

新興再興感染症起因病原体の診断及び解析法に関する研究

保坂 三継, 新開 敬行, 向川 純, 小西 典子, 田部井 由紀子, 畠山 薫, 灘岡 陽子,
貞升 健志, 神谷 信行, 仲真 晶子, 甲斐 明美, 吉田 靖子, 矢野 一好

Studies on Diagnostic and Analytical Methods for Pathogens of Emerging and Re-emerging Diseases

Mitsugu HOSAKA, Takayuki SHINKAI, Jun MUKAIGAWA, Noriko KONISHI, Yukiko TABEL,
Kaoru HATAKEYAMA, Yoko NADAOKA, Kenji SADAMASU, Nobuyuki KAMIYA,
Akiko NAKAMA, Akemi KAI, Yasuko YOSHIDA and Kazuyoshi YANO

新興再興感染症起因病原体の診断及び解析法に関する研究

保坂 三継^{*1}, 新開 敬行^{*2}, 向川 純^{*3}, 小西 典子^{*4}, 田部井 由紀子^{*2}, 畠山 薫^{*3}, 灘岡 陽子^{*5},
貞升 健志^{*3}, 神谷 信行^{*5}, 仲真 晶子^{*4}, 甲斐 明美^{*6}, 吉田 靖子^{*7}, 矢野 一好^{*8}

健康安全研究センター微生物部が平成18年度～20年度の3年間で取り組んだ重点研究「新興再興感染症起因病原体の診断及び解析法に関する研究」の成果の概要について紹介した。本研究は7題の個別研究から構成され、鳥インフルエンザや結核、その他の新興再興感染症の発生を想定し、おもに遺伝子検査技術を駆使して、それらの感染症の病原体に対する迅速かつ高感度な診断検査方法と類症鑑別方法を構築する。また遺伝子系統樹解析など分子疫学解析手法を確立し、それらの感染経路の究明や発生源対策及び感染症の封じ込め対策等に有効なデータを関係部署に提供する。さらに、感染症発生情報のいち早い収集と解析によって健康危機管理にかかる情報の迅速な還元と共有化を図るものである。本研究は各課題においてその目標を達成し、その成果のいくつかはすでに感染症や食中毒事例発生に際して応用され、行政施策に反映されている。その代表的事例が、研究終了の翌年、平成21年（2009年）の新型インフルエンザ流行発生に際しての、新型インフルエンザウイルスと季節性インフルエンザウイルスの鑑別検査系の迅速な構築完了と、都独自の情報ネットワークシステムを利用した患者発生情報の収集と迅速な病原体情報の還元である。

キーワード：新興再興感染症，遺伝子検査，遺伝子疫学解析，鳥インフルエンザウイルス，結核菌，腸管出血性大腸菌，狂犬病ウイルス，E型肝炎ウイルス，フラビウイルス属，感染症発生動向調査

はじめに

健康安全研究センター微生物部は平成18年度～20年度の3カ年で、重点研究「新興再興感染症起因病原体の診断及び解析法に関する研究」を実施した。本研究は、微生物部ウイルス研究科長をプロジェクトリーダーとし、微生物部のすべての研究科・室から本プロジェクトを構成する7つの個別研究課題を担当する研究チームが参加した。

本研究では、新型インフルエンザをはじめとした新興感染症や流行の拡大が懸念されている結核などの再興感染症に対するいち早い病原体検査と類症鑑別を可能にするため、遺伝子検査法を主体とした迅速・高感度検査手法の開発・改良を行い、またそうした新興・再興感染症の発生情報の迅速探知と解析のための情報ネットワークの構築及び活用について検討した。本稿では本研究の3カ年にわたる取り組みで得られた成果を紹介する。

研究目標と研究内容

本重点研究は以下の目標とそれを達成するための検討手段で構成される。

○目標Ⅰ．感染症の原因究明を目標とした症候群別迅速診

断法の開発改良

手段1. 迅速・高感度検査法の開発

手段2. 類症鑑別診断法の開発

手段3. 除外診断法の開発

○目標Ⅱ．感染症の蔓延防止を目標とした疫学調査

手段1. 感染経路の究明

手段2. 感染拡大の予知

手段3. 感染症発生状況の把握

具体的には、症候群別検査体制の整備に関する研究として1)急性呼吸器症候群（①新型インフルエンザウイルス，②結核菌），2)急性胃腸症候群（③腸管出血性大腸菌），3)急性神経症候群（④ウエストナイルウイルス等フラビウイルス，⑤狂犬病ウイルス），4)非特異的感染症症候群（肝炎症候群）（⑥E型肝炎ウイルス）について、おもに遺伝子検査法等による迅速・高感度検査法を開発した。さらにそうした方法により、類症鑑別診断あるいは新興感染症疑いの原因不明疾患との鑑別を可能とするとともに、媒介動物や食品の汚染、感染状況の調査、分離株等の薬剤感受性や遺伝子解析による系統解析を行い、当該病原体の感染経路の究明や感染拡大の予知に資する知見を得た。また⑦新興・

^{*1} 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*2} 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^{*3} 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^{*4} 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^{*5} 東京都健康安全研究センター微生物部疫学情報室

^{*6} 東京都健康安全研究センター微生物部

^{*7} 元東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科

^{*8} 元東京都健康安全研究センター微生物部

表1. H5N1型インフルエンザウイルスに対する検出感度の比較

検査法	遺伝子	特異性	検出感度(ウイルス希釈倍数)					
			10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
LAMP 法	HA	H5	+	+	+	—	—	—
リアルタイム PCR 法 (本研究)	HA	H5	+	+	+	+	+	—
	NP	A	+	+	+	+	+	+
リアルタイム PCR 法*	HA	H5	+	+	+	+	—	—
	M	A	+	+	+	+	+	—
RT-PCR 法**	HA	H5	+	+	+	+	—	—
	M	A	+	+	+	+	+	—

