

表1にアジア地域の国立の研究機関との共同研究の課題名と担当者を示した。各担当者の研究報告書は、当該報告書に含めた。日本国内の研究者との共同研究を通して、各国で発生している各病原体の性質に関する研究報告をまとめて今後データベース化していく方向である。また、このような共同研究を通し、研究者間の交流が促進され、必要なときにデータの交換が行われ、その結果を感染症対策に生かせる基盤が整うことが期待できる。

D. 考察：

アジアの特定な地域で発生している感染症が、旅行者、食材（食品）、動物等を介してアジア地域全域に拡散し、それが我が国にも侵入する機会は増大してきている。そのような時期に、各国の感染症の制御に責任を持っている国の研究機関との連携を深め、情報の共有化を図るためのネットワーク化に向けた試みを行うことは時期を得た物である。特に、各地域、各国において発生している病原体の表現型（生物型、薬剤耐性等）および遺伝型（塩基配列の差による型別）の解析結果の情報を収集し、そのデータベース化を図る基盤的研究成果は、新規病原体の発生、あるいは既存病原体の変異およびその伝播を迅速に検知する源になる。そのような目的を持って、今回は、アジアで問題となっている下痢症細菌（コレラ、赤痢、腸チフス等）、デング熱ウイルス、日本脳炎

ウイルス等、狂犬病ウイルス、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、マラリア等を主な対象病原体として、研究を進めることにした。

その結果、細菌においてはPFGE, MLVA等の分子疫学的解析手法の標準化に向けての検討がアジア諸国13カ国（+米国CDC）の協力の下に進むこととなった。各国の12の研究機関に委託研究費を分配し、その国における病原体の解析を共通の手法を用いて研究していただきその成果を報告書としてまとめることができた。デングウイルス関係は5カ国の研究機関、狂犬病ウイルスは3カ国、マラリアは4カ国の研究機関との共同研究が成立した。それらの結果は、感染研とアジアの研究機関との連携の強化、人的交流、およびアジアで発生している病原体の遺伝型等のデータベースの構築に利用できるであろう。さらに、今年度は、ASEAN+ThreeのEID(Emerging Infectious Diseases)プログラムの支援の一環として、アジア10カ国の研究者を対象に新型インフルエンザウイルス検出のためのRT-PCR法の研修会を感染研で主催し、アジアにおける新型インフルエンザ感染症対策に貢献することが出来た。このようなことこそ、アジアの研究機関の能力を高め、各国が自力で自国の感染症への対応を勝ち取ることに結びつくものである。

感染症の伝播には国境はない。今回の新型インフルエンザのようにいつどのような病原体の勃発、その拡散が

起こるか予期できない。その発生を迅速に検知するためにも、近隣諸国との連携、および病原体の検出技術の均一化が重要である。幸いにも我が国は科学的にも技術的にもアジア諸国のなかでは先んじている。我が国がリーダーシップをとり、アジア諸国の感染症対応の責任を担う国立の研究機関とのネットワークを構築し、人的、技術的な交流を深めておくことが、強いては我が国への新規病原体の侵入防止、および拡大の迅速把握に結びつき、我が国の感染症対策に役立つこととなる。構築されつつあるネットワークのさらなる発展および維持に当該研究の果たす役割は大きいと考える。

E. 結論：

一国で発生した感染症の原因となる病原体は、SARS の事件が実証したように、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。それを未然に阻止する対策が求められている。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が最も効果的防止法である。そのためには国を越えての協力体制の構築が求められている。本研究はASEAN諸国を中心として感染症対策に関与する研究機関と国立感染症研究所とのネットワークを構築することにより、病原体のゲノム情報を基本としてデータベース化を行い、その情報を利用することにより発生するあるいは伝播する病原体を迅速に把握することを可能にする。それにより、わが国への病原体の侵入あるいは拡散を未然に防止することができる。そのことはわが国民の健康被害を最小限に食い止めることを意味する。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

別途記載。

H21年度 アジアネット 海外委託費一覧

細菌(渡辺グループ)

国	the title of research	
1 China CDC	To study the contributions of the serotype-converting phages to the serotype shifting and emerging of new serotype of <i>Shigella flexneri</i> in China	J-G.Xu
2 インドNICED	Genotyping of <i>Vibrio cholerae</i> O1, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Campylobacter</i> spp	B.B.Nair
3 バングラデッシュICDDR	Phenotypic and genotypic characterization of different virotypes of <i>Escherichia coli</i> present in diarrheal patients and non-diarrheal controls	A Cravioto,
4 バングラデッシュICDDR	Clonal recycling, dual peaks and off-season cholera outbreaks in Dhaka	M. Alam
5 韓国 NIH	Application of Multilocus variable-number tandem repeat analysis for typing of <i>Shigella</i> spp	B.K.Lee
6 タイNIH	Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> Isolated from Children	O.A.Ratchtrachentrai
7 香港公衆衛生研究所	Organization of PFGE Workshop for Training and Technology transfer for Asia Pacific countries/ areas in February 2010	K.Man Kam
8 マレーシア医学研究所	Distribution of Genotypes by PFGE and MLVA and Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> Typhi and Paratyphi: An interlaboratory collaborative study (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	Thong Kwai-Lin
9 ベトナム、NIHE	Identification the new combinations of beta-lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors of <i>Shigella</i> isolates from 2007-2009 in Vietnam	P.D. Cam
10 ニュージランド環境科学研究所	Development of PFGE protocol for <i>Yersinia enterocolitica</i>	B.J.Gilpin
11 CDC台湾	Development and Evaluation of Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for Fine Typing and Phylogenetic Analysis of <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	C-S Chiou
12 ASEAN	Strengthening the Capacity and Networking of the National Laboratory Contact Points (Institutions) of ASEAN Member States through a Laboratory Training on Influenza A (H1N1)	Dhannan Sunoto

ウイルス(倉根グループ)

