

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 感染症研究国際展開戦略プログラム  
Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases

研究開発課題名： インドネシアにおける新興・再興感染症の国際共同研究拠点形成  
International collaborative research center for emerging and re-emerging infectious diseases in Indonesia

研究開発担当者

所属 役職 氏名： 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科附属感染症センター 教授 森 康子  
Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine  
Professor, MORI Yasuko

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 鳥インフルエンザの研究

開発課題名： (英語) Molecular epidemiology of avian influenza virus infection in Indonesia

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科附属感染症センター  
教授 森 康子

所属 役職 氏名： (英語) Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of  
Medicine Professor, MORI Yasuko

分担研究 (日本語) デング熱の疫学調査と診断・治療に関する研究

開発課題名： (英語) Studies on epidemiology, diagnosis and treatment of dengue

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院保健学研究科国際保健領域  
准教授 亀岡 正典

所属 役職 氏名： (英語) Department of International Health, Kobe University Graduate  
School of Health Sciences Associate Professor, KAMEOKA Masanori

分担研究 (日本語) HIV感染症の疫学調査に関する研究

開発課題名： (英語) Epidemiological study on HIV disease

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院保健学研究科国際保健領域  
准教授 亀岡 正典

所属 役職 氏名： (英 語) Department of International Health, Kobe University Graduate School of Health Sciences Associate Professor, KAMEOKA Masanori

分 担 研 究 (日本語) 薬剤耐性菌とコレラの研究

開 発 課 題 名： (英 語) Molecular epidemiological study of antimicrobial-resistant bacteria and Cholera

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科  
教授 白川 利朗

所属 役職 氏名： (英 語) Kobe University Graduate School of Science,  
Technology and Innovation Professor, SHIRAKAWA Toshiro

分 担 研 究 (日本語) ウイルス性下痢症の疫学調査と感染防御法に関する研究

開 発 課 題 名： (英 語) Epidemiological Study and Prevention of Viral Diarrhea

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科附属感染症センター  
教授 勝二 郁夫

所属 役職 氏名： (英 語) Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine Professor, SHOJI Ikuo

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### (1) 鳥インフルエンザの研究

東ジャワ州にある生鳥市場のニワトリ及びアヒルより採取した総排出腔拭い液 883 検体から高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 を 127 株分離し、同ウイルスが家禽の中で常在化していることを示した。また、低病原性鳥ウイルス H3N6 及び H4N6 をインドネシアで初めて分離した。同じ生鳥市場の従業員の 84%が高病原性ウイルス H5N1 に対する抗体を保有していることを見だし、抗体価の変動から 2013 年に感染があったことを示した。臨床疫学調査により感染は軽症あるいは不顕性であったことを明らかにした。

### (2) デング熱の疫学調査と診断・治療に関する研究

インドネシアの複数の都市より合計 528 検体の血清試料を収集して、153 株のデングウイルスを分離した。遺伝子系統樹解析をおこなうと共に、分離ウイルスに関する情報整理を開始した。また、抗デング中和ヒト単クローン抗体のエピトープ解析を行い、すべての抗体がエンベロップ (E) タンパク質のドメイン I-II に結合することを明らかにした。2 つの代表的な抗体はデングウイルス血清型 1-4、日本脳炎ウイルス、ジカウイルスとウエストナイルウイルスを広範囲且つ強力に中和することがわかった。また、インドネシアの天然抽出物や低分子化合物に強力な抗デングウイルス活性が認められた。また、デングウイルス増殖に関わる宿主因子の候補を見出した。

### (3) HIV 感染症の疫学調査に関する研究

バリ島とスラウェジ島で収集した 119 検体の HIV 患者血試料の遺伝子解析を行った。バリ島に流行する HIV-1 株は CRF01\_AE 株が主流であった。また、パプア州で薬剤治療患者血に由来する HIV-1 遺伝子の一部から薬剤耐性変異を検出した。

