

**11:15– 11:30 TEA BREAK**

**11:30 – 13:30 Program Evaluation and Country Action Plans (Session – 6)**

**Chair: Kai Man Kam, Co-Chair: Jianguo Xu**

**11:30 – 13:00 Country/Area Action Plan Presentation (about 6 min each)**

**1. Australia**

**2. Bangladesh**

**3. China**

**4. Hong Kong**

**5. India: Molecular characterization of *Campylobacter* spp and *Bacillus cereus* in India:**

**A. K. Mukhopadhyaya**

**6. Indonesia**

**7. Japan: J. Terajima**

**8. Korea: PulseNet Korea, Action and Plan: Kim**

**9. Malaysia**

**10. New Zealand**

**11. Philippines**

**12. Taiwan**

**13. Thailand**

**14. Vietnam**

**13:00- 13:30 Plenary Discussion (Session – 7):**

1. How successful is the Network in standardization of PFGE methods?
2. How successful is the Network in identification of emerging and reemerging enteric pathogens?
3. How successful is the Network in establishing newer molecular methods in identification of enteric pathogens?
4. How successful has the Network been in sharing critical information?

**13:30 – 14:30 LUNCH**

**14:30 – 15:30 (Free Session: )**

**15:30 – 16:00 TEA BREAK**

**16:00 – 17:00 Laboratory Visit**

**17:15 – 18:30 Dr. S. C. Pal Memorial Oration Lecture at the NICED Auditorium**

*Campylobacter*: from obscurity to celebrity: **Professor Jean Paul Butzler**

**19:30 DINNER PARTY**

**Day 3: February 27, 2008**

**9:15 – 9:30 Summary of Day 2 Rapporteur: Sharon Rolando Shea**

**9:30 – 13:00 Directions for Future Activities (Session – 8)**

**Chair: Peter Gerner-Smidt, Co-Chairs: H. Watanabe and K. M. Kam**

- 1. Future PulseNet Asia-Pacific activities: K. M. Kam**
- 2. Funding and other supports: H. Watanabe, Peter Gerner-Smidt, Louise S. Gresham, and Sharon Rolando Shea.**
- 3. Improvement and Real-time sharing of PFGE data: B. J. Gilpin**
- 4. ( PulseNet Africa Network: Amy Gassama-Sow )**
- 5. Meeting Rapporteur: Sharon Rolando Shea**
- 6. Concluding Remarks: G. Balakrish Nair**

**Closing**

**PIC meeting of the *Vibrio parahaemolyticus* PFGE standardization group**

***Date: February 26, 2008 from 8:30 to 9:15***

**Chair: H. Watanabe, NIID, Japan**

**Co-Chair: K. M. Kam, PHL, Hong Kong**

**Rapporteur: Sharon Rolando Shea**

**Members:**

- 1. J. Terajima, NIID, Japan**
- 2. P. Gerner-Smidt, CDC, USA**
- 3. E. S. Ahmed CDC, USA**
- 4. Cindy K. Y. Luey, PHL, Hong Kong**
- 5. O-A. Ratchtrachenchai, NIH, Thailand**
- 6. M. Alam, ICDDR, Bangladesh**
- 7. G. Balakrish Nair, NICED, India**
- 8. T. Ramamurthy, NICED, India**

資料 2.

## 2) International Meeting on Malaria Network

November 29 & 30, 2007

(National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan )

11:00~12:40

- 1 Opening Dr Takuro Endo
- 2 Vivax malaria in Asia –Report of Vivax meeting in Shanghai, 2007 –  
Drs Guan Yayi and Hiroshi Ohmae

Report of research activities

- 3 Thailand-1 Risks and changing trends of malaria in Thailand  
Dr Jeeraphat Sirichaisinthop
- 4 Thailand-2 Genome-wide novel antigen discovery of malaria parasites  
Dr Takafumi Tsuboi *et al.*
- 5 Thailand-3 LAMP for malaria diagnosis, initial evaluation at malaria clinic  
Dr Jetsumon Prachumsri

13:30~15:30

Report of research activities

- 1 Cambodia: Achievement of the Epidemiology and Malaria Control in a Newly  
Developed Region in Campot Province, Southern Cambodia  
Dr Chea Nguon *et al.*
- 2 China: Study on Forecasting and Warning of Malaria Epidemics in Anhui  
Province, China Dr Tang Linhua
- 3 Philippines: Malaria GIS in Philippines Mr Ferdinand Salazar *et al.*
- 4 Solomons-1: Reduction of the frequency of epidemics through better strategies  
using the present malaria information system in the  
Solomon Islands Dr Bernard Bakote'e
- 5 Solomons-2: Change of malaria trends and its monitoring in the  
Solomon Islands

Dr Hiroshi Ohmae *et al*

15:50~17:30

Report of research activities

- 1 Genetic polymorphisms of drug resistant gene in Southeast Asia through  
imported isolates of *Plasmodium falciparum* Dr Yumiko Nakano *et al*
- 2 Molecular analysis of G6PD deficiency in Cambodia and Indonesia  
Dr Fumihiko Kawamoto
- 3 Detection of the mosquitoes infected *Plasmodium* spp. in Quarantine center in

Japan -1

Mr Shinji Iizuka (in Japanese)

