

- (10) Saito-Nakano Y., Tanabe K.,  
Kamei K, Iwagami M,  
Komaki-Yasuda K, Kawazu S, Kano  
S, Ohmae H., Endo T. Genetic  
evidence for *Plasmodium*  
*falciparum* resistance to  
chloroquine and pyrimethamine  
in Indochina and the Western  
Pacific between 1984 and 1998.  
*Am J Trop Med Hyg.* 79: 613-619,  
(2008)
- (11) Lim, C.K., Nishibori, T.,  
Watanabe, K., Ito, M., Kotaki,  
A., Tanaka, K., Kurane, I.,  
Takasaki, T. Chikungunya virus  
isolated from a returnee to  
Japan from Sri Lanka: Isolation  
of two sub-strains with  
different characteristics. *Am*  
*J. Trop. Med. Hyg.*,  
81 (5) :865-868 (2009).

表 1. H22 年度 アジアネット 海外委託費一覧

細菌 (渡辺グループ)

国	Title of research	
1 China CDC	Molecular Analysis of <i>Shigella flexneri</i> 4C emerged in China.	J-G. Xu
2 インド NICE	Genotyping of <i>Vibrio cholerae</i> O1, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>campylobacters</i> .	B. B. Nair
3 バングラデシュ ICDDR	Construction of laboratory net work on the characterization of bacterial enteric pathogens prevalent in Asia and Pan-pacific area (Bangladesh)	A. Cravioto.
4 バングラデシュ ICDDR	Phenotypic and Molecular Characterization of <i>Vibrio cholera</i> Causing Epidemics, 1991, and Subsequent Endemic Cholera in Latin America	M. Alam
5 韓国 NIH	Application of Multilocus variable tandem-repeat analysis for typing of <i>Shigella</i> spp.	B. K. Lee
6 タイ NIH	Molecular epidemiology of non-ESBL and ESBL-producing <i>Shigella sonnei</i> strains in Thailand during year 2007-2008.	O. A. Ratchtrachentrai
7 香港公衆衛生研究所	Organization of PFGE Working for Training and Technology transfer for Asia Pacific countries / areas in February 2009.	K. Man Kam
8 マレーシア医学研究所	Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> Typhi and Paratyphi: An Inter-country Collaborative Study (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	Thong Kwai-Lin
9 ベトナム, N I H E	Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (I) : Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of <i>Salmonella</i> Typhi and Paratyphi AP. D. Cam (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	AP. D. Cam

10	ニュージーランド環境科学研究所	Validation of new <u>Listeria PFGE</u> protocol and analysis of <u>recalcitrant isolates</u> .	<u>B. J. Gilpin</u>
11	CDC台湾	Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (I): Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of <u>Salmonella Typhi</u> and <u>Paratyphi A</u> (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	<u>C-S Chiou</u>
12	ASEAN	Development of Laboratory Based Surveillance and Strengthening Regional Laboratory Networking among the ASEAN Plus Three Countries, under the ASEAN Plus Three Emerging infectious Diseases Programme.	<u>Dhannan Sunoto</u>

ウイルス (倉根グループ)

1	台湾CDC	Characterization of dengue viruses prevalent in Taiwan for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia.	<u>J-h Huang</u>
2	インドネシア大	Characterization of dengue viruses prevalent in Indonesia for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia.	<u>M Sudiro</u>
3	中国CDC	Characterization of Japanese encephalitis virus prevalent in China for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of Japanese encephalitis and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia.	<u>Guo-Dong Liang</u>
4	タイNIH	Characterization of dengue viruses prevalent in Thailand for establishment of the laboratory network for molecular epidemiology of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia.	<u>Anantapreecha</u>

