

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

委託業務成果報告（総括）

**海外研究機関等との感染症に関する共同研究および
連携強化に関する研究**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

平成 27 年 3 月

研究代表者

倉根 一郎

（国立感染症研究所）

目 次

・委託業務成果報告（総括）

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

・委託業務成果報告（業務項目）

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

・学会等発表実績・・・77

厚生労働科学研究委託費(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
委託業務成果報告(総括)

海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化に関する研究

業務主任者 倉根一郎(国立感染症研究所副所長)

研究要旨

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

研究分担者：

大石和徳 国立感染症研究所感染症疫学センター センター長
大西真 国立感染症研究所細菌第一部 部長
小田切孝人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター センター長
片山和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
黒田誠 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター・センター長
西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部 部長
柴山恵吾 国立感染症研究所細菌第二部

部長

高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第一部 部長
長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長
宮川昭二 国立感染症研究所国際協力室 部長(平成26年10月19日まで研究分担者)

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

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

1. 研修全体計画

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

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

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

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

2. カウンターパート研修

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

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

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

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

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

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

(1) エボラウイルス感染症実験室診断技術研修

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

(2) 感染症制御セミナー

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

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

(3) カウンターパート研修

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

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

(4) その他

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

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

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

3. 蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発

に関する研究

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

4. 下痢原性病原細菌に関する研究

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

5. 下痢症ウイルスの高感度検出法の確立と分子疫学に関する共同研究

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

6. 海外研究機関研究員の研修に関する研究

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

7. アジア地域の研究者向け薬剤耐性菌の検出、分子疫学、ゲノム解析の研修

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

8. 病原体ゲノム情報の取得とデータベース運用

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

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

9 . チクングニアウイルス遺伝子型間共通迅速診断法の開発

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

10 . アジアにおける感染症病理診断ネットワークに関する研究

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

D . 考察

感染症には国境はなく、一国で発生した感染症の病原体は、ヒトあるいは物を

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

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

E . 結論

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

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

F . 健康危険情報
なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

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

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

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

2 . 学会発表
国際学会

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

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

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

国内学会

高崎智彦 . 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会

高崎智彦 . デング熱国内発生への対応 - デング熱の基礎と疫学 - . 第 46 回日本小児感染症学会 . 平成 26 年 10 月 18 - 19 日 (東京)

高崎智彦 . 緊急企画 : 70 年を経ての再来 ~ デング熱国内流行 2014 . 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 . 平成 26 年 10 月 23 - 25 日 (岡山市)

高崎智彦 . 緊急報告「デング熱 - 今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)

高崎智彦 . 「デング熱から身を守るために ~ 忍び寄る地球温暖化 ~ 」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催 . 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)

高崎智彦 . - 市民公開講座 - デング熱

これからどうなる？．日本獣医学会 公衆衛生分科会主催．平成 26 年 12 月 1 日（東京、日本獣医生命科学大学）

高崎智彦．「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー．平成 26 年 12 月 13 日（東京 東医健保会館）

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

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

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

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

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

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

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

H．知的財産権の出願・登録状況

- 1．特許取得
なし
- 2．実用新案登録
なし
- 3．その他
なし

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

インフルエンザ実験室診断の精度向上に関する海外機関との共同研究に関する研究

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

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

A . 研究目的

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

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

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

ルへの流行が懸念されている。

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

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

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

B . 研究方法

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

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

C . 研究結果

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

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

D . 考察

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

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

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

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

E . 結論

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

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

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

F . 研究発表

- 1 . 論文発表
なし
- 2 . 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発に関する研究

担当責任者 高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第一部

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

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

C. 研究結果

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

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

D. 考 察

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

E. 結 語

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Local Transmission of Dengue in Japan, August to October 2014. NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22-23rd, January, 2015 (Tokyo)
3. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

国内学会

1. 高崎智彦 .黄熱ワクチンとデングワクチン .第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会 .平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
2. 高崎智彦 .黄熱ワクチンとデング熱ワクチン .第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26 年 6 月 30 日 (東京)
3. 高崎智彦 .デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか .日本記者クラブ .平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦 .海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行

- (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦 . デング熱国内発生への対応 - デング熱の基礎と疫学 - . 第 46 回日本小児感染症学会 . 平成 26 年 10 月 18 - 19 日 (東京)
 6. 高崎智彦 . 緊急企画 : 70 年を経ての再来 ~ デング熱国内流行 2014 . 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 . 平成 26 年 10 月 23 - 25 日 (岡山市)
 7. 高崎智彦 . 緊急報告「デング熱 - 今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
 8. MoiMeng Ling, 白井顕治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦 . Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
 9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二 . デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
 10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦 . Fc R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
 11. 高崎智彦 . 「デング熱から身を守るために ~ 忍び寄る地球温暖化 ~ 」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催 . 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
 12. 高崎智彦 . - 市民公開講座 - デング熱 これからどうなる? . 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催 . 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
 13. 高崎智彦 . 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー . 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
 14. 高崎智彦 . デング熱国内流行 ~ 70 年の時を経て ~ (特別講演) . 第 21 回リケッチア研究会 . 平成 26 年 12 月 20 - 21 日 (東京 国立感染症研究所)
 15. 高崎智彦 . デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症 . 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)
- H . 知的財産権の出願・登録状況
特になし

下痢原性病原細菌に関する研究

国立感染症研究所 細菌第一部

担当責任者 氏名 大西 真

研究協力者 森田昌知

研究協力者 泉谷秀昌

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

A．研究目的

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

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

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

B．研究方法

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

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

RNase 処理について添付プロトコールと異なる方法を用いた。

ILLUMINA MiSeq 解析は、Nexta XT DNA 調整キット、Nextera インデックスキットを用いてゲノム DNA のインデックス化と調整を行った。MiSeq における塩基配列決定は、ILLUMINA 社のインストラクトに従って実施した。

C. 研究結果

1 コレラ菌ゲノム解析研修

期間：平成27年2月2日～13日

研修参加者：

- 1 今村大輔（岡山大学インド感染症共同研究センター）
- 2 岡田和久（大阪大学 日本・タイ感染症共同研究センター）
- 3 竹村太地郎（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点）
- 4 NGO Tuan Cuong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点 National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）
- 5 TRAN Thi Luong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 6 NGUYEN Hai Tuan（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 7 PHAM Duc Tho（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）

コレラ菌16株についてゲノム DNA を取得し、ILLUMINA MiSeq による配列決定を行った。それぞれの国で分離株をそれぞれが調

整し、解析を実施した。また、得られた配列の品質評価法について研修した。品質評価をクリアした配列生データを利用して、系統解析を実施した。

D. 考察

ゲノム DNA を取得し ILLUMINA MiSeq 解析を実施し、期間内に解析の流れの一連を各人が研修することができた。次世代シーケンサーは高価な機器であり、現状では各研究施設に配備することは困難な面もある。また、その保守については、特に発展途上国においては、万全な体制が整っているとはいえない。

海外研究機関において分離された株のゲノム配列情報を所得するためには、3つの方策が考えられる。

- 1) 海外研究機関から国立感染症研究所に菌株を輸送し、国立感染症研究所においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定・解析の全てを実施する。
- 2) 海外研究機関においてゲノム DNA を取得し、ゲノム DNA を国立感染症研究所に輸送し、国立感染症研究所において、解析 DNA 調整、配列決定・解析を実施する。
- 3) 海外研究機関においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定を実施する。他地域との比較解析のためには、決定された配列情報を国立感染症研究所に設置するデータベースに格納して解析する。

1)においては、病原体輸送にコストがかかることが問題であり、迅速な解析が難しい。次世代シーケンサーが設置可能な研究機関では、3)の方策が可能である。また、設置不能であるか、あるいは保守が困難な場合には、2)ゲノム DNA を輸送することで(菌株の輸送に比較して簡易である)ゲノム配列の取

得が可能となる。

本研修において、2)および 3)が実施できる体制が整いつつあることが認識された。また、今村博士、岡田博士、竹村博士に関しては国立感染症研究所の協力研究員として登録することで、自らの研究を進展させるためにも、国立感染症研究所の機器を利用することが可能である。

赤痢菌性状解析に関する研修(開催予定時期
3月2日～6日)

Mark Philip Bugayong (Research Institute
for Tropical Medicine, 東北大)

既に研修にもちいらフィリピン分離赤痢菌
25株の輸送の準備が整っている。本研修
においては赤痢菌の分子型別ならびに薬剤感
受性試験に関する研修の依頼があり、その準
備を整えている段階である。

E . 結論

今後の、海外研究機関等と国立感染症研究
所との感染症に関する共同研究および連携
強化の流れのなかで、様々な手段において迅

速にゲノム配列情報を集積することを可能
とする道筋が、本研究によって明らかにされ
たと考える。研究者の交互の交流と、技術の
共有化を押し進めて行くことで、共同研究の
進展の原動力となりうる。

F . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

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

担当責任者 片山 和彦 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究協力者 岡 智一郎 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

カウンターパート：
Thailand NIH, Vietnam NIHE

研究要旨：本年度は、下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス）の全ゲノム配列解析技術の研修と、配列解析の共同研究をJ-GRID拠点を通じて実施するための職員研修を中心に行った。

A. 研究目的

ヒトに感染するノロウイルス（HuNoV）、サポウイルス、ロタウイルス等の下痢症ウイルスは、毎年、我が国のみならず全世界的な流行を引き起こすため社会問題となっている。上記ウイルス感染症は、交通機関の発達によるヒトの移動がウイルスを運び、流行を引き起こすと考えられている。本研究は、我が国の近隣諸国における上記ウイルスの流行動向を調べ、アジア地域の分子疫学を推進することで、アジア地域における上記ウイルスの流行動向を把握して、予測プログラム構築に役立てる。さらに、ワクチンや、抗ウイルス薬の開発を通じて下痢症ウイルスの感染制御に貢献する。

今年度は、下痢症ウイルス（ノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルス）の全ゲノム配列解析技術の研修と、配列解析の共同研究をJ-GRID拠点を通じて実施するための職員研修を中心に行った。今後、現地に流行株の全塩基配列を利用した時系列解析ゲノム解析を導入し、流行状況を互いに把握し、下痢症ウイルスの感染制御に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

1. タイNIH職員の研修

大阪大学タイJ-GRID拠点を通じ、タイNIH職員2名を受け入れた。同時にタイNIHからは下痢症ウイルス感染者の便検体48サンプルが持ち込まれた。

研修は、コンベンショナルなRT-PCRによるノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスの検出、次世代シーケンサーによる全ゲノム塩基配列解析を実施した。

2. ベトナムでの感染研若手職員の研修
国立感染症研究所より、岡智一郎主任研究官を、長崎大学J-GRID拠点を通じてNIHEの下痢症ウイルスセクションと地元の大学との共同研究体制の調査、協力関係樹立のために現地に約1週間派遣した。

C. 研究結果・考察

1. タイNIH職員の研修

研修は、順調に進み、48サンプルの解析が終了する予定。大阪大学J-GRID対拠点には、ライフテクノロジーズ社のイオンプロトン次世代シーケンサーが導入され、稼働している。感染研では、イルミナ社のMiSeqが稼働している。両マシンは作動原理、シーケンス原理が異なるが、データ処理手法、解析手法については共通点が多く、双方でのデータ共有が可能である。そこで、本研修では、RNA抽出からcDNAライブラリー作製、