4 Discussion

9:30~12:00

- 1 Detection of the mosquitoes infected *Plasmodium* spp. in Quarantine center in Japan -2  
Dr Hiroshi Ohmae (in Japanese)
- 2 Detection of malaria parasite in the infected mosquitos  
Dr Setsuo Suguri (in Japanese )
- 3 Distribution and density of *Anopheles* spp. in Japan  
Dr Yoshio Tsuda
- 4 Is there any probability of malaria re-emerging in Japan? -From the malaria transmission models' point of view. Dr Hirofumi Ishikawa *et al.*
- 5 Knowledge and practices regarding malaria risk among Japanese travelers.  
Drs Mikio Kimura and Kyoko Namikawa
- 6 Estimation of genetic diversity of malaria parasites: geographic comparison  
Dr Kazuyuki Tanabe
- 7 Closing  
Dr Takuro Endo

## 図 1.

### アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究

#### 目的：

- ・アジアの CDC（疾病制御センター）様機能を持つ研究機関と感染研との連携強化を図る。ネットワーク化
- ・アジアで流行している感染症の正確な情報を得るための検査法の基盤を構築する。検査法の標準化、精度管理を行う
- ・分子疫学的解析を可能にするため病原体のゲノム情報に基づいたデータベース化を推進する
- ・我が国に侵入する病原体の起源の追求を可能にし、防疫に役立てる

モデルケース；細菌、ウィルス、原虫等の対象病原体を選出し対応：

細菌（アジアで流行している  
コレラ、腸チフス等を対象）

ウィルス（アジアで問題とな  
っているデング熱等を対象）

原虫（マラリアを対象）

#### 方法：

- ・ Asia-Pacific（中国、韓国、ベトナム、タイ、インドネシア、フィリピン、マレーシア、インド、バングラデシュ、オーストラリア、ニュージーランド、米国等を中心に）の CDC 様の国立の感染症研究機関との連携
- ・ 下痢性腸内細菌の解析：コレラ菌、腸チフス菌等を対象に分子疫学的解析法として PFGE（パルスフィールド電気泳動法）、MLVA（複数部位多型配列解析）等を用いたゲノムデータベースの構築（PulseNet-Asia）；手法の標準化、国際間の精度管理の実施
- ・ アジアで流行しているデングウィルスの E 遺伝子塩基配列に基づいた系統解析の標準化、ウィルス分離法、塩基配列決定法の講習会
- ・ 熱帯熱・三日熱マラリアの迅速診断法(LAMP 法)の開発と普及。クロロキン耐性マラリアの分布と耐性遺伝子のデータベース化。

#### 研究成果：

- 1) 各班とも年 1 回のアジア地域の国立研究所間の国際会議を開催し、疫学情報交換とデータベース構築の合意を行った。各国ともこのような連携の重要性を認識し、感染研のその努力に敬意を払った。
- 2) 細菌に関し：アジアで関心の高い新型コレラ菌、新型腸炎ビブリオの PFGE ベースのゲノム解析の標準化を行い、そのデータをウェブサイトに掲載した。各国の情報を迅速に交換できるようになった。精度管理のための講習会を毎年、香港で開催し、各国の技術の維持、管理を行った。
- 3) ウィルスに関し：各国で分離されるデング熱ウィルスの E 遺伝子の解析を行い、系統樹の作成を行った。各国で分離される型が少しずつ異なり、地域性が推定できることが判明した。その情報を感染研のウェブ上で公開する体制を確立した。
- 4) 原虫に関し；アジアにおけるマラリアの疫学情報として、熱帯熱から三日熱への変化が起こっている地域が多いことが判明した。クロロキン耐性遺伝子の解析から、地域により変異部位に差が見られることが判明した。

# プロジェクト 1 : 細菌

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

## 分担研究報告書

分担研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
協力研究者	伊豫田 淳	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨 2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、集団発生由来株或いは広域で分離された EHEC 0157 について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を行った。広域分離株の示すパターンには異なる 5 種類のパターンがあり、XbaI 及び BlnI 消化による PFGE パターンが一致している株であったが、MLVA では 9 つの遺伝子座の全てでリピート数が一致する株とともに 9 つのうち 1～2 個の遺伝子座においてリピート数が異なる株や少数ではあるが 4 個の遺伝子座においてリピート数が異なる株も見いだされた。以上の結果から、散発事例由来株が主である広域分離株でも遺伝学的特性が極めて類似した株が検出されていることが示唆された。集団発生由来株においても、9 遺伝子座においてリピート数が一致する株が大部分であるものの、1～2 個の遺伝子座においてリピート数が異なる株が見つかった。また、PFGE パターンが異なるものの、MLVA では一致する株もあることから、株によっては MLVA よりも PFGE の方が識別能の高い場合もあることが示唆された。

### A. 研究目的

細菌感染症における起因菌の解析方法のひとつとして Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法が汎用されている。また、腸管出血性大腸菌 0157 については PFGE による解析を主体とした、国際的なネットワークである PulseNet Asia Pacific 等においても分離菌株の解析結果を比較することが可能となっている。一方、病原菌の遺伝子配列決定が進むとともに種々の遺伝子型別法が開発されてきており、そのひとつとして Multilocus variable-number tandem

repeat analysis (MLVA) 法がある。結核菌やサルモネラをはじめとして腸管出血性大腸菌 0157 においても MLVA による解析報告がある。本研究では、腸管出血性大腸菌 0157 における MLVA の菌株識別能について、PFGE との比較を行い分子疫学的解析方法としての評価を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 0157 のうち、PFGE 解析により XbaI 及び BlnI でのパターンが同一と考えられる広域分離株を使用して MLVA による解析を行った。MLVA