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	Construction of laboratory network on the development and standardization of Rabies diagnostic methods and the molecular epidemiology.	Beatriz P. Quiambao
2	ベトナム NHE	Development, application of new methods for rabies diagnosis and study on rabies molecular epidemiology and on the routes of rabies transmission in 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	フィリピン熱帯医学研究所	Re-assessment of the epidemiology of malaria using molecular approaches in Palawan, Philippines	R M Olveda ( J Luchavez )
2	中国 CDC	Molecular analysis of chloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Hainan and Yunnan Province, China.	Tang Linpha
3	タイ	Screening of transmission blocking efficacy of antibodies produced against Plasmodium vivax and P. falciparum vaccine candidates.	J Prachumsri
4	カンボジア	Strengthening and integrating of Malaria control activities in newly developed areas in Kampot Province, Southern Cambodia.	D Socheart

その他 (課報センター谷口)

1	ベトナム NIHE	Circulation of Influenza and Influenza like illness in Cam Giang district, Hai Duong province, 2008-2009.	Tham Chi Dung
---	-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------

## アジア各国の感染症研究機関との連携；

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、迅速抗原検出法「DRIT 法（a direct, rapid immunohistochemical test）」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樣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 2009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、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、6ヶ所以上の都道府県で分離されたEHEC 0157には、異なる7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。7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、1)疫学的関連がある株のみならず、散发事例由来株が主である広域分離株においても、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、MLVAを用いて腸管出血性大腸菌0157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

2009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 種類の 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ピ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

2009 年に分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 O157、1718 株のうち、XbaI と BlnI による PFGE パターンが一致し 6 箇所以上の都道府県から分離されている、Type No. (TN) c293, c47, c57, d654, d92, e241, e99 のパターンを示す株について（図 1）調べた。2009 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 42 種類のパターンが見られたが、6 箇所以上の都道府県から分離されているパターンには 7 種類が見いだされた。これらの 7 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 1～3 及び図 3）。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 6～10 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ピート数の異なるものまでであった（表 1～3）。ステーキハウスのチェーン店で発生した O157 の事例では、44 株中 43 株が 8 月または 9 月に分離されており、31 株は TN c241 を示した（表 1）。XbaI-BlnI の PFGE では 7 種類、MLVA では 9 種類に型別された。MLVA では、33 株が同一タイプを示し、10 株は 1 遺伝子座において 1 だけリピート数が異なる変異株（Single Locus Variant; SLV1）、2 リピート数が異なる（SLV2）或いはそれ以上（SLV）であり、8 遺伝子座でリピート数が異なる株が 1 株あった（表 1）。ステーキチェーンは全国展開しており、患者は各地に及んだが、1 店舗から 1 名の菌陽性者が出る場合が多かった（図 2）。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 16 株は、広域から分離されていたが、全ての遺伝子座で同一リピート数を示し 2008 年分離株と同一タイプ（MLVA type A）は 1 株のみであり、大部分の株は 1 遺伝子座でリピート数が異なる株であった（表 2）。同様に、2007 年から毎年広域から分離が続いている、c47, c57 を示す株についても、前年と同じ MLVA タイプを示す株はそれぞれ 1 株ずつしか分離されず、多様な MLVA タイプを示す株がこれらの PFGE タイプを形成していた（表 3、4）。一方、2009 年に初めて広域分離株として出現し

てきた、d654 を示す株は、7月～10月の期間で分離され、総数8株のうち同一MLVAタイプが3株、1遺伝子座での変異株が2株、残りは大部分の遺伝子座でリピート数が異なる株であった(表5)。また、2009年に分離されたPFGEタイプの異なる0157を約100株と図1に示される7種類の広域分離株のMLVAの結果をMinimum spanning treeで表現すると、ステーキハウス事例に由来する株は、ほとんど均質な集団を形成していた(図3)。c47, c57, d654, d92, e99株が近縁な株として集合体を形成している一方で、c293株は、異なったグループを含めて集団を形成していることが示唆された。

#### D. 考察

2009年に広域から分離された7種類のTNを示すEHEC 0157のうち4種類のTN(c293, c47, c57, d92)は、2年間(c293, c57, d92)または3年間(c47)連続的に分離されている株であった。これらの長期間に分離された株については、MLVAタイプにおいても多様性があり、同一PFGEパターンを示しても時間の経過とともに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発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。一方、疫学的な関連が強いと考えられるステーキハウス関連事例由来株では、大部分の株が同一MLVAを示したものの、いままでの報告と同様、1遺伝子座においてリピート数の異なる変異株が存在した。したがって、一つの遺伝子座における変異株の存在は、同一汚染源による集団発生においても検出さ