次世代シーケンスランをMiSeqに対応した方法で行い、データを持ち帰ることにより、タイNIHに隣接した大阪大学タイ拠点のスタッフと共に配列解析ができるようにトレーニングを行うこととした。

2. ベトナムでの感染研若手職員の研修
長崎大学J-GRID拠点を通じてNIHEの下痢症ウイルスセクションと地元の大学との共同研究体制の調査、協力関係樹立のために現地に約1週間派遣した岡智一郎主任研究官により、NIHEとの共同研究がスタートすることとなった。NIHEのカウンターパートとして、J-GRIDベトナム拠点の長崎大学山城教授を通じて紹介を受けたDr. Nguyen Van Trangが対応することとなった。3者間の協議により、2000年以降にベトナムで流行したノロウイルス、サポウイルス、ロタウイルスを中心とした下痢症ウイルスの全ゲノム塩基配列解析を実施し、ベトナム国内での下痢症ウイルスの流行の変遷をレトロスペクティブに解析することとした。すでに検体の選択が始まっており、今年度中にNIHEからJ-GRID拠点を通じて感染研に検体の輸送搬入が行われる予定である。また、来年度は、カウンターパートであるDr. Nguyen Van Trangが来日し、感染研にて次世代シーケンサー（イルミナ社MiSeq）に関する研修、分子系統解析手法にかかる研修を実施する予定である。

D. 結論

従来より交流が有り、共同研究が稼働している台湾に加え、本年度は、別プロジェクトではあるが、インド国立研究所NICEDとの協力体制がスタートした。さらに、本プロジェクトで、タイNIH、ベトナムNIHEとの共同研究がJ-GRID拠点を通じて稼働し始めた。さらに、来年度は神戸大学インドネシアJ-GRID拠点が、本プロジェクトへの合流を目指している。全ての拠点が本プロジェクトに合流すると、アジア領域における下痢症ウイルスの流行とその変遷について、時系列データが収集、共有化できるようになる。また、感染研による次世代シーケンスで、ゲノム全長に渡る配列データが供給される事と成る。今後、これらのプロジェクトが、順調に推移することで、下痢症ウイルスの流行の把握、より確率の高い流行予測システムの構築に効果を発揮すると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 論文発表

なし

G. 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

なし

海外研究機関研究員の研修に関する研究

担当責任者 大石和徳（国立感染症研究所感染症疫学センター長）

研究協力者 木村博一（国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）

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

A．研究目的

国立感染症研究所においては、病原体検査診断に関する国際研修および国内研修を行っている。特に、国際研修においては、WHO 西太平洋事務局地域の病原体検査診断に従事する専門官の人材育成を重要視し、公衆衛生学上、対策が必要な疾患に関する病原体検査診断研修を行っている。このなかで、東南アジア地域各国、例えば、インドネシア、タイ、フィリピンおよびベトナムにおいては、水系感染を引き起こすウイルスによる国内で発生した急性胃腸炎患者の検査診断ならびに生鮮食品（魚介類）や乳肉製品の輸出食料品の微生物学的安全確保のための研修のニーズが高い。そこで、本研究においては、急性胃腸炎患者の起因ウイルス検査診断および食品中に含まれるウイルスの検出に関する国際研修プログラムの構築ならびに研修を実施するための先進的な病原体検出系の構築を行った。また、これらの研修を行うため次世代シーケンサーなどの先駆的な病原体遺伝子解析機器も導入した。

B．研究方法

国際研修プログラムの構築

水系感染を引き起こす主要ウイルスを A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびロタウイルスとした。研修プログラムの座学による研修は、当該ウイルスのウイルス学、疫学および各検査診断法を主体とした。また、実験室内研修は、当該ウイルスの検出法として、コンベンショナル (RT-)PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、シーケンス解析法および分子系統樹解析 (近隣結合法) を主体とした英語によるプログラムを作成した。

先進的病原体検出系の構築と次世代シーケンサーを用いた病原体網羅解析研修プログラムの構築

上記ウイルス以外にも経口感染症を引き起こす病原体は多種類存在することは言う

までもない。そこで、次世代シーケンサー (NGS) を導入し、経口感染症の原因となる病原体の網羅解析に関する検出系の構築を行った。また、NGS を用いた英語による研修プログラムの作成・構築も行った。

(倫理面への配慮)

特に該当事項は無い

C．研究結果

国際研修プログラムの構築

研修プログラム期間は、派遣元の諸事情を考慮し、1 週間 (実質 5 日間) の英語による研修プログラムを構築した。具体的には、第 1 日目に、研修内容のオリエンテーションと下痢症ウイルス総論、第 2 日目は、各種ウイルスのウイルス学・疫学検査診断法の概要に関する座学、第 3 日目から 5 日目までは、当該ウイルスの遺伝子検出、病原体遺伝子定量、シーケンス・系統樹解析を実験室内診断研修とした。

先進的病原体検出系の構築と次世代シーケンサーを用いた病原体網羅解析研修プログラムの構築

NGS は、ウイルス細菌を含む病原体のフルゲノムおよびディープシーケンシングを遂行することが可能な機種 (Illumina MiseqII) を導入した。また、NGS を用いた病原体網羅解析の英語によるマニュアルも一部完成した。

D．考察

今回、本研究において、水系感染を引き起こすウイルスによる国内で発生した急性胃腸炎患者の検査診断ならびに生鮮食品 (魚介類) や乳肉製品の輸出食料品の微生物学的安全確保のため、病原体検査診断に従事する国外の専門官のための研修プログラムの構築およびプログラムを遂行するための機器整備を行った。本プログラムにより、WPRO 西太平洋地域に属する国の専門官であれば、

約1週間のプログラムで、水系ウイルスの主な原因であるA型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ノロウイルスおよびロタウイルスの疫学やウイルス学のみならず、これらの病原体の検査診断法が習得可能になると思われる。

国内外において、食品が原因と思われる食中毒の一定数は、起因病原体が原因不明になっている。その一方で、NGSによる原因究明が進み、クドアなどの新規病原体も同定されるようになってきている。したがって、今後、NGSを応用した水系感染あるいは食品に由来する感染症の病原体検索が進むと思われる。来年度以降、研修プログラムのさらなる充実と導入したNGSやリアルタイムPCRを応用し、国内外の研修充実化を図りたい。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda

M, Katayama K, Kimura H. A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan. *Microbiol Immunol.* 58(9):536-539, 2014.

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

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

アジア地域の研究者向け薬剤耐性菌の検出、分子疫学、ゲノム解析の研修

担当責任者	柴山 恵吾	（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者	鈴木 里和	（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
研究協力者	松井 真理	（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）
研究協力者	筒井 敦子	（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
研究協力者	鈴木 仁人	（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）

アジア各国ではNDM型カルバペネム耐性腸内細菌科細菌など、多剤耐性菌が蔓延しており临床上、公衆衛生上大きな問題となっている。薬剤耐性菌は、国境を超えて拡散するため、対策には各国の連携が重要である。WHOは各国の専門家が協力してグローバルな視点で耐性菌対策を進めることを求めている。この研究では、アジア各国の研究者を招聘し、薬剤耐性菌の検出やサーベイランスに関する技術研修を行い、各国での薬剤耐性菌対策のレベルの向上を図り、また今後の共同研究体制を構築することを目的とした。国立感染症研究所細菌第二部第一室にて、アジア各国の研究者向け研修プログラムを作成した。プログラム内容は主に、現場ですぐに活用できることを目指して作成した。アジア各国で拡散しており、かつ特に注意を要する耐性菌について、検出法や着目すべき点などについて講義と実習を行った。研修は単なる実験技術の習得だけでなく、実験結果と菌株の疫学情報とを合わせて総合的に解釈し、実際に感染対策に資するようにすることを目指した。また、今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる作業や、感染研で行なう解析についても研修を行った。中国、フィリピン、韓国、ベトナム、台湾から1名ずつ、ミャンマーから3名の研究者が来所し研修を受けた。また研修中に各研修生から各国の薬剤耐性菌の状況を発表してもらい、お互いの理解を深めた。この研修により各国参加者の研究機関との連携が強化され、今後の薬剤耐性菌に関する共同研究が促進されることとなった。

A. 研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、国境を越えて拡散している。特に途上国では、新型のカルバペネム耐性菌が急速に拡散している。これらの耐性菌は日本にも輸入例がある。米国でも、CDCがカルバペネム耐性腸内細菌科細菌がこの10年で急速に増加したと報告した。国内でも類似の薬剤耐性菌による院内感染が散発しており、今後諸外国のように薬剤耐性菌が拡散していくことが危惧される。これらの耐性菌は有効な薬剤が無いが極めて限られるため、公衆衛生上深刻な問題である。WHOは2013年に薬剤耐性菌対策に関するAdvisory Groupを組織し、各国にサーベイランスの強化を求めている(Global Report on Surveillance, 2014)。薬剤耐性菌対策のためには、まず状況を的確に把握し、そして特に注意を要する耐性菌を明らかにして積極的に社会に情報発信する必要がある。同時に、簡便な検査法や型別法を開発して医療現場が容易に検査をできるようにして、感染拡大防止策が適切に実施されるよ

うにすることが重要である。国立感染症研究所細菌第二部は、これまで全国の医療機関と協力関係を構築して菌株を収集し、実態を解明して注意すべき耐性菌を同定し、検査法の開発などを行ってきた。同時にJ-GRIDなどと連携し、アジア各国の研究機関、病院と協力関係を構築してきた。アジアの多くの国では、薬剤耐性菌が蔓延しているものの、専門家がないなどの理由で臨床現場で薬剤耐性菌の検出が十分に実施されていない。この研究では、アジア各国との共同研究および連携を強化し、グローバルな薬剤耐性菌対策の向上に資することを目標にて、各国の研究者に薬剤耐性菌に関する研修を行った。

B. 研究方法

J-GRIDの海外拠点や、感染研細菌第二部が共同研究を行っているアジアの研究機関を対象に、薬剤耐性菌の研修希望者を募り、応募者に感染研細菌第二部において研修を実施した。

倫理面への配慮

該当なし。

C. 研究結果

中国、フィリピン、韓国、ベトナムから1名ずつ、ミャンマーから3名の若手研究者が研修を受けた。別の時期に、台湾の研修生1名が耐性菌のゲノム解析に関する研修を受けた。国立感染症研究所細菌第二部第一室にて、アジア各国の若手研究者を想定した研修プログラムを作成した。プログラム内容は主に、現場ですぐに活用できることを目指して作成した。プログラム及び配布資料を末尾に示す。アジア各国で拡散しており、かつ特に注意を要する耐性菌について、検出法や着目すべき点などについて講義と実習を行った。菌の培養、同定など基本操作を習得後、まず薬剤感受性試験を実施した。対象は、臨床的、公衆衛生的に最も問題が大きいカルバペネム耐性腸内細菌科細菌とした。日本及びアジア各国で比較的良好に分離されるカルバペネマーゼ遺伝子を持つ菌株を研修に供した。微量液体希釈法に加え、途上国でも実施することができるディスク法の研修を行った。特に注意を要するカルバペネマーゼ産生菌について、ディスク法での判別法を実演により習得させた。また、近年開発され今後普及が見込まれる CarbaNP テストも含めた。ディスク法での判別後に、パルスフィールド電気泳動による型別の研修を行った。またこれらの技術を習得するだけでなく、分離された菌株の疫学情報から、どのような菌株を解析対象とするべきか、結果をどのように解釈するのかなど、その技術を実際の感染対策に活用するために必要な知識についても講義を行った。一部の希望者には、ゲノム解析の研修も実施した。研修プログラムの最後に、試験用菌株を用いて理解度テストを行った。また研修中には、各研修生から各国の薬剤耐性菌の状況を発表してもらい、お互いの理解を深めた。