の primer には、米国 CDC において選択された既報の 9 種類を使用した。9 種類の primer は 3 種の蛍光色素（青、緑、黄色）で標識した市販品を使用した。PCR 反応は、9 種類 primer のうち、4 種類の multiplex PCR を 2 本と single set primer による計 3 本の PCR によるもので、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社)で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国)を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130x1 Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社)を用いた。一部の増幅断片については、塩基配列を決定し MLVA から推定される増幅断片サイズとの比較を行い、泳動誤差の補正を行った。解析結果については、9 つの遺伝子座におけるリピート数を表にして提示した。

### C. 研究結果

2006 年に分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 O157、2,029 株のうち、XbaI と BlnI による PFGE パターンが一致し 5 箇所以上の都道府県から分離されている株について（図 1 及び表 1）調べた。XbaI のパターンが一致し、3 ヶ所以上の広域から分離されている株には 37 種類のパターンが見られたが、5 箇所以上の都道府県から分離されているパターンには 5 種類が見いだされた。これらの 5 種類のパターンを示す株について MLVA を行い、9 遺伝子座についてそれぞれのリピート数の比較を行った（表 2～7）。広域流行株については、XbaI と BlnI による PFGE パターンが一致しているにもかかわらず、それぞれの PFGE タイプ (Type No. 以下、TN と略す) の中で 3～

5 種類の MLVA タイプに分かれ、その違いは 1 locus で 1 repeat 数異なるものから 3 loci で 1 repeat から 5 repeat 数異なるものまであった（表 2 - 4）。TN b328 の株では、疫学的に関連が疑われる 2 事例に由来する 14 株（表 3 ; 青枠、赤枠）において 1 locus で 1 repeat 数の違いがある株とさらに別の 1 locus で 2 repeat 数の違いを示す株がみられた。また、関連は不明である散発事例由来株においても上記 2 事例の株と同じ MLVA タイプを示す株があった。TN b330 を示す株においては、同一集団発生由来株において 27 株中 2 株が 1 locus で 1 repeat 数異なっており、1 株がそれとは別の 1 locus で 2 repeat 数異なる MLVA タイプを示した（表 4、赤枠）。また、TN b330 の株においても、上記の集団発生由来株以外に同一 MLVA タイプを示す株や 1 locus で 1 repeat 数の違いを示す株が存在した。これらの株も疫学的な関連が不明な散発事例由来株であるが、分離時期については約 3 週間の集団発生の時期をふくめた約 80 日間に分離されていた。TN a829 の株については、BlnI によって 3 つの異なるパターンに分かれたが、30 株中 19 株が同一 BlnI-PFGE パターンを示した（表 5、赤枠）。この 19 株においても MLVA ではさらに A～H の 8 種類のタイプに分かれた。A タイプを基準として、1 locus 1 repeat 数異なるタイプ (B, C, E)、2 loci で 2 repeat 数 (G)、3 repeat 数 (F) 異なるタイプ、及び 4 loci で repeat 数が異なるタイプ (D, H) に分けられた。同一施設における集団発生由来株においても、表 6 に示す 29 株では BlnI では全て同一パターンであるものの、XbaI ではバンドが 1～2 本異なる



っている、TN b701～ b704 までの 4 種類に分けられ、MLVA でも 4 種類のタイプがあった。ただし、XbaI-PFGE, MLVA のそれぞれのタイプが一致するわけではなく、MLVA A タイプは TN b703、B タイプは TN b702 及び b703、C タイプは TN b701 及び b704、D タイプは TN b703 の株が対応しており、株によっては XbaI で MLVA よりも菌株識別能が高い場合もあった。

2006 年の広域流行株である TN a259 は、28 都府県の散発事例から 130 株が 4 月から 12 月の長期にわたって分離されていた（表 7-1 及び 2）。このうち 120 株は BlnI-PFGE パターンが一致し、その他には 7 種類の異なる BlnI-PFGE パターンがあった。BlnI-PFGE パターンが一致する 120 株について、Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法により 9 種類の遺伝子座について調べると、すべての遺伝子座で繰返し数が一致する株が 32 株、1 遺伝子座について繰返し数が 1 異なる変異株 (SLV1) が 67 株あった。残りの 22 株については、1 遺伝子座で繰返し数が 2 異なる変異株から 2 遺伝子座で繰返し数が 2 以上異なる変異株まで 11 種類の異なる MLVA タイプに分けられた。また、それぞれの MLVA タイプの株の分離時期を見ると、第 31 週までは MLVA タイプ A の株の分離頻度が高いが、第 32 週以降はタイプ A とは locus 10 で 1 repeat 数異なるタイプ D の分離頻度が高くなっていった（図 2）。

#### D. 考察

TN b328、TN330 では、集団発生由来株以外の散発事例由来株においても 1 locus で 1 repeat 数の違いがある株が検出されており、

これらの株は集団発生由来株において repeat 数が 1～2 異なる、single locus variant が見られたとの既報の評価基準によく合致すると言える。一方、TNa829 の株については、2 loci で 2 repeat 数 (G)、3 repeat 数 (F) 異なるタイプ、及び 4 loci で repeat 数が異なるタイプの株が検出されており、遺伝子型の変異の程度が高い。また、これらの株は分離時期が長く約 24 週にわたって分離されていたことを考えると、これらの散発事例間における関連性は低いことが MLVA の結果からも示唆されたといえる。2006 年において長期間に広域から分離されていた、TN a259 の株については、XbaI および BlnI での同一 PFGE タイプであっても時間の経過とともに 1 locus で 1 repeat 数程度の違いを示す株が主体となる変化が生じていることになるが、その変異の程度は集団発生事例内でも生じる、比較的違いが小さい変異であった。130 株の TN a259 株はその疫学的関連性については不明である散発事例由来株であるが、PFGE 及び MLVA の結果でも同一タイプになる株が、32 株あり、67 株の SLV1 を含めると約 76% の株が極めて遺伝学的関連性の高い株であることが示唆された。