れる可能性が高いと考えられる。これら株は共通の感染源に由来することが推定されるが、PFGE及びMLVAの結果からも遺伝学的な近似度が極めて高い株の集団であることが示唆された。

広域分離株で同一PFGEパターンを示しているとはいえ、c293を示す株では、MLVAの結果から多様性が明らかになっており、これらの株の9つの遺伝子座におけるリピート数の多様性をステーキハウス関連株と比較すると、c293を示す株においてはそれぞれの遺伝子座におけるリピート数の変異が非常に高く、PFGEパターンの異なる株を含めた全体の多様性にはおよばないものの、関連株と考えられるステーキハウス事例由来株よりは多様性を持つ集団であることが明らかとなった(図4)。約6カ月に及んで分離されていたc293株では、複数の感染源が存在し、それぞれに共通のMLVAタイプを示す株が分離されていた可能性が高い。MLVAの解析により、同一PFGEタイプのEHEC 0157においても、特異的な感染源を持つ複数の事例が存在していることが推測されるが、その疫学的な関連性をつなぐことは非常に難しい課題となっている。

#### E. 結論

広域集団発生事例由来株であるEHEC 0157に比べると、同一PFGEパターンを示していても遺伝学的関連性がそれほど高くない広域散発事例由来株が存在していた。

#### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol.* 2010, 54, 569-577.

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、大西 真 腸管出血性大腸菌の分子疫学と広域ネットワーク 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、2010

2) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、大西 真 最近の腸管出血

性大腸菌感染症の動向について、第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、宮崎市、2010

3) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡辺治雄 Molecular epidemiological investigation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan; Perspectives and problems. 腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学研究の現状と課題、第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

