヌがこの血清群の維持宿主となり、ヒトへの感染源となっている可能性が示唆された。また沖縄県の患者分離株は台湾のネズミ分離株と同一のクラスターを形成し、本州のイヌおよびアカネズミから分離された血清群 Australis とは異なるクラスターであった。これまで沖縄県における本血清群の保有動物は明らかになっていないが、沖縄県に広く存在するジャコウネズミが保有動物の可能性が示唆された。

2. ベトナム北部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。そこで本研究では、ベトナム NIHE にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、これらの診断法を用いてタインホア省のレプトスピラ症疫学研究を行った。

熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM (LigA IgM) が検出され、9% の患者血液から *flaB*-nested PCR によりレプト

スピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG (LigA IgG) が検出された。抗体陽性者の職業は農作業従事者 62%、畜産従事者 17%、屠畜従事者 6% であり、農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。またネズミの 10% の腎臓あるいは尿からレプトスピラ DNA が検出された。一方、土壌 70 検体からレプトスピラ DNA は検出されなかった。今後ネズミ以外のウシやブタなどの家畜からのレプトスピラ検出を行うとともに、環境からの検出法の改善を行い、同地域におけるレプトスピラ症の伝播経路の解明を目指す。

loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による血漿からの DNA 検出のための、DNA 精製を必要としない簡便な DNA テンプレートの調整法を以下のように確立した。

Lepto-rrs LAMP のための血漿からの DNA 調整法

血漿

遠心分離(16,000 × g, 10 分間)

遠心沈渣

5% Chelex 100 を含む TE 20 μl に懸濁

熱処理 (100 °C, 10 分間)

急冷

遠心分離(16,000 × g, 1 分間)

上清を DNA 検体として使用

レプトスピラを分与いただいた岡野祥 (沖縄県衛生環境研究所)、吉松組子 (北海道大学大学院)、また MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌 (国立感染症研究所) 各氏に深謝いたします。

論文発表

1. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症. 小児科. 54:43-48, 2013.
2. 小泉信夫, 岡野祥, 大西真. レプトスピラ症. 化学療法の領域. 29:670-678, 2013.
3. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ感染症(レプトスピラ症, ワイル病). 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 24 感染症症候群(第2版)(上) 病原体別感染症編. 257 - 260, 2013.
4. Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. A new loop-mediated isothermal amplification

method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. J Clin Microbiol 50:2072-2074, 2012.

学会発表

1. 小泉信夫. スリランカ・フィリピンにおけるレプトスピラ症の現状. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月.
2. 小泉信夫. レプトスピラ症の現状. 第12回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 2012年11月.

表1. 本研究で解析を行った *L. interrogans* の分離国，血清群および分離動物

国	レプトスピラ血清群	分離動物
日本	Australis	アカネズミ，イヌ，ヒト
	Autumnalis	アカネズミ，イヌ，ヒト
	Canicola	イヌ，ネコ，ヒト
	Grippotyphosa	ヒト
	Hebdomadis	アカネズミ，アライグマ，イヌ，オキナワハツカネズミ，ヒト，マンゲース
	Icterohaemorrhagiae	アライグマ，イヌ，ドブネズミ，ヒト
	Pomona	ドブネズミ
	Pyrogenes	ヒト
台湾	Australis	コキバラネズミ，ジャコウネズミ
	Bataviae	ドブネズミ
ベトナム	Bataviae	ドブネズミ
フィリピン	Bataviae	ドブネズミ，ヒト
	Grippotyphosa	ドブネズミ，ヒト
	Pyrogenes	ドブネズミ，ヒト

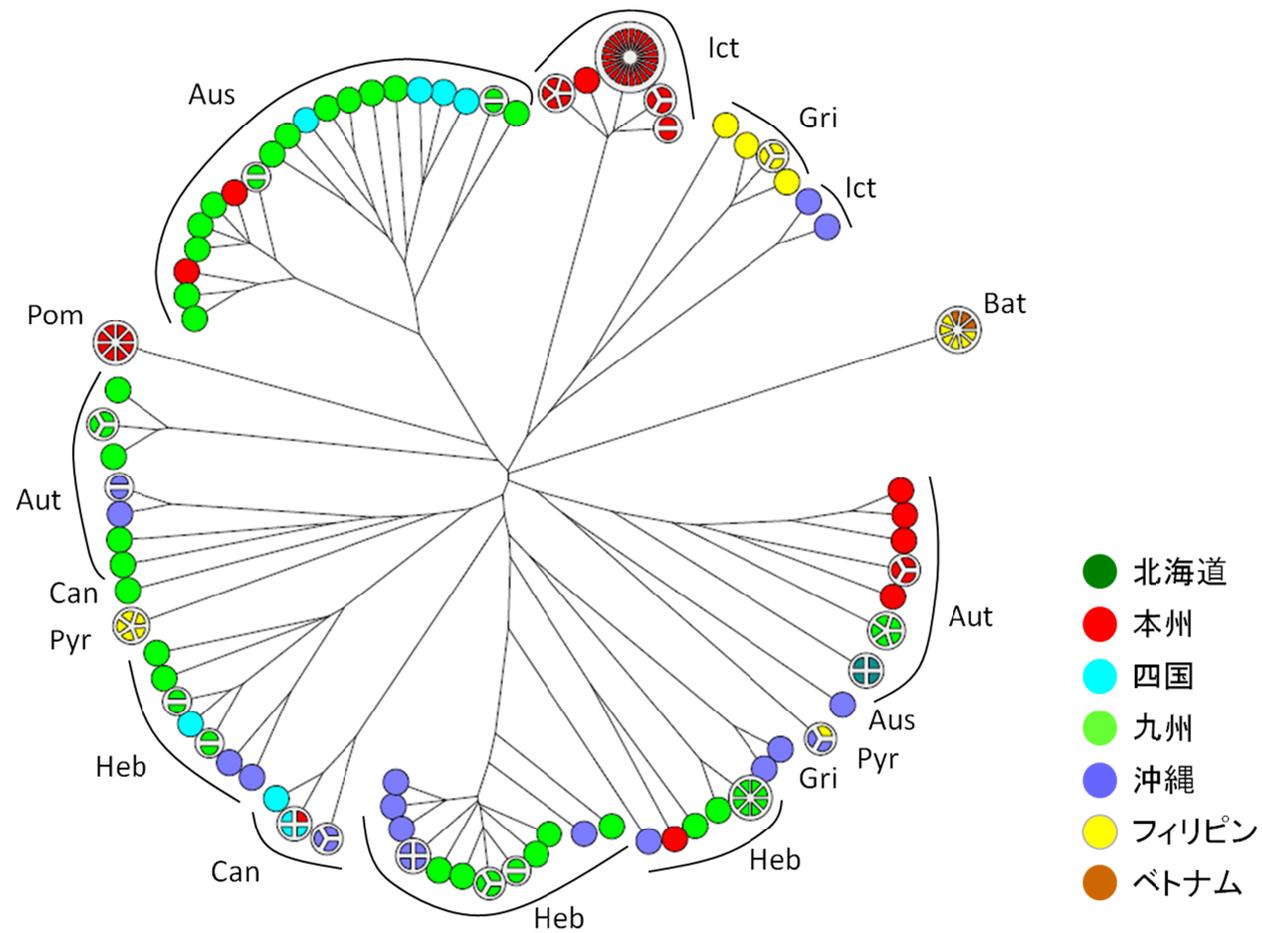


図1. MLVAによる日本, フィリピン, ベトナムで分離された *L. interrogans* の系統樹
 各アルファベットは血清群を表す: Aus; Australis, Aut; Autumnalis, Bat; Bataviae, Can; Canicola, Gri; Grippotypfosa, Heb; Hebdomadis, Pom; Pomona, Pyr; Pyrogenes.

厚生労働科学研究費補助金

平成 23～25 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（アジア指定研究）

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
総合研究報告書

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

研究分担者：	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：	片岡周子	国立感染症研究所 ウイルス第二部
研究協力者：	中島一敏	国立感染症研究所 感染症疫学センター

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。主として 2011-2012 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行い以下の結果を得た。

- 1) 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った。2011～2012 年にかけて、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た。
- 2) NIHE における実験室診断体制を整備し、手足口病由来検体の実験室診断を実施した。2011～2012 年の検体では、エンテロウイルス陽性検体のうち、半数以上が EV71 であった。
- 3) 2011～2012 年の手足口病検体から EV71 に次いで高頻度にコクサッキー A6 型 (CVA6) が検出された。日本やアジア諸国同様、ベトナムでも、CVA6 による手足口病症例の増加傾向が認められた。
- 4) 2011～2012 年にかけて、ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 の遺伝子型は C4 型の頻度が高かったが、2012 年は B5 型が増加した。ベトナム固有の遺伝子型 C5 型も少数検出された。
- 5) WHO 西太平洋地域事務局、感染研、NIHE を含む専門家の協力の下、WHO 手足口病ガイドライン "A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)" を作成・公開した。

重症 EV71 感染症の流行が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、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 1 つである。しかし、1990 年代後半以降、広範な東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) 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、大

きな社会問題となっている。

ベトナムでは、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。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、

かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高いEV71が多く分離されている。カプシドVP1領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離されたEV71は、2種類の遺伝子型であるgenogroup Bおよびgenogroup Cに大きく分かれ、さらにsubgenogroup B1～B5およびC1～C5に細分類される。EV71分離株の分子系統解析によると、特定のEV71遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、2011-2012年に重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生したベトナムで分離されたEV71分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は重要である。

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った。

B. 研究方法

主として2011-2012年に発症したベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体(咽頭拭い液、発疹拭い液、糞便等)を用いた解析を行った。検体は常法に従って調整し、遺伝子検査およびウイルス分離試験に供した。エンテロウイルススクリーニングのため、咽頭拭い液検体から抽出したRNAを鋳型にしたsemi-nested RT-PCR(CODEHOP RT-PCR)法によりVP1部分領域を増幅し、エンテロウイルス特異的フラグメントの増幅を確認した。増幅DNAを鋳型として塩基配列解析を行い、RNA配列の相同性により、エンテロウイルス型(type)を同定した。エンテロウイルス遺伝子陽性検体のうち、一部検体について、RD細胞を用いたウイルス分離を実施した。EV71分離株のうち、代表的なEV71株についてVP1全領域遺伝子をもとにした分子系統解析により、EV71遺伝子型を解析した。

臨床検体の種類、患者の年齢、異なる検体からのウイルス検出陽性率等、NIHEで入手可能な患者情報と疫学情報・実験室診断の結果を整理した。ベトナムにおける手足口病サーベイランスシステムおよび手足口病実験室診断体制の実態を把握するため、Hien所長、サーベイランス担当者、実験室担当者とのミーティングを実施するとともに、症例報告システムや検体送付票・症例報告票等を調査した。

C. 研究結果

1) ベトナムにおける手足口病サーベイランス

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。全国的な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。

2) 手足口病サーベイランス由来検体の実験室診断

手足口病サーベイランスに由来する一部の検体について、NIHEでの実験室診断が実施されている。手足口病由来検体は、患者情報・疫学情報とともにNIHEに送付されるシステムとなっているが、検査情報と患者情報・疫学情報の統合は十分なされていない。また、重症例を含む手足口病症例報告、また、どのような背景の検体についてNIHEで実験室診断を実施しているのか等について、疫学情報・検査診断結果の報告バイアスが存在することが示唆された。サーベイランスおよび実験室診断の結果を解釈する際には留意が必要となる。

3) 手足口病サーベイランス由来検体の実験室診断

NIHEエンテロウイルス実験室で入手可能なデータを再度確認し整理したところ、2011年の手足口病患者912症例中594症例(65%)がエンテロエンテロウイルス陽性と判定された。ひとりの手足口病症例に由来する複数の臨床検体からエンテロウイルスが検出される場合も多いため、検体ごとのエンテロウイルスおよびEV71検出率を整理した。糞便検体からはEV71が比較的高頻度に検出された(62%)、咽頭拭い液(37%)および水疱検体(13/46; 28%)からのEV71検出率は糞便と比較すると低かった。EV71分離株の一部について、VP1領域の塩基配列解析によりEV71遺伝子型を解析したところ、C4型が高頻度に検出され(83%)、B5型(12%)およびC5型(5%)が低い頻度で検出された。

2012年の手足口病症例730人中444症例(68%)がエンテロウイルス陽性と判定された。2012年の手足口病患者糞便検体からのEV71検出率(41%)は、2011年(62%)と比較すると低く、咽頭拭い液(56%)との比較でもEV71検出率が低い傾向が認められた。EV71分離株の一部について、VP1領域の塩基配列解析によりEV71遺伝子型を解析したとこ

ろ、2011年同様、C4型が高頻度に検出されたが(54%)、B5型(38%)の検出頻度が増加した。C5型(4%)は、引き続き低い頻度で検出された。

4) WHO手足口病ガイドラインの作成・公開

WHO/WPRO地域では、手足口病およびEV71感染によるものと考えられる中枢神経合併症重症例が頻発しているが、手足口病および重症例の症例定義、および、症例定義に基づく疾患および病原体サーベイランスが、かならずしも標準化されておらず、各国の疫学情報の比較は困難であった。そのため、WHO/WPRO事務局、感染研、中国CDC、台湾CDC、ベトナムパスツール研、NIHE等からの専門家の協力の下、手足口病ガイドライン”A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)”を作成した。本ガイドラインは、2011年に公開され、手足口病関連合併症の症例定義や標準的な実験室診断手法に関する基盤情報の共有化に寄与した。

D. 考察および今後の研究方針

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かった。また、重症例を含む手足口病原因ウイルスの実験室診断体制も未整備であった。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った。それに伴い、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。その結果、2011～2012年に手後口病症例から検出されたエンテロウイルスの半数以上がEV71であることが明らかとなった。この時期、死亡例を含む重症例が多発したのは、他のアジア諸国同様、EV71による手足口病流行の発生によることが示唆された。

一方、2011～2012年、北部ベトナムの手足口病症例から2番目に高頻度で検出されたエンテロウイルスはCVA6であり、ベトナムでも他のアジア諸国同様、CVA6が手足口病の主要な原因ウイルスのひとつとして定着しつつあることが示唆された。CVA6は、日本では従来、他のコクサッキーA群ウイルス(HEV-A)とともに、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったが、2008年以降、「非典型手足口病」(Atypical HFMD)症例からの検出頻度が増加し、

2011年には大規模な手足口病の主要な原因ウイルスとなった。

1990年代後半以降、おもに、EV71遺伝子型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。ベトナムでは、2000年代は、地域固有のC5型が主要な遺伝子型であったが、2011-2012年の手足口病流行の主要な原因ウイルスは遺伝子型C4であり、中国で継続的に伝播している遺伝子型C4と同じ遺伝子型に属することが明らかとなった。2005～2009年にかけて北部ベトナムにおけるEV71分離株の主要な遺伝子型はベトナム固有の遺伝子型C5だったが、2010年から遺伝子型C4が高頻度に検出され、2011～2012年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。ベトナムでは、近年、主要なEV71遺伝子型がC5からC4に入れ替わった可能性が示唆される。EV71遺伝子型C4は、2008年から中国で断続的に発生している多くの重症例を伴う大規模手足口病流行に関与しており、多数の死亡例が報告された2012年のカンボジアにおける重症EV71感染症症例から検出されたEV71もC4型と報告されている。ベトナムにおける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は、今後も継続した解析が必要とされる。

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、一部検体についてはNIHEで実験室診断が行われている。近年の手足口病重症例の多発を受け、NIHEを中心として、サーベイランスおよび実験室診断体制の整備が進められているが、全国的なサーベイランスおよび報告システムは質的に不十分な点が認められ、改善の余地がある。また、実験室診断結果を含め、得られた情報の疫学的・ウイルス学解析は、今後の課題である。重症EV71感染症の流行が発生しているベトナムにおける、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の質的強化は、EV71感染症重症化のリスクを解析するため、引き続き重要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu H, Nakashima K. Surveillance of hand, foot, and mouth disease for a vaccine. *Lancet Infect Dis.*

- (in press) 2014
- 2) Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T. A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit, *Jpn J Infect Dis* 66, 564-566, 2013
 - 3) Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A Strain-Specific Epitope of Enterovirus 71 Identified by Cryo-Electron Microscopy of the Complex with Fab from Neutralizing Antibody. *J Virol*; 87(21): 11363-11370. 2013
 - 4) Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathog*;9(7):e1003511. 2013
 - 5) Kobayashi, M., Makino, T., Hanaoka, N., Shimizu, H., Enomoto, M., Okabe, N., Kanou, K., Konagaya, M., Oishi, K., Fujimoto, T. Clinical manifestations of coxsackievirus a6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan. *Jpn J Infect Dis* 66, 260-261, 2013
 - 6) Arita M, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Wakita T, Shimizu H. Oxysterol-binding protein (OSBP) family I is the target of minor enviroxime-like compounds. *J Virol* 87: 4252-4260, 2013
 - 7) Khamrin P, Thongprachum A, Kikuta H, Yamamoto A, Nishimura S, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Okitsu S, Hayakawa S, Shimizu H, Maneekarn N, Ushijima H. Three clusters of Saffold viruses circulating in children with diarrhea in Japan. *Infect Genet Evol* 13: 339-343, 2013
 - 8) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2013
 - 9) 清水博之: 手足口病の大規模流行と原因ウイルス. *日本医事新報* 4673, 56-57, 2013
 - 10) 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, 2013
 - 11) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
 - 12) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
 - 13) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012
 - 14) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
 - 15) 清水博之: 手足口病. 特集「感染症動向 2013」, *メディカル朝日* 1, 28-30, 2012
 - 16) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
 - 17) 増本久人, 南亮仁, 野田日登美, 江口正宏, 古川義朗, 鶴田清典, 中田恵子, 左近(田中)直美, 山崎謙治, 高尾信一, Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未, 吉田弘, 清水博之. 国内外における手足口病流行に關与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
 - 18) 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田弘, 清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
 - 19) 武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび關連合併症の入院症例に關する全国調査(2010年分) 中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
 - 20) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71)ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
 - 21) Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T: Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996-2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells. *Jpn J Infect Dis* 64:167-168, 2011
 - 22) Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, and Shimizu H: Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Gen Virol* 92: 287-291, 2011
 - 23) A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)

2. 学会発表等

- 1) Shimizu H. Hand, Foot, and Mouth Disease and infectious agent surveillance in Japan. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 2) Shimizu H. Molecular Epidemiology and Virulence (viral) factors of EV71. International Workshop on Hand, Foot and Mouth Disease. Hanoi, Vietnam, 4-5 April, 2013
- 3) Shimizu H. Current status of hand, foot, and mouth disease outbreaks and EV71 infection in Japan and Asian countries, The 7th China-Korea-Japan Forum on Communicable Disease Control and Prevention, Beijing, China, 25 November, 2013
- 4) 有田峰太郎、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、脇田隆字、清水博之: OSBP ファミリーI は minor enviroxime 様化合物の標的である。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 5) 西村順裕、Hyunwook Lee、Susan Hafenstein、片岡周子、脇田隆字、Jeffrey M. Bergelson、清水博之: エンテロウイルス71と受容体PSGL-1との結合: VP1-145は受容体特異性を制御する分子スイッチである。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 6) 飯塚節子、清水博之: RD-A細胞を用いた Human enterovirus A の分離。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 7) 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のカニクイザリにおける病原性の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会。神戸市、11月10~12日、2013
- 8) 清水博之: アジアにおける手足口病とエンテロウイルス感染症流行の現状。第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合同学会、シンポジウム「世界的視野でみる感染症疫学とその対策」。横浜市、6月5日、2013
- 9) 町田早苗、清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析。第60回日本ウイルス学会学術集会。大阪、11月14日、2012
- 10) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 11) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 12) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 13) Urami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業)

分担研究報告書

アジアの感染症担当機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制強化に関する研究

ベトナム NIHE における麻疹、風疹ウイルス遺伝子診断技術の確立と

ベトナム北部に流行する麻疹ウイルス、風疹ウイルスの解析

Establishment of molecular diagnosis for Measles and Rubella in NIHE, Viet Nam
and molecular analysis of measles circulated in the northern part of Viet Nam.