#### E. 結論

2006 年に広域から分離された EHEC O157 では、同一 PFGE パターンであっても MLVA では異なるタイプの場合が見られた。分離地や分離時期が異なっている広域分離株においても、PFGE 及び MLVA の型別が一致している株があり、それぞれの遺伝学的関連性が極めて高い可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) Liang SY, Watanabe H, Terajima J, Li CC, Liao JC, Tung SK, Chiou CS. Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Molecular Typing of *Shigella sonnei*. J Clin Microbiol. 2007 Nov;45(11):3574-80.

2) Terajima J, Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK, Park

SY, Watanabe H. *Shigella sonnei* outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. Jpn J Infect Dis. 2006 Aug;59(4):282-3.

図 1

Number of various PFGE type isolates in 2006

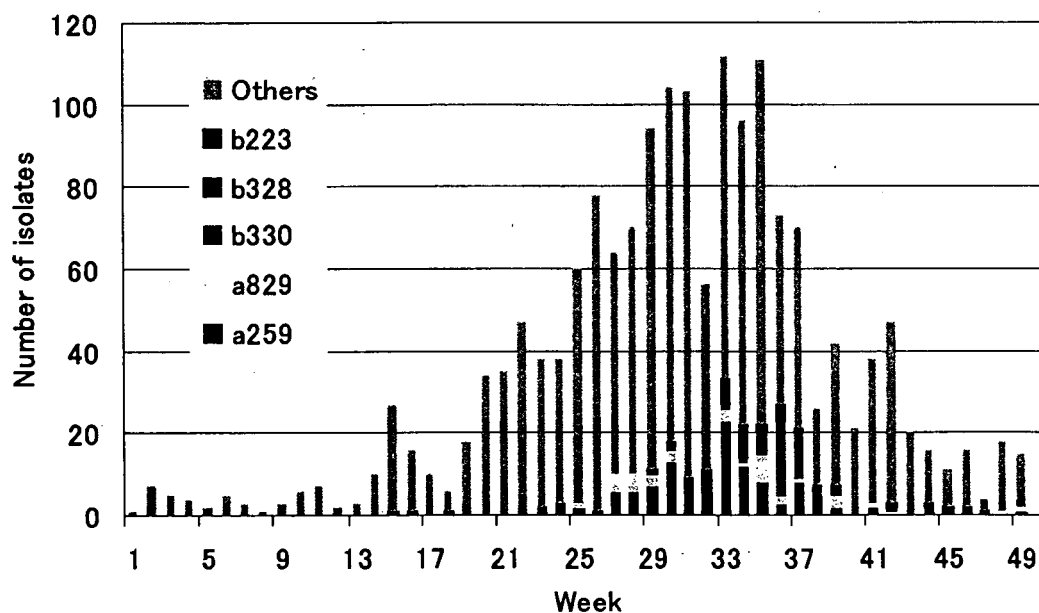


表.1

Xballによる Type No.	分離 株数	分離 都道	分離都道府県
92	13	4	宮城、茨城、埼玉、神奈川
112	17	9	群馬、埼玉、兵庫、大阪、山形、広島、富山、青森、神奈川
a139	13	4	大阪、千葉、兵庫、佐賀、
a259	130	28	大阪、石川、広島、兵庫、福岡、福島、愛媛、茨城、三重、宮城、東京、 奈良、愛知、宮崎、岡山、神奈川、富山、福井、京都、山口、熊本、栃 木、秋田、岐阜、静岡、沖縄、鹿児島、新潟、
a718	3	3	徳島、石川、大阪
a829	37	6	神奈川、大阪、青森、奈良、福岡、大分
b112	12	4	福岡、鹿児島、宮崎、熊本
b142	4	4	石川、福井、埼玉、兵庫
b178	11	6	岐阜、大阪、兵庫、富山、岡山、奈良
b183	7	3	福岡、宮崎、神奈川
b193	3	3	愛媛、岡山、秋田
b216	10	5	三重、石川、神奈川、広島、福岡
b223	7	5	宮城、神奈川、岡山、愛知、大分
b253	3	3	東京、長野、青森
b272	19	4	大阪、兵庫、奈良、三重
b276	6	4	東京、大阪、神奈川、埼玉
b277	19	6	滋賀、富山、石川、岐阜、兵庫、岡山
b284	5	4	長野、神奈川、群馬、三重
b294	9	6	東京、山梨、福岡、岡山、岩手、神奈川
b300	3	3	東京、神奈川、兵庫
b316	3	3	千葉、福岡、大阪
b318	5	3	大阪、秋田、神奈川
b32	12	4	石川、大阪、兵庫、和歌山
b326	23	4	滋賀、京都、福島、神奈川
b328	21	5	滋賀、福井、大阪、福岡、神奈川
b330	43	8	滋賀、鹿児島、徳島、福島、広島、富山、岡山、三重
b348	3	3	宮崎、広島、神奈川
b385	5	3	神奈川、埼玉、青森
b436	4	3	大阪、三重、群馬
b45	6	4	大阪、広島、兵庫、岡山
b495	4	3	兵庫、大阪、奈良
b501	15	5	兵庫、岡山、佐賀、新潟、福岡
b51	3	3	三重、愛知、熊本
b519	3	3	兵庫、鹿児島、大分
b58	25	3	大阪、愛知、兵庫
b83	6	3	千葉、群馬、山形
b91	5	3	大阪、宮崎、鹿児島