図 1

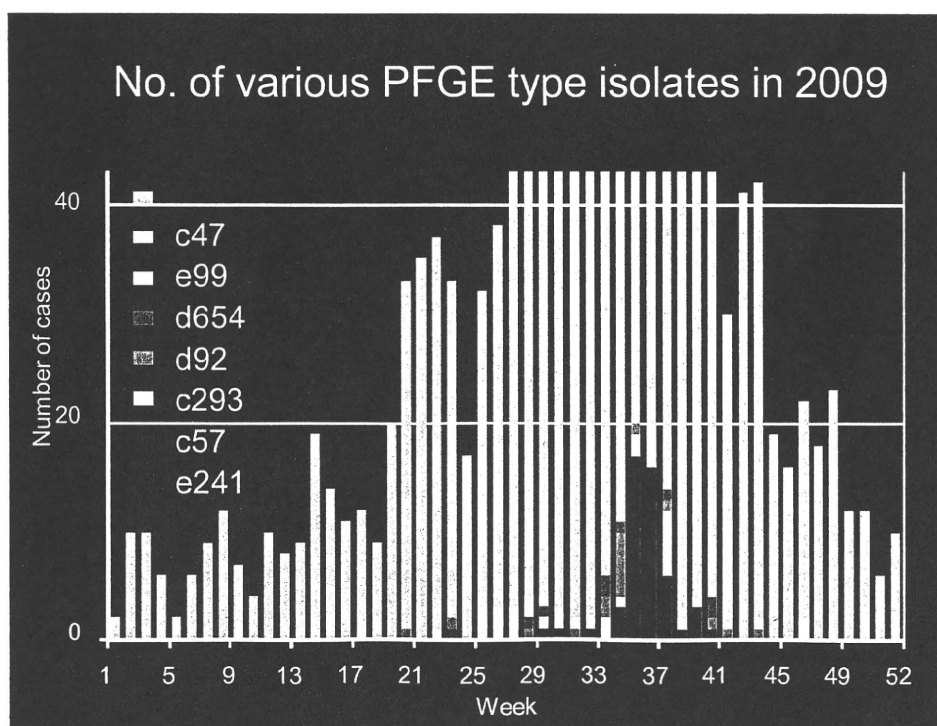


表 1

VNTR loci									Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA	
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e241	A	A	28
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e241	B	A	1
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e239	A	A	1
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e245	A	A	1
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e240	C	A	1
2	12	9	17	9	6	9	7	59	e245	C	A	1 33
2	12	9	18	9	6	9	7	59	e241	A	B	1
2	12	9	17	9	6	9	7	60	e241	A	E SLV 1	1 2
2	12	9	15	9	6	9	7	59	e241	A	D	1
2	12	9	17	9	6	9	7	61	e241	A	F SLV2	4 5
2	12	9	8	9	6	9	7	59	e241	A	C	1
2	12	9	17	9	6	9	7	50	e241	A	G SLV	1
2	12	9	17	9	6	9	7	45	e241	A	H	1 3
5	10	9	12	7	4	5	9	28	e238	D	I Others	1 1

図 2

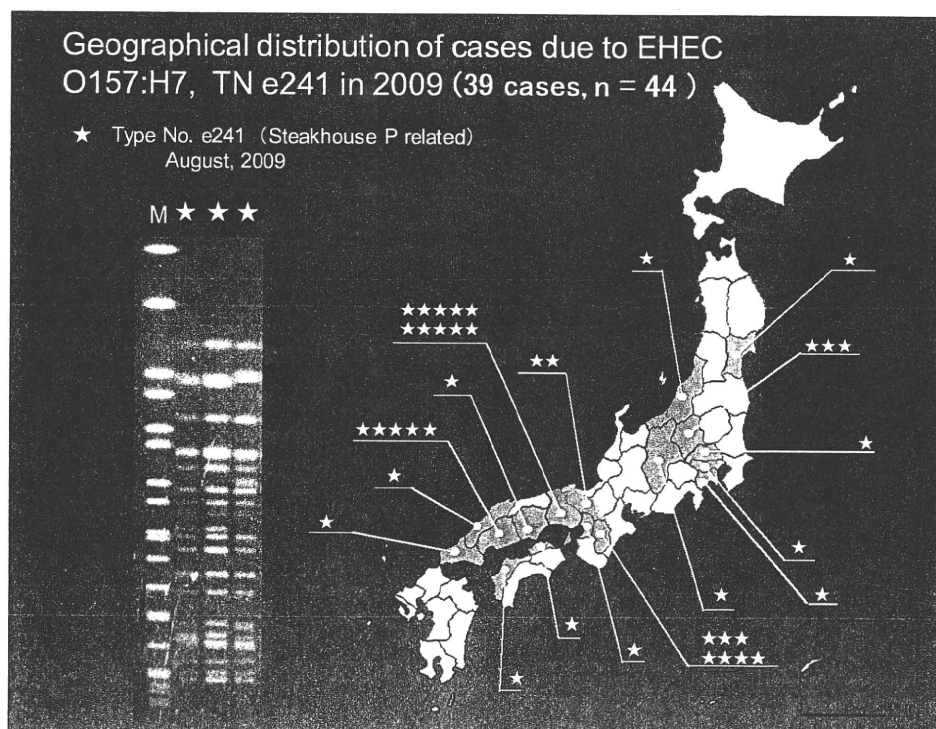


表 2

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	1
5	12	10	9	6	6	9	7	29	d92	05BL019	N SLV1	1
5	12	10	10	6	6	9	7	30	d92	05BL019	O SLV1	2
5	12	10	10	6	6	9	7	30	d92	09BL001	P SLV1	1
5	12	10	11	6	6	9	7	30	d92	05BL019	Q SLV1	1
5	12	10	9	6	6	9	7	32	d92	05BL019	F SLV2	5
5	12	10	9	6	6	9	7	32	d92	09BL031	F SLV2	1
5	12	10	9	6	6	9	7	33	d92	05BL019	G SLV3	1
5	17	10	9	6	4	9	7	25	d92	05BL019	R	1
4	12	10	9	6	6	9	7	31	d92	05BL019	S Others	1
5	9	10	18	6	6	10	7	22	d92	05BL019	T	1