この研修により、参加者は薬剤耐性菌の検出に関する基本的な技術を習得した。今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる実験技術を習得し、また感染研で行なう解析についても理解した。

D. 考察

薬剤耐性菌は感染症を起こすと有効な薬剤が極めて限られるため、临床上深刻な問題である。また対策が不十分だと病院内や市中で拡散するため、公衆衛生上も大きな問題である。アジアの多くの途上国では日本と比べると薬剤耐性菌が多い。この原因としては、多くの途上国では国民は抗菌薬を処方箋なしで購入可能なので、抗菌薬

がコントロールなしに使用されており、また病院での感染対策も不十分なので、薬剤耐性菌が極めて出現、拡散しやすい状況にあることが挙げられる。しかしアジア地域の国々、特に途上国では、薬剤耐性菌の解析のための設備や専門家が十分ではないことが多い。途上国においては、これまでマalaria、結核、インフルエンザなど、症状が明らかな市中感染症と比較して、新興感染症としての薬剤耐性菌感染症はあまり大きく認識されていなかったと思われる。しかし、2014年にWHOが薬剤耐性菌を世界的な問題として取り上げて、Global Report で各国に対応を求めたことや、治療薬がない薬剤耐性菌が国境を超えて拡散している実態が理解され始めてから、先進国だけでなく途上国も最近関心を高めてきた。

日本は世界でも最も薬剤耐性菌が少ない国の一つである。薬剤耐性菌が少ない背景には、医療機関において積極的に耐性菌の検出が行われていることが挙げられる。この研修で、アジアの研究者に特に注意を要する薬剤耐性菌の検出法を習得してもらい、帰国後に各国でその技術を普及してもらえれば、各国の薬剤耐性菌対策の一助となると考えられる。同時に、分離された耐性菌株を用いて、感染研と共同でグローバルな体制で耐性菌対策のための研究が進められると期待できる。

E. 結論

アジア各国の専門家に、临床上、公衆衛生上特に注意を要する薬剤耐性菌の検出法、型別法、その他解析法について研修を実施した。研修は単なる実験技術の習得だけでなく、実験結果と菌株の疫学情報とを合わせて総合的に解釈して、実際に感染対策に資することを目指した。また、今後感染研との共同研究を行なうにあたり、各国の現場で必要になる作業や、感染研で行なう解析についても研修を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

病原体ゲノム情報の取得とデータベース運用

担当責任者 黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）
研究協力者 山下明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

近年特に大きな問題となっているデングウイルスの感染伝播状況を把握するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) database から計 7,933 株分のデングウイルス・ゲノム配列を取得し、serotype, genotype 毎に分類して Google Maps にて分布地図を作成した。世界各国で分離されるデングウイルスの genotype には特徴的な地理的要因が背景にあり、それはデングウイルスの蚊を媒介とする感染伝播ライフサイクルに起因するものと推測された。また、検疫所にて報告される輸入感染症例もマップ上で理解できる web サイトを構築し、海外渡航前に感染リスク因子を予め把握し、渡航中における注意喚起にも役立つ web サイトになるものと期待している。今後、アジア各国と日本を有機的に結び付けるシステムを確立するため、他の病原体ゲノム情報のマップ化を推進していく予定である。

A. 研究目的

多くの新興・再興感染症が発生し、インフルエンザ、デング熱、薬剤耐性菌感染症、下痢性感染症は特に近年我が国にとって近年大きな問題となっている感染症である。これら感染症に対して適切な感染症対策の立案と新たな治療薬、ワクチン、診断薬等の創薬開発が求められている。これら感染症はアジアにおいての発生が問題となることから、アジアにおいて分布するこれら各種病原体のゲノム情報は有効な情報源となり、ゲノム情報を基盤とした発生分布と疫学への情報提供は効果的な対策となりうる。

本研究においては、近年特に大きな問題となるインフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌およびノロウイルスに関して、アジア各国と日本を有機的に結び付けるシステムを確立し、アジアにおいて流行している病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し、さらにデータベースが継続的に維持されるため基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) デングウイルスの公開配列情報の取得

デングウイルス・ゲノム配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) database

から計 7,933 株分を取得し、表記されている serotype, genotype 毎に分類した。公開データベースの取得と genotype 分類の基本的な解析手法は

Yamashita A, Sasaki T, Kurosu T, Yasunaga Y, Ikuta K. Origin and distribution of divergent dengue virus: novel database construction and phylogenetic analysis. Future Virology. 2013, 8(11): 1061-83. (査読有)

<http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.13.99>

にて報告している。

2) Google Maps によるデングウイルスの頻度と分布地図の図示化。

Google Maps の地図情報（フリーライセンス）を元にしてデングウイルスの serotype と genotype を分離国ごとにパイチャートとして表示した。配列データベースは MySQL で管理し、地図上への描画は JavaScript D3.js にて開発した。

（倫理面への配慮）

特記事項無し。公開配列情報を用いたデングウイルス・データベースの構築であり、個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

NCBI 配列データベースに配列登録されている 7,933 株の Dengue ウイルスを serotype ごとに Google Map 上にパイチャートで閲覧可能にし、分離国における各 serotype の頻度（実態数ではなく、配列登録数である）と分布状況が俯瞰的に理解できるようにした（図 1）。Dengue 熱発生国の実情がこのマップ図示化により把握しやすくなった。Serotype 1 (2,855 株), 2 (2,615 株), 3 (1,706 株), 4 (757 株) ごとに genotyping が施されているため、判明している genotype ごとの分類を行った。

Serotype 1 では、Genotype I が東南アジアで優位であり、一方、Genotype V がアメリカ大陸で優位であることが容易に把握できるようになった（図 2）。特にポリネシア諸国における genotype IV が優位であることは特筆すべきことに見える。

Serotype 2 では、Genotype Cosmopolitan が東南アジアで優位であり、一方、Genotype AsianAmerican がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できた。東南アジア諸国の中でも異なる genotype が優位になっており、serotype 1 とはまた違う genotype 分布であることが判明した（図 3）。

Serotype 3 では、Genotype I, II が東南アジアで優位であり、一方、Genotype III がアメリカ大陸で優位であることが理解できた（図 4）。

Serotype 4 では、東南アジア、ポリネシア諸国、アメリカ大陸と明瞭に分布が別れることが判明した（図 5）。

これらマップ図をマウス操作で自在に拡大縮小し、近隣国における検出 genotype の登録状況の閲覧を容易にした。シンガポールでは複数の genotype が検出される一方、ベトナム、カンボジアでは特有の genotype I が優位であり、インドでは Genotype V が主になっていた（図 6）。

日本の Dengue 熱症例は輸入症例が主体であり、検疫所から報告のあった Dengue 熱輸入感染症例（<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1493-iasr-ta>）を Google map へ図示化した。

D . 考察 E . 結論

Dengue ウイルスは、主にヤブカとりわけネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) によって媒介され、ウイルスは主にヒトを宿主とするが、ヒト以外の

サル目にも伝染し感染を媒介することが知られている。公開配列データベースの serotype そして genotype として分類してさらにマップ図示化することにより明解な地域依存的な genotype 分布が示唆された。1943 年から 2012 年までの分離株情報が登録されており、年代推移を時系列として分布を表示することも可能にしているため、genotype の変遷も理解することができる。ウイルス情報をゲノム配列として取得し、serotype, genotype として詳細に分類することで、Dengue ウイルスの感染伝播のライフサイクルの理解にも役立つだろう。今後、感染症対策に立案にも役立つような疫学調査システムになるよう発展させたい。

また、検疫所にて報告される輸入感染症例もマップで一目瞭然に理解できるため、海外渡航前に感染リスク因子を予め把握して渡航中における注意喚起を促すことにも役立つことと期待している。

F . 健康危険情報
特になし

G . 研究発表
1 . 論文発表
なし

2 . 学会発表
NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22nd - 23rd January, 2015. Venue; Sunshine City Conference Room No.14. The fifth floor, World Import Mart Building, 3-1-1 Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo, JAPAN. "Pathogen Genomics for Public Health" Makoto KURODA.

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

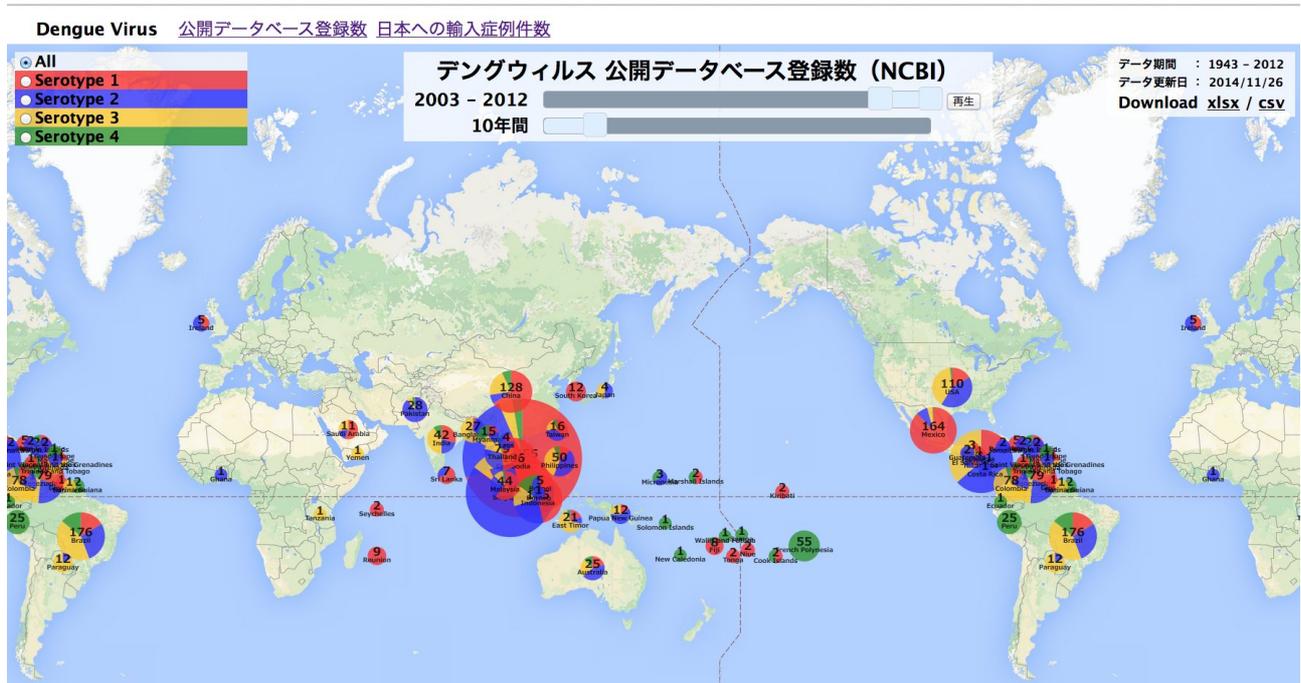


図1 デングウイルス公開データベースと Google Map 上での図示化 (血清型別)。NCBI 配列データベースに登録されている 7,933 株のデングウイルスを serotype ごとにパイチャートで閲覧可能にした。Serotype 1 (2,855 株), 2 (2,615 株), 3 (1,706 株), 4 (757 株)。