表 2

Strain No.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
061033	5	13	9	16	7	4	10	6	20	A	b223	06BL026
061484	5	13	9	16	7	4	10	6	20	A	b223	06BL026
061555	5	13	9	16	7	4	11	6	25	B	b223	06BL026
062073	5	13	9	16	7	4	10	6	20	A	b223	06BL026
062430	5	13	9	9	7	4	10	6	21	C	b223	06BL026
062772	5	13	9	16	7	4	10	6	20	A	b223	06BL026

表 3

Strain No.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
061259	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061505	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061835	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061756	5	9	9	12	7	4	11	8	24	C	b328	06BL034
061757	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061758	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061761	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061762	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061763	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061927	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061928	5	9	9	10	7	4	11	8	25	A	b328	06BL034
061929	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061951	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL033
061952	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061955	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061956	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061957	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061958	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061959	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034
061961	5	9	9	10	7	4	11	8	24	B	b328	06BL034

表 4

NIID No.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
061258	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061308	5	13	9	16	7	4	10	6	18	B	b330	06BL014
061681	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061682	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061683	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061684	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061685	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061686	5	13	9	16	8	4	10	6	19	C	b330	06BL014
061687	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061688	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061689	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061690	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061691	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061692	5	13	9	16	7	4	10	6	21	D	b330	06BL014
061693	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061694	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061695	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061696	5	13	9	15	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061697	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061698	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061699	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061700	5	13	9	16	8	4	10	6	19	C	b330	06BL014
061701	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061702	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061703	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061704	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061705	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061706	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061707	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061712	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
061881	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
062003	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
062077	5	12	9	16	7	4	10	6	19	E	b330	06BL014
062082	5	12	9	16	7	4	10	6	19	E	b330	06BL014
062083	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
062087	5	12	9	16	7	4	10	6	19	E	b330	06BL014
062092	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
062439	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014
062487	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	b330	06BL014

表 5

Strain No.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
060303	5	11	10	16	7	6	8	4	20	I	a829	05BL023
061490	4	11	9	11	10	6	10	7	20	H	a829	06BL028
061553	5	11	9	11	10	6	10	7	21	G	a829	06BL028
061628	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	06BL028
061908	5	11	9	11	10	6	10	7	21	G	a829	06BL028
062114	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	06BL028
062115	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062120	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	05BL019
062121	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062122	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	05BL019
062124	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062125	4	11	9	11	11	6	10	7	18	C	a829	05BL019
062126	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062127	4	11	9	11	11	6	10	7	18	C	a829	05BL019
062131	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062132	4	11	9	11	10	6	10	7	18	A	a829	05BL019
062134	5	13	9	11	8	6	10	8	19	D	a829	05BL019
062139	4	11	9	11	9	6	10	7	18	E	a829	05BL019
062141	5	10	10	16	7	6	8	7	18	J	a829	06BL009
062146	5	10	10	16	7	6	8	7	18	J	a829	06BL009
062148	5	10	10	16	7	6	8	7	18	J	a829	06BL009
062149	5	10	10	16	7	6	8	7	18	J	a829	06BL008
062151	5	10	10	16	7	6	8	7	18	J	a829	06BL009
062154	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	05BL019
062159	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	05BL019
062376	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	05BL019
062473	4	11	9	11	10	6	10	7	19	B	a829	06BL019
062653	5	11	9	11	10	6	10	7	22	F	a829	05BL019
062738	5	11	9	11	10	6	10	7	21	G	a829	05BL019
062796	5	15	9	12	10	6	10	7	23	H	a829	05BL019

表 6

Strain No.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	Type No	BlnI
062559	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062560	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062561	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062562	5	12	11	15	9	6	0	5	24	A		06BL039
062563	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062564	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062565	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062566	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062567	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062568	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062569	5	12	11	15	9	6	0	5	24	A		06BL039
062570	5	12	11	15	9	6	0	5	24	A		06BL039
062571	5	12	11	15	9	6	0	5	24	A		06BL039
062572	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b701	06BL039
062573	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b701	06BL039
062574	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b701	06BL039
062575	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062576	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062577	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062578	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062579	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062580	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062581	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062582	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062583	5	12	11	15	9	6	0	5	25	C	b704	06BL039
062584	5	15	11	15	9	6	0	5	23	B		06BL039
062585	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062586	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039
062587	5	12	11	15	9	6	0	5	23	B	b702	06BL039