表 3

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	1
5	16	7	16	3	7	5	7	4	c47	07BL001	E SLV1	4
5	16	7	16	3	8	5	7	4	c47	07BL001	V	1
5	17	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	W Others	1
5	18	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	S	1
5	19	7	15	3	7	5	7	5	c47	07BL001	X	1

表 4

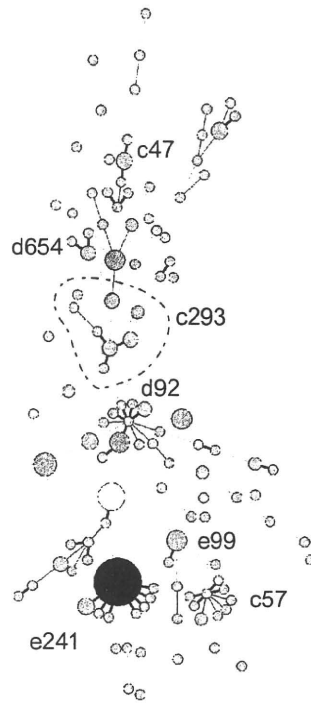
VNTR loci									Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA	
4	18	7	10	6	8	0	11	32	c57	07BL041	A	1
4	18	7	10	6	8	0	11	34	c57	07BL041	E SL	1
4	18	7	10	6	8	0	11	36	c57	07BL041	R SL	1
4	18	7	10	6	8	0	11	19	c57	07BL041	S SL	1
4	18	7	10	6	8	0	11	35	c57	07BL041	D SL	1
4	19	7	10	6	8	0	10	32	c57	07BL041	T	1
4	19	7	10	6	8	0	11	38	c57	07BL041	U	1
4	21	7	10	6	8	0	11	29	c57	nt	V Others	1
4	21	7	10	6	8	0	11	29	c57	07BL041	W	1
4	18	7	10	7	8	0	11	33	c57	07BL041	X	1

表 5

VNTR loci									Subtype			No. of isolate
25	3	34	9	17	19	36	37	10	XbaI	BlnI	MLVA	
5	9	9	15	7	4	7	9	38	d654	09BL011	A	1
5	9	9	15	7	4	7	9	38	d654	09BL012	A	1
5	9	9	15	7	4	7	9	38	d654	09BL013	A	1
5	9	9	15	7	4	7	9	39	d654	09BL012	B SLV1	1
5	9	9	15	7	4	7	9	40	d654	09BL012	C SLV2	1
5	10	9	11	8	4	9	7	23	d654	09BL014	D	1
5	10	9	11	8	4	9	7	25	d654	09BL014	E Others	1
5	12	10	9	6	6	10	6	31	d654	09BL015	F	1

☒ 3

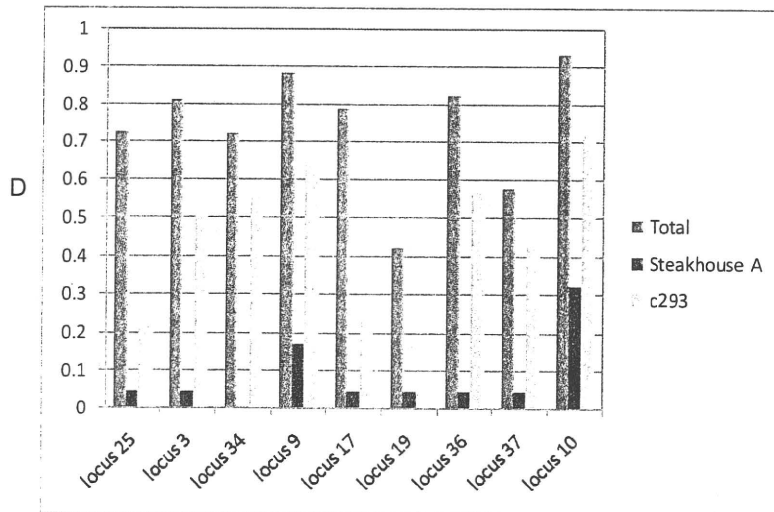
Minimum spanning tree of EHEC O157 isolates based on MLVA data, 2009 (n=220)