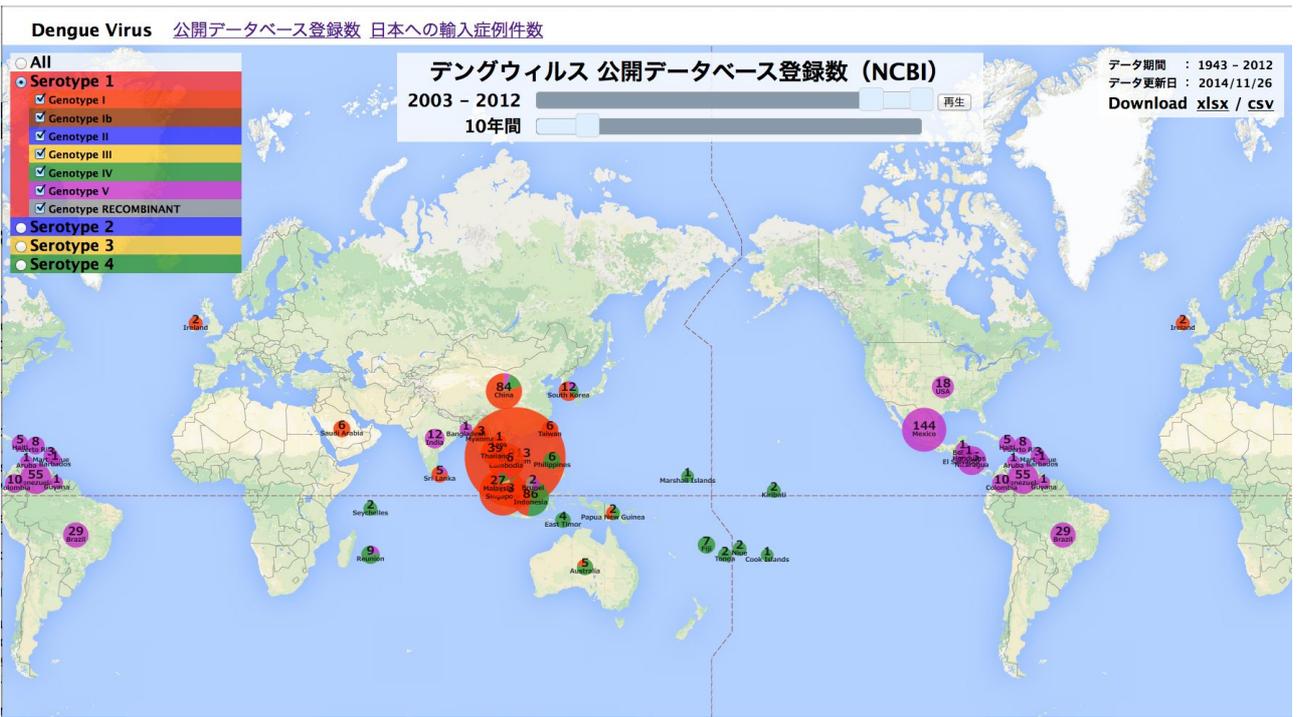


図2 デングウイルス serotype 1 (2,855 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。Genotype I が東南アジアで優位であり、一方、Genotype V がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。

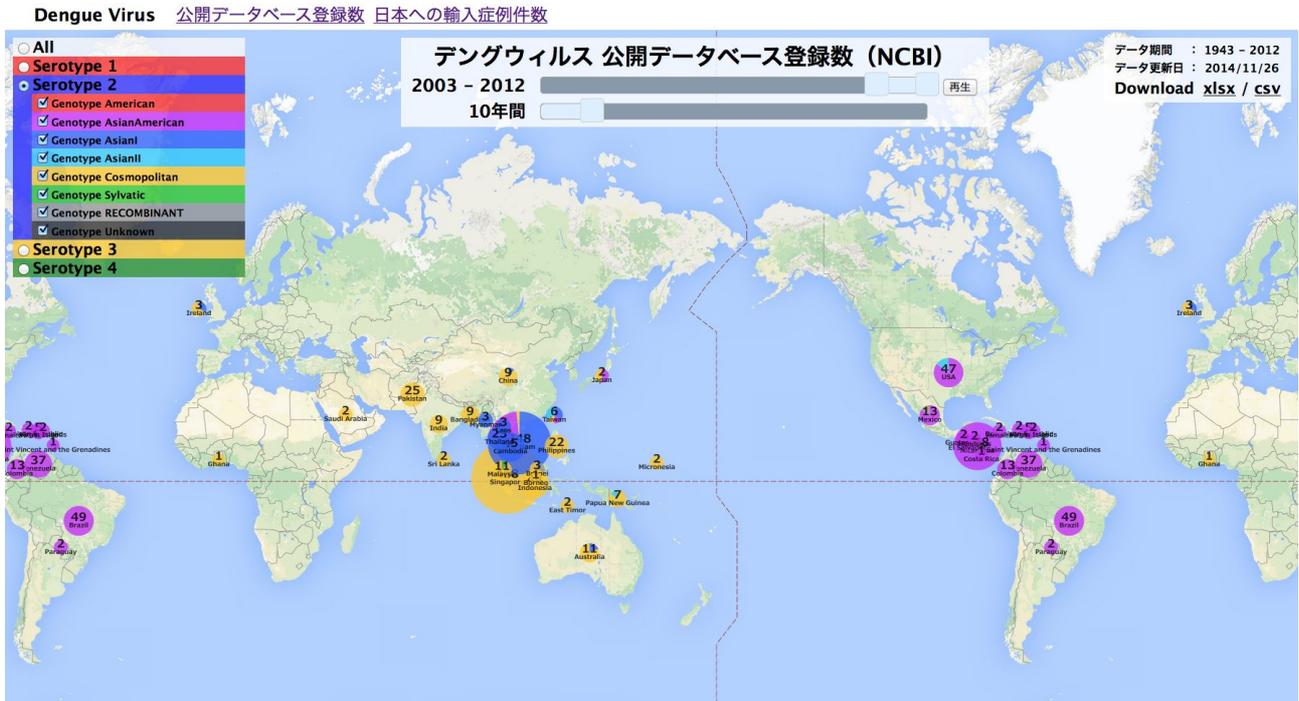


図3 デングウイルス serotype 2 (2,615 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。Genotype Cosmopolitan が東南アジアで優位であり、一方、Genotype AsianAmerican がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。



図4 デングウイルス serotype 3 (1,706 株) の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。複数の Genotype が東南アジアで検出され、一方、Genotype III がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。

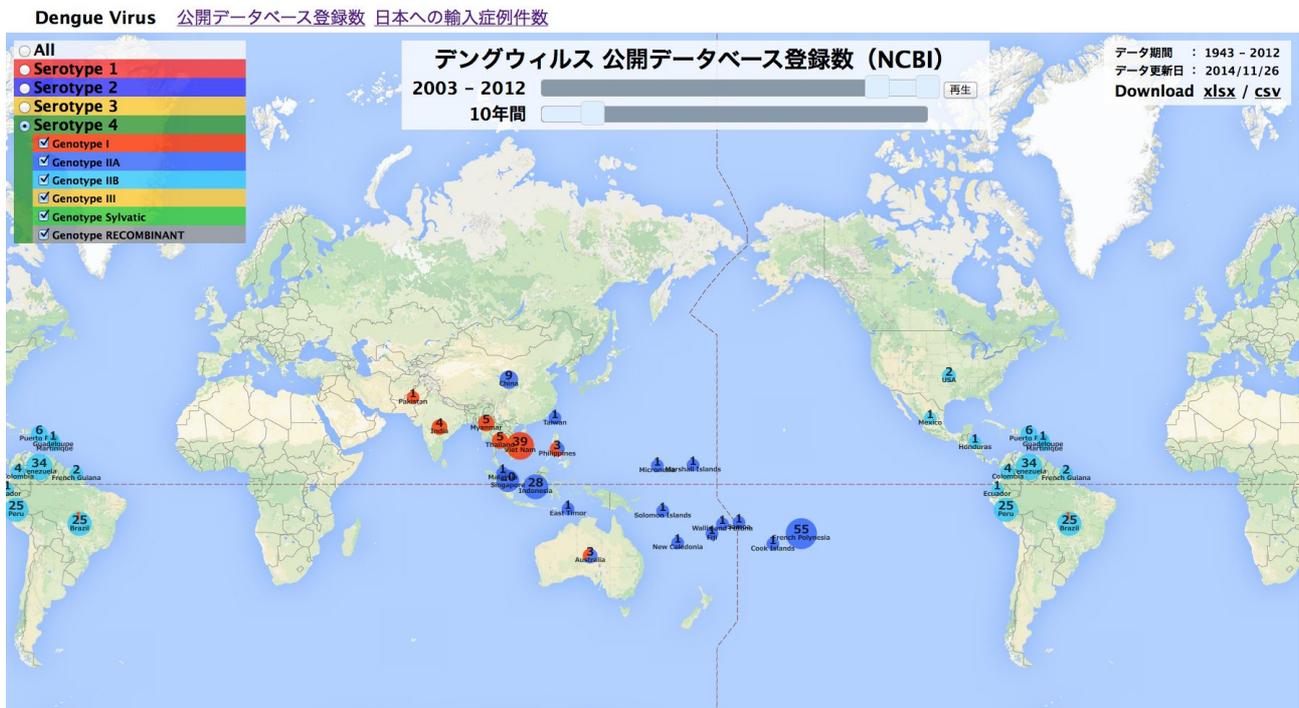


図5 デングウイルス serotype 4 (757 株)の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。Genotype I, IIA が東南アジアで優位であり、一方、Genotype IIB がアメリカ大陸で優位であることが俯瞰的に理解できる。