研究分担者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究分担者 Trieu Thi Thanh Van National Institute of Hygiene and Epidemiology

研究協力者 森 嘉生 国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長

研究要旨 WHO では麻疹の排除、風疹、CRS の減少、根絶を目指している。そのための要件として、高いワクチン接種率の維持とともに実験室診断による質の高いサーベイランス体制の確立を求めている。また麻疹排除の定義から流行株の起源の鑑別が求められておりウイルスの遺伝子解析の手法が必須になっている。ベトナムにおいては、麻疹、風疹の検査診断はWHO が標準法とするIgM ELISA 法で行われているが、遺伝子検出による診断技術、解析技術はまだ十分に確立されていない。本研究はベトナム北部のNational Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)と協力して、ベトナムにおける遺伝子検出による診断技術、ならびに遺伝子解析技術を確立する事、そしてまた患者検体や過去に採集された血清検体からウイルス遺伝子を検出し、過去から現在において流行したウイルスの変遷を調査する事を目的としている。本研究では、1) NIHE に遺伝子解析技術の移転をはかり、2) 2006 年～2012 年までに流行したウイルスの遺伝子解析し、遺伝子型 H1 株が流行している事、また、その流行株は同じ遺伝子型 H1 でありながら、流行年ごとに少しずつ異なる事、また 3) 2013 年春からベトナム北部山岳地域で流行し始めたウイルスは隣国、ラオスで流行した株を起源とする可能性が高い事、を示した。

A. 研究目的

国際連合は 2000 年に、21 世紀の国際目標として、より安全で豊かな世界をつくるための国際協力を約束した「国連ミレニアム宣言」を採択し、その共通目標としてミレニアム開発目標(MDGs)を設定した。MDGs の 8 つの目標の一つ、MDG4 では「乳幼児の死亡率の削減」を掲げ、乳幼児死亡率を 2015 年までに 1990 年の 1/3 にする事を目標とした。当時、麻疹は開発途上国の乳幼児の死因の上位を占めた事、またすぐれたワクチンがある事等から、MDG4 の進捗を計る指標として麻疹ワクチ

ンの接種率を定めている。WHO もこれに呼応して 2000 年に「Measles Initiative」を採択し、天然痘、ポリオについて、麻疹の排除、さらには根絶を目指す事を決定した。

WHO は麻疹排除を「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」と定義とし、麻疹の排除達成には症例数を減少させるだけでなく、検査診断に基づく質の高いサーベイランス体制の確立を求め、さらに麻疹排除が近づいた時には、検出された麻

疹ウイルスがその土地に常在した株なのか、あるいは輸入によってもたらされた株なのかを鑑別する事を求めている。またそこで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事から、各国の麻疹検査を担う研究所では、優れた麻疹ウイルスの遺伝子解析力が期待されている。

現在、日本では年間の麻疹報告数が300症例を下回り、また、2006-8年の麻疹の流行の原因ウイルスであった遺伝子型D5のウイルスの検出が全くない状態となっている。この事は実質的に日本は麻疹排除状況にあることを示唆している。一方、近年の麻疹患者の多くからは遺伝子型D4, D8, D9, B3, G3, H1などの海外に起源を持つと考えられるウイルスが検出されている。麻疹ウイルス、風疹ウイルスはともに呼吸器感染し、感受性者にはたやすく感染する。これはとりまおさず、日本での麻疹排除、風疹排除の達成および維持には、周辺国の流行が大きく関係する事を示す。本研究はベトナムにおける遺伝子診断技術、解析技術の確立を目指している。これらはWPR、あるいは世界ににおける麻疹、風疹排除の推進の有用である。

B. 研究対象と方法

- 1) ベトナムの麻疹、風疹に関する情報の収集およびウイルス遺伝子検出技術の供与
ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)の Dr. Trieu Thi Thanh Van、ベトナムにおける麻疹、風疹の流行状況、検査状況を確認した。また、日本で用いられている高感度の遺伝子検出法の技術供与を行った。
- 2) 過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析
NIHEに保管されていた2006年、2008年、2009年の麻疹IgM抗体陽性血清から

Qiagen Viral RNA mini kit RNAを用いてRNAを抽出し、麻疹ウイルス遺伝子型鑑別領域増幅用のRT-PCRを実施し、麻疹ウイルスゲノムの検出を試みた。増幅された遺伝子の塩基配列を決定し系統樹解析を実施した。

- 3) 2013年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

ベトナム北部の山岳地域では2013年春から麻疹の流行があった。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

- ・ ベトナムの麻疹、風疹の流行状況

ベトナムにおける麻疹は2008年から2009年にかけて全土にわたるアウトブレイクがあり約5200例の麻疹が報告されたが、2010年9月～11月に1～5才の子供を対象とした全国的な補足的ワクチン接種を実施したことから、2010年は1826例、2011年は750例、2012年637症例と減少傾向にあった。しかし2013年には800例が報告されやや増加している。2013年はここ数年、報告のなかった北部の山岳地域を中心に麻疹の報告が相次ぎ、最近ではハノイでも増加傾向にある。一方、風疹は2008年にはおよそ646例の報告であったが、2009年、2010年と増加し、2011年には7259例となったが、2012年12月までに120例前後となり流行は収まりつつある。しかし月齢12ヶ月未満の心臓、白内障、難聴を持つ乳児を対象にCRSサーベイランスを行った結果、2011年では161例が、2012年も9月までにおよそ300例のCRS児が確認されている。麻疹症例報告数、風疹症例報告数のすべてが検査診断されたわけではないが、検査方法はWHOのプロトコールに従い、発疹、発熱患者を対象にELISA法で麻疹IgM抗体を測定、陰性だっ

た場合には風疹の IgM 抗体測定を実施している。

・ 過去に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析

2006 年、2008 年、2009 年の麻疹 IgM 抗体陽性患者血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法により麻疹ウイルスゲノムの増殖を試みた。2006 年 6 検体、2008 年 17 検体、2009 年 20 検体から麻疹ゲノムの回収に成功した。これらの塩基配列を決定し系統樹解析を行ったところ、すべて遺伝子型 H1 型に分類された。また 2006 年と 2008 年、2009 年の株は同じ遺伝子型 H1 でも異なるブランチに属し、塩基配列で 450 塩基中 10～11 の変異があった。また 2008、2009 年の流行株間の塩基配列の変異は 0～3 であった(図1)。

・ 2013 年に流行した麻疹ウイルスゲノムの解析
ベトナム北部の山岳地域である Lai Chau 県、Lao Cai 県、Ha Giang 県から 4 月ごろから麻疹の報告されている。少なくとも 4 月～6 月の間に Lai Chau 県では 52 例が実験室診断、あるいは臨床診断より麻疹と診断されている。Lai Cai 県より 4 株、Lai Chau 県より 3 株、Ha Giang 県より 1 株の遺伝子型決定部位の遺伝子配列を決定し、系統樹解析を行ったところ、各県内で検出されたウイルスは同一であるが県間では異なっていた。また、これらの麻疹ウイルスは遺伝子型 H1 に属していた。またその塩基配列は隣国、ラオスの Phongsaly 県、Luangnamtha 県で 2011～2012 年に検出されたウイルスと同一、あるいはよく似ていた(図2)。一方、隣接する中国、雲南省でも 2013 年には麻疹の流行があったが、遺伝子型 D9 のウイルスであった。

D. 考察

麻疹、風疹はともに感染力が強いウイルス性呼吸器感染症である。麻疹は罹患者の免疫を低下させることから、患者のおよそ 1/3 が合併症を併発

する。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。また、途上国では時として 10% 近い死亡率を示す事がある。一方、麻疹には有効性、安全性にすぐれたワクチンが存在するにも関わらず、今だ乳幼児死亡率の高い感染症である。ワクチン接種率を高めれば確実に乳幼児の死亡率を減少しうる。国連が進める MDG4 の指標に麻疹ワクチンの接種率が掲げられているのもそのためである。また WHO では麻疹だけでなく風疹の排除もすすめている。妊婦が風疹に罹患した場合、胎盤を通じて胎児に風疹ウイルスが感染し、出生する子供に CRS と呼ばれる障害を残す事が知られている。麻疹同様に風疹にも有効なワクチンがあり、麻疹、風疹混合ワクチンとして同時に接種できる事から、麻疹排除と同時に風疹の排除も計画している。これらの排除計画は人類の公衆衛生上、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。当初は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 人になったが、その後、ワクチン不足により接種率が 83%に減少したためか 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。その後は 95%を超える高いワクチン接種率を維持しているにも関わらず 5 人～20 人/人口 100 万人程度で麻疹の流行が継続している。

一方、風疹は現在までワクチンが導入されておらず、4～5 年のサイクルで流行を繰り返している。2009 年ごろから風疹の流行のきざしがみられ、2011 年には 7000 人を超す風疹が報告されている。これに伴い CRS を持つ子供の出生数も増加しており、2012 年では三カ所の定点病院でサーベイランスを実施したところ 300 以上の CRS 確

定例が報告されている。現在、予定を早めて 2013 年から風疹ワクチンを含むワクチン(MR or MMR ワクチン)の導入を計画している。風疹予防の主たる目的は小児への感染防御ではなく、妊婦への感染を防ぎ、CRS の発生を防ぐ事にある。小児へのワクチン接種により、風疹が減少し、ワクチンの接種機会のなかった年代がそのまま妊娠可能年齢になり、逆に CRS が増えた事例がある。成人への感染のコントロールはより困難である。小児への高い接種率を維持し、風疹の流行そのものを減少させることが CRS の予防に重要となるだろう。

前述のように 2007 年には麻疹の発生率が人口 100 万人当たり 0.2 人にまで減少した。2006 年以前と 2007 年以降の麻疹ウイルスの違いは興味深い。過去の検体からの麻疹ゲノムの検出、解析から、2006 年のウイルスと 2008 年以降のウイルスでは同じ遺伝子型 H1 であるが、異なるブランチに属する事が明らかになった。2006 年ウイルスと 2009 年ウイルスでは麻疹ウイルス N 遺伝子末端の遺伝子型決定部位 450 塩基中に 10~11 塩基、アミノ酸配列で 4~5 アミノ酸の変化がみいだされ、異なる由来のウイルスである可能性が考えられた。麻疹の排除は「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のよる麻疹の伝播が 12ヶ月間以上ないこと」と定義されており、排除の最終段階では流行する麻疹ウイルスが定着株か輸入株かの鑑別が必要となってくる。遺伝子型別のみではウイルスの鑑別には不十分な事が考えられ、ウイルス学的、疫学学的により慎重に麻疹症例を観察する必要がある。

2013 年に麻疹の流行の端緒となった Lai Chau 県、Lai Cai 県、Ha Giang 県の北部山岳地域では少数民族が暮らし、また交通のアクセスが悪い事もありワクチン接種等の公衆衛生上のサービスが必ずしも十分に行き渡っていない可能性が考えられた。また、今回の麻疹ウイルスの遺伝子解析から、2011 年ごろからラオスの麻疹患者から検出されているウイルスと近い事がわかった。北

部山岳地域はラオス国境と接しており、何らかの接触が両国民の中であった可能性が考えられた。

一般的な問題であるが、ワクチン接種率の把握は先進国でも困難である。特に途上国の地方においては人口の正確な把握そのものが難しい事が多く、ワクチン接種率に表示された数字の信頼性が高くないと思われる。ベトナムでもワクチンが不足した 2007 年以外は 95%以上のワクチン接種率が公式には報告されているが、信頼性が低い可能性は否定できない。ワクチン接種率だけではなく血清疫学の併用によって感受性者の集団を見つけ出していく事も今後麻疹の排除を達成するためには必要かもしれない。

容易に国外旅行ができる現在では、麻疹排除、風疹排除を達成し、その状態を維持していくには、ある特定の国だけでの排除達成では不可能で、少なくとも WPR 等の様にある一定の広さを持つ地域からの排除が必要になってくる。事実、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、ウイルス学的に海外に由来すると考えられており、またこれらが国内で小規模なアウトブレイクを起こす事もある。また 2012~2013 年に風疹の流行を引き起こしたウイルスも東南アジアで流行していた遺伝子型 2B のウイルスと類似のウイルスであった。国内の麻疹、風疹の排除の達成、維持は国外、おもに近隣の状況と無関係ではない。特に中国、韓国、東南アジア等のように比較的人口が多い国の中心的な研究室と技術、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今後も重要になると考えられる。

E. 結論

麻疹、風疹のような感染性の強いウイルスは容易に国境を超えて伝播する。この事は日本において麻疹、風疹の排除を達成、維持していくためには、少なくとも関係の深い周辺の諸国の麻疹、風疹の状況を把握し、可能ならばその改善

に協力できる体制を構築する事が重要である。事実、2013年暮れから2014年においてフィリピンで麻疹が流行した事により、昨年の約2倍のペースで日本において麻疹が検出されている。周辺諸国での公衆衛生を向上させ、共通の目標としてこれらの感染症対策を実施していけるような協力関係を継続していく事は、対象の途上国だけではなく、日本にとっても重要である。その意味でも本研究班は大変意義深いものであると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tran DN, Vu MP, Ha MT, Giang TPL, Komase K, Mizuguchi M, Ushijima H. Viral molecular characterization of the first congenital Rubella syndrome case in Vietnam. *Clin Lab.* 2011;57(5-6): 397-401.
- 2) Rota PA, Brown K, Mankertz A, Santibanez S, Shulga S, Muller CP, Hübschen JM, Siqueira M, Beirnes J, Ahmed H, Triki H, Al-Busaidy S, Dosseh A, Byabamazima C, Smit S, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Bukenya H, Wairagkar N, Ramamurty N, Incomserb P, Pattamadilok S, Jee Y, Lim W, Xu W, Komase K, Takeda M, Tran T, Castillo-Solorzano C, Chenoweth P, Brown D, Mulders MN, Bellini WJ, Featherstone D. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology. *J Infect Dis.* 2011 Jul; 204. Suppl 1: S514-23.
- 3) Abernathy ES, Hübschen JM, Muller CP, Jin L, Brown D, Komase K, Mori Y, Xu W, Zhu Z, Siqueira MM, Shulga S, Tikhonova N, Pattamadilok S, Incomserb P, Smit SB, Akoua-Koffi C, Bwogi J, Lim WW, Woo GK, Triki H, Jee Y, Mulders MN, de Filippis AM, Ahmed H, Ramamurty N, Featherstone D, Icenogle JP. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S524-32.
- 4) Featherstone DA, Rota PA, Icenogle J, Mulders MN, Jee Y, Ahmed H, de Filippis AM, Ramamurty N, Gavriliu E, Byabamazima C, Dosseh A, Xu W, Komase K, Tashiro M, Brown D, Bellini WJ, Strebel P. Expansion of the global measles and rubella laboratory network 2005-09. *J Infect Dis.* 2011 Jul;204 Suppl 1:S491-8.
- 5) Phengxay M, Hayakawa Y, Phan TG., Tanaka-Taya K, Ueno-Yamamoto K., Vongphrachanh P, Komase K, Ushijima H. Seroprevalence of rubella and measles virus antibody in Lao PDR. *Clin Lab.* 2011; 57(3-4);237-244.
- 6) Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K. Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis.* 65(3) 268-70, 2012
- 7) Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H. Phylogenetic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010. *J Med Virol.* 84(4):705-10, 2012
- 8) Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 3; 418(1): 38-43, 2012
- 9) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. (2013) Lethal canine

- distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 87:1105-1114.
- 10) Sakai K, Yoshikawa T, Seki F, Fukushi S, Tahara M, Nagata N, Ami Y, Mizutani T, Kurane I, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Komase K, Morikawa S, Takeda M. (2013) Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J Virol.* 87:7170-5.
- 11) Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma XM, He JL, Xu ST, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K and Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 87:666-675.
- 12) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M. (2013) The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope. *J Virol.* 87:3583-6.
- 13) Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M. (2013) Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells. *J Virol.* 87:4683-93.
- 14) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. (2013) Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Microbiol immunol.* 57:246-51.
- 15) 駒瀬勝啓 麻疹検査診断法とその問題点、小児科 金原出版 52 (9):1273-1280 (2011)
- 16) 竹田誠、駒瀬勝啓、社会情勢の中で変わりゆく麻疹という感染症、*BIO Clinica*, 26, 1198-1202 (2011) 駒瀬勝啓 Q & A 麻疹検査診断法 日本医事新報 2012 4605: 57-59.
- 17) 駒瀬勝啓、竹田誠 麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状、臨床と微生物 2012 39(6): 656-662.
- 18) 駒瀬勝啓 麻疹ワクチン、風疹ワクチンの品質管理 臨床とウイルス 2012 40(5):334-341.
- 19) 染谷健二 駒瀬勝啓 竹田 誠 2012 年の海外の麻疹情報、病原微生物検出情報、2013,34(2); 24-25
- 20) 駒瀬勝啓、竹田誠 ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題、病原微生物検出情報 33(2); 29-30 (2012)
- 21) 駒瀬勝啓 麻疹排除の進捗と麻疹輸入例の増加 -麻疹排除に向けた今後の課題- 小児科 金原出版 53 (1):105-112 (2012)
- 22) 駒瀬勝啓 染谷健二 竹田 誠、日本における麻疹ウイルス流行株の変遷 2009 ~ 2012、病原微生物検出情報、2013, 34(2); 36-37
- 23) 倉田貴子 上林大起 駒野 淳 西村公志 加瀬哲男 高橋和郎 大平文人 松井陽子 伊達啓子 熊井優子 久保英幸 改田 厚 後藤 薫 長谷 篤 大阪市保健所 廣川秀徹 吉田英樹 内野清子 三好龍也 田中智之森 嘉生 大槻紀之 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、大阪府内における2012年の風疹患者発生状況、病原微生物検出情報、2013,34(4); 97-98
- 24) 森嘉生 大槻紀之 岡本貴世子 坂田真史 駒瀬勝啓 竹田 誠、風疹ウイルスの遺伝子型別動向と検査診断マニュアル改訂、病原微生物検出情報、2013, 34(4); 99-100 (2013)
- 25) 梶山桂子 古川英臣 宮代 守 佐藤正雄 伊藤孝子 酒井由美子 植山 誠 眞野理恵子 衣笠有紀 戸川 温 高田 徹 田村和夫 駒瀬勝啓 タイからの B3 型麻疹ウイルス輸入例 福岡市、病原微生物検出情報、2013, 34 (7); 201-202
- 26) 岡本貴世子、森嘉生、落合雅樹、庵原俊昭、大槻紀之、海野幸子、竹田誠、駒瀬勝啓 抗麻疹 IgG 国内標準品の作製、および ELISA 法による IgG 抗体価(国際単位)と HI 抗体価の相関性の解析 臨床化学、2013, 42; 146-150