### (4) 薬剤耐性菌とコレラの研究

薬剤耐性菌の研究では、合計 117 株のカルバペネム耐性グラム陰性桿菌を分離し、DNA シークエンスにより合

計 24 株のカルバペネマーゼを同定した。最も多く検出されたカルバペネマーゼは NDM-1 (19 株) であった。また 24 株中の 5 株のカルバペネム産生腸内細菌のゲノムシーケンスを完了した。コレラの研究では、養殖エビより分離した環境株と臨床株の比較を行った。結果、2009 年に環境 (エビ) および臨床検体から抽出したコレラ菌のゲノム解析を実施したが、両者に近縁性はなかった。

#### (5) ウイルス性下痢症の疫学調査と感染防御法に関する研究

##### 「インドネシアにおけるノロウイルス感染症」

急性胃腸症患者の糞便検体中のノロウイルスゲノム配列を解析した。2015-2016 のノロウイルス陽性検体では GII.4 が依然として最も多い genotype であったが、興味深いことに GII.13 というマイナー genotype が 2 番目に多い (17%) ことが判った。また、GII.17 がそれに次いで多かった。GII.17-GII.P17 は近隣の韓国、タイ、ベトナムでは散発例が見られるにすぎないが、インドネシアでは 3 番目に多くなっており、今後、predominant な GII.4 が GII.17-GII.P17 にとって代わられる可能性が考えられた。

##### 「インドネシアにおけるロタウイルス感染症」

急性胃腸症患者糞便検体中のロタウイルスゲノム配列を解析した。2015-2016 のロタウイルス陽性検体 22 例を NGS 解析したところ、日本とは全く異なる株で、unusual G3P[8] DS-1 like and G3P[6] DS-1 like strain であることが明らかとなった。unusual G3P[8] DS-1 like strain はオーストラリア 2013、ハンガリー 2015、スペイン 2015 に似ており、地理的に考えるとオーストラリアとの関係が示唆された。また、unusual G3P[6] はインドネシアの地元由来の株と推定された。

#### (1) **Molecular epidemiology of avian influenza virus infection in Indonesia**

From 883 cloacae swab samples from chickens and ducks at a live-poultry market in East Java, we isolated 127 strains of highly pathogenic avian influenza H5N1 indicating H5N1 infections are endemic in poultry. We also isolated low pathogenic virus H3N6 and H4N6 for the first time in Indonesia. Among workers in the live-poultry market, 84% tested positive for antibody activity against a highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus. Kinetics of the antibody titers suggested that the infection occurred in 2013. A medical history survey indicated that the virus did not manifest any clinical symptoms in the workers.

#### (2) **Studies on epidemiology, diagnosis and treatment of dengue**

A total of 528 serum samples were collected from multiple cities in Indonesia, and 153 dengue viruses were isolated. Phylogenetic analysis was conducted. In addition, we started to organize information on isolated viruses. Epitope analysis of anti-dengue neutralizing human monoclonal antibodies was performed and it was revealed that all antibodies recognized the domain I-II of envelope (E) protein. Two representative antibodies were found to broadly and potently neutralize dengue virus serotypes 1-4, Japanese encephalitis virus, zika virus and West Nile virus. In addition, strong anti-dengue activity was observed in Indonesian natural extracts and low molecular weight compounds. We also found candidate host factors involved in the replication of dengue virus.

#### (3) **Epidemiological study on HIV disease**

One hundred and nineteen HIV<sup>+</sup> blood samples isolated in Bali or Sulawesi island were subjected to genotypic study. HIV-1 CRF01\_AE was found to be a major strain prevalent in Bali. In addition, drug resistance-associated mutations were detected in HIV-1 genomic fragments derived from drug-treated individuals residing in Papua province.

#### (4) **Molecular epidemiological study of antimicrobial-resistant bacteria and Cholera**

As for the study of antimicrobial-resistant bacteria, we have identified the 24 strains of carbapenemase-producing gram-negative rod by multiplex PCR and DNA sequencing, and the most frequently detected

carbapenemase was NDM-1 (19 strains). Up to now, the whole genome-sequencing of the five carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* has been completed. For the study of Cholera, we performed comparative analysis between environmental and clinical isolates. As a result, there was no close relation between the genes of clinical and environmental (shrimp) strains isolated in 2009.