* 2008年8月に国が提示

** 2006年6月に国が提示

表2. リアルタイムPCR法で検出が可能となったインフルエンザウイルスの亜型・型

ウイルス	検出可能な亜型・型			
鳥インフルエンザウイルス	H2	H5	H7	H9
ヒトインフルエンザウイルス	H1	H3	B	
ヒトインフルエンザウイルス (ノイラミニダーゼ)	N1	N2	N3	
インフルエンザウイルス属	A 型共通			

再興感染症の発生動向の早期把握に関する研究として、感染症発生動向調査や各種疫学情報の収集・解析による患者発生状況の迅速把握及び各種情報の効果的利用方法等を検討した。

課題ごとの研究成果

以下に、①から⑦までのそれぞれの課題に関する研究成果の概要を紹介する。

1. インフルエンザ様疾患の迅速診断及び除外診断法の改良・開発

1) インフルエンザウイルス遺伝子検査システムの改良

鳥インフルエンザウイルス、ヒトインフルエンザウイルスを対象とした検査法を再構築した。LAMP法は鳥インフルエンザウイルスのクレード2.3まで検出可能なVer.2に更新して検出対象の拡大を図った。2006年6月に国が新しいRT-PCR法によるH5N1型ウイルスの検出法を提示し、これを参考として都独自のRT-nested PCR法を作製して検査システムに組み込んだ。さらに、リアルタイムPCR法について、東京都独自に開発したクレード2.1までの検出用プライマープローブセットを、国内外の機関からもたらされる遺伝子情報から新開発したプライマープローブセットに更新

することで、クレード2.3までのすべてのクレードのウイルスを検出できるように改良した。その結果、国の提示した方法よりも高感度で(表1)、かつA型インフルエンザウイルスの広範囲のH亜型とN亜型並びにB型の同時検出が可能なりアルタイムPCR検出系(表2)を構築した。

なお、本研究が終了した翌年、平成21年(2009年)に豚インフルエンザウイルスを起源とする新型インフルエンザウイルスAH1pdmの世界的な大流行が発生した。当センター微生物部ウイルス研究科は、本研究の成果を直ちに応用してAH1pdmのリアルタイムPCRおよびRT-nested PCR検出系を開発し、AH1pdmとヒト季節性インフルエンザウイルスAH1N1(Aソ連型)、AH3N2(A香港型)及びB型インフルエンザウイルスを6時間以内に同時に鑑別でき、国が当初示した検出系よりも高感度なりアルタイムPCR検査システムを同年4月下旬までに構築した。これにより、RT-nested PCRと塩基配列解析による23時間以内の確認検査を含めた新型インフルエンザウイルスに対する東京感染症アラート*検査体制をいち早く確立することが出来た。

(*東京感染症アラート: 鳥インフルエンザ・新型インフルエンザの発生を早期に発見し、封じ込め対策を的確に行なうための東京都独自の緊急検査システム。迅速な検査と精密な検査を組み合わせ、検体受付から24時間以内に検査結果を関係部署に通知する。)

2) インフルエンザウイルスの分子系統解析

ヒトインフルエンザウイルスの遺伝子データを用いて作製した分子系統樹の解析により、AH1型ウイルスは5~10年前までほとんど遺伝子変異が見られなかったが、近年、小規模の遺伝子変異を毎年起こしていること、AH3型ウイルス流行株は歴代のワクチン株に対して比較的近縁な位置を保つ程度に変異を起こし続けており、毎年ワクチン株の変異が続いていること、さらにB型は予想されたワクチン株とは異なる系統の株が流行しているものの、近年に流行が見られたウイルスに近縁なウイルスの発生が多いことが判った。また、NA遺伝子解析の結果、2008/2009シーズンに都内で流行したAH1型ウイルス株の全てがタミフル耐性のマーカー遺伝子(H275Y)を持つことを確認した。AH3

型, B 型には耐性マーカー遺伝子は見られなかった. これらの流行株の遺伝子変異を踏まえて, 季節性インフルエンザ検出試薬を随時改良し, 検出感度の維持・向上を図った.

3) 媒介動物に対する鳥インフルエンザウイルス侵入状況の監視

都内産ブタの血清計120検体を用い, 鳥インフルエンザウイルスH5型に対する抗体調査を行った結果, 全て陰性となり, 血清疫学的にH5ウイルスの都内侵入は認められなかった. また都内で採取された野鳥, 渡り鳥の糞便計60検体を用いて鳥インフルエンザウイルスH5型遺伝子検査を実施した結果, H5型ウイルス遺伝子は検出されなかった.

2. 遺伝子工学的手法を導入した結核菌迅速検査法の開発

1) LAMP 法による *Mycobacterium* 検出法の開発

抗酸菌の 16SrRNA 遺伝子と *gyrB* 遺伝子を基に設計したプライマーを用いて, LAMP 法による抗酸菌, 結核菌, *M. avium*, *M. intracellulare* の検出系を作成した. 16SrRNA 遺伝子を基にした検出系は抗酸菌全般, *gyrB* 遺伝子を基にした検出系は結核菌群と *M. avium*, *M. intracellulare* を特異的に検出した (図 1). 感度は従来法のコバスアンプリコア法と同等であり, 検出時間は約 1/3 に短縮できた.