2. 学会発表

- 1) Tran Nguyen, 駒瀨勝啓、早川智、牛島廣治、
Phylogenetic analysis of rubella viruses found in
Vietnam in 2009-2010 第 52 回日本臨床ウ
イルス学会 津市三重県総合文化センター、
2011 年 6 月 11 日～12 日
- 2) 倉田貴子、井澤恭子、西村公志、加瀬哲男、
高橋和郎、大平文人、松井陽子、梯和代、
久保英幸、改田厚、後藤薫、長谷篤、内野
清子、三好龍也、田中智之、駒瀨勝啓、森
嘉生、竹田誠、大阪府内における 2011 年の
風しん発生状況 第 15 回日本ワクチン学会
学術集会 東京都日本教育会館、2011 年
12 月 10 日～11 日
- 3) 小川知子、堀田千恵美、小倉惇、福嶋得忍、
平野憲朗、小山早苗、駒瀨勝啓、中山哲夫、
和山行正、MR ワクチン接種後、約 4 ヶ月を
経て麻疹ワクチン株が検出された症例につ
いて 第 15 回日本ワクチン学会学術集会
東京都日本教育会館、2011 年 12 月 10 日～
11 日
- 4) Hiroko Minagawa, Teruo Yamashita, Yoshihiro
Yasui, Mami Hata, Shinichi Kobayashi,
Hirokazu Adachi, Emi Mizutani, Miyabi Ito,
Noriko Fujiwara, Akira Fujiura, Katsuhiko
Komase. COLLECTION/PRESERVATION
CONDITIONS OF SAMPLES FOR MEASLES
VIRUS DETECTION TO IMPROVE
LABORATORY DIAGNOSIS FOR
CASE-BASED MEASLES SURVEILLANCE.
XV International Congress of Virology, 札幌
市札幌コンベンションセンター、2011 年 9 月
11 日～16 日
- 5) 駒瀨 勝啓、高崎智彦、竹田誠 デング熱
患者における麻疹 IgM 抗体の検出、第 86
回日本感染症学会学術講演会 長崎 2012
年 4 月 24 日～25 日
- 6) Khamla Lerdsaway, K. Thammavongsa, P.
Ounnaphone, B. Khamphongphanh, V.
Somoulay, P. Vongphrachanh, K. Komase, K.
Yamamoto, S. Archkhawong, P. Ketmayoon,
M. Phengxay, T. Chanthapaseuth, K. Feldon,
J. Denny, H. Lewis, Rubella Susceptibility
Study among Women of Child-bearing Age -
Vientiane Capital, Lao PDR, 2010, 15th
International Congress on Infectious
Diseases, Bangkok, 2012 年 6 月 13 日～16
日
- 7) 中山哲夫、改田厚、駒瀨勝啓、麻疹ウイルス
野生流行株とワクチン株との鑑別、第 53 回
日本臨床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16
日～17 日
- 8) 駒瀨勝啓、秋吉京子、伊藤正寛、麻疹 IgM
抗体価測定による麻疹検査診断-偽陽性と
感度の関係-、第 53 回日本臨床ウイルス学
会、堺 2012 年 6 月 16 日～17 日
- 9) 点状出血で発症したパルボウイルス感染症
の臨床とウイルス学的検討～麻疹 IgM 抗体
との交叉反応について～、第 53 回日本臨
床ウイルス学会、堺 2012 年 6 月 16 日～17
日
- 10) 酒井宏治、關文緒、網康至、田原舞乃、中
津祐一郎、大槻紀之、福原英雄、福土秀悦、
吉川智城、西條政幸、森川茂、前仲勝美、
山口良二、駒瀨勝啓、竹田誠、カニクイザル
で致死的感染症を起こしたジステンパーウ
イルスのサルレセプターの効率的な利用:ジ
ステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得る
のか? 第 60 回日本獣医学会 岩手 2012
年 9 月 14 日～16 日
- 11) 中津 祐一郎、鈴木 忠樹、駒瀨 勝啓、竹
田 誠、極性上皮細胞におけるリサイクリン
グエンドソーム経路を利用した麻疹ウイルス
RNP 複合体の細胞膜への輸送と感染性ウイ
ルス粒子の産生:第 60 回ウイルス学会学術
集会 大阪、2012 年 11 月 13 日～15 日
- 12) 田原 舞乃、Melinda A. Brindley、福原 秀

- 雄、酒井 宏治、大野 真治、駒瀬 勝啓、Paul A. Rota, Richard K. Plemper、前仲 勝実、竹田 誠、麻疹ウイルス単一血清型決定の分子基盤:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日~15日
- 13) 酒井 宏治、關 文緒、網 康至、田原 舞乃、中津 祐一郎、大槻 紀之、福原 秀雄、福士 秀悦、吉河 智城、西條 政幸、森川 茂、前仲 勝実、山口 良二、駒瀬 勝啓、竹田 誠、カイクイザルで致死的感染症を起こしたジステンパーウイルスのサルレセプターの効率的な利用:ジステンパーウイルスはヒトへの脅威となり得るのか?:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日~15日
- 14) 内野 清子、三好 龍也、森 嘉生、駒瀬 勝啓、田中 智之、いわゆる臨床検体三点セットを用いた風疹ウイルス検出状況:第60回ウイルス学会学術集会 大阪、2012年11月13日~15日
- 15) 田原舞乃、駒瀬勝啓、竹田誠、麻疹ウイルスH蛋白質全エピトープの詳細な解析、第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17日~18日
- 16) Kouji Sakai, Fumio Seki, Maino Tahara, Noriyuki Otsuki, Yasushi Ami, Masayuki Saijo, Ryoji Yamaguchi, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda and Shigeru Morikawa、Canine distemper virus intrinsically uses monkey receptors and readily adapts to use human receptors as well, 15th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) Singapore 2013年3月11日~13日
- 17) 駒瀬勝啓、竹田誠、庵原俊昭、皆川洋子、安井善宏、山下照夫、改田厚、秋吉京子、麻疹ウイルス流行株の推移とウイルス鑑別方法の検討、第54回日本臨床ウイルス学会、倉敷、2013年6月8日~9日
- 18) 酒井宏治、關文緒、網康至、染谷健二、田原舞乃、大槻紀之、西条政幸、森川茂、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利用応獲得に必要な変異、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日~12日
- 19) 田原舞乃、酒井宏治、駒瀬勝啓、前仲勝実、竹田誠、受容体結合領域を含む複数の主要エピトープを変化させた麻疹ウイルスの解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日~12日
- 20) 池野翔太、鈴木基臣、寺原和孝、石毛真行、駒瀬勝啓、竹田誠、森川裕子、中山哲夫、柳雄介、竹山春子、横田恭子、ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系の応用、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日~12日
- 21) 内野清子、三好龍也、岡山文香、芝田有理、田中智之、森嘉生、駒瀬勝啓、竹田誠、堺市における風疹の流行状況と検査結果の解析、評価、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月10日~12日
- 22) 竹田誠、田原舞乃、駒瀬勝啓、麻疹ウイルスの抗原性の安定性は強固に保証されているか 第17回日本ワクチン学会、津、2013年11月30日~12月1日
- 23) Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Progress towards measles elimination after introduction of supplementary immunization in Japan, Sitges, Spain 7th Vaccine & ISV congress, 2013年10月27日~29日
- その他
- 1) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の疫学、実験室検査診断、衛生微生物技術協議会第33回研究会 横浜 2012年6月28日~29日
- 2) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹、風疹ウイル

スと検査診断について、第26回公衆衛生情報研究協議会、研究会 沖縄 2013年1月24日～25日

- 3) 講演 駒瀬勝啓、麻疹、風疹発生状況、ウイルス検査の概要と精度管理、平成24年度地方衛生研究所東海、北陸ブロック微生物部門専門家会議 名古屋 2012年10月18日～19日

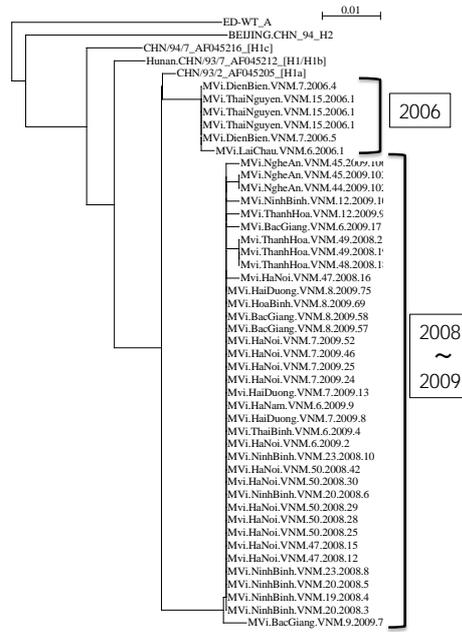
- 4) シンポジウム 駒瀬勝啓、麻疹の状況と検査

診断について、衛生微生物技術協議会第34回研究会 名古屋 2013年7月11日～12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

図1. 2006年、2008年、2009年の血清より検出された麻疹ウイルスゲノムの系統樹解析



ベトナムにおける麻疹流行株の解析 (2013)

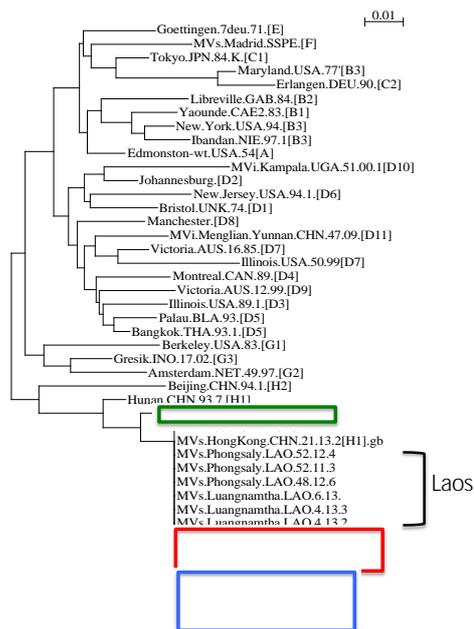


図2.

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
（ 総括 **分担** ）研究報告書

ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Health and Environments：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：	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
	加来義浩	国立感染症研究所・獣医科学部
	濱本紀子	国立感染症研究所・獣医科学部
	Bazartseren Boldbaatar	IVM・ウイルス部
	飛梅 実	国立感染症研究所・感染病理部
	阿戸 学	国立感染症研究所・免疫部
	Nguyen Thi Kieu Anh	NIHE・ウイルス部
	Hoang Thi Thu Ha	NIHE・細菌部

研究要旨：本研究では、ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology；NIHE）との狂犬病及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、NIHEの狂犬病ラボ（ウイルス部・Dr.Nguyen Thi Kieu Anh）と炭疽ラボ（細菌部・Dr.Hoan Thi Thu Ha）と共同して、当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学、ベトナムの地域ラボ・ネットワーク強化の促進を行った。

狂犬病：平成23年度は、ベトナムに生息する翼手目（コウモリ）がRVを含むリッサウイルス属の自然宿主あるかを調べるためにNIIDで保有している5株（RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系を確立した。平成24年度は、ベトナムで流行しているウイルス株を簡易かつ迅速に検出できるLAMP法の確立、診断ラボのネットワーク強化に必要な検査系の検証と臨床・検査・疫学等を網羅したモデル研修を北部の流行地域で試みた。平成25年度は、より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるように分泌型アルカリフォスファターゼ（SEAP）発現シュードタイプを利用した中和試験法の開発を試みて従来法（RFFIT法）等同様の成績で感度・特異性の高いことが示された。

炭疽：平成23年度は、ベトナムの北部山岳地帯で発生した皮膚炭疽の集団発生事例の炭疽菌DNAを抽出してMLVA（Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis）とSNP（Single Nucleotide Polymorphism）による系統解析を行い分離株が西ヨーロッパや北アメリカの菌株と同じ遺伝学的クラスター（A1クラスター）に分類されることを明らかにした。平成24年度は、皮膚炭疽から分離した菌株を80-SNP（Single Nucleotide Polymorphism）で系統解析してベトナム株がアジア分離株の多数含まれるA3クラスターに所属するが日本株（A3aクラスター）やモンゴル株（A3bクラスター）と異なるクラスターを韓国分離株と形成することを明らかにした。平成25年度は、市販食肉分離株について解析を行い西ヨーロッパや北アメリカで分離される菌株と同じ遺伝学的クラスター（A1クラスター）に分類されることを明らかにした。

A . 研究目的

本研究では、ベトナム国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE) との狂犬病及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、NIHE の狂犬病ラボ (ウイルス部・Dr.Nguyen Thi Kieu Anh) と炭疽ラボ (細菌部・Dr.Hoan Thi Thu Ha) と共同して当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学、ベトナムの地域ラボ・ネットワーク強化の促進について行った。

B . 研究方法

狂犬病: ベトナム北西部 Hoa Binh、東北部 Long Song、Phu Tho、Yen Bai、Tuyen Quang に生息するコウモリを捕獲して血清採取を行って、NIID で保有している狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株 (RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) による簡易中和抗体検出系の確立と中和活性測定を行った。

ベトナム北部・中央高地・南部の三地域から代表的な 11 株を選択して N 遺伝子の塩基配列を特定して RT-LAMP に使用するプライマーを設計の後に既報 (Boldbaatar B., and et al. Jpn.J. Infect.Dis. 62:187-191, 2009) を利用して反応の至適条件を検討した。

NIHE が、地域ラボに狂犬病の検査系を普及したときに検査系の精度を維持するために必要となる検査手技等の検証方法を EQAS (外部精度評価プログラム) を利用して検討した。

ベトナム北部の Thai Nguyen 省で、所属 Thai Nguyen 衛生疫学研究所を中心に、医療関係者、獣医師、行政担当者も加えて、狂犬病の基礎知識、疫学、免疫・予防、発症病理、臨床、検査を網羅するモデル研修を行った。

より安全かつ簡便に中和抗体を測定できるように分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現シュードタイプを利用した中和試験法の開発を試みて、従来法 (RFFIT 法) と比較検討

した。

炭疽: 地域ラボと連携した炭疽ネットワークを活用して患者からの炭疽菌分離と野外事例からの遺伝子検出を行い、ベトナム株に特異的な SNP 検索を継続しつつ、ベトナム株のアジアにおける系統分類と遺伝子型別を行った。

ベトナムでの炭疽の流行機序を明らかにするため、炭疽ネットワークを利用して患者の検査検体と同時に患者と接触履歴のある家畜や土壌から検体を採取して NIHE に移送して菌分離と遺伝子検出を行って感染源・経路等について検討した。

C . 研究結果

狂犬病: 狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス 5 株 (RV、EBLV-1、Duvenhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus) を利用した簡易中和抗体検出系の実際的な手技を共同で行い、技術的な知見共有と課題等の確認が可能になった。

設計した RT-LAMP プライマーはベトナム北部・中央高地・南部の三地域の代表的な 11 株をいずれも増幅可能であり、狂犬病が疑われた患者から採取された唾液と脳脊髄液 (65 検体) について RT-PCR 法と比較したところ感度が 100%、特異性が 96.8%であった。

EQAS に準じて以下を行った。(1) NIID で準備した検体を NIHE に送付、(2) NIID から NIHE に正解を開示、(3) NIHE で抗原および遺伝子を検出、(4) NIHE と NIID で成績・課題を分析。

ベトナムの地域ラボ等を対象にした研修・実習を Thai Nguyen 省の地域ラボ等と連携して行った。研修内容：バイオセーフティの基礎、臨床診断・疫学、および予防法等。参加者：ベトナム狂犬病コントロールプログラムの疫学専門家、北部 4 省 (Thai Nguyen、Ha Giang、Cao Bang、Son La) の PCPM スタッフ・医療従事者、ワクチン接種担当者、医師、看護師、獣医師 (60 名以上) 。

炭疽：地域ラボと連携した炭疽ネットワークを利用して患者からの炭疽菌分離と遺伝子検出に成功した。分離菌株のゲノム解析によってベトナム北部の炭疽流行地（Dien Bien）で発生した炭疽アウトブレイク患者 6 名の特定と菌分離に成功し、ゲノム解析を行ってベトナム株はアジア分離株が多数含まれる A3 クラスタに所属するが日本株（A3a クラスタ）やモンゴル株（A3b クラスタ）と異なるクラスタを韓国分離株とともに形成することが明らかになった。一方、市販食肉由来菌株は西ヨーロッパ地域由来株が多く分類される A1 クラスタに分類された。

D. 考察

狂犬病：NIID で保有している 5 株（RV、EBLV-1、Duvnhage virus、Mokola virus、Lagos bat virus）を利用した簡易中和抗体検出系を確立し、ベトナムのコウモリから採取した血清を利用して NIHE と NIID のラボラトリー間で手技および検査成績を検証し概ね同じ成績であることを明らかにした。コウモリ等の野外調査を進めながら、NIHE と NIID のラボラトリー間で血清等の検体を共有して、検査系の比較検証を行い、狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス属のベトナムにおける分布と自然宿主の疫学を明らかにすることで、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が期待された。

RT-LAMP によって既存の RT-PCR でウイルス検出ができなかった発症早期の患者から標的のウイルス遺伝子を増幅できたことは特記すべきことであり、狂犬病の早期診断をより確実にに行えることが期待された。

NIHE が地域ラボと連携したラボラトリーネットワークを構築する際に必要となる検査系の精度維持を検証するために EQAS（外部精度評価プログラム）に準じたブラインドテストを行い抗原検出、遺伝子検出のいずれについてもよい成績を得ることができた。課題として、地域ラボで検査系を確立して普及するためには各

ラボの状況を十分に把握・理解して柔軟性のある標準手技等を提案する必要があることが示された。

炭疽：ベトナム分離株は西ヨーロッパや北アメリカで分離される菌株と同じ遺伝学的クラスタ（A1 クラスタ）に分類され、日本やモンゴルなど他のアジア諸国で分離される炭疽菌が分類される A3 クラスタとは異なることが明らかになった。今後、ベトナム分離株のフルゲノム解析を行いベトナム分離株をより特異的に解析可能な SNP タイピングを確立して感染経路の推定や詳細な分子疫学を可能にすることが重要と考えられた。

ベトナム北部の炭疽流行地域（Dien Bien 省）をモデル調査地として、患者の感染源調査を行っているが、家畜・環境から炭疽菌を分離できていない。患者からの菌分離には成功していることから、環境からの検出法の改良と、炭疽発生時にどのように家畜や環境検体を採取するかについての検討が必要と考えられた。また、北部の炭疽流行地（Dien Bien）はラオスと中国に隣接しており近隣国で発生している炭疽についても同様の解析を行ってベトナム北部の炭疽多発地域における感染源や流行形態の詳細を明らかにしていくことが重要と考えられた。

E. 結論

ベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）との狂犬病及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、NIHE の狂犬病ラボ（ウイルス部・Dr. Nguyen Thi Kieu Anh）と炭疽ラボ（細菌部・Dr. Hoan Thi Thu Ha）と共同して、当該病原体の検査・同定法の開発、分離株の分子疫学による当該感染症の流行形態や発生状況の解析等を行った。

本研究により、日本国内での発生は希少であるが発生時に大きな社会的混乱が予想される

狂犬病や炭疽等の動物由来感染症では、最新の流行形態や課題、検査法の確立、公衆衛生対策に必要な啓発手法等を開発するために、近隣の感染研相当機関と連携してラボラトリーネットワークを活用した調査・研究等を展開することの意義とその重要性が示された。

F . 研究発表

A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) Japanese Journal of Infectious Diseases 2011;4:345-348.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo G.C., Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., K.X.D., Nguyen van D., Phan T.X., Pham B.Q., Nguyen H.T. and Nguyen H.T.H. (2011) Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009). Jpn.J.Infect.Dis. 64:391-396.

Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G., Nguyen van D., Nguyen T.T.H., Pham Q.B., Inoue S., Yamada A., Dinh K.X., Nguyen T.H.H., Nguyen T.H. (2010) Characterization nucleoprotein of isolated rabies virus in Vietnam 2006-2009", Journal of Preventive Medicine, Vietnam. Volume XX, 6:164 - 170.

Inoue, S. The clinical signs and diagnosis of animal rabies. Training Program for Rabies Laboratory Diagnosis. ESRM in NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

Inoue, S. Brain operation of rabies suspected dog for taking samples, packaging and transporting to the laboratory. ESRM in

NIHE, 26-30 September 2011, Hanoi, Vietnam.

井上 智. 事例 3：狂犬病の発生様式、5：感染症の疫学事例、16 章：感染症の疫学。獣疫学・第 2 版 (Veterinary Epidemiology 2nd edition)。獣疫学会編。近代出版。p131、2011

井上 智. 18. ラブドウイルスと感染症。第 3 章 II. ウイルス学各論。獣医微生物学 (第 3 版)。監修：見上 彪。編集：関崎 勉、高井 伸二、堀本泰介、望月雅美。文永堂出版、p231-238、2011

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピングについて。第 11 回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2011、11 月 5 日、国立感染症研究所、東京都

Manalo D.L., Tuason L., Jarilla B., Avenido E., Demetria C., Quiambao BP., Acosta L.P., Noguchi A., Bazartseren B., Sugaira N., Kaku Y. and Inoue S. Optimization Procedures of the Production of Rabies Polyclonal Antibodies as Reagent for Direct Rapid Immunohistochemical Test (DRIT). Conference for Laboratory Animal Sciences and Technologies 2012. 24-26 May, 2012. . Beppu international convention center, Japan.

Inoue S., Shigematsu, M., Sato M., Muranaka S., Masukawa H., Sugiyama K., Kobayashi M., Imabayashi A., Watanabe T., Suzuki A., Minami, H. Surveillance: Encompassing public health to your animal companion! 15th International Congress on Infectious Diseases. Organized by the International Society for Infectious Diseases. 13-16 June, 2012. Bangkok, Thailand.

Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of central nervous

system in CVS-11 infected mice showing signs of paralysis. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases. The Japna-US Cooperative Medical Science Program. 19-20 June, 2012. Beppu, Japan.

Inoue S., Uda A., Sugiura N., and Park C.-H. Microarray analysis of CNS in mice showing signs of paralysis after the intramuscular inoculation of RV (CVS-11 strain). The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Neurovirology. Symposium "Current Progress in Enterovirus 71 Research in The Asia-Pacific Region". 30-31 Aug, 2012. NIID, Tokyo, Japan.

Thi Thu Ha Hoang, Satoshi Inoue, Akiko Okutani, Dang Duc Anh, Thanh Hai Pham, Thuy Tram Nguyen, and Tran Hien Nguyen. Anthrax cases report in Vietnam - An update. 1-2 Dec, 2012. SAOHUN (The southeast Asian One Health university network) executive board meeting supported by RESPOND-USAID, Bali, Indonesia.

Inoue, S. Zoonosis: Rabies. Conferaence and workshop on "From zoonosis to the Chiang Mai model towards rabies free zone", 26-27 April 2012, Chiang Mai University, Thailand.

Inoue, S. "The prevention of rabies in Japan". A Contingency Plan of Rabies in Japan. 2012 Rabies Conference in China, 17-18 May 2012, Beijing, China.

Inoue, S. Clinical signs and symptoms of rabies in animals (Theory and video on dog rabies, the notes of clinical diagnosis). Enhancement of quality of rabies control and prevention. National program for rabies control and prevention - NIHE and JICA project on enhancement of communicable disease control and prevention for PMS with

NIID and WHO experts. 4-6 July 2012, Thai Nguyen Province, Vietnam.

奥谷晶子。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的解析について。シンポジウム：忍び寄る人獣共通病原体。第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月、千葉県

奥谷晶子、井上 智。アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピング。特集：人と動物の共通感染症最前線 9。獣医畜産新報 (JVM)。65:374-376、2012

杉下摩由璃、山田健太郎、小宮尚之、久保達也、小嶋大亮、Boonsriroj Hassadin、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。病原性の異なる狂犬病ウイルス (強毒株 1088-N0 と弱毒株 1088-N30) を筋肉内接種した ddY マウスの末梢神経系 (脳を除く頭部) に関する比較病理学的研究。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県

朴 天鎬、山田健太郎、小宮尚之、久保達也、小嶋大亮、井上 智、西園 晃。病原性の異なる狂犬病ウイルス (強毒株 1088-N0 と弱毒株 1088-N30) を筋肉内接種した ddY マウスの中樞神経系に関する比較病理学的研究。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県

加来義浩、野口 章、濱本紀子、Bazartseren Boldbaatar、佐藤 豪、森川 茂、井上 智。分泌型アルカリフォスファターゼ発現 VSV シュードタイプを利用した狂犬病ウイルス中和試験法の開発。第 154 回日本獣医学会学術集会、2012、9 月、岩手大学、岩手県

飛梅 実、井上 智、野口 章、濱本紀子、長谷川秀樹。狂犬病ウイルス抗原の口腔内局在の病理学的探索。第 60 回ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日-15 日、大阪国際会議場、大阪府

Saito, M., Oshitani, H., Orbina, J.R.C., Tohma, T., de Guzman A.S., Kamigaki, T., Demetria, C.S., Manalo, D.L., Noguchi, A., Inoue, S., Quiambao, B.P. (2013) Genetic Diversity and Geographic Distribution of Genetically Distinct Rabies Viruses in the Philippines. PLoS Ne.Trop.Dis., 7 e2144

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.

Petsophonsakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul C., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. IMED 2013. 15-18 Feb, 2013. Vienna, Austria.

Hoang H.T.T., Okutani A., Inoue S., Pham H.T., Dang A.D., Nguyen T.T., Dang H.N., and Nguyen H.T. Anthrax outbreaks and B.anthraxis isolation in Vietnam, issues of public health. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.

Okutani A., Tungalag K., Tserennorov D., Bazartseren B., Hoang H.T.T., Nguyen H.T., and Inoue S. Novel genotyping by SNPS selected from genome-wide analysis of B.anthraxis isolation in Japan and Mongolia. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.

Petsophonsakul W., Jaisuda S., Yodgomleo A., Srijun M., Phornwisedsirikun S., Munepo

M., Atuntee T., Noguchi A., and Inoue S. A Chiang Mai model for the humane management of rabies control at borders between the forest and city. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.

Nguyen A.T.K., Nguyen T.T., Noguchi A., Nguyen D.V., Ngo G.C., Thong V.D., Olowokure B., and Inoue S. Survey for bat lyssaviruses in northern Vietnam. The 4th Rabies in Asia conference: RIACON 2013. 11-13 Sep, 2013. Bangkok, Thailand.

Park, C.H., Yamada, K., Kojima, D., Hassadin, B., Kimitsuki, K., Inoue, S., Nishizono, A. Pathological Study on the Central Nerve System of ddY Mice Intramuscularly Infected with Street Rabies Virus (1088 Strain). 24th the Rabies in the Americas (RITA). 27-31 Oct, 2013. Toronto, Ontario, Canada.

濱本紀子、飛梅実、加来義浩、宇田晶彦、朴天鎬、野口章、森川茂、井上智。狂犬病ウイルス固定毒 (CVS-26 株) で見られる G 蛋白質 204 番目の N 型糖鎖付加は固定毒に特徴的な細胞からの出芽に関与している。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

飛梅 実、佐藤由子、長谷川秀樹、濱本紀子、井上 智、野口 章。街上毒狂犬病ウイルスの宿主動物内局在の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日-12 日、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県

グエン トウイズオン、河原 正浩、加来 義浩、井上 智、長棟 輝行。増殖誘導型キメラ受容体を用いた狂犬病ウイルス核タンパク質に対するイントラボディ選択。第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日-20 日、広島国際会議場、広島県

小宮拓巳、山田健太郎、君付和範、井上 智、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-N4 14)に感染後耐過した ddY マウスの中枢神経系に関する病理学的研究。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県

君付和範、小宮拓巳、井上 智、山田健太郎、西園 晃、朴 天鎬。狂犬病ウイルス(1088-N0)を後肢筋肉内に接種したヌードマウスの中枢神経系および末梢組織病変。第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県

Nguyen Thi Kieu Anh, Nguyen Vinh Dong, Nguyen Tuyet Thu, Satoshi Inoue, Ngo Chau Giang, Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Tran Hien. Genetic characterization of rabies virus circulated in Vietnam, 2007- 2012. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 9 月 20 日-22 日、岐阜大学、岐阜県

G . 知的所有権の取得状況

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

平成23年度-25年度

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「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（H23 - 新興—指定—020）」班

総合研究報告書

ヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究におけ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

研究分担者：大野秀明

国立感染症研究所 真菌部 室長

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

Nanthawan Mekha, Natteewan Poonwan (The National Institute of Health, Thailand),

Pojana Sriburee (Chiang Mai University, Thailand),

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)

研究要旨：地域流行型真菌症であるヒストプラズマ症に関して、タイ国立衛生研究所、ベトナム国立衛生疫学研究所との基礎的、臨床的共同研究を行った。ヒストプラズマ属生息調査として、タイ・バンコク周辺で収集したコウモリ糞汚染土壌から PCR 法でヒストプラズマ属 DNA が検出され、本症の重要な感染源の一つと疑われた。一方、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では、提出された 258 検体中 9 検体がヒストプラズマ属特異的 PCR 法で陽性を示した。また、血清中の抗ヒストプラズマ抗体の保有状況の検討では、144 検体中 26 検体で抗体陽性と判定された。我々の検討から、ベトナムは他の東南アジア地域と同様にヒストプラズマ症の流行地域であり、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壌中に生息し、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ー川流域や中南米、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、日本人現地居住者、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・発展主要内容として、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し、日本ならびにアジア諸国の公衆衛生に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

ネットワーク構築対象のアジアの感染症研究機関として、タイ王国の国立衛生研究所 (The National Institute of Health : NIH, Thailand)、チェンマイ大学 (医学部微生物学講座) ならびにベトナム社会主義共和国の国立衛生疫学研究所 (National Institute of Hygiene and Epidemiology: NIHE,

Vietnam) とし、ヒストプラズマ症に関する共同研究やラボラトリーネットワークについて検討を行った。

1) タイにおけるヒストプラズマ症の実態調査、生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定

生息調査に関しては、タイ NIH のスタッフと共同で、タイ・バンコク周辺の環境検体 (土壌) を対象として、培養法、遺伝子検出法を用いて検討を行った。

) 培養法

ヒストプラズマ属が存在すると考えられるコウモリや鳥類の糞で汚染された土壌を採取し、クロラムフェニコール含有 PBS に懸濁した後振盪攪拌し、1-3 時間静置した上清を一部採取し brain heart infusion 培地へ塗布し、30℃ で 8 週間培養した。

) 遺伝子検出法

対象検体は培養法に供した検体とし、PBS に懸濁した上清を proteinase K 処理、 β グルカナーゼ処理し、フェノール・クロロフォルム法で DNA 抽出した。遺伝子検出には我々が用いているヒストプラズマ属の M antigen を標的とする nested PCR 法を適用し、プライマーはすでに報告した (Ohno H, et al. J Infect Chemother, 2013) Msp1F、Msp2R を first PCR で、Msp2F、Msp3R を second PCR で用い、反応条件も同様に準じた。

2) ベトナムにおけるヒストプラズマ症の基礎的、臨床的研究

平成 24 年度から 25 年度にかけ、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。

) 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

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培養検査、遺伝子検査、抗体検査を実施した。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)、血清診断法を行った。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)を行い、また血清診断法についても我々が診断目的で使用しているキット(Histoplasma DxSelect,

Focus Diagnostics, Cypress, CA)を用いて抗ヒストプラズマ抗体の有無を検出した。

) ヒストプラズマ属生息状況に関する調査
ハノイ市内ならびに近郊の公共エリア、住宅地、病院周辺、洞窟などで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。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。

(倫理面からの配慮について)

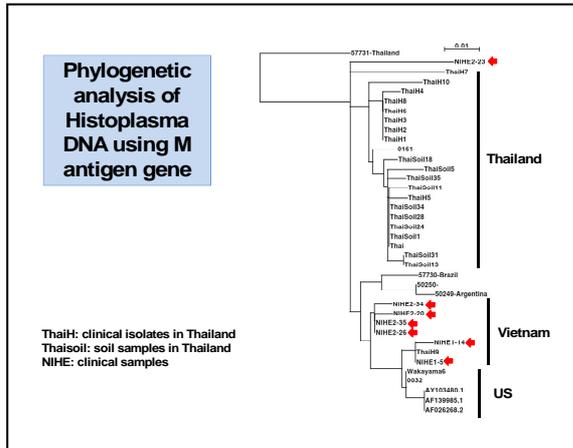
環境検体採取に関しては、研究目的、内容を土地所有者等に説明し許可を得て採取した。本検討においては NIHE の倫理委員会(No.01 IRB)ならびに国立感染症研究所倫理委員会(No.365, No.460)の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

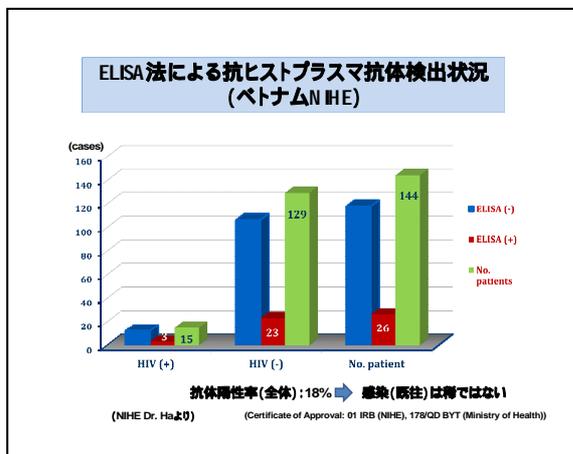
1) タイにおけるヒストプラズマ症の実態調査、生息状況に関する調査、環境リスク因子の同定

タイ NIH の真菌研究室のスタッフとともに、タイ・バンコク近郊の4地域を対象に(図1)、おもに公共の場所(寺院境内など)を中心にコウモリの糞で汚染された土壌を採取し、ヒストプラズマ属の培養、遺伝子検出を行った。土壌検体は計36検体採取し、培養結果はいずれも陰性であったが、14検体(39%)でヒストプラズマ検出用 PCR が陽性であった(図2)。陽性検体については塩基配列の確認を行ったところ、*Ajellomyces capsulatus* と 97-99%の相同性が確認された。

(図 5)



(図 6)



ヒストプラズマ属生息状況に関する調査

本年度は現在まで、コウモリ糞や家禽類の糞汚染土壌検体計 152 検体が採取された。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 3 例で確認された。

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されている。東南アジア、とくにタイでは HIV 感染者を中心に比較的高い頻度で認められる真菌症である。本感染症は基本的にヒト - ヒ

ト感染がないことや、培養陽性率が極めて低いことから診断が困難である。日本人ヒストプラズマ症患者の中には、東南アジアでの感染であることが考えられている症例もあるが、感染危険因子、ハイリスクな自然環境などの情報は不足していると言っても良い。

今回われわれは上記のような背景から、タイ、ベトナム両国の感染症担当研究機関と接触を行い、ヒストプラズマ症に対する総合的な対策の一環として、基礎的、臨床的共同研究の提案を行い、合意を得ることに至った。

両国とも感染源、リザーバーの同定はほとんど検討されておらず、今回タイ国での公共利用の土地の土壌検体を中心にヒストプラズマ属の存在を検証した。その結果、生菌は証明できなかったものの、多くの検体で菌遺伝子の存在が認められた。この結果は、バンコク近郊においてヒストプラズマ属は特殊な環境ではなく、日常的に人間が生活する空間に生息していることが推測され、感染源、感染経路解明、感染対策の一助となる可能性がある。

一方、ベトナムにおいては本症の疫学情報の不足が認められる。このような背景から、ベトナムにおけるヒストプラズマ症の実態や感染源と考えられる環境の検討を行った。

本検討では、気管支肺胞洗浄液検体から初めて PCR 法でヒストプラズマ属 DNA 陽性となった検体が認められた。これら陽性例はすべて培養法陰性であったが、臨床所見や PCR 産物の解析からヒストプラズマ症と診断できると考えられる。すなわちベトナム北部における、微生物学的検査成績をともなった初のヒストプラズマ症例となる。この事実、ベ

トナムにおいても呼吸器感染症としてのヒストプラズマ症は決して稀ではない深在性真菌症であることが伺われ、今回同時に検討した抗体検出率の値もこの点を支持しているものとする。また、M 抗原遺伝子の一塩基多型解析では、タイ型とは離れ、むしろ米国型に近いクレードを形成することが認められることから、東南アジアにおけるヒストプラズマ属の遺伝的多型性を示唆する結果が認められたことは興味深いと考えられた。今後、更なる症例の蓄積が求められる。

さらに本研究では、ヒストプラズマ属の感染源となりうる環境の検討も行ったが、3 検体のみで PCR 法が陽性であった。これについて一定の見解はまだ付与できないと考えるが、我々のタイでの検討の結果を考慮すると、ベトナムにおいても家禽類の糞汚染土壌が感染源である可能性は高い。

本研究は日本とベトナムとの真菌症に関する共同研究の先駆けでもあり、今後継続的な研究体制を維持しながら発展させていくことが重要と考えられる。

E. 結論

タイ・バンコク近郊において複数の公共地点の土壌からヒストプラズマ属の遺伝子と考えられる遺伝子が検出され、感染源となりうる可能性が考えられた。また、ハノイ市を中心とする北部ベトナムにおいて、急性呼吸器感染症が疑われる症例から得られた臨床検体中に、ヒストプラズマ属の遺伝子が検出された症例を経験した。また、抗ヒストプラズマ抗体保有状況の検討から、この地域における

ヒストプラズマ症は決してまれな真菌症ではないことが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Tomita H, Muroi E, Takenaka M, Nishimoto K, Takeya H, Ohno H, Miyazaki Y, Utani A. *Rhizomucor variabilis* infection in human cutaneous mucromycosis. Clin Exp Dermatol 36: 312-314, 2011.
- 2) Kobayashi T, Takeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. Jpn J Infect Dis 64: 292-296, 2011.
- 3) Kimura M, Araoka H, Uchida N, Ohno H, Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. *Cunninghamella bertholletiae* pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation. Med Mycol 50: 412-416, 2012.
- 4) Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A,

- Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol* 50: 631-636, 2012.
- 5) Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y, Maesaki S. A first report of *Rothia aeria* endocarditis complicated by cerebral hemorrhage. *Internal Medicine* 51: 3295-3299, 2012 .
- 6) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol* 51: 252-260, 2013.
- 7) Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. Serum cholesterol promotes the growth of *Candida glabrata* in the presence of fluconazole. *J Infect Chemother* 19: 138-143, 2013.
- 8) Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M. Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol* 93: 187-188, 2013.
- 9) Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66: 51-55, 2013.
- 10) Nagi M, Tanabe K, Ueno K, Nakayama H, Aoyama T, Chibana H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Ohno H, Kajiwara S, Miyazaki Y. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Mol Microbiol* 88 (2): 371-381, 2013.
- 11) Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, Ohno H, Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y. The mannan of *Candida albicans* lacking β -1, 2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol* 51: 385-395, 2013.
- 12) Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J Infect Chemother* 19 (5): 999-1003, 2013.
- 13) Kaneko Y, Miyagawa S, Takeda O, Hakariya M, Matsumoto S, Ohno H, Miyazaki Y. Real-time microscopic observation of *Candida* biofilm development and effects due to micafungin and fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2226-2230, 2013.