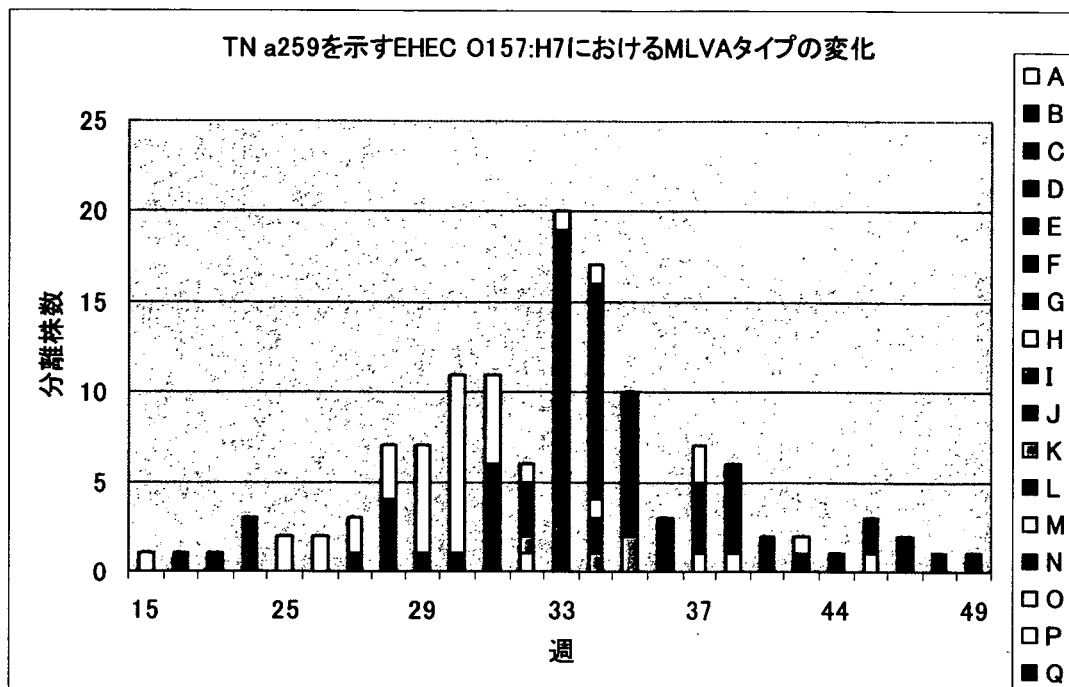
表 7-1

NID No.	week	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
060375	15	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060409	16	5	13	9	15	7	4	10	6	19	C	a259	06BL026
060526	23	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
060614	24	5	13	9	16	8	4	10	6	20	H	a259	06BL026
060615	24	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
060616	24	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061274	25	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061276	25	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061277	26	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061278	26	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060935	27	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
061474	27	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060800	27	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060777	28	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060932	28	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
060933	28	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
060934	28	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
061176	28	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060990	28	5	14	9	16	7	4	10	6	19	F	a259	06BL026
061127	28	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060801	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060969	29	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061421	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060778	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061475	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL044
061476	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060970	29	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060971	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061030	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL023
061854	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061009	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061713	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061334	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061340	30	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
062244	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
060960	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061011	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062598	30	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061341	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061342	31	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL046
062533	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061424	31	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061568	31	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062167	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062245	31	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL023
061569	31	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061096	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062170	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062171	31	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061886	32	5	13	9	16	6	4	10	6	20	N	a259	06BL026
062172	32	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061824	32	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062095	32	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
061496	32	5	13	9	16	7	4	9	5	19	L	a259	06BL026
061887	32	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062052	33	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062074	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061436	33	5	13	9	16	7	4	9	6	20	J	a259	06BL026
061865	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062088	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061427	33	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
061431	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061504	33	5	13	9	16	7	4	9	6	19	G	a259	06BL022
062070	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061601	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061779	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062098	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061428	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061429	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061430	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL045

表 7-2

NID No.	week	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10	MLVA	XbaI	BlnI
062173	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062848	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062849	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062042	33	5	13	9	16	7	4	8	6	19	M	a259	06BL026
062075	33	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062076	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061432	34	5	13	9	17	7	4	11	6	20	I	a259	06BL026
061433	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061434	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061435	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061437	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061438	34	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062059	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062060	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL046
062061	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061471	34	5	13	9	16	7	4	9	5	19	L	a259	06BL026
062053	34	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062058	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062062	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062066	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062038	34	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062079	34	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062068	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061499	35	5	13	9	16	7	4	9	5	19	L	a259	06BL026
062067	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062078	35	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062084	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
061472	35	5	13	9	16	7	4	9	5	19	L	a259	06BL026
061510	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062099	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062488	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062595	35	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062080	36	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062599	36	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062600	36	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062085	37	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	05BL057
062086	37	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062716	37	5	13	9	15	7	4	10	6	19	C	a259	06BL026
061787	37	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062598	37	5	13	9	16	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062341	37	5	14	9	16	7	4	10	5	19	O	a259	06BL026
062425	37	5	13	9	9	7	4	10	6	21	P	a259	06BL026
062426	38	5	13	9	9	7	4	10	6	21	P	a259	06BL026
062617	38	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062618	38	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062620	38	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062621	38	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062622	38	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062619	39	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062212	39	5	13	9	16	7	4	10	6	21	K	a259	06BL026
062211	41	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062224	41	5	13	9	15	7	4	10	6	19	A	a259	06BL026
062705	44	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL025
062451	45	5	13	9	17	7	4	10	6	20	Q	a259	06BL026
062707	45	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
062452	45	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
062453	46	5	13	9	17	7	4	10	6	19	E	a259	06BL026
062713	46	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062651	47	5	13	9	16	7	4	10	6	20	D	a259	06BL026
062652	49	5	14	9	16	7	4	10	6	20	R	a259	06BL026

図 2





厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成19年度 分担研究報告書

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

分担研究者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	寺嶋 淳	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	斐 迎新	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	林 哲也	宮崎大学	