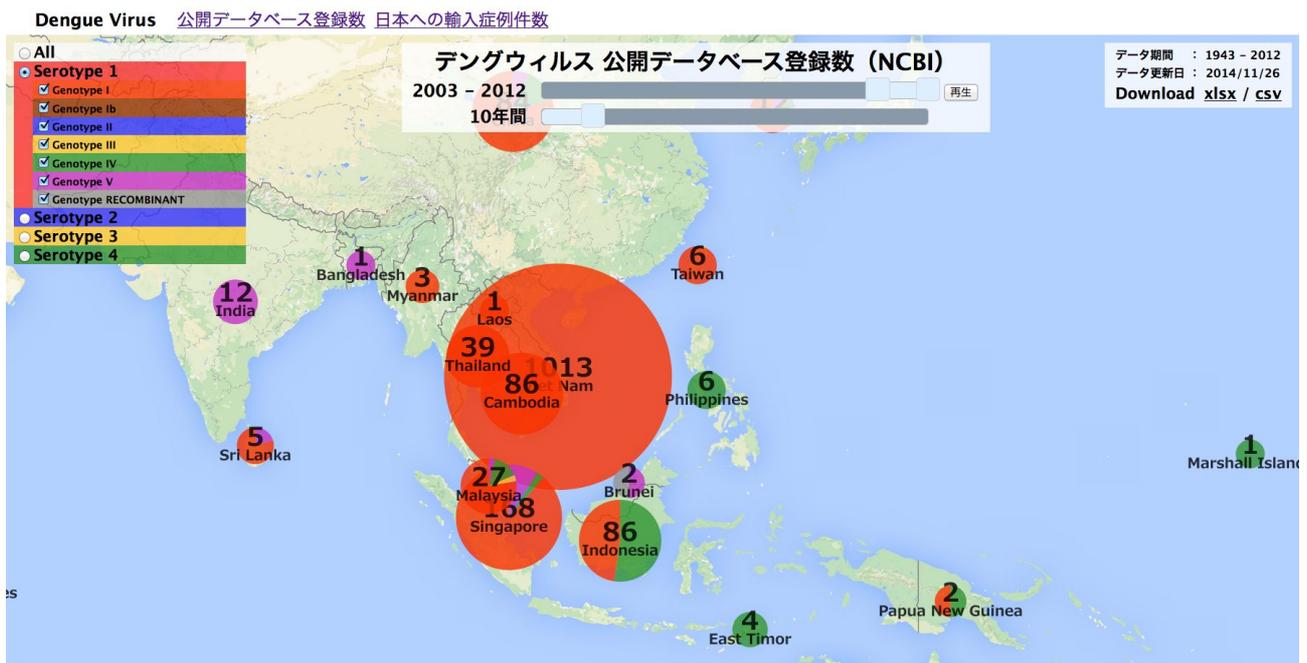


図6 デングウイルス serotype 1 の公開データベースから genotype を判定し Google Map 上で図示化。マウス操作で自在に拡大縮小し、近隣国における検出 genotype の登録状況の閲覧を容易にした。シンガポールでは複数の genotype が検出される一方、ベトナム、カンボジアでは特有の genotype I が優位であり、インドでは Genotype V が主になっている。

(参考資料) デングウイルス配列データベースに登録されている以下のような serotype と genotype、そして配列アクセッション番号と URL もエクセルファイルとして一覧をダウンロード可能にした。

SeroType	Accession	GI	Country	Year	C	prM	Env	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5	Summary	Url
1	AF425610	23451570	Angola	1988			V								V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF425610
1	AF426111	32364767	Angola	NoDate					V	V					V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF426111
1	AF514889	27368029	Argentina	2000	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF514889
1	AF514885	28927655	Argentina	2000	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF514885
1	AF425609	23451568	Aruba	1985			V								V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF425609
1	JN379473	375304160	Aruba	2004			V								V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN379473
1	AF425611	23451572	Australia	1983			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF425611
1	AF425612	23451574	Australia	1983			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF425612
1	AF426112	32364769	Australia	1983					IV	IV					IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF426112
1	JN415495	396085286	Australia	2003			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415495
1	JN415514	396085324	Australia	2003			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415514
1	JN415531	396085358	Australia	2008			I								I	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415531
1	JN415532	396085360	Australia	2009			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415532
1	HQ871946	364506297	Australia	2010			IV								IV	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ871946
1	JN379475	375304164	Bahamas	1977			V								V	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN379475

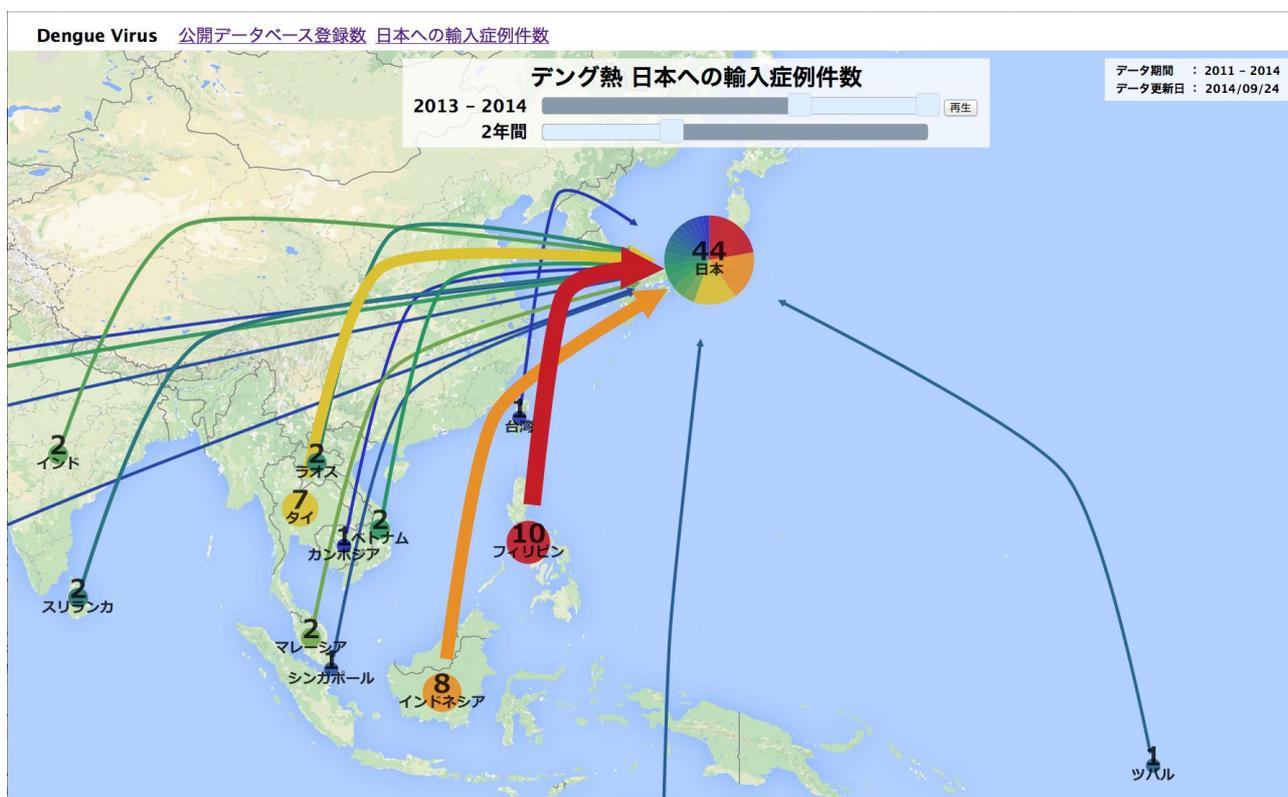


図7 検疫所から報告のあったデング熱輸入感染症例の Google maps への図示化。

(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/511-surveillance/iasr/tables/1493-iasr-ta>)

東南アジアからの輸入症例が最も多く、渡航前の注意喚起にも役立てたい。

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

チクングニアウイルス遺伝子型間共通迅速診断法の開発

担当責任者 西條 政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部長）
研究協力者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長）
藤本 嗣人（国立感染症研究所感染症情報センター第四室長）
小長谷 昌未（国立感染症研究所感染症情報センター）
ギジェルモ ボサダス・エレラ（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室）
高崎 智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）
倉根 一郎（国立感染症研究所副所長）

研究要旨

チクングニア熱の流行域は近年急速に拡大している。チクングニア熱はチクングニアウイルス (CHIKV) によって発症する熱性疾患であり、特に高齢者において重篤な経過をとる。チクングニアウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の+鎖 RNA ウイルスである。チクングニアウイルスにはアジア型、中央・東・南アフリカ型、西アフリカ型の遺伝子型が存在する。チクングニアウイルスは蚊によって媒介され、都市部においてはヒト-蚊-ヒトの感染環を形成する。その主たる媒介蚊はヒトスジシマカやネッタイシマカ等のヤブカ属の蚊である。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、チクングニアウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。したがって急性期患者の迅速な把握は防疫上重要である。そこでより迅速かつ全ての遺伝子型のウイルスを検出することを目的とした RT-PCR 法の開発を行った。その結果、アジア型および中央・東・南アフリカ型のチクングニアウイルスを検出できる特異性の高い Real time RT-PCR 法を開発したので報告する。

A. 研究目的

近年蚊によって媒介されるチクングニア熱 (Chikungunya fever) の流行域の拡大が報告されている。チクングニア熱は 1952 年にアフリカのタンザニアでデング熱様疾患として初めて報告された人獣共通感染症であり、時に激しい関節痛、発疹、悪寒、頭痛、悪心、嘔吐、筋肉痛を伴うウイルス性急性熱性疾患である。また近年のチクングニア熱の特徴は死亡例を含む重篤な症例が報告されていることである。チクングニア熱の原因ウイルスはトガウイルス科アルファウイルス属に分類されるチクングニアウイルス (Chikungunya virus: CHIKV) である。チクングニアウイルスは昆虫媒介性ウイルスで

あり、その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属の蚊である。

チクングニアウイルスにはアジア型、中央・東・南アフリカ型、西アフリカ型の 3 つの遺伝子型が存在する。近年の中央・東・南アフリカ型のチクングニア熱の流行は 2004 年にケニア沿岸において確認され、インド洋諸島、インド、東南アジアに急速にその流行域を拡大した。またアジア型の流行が 2013 年末よりカリブ海諸国で報告され、2014 年には米国フロリダ州、メキシコ、エル・サルバドル、コスタリカ、ベネズエラにその流行域が拡大した。

これまでに我々は RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を用いた検査体制を確立した. 日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており, チクングニアウイルスが日本に侵淫する可能性は否定できない. また, チクングニアウイルスの感染環は森林部では主に霊長類と蚊の間で形成されているが, 都市部ではヒト-カ-ヒトの感染環が形成される. したがって防疫上チクングニア熱の急性期患者の迅速な把握が必須である. そこで我々は現在のチクングニアウイルス遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらに迅速且ついずれの遺伝子型のウイルスも検出可能な RT-PCR 法の開発を試みたので報告する.

B. 研究方法

ウイルス: チクングニアウイルス S27 株, BaH306 株, SL10571 株, SL11131 株, MAL09 株, R109 株より High pure viral RNA kit (ロシュ)を用いてウイルス RNA を抽出し供試した. またサギヤマウイルス, ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス, 東部馬脳炎ウイルス, シンドビスウイルス, セムリキ森林熱ウイルス, デングウイルス 1 型, 2 型, 3 型, 4 型, 日本脳炎ウイルス, ウエストナイルウイルスより同様にウイルス RNA を抽出し供試した. さらにチクングニア熱患者血清よりウイルス RNA を抽出し用いた. 陰性対照としてヒト全血由来核酸を用いた.

合成チクングニアウイルス RNA を用いた RNA コピー数の検討: チクングニアウイルスの E1 蛋白質領域をプラスミドベクター pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合

成した. 得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した.

プライマーの設計: チクングニアウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンスプライマー 8 種類, アンチセンスプライマー 7 種類を設計し検討した.

RT-PCR 法: サンプルに遺伝子検出マーカー SYBR green I を添加し, 温度条件 48 60 秒, 95 60 秒, [95 4 秒, 68 4 秒, 68 4 秒] で 45 サイクル反応した. RT-PCR 反応には Hyper PCR UR MK-IV (トラスト, 兵庫県加西市)およびライトサイクラー 96 システム(ロシュ)を用いた. RT-PCR 反応により得られた増幅産物を 470nm の波長のシグナルおよびゲル電気泳動用にて検出した.

