

ニュージーランド環境科学研究所	Validation of new Listeria PFGE protocol and analysis of recalcitrant isolates.	B. J. Gilpin
CDC台湾	Inter-country Study on Infectious Bacterial Pathogens (I): Distribution of Genotypes and Antimicrobial Resistance of Salmonella Typhi and Paratyphi AC-S Chiou (Malaysia, Taiwan and Vietnam)	
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.	Dhannan Sunoto

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.	J-h Huang
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.	M Sudiro
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.	Guo-Dong Liang
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.	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	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 NIHE	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 (諜報センター谷口)

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
---	-----------	---	---------------

プロジェクト 1 : 細菌

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 20～22 年度 総合分担研究報告書

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 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、わが国では年間の感染者報告数が 4 千名前後あり、そのうち血清群 0157 の分離は 7 割前後ある。アジア諸国においてはまだそれほど EHEC 感染症は多くないが、わが国で EHEC 感染症は 3 類感染症に規定される重要な疾患である。本研究では、わが国で 2007～2009 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、6～11 都道府県で分離された EHEC 0157 には、異なる 5～7 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。単一年のみに分離されるパターンの他、2 年間にわたって分離されるパターン (Type No. (TN) c57, c293, d92) 或いは 3 年間にわたって分離されるパターン (TN c47) が存在した。これらの広域分離株についてさらに 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。特に 2 年から 3 年にわたって分離が続いているパターンを示す株では、時間経過とともに、MLVA による多様性が増加する傾向が見られた。以上の結果から、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おり、これらの散发事例由来株が “Unrecognized outbreak” を形成している可能性があること、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り、これらの株では複数の感染源・汚染源が存在する可能性があることが示唆された。

A. 研究目的	Electrophoresis (PFGE) 法が汎用されている。
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	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

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

2007～2009 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。PFGE 及び MLVA の結果は BioNumerics (Applied Maths 社) を用いて解析を行った。

C. 研究結果

2007～2009 年に分離されたヒト由来腸管出血性大腸菌 0157、5597 株のうち、XbaI と BlnI による PFGE パターンが一致し 6～11 箇所以上の都道府県から分離されている、Type No. (TN) a259, a829, b142, b293, b705, c293, c47, c57, d148, d92, d654, e241, e99 のパターンを示す株について MLVA を実施した。

TN a259 を示す株は 2006 年の広域流行株のパターンであるが、MLVA で比較すると、2007 年分離株のほとんどは 2006 年分離株の主となるタイプとは 2 loci で 1 repeat 数異なっていた。TN a829 のパターンも 2006 年の広域流行株が示すパターンであるが、2007 年分離の TN a829 株では、9 loci すべてにおいて 2006 年分離株とは 1～10 repeat 数の変異が見つかり、まったく同一の MLVA タイプを示す 2007 年分離株はわずか 3 株であった。家族内事例などの同一事例では同一 MLVA タイプを示すものの、2007 年分離株においても互いに異なる MLVA タイプを示す株がほとんどであった。TN b142 を示す株では、基準パターンと同一のパターンが多かったが、repeat 数が 1～2 異なる、single locus variant (SLV) あるいは 2 loci 以上において repeat 数が 1～2 異なる変異株も多く見られた。TN b142 の株は、4 月から 11 月の 7 ヶ月にわたって主として北陸地方から分離されていた。さらにこれらの株について、クラスター解析

による近似度を調べると、分離時期あるいは分離地域によるクラスターを形成し、62株が18のクラスターに分かれた。また、Minimum spanning treeを描くとこれらの株は互いに1 locus あるいは2 loci において1 repeat 数程度の違いを示す3つのグループとそれ以外に分かれた。TN b293を示す株では、BlnI によるPFGEパターンが異なる株が多かったが、MLVAによっても3 loci で違いがみられ、特に locus 10ではrepeat数の変化が20以上に及んでいた。TN b705を示す株では同一MLVAタイプの株が多く、変異株においても locus 10におけるSLVでrepeat数が1異なるものがほとんどであった。

2008年において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ピート数が一致し、SLV1は6株、その他に複数の遺伝子座においてリピート数の異なる株が6株存在していた。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、全ての遺伝子座で同一リピ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。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においてリピート数が1~14異なるタイプが14株あった。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。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。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。

2009年にステーキハウスのチェーン店で発生した0157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。MLVAでは、33株が同一タイプを示し、10株はSLV1、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。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。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。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。

また、2009年に分離されたPFGEタイプの異なる0157を約100株と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がほとんど均質な集団を形成している。他は、近縁な株で集合体を形成している、c47, c57, d654, d92, e99株と異なったグループを含めて集団が形成されている、c293株が存在していることが示唆された。

D. 考察

広域から分離されるEHEC 0157において、2007～2009年の間に初めて検出されるPFGEパターンを示す株では、MLVAによる解析結果でも遺伝学的均質性の高い株を含む集団であることが明らかになった。これらの株における変異の度合いは、集団発生事例に由来する株における変異の範囲に収まっており、今回解析した株が共通感染源に由来する可能性を強く示唆する結果と考えられた。2009年のステーキハウス関連株や2008年に分離されたTN d148を示す株では、分離時期が集中しているだけでなく、MLVAにおいてもそのほとんどの株が同一タイプとなった。したがって、広域から分離される散发事例由来株が“Unrecognized outbreak”を形成している可能性があることが強く示唆されるものと考えられるが、多くの場合疫学的な関連性を示す情報は得られていない。