#### (5) Epidemiological Study and Prevention of Viral Diarrhea

‘Norovirus Infection in Indonesia’ Stool samples were obtained from patients with acute gastroenteritis. Norovirus genome sequences were examined by conventional sequencing method. We found that GII.4 was most common in the samples from 2015-2016. Interestingly, GII.13 was the second most common (17%) in these samples, followed by GII.17. Sporadic GII.17-GII.P17 strains were found in Korea, Thailand, and Vietnam. On the other hand, the GII.17-GII.P17 strain was third predominant strain in Indonesia, suggesting that the GII.17-GII.P17 strain may replace the predominant GII.4.

‘Rotavirus Infection in Indonesia’ Rotavirus genome sequences of 22 samples were examined by Next generation sequencing. The Rotavirus strains from 2015-2016 were genetically very different from Japanese strains. It turned out that these strains are classified into unusual G3P[8] DS-1 like and G3P[6] DS-1 like strain. The unusual equine-like G3P[8] DS-1 like strains were predominant strains in Australia 2013, Hungary 2015, Spain 2015. We speculate that the unusual equine-like G3P[8] DS-1 like strain may come from Australia because the geographical proximity and that the unusual G3P[6] may be Indonesian domestic strain.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国際誌 10 件)

1. Shimizu K, Wulandari L, Poetranto ED, Setyoningrum RA, Yudhawati R, Sholikhah A, Nastri AM, Poetranto AL, Candra AY, Puruhito EF, Takahara Y, Yamagishi Y, Yamaoka M, Hotta H, Utsumi T, Lusida MI, Soetjipto, Shimizu YK, Soegiarto G, Mori Y. Seroevidence for a High Prevalence of Subclinical Infection With Avian Influenza A(H5N1) Virus Among Workers in a Live-Poultry Market in Indonesia. *Journal of Infectious Diseases* 2016 Dec 15; 214(12): 1929-1936.
2. Yamanaka A, Oddgun D, Chantawat N, Okabayashi T, Ramasoota P, Churrotin S, Kotaki T, Kameoka M, Soegijanto S, Konishi E. Dengue virus infection-enhancing antibody activities against Indonesian strains in inhabitants of central Thailand. *Microbes Infect* 2016, 18, 277-84.
3. Chaitaveep N, Utachee P, Chuenchitra T, Karasavvan N, Takeda N, Kameoka, M. Neutralization breadth and potency of serum derived from recently human immunodeficiency virus type 1-infected Thai individuals. *Microbes Infect* 2016, 18, 346-53.
4. Churrotin S, Kotaki T, Sucipto TH, Ahwanah NLF, Deka PT, Mulyatno KC, Utami DAP, Ranasasmita R, Soegijanto S, Kameoka M. Dengue virus type 1 strain isolated in Indonesia shows a close phylogenetic relationship with the strains that caused the autochthonous dengue outbreak in Japan in 2014. *Jpn J Infect Dis* 2016, 69, 442-4.
5. Witaningrum AM, Kotaki T, Khairunisa SQ, Yunifiar MMQ, Indriati DW, Bramanthi R, Nasronudin, Kameoka M. Genotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 derived from antiretroviral therapy-naïve individuals residing in Sorong, West Papua. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016, 32, 812-7.