- 14) Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K. Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. Jpn J Infect Dis 66: 216-221, 2013.
- 15) Kaneko Y, Fukazawa H, Ohno H, Miyazaki Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. J Infect Chemother 19 (6): 1141-1145, 2013.
- 16) Okubo Y, Tochigi N, Wakayama M, Shinozaki M, Nakayama H, Ishiwatari T, Shimodaira K, Nemoto T, Ohno H, Kaneko Y, Makimura K, Uchida K, Miyazaki Y, Yamaguchi H and Shibuya K. How histopathology can contribute to an understanding of defense mechanisms against Cryptococci. Mediators of Inflammation, volume 2013, article ID 465319, 2013.
- 17) Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand by nested PCR. Mycopathologia 176 (5): 395-402, 2013.
- 18) 大野秀明. 中枢神経系真菌感染症における最近の動向. 最新医学 66: 997-1004, 2011.
- 19) 大野秀明. 髄膜炎、脳炎. 新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使い方のすべて (Medical Practice 臨時増刊号). 文光堂、352-358、東京、2011.
- 20) 大野秀明、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染症 -新興・再興感染症 up to date-. 化学療法の領域 29 S-1: 1144-1151, 2013.
- 21) 大野秀明. 結核感染症の病態-結核発症の危険因子とは?-. 治療 95 (6): 1159-1163, 2013.
- 22) 大野秀明、荒岡秀樹、梅山 隆、金子幸弘、宮崎義継. 接合菌症. 臨床検査 58 (1): 97-103, 2014.
- 学会発表
国際学会
- 1) Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Berlin, 2012.
- 2) Umeyama T, Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y. Multi-locus sequence typing epidemiology of *Cryptococcus neoformans* strains clinically isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.
- 3) Tanabe K, Ohno H, Umeyama T,

Yamagoe S, Chibana H, Miyazaki Y. Genetic analysis of echinocandin-resistant *Candida glabrata* isolated in Japan. 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 11-15, 2012, Berlin, Germany.

4) Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Muraosa Y, Toyotome T, Ohno H, Miyazaki Y. Epidemiology of imported mycoses in Japan-its past and the present status. 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, Yokohama, 2013.

5) Sriburee P, Puengchan T, Ohno H, Tanabe K, Siriaunkul S, Lamaroon A, Chanwong S, Khamwan C, Khantawa B, Miyazaki Y. Early diagnosis of histoplasmosis by nested PCR. 6th Trends in Medical Mycology, Copenhagen, 2013.

6) Tanabe K, Ohno H, Hoang Thi Thu Ha, Nguyen Thuy Tram, Miyazaki Y. Histoplasmosis. NIID-NIHE review meeting on collaborative research program, Hanoi, 2013.

国内学会

1) 大野秀明. 高病原性クリプトコックス症の現状とその病態. ワークショップ 3、深在性真菌症の新たな展開 - 重症例、難治症例の病態と治療 - 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011.

2) 大野秀明、大川原明子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、泉川公一、藤井

毅、竹村 弘、岸 一馬、河野 茂、宮崎義継. 日本国内で分離された *Cryptococcus* 属臨床分離株の血清型解析と抗真菌薬に対する感受性動向. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会、山形、2011.

3) 大野秀明、宮崎義継. 真菌症診断の現状と課題. 第 128 回 ICD 講習会、東京、2011.

4) 大野秀明、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、杉田 隆、畠山修司、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. 本邦初の北米流行型 *Cryptococcus gattii* 臨床分離株の実験的病原性解析. 第 55 回日本医真菌学会学術集会、東京、2011.

5) 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、宮崎義継. 国内で初めて分離された VGIIa 型 *Cryptococcus gattii* 株の薬剤感受性と病原性についての検討. 第 59 回日本化学療法学会総会、札幌、2011.

6) 大野秀明、田辺公一、杉田 隆、畠山修司、大久保陽一郎、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、金城雄樹、渋谷和俊、亀井克彦、宮崎義継. 北米流行型 *Cryptococcus gattii* 株の病原性、病原因子の解析-国内臨床分離株を中心に-. 第 86 回日本感染症学会総会、4 月 25 , 26 日、長崎、2012.

7) 渋谷和俊、大久保陽一郎、大野秀明、宮崎義継、田辺公一、金子幸弘、山越 智、梅山 隆、安藤常浩、若山 恵. *Cryptococcus gattii* 感染症における病理組織学的解析. 第 86 回日本感染症学会総会、4 月 25 , 26 日、長崎、2012.

8) 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継. *Aspergillus fumigatus* プロテインキナーゼの特異的阻害による病原性制御. 第 60 回日本化学療法学会総会、4 月 26、27 日、長崎、2012.

9) 木村雅友、大野秀明、梅山 隆、宮崎義継. アスペルギルスとクリプトコックスによる肺混合感染の 2 手術例. 第 56 回日本医真菌学会学術集会、11 月 10、11 日、東京、2012.

10) 大久保陽一郎、大野秀明、篠崎 稔、宮崎義継、根本哲生、若山 恵、栃木直文、笹井大督、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、職 玉珠、北原加奈子、山本慶郎、渋谷和俊. マウス肺クリプトコッカス症モデルを用いた感染防御ならびに構築変換の解析. 第 56 回日本医真菌学会学術集会、11 月 10、11 日、東京、2012.

11) 大野秀明、宮崎義継. 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩-真菌性脳髄膜炎の遺伝子診断-(シンポジウム). 第 54 回日本神経学会学術大会、5 月 29 日-6 月 1 日、東京、2013.

12) 秋根 大、加藤幹朗、辻 浩史、榎村浩一、大野秀明、小林裕幸. 2 cases of cryptococcal meningitis in HIV-uninfected healthy patients. 第 87 回日本感染症学会、第 61 回日本化学療法学会総会合同学会、6 月 5 日-6 日、横浜、2013.

13) 大久保陽一郎、大野秀明、篠崎 稔、宮崎義継、根本哲生、若山 恵、栃木直文、石渡誉郎、中山晴雄、下平佳代子、安藝恭子、田辺公一、金子幸弘、梅山 隆、山越 智、渋谷和俊. ガッティ型クリプトコックス症に

関する感染防御機構ならびに病原因子の解析. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27 - 28 日、東京、2013.

14) 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山隆、山越 智、名木 稔、知花博治、亀井克彦、宮崎義継. 日本のキャンディン耐性カンジダの現状. 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27 - 28 日、東京、2013.

15) 大野秀明、大久保陽一郎、金子幸弘、田辺公一、梅山 隆、山越 智、亀井克彦、渋谷和俊、宮崎義継. *Cryptococcus gattii* 感染書の病態解析 (シンポジウム 4). 第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、9 月 27 - 28 日、東京、2013.

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

***Clostridium difficile* 感染症の信頼性の高い細菌学的検査システムの確立と
アジアにおける *C. difficile* 感染実態調査**

Establishment of a reliable system for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection and molecular epidemiology of *C. difficile* infection in Asia

研究分担者 加藤はる (国立感染症研究所 細菌第二部)
Haru Kato (Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases)

【研究要旨】ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE)がハノイ市内の4医療機関と *Clostridium difficile* 感染症(CDI)の研究をするためにネットワーク構築を行い、NIHEにおいて *C. difficile* 分離培養が開始された。ハノイの医療機関は、抗菌薬適正使用が行われていない、病棟で複数患者が1ベッドを共有するなど過密な状況で感染管理が難しい等により、*C. difficile* 高病原性株の発生源・温床となりやすいと考えられた。ベトナムにおける CDI の感染実態調査および疫学調査は急務であると考えられた。

新しい細菌学的検査法として、RT-PCR法を用いた *C. difficile* 毒素遺伝子検出法の開発・評価を行った。検討検体数を増やす必要があるが、本法は、臨床検査として使用でき、さらに *C. difficile* による感染と無症候キャリアを区別できうる画期的検査法と考えられた。

【Summary】A network of National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) and 4 healthcare facilities in Hanoi has been successfully constructed to investigate epidemiology of *Clostridium difficile* infection (CDI) in Hanoi and *C. difficile* culture was started in NIHE. Healthcare facilities in Hanoi, where antimicrobial stewardship program and infection control are not adequately performed, has a high potential to be a new source and hotbed of hypervirulent strains, such as BI/NAP1/027. Further study is urgent to investigate current status and epidemiology of CDI in Viet Nam.

A novel method detecting vegetative cells of *C. difficile* from fecal specimens by amplifying the repeating sequences of toxin A gene by reverse transcription PCR (RT-PCR) was established and evaluated. The method could be used for clinical examination and has potential to distinguish between *C. difficile* infection and asymptomatic colonization with *C. difficile*.

研究協力者

妹尾充敏 Mitsutoshi Senoh	国立感染症研究所 細菌第二部, Department of Bacteriology II, National
福田靖 Tadashi Fukuda	Institute of Infectious Diseases
柴山恵吾 Keigo Shibayama	
Vu Thi Thu Huong Tăng Thị Nga Lê Thị Trang Tham Chi Dung	Department of Bacteriology National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Hanoi, VietNam

A. 研究目的

Clostridium difficile は抗菌薬関連下痢症・腸炎の主要な原因菌である。ベトナムでは、医師処方箋なしで抗菌薬の購入が可能であり、抗菌薬使用ガイドラインもないため、抗菌薬の使用の乱用・多用が懸念され、従って *C. difficile* 感染症(CDI)症例数が多いと推測される。しかし、CDIの臨床検査はまったく行われていないため、その感染実態についてはまったく情報がない。本研究の第一の目

的は、ベトナム NIHE において、CDI の細菌学的検査システムを確立することである。

一方、欧米では特に 2000 年以降の症例数の急激な増加に伴い、CDI は、いっそう注目されている。世界各地で米国をその発生源と報告される高病原性株 BI/NAP1/027 の分布や伝播を含めて、疫学的検討が進んでいるところであるが、ベトナムを含め、アジアにおける CDI の疫学については非常に情報に乏しい。本研究では、ベトナム、ハノイ市の協力医療機関入院症例から分離された *C. difficile* 菌株の解析に加え、その臨床背景も含めて検討し、感染実態を調査する足がかりとする。

C. difficile は、重症感染症を引き起こすことがある反面、無症候キャリアも多く、診断が難しい場合が少なくない。本研究では、遺伝子学的手法を用いた、より臨床病態を反映できる、新しい細菌学的検査法を開発評価することを目的のひとつとする。

B. 研究方法

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査シ

ステムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学

- (a) 2012 年 7 月 29 日から 8 月 5 日まで、国立感染症研究所で、NIHE の Vu Thi Thu Huong に CDI の細菌学的検査の技術講習を行った。
- (b) ハノイ市の 4 病院、National Hospital of Infectious Diseases、Tropical Infectious Hospital、Dong Da Hospital、National Hospital of Geriatrics、および Bac Mai Hospital とのネットワーク構築を行い、糞便検体収集と *C. difficile* 分離培養が NIHE で開始された。
- (c) 2013 年 1 月 16 日から 1 月 21 日まで、および、2013 年 10 月 27 日から 11 月 1 日まで、研究分担者がベトナムへ出張し NIHE を訪問した。研究分担者が実験室現場で、実際の実験内容について確認作業を行い、さらに、今後の研究計画について話し合った。また、協力医療機関のうち、National Hospital of Geriatrics、Dong Da Hospital、および Bac Mai Hospital を訪問し、医師との意見交換および病棟内の見学をした。
- (d) NIHE において分離した *C. difficile* 17 菌株からの DNA 抽出サンプルが、国立感染症研究所へ送付され、国立感染症研究所において、PCR による毒素遺伝子検出、PCR ribotyping を行った。
- (e) NIHE において分離された *C. difficile* 36 菌株が NIID に送付され、同定確認と毒素遺伝子検出を行った。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

- (a) RT-PCR によって栄養型の毒素産生性 *C. difficile* だけを選択的に検出する方法の開発を行った。まず、毒素遺伝子検出の RT-PCR 条件検討を行った。PCR primer は toxin A 遺伝子配列から選んだプライマー、NK3-NK2 (J Clin Microbiol, 1991, 29, 33-7)を使用した。
- (b) 便検体中の *C. difficile* 毒素遺伝子を検出できるか否か検討するため、栄養型 *C. difficile* を含む便検体、芽胞 *C. difficile* を含む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体を調製して実験を行った。各検体から RNA を抽出し、(a)で得られた結果を元に RT-PCR を行った。
- (c) 44 臨床検体から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。従来の検査法である毒素産生性 *C. difficile* 分離培養法、酵素抗体法によるグルタメートデヒドロゲナーゼ(GDH)検出、酵素抗体法による糞便中毒素 (toxin A/toxin B) 検出および、PCR 法による毒素遺伝子検出の 4 法による結果と比較した。

倫理面への配慮

「*Clostridium difficile* 医療関連感染に関する研究」は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認された (受付 114)。

C. 結果

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学
 - (a) Vu Thi Thu Huong が、嫌気培養法の基本的手技、糞便検体からの *C. difficile* の分離培養、同定、菌株保存、さらに、PCR による毒素遺伝子検出などの基本的技術を習得した。
 - (b) ハノイ市内の 4 医療機関入院症例から採取した糞便検体の収集と、NIHE 研究室において *C. difficile* の分離培養が開始された。最初の 2 例は症例報告がなされた。
 - (c) NIHE 研究室では、NIHE における実験結果と国立感染症研究所における実験結果の乖離を中心に、基本的技術ステップを見直し、一部実験プロトコルを改訂した。医療機関では、ひとつのベッドが複数の患者により共用され、標準予防策が十分に行われることができない状況であった。
 - (d) NIHE より送付された DNA 抽出物 17 サンプルにおいて、5 サンプルが toxin A 陽性 toxin B 陽性、5 サンプルが toxin A 陰性 toxin B 陽性、6 サンプルが toxin A 陰性 toxin B 陰性であり、残りの 1 サンプルは PCR によって同定できなかった。Binary toxin 遺伝子が検出されたサンプルはなかった。toxin A 陽性 toxin B 陽性と同定された 5 サンプルのうち、3 サンプルで同一バンドパターンを認めたが、日本で頻繁に分離されるタイプではなかった。この 3 サンプル (3 株) は異なる 3 医療機関由来であった。toxin A 陰性 toxin B 陽性と同定された 5 サンプルのうち 4 サンプルで、PCR ribotype 017 と同一パターンであった。
 - (e) NIHE において分離された *C. difficile* 36 菌株において PCR による毒素遺伝子検出を行ったところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められなかった。Toxin A 陽性 toxin B 陽性が 13 株、toxin A 陰性 toxin B 陽性株が 10 株、toxin A 陰性 toxin B 陰性株が 13 株であった。医療機関別では、Tropical Infectious Hospital では toxin A 陰性 toxin B 陽性株が多く、Bac Mai Hospital では toxin A 陽性 toxin B 陽性株が多かった (表 1)。
2. 新しい細菌学的検査法の開発
 - (a) *C. difficile* 毒素遺伝子検出の RT-PCR の条件検討を行ったところ、逆転写反応は 30 で 10 分間反応させた後、42 で 20 分間反応させることにより、良好な結果が得られることが分かった。また、一反応系に必要な RNA 量は > 200 fg であった (図 1)。
 - (b) 便検体から直接 RNA を抽出する方法として、フェノール・クロロホルムによる抽出法が高純度で収量も多かった。栄養型 *C. difficile* を含む便検体、芽胞 *C. difficile* を含

む便検体、死菌 *C. difficile* を含む便検体からそれぞれ RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、本法では栄養型 *C. difficile* を含む便検体のみ陽性の結果が得られた(図 2)。

- (c) 検討した 44 検体中、12 検体で 5 検査法すべてにおいて陽性、22 検体で 5 検査法すべてにおいて陰性であり、計 34 検体で結果が一致した(表 2)。3 検体では酵素抗体法による結果のみが陰性であった。4 検体において、PCR 陽性、毒素産生性 *C. difficile* 分離培養陽性、酵素抗体法による GDH 検出陽性であったが、酵素抗体法による毒素陰性であり、RT-PCR による毒素遺伝子検出も陰性であった。残る 3 検体では GDH のみ検出され、毒素陰性 *C. difficile* が分離された。

D. 考察

1. NIHE 研究室における *C. difficile* 細菌学的検査システムの構築とハノイにおける CDI 分子疫学ベトナムで今までまったく行われていなかった嫌気培養および *C. difficile* 培養検査が、NIHE で開始されたことは大きな進展であった。特に、NIHE がハノイ市内の医療機関とネットワークを組み、協力しながらシステム構築を進めたことは非常に評価できる。一方、基本的な細菌学的実験技術は、継続して見直していく必要があると考えられた。

欧米では、2000 年以降の高病原性株 BI/NAP1/027 による大流行が注目されている。BI/NAP1/027 株は、フルオロキノロン耐性獲得を含む遺伝子変異が認められた菌株が、米国をその発生源として世界中に伝播していき、疫学的に大きな影響を及ぼしたとされている。ハノイ市内の 4 医療機関分離株では現在のところ、binary toxin 遺伝子陽性株は認められておらず、binary toxin 陽性の BI/NAP1/027 株が流行している可能性は低いように考えられる。しかし、検討菌株数が少なく限られたデータであるが、検討された toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 5 菌株中 3 株が同一タイプで、現在まで欧米や日本で流行株として報告されたタイプではなかったこと、さらに、本 3 株は異なる 3 医療機関由来であったことが注目された。抗菌薬適正使用がなされておらず、病棟病床が過密で有効な感染対策が困難なハノイの医療機関が、CDI の温床になっていることは想像に難くない。新しい高病原性株の発生源・温床となりうるハノイ市内の医療機関における調査は、アジア、世界にとっても重要であると考えられた。

2. 新しい細菌学的検査法の開発

CDI であるのか、他の原因で下痢・腸炎で同時に *C. difficile* を消化管保有しているだけであるのかを細菌学的検査によって区別できれば、治療を考える上で有用である。近年、real-time PCR などにより糞便中毒素遺伝子を検出するキットが利用されはじめているが、無症候キャリアにおいても陽性結果が出るため過剰診断ではないかという報告が認められる。検討症例数を増やし、臨床病態との関連を調べる必要があるが、本研究で開発した RT-PCR により糞便中の毒素 RNA を検出する方法は、CDI と無症候キャリアを区別しうる画期的な検査法と考えられた。

E. 結論

NIHE とハノイ市内の 4 医療機関がネットワークを構築し、今まで情報のなかったベトナムにおける CDI の感染実態および分子疫学についての調査検討が開始された。

RT-PCR によって栄養型の毒素産生性 *C. difficile* だけを選択的に検出する方法の開発を行った。本法は、*C. difficile* による感染症と無症候キャリアを区別しうる画期的な新規検査法と考えられた。

F. 健康危機情報

C. difficile は米国 CDC から "urgent threat" として警告されている。CDI アウトブレイク発生の条件がそろっているベトナムにおいて、CDI 感染実態を調べることは urgent であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hie. Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of *Clostridium difficile* A- B+ and *Clostridium difficile* A+ B+ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012. Journal of Preventive Medicine 22 (5), p. 81-90 (in Vietnamese).