☒ 4

Diversity value for nine polymorphic VNTR loci of O157 isolates, n = 220, 2009

$$D = 1 - \sum(\text{allele frequency})^2$$



厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）

平成 22 年度 分担研究報告書

研究課題名：「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」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

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。昨年度までに *Shigella sonnei* および *S. flexneri* について MLVA の有用性を検討してきた。本年度は、*Shigella sonnei* について台湾 CDC とのデータ交換を行うことで二国間での validation について検討した。

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、一昨年度 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* については 4 割を占める(表 1)。

【inter-laboratory validation】

*S. sonnei* の MLVA に関しては台湾 CDC が最初にシステムを構築したこともあり、国際的なハーモナイゼーションに向けて主導的な位置にある。今年度は台湾 CDC 主催のもと、国際的なラボ間のデータ整合性を検討することとなった。

手順としては、はじめに台湾 CDC から 30 株の試験菌株、蛍光プライマーのセット (8 遺伝子座で 2 本) が供与された(図 1 参照)。供試菌株から DNA を抽出、当研究所の試薬お

よびシークエンサーを使用してPCRおよび電気泳動を行った。得られた各産物の大きさ、並びに推定されるリピート数を報告して台湾 CDC により評価が行われた。

最終的な結果を表 2 に示す。30 株中 29 株においては台湾 CDC と日本 NIID の結果は一致した。また、結果が異なった株についても違いは 1 遺伝子座のみであった。従って、整合性の確認された遺伝子座は 239/240 であった。

#### 【二国間データベースの照合】

2010 年 10 月に我が国では *S. sonnei* の広域事例が発生した。本事例に関する感染源は特定できなかった。そこで、台湾 CDC の保有するデータベースにおいて本事例の MLVA 型が存在するか照合した。比較可能な 7 遺伝子座中 4 遺伝子座が一致したものがあったが、本事例との関連性が疑われるものではなかった。

#### D. 考察

本年度実施した台湾 CDC との共同研究は MLVA が国際ラボの間で整合性をとることが可能であることを示した。これまで有用性が確認されていた遺伝子座と今回 validation で使用した遺伝子座が、数としては 8 と変わらないが、場所が 1 箇所変更されていた (図 1)。このため、我が国におけるデータベースと共通性が保たれているのは 7 遺伝子座である。しかしながら、他の遺伝子座については分解能が劣ることがわかっており、実用的には 7 遺伝子座で問題ないと考えられる。

#### E. 結論

*S. sonnei* の MLVA に関して台湾 CDC との国際的なラボ間の整合性をとることに成功した。今後、他国との整合性を広めると共に、国内発生例と海外のデータベースの比較が可能となることで、その原因究明に寄与することが期待される。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし



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	2008
<i>Shigella dysenteriae</i>	4	2	2	2	3	1	3	1	1
<i>Shigella flexneri</i>	45	40	66	21	40	33	34	17	36
<i>Shigella boydii</i>	4	2	3	8	2	3	1	1	11
<i>Shigella sonnei</i>	205	225	186	79	101	66	91	165	103
計	258	269	257	110	146	103	129	184	151