6. Fahmi MZ, Sukmayani W, Khairunisa SQ, Witaningrum AM, Indriati DW, Matondang MQY, Chang J-Y, Kotaki T, Kameoka M. Design of boronic acid-attributed carbon dots on inhibits HIV-1 entry. RSC Adv 2016, 92996-3002.
7. Inoue M, Oyama D, Hidaka K, Kameoka M. Evaluation of novel protease inhibitors against darunavir-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1. FEBS Open Bio 2017, 7, 88-95.
8. Tian Y-S, Kawashita N, Kameoka M, Takagi T. Novel Anti-Human Immunodeficiency Virus Compounds with Activity against Cyclophilin A: A Look Back. J Prev Inf Cntrl 2016, 2, 2.
9. Wasito EB, Shigemura K, Osawa K, Fardah A, Kanaida A, Raharjo D, Kuntaman K, Hadi U, Harijono S, Sudarmo SM, Nakamura T, Shibayama K, Fujisawa M, Shirakawa T. Antibiotic susceptibilities and genetic characterization of extended spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli isolated from stools of pediatric diarrhea patients in Surabaya, Indonesia. Jpn J Infect Dis. 2016 Dec 22. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.234.
10. Iijima Y, Oundo JO, Hibino T, Saidi SM, Hinenoya A, Osawa K, Shirakawa T, Osawa R, Yamasaki S. High Prevalence of Diarrheagenic Escherichia coli among Children with Diarrhea in Kenya. Jpn J Infect Dis. 2017 Jan 24;70(1):80-83. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.064.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Avian influenza A (H5N1) virus infection among live poultry market workers in Indonesia, 口頭, Kazufumi Shimizu, Emmanuel D Poetranto, Aldise M Natri, Anna L Poetranto, Adithya Y R Candra, Edith F Puruhito, Zezzy R Dewantari, Indah L Rahmawati, Yoshiaki Yamagishi, Yohko K Shimizu, Laksmi Wulandari, Resti Yudhawati, Retno A Setyoningrum, Amelia Sholikhah, Gatot Soegiarto, Yasuko Mori, GSEID 2016: International Seminar on Global Strategy to Control Emerging Infectious Diseases in Borderless Era, Surabaya, Indonesia, 2016/8/8, 国外.
2. Development of avian influenza virus in duck as reservoir in East Java, Indonesia, 口頭, Djoko Poetranto, Aldise Natri, Adhitya Candra, Anna Poetranto, Edith Puruhito, Jezy R Dewantari, Indah L Rahmawati, Laksmi Wulandari, Resti Yudhawati, Retno Setyoningrum, Amelia Sholikhah, Gatot Soegiarto, Yoshiaki Yamagishi, Yoko Shimizu, Yasuko Mori, Kazufumi Shimizu, GSEID 2016: International Seminar on Global Strategy to Control Emerging Infectious Diseases in Borderless Era, Surabaya, Indonesia, 2016/8/8, 国外.
3. Seroevidence for high prevalence of infections with avian influenza A(H5N1) virus among workers in a live poultry market in Indonesia. 生鳥市場作業員における鳥 H5N1 インフルエンザウイルス感染の血清疫学, 口頭, Kazufumi Shimizu, Laksmi Wulandari, Djoko Poetranto, Aldise Natri, Anna Poetranto, Adhitya Candra, Edith Puruhito, Resti Yudhawati, Retno Setyoningrum, Amelia Sholikhah, Yoshiaki Yamagishi, Yusuke Takahara, Masaoki Yamaoka, Hak Hotta, Yoko Shimizu, Gatot Soegiarto, Yasuko Mori, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2016/10/24, 国内.
4. デングウイルス 1 型望月株に対して強力な中和活性を示すマウスモノクローナル抗体のエピトープ解析, 小瀧将裕, 山中敦史, 小西英二, 亀岡正典, 第 51 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2016/5/13, 国内