1	台湾CDC	Characterization of dengue virus prevalence in Taiwan for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia, 2009	J-h Huang
2	インドネシア大	ANALYSIS OF ENVELOPE, NS1 AND NS3 GENE AND POLYPEPTIDE SEQUENCES OF DENGUE VIRUSES IN JAKARTA	M Sudiro
3	中国CDC	Investigation of arbovirus in Jiangxi province, China, 2009	Guo-Dong Liang
4	タイNIH	Characterization for dengue viruses prevalent in Thailand for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia	S Anantapreecha
5	フィリピン熱帯医学研究所	Characterization of dengue, Japanese encephalitis and vector-borne viruses prevalent in the Philippines for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other vector-borne viruses prevalent in Asia	R M Olveda

狂犬病(山田グループ)

1	フィリピン	Enhancement of Rabies Surveillance by Strengthening Rabies Research in the Philippines	Beatriz P. Quiambao
2	ベトナム NIHE	Development, application of new methods for rabies diagnosis in National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE), Hanoi, Vietnam	Nguyen thi Kieu Anh
3	中国CDC	Construction of laboratory network on the molecular epidemiology and the development and standardization of Rabies diagnostic methods	Qing Tang

寄生虫(大前グループ)

1	インドネシア	Evaluation of Malaria Diagnostic In North Sumatera Province, Indonesia	Lambok Shiahann
2	中国CDC	Molecular analysis of antimalarial drugs resistance in Plasmodium falciparum in China	Tang Linpha
3	中国CDC	Construction of international network of research and control on vivax malaria in Asia and Pacific area	Guan Yayi
3	タイ	Screening of transmission blocking efficacy of antibodies produced against Plasmodium vivax and P. falciparum vaccine candidates.	J Prachumritsi
4	カンボジア	The Strengthening & Integrating Of Malaria Control Activities In Newly Developed Area In Kampot Province, Southern Cambodia	Chea Nguon
5	パプア・ニューギニア	The contribution of relapses to the burden and complexity of P. vivax infection in PNG elementary school	Ivo Mueller

図 1 : アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

目的 :

- 1) 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。
- 2) アジアで流行している新興感染症 (細菌性疾患 ; 新型コレラ、新型腸炎ビブリオ、その他の腸管感染症。ウイルス性疾患 ; デング熱、麻疹、風疹、狂犬病、新型インフルエンザ。原虫 ; マラリアを対象) の正確な情報を得るためのゲノムに基づいた検査法の基盤を構築する。検査法の標準化、精度管理およびゲノム情報に基づいたデータベース化を推進する
- 3) 病原体伝播の迅速把握および阻止に役立てることができる

モデルケース ; 細菌、ウイルス、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、腸チフス等の下痢性疾患)

ウイルス (アジアで問題となっているデング熱、狂犬病、インフルエンザ、麻疹等を対象)

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
- ・ ゲノムの多様性解析 ; 各国で分離される病原体のゲノム構造を塩基配列に基づいて解析し、データベースの構築を行う (各国の機関に委託研究費を出し、各国の病原体解析を促進させる)
- ・ 迅速診断法の開発 ; ゲノムの多様性を利用して、迅速検出法の開発を行う (国内研究機関が中心に行う)
- ・ アジア諸国へ解析法、診断法の技術伝達、および精度管理、研修を行う (国内研究機関が中心に行う)
- ・

研究成果 :

- ・ アジア (韓国、中国、台湾、ベトナム、マレーシア、フィリピン、タイ、バングラデシュ、インド、オーストラリア、ニュージーランド) および米国 CDC 等の国立の感染症研究所との連携を図り、コレラ菌等の腸管系細菌のゲノム情報 (PFGE) に基づくデータベース化およびそのネットワーク (Pulse-Net) の構築を行った
- ・ デングウイルスおよびチクングニヤウイルスの NS1 抗原 ELISA の開発、診断技術を実施した。また、検査法に関する情報をタイ NIH に提供し、タイ南部に侵入したチクングニヤ熱診断に寄与した。
- ・ 狂犬病の簡易・迅速遺伝子検出を可能とする RT-LAMP 法を確立して、フィリピンで流行している野外の狂犬病ウイルス株に対して検出感度の検証を行った
- ・ ブタインフルエンザウイルス由来の新型 A/H1N1 ウイルスの PCR 高感度診断系を開発し、そのマニュアルをアジア周辺諸国へ提供した。
- ・ アジア・アフリカのマラリア浸淫地から得られた熱帯熱マラリア原虫集団の遺伝的多様性とその分布の定量的解析を行った。各地域において遺伝的多様性は大きく異なり、マラリア獲得免疫やワクチン効果は一様には現れないことが示唆された。

プロジェクト1：細菌

「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究」

研究分担者 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 2008 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 O157 について、PFGE 及び Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を行った。XbaI 消化による PFGE パターンが一致し、11ヶ所以上の都道府県で分離された EHEC O157 には、異なる 5 種類のパターンがあり、BlnI による PFGE でも一致している株が含まれていた。5 種類のパターンそれぞれについて、両酵素でもパターンが一致する株について MLVA で調べると、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複数の遺伝子座においてリピート数の異なる変異株が見出されるパターンが存在した。以上の結果から、XbaI 消化による PFGE パターンが一致し広域から分離されている EHEC O157 には、1) 散发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、2) 長期間に広域から分離されている株では遺伝学的特性が異なる変異株が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 O157 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 O157 においても MLVA による解析報告がある。本研究では、MLVA を用いて腸管出血性大腸菌 O157 の日本国内における詳細な動向を把握することを目的とする。

B. 研究方法

2008 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 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-3130xl 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ポート数を表にして提示した。MLVA の結果は BioNumerics (Applied Maths 社) を用いて解析を行った。