2. 学会発表

- Mitsutoshi Senoh, Haru Kato, Keigo Shibayama. Rapid detection method of live *Clostridium difficile*. 4th International *Clostridium difficile* Symposium. Slovenia, 2012 Sept.
- 妹尾充敏、加藤はる 栄養型毒素産生性 *Clostridium difficile* の新規検査法の開発 第 28 回日本環境感染学会総会 横浜 2013 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . ハノイ市内 4 医療機関で分離された 36 菌株の毒素産生性検討結果

Hospital	Toxin production of isolates			Total
	A ⁺ B ⁺	A ⁻ B ⁺	A ⁻ B ⁻	
National Geriatric Hospital	2*	1	3	6
Tropical Infectious Hospital	1	5	5	11
Đống Đa Hospital	1	1	1	3
Bạch Mai Hospital	9	3	4	16
Total	13	10	13	36

A⁺B⁺, toxin A-positive, toxin B-positive; A⁻B⁺, toxin A-negative, toxin B-positive; A⁻B⁻, toxin A-negative, toxin B-negative; *number of isolates recovered.

図 1 . 異なる量の RNA を添加して行った RT-PCR の結果

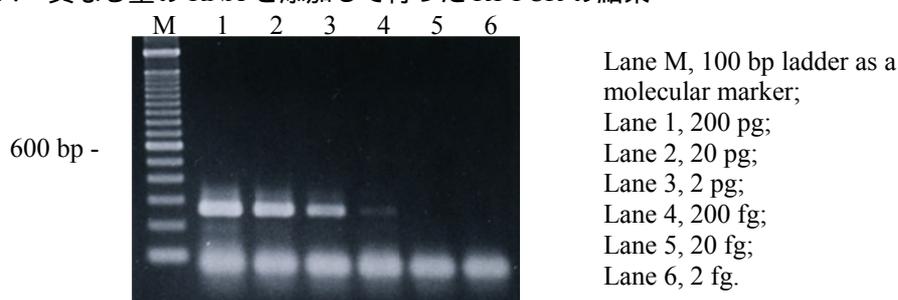


図 2 . 栄養型、芽胞、死菌の *C. difficile* を含む糞便検体から抽出した RNA における RT-PCR の結果

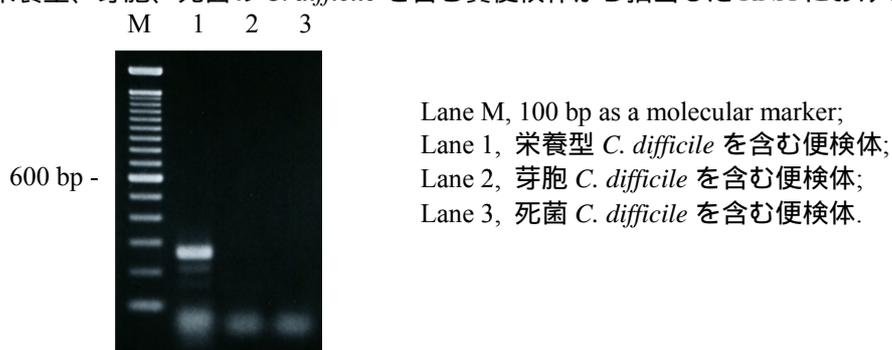


表 2 . 44 臨床検体における RT-PCR および PCR による *tcdA* 検出、毒素産生性 *C. difficile* 培養、酵素抗体法による GDH および毒素(toxins A & B)検出結果の比較

Number of stool specimens	RT-PCR	PCR	Toxigenic culture	EIA for	
				GDH	Toxins A/B
12	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
1	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-
3	-	-	-	+	-
22	-	-	-	-	-

GDH, glutamate dehydrogenase; * non-toxigenic *C. difficile* was isolated from 3 specimens.

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成24年度)

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行 年
プロジェクト1：中国					
Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA Kew O.	Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria.	J Virol		(in press)	
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y.	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation.	J Virol	87	701-705	2012
Nishimura Y, Shimizu H.	Cellular receptors for human enterovirus species a.	Front Microbiol	3	105	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N,	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6,	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012

Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Japan, 2011.				
Sun Q, Zhang Y, Zhu S, Cui H, Tian H, Yan D, Huang G, Zhu Z, Wang D, Li X, Jiang H, An H Xu W.	Complete genome sequence of two coxsackievirus A1 strains that were cytotoxic to human rhabdomyosarcoma cells.	J Virol	86	10228-10229	2012
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		(印刷中)	2013
清水博之	手足口病、特集「感染症動向2013」	メディカル朝日	1	28-30	2012
清水博之	手足口病の問題点	小児科	53	751-758	2012
増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之.	国内外における手足口病流行に関するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析.	病原微生物検出情報	33	60-61	2012
藤本嗣人,花岡希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田弘, 清水博之.	2011 年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子配列.	病原微生物検出情報	33	61-62	2012
武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之.	手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査(2010年分)―中間集計結果.	病原微生物検出情報	33	63-64	2012
清水博之	手足口病(エンテロウイルス 71)ワクチン開発の現状.	病原微生物検出情報	33	65-66	2012
<u>Shimizu H</u> (分担執筆)	A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)	WHO report			2011
Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F	Working Group for <i>Legionella</i> in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 isolates derived	Appl Environ Microbiol.	12	4263-70.	2012

	from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan.				
Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda, Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi ,	the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease.	Vaccine.	31	845-849	2013
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.	Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008.	J Virol.	87(2)	1105-1114	2013
Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa, Kiyoshi Tanabayashia .	Detection of <i>Francisella tularensis</i> -specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay.	Clinical and Vaccine Immunology		(in press)	2012
Satoshi Taniguchi, Yusuke Sayama, Noriyo Nagata, Tetsuro Ikegami, Mary E Miranda, Shumpei Watanabe, Itoe Iizuka, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Yoshiyuki Ishii, Masayuki Saijo, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa and Shigeru Morikawa.	Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines.	BMC Veterinary Research,	Oct 11 8(1)	189	2012
Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa.	Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers.	Viruses (special issue: Arenaviruses)	Oct 12 4(10)	2097-114	2012
Harutaka Katano, Seiichi Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Tetsuya Mizutani, Makoto Kuroda.	Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease.	Int J Clin Exp Pathol	5(8)	814-823	2012

Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S.	A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines.	BMC Vet Res.	Jun 18 8	82	2012
Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T.	The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine.	J Virol.	Jul 86(14)	7650-61	2012
Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies.	J Virol Methods.	Mar 180(1-2)	68-74	2012
Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW.	Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea.	Virology.	Mar 15 424(2)	99-105	2012
Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN.	Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults.	J Inf Dis	204(9)	1395-402	2011
Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T.	Detection of bat coronaviruses from <i>Miniopterus fuliginosus</i> in Japan.	Virus Genes	Feb 44(1)	40-4	2012
<u>Nakayama, S.</u> , Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srfuengfung, S., Unemo, M., and	Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing <i>Neisseria</i>	Antimicrob. Agents Chemoter.	56	916-920	2012.

Ohnishi, M.	gonorrhoeae isolates in Bangkok, Thailand.				
-------------	--	--	--	--	--

プロジェクト2：台湾					
Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Kaw Bing Chua, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Ichiro Kurane.	Dengue Virus Infection-Enhancing Activity in Serum Samples with Neutralizing Activity as Determined by Using FcγR-Expressing Cells.	Plos Neglected Tropical Diseases.	6(2)	e1536.	2012
Yasutaka Mizuno, Yasuyuki Kato, Shigeyuki Kano, <u>Tomohiko Takasaki</u> .	Imported malaria and dengue fever in returned travelers in Japan from 2005 to 2010.	Travel Medicine and Infectious Diseases.	10	86-91	2012
Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, <u>Takasaki T</u> .	Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum.	J Clin Microbiol.	Jun 50(6)	2047-2052	2012
Tsutomu Omatsu, Meng Ling Moi, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Shinichiro Nakamura, Yuko Katakai, Shigeru Tajima, Mikako Ito, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari & Ichiro Kurane.	Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (Callithrix jacchus) after inoculation with dengue virus.	J Med Primatol		1-8	2012
Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, <u>Takasaki T</u> , Kanagawa S.	Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan.	J Travel Med.	Jul 19(4)	255-257	2012
Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, <u>Takasaki T</u> , Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R.	A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.	J Immunol Methods.	384(1-2)	81-91	2012
Yamaguchi Y, Nukui Y, Kotaki A, Sawabe K, Saijo M, Watanabe H, Kurane I, <u>Takasaki T</u> , Tajima S.	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	J Gen Virol.	94(1)	90-96.	2013.

Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, <u>Takasaki T</u> , Rerkamnuaychoke W, Maeda K.	Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs.	J Virol Methods.	187(1)	85-89	2013
Kazuo Nakamichi, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada, Shuji Kishida, Yoshiharu Miura, Toshio Shimokawa, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Chang-Kweng Lim, Ichiro Kurane and Masayuki Saijo.	Characteristics of progressive multifocal leuko-encephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan.	BMC Neurology.	12	121	2012
Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, <u>Takasaki T</u> , Ogasawara Y, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K.	Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a Japanese traveler after returning from Thailand.	J Travel Med.	20(1)	50-53	2013
Moi ML, <u>Takasaki T</u> , Saijo M, Kurane I.	Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection.	Trans R Soc Trop Med Hyg.	107(1)	51-58.	2013.
Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, <u>K. Kobayashi</u> , and S. Matsumoto.	Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain <i>Mycobacterium intracellulare</i> M.i.198.	J. Bacteriol.	194	6336	2012
Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, <u>K. Kobayashi</u> , and S. Matsumoto.	A novel mechanism underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria.	J. Biol. Chem.	287	27743-27752	2012
Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, <u>K. Kobayashi</u> , Y. Suzuki, and S. Matsumoto.	Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clones in Osaka prefecture, Japan.	PLoS One	7	e42505	2012
松村隆之、阿戸 学、 <u>小林和夫</u> .	解説 .結核および非結核性抗酸菌感染症の診断 .	リウマチ科	47	427-435	2012

小林和夫, 松村隆之, 阿戸 学	解説 .結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題 .	JBSA Newsletter	2 (3)	6-10	2012
麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優二, 手塚貴文, 塚田弘樹.	血液培養から分離された <i>Brucella melitensis</i> の一症例.	医学検査	61(5)	902 -907	2012
Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H.	Cutting Edge: <i>Brucella abortus</i> exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J.	Immunol.,	189	1540-1544	2012
今岡浩一, 木村昌伸	日本におけるブルセラ症 - 感染症法施行前 (1999年3月31日) まで	病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局	33(7)	186-187	2012
今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉	台湾におけるブルセラ症 - 33年ぶりの患者報告と届出疾患へ	病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局,	33(7)	193-194	2012
今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋	ブルセラ症 -ブルセラ症検査マニュアル -2012	病原体検査マニュアル(国立感染症研究所, 地方衛生研究所全国協議会編			2012
今岡浩一	ブルセラ症の現状	化学療法の領域, 医薬ジャーナル社	28(12)	138-148	2012
Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K.	Bronchitis caused by <i>Bordetella holmesii</i> in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection.	J Infect Chemter,	[Epub ahead of print]		
Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K.	Simple and specific detection of <i>Bordetella holmesii</i> by using a loop-mediated isothermal amplification assay.	Microbiol Immunol	56	486-9	2012

プロジェクト3 : インド

Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and <u>Nozaki, T.</u>	Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite <i>Entamoeba histolytica</i> .	PLoS Negl. Trop. Dis.	6	e1831	2012
Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., <u>Nozaki, T.</u> , Zhang, K. Y., and Bhakuni, V.	Novel protein-protein interactions between <i>Entamoeba histolytica</i> d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase.	Biochimie	94	1676-1686	2012
Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, <u>Matano T.</u>	Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques.	J Virol	86	6481-6490	2012
Nomura T, <u>Matano T.</u>	Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections.	Front Microbio	3	234	2012
Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, <u>Matano T.</u>	A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques.	PLoS ONE	8	e54300	2013

プロジェクト4 : ベトナム

<u>Koizumi N.</u> , Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y.	A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of <i>Leptospira</i> spp. in urine.	J Clin Microbiol	50	2072-2074	2012.
Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA,	Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived	J Virol		(in press)	

Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA Kew O.	Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria.				
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y.	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation.	J Virol	87	701-705	2012
Nishimura Y, Shimizu H.	Cellular receptors for human enterovirus species a.	Front Microbiol	3	105	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011.	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012
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	(印刷中)		2013
清水博之	手足口病、特集「感染症動向2013」	メディカル朝日	1	28-30	2012
清水博之	手足口病の問題点	小児科	53	751-758	2012

増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之.	国内外における手足口病流行に 関与するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析.	病原微生物検 出情報	33	60-61	2012
藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之.	2011 年に手足口病患者から検出 されたコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子配列.	病原微生物検 出情報	33	60-61	2012
武知茉莉亜、乾未来、福島若葉、中野貴司、清水博之.	手足口病・ヘルパンギーナおよび 関連合併症の入院症例に関する 全国調査(2010 年分)ー中間集 計結果.	病原微生物検 出情報	33	63-64	2012
清水博之	手足口病(エンテロウイルス 71) ワクチン開発の現状.	病原微生物検 出情報	33	65-66	2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3)	268-70	2012
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4)	705-10	2012
Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y.	Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin.	Biochem Biophys Res Commun.	3 418(1)	38-43	2012
Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	87(1)	666-75	2012
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.	Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008.	J Virol.	87(2)	1105-14	2013
Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N,	Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type	Microbiol immunol	Jan 22	[Epub ahead of	2013

Komase K, Takeda M.	strains using loop - mediated isothermal amplification (LAMP).			print]	
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M.	The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.	J Virol	Jan 2	[Epub ahead of print]	
駒瀬勝啓	Q & A 麻疹検査診断法	日本医事新報	4605	57-59	2012
駒瀬勝啓、竹田誠	麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状	臨床と微生物	39(6)	656-662	2012
駒瀬勝啓	麻疹ワクチン、風疹ワクチンの品質管理	臨床とウイルス	40(5)	334-341	2012
奥谷晶子、井上 智	アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピング。特集：人と動物の共通感染症最前線 9	獣医畜産新報 (JVM)	65	374-376	2012
Kimura M, Araoka H, Uchida N, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Tanigichi S, Yoneyama A.	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation.	Med Mycol	50	412-416	2012
Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S.	A case of bronchial aspergillosis caused by <i>Aspergillus udagawae</i> and its mycological features.	Med Mycol	50	631-636	2012
Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Akiyama M.	Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. Acta Derm Venereol,	(DOI: 10.2340/000155-1385)			2012
Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, <u>Ohno H</u> , Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S.	Multilocus sequence typing of <i>Cryptococcus neoformans</i> in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan.	Med Mycol (doi:10.3109/13693786.2012.708883)		1-9 Posted online	17 Aug 2012
Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Maesaki S.	A first report of <i>Rothia aeria</i> endocarditis complicated by cerebral hemorrhage.	Internal Medicine	51	3295-3299	2012

Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, <u>Ohno H</u> , Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y.	The mannan of <i>Candida albicans</i> lacking β -1, 2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells.	Med Mycol.	(doi:10.3109/13693786.2012.733892)	Posted online	Oct. 29, 2012.
Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, <u>Ohno H</u> , Kajiwara S, Miyazaki Y.	Serum cholesterol promotes the growth of <i>Candida glabrata</i> in the presence of fluconazole.	J Infect Chemother.		(in press)	2013
Umeyama T, <u>Ohno H</u> , Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y.	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing.	Jpn J Infect Dis.		(in press)	2013
<u>Ohno H</u> , Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y.	Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis.	J Infect Chemother.		(in press)	2013
Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hie.	Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of <i>Clostridium difficile</i> A- B+ and <i>Clostridium difficile</i> A+ B+ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012.	Journal of Preventive Medicine (in Vietnamese)	22 (5)	81-90	2012
<u>Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. J. Clin.</u>	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	Microbiol.	Jan 51(1)	373-4	2013
鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子 吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾	わが国における NDM 型および KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離状況、2012 年現在	病原体微生物 検出情報 (IASR)	34(1)	8-9	2013

研究成果の刊行に関する一覧表（平成25年度）

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行 年
Wachino J, Matsui M, Hoang TH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K.	Evaluation of a Double-Disk Synergy test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii	Jpn J Infect Dis		in press	2014
Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyoizumi-Ajisaka H, Kamachi K.	Bronchitis caused by <i>Bordetella holmesii</i> in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection.	J Infect Chemter,	19	534-7	2013
Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K.	Simple and specific detection of <i>Bordetella holmesii</i> by using a loop-mediated isothermal amplification assay.	Microbiol Immunol	56	486-9	2012
麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優 二, 手塚貴文, 塚田弘樹	血液培養から分離された <i>Brucella melitensis</i> の一症例	医学検査	61(5)	902-907	2012
Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H.	Cutting Edge: <i>Brucella abortus</i> exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor.	J. Immunol.	189	1540-1544	2012
今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉	台湾におけるブルセラ症 - 33 年ぶりの患者報告と届出疾患 へ -	病原微生物検 出情報	33(7)	193-194	2012
今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋	ブルセラ症-ブルセラ症検査マ ニュアル-2012	病原体検査マ ニュアル			2012
今岡浩一	ブルセラ症の現状	化学療法の領 域	28(12)	138-148	2012
水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳 子, 松村藍, 山本智美, 木村昌	東京都における犬の抗 <i>Brucella canis</i> 抗体保有状況	日本獣医師会 雑誌	67(3)	(in Press)	2014