2) VNTR 法による結核菌遺伝子型別の検討と応用

VNTR 法は特定領域の PCR を応用できるため, 少量の菌体で検査可能であり, 多量の菌体を要する RFLP 法よりも迅速に解析できる利点がある. VNTR 法で広く用いられて

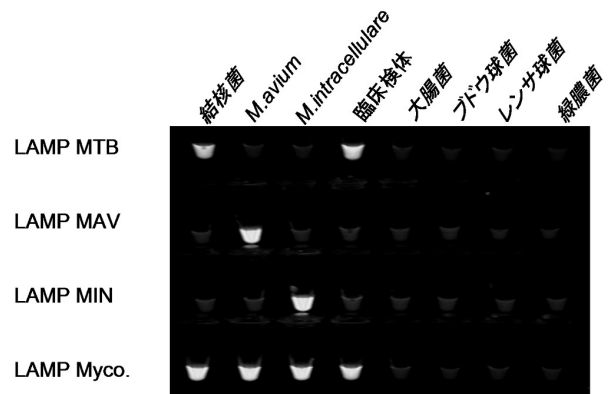


図 1. LAMP 法による結核菌ほか抗酸菌の検出系の構築

LAMP MTB : *gyrB* 遺伝子による結核菌群検出系

LAMP MAV : *gyrB* 遺伝子による *M.avium* 検出系

LAMP MIN : *gyrB* 遺伝子による *M.intracellulare* 検出系

LAMP Myco. : 16SrRNA 遺伝子による抗酸菌全般の検出系

きた MIRU と ETR 領域に加え, QUB や Mtub などの領域を対象とすることで, 分析精度が向上した. また RFLP 法では分析不十分な IS6110 が 1 コピーの株も VNTR 法で明瞭に分析できることがわかった. 図 2 に RFLP 法では同一パターンを示した 5 事例 9 株を VNTR 法で解析した結果を示す. この 9 株は同一事例内の株ではほぼ同じ反復数であるが, 事例が異なると反復数の異なる領域があることが明らかとなり, きめ細かい分子疫学的情報の提供が可能と考えられた.

表 3. VNTR 法による結核発生事例の事例内及び事例間の解析結果

発生年度	平成12年			平成12年		平成13年	平成16年		平成17年
発生場所	病院			集合住宅		病院	遊技店		会社
検体	A	B	C	A	B	A	A	B	A
QUB11a	8	8	8	8	8	8	8	8	8
11b	8	8	8	8	8	8	8	8	8
18	8	8	8	8	8	8	8	8	8
26	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1451	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1895	4	4	4	4	4	2	4	4	4
3232	18	14+18	14	14	14	14	14	14	14
4156	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mtub01	9	9	9	9	9	9	9	9	9
04	4	4	4	4	4	4	4	4	4
16	2	2	2	2	2	2	2	2	2
21	4	4	4	4	4	4	4	4	4
24	3	3	3	3	3	3	3	3	3
29	4	4	4	4	4	4	4	4	4
30	4	4	4	4	4	4	4	4	4
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	3	3	3	3	3	3	3	3	3
VNTR2372	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3820	14	14	14	14	14	14	14	14	14
4120	9	9	9	9	9	9	9	9	10

□ : 他の検体と異なる反復数

3) 薬剤耐性菌拡大防止のためのデータベースの構築

DNAシーケンス法による薬剤耐性に関与する遺伝子変異の検出法をほぼ確立し、当センターに搬入された薬剤耐性結核菌株の薬剤感受性と遺伝子型に加えて耐性遺伝子の解析を行い、薬剤耐性菌の拡大防止につながるデータベースを構築した。

3. 腸管出血性大腸菌の迅速診断法及び分子疫学解析法に関する研究

1) 食品からの腸管出血性大腸菌の増菌培養法及び DNA 抽出法の検討

O157に加えて、近年事例が増加しているが検査法が確立していない腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26, O111 等を食品から迅速に同時に検出するための増菌培養方法を検討した結果、O157 および O26 は N-mEC 培地で 42℃、18~22 時間培養後、免疫磁気ビーズ法で集菌する方法が最も効率よく分離できた。O111 はこの方法では増菌されない場合が認められたが mEC 培地で効率よく増菌できた (表 4)。

表 4. 増菌培地と菌の発育

対象菌	増菌培地 (培養温度)			
	N-mEC (42℃)	mEC (42℃)	BPW (37℃)	BPW (42℃)
O157	◎	△	×	△
O26	○	◎	×(*)	○
O111	×	◎	×(*)	○

(*) : BPW 培養後 N-mEC へ継代培養すれば○

△ : 食品によって異なる

N-mEC 培地で増菌した後の菌体からの DNA 抽出方法について、熱抽出法、アルカリ抽出法及び市販の DNA 精製キット 4 種類を用いて検出感度を検討した。キット C, D で 10^2 /mL まで検出できたが、費用と時間がかかった。一方、アルカリ抽出法は 10^3 /mL まで検出でき、 10^2 /mL でも 50% で検出できたことから、もっとも安価で簡便な実用的抽出法であった。

2) 実際の食品を対象とした遺伝子検査と菌分離の比較

検体として搬入された食品 283 検体を対象に遺伝子検査法 (LAMP 法及び PCR 法) を用いて EHEC の検出を試みた。LAMP 法陽性は 55 検体 (19.4%)、PCR 法陽性は 26 検体 (9.2%) であった。いずれかの遺伝子検査で陽性となった検体のうち、8 検体から EHEC が検出された。この 8 件は LAMP 法及び PCR 法ともに陽性であった。検出された EHEC の血清型は O157 が 3 件、血清型別不能 (OUT) が 5 件であった。遺伝子検査陽性検体における EHEC の分離率は LAMP 法で 8/55 (14.5%)、PCR 法で 8/26 (30.7%) であった。