C. 研究結果

2008 年に分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 O157、1729 株のうち、XbaI による PFGE パターンが一致し 11 箇所以上の都道府県から分離されている、Type No. (TN) c293, c47, c57, d148, d92 のパターンを示す株について(図 1)調べた。2008 年には、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 45 種類のパターンが見られたが、11 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のうち、特に分離株数の多かった 4 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ポート数の比較を行った(表 1~4)。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 数異なるものから全ての遺伝子座でリポート数の異なるものまであった(表 1~4)。分離時期が比較的短期間に集中していた、TN d148 及びその類似のパターンを示す株、計 56 株について MLVA を行った結果、44 株はすべての遺伝子座においてリポート数が一致し(A 型)、1 遺伝子座において 1 だけリポート数が異なる変異株(Single Locus Variant; SLV1)は 6 株、その他に複数の遺伝子座においてリポート数の異なる株が 6 株存在していた(表 1)。分離時期が 5 月から 10 月とやや長い期間に及んだ TN d92 のパターンを示す 34 株は、広域から分離されていたが(図 2)、全ての遺伝子座で同一リポート数を示す株は約半数の 15 株であり、SLV1 が 10 株、その他が 9 株あった(表 2)。TN c57 を示す株は 2007 年の広域流行株のパターンであるが、MLVA で比較すると、2008 年分離 64 株のうち 31 株は 2007 年分離株の主となるタイプとは異なる SLV1 で、その他にも locus 10 においてリポート数が 1~14 異なるタイプが 14 株あった(表 3)。TN c47 を示す株は、2007 年に集団発生を引き起こし、全国の散発事例からも多数の同一 MLVA タイプの株が分離されていたが、2008 年になっても、この MLVA タイプの 28 株が分離されていた。2007 年及び 2008 年に分離された TN c47 株について MLVA タイプを調べ

ると、2007年と同一 MLVA タイプは2株しかなく、多くは SLV1 であった(表4)。TN c293 のパターンも2007年の広域流行株が示すパターンであるが、MLVA では41株が23タイプに分かれ、全ての遺伝子座で変異がみられ、ほとんどのタイプが1株のみの分離であった(表5)。しかしながら、複数の分離株が見られたタイプについてその分離地と時期を調べると、地理的な集積や時間的な集積が見られるタイプがあることが明らかになった(図3)。そのうち、MLVA タイプ A は、7月～8月にかけて岐阜、福井、滋賀の3県で分離されていた(赤色)。また、MLVA タイプ D は、千葉県のみで8月中旬から9月初旬にかけて分離されていた(黄色)。一方、MLVA タイプ C の株は、岡山・香川と栃木・東京という地域でやや離れた時期に発生していた(緑色)。

D. 考察

2008年に広域から分離された5種類の TN を示す EHEC O157 のうち4種類の TN (c293, c47, c57, d92) では、分離期間が比較的長期に及んでおり4～8ヶ月であった。分離期間が約4カ月である、TN d92 では同一或いは SLV1 となる変異株が大部分を占めた。2007年から続いて広域で分離されている TN c57 及び c293 では、c57 で SLV1 の比率が約半数に達し、c293 では大部分が複数の遺伝子座でリピート数が異なる変異株が主体であった。EHEC O157 における広域流行株では、長期間に及んで分離される株が同一 PFGE パターンを示しても、少しずつ遺伝子構成に変化が生じていることが示された。これらの株がほとんど散发事例由来株であることを考

えると、その感染源が異なっても不思議ではない。しかしながら、同一 MLVA タイプの株では、c293 においても地域的な集積や時間的な集積が見られ、これらの事例における同一感染源の存在が示唆された。PFGE と MLVA で同一クラスターを形成している事例では、それぞれに対応するクラスター内共通の感染源をもっていた可能性が高いと考えられる。これらの広域事例感染源の究明には、菌株解析情報だけではなく、疫学情報を含めた総合的な情報共有が重要である。

E. 結論

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 の型別が一致しそれぞれの遺伝学的関連性が極めて高いと考えられる EHEC O157 が分離されていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morita-Ishihara T, Terajima J, Watanabe H, Izumiya H. Interaction between enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62:351-5, 2009

2. 学会発表

1) 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄; 地研・感染研のネットワークによる EHEC 感染症の動向把握

第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009

2) Jun Terajima, Sunao Iyoda, Tomoko Morita-Ishihara, Jiro Mitobe, Hidemasa Izumiya, Haruo Watanabe; Molecular Epidemiological investigation of enterohemorrhagic E. coli isolates in Japan 2006-2007, 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing Escherichia coli Infections, Buenos Aires, 2009

3) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄; 最近の腸管出血

性大腸菌感染症の動向について。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図 1

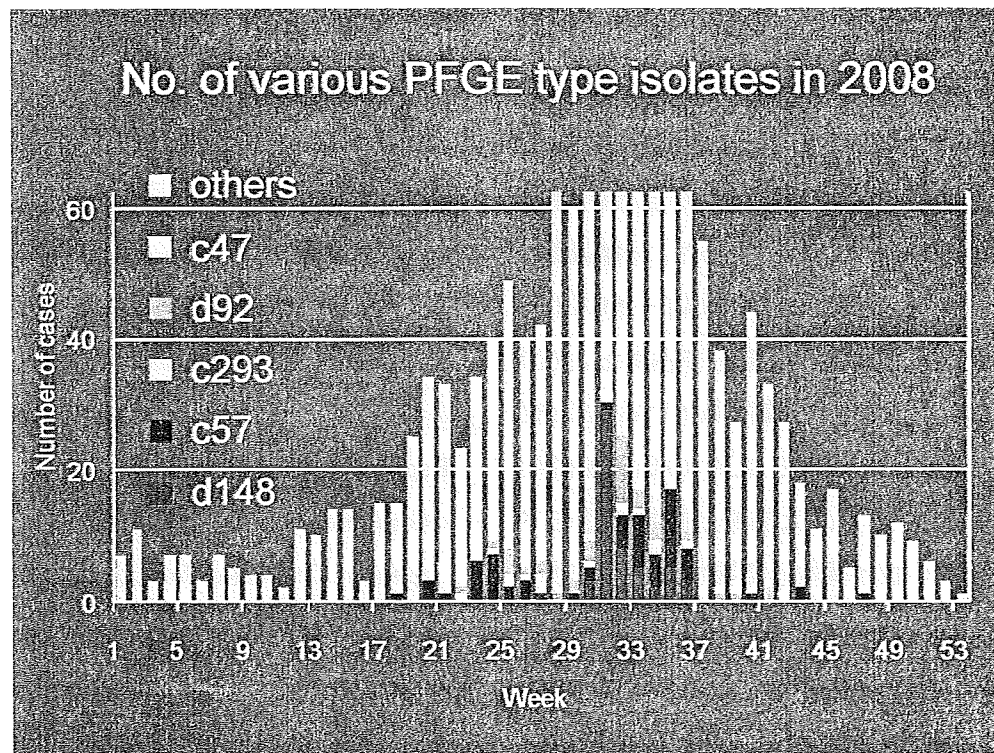


表 1

VNTR loci									Subtype			No. of isolate	
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA		
4	9	10	12	8	6	5	6	39	d148	08BL001	A	44	44
4	9	10	12	8	6	5	6	40	d148	08BL001	B	2	
4	10	10	12	8	6	5	6	39	d148	08BL001	C	1	SLV1
4	9	10	12	8	6	5	6	38	d148	08BL001	D	2	
4	9	10	11	8	6	5	6	39			E	1	6
4	9	10	12	8	6	5	6	35	d148	08BL001	F	1	
4	9	10	12	8	6	5	6	28	d148	08BL001	G	1	Others
4	9	10	11	8	7	5	6	38	d148	08BL001	H	4	6

図 2

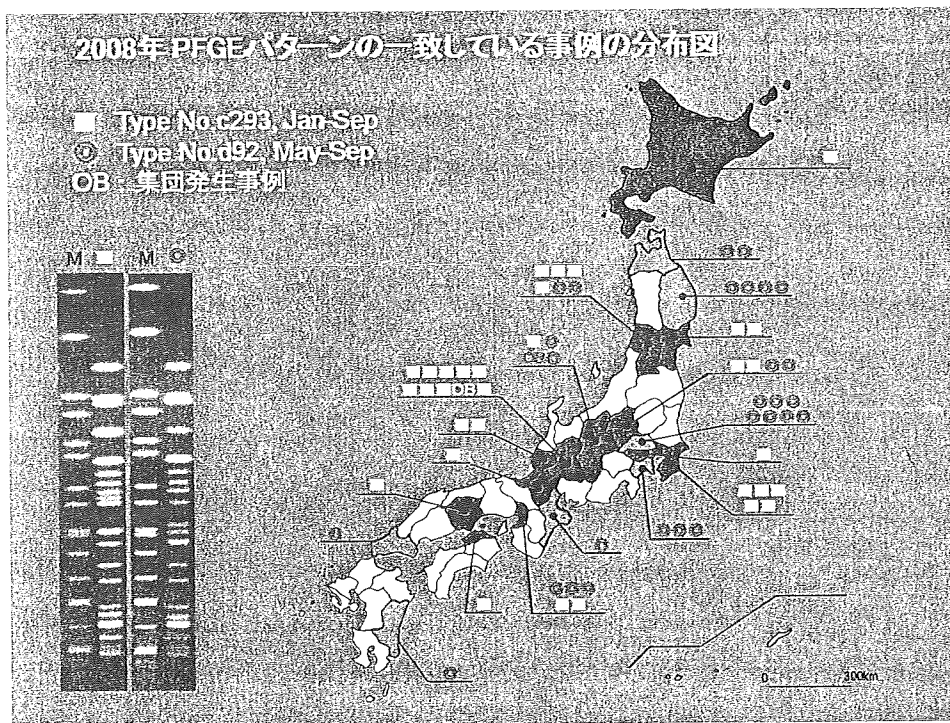


表 2

VNTR loci									Subtype			No. of isolate	
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA		
5	12	10	9	6	6	9	7	30	d92	05BL019	A	15	15
5	13	10	9	6	6	9	7	30	d92	05BL019	B	4	SL1
5	12	10	9	6	6	9	8	30	d92	05BL019	C	3	SL1
5	12	10	9	6	7	9	7	30	d92	05BL019	D	1	SL1
5	12	10	9	6	6	9	7	28	d92	05BL019	E	1	SL2
5	12	10	9	6	6	9	7	32	d92	05BL019	F	1	10
5	12	10	9	6	6	9	7	33	d92	05BL019	G	1	
5	12	10	9	6	6	9	7	35	d92	06BL019	H	1	
5	12	10	9	6	6	9	7	15	d92	05BL019	I	1	
5	12	10	9	6	6	6	7	30	d92	05BL019	J	1	Others
5	12	10	9	6	6	9	5	31	d92	05BL019	K	2	
5	12	10	9	6	6	9	5	32	d92	05BL019	L	2	
5	11	10	9	6	6	10	7	30	d92	05BL019	M	1	9

表 3

VNTR loci										Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA		
4	18	7	10	6	8	0	11	32	c57	07BL041	A	18	
4	18	7	10	6	8	0	11	32	c57	07BL041	A	1	
4	18	7	10	6	8	0	11	33	c57	07BL041	B SLV1	22	
4	18	7	10	6	8	0	11	31	c57	07BL041	C SLV1	4	
4	19	7	10	6	8	0	11	32	c57	07BL041	F SLV1	3	
4	18	7	10	6	8	0	12	32	c57	07BL041	H SLV1	1	
4	18	7	10	6	7	0	11	32	c57	07BL041	P SLV1	1	
4	18	7	10	6	8	0	11	35	c57	07BL041	D	3	
4	18	7	10	6	8	0	11	34	c57	07BL041	E	2	
4	18	7	10	6	8	0	10	31	c57	07BL041	G	1	
4	17	7	10	6	8	0	11	33	c57	07BL041	I	1	
4	17	7	10	6	8	0	10	34	c57	07BL041	J	1	
4	18	7	10	6	8	0	12	35	c57	07BL041	K	1	
4	18	7	10	6	8	0	12	36	c57	07BL041	L	1	
4	18	7	10	6	8	0	11	44	c57	07BL041	M	1	
4	18	7	10	7	8	0	11	33	c57	07BL041	N	1	
4	18	7	10	6	8	0	11	18	c57	07BL041	O	1	
4	21	7	10	6	8	0	11	33	c57	07BL041	Q	1	
											Others	31	
												14	