- ・ 研究要旨 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主としてサルモネラおよび腸管出血性大腸菌（EHEC）を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標の開発、有用性の検討を主眼としている。近年、新たな疫学解析の手法として Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis (MLVA) が注目されており、本研究でもサルモネラについて MLVA に利用可能と考えられるいくつかの遺伝子座に対して *Salmonella* Enteritidis、*S. Infantis* および *S. Typhimurium* を対象に検討を行った。また、EHEC についても血清群 0157 以外のものを主たる対象に、MLVA 試験系の構築を検討した。

A. 研究目的

腸管感染症起因菌、中でもサルモネラ、大腸菌を中心に、生化学性状、血清型、薬剤耐性、遺伝子型別等の比較を行うことで、広域にわたる感染事例の探知および国を越えた流行解析を可能にするシステムの構築に寄与する。

B. 研究方法

PCR 等に関しては基本的に標準法による。マルチプレックス PCR は Qiagen 社の Multiplex PCR キットを使用した。

C. 研究結果と考察

1. サルモネラ MLVA

現在サルモネラ分離株の型別としては血清型別があり、同じ血清型の菌株をさらに型別するためにファージ型別、パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別などがある。近年、細菌の遺伝子型別の新たな着目点として VNTR (variable-number tandem repeat) が提唱され、これを複数の遺伝子座に対して適用した MLVA (multi-locus variable-number tandem repeat analysis) が各菌種において開発、検討がなされている。サルモネラでは既に血清型 Typhimurium、Enteritidis、Typhi、Paratyphi A などにおいてゲノム解析が完了しており、MLVA が開発

可能な状況にある。昨年度までに選定していた 22 からの候補遺伝子座に対して、1 検体あたり 2 本のマルチプレックス PCR で実施可能な系を構築し、血清型 Enteritidis、Infantis および Typhimurium の分離株に適用した。ABI3130 にて PCR 産物を泳動し、各産物のサイズおよび繰り返し配列のリピート数を Gene Mapper ソフトウェアにて解析した。得られたリピート数のデータを BioNumerics に取り込みクラスター解析を行った結果を図 1 に示す。

22 遺伝子座中、血清型 Enteritidis については 16 遺伝子座において、Infantis については主として 15 遺伝子座において、Typhimurium については 18-20 遺伝子座において、それぞれ増幅産物が観察された。クラスター解析した結果、Enteritidis および Infantis は、最も遠い分岐での類似度がそれぞれ約 90% および 75% 程度であり、高い分解能は得られなかった。また、Diversity Index もそれぞれ 1 遺伝子座においてのみ 0.56 および 0.40 という値を得たがそれ以外の遺伝子座では 0.1 以下の値しか得られなかった。一方、Typhimurium については最も遠い分岐での類似度が約 65% であった。また、6 遺伝子座において 0.35 以上の Diversity Index を得た。

各血清型とも 100 から 200 株程度試験し、増幅産物も 7 割以上の遺伝子座において良好に得られたものの、高い分解能が得られたのは血清型 Typhimurium のみであった。Typhimurium についてはファージ型 DT104 株の流行があり、MLVA におけるクラスター解析でも互いに同じクラスターに集約されたが、

そのクラスター内でも高度に分岐しており、多様性があることが示唆された。

## 2. EHEC MLVA

EHEC に関しても血清群 0157 以外に 026 および 0111 においてゲノム情報が得られつつある。これらの情報を利用し、サルモネラにおける MLVA 試験系構築と同様にして 0157 を含めた EHEC 全体をカバーしうる形で MLVA 試験系の検討を行った。約 20 からの候補遺伝子座を選定し、サルモネラと同様に 2 本のマルチプレックス PCR で実施可能な系を構築した。このうち 9 の遺伝子座は米国 CDC から提唱されている遺伝子座に相当する。血清群 0157 を 270 株、026 を 314 株、0111 を 140 株試験し、Diversity Index を比較した(図 2)。その結果、0157 で使用されている 9 遺伝子座のうち、0111 でも高い DI を示したのは 1 遺伝子座のみであり、026 に関しては高い DI を示した遺伝子座は観察されなかった(なお、M12 は 0157 と 026、0111 では配列が異なっていたため考慮していない)。また、上記 0157 で使用されていない遺伝子座の中に 3 つの血清型に共通して高い DI を示すもの、026 あるいは 0111 に特異的に高い DI を示すものも見付き、今後さらに検討する価値があると考えられた。

## D. 結論

本研究のマルチプレックス PCR を用いたサルモネラ MLVA に関しては、現在のところ S. Typhimurium での有用性が示唆された。今後さらに検体数を増やすとともに、他の試験法とも比較してその有用性を検討していく必

要がある。

EHEC MLVA に関しても、有用と思われる遺伝子座が新たに特定されつつあり、0157 以外の血清群に属す EHEC の簡易型別法としての有効性を検討していくことが重要となるであろう。