3) PFGE 法による O26 集団感染事例の解析

2008 年に都内で分離された 73 株の O26 について PFGE

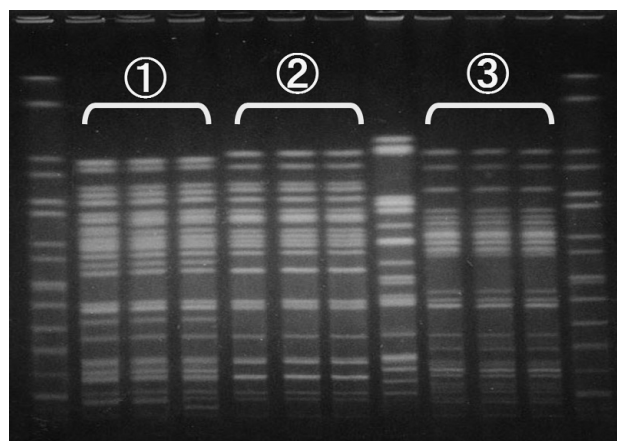


図2. 都内3保育園で発生したO26集団感染症からの分離株のPFGEパターン

解析を行った結果、16 種類のパターンに分類された。2008 年 8~9 月に都内保育園で O26 の集団感染事例が 3 件発生し、これらの事例で分離された株について PFGE 解析を行った。同一事例由来株は同じパターンを示した一方、各事例間ではそれぞれ異なったパターンを示しており、各事例の感染源は異なるものであると推定された (図 2)。このことから O157 と同様に、O26 の集団感染においても PFGE 法が感染源推定に有効であることが示された。

4. ウエストナイルウイルス及びデングウイルスを中心としたフラビウイルス感染症の簡易迅速診断法の検討

1) デング熱ウイルス診断法の簡易・迅速化及び高感度化
ウエストナイル熱ウイルス (WNV)、デング熱ウイルス (DEV)、日本脳炎ウイルスはともにフラビウイルス属に分類され、類似の熱性疾患を起こすため、迅速な鑑別診断が求められる。リアルタイムPCRによるDEV遺伝子の高感度検査法として、エンベロープ領域のDEV1型から4型の全てに共通する遺伝子配列部位にプライマーを1対設定し、プローブはDEV1型と2型、3型と4型、それぞれに共通する遺伝子配列部位に2対設定し、異なる蛍光色素を標識した。これによりマルチプレックス検査が可能となり、1回の検査でDEV1型から4型全てが検出可能となった。また、デング熱の新たな診断法であるELISA法によるDEVのNS1抗原検査の検出可能となる病日期间について検討した。NS1抗原陽性となった患者検体の病日期间は2病日から8病日であり、発病初期の有熱期 (1病日~5病日) から解熱後の回復期までの長い病日期间で抗原検出が可能であった。このことから、発病初期の有熱期においてのみ診断が可能であるDEV遺伝子検査にNS1抗原検査を加えて実施することによって、診断の精度は更に向上することが示された。

2) チクングニヤ熱ウイルス鑑別法の検討とデング熱ウイルスとの同時検出法の構築

2005年から南アジア地域においてチクングニヤ熱が流行し、流行地域の拡大が懸念された。チクングニヤ熱はウエストナイル熱よりもデング熱と類似の疾患であることから、

トガウイルス科アルファウイルス属であるチクングニヤウイルス（CHKV）についても緊急に検査法の導入を図り、さらにDEVとの同時検査法を検討した。リアルタイムPCR法によるCHKV遺伝子検査法として、CHKVのE1蛋白領域にプライマー及びプローブを設定し、CHKV遺伝子のみの増幅を確認した。この方法によって過去2年間に当センターに搬入されたデング熱疑いの急性期（有熱期）患者検体のうちDEVが検出されなかった13検体についてCHKV遺伝子検査を行い、全ての検体でCHKV遺伝子陰性を確認した（図3）。さらにCHKVとDEVの遺伝子検査のマルチプレックス化により類似症状を起こすDEV（1型から4型）とCHKVの同時検出を可能とし、これらの疾患の類症鑑別法として確立した。

3) ウェストナイル熱等媒介蚊のサーベイランス

CHKV及びDEV遺伝子が同時に検出可能となったことから、これまで調査していたWNVに加えて、類似症状を起こし、同じヒトスジシマカによって媒介されるDEVとCHKV

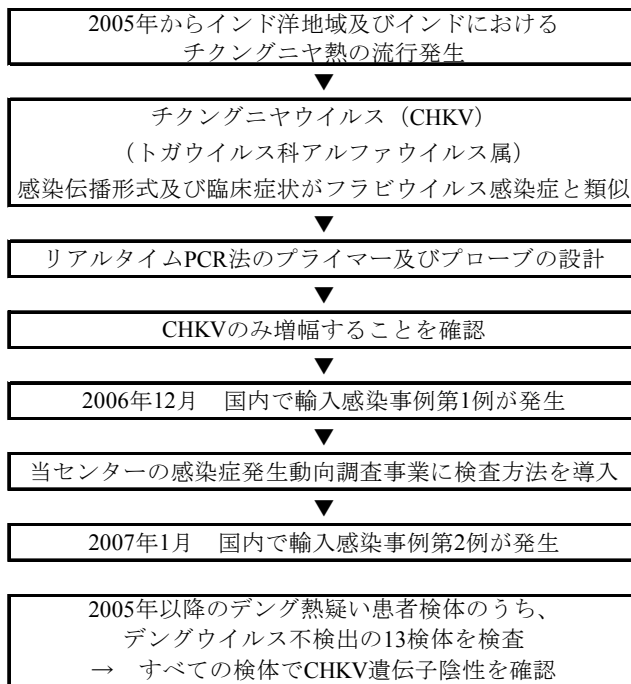


図3. チクングニヤウイルス検査法の開発と経常業務への導入経過

表5. 当センターにおける蚊の捕集数及び分類結果

蚊の種類	平成19年 6～12月	平成20年 4～12月	2カ年合計
アカイエカ	1,882	915	2,797
ヒトスジシマカ	160	241	401
コガタアカイエカ	72	109	181
オオクロヤブカ	1	0	1
計	2,115	1,265	3,380

を効率的に検査することが可能となった。都におけるこれらのウイルス侵入調査の基礎資料とするため、当センター

内の2定点において平成19年と20年の2カ年にわたり蚊の捕集と分類及びWNV等のウイルス検索を行った。その結果、3,380匹の蚊が捕集され、優占種はアカイエカであること、ヒトスジシマカに加えて日本脳炎を媒介するコガタアカイエカが第3位であること、またWNV、DEV及びCHKVの遺伝子はいずれも不検出であったことが確認された。