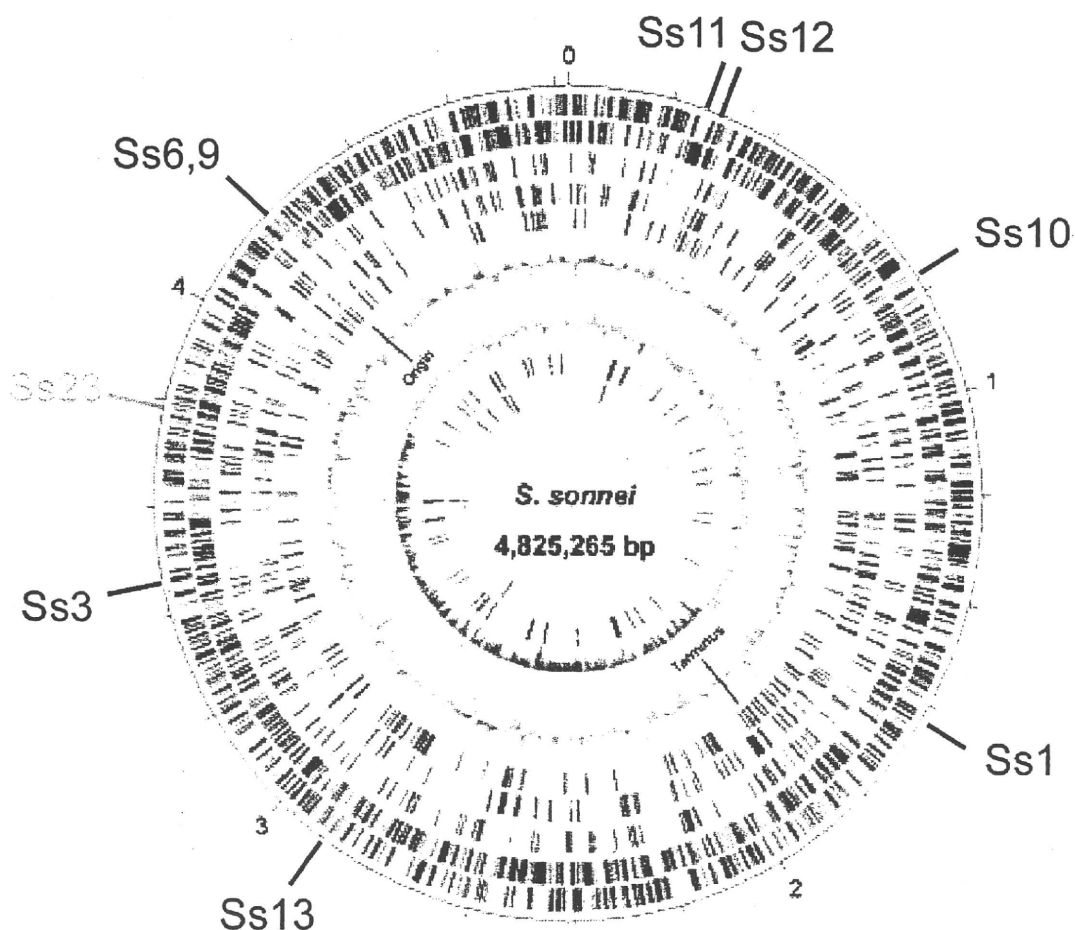


図 1. 台湾 CDC との validation に使用された遺伝子座。

Ss12 は今回の validation にて初めて使用。

Ss1, 3, 6, 9, 10, 11, 13 は日本と共通で使用されている。

表 2. 台湾 CDC との validation における供試菌株の MLVA の結果

	SS1	SS3	SS6	SS9	SS10	SS11	SS12	SS13
04-901-748065	6	14	6	7	4	4	2	5
89e1015	2	20	20	7	8	6	2	3
89e1237	2	21	20	7	8	6	2	3
c04.1101	12	29	17	7	3	4	2	3
c05.1923	1	15	25	8	6	5	3	2
c05.2119	7	21	10	10	2	4	2	4
c07.0755	15	17	24	9	3	4	2	3
c07.0894	16	17	24	9	3	4	2	3
c07.4098	15	17	31	9	3	4	2	3
n04.829	6	18	16	7	3	4	2	3
n05.0011	1	17	2	7	5	4	3	2
n05.0012	10	11	15	8	4	4	2	5
s05.2456	11	22	12	9	2	4	2	5
sh07150	1	13	18	11	5	7	4	2
sh09727	1	10	9	12	5	6	3	2
sh10288	1	11	2	11	5	4	5	2
sh12324	8	19	6	8	3	4	2	3
sh15371	1	16	6	9	5	8	3	2
sh22703	1	14	23	9	6	5	3	2
sh22738	1	16	2	18	5	4	5	2
sh23679	2	23	20	7	8	6	2	3
sh23752	2	23	19	7	8	6	2	3
sh24464	9	15	17	7	3	5	2	3
sh25405	2	21	20	7	8	7	2	3
sh25550*	2	25	2*	7	8	6	2	3
sh26364	2	26	21	7	8	6	2	3
sh26840	2	26	19	7	8	6	2	3
sh27192	2	22	19	8	8	6	2	3
sh30284	1	21	17	9	6	7	3	2
sh7156	1	13	17	11	5	7	4	2