5. Characterization of human monoclonal antibodies against dengue virus generated from Indonesian dengue patients, Tomohiro Kotaki, Siti Churrotin, Tamaki Okabayashi, Shuhei Ueda, Orapim Puiprom, Ken-ichiro Ono, Soegeng Soegijanto, Masanori Kameoka, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内
  6. インドネシアのデング患者血より作製された抗デングウイルスヒト型モノクローナル抗体の性状解析, 小瀧将裕, Siti Churrotin, 岡林環樹, 上田修平, Orapim Puiprom, 小野健一郎, Soegeng Soegijanto, 亀岡正典, 第 23 回トガフラビペスチウイルス研究会, 2016/10/22, 国内
  7. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in Indonesia, ポスター、Akiho Kanaida, Kayo Osawa, Katsumi Shigemura, Alpha Fardah, Dadik Raharjo, Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo, Toshiro Shirakawa, 第 32 回世界医学検査学会、2016 年 8 月 31 日～2016 年 9 月 4 日、国内
  8. インドネシアで分離された *Vibrio cholerae* の疫学解析、ポスター、山中 凌、大澤 佳代、重村克巳、木下承皓、Alpha Fardah, Dadik Raharjo, Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo 白川利朗, 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016 年 8 月 31 日～2016 年 9 月 1 日、国内
  9. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated urinary tract infection in a university teaching hospital, ポスター、Katsumi Shigemura, Kayo Osawa, Kazushi Tanaka, Yuzo Nakano, Toshiro Shirakawa, Soichi Arakawa, Masato Fujisawa, 111th AUA annual meeting、2016 年 5 月 6 日～2016 年 5 月 10 日、国外
  10. A preliminary survey of norovirus and rotavirus infections among children in Surabaya, Indonesia, 口頭、Soetjipto, Utsumi T, Lusida MI, Wahyuni RM, Dinana Z, Juniastuti, Yamani LN, Sudarmo SM, Athiyyah AF, Darma A, Matsui C, Deng L, Doan YH, Katayama K, and Shoji I, International seminar Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases in Borderless Era, 2016/8/8, 国外.
  11. Occurrence of norovirus infection in an asymptomatic population in Indonesia, 口頭、Dinana Z, Utsumi T, Wahyuni RM, Yamani LN, Matsui C, Deng L, Lusida MI, Soetjipto, Doan YH, Katayama K, and Shoji I, International seminar Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases in Borderless Era, 2016/8/8, 国外.
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
1. ノロウイルス感染症について, 内海孝子, 東ジャワジャパクラブ協会会報誌, 2016/06/14, 国外
  2. HIV/AIDS の分子生物学, 亀岡正典, 奈良県立医科大学 特別講演, 2016/10/27, 国内
  3. Characterization of HIV-1 strains prevalent in Southeast Asia, 亀岡正典, 留日中国人生命科学協会 2016 年年会, 2016/11.20, 国内
  4. インフルエンザについて, 清水一史, 第 7 回感染症研究国際ネットワーク市民講座, 2017/2/11, 国外 (インドネシア・スラバヤ在住日本人対象)
  5. 感染性下痢症について, 勝二郁夫, 第 7 回感染症研究国際ネットワーク市民講座, 2017/2/11, 国外.
  6. 東南アジア型 HIV-1 の広範囲中和抗体に対する感受性, 亀岡正典, 神戸ポートアイランド創薬フォーラム, 2017/3/9, 国内
  7. ロタウイルス感染症について, 内海孝子, 東ジャワジャパクラブ協会会報誌, 2017/03/15, 国外

(4) 特許出願  
該当なし

## 平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金 (感染症研究国際展開戦略プログラム (J-GRID) ) 成果報告書

### I. 基本情報

事業名 : (日本語) 感染症研究国際展開戦略プログラム (J-GRID)  
(英語) Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) インドネシアにおける新興・再興感染症の国際共同研究拠点形成  
(英語) International collaborative research center for emerging and re-emerging infectious diseases in Indonesia

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 室長 片山和彦  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases. Section Chief. Kazuhiko Katayama

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 : (日本語) ウイルス性下痢症の疫学研究  
(英語) Molecular epidemiology of gastroenteric viruses

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室 室長 片山和彦  
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases. Section Chief. Kazuhiko Katayama

### II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者 : 神戸大学医学部・大学院感染制御学分野・教授・勝二郁夫 研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)  
無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Soetjipto, Takako Utsumi, Maria Inge Lusida, Rury Mega Wahyuni, Zayyin Dinana, Juniastuti, Laura Navika Yamani, Subijanto Marto Sudarmo, Alpha Fardah Athiyah, Andi Darma, Chieko Matsui, Lin Deng, Yen Hai Doan, Kazuhiko Katayama, and Ikuo Shoji. A



- preliminary survey of norovirus infections among children in Surabaya, Indonesia. International seminar Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases in Borderless Era (GSEID). August 8-9, 2016, Surabaya, Indonesia.
2. Zayyin Dinana, Takako Utsumi, Rury Mega Wahuni, Laura Navika Yamani, Chieko Matsui, Lin Deng, Maria Inge Lusida, Soetjipto, Yen Hai Doan, Kazuhiko Katayama, and Ikuo Shoji. Occurrence of norovirus infection an asymptomatic population in Indonesia. International seminar Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases in Borderless Era (GSEID). August 8-9, 2016, Surabaya, Indonesia

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特記なし

(4) 特許出願  
無し