5. 新しい遺伝子増幅法による狂犬病の迅速検査法の確立

狂犬病は現在、我が国での発生はないが、近隣諸国を含め世界中で発生しており、当センターにも疑似狂犬病検体が搬入されている。現行の狂犬病ウイルス検査は、①蛍光抗体法（検体搬入から3時間）、②RT-PCR法（検体搬入から20時間）、③マウス脳内接種法（接種から5日～21日）によっており、最短でも5日を要する。狂犬病発生時には患者の救命処置や蔓延の防止対策を緊急に講じる必要があるため、検体搬入後1日以内に結果が得られる検査法の開発を目指した。

1) リアルタイム PCR による迅速検査法の構築

狂犬病ウイルスのNタンパク遺伝子の配列を基にTaqMan MGB Probeを用いてプライマーおよびプローブを設計し、狂犬病ウイルス検出用のリアルタイムPCRを構築した。動物用狂犬病ワクチンで検証した結果、従来のRT-PCR法より検出感度が1,000倍向上し、検体受付後6時間で結果の報告が可能となった（図4）。

2) RT-nested PCR による高感度化と遺伝子解析法による精度の高い確認方法の導入

国の「狂犬病対応ガイドライン2001」に記載されているRT-PCR法は感度が低いため、都独自のRT-nested PCR法を構築し、検出感度を1,000倍に向上させた。またRT-nested PCR法で得られた遺伝子増幅産物のシーケンス解析による狂犬病ウイルスの最終確認とともに、遺伝子系統樹解析を可能とした（図5）。以上の工程により、検体受付から23時間で最終的な検査結果の報告が可能となった。

以上の1)、2)の成果をもとに、①蛍光抗体法（検体搬入から3時間）、②リアルタイムPCR法（検体搬入から6時間）、③RT-nested PCR法／シーケンス解析（検体搬入から23時間）による検査を軸とした健康安全研究センター疑似狂犬病検査マニュアルを作成し、また平成20年12月に行われた東京都の疑似狂犬病発生時対応訓練に参加し、本マニュアルを検証した。

3) 疑似狂犬病診断時の類症鑑別

疑似狂犬病診断時に類症鑑別が必要となる疾病として、イヌ科やイタチ科動物で疑似狂犬病と同様の神経症症状を示すイヌジステンパーウイルス感染症があることから、本ウイルス検出用のリアルタイムPCRについても作成した。

6. 臨床及び食品材料からのE型肝炎ウイルス検出法の検討

これまで輸入感染症と考えられていたE型肝炎の国内で

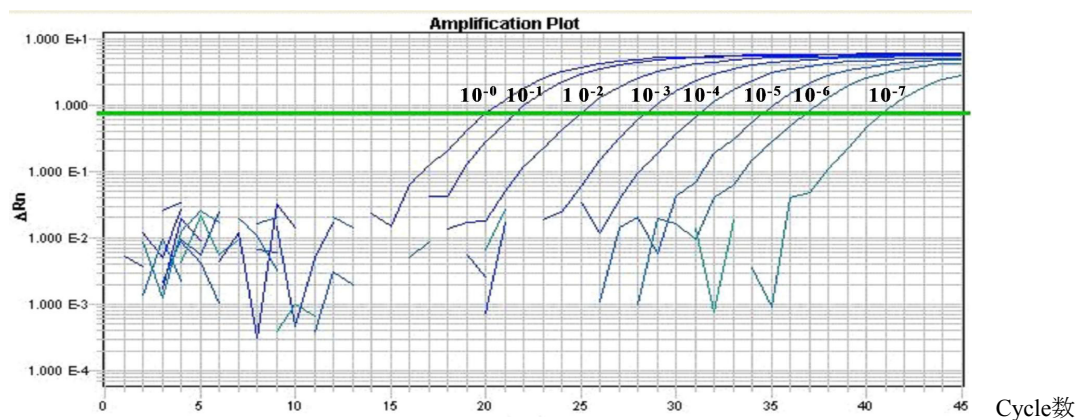


図4. リアルタイムPCRによる狂犬病ウイルス検出法の構築

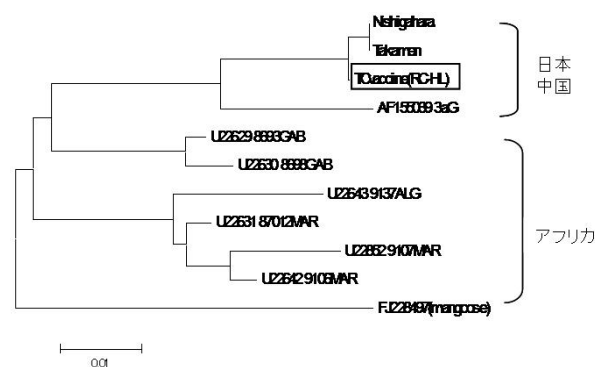
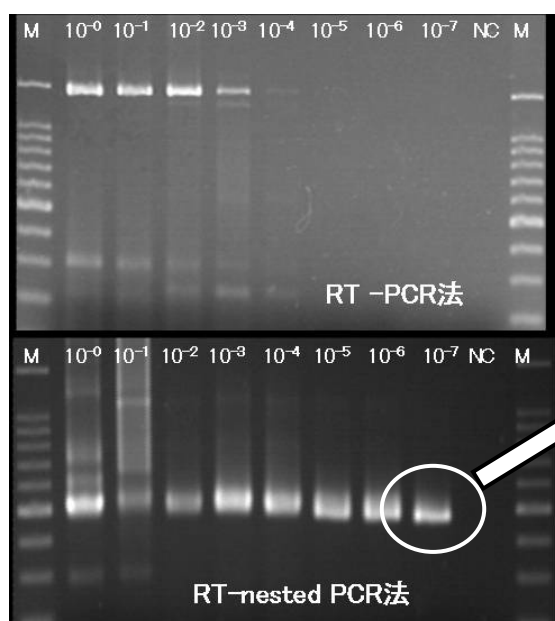