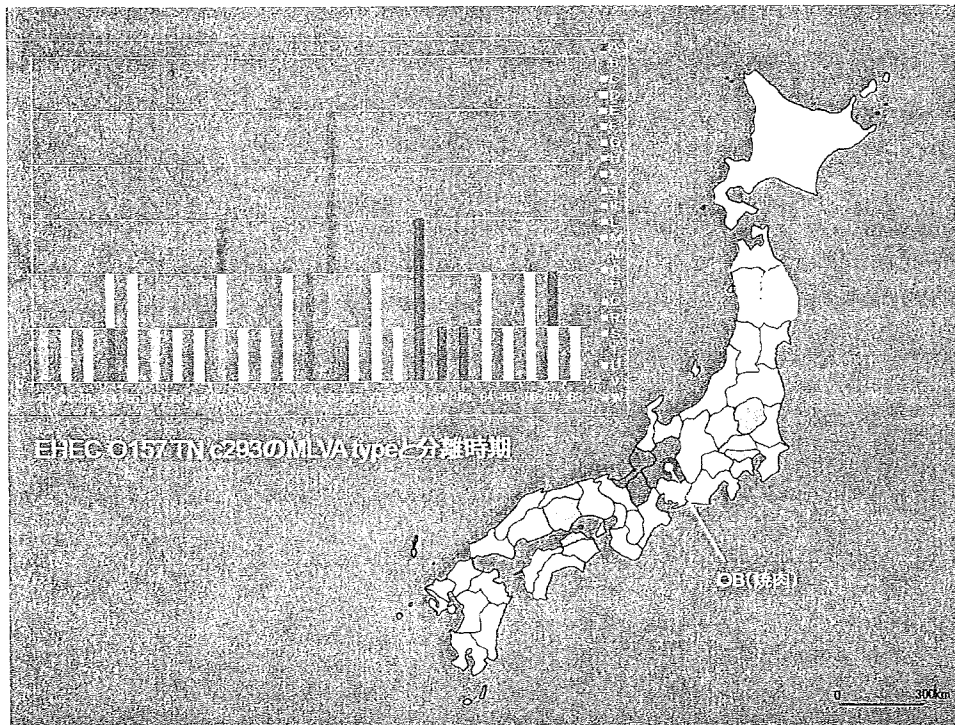
表 4

VNTR loci										Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA		
5	16	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	A	69	
5	16	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL052	A	1	
5	16	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL004	A	1	
5	16	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	A	1	
5	16	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL006	A	1	
5	16	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	B	17	
5	17	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	C	8	
5	16	7	15	3	7	5	8	4	c47	07BL001	D	1	
5	16	7	16	3	7	5	7	4	c47	07BL001	E SLV 1	12	
5	16	7	14	3	7	5	7	4	c47	07BL001	F	2	
5	16	8	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	G	1	
5	16	7	15	3	7	5	6	4	c47	07BL001	H	2	
5	14	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	I	4	
5	16	7	15	3	7	5	7	6	c47	07BL001	J SLV 2	2	
5	16	7	13	3	7	5	7	4	c47	07BL001		2	
5	15	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	L	1	
5	16	7	14	3	7	5	7	5	c47	07BL001	M	1	
5	16	7	9	3	7	5	7	4	c47	07BL001	N	1	
5	16	7	16	3	7	5	7	5	c47	07BL001	O	1	
5	6	7	15	3	7	5	7	4	c47	07BL001	P	1	
2	16	7	13	3	2	5	7	4	c47	07BL001		1	
5	17	7	16	3	7	5	7	4	c47	07BL001		1	
5	18	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001		1	
5	21	7	14	3	7	5	7	4	c47	07BL001		1	
5	16	7	15	3	8	5	7	6	c47	07BL001		3	
											Others	12	

表 5

Date	分離地	25	3	34	9	17	19	36	37	10	MLVA type	No. of isolates	BlnI
2008/8/5	Miyagi	5	8	8	11	7	6	4	6	24	F	1	06BL017
2008/1/18e	Yamagata		9	10	10	7	6	5	6	36	G	1	
					11	5	6	5	4	23	A	6	08BL004
2008/5/15	Yamagata					7	6	5	5	10	H	1	
2008/1/18	Yamagata									47	I	1	07BL061
2008/5/21	Yamagata								7	31	J	1	08BL003
2008/6/24	Osaka									33	K	1	
2008/8/22	Chiba					8	6	5	5	34	L	1	
										35	D	1	
2008/5/8	Yamagata					9	6	5	6	20	M	1	
2008/4/30	Miyagi									21	N	1	
2007/12/21	Hyogo				12	7	6	5	6	33	O	1	
2008/6/4	Gifu									39	P	1	07BL062
										40	B	6	06BL018
										41	E	2	
2008/2/15	Aomori								7	31	Q	1	
2008/1/11	Nagano									32	R	1	
2007/11/1	Osaka		10	10	11	7	6	5	6	13	S	1	
2008/6/3	Gifu				12	7	6	5	6	41	T	1	
2008/8/6	Hokkaido			12	11	7	6	3	7	29	U	1	
2008/1/10	Osaka				13	7	6	4	7	21	V	1	
			12	10	12	7	5	5	6	31	C	5	
2007/10/1	Saitama	6	11	10	12	7	6	5	7	52	W	1	