伸, 今岡浩一					
Morita M., Yamamoto S., Hiyoshi H., Kodama T., Okura M., Arakawa E., Alam M., Ohnishi M., Izumiya H., Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiology and Immunology	57(5)	334-339	2013
Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, Toru Shigeoka, Takayuki Tominaga, Toshiaki Kamei, Masahiro Honda, Daisuke Ninomiya, Takenori Sakai, Noriyo Nagata, Harutaka Katano, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo.	The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan.	Journal of Infectious Diseases,		in press	2014
Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T.	A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit.	Jpn J Infect Dis.	66(6)	564-6	2013
Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S.	A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with Fab from neutralizing antibody.	J Virol.	87(21)	11363-70	2013
Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H.	Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction.	PLoS Pathog.	9(7)	e1003511	2013
Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T	Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan.	Jpn J Infect Dis.	66(3)	260-1	2013
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K,	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by	J Virol	87	701-705	2012

Koyanagi Y	experimental-mathematical investigation.				
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011.	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T.	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T	Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996–2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells.	Jpn J Infect Dis	64	167-168	2011
Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H	Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1.	J Gen Virol	92	287-291	2011
Shimizu H et al. (分担執筆)	A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)	WHO report			2011
Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S.	Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an	Antiviral Res.	91	64-71	2011

	intrabody against the viral phosphoprotein.				
Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G, Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., Dinh, K.X., Nguyen van D., Phan X.T., Pham Q.B., Nguyen H.T. and Nguyen T.H.H.	Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009)	Jpn.J.Infect.Dis	64	391-396	2011
Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A.	Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice.	Jpn.J.Infect.Dis	64	463-472	2011
Yamada K., Park C.-H., NoguchiK., Kojima D., Kubo T., Komiya N., Matsumoto T., Mitsui M.T., Ahmed K., Morimoto K., Inoue S., Nishizono A.	Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus.	Virus Res.	165	34-45	2012
M. Kai, N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda and M. Makino.	Characteristic mutations found in the ML0411 gene of <i>Mycobacterium leprae</i> isolated in Northeast Asian countries.	Infection, Genetics and Evolution	Vol. 19	200-204	2013
Nakata N., Kai M., Makino M.	Mutation Analysis of Mycobacterial <i>rpoB</i> Genes and Rifampin Resistance Using Recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Antimicrobial Agent Chemother.	Vol.56	2008-2013	2012
Maeda Y., Tamura T., Fukutomi Y., Mukai T., Kai M., and Makino M.	A lipopeptide facilitate induction of <i>Mycobacterium leprae</i> killing in host cells	PLoS Neglected Tropical Diseases	5	e1401	2011
Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T.	FTA Card Utility for PCR Detection of <i>Mycobacterium leprae</i> .	Jpn J Infect Dis	Vol. 64	246-248	2011
Kai M., Ngyyen Phvc N. H.,	Analysis of drug-resistant strains	Clin Infect Dis	52	e127-e132	2011

Ngvyen H. A., Pham T. H., Ngvyen K. H., Miyamoto Y., Maeda Y., Fukutomi Y., Nakata N., Matsuoka M., Makino M., and Ngvyen T. T.	of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.				
Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V.	Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of <i>Mycobacterium leprae</i> drug resistance mutations and strain types.	J Clin Microbiol	Vol.50	742-753	2011
Kai M. Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K.	Leprosy chapter 9 Serology.	Tokai University Press		108-115	2011
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K., Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M.	The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.	J Virol.	87	3583-6	2013
Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M.	Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells.	J Virol.	87	4683-93	2013
Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK , Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	Oct 31		2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3)	268-70	2012
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4)	705-10	2012
Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M.	The SI Strain of Measles Virus Derived From an SSPE Patient Possesses Typical Genome Alterations and Unique Amino Acid Changes that Modulate	J Virol.	Sep 14		2011

	Receptor Specificity and Reduce Membrane Fusion Activity.				
Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP.	A simple approach to obtain comparable <i>Shigella sonnei</i> MLVA results across laboratories.	Int J Med Microbiol.	303(8)	678-84	2013
Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.	Genomic analysis of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg Infect Dis.	19(5)	823-5	2013
Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiol Immunol.	57(5)	334-9	2013
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT.	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	J Clin Microbiol.	51(1)	373-4.	2013
Chowdhury G, Pazhani GP, Dutta D, Guin S, Dutta S, Ghosh S, Izumiya H, Asakura M, Yamasaki S, Takeda Y, Arakawa E, Watanabe H, Mukhopadhyay AK, Bhattacharya MK, Rajendran K, Nair GB, Ramamurthy T.	<i>Vibrio fluvialis</i> in patients with diarrhea, Kolkata, India.	Emerg Infect Dis.	18(11)	1868-71	2012
Sithivong N, Morita-Ishihara T, Vongdouangchanh A, Phouthavane T, Chomlasak K, Sisavath L, Khamphaphongphane B, Sengkeoprasedh B, Vongprachanh P, Keosavanh O, Southalack K, Jiyoung L, Tsuyuoka R, Ohnishi M, Izumiya H.	Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010.	Emerg Infect Dis.	17(11)	2060-2	2011
Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamamoto S, Arakawa E, Ohnishi M.	Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic <i>Vibrio</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , and <i>Vibrio</i>	MolCell Probes.	25(4)	174-6	2011

	<i>vulnificus</i> .				
Yamamoto S, Izumiya H, Mitobe J, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Watanabe H.	Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the <i>tfoX</i> gene, encoding a positive regulator of natural competence in <i>Vibrio cholerae</i> .	J Bacteriol.	193(8)	1953-65	2011
Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hien.	Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of <i>Clostridium difficile</i> A ⁻ B ⁺ and <i>Clostridium difficile</i> A ⁺ B ⁺ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012.	Journal of Preventive Medicine (in Vietnamese)	22 (5)	81-90	2012
Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8 ⁺ T cells.	J Virol,		in press	
Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques.	J Virol	86	6481-6490	2012
Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T.	Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques.	J Virol	86	738-745	2012
Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK,	Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge.	Biochem Biophys Res Commun	408	615-619	2011

Kimura A, Matano T.					
Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y.	Detection of environmental sources of <i>Histoplasma capsulatum</i> in Chiang Mai, Thailand by nested PCR.	Mycopathologia,	(8)	article ID 465319	2013
Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K.	Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Jpn J Infect Dis	66	216-221	2013
Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y.	Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis.	J Infect Chemother 19	(5)	999-1003	2013
Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y.	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing.	Jpn J Infect Dis	66	51-55	2013
Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M.	Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid.	Acta Derm Venereol	93 (3)	187-188	2013
Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrunroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S.	Multilocus sequence typing of <i>Cryptococcus neoformans</i> in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan.	Med Mycol	51 (3)	252-260	2013
Shu, C.C.*, Ato, M.*, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., Kobayashi, K., Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work)	Sero-diagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan.	PLoS One	8(11)	e80473	2013
Fukuda, T.*, Matsumura, T.*, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K.	Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis.	mBio	4(1)	e00472-12	2013

Kobayashi, Kinoshita T, Y.S. Morita (*T.F. and T.M. contributed equally to this work)					
Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, and S. Matsumoto.	Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain <i>Mycobacterium intracellulare</i> M.i.198.	J. Bacteriol.	194	6336	2012
Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto.	Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clones in Osaka prefecture, Japan.	PLoS One	7(8)	e42505	2012
Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., Katayama, K.	Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells.	Antiviral Res.	vol.90	9-16	2011
Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K.	Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases.	Microbiol Immunol.	Vol. 55	108-14	2011
Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H.	Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan.	Letters in applied microbiology.	Vol. 52	181-4	2011
Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D.	Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability.	Journal of virology	vol. 85	6687-701	2011
Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	Journal of virology	vol. 86	284-92	2012
Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park,	Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site	Journal of virology	vol. 86	3635-3646	2012

Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata, and Peter D. Kwong.	Occluded in the Viral Particle				
Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, Qihong Wang, Linda J. Saif, and Kazuhiko Katayama.	A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011.	Arch Virol (online)	DOI 10.1007	s00705-012 -1387-7	2012
Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.	Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus.	Exp Anim.	vol. 61	35-40	2012
Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K.	Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences.	Arch Virol	Vol.157	349-52	2012
Tyler M Sharp, Sue E Crawford, Nadim J Ajami, Frederick Neill, Robert L Atmar, Kazuhiko Katayama, Budi Utama, Mary K Estes.	Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses.	Virology Journal	9	181	2012
Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama.	Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction .	Microbiol Immunol.	56	630–638	2012
Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda and Hironori Sato.	Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease.	Frontiers in Microbiology	3	1-10	2012
Motohiro Miki and Kazuhiko Katayama.	<i>In silico</i> 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism.	Frontiers in Microbiology	3	1-6	2012

Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T.	Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles.	Microbiol Immunol.	56(11)	760-770	2012
Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T.	Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients.	Jpn J Infect Dis.	66(5)	454-7	2013
Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T.	Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing.	J Vet Med Sci.		[Epub ahead of print]	2013
Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K.	Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens.	PLoS One.	8(6)	e66534	2013
Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M.	Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping.	Arch Virol.	158(10)	2059-68	2013
Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T.	Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams.	Food Environ Virol.	5(2)	119-25	2013

研究成果の刊行に関する一覧表 (平成24年度)

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行 年
プロジェクト1：中国					
Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA Kew O.	Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria.	J Virol		(in press)	
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y.	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation.	J Virol	87	701-705	2012
Nishimura Y, Shimizu H.	Cellular receptors for human enterovirus species a.	Front Microbiol	3	105	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N,	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6,	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012

Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Japan, 2011.				
Sun Q, Zhang Y, Zhu S, Cui H, Tian H, Yan D, Huang G, Zhu Z, Wang D, Li X, Jiang H, An H Xu W.	Complete genome sequence of two coxsackievirus A1 strains that were cytotoxic to human rhabdomyosarcoma cells.	J Virol	86	10228-10229	2012
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		(印刷中)	2013
清水博之	手足口病、特集「感染症動向2013」	メディカル朝日	1	28-30	2012
清水博之	手足口病の問題点	小児科	53	751-758	2012
増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之.	国内外における手足口病流行に関するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析.	病原微生物検出情報	33	60-61	2012
藤本嗣人,花岡希, 小長谷昌未, 岡部信彦, 榎本美貴, 小林正明, 吉田弘, 清水博之.	2011 年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子配列.	病原微生物検出情報	33	61-62	2012
武知茉莉亜, 乾未来, 福島若葉, 中野貴司, 清水博之.	手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査(2010年分)―中間集計結果.	病原微生物検出情報	33	63-64	2012
清水博之	手足口病(エンテロウイルス 71)ワクチン開発の現状.	病原微生物検出情報	33	65-66	2012
Shimizu H(分担執筆)	A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)	WHO report			2011
Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhata K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F	Working Group for <i>Legionella</i> in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among <i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1 isolates derived	Appl Environ Microbiol.	12	4263-70.	2012

	from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan.				
Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda, Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi ,	the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease.	Vaccine.	31	845-849	2013
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.	Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008.	J Virol.	87(2)	1105-1114	2013
Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa, Kiyoshi Tanabayashia .	Detection of <i>Francisella tularensis</i> -specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay.	Clinical and Vaccine Immunology		(in press)	2012
Satoshi Taniguchi, Yusuke Sayama, Noriyo Nagata, Tetsuro Ikegami, Mary E Miranda, Shumpei Watanabe, Itoe Iizuka, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Yoshiyuki Ishii, Masayuki Saijo, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa and Shigeru Morikawa.	Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines.	BMC Veterinary Research,	Oct 11 8(1)	189	2012
Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa.	Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers.	Viruses (special issue: Arenaviruses)	Oct 12 4(10)	2097-114	2012
Harutaka Katano, Seiichi Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Tetsuya Mizutani, Makoto Kuroda.	Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease.	Int J Clin Exp Pathol	5(8)	814-823	2012

Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S.	A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines.	BMC Vet Res.	Jun 18 8	82	2012
Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T.	The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine.	J Virol.	Jul 86(14)	7650-61	2012
Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S.	Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies.	J Virol Methods.	Mar 180(1-2)	68-74	2012
Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW.	Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea.	Virology.	Mar 15 424(2)	99-105	2012
Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perlroth M, and Greenberg RN.	Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults.	J Inf Dis	204(9)	1395-402	2011
Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T.	Detection of bat coronaviruses from <i>Miniopterus fuliginosus</i> in Japan.	Virus Genes	Feb 44(1)	40-4	2012
<u>Nakayama, S.</u> , Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srfuengfung, S., Unemo, M., and	Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing <i>Neisseria</i>	Antimicrob. Agents Chemoter.	56	916-920	2012.

Ohnishi, M.	gonorrhoeae isolates in Bangkok, Thailand.				
-------------	--	--	--	--	--

プロジェクト2：台湾					
Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Kaw Bing Chua, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Ichiro Kurane.	Dengue Virus Infection-Enhancing Activity in Serum Samples with Neutralizing Activity as Determined by Using FcγR-Expressing Cells.	Plos Neglected Tropical Diseases.	6(2)	e1536.	2012
Yasutaka Mizuno, Yasuyuki Kato, Shigeyuki Kano, <u>Tomohiko Takasaki</u> .	Imported malaria and dengue fever in returned travelers in Japan from 2005 to 2010.	Travel Medicine and Infectious Diseases.	10	86-91	2012
Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, <u>Takasaki T</u> .	Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum.	J Clin Microbiol.	Jun 50(6)	2047-2052	2012
Tsutomu Omatsu, Meng Ling Moi, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Shinichiro Nakamura, Yuko Katakai, Shigeru Tajima, Mikako Ito, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari & Ichiro Kurane.	Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (Callithrix jacchus) after inoculation with dengue virus.	J Med Primatol		1-8	2012
Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, <u>Takasaki T</u> , Kanagawa S.	Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan.	J Travel Med.	Jul 19(4)	255-257	2012
Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, <u>Takasaki T</u> , Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R.	A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.	J Immunol Methods.	384(1-2)	81-91	2012
Yamaguchi Y, Nukui Y, Kotaki A, Sawabe K, Saijo M, Watanabe H, Kurane I, <u>Takasaki T</u> , Tajima S.	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	J Gen Virol.	94(1)	90-96.	2013.

Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, <u>Takasaki T</u> , Rerkamnuaychoke W, Maeda K.	Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs.	J Virol Methods.	187(1)	85-89	2013
Kazuo Nakamichi, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada, Shuji Kishida, Yoshiharu Miura, Toshio Shimokawa, <u>Tomohiko Takasaki</u> , Chang-Kweng Lim, Ichiro Kurane and Masayuki Saijo.	Characteristics of progressive multifocal leuko-encephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan.	BMC Neurology.	12	121	2012
Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, <u>Takasaki T</u> , Ogasawara Y, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K.	Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a Japanese traveler after returning from Thailand.	J Travel Med.	20(1)	50-53	2013
Moi ML, <u>Takasaki T</u> , Saijo M, Kurane I.	Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection.	Trans R Soc Trop Med Hyg.	107(1)	51-58.	2013.
Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, <u>K. Kobayashi</u> , and S. Matsumoto.	Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain <i>Mycobacterium intracellulare</i> M.i.198.	J. Bacteriol.	194	6336	2012
Niki, M., M. Niki, Y. Tateishi, Y. Ozeki, T. Kirikae, A. Lewin, Y. Inoue, M. Matsumoto, J. I. Dahl, H. Ogura, <u>K. Kobayashi</u> , and S. Matsumoto.	A novel mechanism underlying growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria.	J. Biol. Chem.	287	27743-27752	2012
Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, <u>K. Kobayashi</u> , Y. Suzuki, and S. Matsumoto.	Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clones in Osaka prefecture, Japan.	PLoS One	7	e42505	2012
松村隆之、阿戸 学、 <u>小林和夫</u> .	解説 .結核および非結核性抗酸菌感染症の診断 .	リウマチ科	47	427-435	2012

小林和夫, 松村隆之, 阿戸 学	解説 .結核や非結核性抗酸菌感染症の動向と最近の話題 .	JBSA Newsletter	2 (3)	6-10	2012
麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優二, 手塚貴文, 塚田弘樹.	血液培養から分離された <i>Brucella melitensis</i> の一症例.	医学検査	61(5)	902 -907	2012
Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H.	Cutting Edge: <i>Brucella abortus</i> exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J.	Immunol.,	189	1540-1544	2012
今岡浩一, 木村昌伸	日本におけるブルセラ症 - 感染症法施行前 (1999年3月31日) まで	病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局	33(7)	186-187	2012
今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉	台湾におけるブルセラ症 - 33年ぶりの患者報告と届出疾患へ	病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局,	33(7)	193-194	2012
今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋	ブルセラ症 -ブルセラ症検査マニュアル -2012	病原体検査マニュアル(国立感染症研究所, 地方衛生研究所全国協議会編			2012
今岡浩一	ブルセラ症の現状	化学療法の領域, 医薬ジャーナル社	28(12)	138-148	2012
Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K.	Bronchitis caused by <i>Bordetella holmesii</i> in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection.	J Infect Chemter,	[Epub ahead of print]		
Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K.	Simple and specific detection of <i>Bordetella holmesii</i> by using a loop-mediated isothermal amplification assay.	Microbiol Immunol	56	486-9	2012

プロジェクト3 : インド

Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and <u>Nozaki, T.</u>	Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite <i>Entamoeba histolytica</i> .	PLoS Negl. Trop. Dis.	6	e1831	2012
Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., <u>Nozaki, T.</u> , Zhang, K. Y., and Bhakuni, V.	Novel protein-protein interactions between <i>Entamoeba histolytica</i> d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase.	Biochimie	94	1676-1686	2012
Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, <u>Matano T.</u>	Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques.	J Virol	86	6481-6490	2012
Nomura T, <u>Matano T.</u>	Association of MHC-I genotypes with disease progression in HIV/SIV infections.	Front Microbio	3	234	2012
Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, <u>Matano T.</u>	A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques.	PLoS ONE	8	e54300	2013

プロジェクト4 : ベトナム

<u>Koizumi N.</u> , Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y.	A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of <i>Leptospira</i> spp. in urine.	J Clin Microbiol	50	2072-2074	2012.
Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA,	Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived	J Virol		(in press)	

Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA Kew O.	Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria.				
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y.	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation.	J Virol	87	701-705	2012
Nishimura Y, Shimizu H.	Cellular receptors for human enterovirus species a.	Front Microbiol	3	105	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011.	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012
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	(印刷中)		2013
清水博之	手足口病、特集「感染症動向2013」	メディカル朝日	1	28-30	2012
清水博之	手足口病の問題点	小児科	53	751-758	2012

増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之.	国内外における手足口病流行に 関与するコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子解析.	病原微生物検 出情報	33	60-61	2012
藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之.	2011 年に手足口病患者から検出 されたコクサッキーウイルス A6 型の遺伝子配列.	病原微生物検 出情報	33	60-61	2012
武知茉莉亜、乾未来、福島若葉、中野貴司、清水博之.	手足口病・ヘルパンギーナおよび 関連合併症の入院症例に関する 全国調査(2010 年分)ー中間集 計結果.	病原微生物検 出情報	33	63-64	2012
清水博之	手足口病(エンテロウイルス 71) ワクチン開発の現状.	病原微生物検 出情報	33	65-66	2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3)	268-70	2012
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4)	705-10	2012
Ohkura T, Kikuchi Y, Kono N, Itamura S, Komase K, Momose F, Morikawa Y.	Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin.	Biochem Biophys Res Commun.	3 418(1)	38-43	2012
Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	87(1)	666-75	2012
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S.	Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008.	J Virol.	87(2)	1105-14	2013
Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N,	Simple method to differentiate measles vaccine from wild-type	Microbiol immunol	Jan 22	[Epub ahead of	2013