図5. RT-nested PCRによる狂犬病ウイルス高感度検出法の構築と増幅産物の遺伝子系統解析の例

の発生例が増加しており、原因として流通食品や飲用水を含む生活用水のE型肝炎ウイルス(HEV)汚染の可能性が指摘されていることから、以下の検討を行った。

1) 食品及び水環境材料からの効率的なHEV遺伝子抽出法の開発・検討

HEVは血中に長く存在するため、食品シートを用いた食肉の血液および浸出液(細胞成分)、ドリップ(凍結融解液)の効率的回収法を考案し、食肉の処理を行わずに抗体測定及び遺伝子検出用試料の調製が可能となった(図6)。また魚介類の生息水域からのHEVの検出を目的として、類似の形態と挙動を示すA型肝炎ウイルスを用いて検討した結果、海水では無機凝集剤(ポリ塩化アルミニウム)+弱アニオン系有機凝集剤を使用する方法が最も効果的(回収率約80%程度)であり、淡水ではセルロース吸着凝集法が有効であった。

2) HEV遺伝子検査法の改良

HEV遺伝子に対するリアルタイムPCR法はこれまで日本での発生が多い3型、4型を中心とした単独の検出系であったが、これを改良し、検出効率が低かった1型、2型

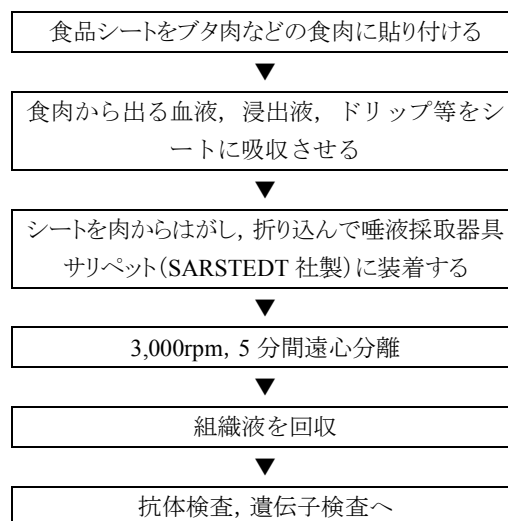


図6. プタ肉等からのHEV検査試料の採取方法

の遺伝子を含めたHEV遺伝子の全ての型の検出を可能とした。また、RT-nested PCR法についても近年の検出株・流行株に合わせたプライマーの再設計を行い、増幅効率等

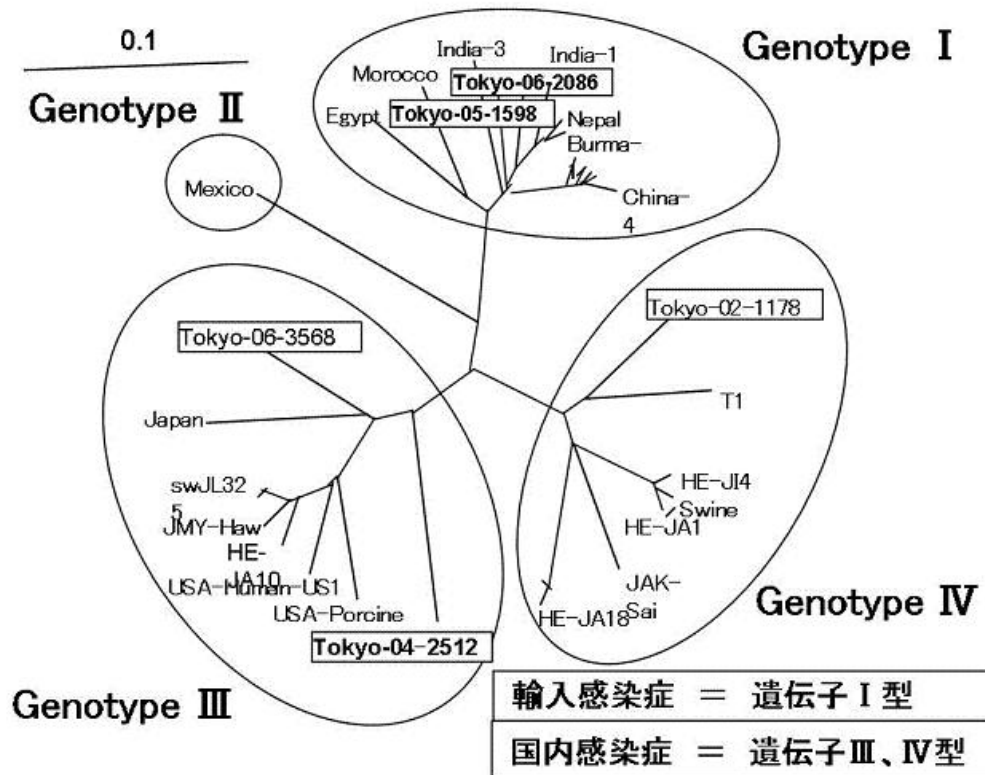


図7. HEVの遺伝子配列を用いた系統樹解析による感染経路の推定

の向上が見られた。これらの成果により、HEVの塩基配列による分子疫学的解析が可能となった（図7）。

3) 市場流通食肉等の実態調査

市販ブタ肉19例およびブタ肝臓30例から得た浸出液およびドリップで、抗HEV-IgG抗体は91.8%で確認されたが抗HEV-IgM抗体およびHEV遺伝子は検出されなかった。また平成19年から奥多摩町との共同研究として、野生シカのトレーサー保存期間の切れた肝臓134件について検査を行ったが、抗HEV抗体及びHEV遺伝子は検出されなかった。