図 3



- ・ 研究要旨 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する種々の細菌感染症に対応するため、主として食水系腸管感染症を対象に遺伝子解析をベースとした疫学指標、診断法の開発、ならびにそれらの有用性についての検討を主眼としている。近年、新たな疫学解析の手法として Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis (MLVA) が注目されている。昨年度 *Shigella sonnei* について MLVA の有用性を検討した。本年度は、*Shigella sonnei* 以外の赤痢菌、特に *Shigella flexneri* に着目し、MLVA 試験系の構築を検討した。

A. 研究目的

食水系腸管感染症起因菌を中心に、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菌型の比較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

いわゆる分子疫学的手法として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。

S. sonnei に関しても同法に関する報告があり、昨年度 8 遺伝子座による MLVA 法を検討し、その有用性が明らかとなった。我が国の赤痢の大半はアジアからの輸入例であり、*S. sonnei* 以外に *S. flexneri* が大きな割合を占める(表 1)。また、赤痢菌については *S. sonnei* に加え、他の赤痢菌 (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*) についてもゲノム配列が明らかになっている。そこで、本研究ではこれらのゲノム配列から VNTR の候補となりえる遺伝子座を選択し、その有用性を検討した。

ゲノム配列の解析から *S. sonnei* で使用している 8 遺伝子座を含め、25 遺伝子座を選択、プライマーを設計した。約 70 株の *S. flexneri* を対象に PC を実施し、MLVA の有用性を検討した。各産物のサイズおよび繰り返

し配列のリポート数を Gene Mapper ソフトウェアにて解析した。得られたリポート数のデータを BioNumerics に取り込み、結果を解析した。

各遺伝子座において観察されたアレル数は 1-13 であり、Diversisty Index (D 値) は 0.00-0.88 であった (図 1)。全遺伝子座をまとめた D 値は 0.98 と比較的高いものであった。*S. sonnei* で使われている遺伝子座の中で、SS9 および SS10 は高い分解能を示した。また、新しく選択した遺伝子座の中では Sf1, Sf4, Sf5, Sf6, Sh2, Sh5, Sh6 が比較的高い分解能を示した。

試験した *S. flexneri* 株に関して MLVA の結果に基づいてクラスター解析を行った。*S. sonnei* で使用した 8 遺伝子座に基づくクラスター解析では、これらの株はほとんど分離されず、ほとんど全ての株が 1 遺伝子座の違いしか示さず、近縁関係にあることになってしまった。一方、25 遺伝子座を使用した解析では、クラスターはより細分化され、疫学的に関連性のある株、あるいは関連性が疑われる株のみが同じか、近縁のクラスターに分類された (図 2、色塗りのクラスター)。

D. 考察

MLVA に使用する遺伝子座を従来の 8 から 25 に増やすことで、*S. sonnei* に加え、*S. flexneri* に関しても比較的高い分解能を得ることが可能となった。我が国では *S. sonnei* に比べ、*S. flexneri* による赤痢の発生頻度は低いため、さらに供試菌株数を増やして検討する必要があるものの、その有用性が期待される。

E. 結論

S. sonnei に加え *S. flexneri* の遺伝子型別法として MLVA 法が有用であることが示唆された。国内対応としては、輸入食品による赤痢の疫学解析、海外対応としては各地の流行菌型の把握に役立つものと期待される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. J. Med. Microbiol. 58 (11), 1486-1491, 2009.

表 1. 赤痢菌検出数（地研・保健所）（病原微生物検出情報より）

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	計	rate
<i>Shigella dysenteriae</i>	4	2	2	2	3	1	3	1	18	1%
<i>Shigella flexneri</i>	45	40	66	21	40	33	34	17	296	20%
<i>Shigella boydii</i>	4	2	3	8	2	3	1	1	24	2%
<i>Shigella sonnei</i>	205	225	186	79	101	66	91	165	1118	77%
計	258	269	257	110	146	103	129	184	1456	100%

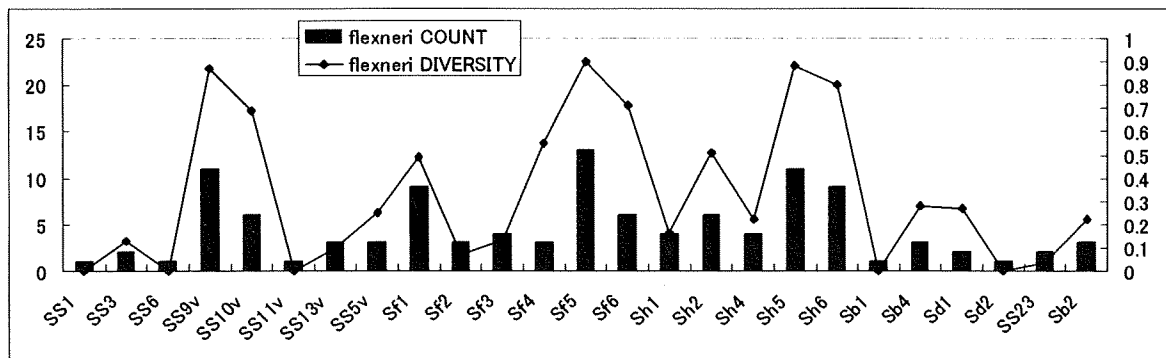
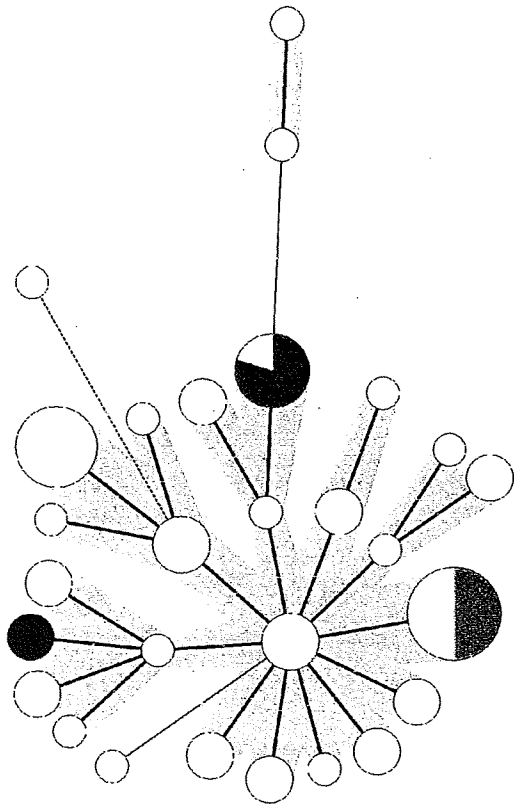