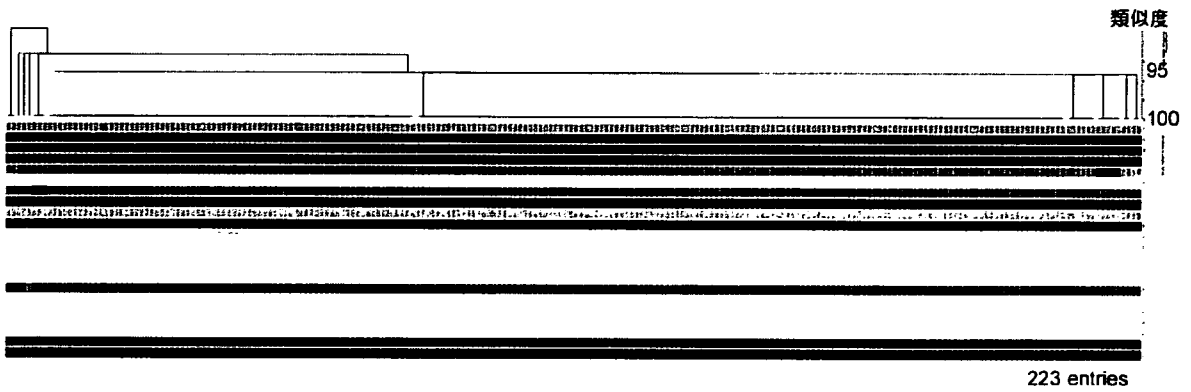
#### F. 健康危機情報

特になし

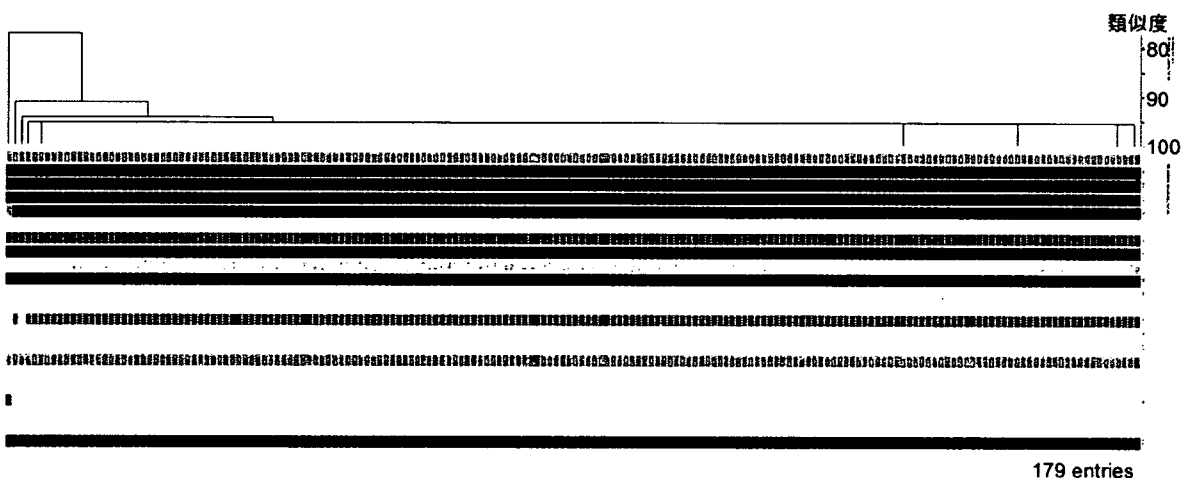
#### G. 研究発表

野田裕之、長田美母衣、大沼正行、金子通治、泉谷秀昌、渡辺治雄：山梨県で分離された散発下痢症患者由来の *Salmonella* serovar Enteritidis の分離頻度と疫学マーカーの頻度。第 81 回日本感染症学会総会、2007 年 4 月。

a)



b)



c)

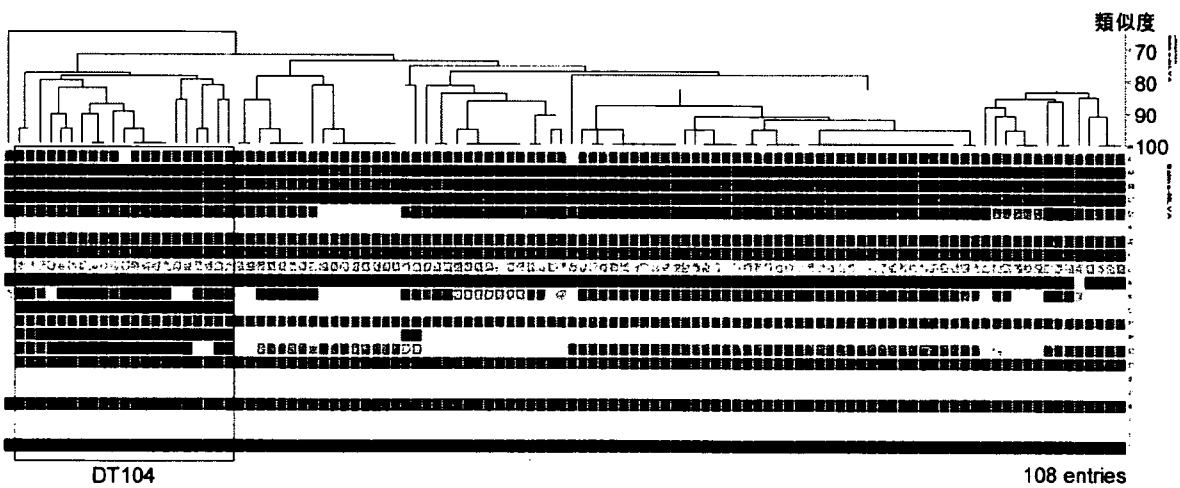


図 1. サルモネラ MLVA によるクラスター解析 a) *Salmonella* Enteritidis, b) *Salmonella* Infantis, c) *Salmonella* Typhimurium. DT104 はファージ型 DT104 関連株が集積したクラスターを示す。