7. 新興・再興感染症の発生動向の早期把握に関する研究

感染症を制御するためには、患者発生を鋭敏に探知し、的確な解析・評価を行った情報を適切かつ迅速に提供してリスクコミュニケーションを図ることが必要である。そのため、感染症発生動向調査等のサーベイランスや各種の健康危機情報の収集システム構築と運用について検討した。

1) 現在の感染症発生動向調査等のサーベイランスの強化と的確な情報提供

新型インフルエンザ対策の一環として、2007年初頭に感染症発生動向調査のインフルエンザ定点医療機関が追加されて290か所となったことによる影響を検討した。既存定点と新規定点では流行ピーク時の定点当たり患者報告数に有意な差が認められ、また内科定点が104か所増設されてそれまでの約4倍になったことから、15歳以上の流行が従来より早期に探知できたことが示唆された。また東京都全

体における注意報、警報の基準となる値を検討し、インフルエンザについては警報状態にある保健所の管内人口が都の人口の30%を越えた時点を目安に流行の警報を報道発表することとした（図8）。

2) 感染症健康危機管理情報ネットワークシステムを主体とした情報収集・解析システムの活用方法の検討

健康危機事例の発生を迅速に探知することを目的として、東京都感染症対策課及び都内医療機関、保健所、当センターを結ぶシステムとして東京都が独自に構築した感染症健康危機管理情報ネットワークシステム（K-net）を利用して症候群別サーベイランスシステムを立ち上げ、運用を開始した。

なお、本システムは、本研究の終了した翌年、平成21年（2009年）に発生した新型インフルエンザの大流行において、医療機関からの大量の患者情報の集約とウイルス検査結果のリアルタイムでの提供に活用され、また本流行発生時の実践的運用を踏まえて改良点が検討された。

3) 救急搬送サーベイランスと地理情報による新たな情報提供システムの構築

東京消防庁の協力を得て救急搬送サーベイランスのモデル事業を開始し、消防庁システムの改修によって収集可能な情報量が増えることから、新たな解析方法の検討を行った。また、本情報の有効利用を図るためにインターネットを介した地理情報システム（GIS）を組み込んだシステムを作成し、症状、覚知場所、搬送先等の情報を、

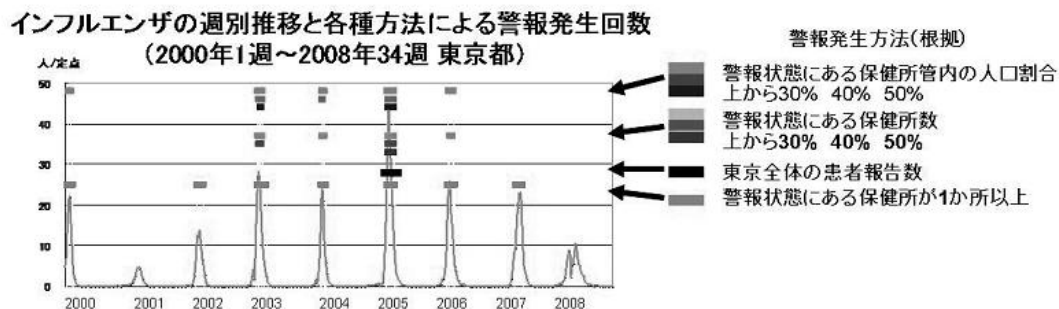


図8. 感染症情報に基づく新たな警報発生基準の検討例

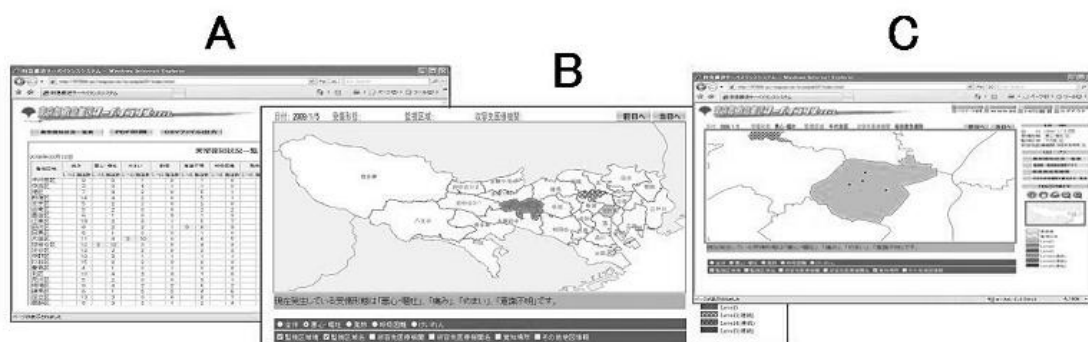


図9. 地理情報システムによる緊急搬送サーベイランス結果の表示例

A: 帳票情報 B: 地図情報として表示 C: 詳細な地点情報の表示

帳票データに加えて地理情報として保健所、東京消防庁でも参照可能とした(図9)。

研究目標に対する達成状況と行政施策への反映

1. 研究目標に対する達成状況

本重点研究の研究目標に対する達成状況は概略以下のよう

目標Ⅰ. 感染症の原因究明を目標とした症候群別迅速診断法の開発改良

手段 1. 迅速・高感度検査法の開発に関しては、鳥インフルエンザウイルス H5N1 に対する PCR 検査システム、結核菌の LAMP 法による迅速高感度検出法、異なる血清型の EHEC を同時検出可能な増菌培養方法とアルカリ抽出による効率的な DNA 抽出法、DEV のすべての型に対するリアルタイム PCR 検査系、狂犬病ウイルスのリアルタイム PCR 法及び RT-nested PCR 法による 6 時間及び 23 時間検査体制、さらに HEV の効率的な試料採取方法と全ての遺伝子型の検出法などを構築した。

手段 2. 類症鑑別診断法の開発については、A 型インフルエンザウイルスの H 亜型と N 亜型の組み合わせから鳥インフルエンザとヒトインフルエンザを鑑別するリアルタイム PCR 検査系を構築し、デング熱と類似症状を呈する CHIKV 遺伝子検査法の作成と DEV 遺伝子検出法とのマルチプレックス化を確立した。また狂犬病と同様の神経症状を示すイヌジステンパーウイルス検出用のリアルタイム