C. 研究結果

プライマーの設計とプライマーペアのチクングニアウイルスに対する特異性の検討:

チクングニアウイルスの構造タンパク質である E1 領域にセンスプライマー 8 種類アンチセンスプライマー 7 種類を設計し様々な組み合わせを検討したところ, センスプライマー-CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798 r の組み合わせを用いて温度条件 48 60 秒, 95 60 秒, [95 4 秒, 68 4 秒, 68 4 秒]で 45 サイクル反応させた(図 1). その結果チクングニアウイルス中央・東・南アフリカ型ウイルスである S27 株およびアジア型株である BaH306 株を増幅した.(図 2A).

プライマーペア CHIK10572f / CHIK10798 r のチクングニアウイルス RNA に対する感度の検討:

チクングニアウイルスの E1 蛋白質領

域をプラスミドベクター-pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合成した. 得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム RT-PCR 法における検出感度を検討した. 10^5 の合成 RNA を 10 倍階段希釈し, 各コピー数におけるプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の反応を検討した結果チクングニアウイルスに対して 1 RNA コピー/ サンプルの検出感度を示した (図 2A). さらに RNA の検出においては定量性が認められた (図 2B).

近年の流行株に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の検討: プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の近年の流行株であり, 中央・東・南アフリカ型である MAL09 株およびアジア型である R109 株に対する反応性を検討した. その結果のチクングニアウイルス MAL09 株, および R109 株においても目的産物の増幅が認められた (図 3A).

急性期患者血清に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の検討: スリランカからの輸入症例患者血清に対するプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の反応性を検討した結果同一患者由来の急性期血清 (2 病日) においては目的産物が検出されたが回復期血清 (8 病日) の患者血清においては目的産物が検出されなかった (図 3B). また 2 病日患者血清より分離されたチクングニアウイルス SL10571 株および SL11131 株に対しても同様に目的産物が検出された (図 3B).

プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の特異性の検討: プライマーペア CHIK10572f/

CHIK10798 r の特異性を検討するために他のアルファウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス, シンドビスウイルス, ゲタウイルス, 東部ウマ脳炎ウイルス, ベネズエラ馬脳炎ウイルス, サギヤマウイルスおよびフラビウイルスであるデングウイルス 1 型 2 型 3 型, 4 型, 日本脳炎ウイルス遺伝子型 1 型, 遺伝子型 3 型, ウエストナイルウイルスに対する反応性を検討した. その結果プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r はいずれのウイルスとも反応せず, チクングニアウイルスに対して特異的に反応した (図 4). またプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r のヒト血液由来核酸に対する反応性を検討したところ非特異反応は観察されなかった (図 4).

D. 考察

これまでに我々はチクングニア熱の実験室診断法として RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50% プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した. しかしながら既存の RT-PCR 法では 1 時間以上の時間を要する. そこで我々はより迅速に反応が終了するリアルタイム RT-PCR 法によるチクングニアウイルスの診断系を確立した. 本 RT-PCR 法の第一の特徴はその迅速性である. 本 RT-PCR 法においては RT 反応から融解曲線解析を終了するまで約 15 分で終了する. またその後の反応産物のアガロースゲルでの解析およびシーケンスでの遺伝子配列の確認も可能であるためチクングニアウイルスの遺伝子型の解析も容易である. チクングニアウイルス E1 タンパク質領域において保存されている配列を基にプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を設計した. その結

果プライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r はチクングニアウイルスを特異的に検出し、さらに感度が1 RNA コピー/サンプルであった。さらにプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を用いて様々なウイルス株に対する増殖性を検討したところアジア型およびアフリカ型の両遺伝子型のウイルスに対して増幅産物が得られた。西アフリカ型のウイルスについてはその増幅能を確認できなかったが、CHIK10572f および CHIK10798 r の配列は遺伝子型間で保存されているため、西アフリカ型に対してもプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r は有効であると期待される。

チクングニアウイルスはヒトにおいて高いウイルス血症を呈するため、ヒト-カ-ヒトの感染環を形成する。したがって急性期のチクングニア熱患者を迅速に診断することは、感染拡大を予防するために重要である。よって迅速に患者血清からチクングニアウイルスを検出できる本 RT-PCR 法は臨床検体への応用が可能である。今後は本診断系の感度の向上、特異性の確認を行い、診断系としての信頼性の向上をめざす。

E. 結論

チクングニア熱の治療法は確立されておらず、チクングニアウイルスの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であり、日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することからチクングニアウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチ

クングニア熱は今後も流行が続くことが予想される。本研究において我々は遺伝子診断の迅速性の向上を目的として迅速な real time RT-PCR 診断系の確立を行ったところチクングニアウイルスを特異的に検出するプライマー候補を得た。本診断系は15分前後で完了し、デングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト由来検体においても非特異反応が観察されなかったため、迅速診断系として期待される。

F. 健康危険情報

2007年初頭に2例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認されて以来、2014年12月までに日本において70例を超える輸入症例が確認されている。温帯地方であるイタリアでは2007年に、フランスでは2010年にそれぞれチクングニア熱の国内流行が報告されており、このときの媒介蚊は日本にも生息するヒトスジシマカであったため、日本においてもチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。現在モインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニア熱の流行は拡大しており、さらに2014年7月にはアメリカでその流行が確認されたため、早期の防疫体制の確立が求められる。チクングニア熱の流行地域に渡航する場合はカに吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。チクングニア熱は平成23年2月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）において4類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニア熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、

行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

G. 研究発表

1. 論文発表

[雑誌]

- 1) Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, **Saijo M**, Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *J Gen Virol* (in press).
- 2) Nagata N, **Saijo M**, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Sato Y, Iwata-Yoshikawa N, Ogata M, Kurane I, Morikawa S, Sata T, Hasegawa H. Pathogenesis of fulminant monkeypox with bacterial sepsis after experimental infection with West African monkeypox virus in a cynomolgus monkey. *Int J Clin Exp Pathol* 15;7(7):4359-70, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, **Saijo M**, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. *J Clin Microbiol* 52(9):3325-33, 2014.
- 4) Hiraki T, Yoshimitsu M, Suzuki T, Goto Y, Higashi M, Yokoyama S, Tabuchi T, Futatsuki T, Nakamura K, Hasegawa H, **Saijo M**, Kakihana Y, Arima N, Yonezawa S. Two autopsy cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) in Japan: A pathognomonic histological feature and unique complication of SFTS. *Pathol Int* 64(11):569-75, 2014.
- 5) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, **Saijo M**, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108(12):768-73, 2014.
- 6) Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Fukuma A, Taniguchi S, Suda Y, Maeda K, Takahashi T, Morikawa S, **Saijo M**. Effects of ribavirin on severe Fever with thrombocytopenia syndrome virus in vitro. *Jpn J Infect Dis* 67(6):423-7, 2014.
- 7) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, **Saijo M**, Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J Virol* 88(13):7317-30, 2014.
- 8) Moi ML, Ami Y, Shirai K, Lim CK, Suzaki Y, Saito Y, Kitaura K, **Saijo M**, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Formation of Infectious Dengue Virus–Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) After Passive Transfer of Antidengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* (in press).
- 9) Moi ML, Takasaki T, **Saijo M**, Kurane I. Determination of antibody concentration as the main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Arch Virol* 159(1):103-116, 2014.
- 10) Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, **Saijo M**, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection. *Arch Virol* 159(11):2969-2975, 2014.
- 11) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, **Saijo M**, Morikawa S. Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One* 9(3):e92777, 2014.

- 12) 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. *Journal of Infectious Diseases* 209(6) :816-827, 2014.
 - 13) Nakamichi K, Lim CK, **Saijo M**. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):307-10.
 - 14) Nakamichi K, Tajima S, Lim CK, **Saijo M**. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol.* 2014 Jul;159(7):1687-96.
 - 15) Shirai S, Yabe I, Kano T, Shimizu Y, Sasamori T, Sato K, Hirotsu M, Nonaka T, Takahashi I, Matsushima M, Minami N, Nakamichi K, **Saijo M**, Hatanaka KC, Shiga T, Tanaka S, Sasaki H. Usefulness of ¹¹C-methionine-positron emission tomography for the diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol.* 2014;261 (12):2314-8.
 - 16) Ohara H, Kataoka H, Nakamichi K, **Saijo M**, Ueno S. Favorable outcome after withdrawal of immunosuppressant therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy after renal transplantation: case report and literature review. *J Neurol Sci.* 2014; 15;341(1-2):144-6.
2. 学会発表
- 1) **西條政幸**. 日本における重症熱性血小板減少症候群とダニ媒介性脳炎の流行. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 2) 三浦義治, 岸田修二, 中道一生, **西條政幸**, 桁丈基弘, 水澤英洋, 山田正仁. 近年の日本国内発症進行性多巣性白質脳症患者の特徴について. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 3) 三條伸夫, 喜納里子, 能勢裕里江, 石橋哲, 穴戸-原由紀子, 中道一生, **西條政幸**, 前原健寿, 江石義信, 水澤英洋. メフロキン治療が有効な進行性多巣性白質脳症における脳の病理学的特徴. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 4) 山本詞子, 石井一弘, 本間晋介, 岡田克典, 中道一生, **西條政幸**, 玉岡晃. 肺移植術後に発症した進行性多巣性白質脳症の60歳女性例. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 5) **西條政幸**, 伊藤(高山)睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発. 第19回日本神経感染症学会総会. 金沢, 2014年9月4-6日.
 - 6) 中道一生, 林昌宏, **西條政幸**. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 7) 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, **西條政幸**. 非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 8) Moi ML, 白石健二, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦孝一, **西條政幸**, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 9) 林昌宏, 司馬肇, 細野邦明, **西條政幸**, 倉根一郎, 高崎智彦. Fc R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 齋藤悠香, Moi ML, 竹下望, 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月10-12日.
 - 10) **西條政幸**, 吉河智城, 福士秀悦, 谷秀樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Singh H, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系

- 統学的特徴とその地理的分布 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
- 11) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、**西條政幸** . 若齢および高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症群ウイルスの感染感受性の解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 12) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、**西條政幸** . プラークを形成する SFTS ウイルスによる中和抗体価測定 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 13) 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、**西條政幸** . 重症熱性血小板減少症群ウイルス GP の細胞融合能と 25-hydroxycholesterol による感染障害効果 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 14) 川岸崇裕、金井祐太、谷英樹、下島昌幸、**西條政幸**、松浦善治、小林剛 . 高病原性コウモリ由来レオウイルスのリバースジェネティックス系の確立 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 15) 山口幸恵、林昌宏、伊藤(高山)睦代、垣内五月、堀谷まどか、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、渡邊治雄、**西條政幸** . 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に關与する炎症性サイトカインの解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 16) 林昌宏、van den Braak W、堀谷まどか、伊藤(高山)睦代、山口幸恵、垣内五月、**西條政幸** . Expression of rabies virus glycoprotein G by using recombinant baculovirus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 17) 中山絵里、小滝徹、谷ヶ崎和美、林昌宏、**西條政幸**、高崎智彦 . チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .
 - 18) 田島茂、谷ヶ崎和美、小滝徹、中山絵里、Moi ML、林昌宏、**西條政幸**、倉根一郎、高崎智彦 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