Komase K, Takeda M.	strains using loop - mediated isothermal amplification (LAMP).			print]	
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M.	The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.	J Virol	Jan 2	[Epub ahead of print]	
駒瀬勝啓	Q & A 麻疹検査診断法	日本医事新報	4605	57-59	2012
駒瀬勝啓、竹田誠	麻疹、風疹、ムンプスの検査診断の現状	臨床と微生物	39(6)	656-662	2012
駒瀬勝啓	麻疹ワクチン、風疹ワクチンの品質管理	臨床とウイルス	40(5)	334-341	2012
奥谷晶子、井上 智	アジアにおける炭疽の発生状況と遺伝学的タイピング。特集：人と動物の共通感染症最前線 9	獣医畜産新報 (JVM)	65	374-376	2012
Kimura M, Araoka H, Uchida N, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Fujii T, Nishida A, Izutsu K, Wake A, Tanigichi S, Yoneyama A.	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> pneumonia showing a reversed halo sign on chest computed tomography scan following cord blood transplantation.	Med Mycol	50	412-416	2012
Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S.	A case of bronchial aspergillosis caused by <i>Aspergillus udagawae</i> and its mycological features.	Med Mycol	50	631-636	2012
Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Akiyama M.	Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid. Acta Derm Venereol,	(DOI: 10.2340/000155-1385)			2012
Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungrroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, <u>Ohno H</u> , Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S.	Multilocus sequence typing of <i>Cryptococcus neoformans</i> in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan.	Med Mycol (doi:10.3109/13693786.2012.708883)		1-9 Posted online	17 Aug 2012
Tarumoto N, Sujino K, Yamaguchi T, Umeyama T, <u>Ohno H</u> , Miyazaki Y, Maesaki S.	A first report of <i>Rothia aeria</i> endocarditis complicated by cerebral hemorrhage.	Internal Medicine	51	3295-3299	2012

Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, Naka T, Umeyama T, Utena-Abe Y, Tarumoto N, Niimi M, <u>Ohno H</u> , Doe M, Fujiwara N, Kinjo Y, Miyazaki Y.	The mannan of <i>Candida albicans</i> lacking β -1, 2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells.	Med Mycol.	(doi:10.3109/13693786.2012.733892)	Posted online	Oct. 29, 2012.
Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, <u>Ohno H</u> , Kajiwara S, Miyazaki Y.	Serum cholesterol promotes the growth of <i>Candida glabrata</i> in the presence of fluconazole.	J Infect Chemother.		(in press)	2013
Umeyama T, <u>Ohno H</u> , Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y.	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing.	Jpn J Infect Dis.		(in press)	2013
<u>Ohno H</u> , Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y.	Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis.	J Infect Chemother.		(in press)	2013
Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hie.	Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of <i>Clostridium difficile</i> A- B+ and <i>Clostridium difficile</i> A+ B+ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012.	Journal of Preventive Medicine (in Vietnamese)	22 (5)	81-90	2012
<u>Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. J. Clin.</u>	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	Microbiol.	Jan 51(1)	373-4	2013
鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子 吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾	わが国における NDM 型および KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離状況、2012 年現在	病原体微生物 検出情報 (IASR)	34(1)	8-9	2013

研究成果の刊行に関する一覧表（平成25年度）

執筆者氏名	刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行書店名	巻名	ページ	刊行 年
Wachino J, Matsui M, Hoang TH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K.	Evaluation of a Double-Disk Synergy test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii	Jpn J Infect Dis		in press	2014
Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyoizumi-Ajisaka H, Kamachi K.	Bronchitis caused by <i>Bordetella holmesii</i> in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection.	J Infect Chemter,	19	534-7	2013
Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K.	Simple and specific detection of <i>Bordetella holmesii</i> by using a loop-mediated isothermal amplification assay.	Microbiol Immunol	56	486-9	2012
麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優 二, 手塚貴文, 塚田弘樹	血液培養から分離された <i>Brucella melitensis</i> の一症例	医学検査	61(5)	902-907	2012
Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H.	Cutting Edge: <i>Brucella abortus</i> exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor.	J. Immunol.	189	1540-1544	2012
今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉	台湾におけるブルセラ症 - 33 年ぶりの患者報告と届出疾患 へ -	病原微生物検 出情報	33(7)	193-194	2012
今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋	ブルセラ症-ブルセラ症検査マ ニュアル-2012	病原体検査マ ニュアル			2012
今岡浩一	ブルセラ症の現状	化学療法の領 域	28(12)	138-148	2012
水谷浩志, 久保田菜美, 宗村佳 子, 松村藍, 山本智美, 木村昌	東京都における犬の抗 <i>Brucella canis</i> 抗体保有状況	日本獣医師会 雑誌	67(3)	(in Press)	2014

伸, 今岡浩一					
Morita M., Yamamoto S., Hiyoshi H., Kodama T., Okura M., Arakawa E., Alam M., Ohnishi M., Izumiya H., Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiology and Immunology	57(5)	334-339	2013
Toru Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Aki Ishido, Toru Shigeoka, Takayuki Tominaga, Toshiaki Kamei, Masahiro Honda, Daisuke Ninomiya, Takenori Sakai, Noriyo Nagata, Harutaka Katano, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Takuya Yamagishi, Kazunori Oishi, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo.	The First Identification and Retrospective Study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan.	Journal of Infectious Diseases,		in press	2014
Yasui Y, Makino T, Hanaoka N, Owa K, Horikoshi A, Tanaka A, Suehiro Y, Shimizu H, Kanou K, Kobayashi M, Konagaya M, Fujimoto T.	A Case of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6: Differential Diagnosis from Varicella in a Pediatric Intensive Care Unit.	Jpn J Infect Dis.	66(6)	564-6	2013
Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S.	A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with Fab from neutralizing antibody.	J Virol.	87(21)	11363-70	2013
Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H.	Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction.	PLoS Pathog.	9(7)	e1003511	2013
Kobayashi M, Makino T, Hanaoka N, Shimizu H, Enomoto M, Okabe N, Kanou K, Konagaya M, Oishi K, Fujimoto T	Clinical manifestations of coxsackievirus A6 infection associated with a major outbreak of hand, foot, and mouth disease in Japan.	Jpn J Infect Dis.	66(3)	260-1	2013
Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K,	Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by	J Virol	87	701-705	2012

Koyanagi Y	experimental-mathematical investigation.				
Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H	Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011.	Emerg Infect Dis	18	337-339	2012
Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M.	Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen.	J Clin Microbiol	50	1764-1768	2012
Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T.	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Konno M, Yoshioka M, Sugie M, Maguchi T, Nakamura T, Kizawa M, Umegaki Y, Yasutake H, Ishikawa Y, Hanaoka N, Okabe N, Taniguchi T, Shimizu H, Fujimoto T	Fourteen years' surveillance of coxsackievirus group A in Kyoto 1996–2009 using mouse, RD-18S, and Vero Cells.	Jpn J Infect Dis	64	167-168	2011
Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H	Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1.	J Gen Virol	92	287-291	2011
Shimizu H et al. (分担執筆)	A Guide to Clinical management and Public Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD)	WHO report			2011
Kaku Y., Noguchi A., Hotta K., Yamada A., Inoue S.	Inhibition of rabies virus propagation in mouse neuroblastoma cells by an	Antiviral Res.	91	64-71	2011

	intrabody against the viral phosphoprotein.				
Nguyen T.K.A., Nguyen vinh D., Ngo C.G, Nguyen T.T., Inoue S., Yamada A., Dinh, K.X., Nguyen van D., Phan X.T., Pham Q.B., Nguyen H.T. and Nguyen T.H.H.	Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009)	Jpn.J.Infect.Dis	64	391-396	2011
Sugiura N., Uda A., Inoue S., Kojima D., Hamamoto N., Kaku Y., Okutani A., Noguchi A., Park C.-H. and Yamada A.	Gene Expression Analysis of Host Innate Immune Responses in the Central Nervous System following Lethal CVS-11 Infection in mice.	Jpn.J.Infect.Dis	64	463-472	2011
Yamada K., Park C.-H., NoguchiK., Kojima D., Kubo T., Komiya N., Matsumoto T., Mitsui M.T., Ahmed K., Morimoto K., Inoue S., Nishizono A.	Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus.	Virus Res.	165	34-45	2012
M. Kai, N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda and M. Makino.	Characteristic mutations found in the ML0411 gene of <i>Mycobacterium leprae</i> isolated in Northeast Asian countries.	Infection, Genetics and Evolution	Vol. 19	200-204	2013
Nakata N., Kai M., Makino M.	Mutation Analysis of Mycobacterial <i>rpoB</i> Genes and Rifampin Resistance Using Recombinant <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Antimicrobial Agent Chemother.	Vol.56	2008-2013	2012
Maeda Y., Tamura T., Fukutomi Y., Mukai T., Kai M., and Makino M.	A lipopeptide facilitate induction of <i>Mycobacterium leprae</i> killing in host cells	PLoS Neglected Tropical Diseases	5	e1401	2011
Khin S. A., Matsuoka M, Kai M., Kyaw K., Win A. A., Shwe M. M., Thein M., Htoo M. M., & Htoon M. T.	FTA Card Utility for PCR Detection of <i>Mycobacterium leprae</i> .	Jpn J Infect Dis	Vol. 64	246-248	2011
Kai M., Ngyyen Phvc N. H.,	Analysis of drug-resistant strains	Clin Infect Dis	52	e127-e132	2011

Ngvyen H. A., Pham T. H., Ngvyen K. H., Miyamoto Y., Maeda Y., Fukutomi Y., Nakata N., Matsuoka M., Makino M., and Ngvyen T. T.	of <i>Mycobacterium leprae</i> in an endemic area of Vietnam.				
Li W., Matsuoka M., Kai M., Thapa P., Khadge S., Hagge D. A., Brennan P. J., Vissa V.	Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of <i>Mycobacterium leprae</i> drug resistance mutations and strain types.	J Clin Microbiol	Vol.50	742-753	2011
Kai M. Edited by Makino M., Matsuoka M., Gotoh M, and Hatano K.	Leprosy chapter 9 Serology.	Tokai University Press		108-115	2011
Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K., Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, and Takeda M.	The receptor-binding site of the measles virus hemagglutinin protein itself constitutes a conserved neutralizing epitope.	J Virol.	87	3583-6	2013
Nakatsu Y, Ma X, Seki F, Suzuki T, Iwasaki M, Yanagi Y, Komase K, Takeda M.	Intracellular transport of the measles virus ribonucleoprotein complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells.	J Virol.	87	4683-93	2013
Tahara M, Ito Y, Brindley MA, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota PA, Plemper RK , Maenaka K, Takeda M.	Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein.	J Virol.	Oct 31		2012
Watanabe K, Watanabe K, Tazawa T, Kon M, Tamara T, Komase K.	Imported cases of measles in Niigata, Japan in 2011.	Jpn J Infect Dis.	65(3)	268-70	2012
Tran DN, Pham NT, Tran TT, Khamrin P, Thongprachum A, Komase K, Hayakawa Y, Mizuguchi M, Ushijima H.	Phylogenic analysis of rubella viruses in Viet Nam during 2009-2010.	J Med Virol.	84(4)	705-10	2012
Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M.	The SI Strain of Measles Virus Derived From an SSPE Patient Possesses Typical Genome Alterations and Unique Amino Acid Changes that Modulate	J Virol.	Sep 14		2011

	Receptor Specificity and Reduce Membrane Fusion Activity.				
Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP.	A simple approach to obtain comparable <i>Shigella sonnei</i> MLVA results across laboratories.	Int J Med Microbiol.	303(8)	678-84	2013
Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.	Genomic analysis of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg Infect Dis.	19(5)	823-5	2013
Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H.	Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in <i>Vibrio cholerae</i> .	Microbiol Immunol.	57(5)	334-9	2013
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT.	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	J Clin Microbiol.	51(1)	373-4.	2013
Chowdhury G, Pazhani GP, Dutta D, Guin S, Dutta S, Ghosh S, Izumiya H, Asakura M, Yamasaki S, Takeda Y, Arakawa E, Watanabe H, Mukhopadhyay AK, Bhattacharya MK, Rajendran K, Nair GB, Ramamurthy T.	<i>Vibrio fluvialis</i> in patients with diarrhea, Kolkata, India.	Emerg Infect Dis.	18(11)	1868-71	2012
Sithivong N, Morita-Ishihara T, Vongdouangchanh A, Phouthavane T, Chomlasak K, Sisavath L, Khamphaphongphane B, Sengkeoprasedh B, Vongprachanh P, Keosavanh O, Southalack K, Jiyong L, Tsuyuoka R, Ohnishi M, Izumiya H.	Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010.	Emerg Infect Dis.	17(11)	2060-2	2011
Izumiya H, Matsumoto K, Yahiro S, Lee J, Morita M, Yamamoto S, Arakawa E, Ohnishi M.	Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic <i>Vibrio</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , and <i>Vibrio</i>	MolCell Probes.	25(4)	174-6	2011

	<i>vulnificus</i> .				
Yamamoto S, Izumiya H, Mitobe J, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Watanabe H.	Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the <i>tfoX</i> gene, encoding a positive regulator of natural competence in <i>Vibrio cholerae</i> .	J Bacteriol.	193(8)	1953-65	2011
Vu Thi Thu Huong, Nguyen Binh Minh, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Ngo Trong Toan, Tham Chi Dung, Pham Thang, Haru Kato, Mitsutoshi Senoh, Keigo Shibayama and Nguyen Tran Hien.	Case reports of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis caused by 2 bacterial clones of <i>Clostridium difficile</i> A ⁻ B ⁺ and <i>Clostridium difficile</i> A ⁺ B ⁺ in Ha Noi city, Viet Nam. 2012.	Journal of Preventive Medicine (in Vietnamese)	22 (5)	81-90	2012
Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8 ⁺ T cells.	J Virol,		in press	
Nomura T, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T.	Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques.	J Virol	86	6481-6490	2012
Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, Matano T.	Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques.	J Virol	86	738-745	2012
Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK,	Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge.	Biochem Biophys Res Commun	408	615-619	2011

Kimura A, Matano T.					
Norkaew T, Ohno H, Sriburee P, Tanabe K, Tharavichitkul P, Takarn P, Puengchan T, Burmrungsri S, Miyazaki Y.	Detection of environmental sources of <i>Histoplasma capsulatum</i> in Chiang Mai, Thailand by nested PCR.	Mycopathologia,	(8)	article ID 465319	2013
Okubo Y, Wakayama M, Ohno H, Yamamoto S, Tochigi N, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Umeyama T, Shinozaki M, Nemoto T, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Shimodaira K, Yamamoto Y, Kamei K, Miyazaki Y, Shibuya K.	Histopathological study of murine pulmonary cryptococcosis induced by <i>Cryptococcus gattii</i> and <i>Cryptococcus neoformans</i> .	Jpn J Infect Dis	66	216-221	2013
Ohno H, Tanabe K, Umeyama T, Kaneko Y, Yamagoe S, Miyazaki Y.	Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis.	J Infect Chemother 19	(5)	999-1003	2013
Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, Miyazaki Y.	Determination of epidemiology of clinically isolated <i>Cryptococcus neoformans</i> strains in Japan by multilocus sequence typing.	Jpn J Infect Dis	66	51-55	2013
Sugiura K, Sugiura N, Yagi T, Iguchi M, Ohno H, Miyazaki Y, Akiyama M.	Cryptococcal cellulitis in patient with bullous pemphigoid.	Acta Derm Venereol	93 (3)	187-188	2013
Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrunroj P, Umeyama T, Takazono T, Tashiro M, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Ohno H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S.	Multilocus sequence typing of <i>Cryptococcus neoformans</i> in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan.	Med Mycol	51 (3)	252-260	2013
Shu, C.C.*, Ato, M.*, Wang, J.T., Jou, R., Wang, J.Y., Kobayashi, K., Lai, H.C., Yu, C.J., Lee, L.N., K.T., Lue. (*S.C.C. and M.A. contributed equally to this work)	Sero-diagnosis of <i>Mycobacterium avium</i> complex lung disease using serum immunoglobulin A antibody against glycopeptidolipid antigen in Taiwan.	PLoS One	8(11)	e80473	2013
Fukuda, T.*, Matsumura, T.*, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K.	Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis.	mBio	4(1)	e00472-12	2013

Kobayashi, Kinoshita T, Y.S. Morita (*T.F. and T.M. contributed equally to this work)					
Tateishi, Y., S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, and S. Matsumoto.	Whole-genome sequence of the hypervirulent clinical strain <i>Mycobacterium intracellulare</i> M.i.198.	J. Bacteriol.	194	6336	2012
Tamaru, A., C. Nakajima, T. Wada, M. Inoue, R. Kawahara, R. Maekura, Y. Ozeki, H. Ogura, K. Kobayashi, Y. Suzuki, and S. Matsumoto.	Dominant incidence of multidrug and extensively drug-resistant specific <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clones in Osaka prefecture, Japan.	PLoS One	7(8)	e42505	2012
Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Murakami, K., Takeda, N., Wakita, T., Katayama, K.	Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells.	Antiviral Res.	vol.90	9-16	2011
Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K.	Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases.	Microbiol Immunol.	Vol. 55	108-14	2011
Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Phanuwat, C., Takeda, N., Katayama, K., Katayama, H.	Genetic diversity of genogroup IV noroviruses in wastewater in Japan.	Letters in applied microbiology.	Vol. 52	181-4	2011
Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D.	Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability.	Journal of virology	vol. 85	6687-701	2011
Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D.	Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate.	Journal of virology	vol. 86	284-92	2012
Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park,	Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site	Journal of virology	vol. 86	3635-3646	2012

Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata, and Peter D. Kwong.	Occluded in the Viral Particle				
Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, Qihong Wang, Linda J. Saif, and Kazuhiko Katayama.	A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011.	Arch Virol (online)	DOI 10.1007	s00705-012 -1387-7	2012
Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K.	Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus.	Exp Anim.	vol. 61	35-40	2012
Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K.	Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences.	Arch Virol	Vol.157	349-52	2012
Tyler M Sharp, Sue E Crawford, Nadim J Ajami, Frederick Neill, Robert L Atmar, Kazuhiko Katayama, Budi Utama, Mary K Estes.	Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses.	Virology Journal	9	181	2012
Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama.	Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction .	Microbiol Immunol.	56	630–638	2012
Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda and Hironori Sato.	Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease.	Frontiers in Microbiology	3	1-10	2012
Motohiro Miki and Kazuhiko Katayama.	<i>In silico</i> 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism.	Frontiers in Microbiology	3	1-6	2012

Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T.	Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles.	Microbiol Immunol.	56(11)	760-770	2012
Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T.	Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients.	Jpn J Infect Dis.	66(5)	454-7	2013
Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T.	Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing.	J Vet Med Sci.		[Epub ahead of print]	2013
Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K.	Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens.	PLoS One.	8(6)	e66534	2013
Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M.	Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping.	Arch Virol.	158(10)	2059-68	2013
Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T.	Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams.	Food Environ Virol.	5(2)	119-25	2013