図 1. 25 遺伝子座について、*S. flexneri* を解析した際に観察されたアレル数 (count) および分解能 (Diversity)

a)



b)

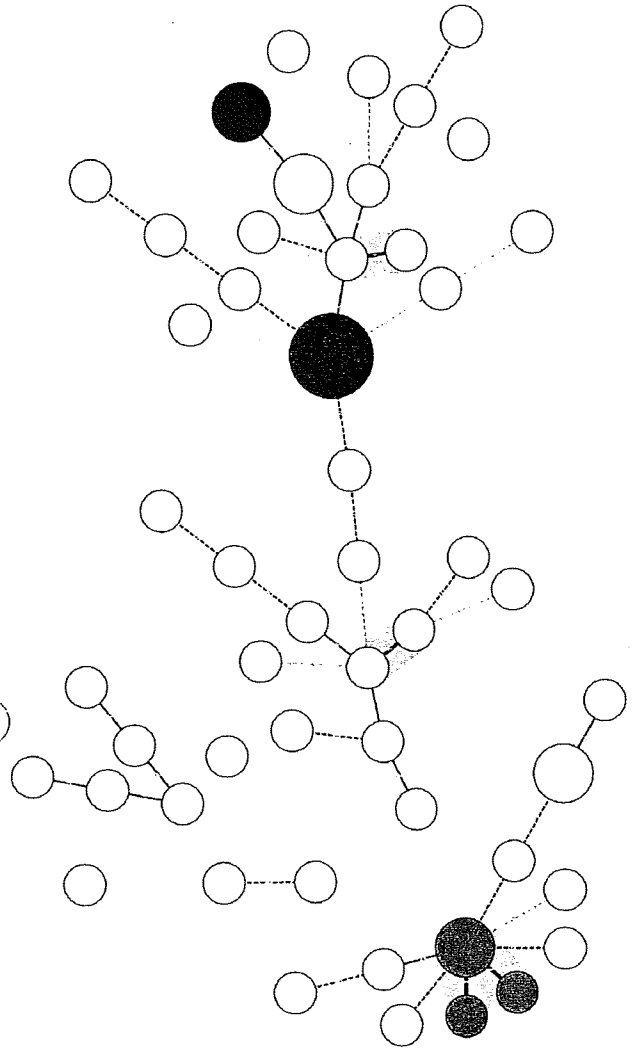


図2. *S. flexneri* MLVA からの最小域木 (Minimam Spanning Tree) によるクラスター解析。
 a) 8 遺伝子座によるもの。b) 25 遺伝子座によるもの。1 遺伝子座の違いの範囲内の分岐には網掛けがなされている。色分けされている円は家族内事例など、疫学的な関連がある、もしくは疑われる事例を示す。

分担研究課題名：「病原性大腸菌の侵入監視に関する研究」

分担研究者：伊豫田淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

協力研究者：佐藤人美，泉谷秀昌，寺嶋淳（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究要旨

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌（EHEC）の大部分は依然として血清群 O157、であり、1999 年以降に分離された HUS 患者由来の EHEC 株のおよそ 90%は血清群 O157（血清型 O157:H7 または O157:H-）である。米国で 2006 年に分離された高病原性と予想される O157:H7 株と同じ遺伝系統株が 1999-2008 年に分離された国内株にも多数存在し、その比率は無症状保菌者由来株と比較すると HUS 患者で有意に高いことが判明した。この傾向は 2009 年の分離株でも同様に見られることが確認された。さらに、これら高病原性と考えられる株はその他の遺伝系統株と比較して既知の病原性因子の発現が上昇している可能性を示唆する予備的な結果が得られた。

A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌（*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC）の約 80%は血清群 O157、O26 または O111 の三大 O 血清群に分類される。これまでの我々の研究から、三大 O 血清群のほとんどすべてが LEE（locus of enterocyte effacement）と呼ばれる病原性遺伝子群を共通に保有し、腸管上皮細胞へ強固に接着することが明らかとなっている。ところで、日本を除くアジア諸国では現在のところ EHEC による感染事例報告は少ないものの、食品や食材又は環境中から分離されるケースが増えており、邦人が海外で EHEC に感染し、国内に持ち込むケースも報告されている。これらの原因菌として分離される EHEC には、国

内の事例と同様に、血清群 O157 による感染事例も含まれている。EHEC 感染によって引き起こされる重篤な臨床症状である溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome: HUS）の患者から分離された国内の EHEC 株について着目すると、その約 90%が血清群 O157（ほとんどの血清型が O157:H7 でその他は O157:H-）であった。本研究では HUS 発症数の最も高い O157:H7 株に焦点を絞り、米国の研究者らが中心となって開発した 96 遺伝子座の一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）解析法を用いて、米国で 2006 年に集団発生が報告され、高病原性と考えられる一群の株（clade8）と同様な遺伝系統株の国内株および輸入例と考えられる事例由来株における分布を解析すること