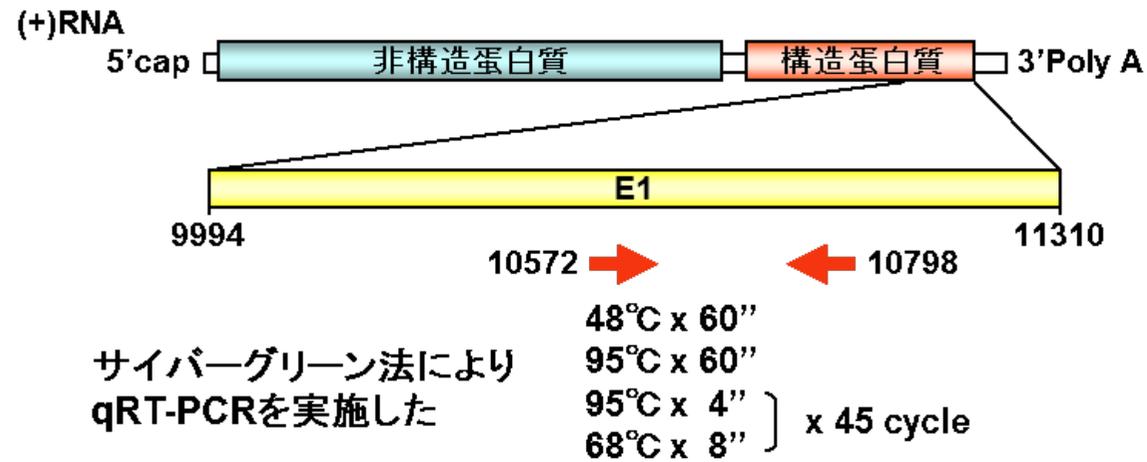


図 1 .CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR 用プライマーの設計：CHIKV 10 株のアライメント結果より E1 領域の保存領域に特異的プライマーを設計した。

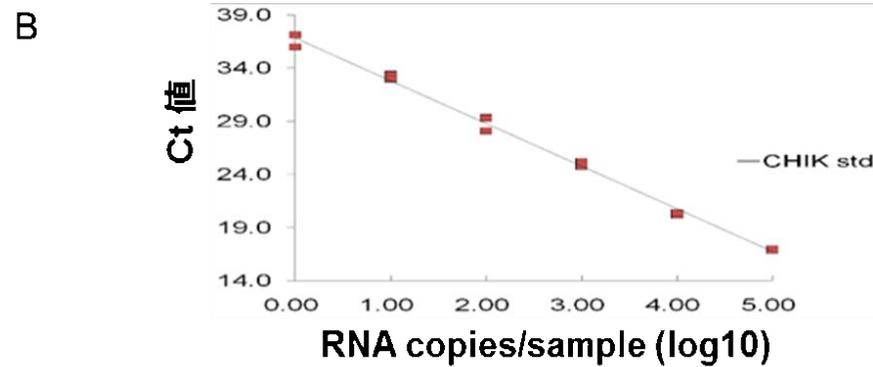
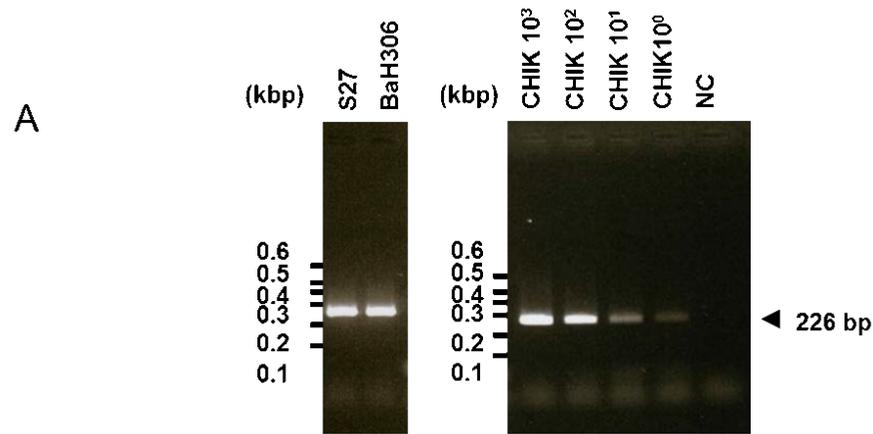


図 2 . CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR の感度および定量性の検討：リアルタイム RT-PCR による検討の結果 CHIKV プロトタイプである S27 株および BaH306 株に対して特異的増幅を示し、RNA コピー数依存的に標的遺伝子の増幅が確認された (A)、設計したプライマーによる RT-PCR の増幅産物は定量性を示した (B)

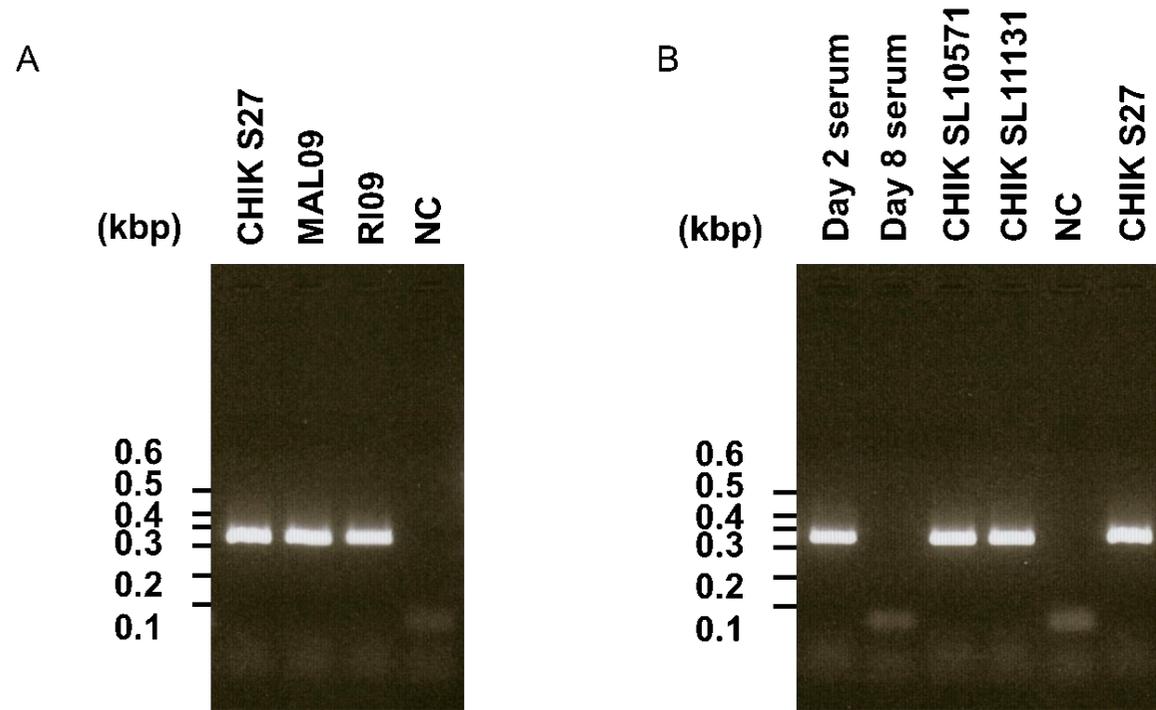


図 3 .CHIKV 検出用リアルタイム RT-PCR 用プライマーの臨床検体と分離株に対する反応性および特異性の検討：プライマーペア CHIK10572f / CHIK10798r はマレーシア (ML09 株)、インドネシア (RI09 株) からの輸入症例からの分離株に対して特異的増幅が確認された (A)、またプライマーペア CHIK10572f / CHIK10798r は急性期患者血清中のチクングニアウイルスおよび、患者血清より分離された SL10571 株、SL11131 株に対しても反応性を示した (B)。

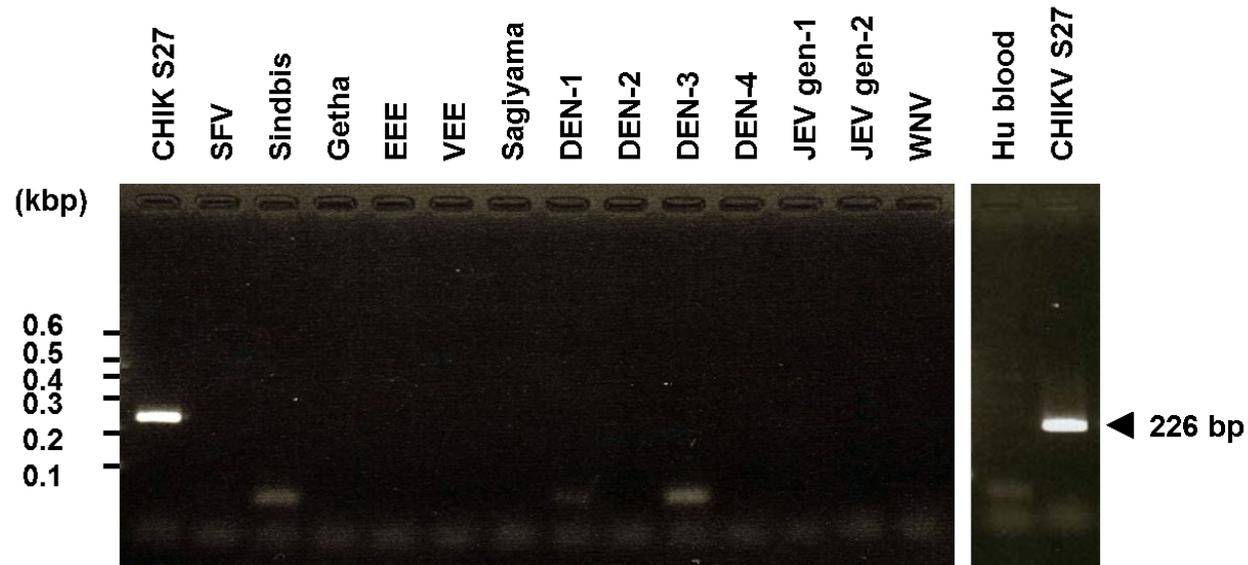


図 4 . CHIKV 検出用 qRT-PCR 用 プライマー の 特異性 の 検討 : プライマー ペア CHIK10572f / CHIK10798r は 他 の アルボ ウイルス の うち、ア ル フ ァ ウ イ ル ス で あ る セ ム リ キ 森 林 熱 ウ イ ル ス、シ ン ド ビ ス ウ イ ル ス、ゲ タ ウ イ ル ス、東 部 ウ マ 脳 炎 ウ イ ル ス、ベ ネ ズ エ ラ 馬 脳 炎 ウ イ ル ス、サ ギ ヤ マ ウ イ ル ス お よ び フ ラ ビ ウ イ ル ス で あ る デ ン グ ウ イ ル ス 1 型、2 型、3 型、4 型、日 本 脳 炎 ウ イ ル ス 遺 伝 子 型 1 型、遺 伝 子 型 3 型、ウ エ ス ト ナ イ ル ウ イ ル ス に 対 し て 反 応 性 を 示 さ な か っ た . ま た 健 常 ヒ ト 血 液 由 来 拡 散 に 対 し て も 非 特 異 反 応 を 示 さ な か っ た .