(\*、台湾 CDC と異なっていた箇所;台湾 CDC では 13)

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成22年度 分担研究報告書

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）

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 2010 年の分離株でも同様に見られることが確認された。今年度はこれら高病原性と考えられる株を特異的に検出可能なコンベンショナル PCR 系を確立した。

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（または O103）に分類される。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。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コンベンショナルな MLST（multi locus sequencing typing）による系統解析が不能である。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（クレード 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）。本研究ではこれらの情報を基に、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。さらに、国外からの輸入感染事例由来と考えられる株における分布についても解析することを目的とした。今年度は特に、クレード 8 を検出可能なコンベンショナル PCR 法を開発することを今年度の目的とした。

## B. 研究方法

### 1) clade 8 を検出可能なコンベンショナル PCR 法の確立

クレード 8 を特異的に検出するとされる RT-PCR 系 (J.C.M 46: 2070-2073, 2008) を評価したところ、クレード 8 に対する特異性が極めて低いことが判明した (クレード 8 に特異的とされるプライマーを用いた場合、その他のクレードの PCR 産物が得られてしまう)。そこで、クレード 8 を特異的に検出可能なコンベンショナル PCR 系を確立する目的で、MAMA (mismatch amplification mutation assay)-PCR 系の構築を行った (結果の項参照)。

### 2) 2010 年に分離された EHEC O157:H7 株の SNP 解析

2010 年に分離された HUS 患者由来株 (34 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 (35 株) についても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。その他、アジア諸国から輸入されたと考えられる事例についてクレード 8 の分布解析も行った。

3) DNA の単離精製, PCR, DNA シークエンス等は定法に従って行った。

## C. 研究結果

### (1) クレード 8 を検出可能な MAMA-PCR 系の構築

クレード 8 を特徴づける SNP は ORF 番号 ECs2357 の 539 番目の塩基が A (クレード 8 以外では C) である。J.C.M 46: 2070-2073, 2008 のプライマーではこの SNP 部分がプライマーの 3' 端に来るようにデザインしていたが、我々はこの部分が 3' 末端より 2 塩基目に来るようにデザインした (資料 1 参照)。

さらに、J.C.M 46: 2070-2073, 2008 でもデザインされていたように、5' 端と 3' 端が相補的になるような配列にしたところ、アニーリング温度を 65°C まで上昇させることに成功した。その結果、特異性の優れた PCR 系を構築することが可能となった (資料 4)。作製したプライマーおよび PCR 反応の情報と鋳型コントロール DNA を地方衛生研究所のいくつか (大阪府、富山県、福岡県、福岡市、北九州市、熊本県、宮崎県、大分県、山口県) に配布し、評価を行ったところ、すべての地研で良好な再現性が得られたことが確認された。現在、これらの地研において感染研で未解析となっている株を中心にクレード 8 の解析を行ってもらっている。

### (2) MAMA-PCR 系を用いたクレード 8 の分布解析

2010 年に HUS 患者から単離された 34 株の O157:H7 のうち、11.8%にあたる 4 株が clade 8 であることが明らかとなった。一方、同じく 2010 年に分離された 35 株の無症状保菌者由来株のうち、4 株がクレード 8 であることが明らかとなった (資料 2)。この結果