を目的とした。

B. 研究方法

1) 1999-2003年、および2009年に分離された EHEC O157:H7 株の SNP 解析法

米国で 2006 年に発生した、ほうれん草の喫食に関連した EHEC O157:H7 による集団発生事例では、HUS の発症率がこれまでの集団発生事例と比較して高いことから、原因となった菌株の病原性が高い（高病原性株）と予想されている。EHEC O157:H7 は菌株間の相同性が高いため、他の細菌種で行われている通常の MLST (multi locus sequencing typing) による型別が不能である。最近になって、96 loci における一塩基多型法（参考文献：PNAS 105: 4868-4873, 2008）によって O157:H7 株が型別可能であることが示された。このうち、いくつかの遺伝系統グループ (clade 1, 2, 3, 8) については一遺伝子の SNP 解析（合計 4 遺伝子座の SNP 解析）によって簡便に型別が可能であることも明らかとなった (J.C.M 46: 2070-2073, 2008)。本研究ではこの手法を用いて、国内の HUS 患者由来および無症状保菌者由来の O157:H7 株について解析を行った。昨年度は 2004-2008 年の株を解析したが、今年度はさらに 1999 年までさかのぼり、1999 年-2008 年の間で総計 272 株の HUS 株について解析した。これらとほぼ同数の無症状保菌者由来株 (264 株) について同様な解析を行った。無症状保菌者由来の O157:H7 株はすべて散発事例由来の株で、調理従事者や食品製造・管理業従事者の定期検便由来の株を多数含む。さらに、2009 年に単離された株についても HUS 患者由来株と無症状保菌者由来株について同様

な解析を行った。

2) DNA の単離精製, PCR, DNA シークエンス：定法に従って行った。

3) LEE にコードされる分泌性蛋白質 (EspB, EspA, EspP) の定量

6 ml の DMEM 培地に 0.5% の glycerol を加えた培地で各菌株を液体培養し、培養上清を遠心分離後フィルター滅菌し、上清中の蛋白質を最終濃度 10% のトリクロロ酢酸溶液で沈殿させる。トリス飽和 SDS-PAGE loading buffer で懸濁後 SDS-PAGE で蛋白質のバンドを分離し、クマジー染色でバンドを可視化する。分泌性蛋白質のバンド (EspP, EspB, EspA, EspD) をデンシトメーターでスキャンして数値化することで発現量を定量化した。

C. 研究結果

(1) clade 1 の分布解析

1999 年から 2003 年までに国内で単離された HUS 患者由来株 (98 株) と無症状保菌者由来株 (99 株) について clade 1, 2, 3, 8 の解析を行った。HUS 患者由来株では clade 1 (6.2%), clade 2 (27.5%), clade 3 (24.5%) および clade 8 (17.3%) とその他の clade (24.5%) に分離された。一方、無症状保菌者由来株では、clade 1 (1.0%), clade 2 (12.1%), clade 3 (18.2%) および clade 8 (5.1%) とその他の clade (63.6%) に分離された。1996 年に大阪府堺市で発生した集団発生に由来する株 (Sakai 株) は clade 1 に属する。昨年度の解析から、2004-2008 年に分離された O157 株では HUS 患者由来株においても無症状保菌者由来株においても clade 1 の割合は低かったが、上記の通り、1999-2003 年の間では、clade 1 は無症状保菌者由来株と比較し

て、HUS 患者由来株において有意に多く存在することが明らかとなった。

(2) clade 8 の分布解析

米国で 2006 年に単離された、ほうれん草アウトブレイク由来株は clade 8 に属する。1999 年-2003 年においても clade 8 は、無症状保菌者由来株と比較して HUS 患者由来株で有意に多く存在することが明らかとなった。1999 年から 2008 年までの結果をまとめると、表 1 上の通りとなり、HUS 株で有意に clade 8 が多く存在することがわかる。

2009 年に HUS 患者から単離された 36 株の O157:H7 のうち、19.4%にあたる 7 株が clade 8 であることが明らかとなった。一方、同じく 2009 年に分離された 40 株の無症状保菌者由来株には clade 8 は存在しなかった(表 1 上)。

(3) アジア各国における邦人の EHEC O157:H7 感染事例由来株

2004 年-2009 年の間にアジア各国への海外渡航によって O157:H7 に感染したと推定される事例のうち、渡航先ごとに、中国(7株)、韓国(7株)、インドネシア(1株)となっており、その他、トルコ(5株)が報告されている。これらの O157:H7 株について同様に clade 解析を行ったが、いずれの株も clade 8 株ではないことが明らかとなった(表 1 下)。邦人のアジア各国への渡航における O157:H7 感染事例は、実際にはこれより多いことが予想されることから、今後の clade 8 の動向が注目される。

(4) in vivo における志賀毒素 2 型の発現量について

EHEC の最も重要な病原性因子は志賀毒

素(Stx1 および Stx2)で、Stx2 が患者の重症化により密接に関与していると考えられている。in vivo における Stx2 の産生量は一酸化窒素(NO)によって負に制御されることが明らかとなっている(参考文献:PNAS 104: 10199-10204, 2007)。大腸菌が産生する NO 不活化酵素の一つをコードする *norV* 遺伝子は、clade 8 のゲノム解読株では保存されている一方で clade 1 および clade 3 に属するそれぞれのゲノム解読株(Sakai 株および EDL933 株)では遺伝子内部に欠失が見られる(参考文献:Infect. Immun. 77: 3713-3721, 2009.)。そこで、clade 1, clade 2, clade 3 および clade 8 について *norV* 内部の欠失を特異的な PCR で解析したところ、clade 1, 2, 3 のほぼ全ては *norV* 内部に欠失が見られる一方、すべての clade 8 は少なくとも clade 1, 2, 3 で見られるような欠失はないものと考えられた。

(5) LEE 発現レベルの解析

表 3 の通り、clade 8 以外の clade における EspB 分泌量(17 株の平均)に対する clade 8 の EspB 分泌量(18 株の結果の平均)は 1.51 倍となっていた。同様な解析から、EspA は 1.55 倍、EspP は 1.52 倍 clade 8 でそれぞれ発現が上昇していることが明らかとなった。これらの解析結果を T 検定で統計処理すると、EspB, EspA および EspP すべてで統計学的に有意となることから、clade 8 は LEE の発現レベルが他の clade と比較して有意に高いことが示唆された。

D. 考察

本研究から、日本国内においても高病原性(clade 8)と考えられている EHEC O157:H7