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

「アジアにおける感染症病理診断レファレンス・コンサルテーションネットワークの形成
に関する研究」

担当責任者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨

マレーシアのマラヤ大学医学部病理学研究室 Kum Thong Wong 教授を訪問し、ウイルス性脳炎を中心とする病理像に関して情報交換、議論を行った。また同大学医学部において、国立感染症研究所感染病理部にて独自に開発したマルチウイルスリアルタイムPCR 検索システムによる、不明感染症病理検体に対する網羅的ウイルス解析法についての講義を行い、同大学病院の診断困難脳炎症例についてレファレンス症例として解析依頼を受け、病原体検索と報告を行った。さらに帰国後に共同研究依頼を受け、慢性扁桃炎あるいは扁桃過形成として同大学医学部病院で過去に外科的手術により摘出された扁桃 22 例についてレファレンス症例としてウイルスの網羅的解析を行い、これらの検体から、パルボウイルス B19 とメルケル細胞ポリオーマウイルスがそれぞれ 1 例ずつ検出された。

A．研究目的

マラヤ大学医学部病理学研究室の Kum Thong Wong 教授を訪問し、ウイルス性脳炎を中心とする疾患の病理像に関して情報交換と議論を行い、アジアにおける感染症の病理専門医間の診断のネットワークを充実させる。また同大学医学部病院の慢性扁桃炎および扁桃過形成患者の扁桃組織からのウイルスの網羅的解析を行う。

B．研究方法

マラヤ大学医学部病理学研究室 Kum Thong Wong 教授を訪問し、同研究室、および国立感染症研究所感染病理部より持参する感染症症例の病理組織標本を顕微鏡にて供覧、観察し、議論と情報交換を行う。また感染病理部にて独自に開発したマルチウイルスリアルタイムPCR 検索システム (Katano H, *et al.* J Med Virol. 2011; 83: 322-30) について同大学医学部において講義を行い、同大学医学部病院の診断困難脳炎症例の解析を行う。さらに、同病院で過去に外科的手術により摘出された扁桃 22 例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、ウイルスの網羅的解析を行う。

（倫理面への配慮）

マラヤ大学医学部病院の扁桃検体の解析について、マラヤ大学での倫理委員会の承認、および国立感染症研究所倫理委員会の承認（平成26年3月4日承認、受付番号491）を得ている。

C．研究結果

マラヤ大学医学部病理学研究室では、二
パ脳炎、日本脳炎、エンテロウイルス脳炎、

狂犬病等の中枢神経感染症を含む希少症例の病理組織標本の検鏡を行った。また国立感染症研究所感染病理部より持参した進行性多巣性白質脳症やコクサッキーウイルス感染による心筋炎症例の標本も検鏡し、所見や病態について情報交換と議論を行った。

同大学医学部病院における診断困難脳炎についてはレファレンス症例として感染病理部で検索を行ったが、明らかな病原体は検出されなかった。また、扁桃検体 22 例についてウイルスの網羅的解析を行ったところ、パルボウイルス B19 とメルケル細胞ポリオーマウイルスがそれぞれ 1 例ずつ検出された。

D．考察

今回の訪問では、日本での発症の報告のない二パ脳炎症例を含む新興・再興感染症の希少症例につき、Wong 教授と鏡検、議論する機会が得られたが、これは本邦における新興・再興感染症の病理診断の向上に直結すると考えられる。またマラヤ大学で感染病理部における病原体解析法に関する講義を行ったことで、同大学医学部から診断困難症例の解析のコンサルトを受けて感染病理部で解析と報告を行ったが、さらに今回の訪問を契機に同大学医学部からの依頼で、多数例の扁桃検体解析の共同研究も行った。今回の訪問により、アジアにおける感染症病理専門医間の診断のネットワークの充実に大いに貢献できたと考えられる。

E．結論

マレーシアのマラヤ大学医学部病理学研究室を訪問し、希少症例の標本の病理像に

についての議論と情報共有を行い、感染病理部における病理組織検体の解析についての講義も行ったことで、アジアにおける感染症病理専門医間の診断に関するコンサルテーション・ネットワークの充実に貢献することができた。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹
不明脳炎症例の臨床検体からの原因ウイルスの網羅的検索

第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014/11/10-12、パシフィコ横浜

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹

不明脳炎症例の病理組織検体からの原因ウイルスの網羅的検索

第19回日本神経感染症学会、金沢、2014/9/4-6、金沢歌劇座

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹

不明脳炎症例の臨床検体における原因ウイルスの網羅的検索

第18回日本神経ウイルス研究会、浜松、2014/6/20-21、アクトシティ浜松

高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹

不明脳炎における原因ウイルスの網羅的検索

第55回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、2014/6/5-7、学術総合センター

H. 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。

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

新興再興感染症制御プロジェクトにおける若手研究者等の研修システムの構築

担当責任者 宮川昭二 国立感染症研究所 国際協力室

研究要旨 インフルエンザウイルス、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌及びノロウイルスに関し、病原体ゲノムデータベース構築を通じアジア各国との有機的かつ継続的な連携協力等の基盤を確立する事業の一環として、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)に参加する海外拠点研究機関や海外国立感染症研究機関等から若手研究者等を招聘し、病原体ゲノム情報の収集・解析等の研修を行った。

A. 研究目的

インフルエンザウイルス等近年特に問題となっている病原体に関して、我が国における感染症対策に資するため、アジア地域等で流行している病原体株を主とするゲノムデータベースを構築し同データベースの継続的に維持されるための基盤を確立する事業を推進する一環として、感染症研究国際ネットワーク推進プログラム(J-GRID)等のアジア地域等の海外研究拠点、海外国立感染症研究機関等の若手研究者等を招聘し、病原体ゲノム情報の収集・解析、感染症流行予測及び対策、治療等開発などについて研修を行う。また、国立感染症研究所(感染研)や地方衛生研究所などの国内の感染症専門家をJ-GRID 海外拠点等に派遣し、海外拠点において研修を行う。

B. 研究方法

J-GRID 海外拠点及び海外の国立感染症研究機関等から若手研究者等を招聘する「感染症制御セミナー」を開催するとともに、J-GRID 拠点を置く海外感染症研究機関などからの要望を受け、「エボラウイルス感染症実験室診断技術研修」を開催するとともに、インフルエンザ、薬剤耐性

などのつい J-GRID 拠点等から若手研究者を感染研に招聘し、研修を実施する。また、感染研究所及び地方衛生研究所の若手研究者を J-GRID 拠点等に派遣し、研修を実施する。

C. 研究結果

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

(2) 感染症制御セミナー

2015年1月22～23日、中国、タイ、インドネシア、フィリピン、ザンビアなど7カ国の研究機関(J-GRID 拠点など)及び地方衛生研究所から計73名の研究者を招聘し、池袋サンシャインシティ内会議室において、感染症制御セミナー(NIID International Seminar on Infectious Diseases)を開催した。同セミナーでは、インフルエンザ、デングウイルス、薬剤耐性菌、下痢原性細菌及びノロウ

ウイルス等の感染研が行う病原体ゲノム情報の収集・解析等のほか、それらを活用した感染症の流行予測、診断・治療等について、最新の研究状況等を研修した。また、海外からセミナーに参加した専門家は、1月24日に国立ハンセン病資料館を訪問し、我が国のハンセン病対策の歴史等について研修を行った。

(3) カウンターパート研修

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

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

(4) その他

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

D、E. 考察と結論

国立感染症研究所は、国内での感染症対策に資するため、これまでも海外の感染症研究機関との連携・協力を積極的に取り組んできたところであり、国際セミナー開催や共同研究事業を通じて、海外研究機関等の専門家と感染研の専門家が交流することにより、海外での感染症発生状況や病原体等に関する情報など収集し分析するなど実績を上げてきていた。

今年度から始まった本研究事業により、より多くの研究者が、海外から感染研に招聘され、もしくは海外研究機関に派遣することが出来、感染研とJ-GRID 拠点等海外研究機関との結びつきがより強化され、研究者間での相互理解や信頼醸成などにつながったと思われる。このような活動を通じて、これまで以上に感染症発生動向や

病原体情報などについて収集等が進むことが期待される。

今年度は、事業決定から執行まで時間的制約があったことから、研修内容や時期、招聘する専門家などで実施可能性などを考慮したものとならざるを得なかった。J-GRID 拠点等海外研究機関からの要望などのほか、感染研側の優先分野などを精査し両者のマッチングを行うこと、招聘や受け入れなどの時期や体制など、今後十分な調整を行うことが望まれる。また、研修内容や研修効果など実施された研修について客観的な評価を行う仕組みなども望まれる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

その他

特記事項なし

学会等発表実績

委託業務題目 「海外研究機関等との感染症に関する共同研究および連携強化に関する研究」

機関名 国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所	発表した時期	国内・外の別
Re emerging dengue in Japan 2014. 口頭	Tomohiko Takasaki	The 8 th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention.The Lotte Hotel, Jeju, Korea	Nov.26, 2014.	国外
Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 口頭	Tomohiko Takasaki	17 th International Conference on Emerging Infectious Diseases, Taipei, Taiwan	27-29 Jun 2015	国外
デング熱国内発生への対応 - デング熱の基礎と疫学 - . 口頭	高崎智彦	第46回日本小児感染症学会 . 東京	平成26年10月18 - 19日	国内
70年を経ての再来 ~ デング熱国内流行2014. 口頭	高崎智彦	第57回日本感染症学会中日本地方会学術集会 . 岡山	平成26年10月23 - 25日	国内
デング熱 - 今年の国内流行。口頭	高崎智彦	第62回日本ウイルス学会学術集会 . 横浜	平成26年11月10~12日	国内
デング熱これからどうなる? 口頭	高崎智彦	日本獣医学会 公衆衛生分科会 東京	平成26年12月1日	国内
デング熱国内感染と海外の対応。口頭	高崎智彦	日本旅行医学会 東京	平成26年12月13日	国内
不明脳炎症例の臨床検体からの原因ウイルスの網羅的検索。口頭	高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、	平成26年11月10 - 12日	国内

不明脳炎症例の病理組織検体からの原因ウイルスの網羅的検索。口頭	高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	第19回日本神経感染症学会、金沢	平成26年9月4-6日	国内
不明脳炎症例の臨床検体における原因ウイルスの網羅的検索。口頭	高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	第18回日本神経ウイルス研究会。浜松	平成26年6月20-21日	国内
不明脳炎における原因ウイルスの網羅的検索。口頭	高橋健太、福本瞳、鈴木忠樹、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	第55回日本神経病理学会総会学術研究会。東京	平成26年6月5-7日	国内
日本における重症熱性血小板減少症候群とダニ媒介性脳炎の流行	西條政幸	第19回日本神経感染症学会総会。金沢	平成26年9月4-6日	国内
重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布。	西條政幸、吉河智城、福土秀悦、谷秀樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Singh H、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸。	第62回日本ウイルス学会学術集会。横浜	平成26年11月10-12日	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
A food-borne outbreak of gastroenteritis due to genotype G1P[8] rotavirus among adolescents in Japan.	Mizukoshi F, Kuroda M, Tsukagoshi H, Sekizuka T, Funatogawa K, Morita Y, Noda M, Katayama K, Kimura H.	Microbiology and Immunology 58(9):536-539,	平成26年9月	国外
脳炎・脳症の病理	高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹	Neuroinfection	平成26年7月	国内