PCR を作成した。

また、これらの遺伝子検査手法により、手段 3. 除外診断法の開発として、ヒトインフルエンザと鳥インフルエンザ以外の新型インフルエンザ、結核と他の抗酸菌感染症、狂犬病ウイルスとイヌジステンパーウイルス、E 型肝炎と A 型肝炎等、新興・再興感染症が疑われる検体の除外診断が可能となった。

目標Ⅱ. 感染症の蔓延防止を目標とした疫学調査

手段 1. 感染経路の究明に関しては、インフルエンザウイルス流行株の HA 領域の遺伝子変異に基づく系統樹解析、結核菌の VNTR 法による詳細な分子疫学的解析とデータベース化、EHEC O26 の PFGE パターン照合による感染源の推定、HEV の遺伝子データベースの構築と発生事例の分子系統解析などによって、実際の流行事例の感染源や感染経路、遺伝子系統変異などの状況を明らかにした。

手段 2. 感染拡大の予知に関しては、インフルエンザ媒介動物であるブタ血清中に H5N1 型インフルエンザウイルス抗体は存在せず、また野鳥・渡り鳥の糞便から同ウイルス遺伝子は検出されなかったこと、また WNV、DEV、CHIKV 等を媒介する蚊のサーベイランスから、これらウイルスの都内侵入がないことを示し得た。食品に関しては、EHEC 遺伝子検査で菌分離の 3 倍 (PCR 法) から 7 倍 (LAMP 法) の汚染の可能性を示し、一方、都内流通のブタの肉と肝臓及び野生シカ肝臓で HEV 抗体と HEV 遺伝子が不検出であったことを報告した。さらに結核菌の DNA 塩基配列のデ

ータベース化によって感染拡大を防止するための予防内服に不可欠な薬剤感受性情報の提供が可能となる。

手段 3. 感染症発生実態の把握については、定点医療機関の追加指定によって感染症発生動向調査の情報に質的な変化がもたらされ、都が構築した K-net システムを利用した症候群別サーベイランスの開始と迅速な情報共有、さらに救急搬送サーベイランスに GIS を連携させて視覚的な状況把握と認識の共有化を図ることができた。

2. 研究成果の行政施策への反映

これらの研究成果は、都が行う以下のような新興再興感染症防止及び食中毒防止等の健康危機管理にかかる各種の行政施策と対応に不可欠なデータや情報を提供し、それらの施策の科学的な支えとなっている。

- ・鳥および新型インフルエンザに対する東京感染症アラート検査対応と封じ込め対策への情報提供
- ・結核菌感染疑い患者の迅速検査と感染経路推定及び薬剤耐性評価による予防内服への情報提供

- ・EHEC 集団食中毒事例の迅速検査と汚染食品の追跡、感染源・感染経路の解明
- ・デング熱、ウエストナイル熱等疑い患者に対する迅速・効率的な類症鑑別と媒介蚊に対する積極的疫学調査
- ・疑似狂犬病発生時のアラート検査対応と感染地域の推定並びに類症鑑別
- ・食肉・レバー等や環境中の HEV 汚染調査への対応と輸入例や国内発生例の感染経路推定
- ・感染症発生情報の早期探知と迅速な情報提供・共有化による政策判断支援、及び患者情報の多角的提供による共通理解・認識の促進

これらのうちの具体的かつ代表的な例が、**課題ごとの研究成果の 1. と 7.** で述べたような、平成 21 年（2009 年）に発生した新型インフルエンザの世界的大流行における都の迅速かつ効果的な検査対応及び情報収集・発信である。

以上のことから、本重点研究の研究目標は十分達成できたものとする。

Studies on Diagnostic and Analytical Methods for Pathogens of Emerging and Re-emerging Diseases

Mitsugu HOSAKA*, Takayuki SHINKAI*, Jun MUKAIGAWA*, Noriko KONISHI*, Yukiko TABEL*,
Kaoru HATAKEYAMA*, Yoko NADAOKA*, Kenji SADAMASU*, Nobuyuki KAMIYA*,
Akiko NAKAMA*, Akemi KAI*, Yasuko YOSHIDA** and Kazuyoshi YANO**

We carried out a research project titled “Studies on Diagnostic and Analytical Methods for Pathogens of Emerging and Re-emerging Diseases” for 3 years, from 2006 to 2008. The project was planned to enable appropriate microbiological diagnostics and analytical action when the suspicious case of emerging and re-emerging infectious diseases was appeared. The project was composed of 7 individual researches to establish rapid and sensitive detection and differentiation methods for pathogens relating to emerging and re-emerging infectious diseases, such as avian influenza and tuberculosis, to provide examination data and related information useful for diagnostics and in order to contain those diseases. Researches established analytical methods for molecular epidemiology, such as phylogenetic tree analysis on pathogen genes, to provide information regarding transmission sources. Examination and reconstruction of information network systems were also performed to improve case information collection, to rapidly provide processed information or examination results, and to share information simultaneously within the related persons. We achieved these objective and project results have been applied to administrative measures on infectious diseases and food poisonings. The actual application of the results obtained by our study includes prompt construction completion of the detection and discrimination system for the pandemic influenza virus and ordinary seasonal influenza viruses by real-time polymerase chain reaction (PCR), and practical usage of the original information network system of Tokyo to collect hospitalization information and to promptly supply viral examination results at the outbreak of pandemic flu in 2009, which is the next year of the study.

Keywords: emerging and re-emerging infectious disease, gene examination technology, avian influenza virus, *Mycobacterium tuberculosis*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, rabies virus, hepatitis E virus, genus *Flavivirus*, infectious disease surveillance

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** Former Tokyo Metropolitan Institute of Public Health