一方、TN c57, c293, d92を示す株のように、2年間、あるいはc47のように、3年間にわたって広域からの分離が続く株につい

ては、MLVAの結果でも時間の経過とともに変異の度合いが進行していることが示されたことから、複数年にわたって分離されている同一PFGEパターンを示す0157においても、遺伝子型の異なる株が存在していることが明らかになった。MLVAの変異型を示す株においても、時間的、地域的な集積が見られるタイプの株では、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と考えられた。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

少なくとも数か所の都道府県を含む、広域から分離された同一PFGEパターンを示すEHEC 0157においても、MLVAの結果から、1) 非常に近縁度が高く短期に分離されている株と、2) 多様性が比較的高く、複数年にわたって分離が続く株が存在し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) Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, Islam MA, Cheung DT, Chu YW, Ramamurthy T, Pazhzni GP, Bhattacharya SK, Watanabe H, Terajima J, Arakawa E, Ratchranchai OA, Huttayananont S,

Ribot EM, Gerner-Smidt P, Swaminathan B; for the *Vibrio parahaemolyticus* PulseNet PFGE Protocol Work Group. Evaluation and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an International Multicenter Collaborative Study. *J Clin Microbiol.* 2008 Aug. 46 (8):2766-2773.

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 寺嶋 淳；近年の腸管出血性大腸菌感染症の発生状況。日本獣医公衆衛生学会シンポジウム「腸管出血性大腸菌による感染症の実態と対策」平成20年度日本獣医師会学会年次大会 2009年1月、盛岡

8) 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、渡辺治雄；分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制：パルスネットについて 第26回獣医疫学会学術集会、2008年11月、東京

9) Jun Terajima: Molecular epidemiological analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 isolates in Japan. National Agriculture

and Food Research Organization International Symposium on Food Safety 2008, Oct. 2008, Tsukuba, Ibaragi

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究事業）

平成 20～22 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。細菌性赤痢は輸入例によるところが多いが、渡航歴のない国内事例も頻繁に報告される。近年、新たな疫学解析の手法として注目されている Multiple Locus Variable-number-tandem-repeat Analysis (MLVA) に関して赤痢菌の疫学解析への有用性を検討し、さらには他国とのラボ間での validation を行った。

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。蛍光プライマーおよびプライマーは国内メーカーの調製品である。台湾 CDC との validation においては台湾 CDC から供与された蛍光プライマーおよびプライマーセットを使用した。

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。

細菌性赤痢の原因である赤痢菌には *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* および *S. sonnei* が含まれ、我が国では *S. flexneri* および *S. sonnei* が主たる起因菌である。また細菌性赤痢の多くは海外渡航者による輸入例である (表 1)。

【*S. sonnei* MLVA の検討】

S. sonnei に関して MLVA 法に関する報告が台湾 CDC から 2007 年になされ、そこでは 26 遺伝子座が利用されている。本研究ではまず、分解能の高い 8 遺伝子座を選択して、輸入例を中心とした *S. sonnei* 約 300 株を用いて当該方法の評価を行った。

各遺伝子座において観察されたアレル数は3-28であり、Diversity Index (D値)は0.41-0.94であった。全遺伝子座をまとめたD値は0.993と非常に高いものであった。

近年の赤痢菌による大きな集団事例として2001年の輸入カキによる事例と、2004年ハワイ便機内食による事例が挙げられる。原因菌は*S. sonnei*であった。これらの菌株はPFGEでは互いに類似しており、クラスター解析を行っても事例ごとに分けることができなかった。一方、MLVAで解析した場合には、事例内に多少のバリエーションはあるものの、事例ごとに分離することが可能であった(図1)。

【*S. sonnei* 以外の赤痢菌の MLVA について】

上記 *S. sonnei* に加え、他の赤痢菌 (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*) に関してもゲノム配列が明らかになっている。そこで、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PCR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、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、Diversity Index (D値)は0.00-0.88であった(図2)。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3、色塗りのクラスター)。

【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。台湾 CDC 主催のもと、国際的なラボ間の validation を実施した。

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4参照)。供試菌株からDNAを抽出、当研究所の試薬およびシーケンサーを使用して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

細菌性赤痢は海外、特にアジアからの輸入例が多数を占めている。一方国内事例においては2001年に韓国からの輸入カキ喫食、2004年にハワイ便の航空機機内食、2008年にはベトナム産輸入イカの喫食に関連した集団事例が起こるなど、輸入食品によると思われる事例も少なくない。こうした事例における疫学調査に有効な分子疫学マーカーの開発は重要であり、本研究ではその一環としてMLVAの開発・検討を行った。*S. sonnei*、*S. flexneri*といった国内でも症例の多い菌種についてはある程度有効と考えられる系が構築された。特に*S. sonnei*についてはMLVAがPFGEよりも有用であることが示唆された。さらに、台湾CDCとの共同研究から、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が示された。現在我が国と台湾とで共通の遺伝子座は7箇所であるが、他の遺伝子座は全体的な分解能に影響しないことがわかっているので、実用的には7遺伝子座

で問題ないと考えられる。今後はこうした細部の問題を解消することで国際的なハーモナイゼーションが進んでいくことが考えられる。

E. 結論

赤痢菌のMLVAに関して、その有用性が示唆された。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、流行菌型の把握、集団事例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

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）（上）総数（下）輸入例（病原微生物検出情報より）

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>S. dysenteriae</i>	4	2	2	2	3	1	3	1	1
<i>S. flexneri</i>	45	40	66	21	40	33	34	17	36
<i>S. boydii</i>	4	2	3	8	2	3	1	1	11
<i>S. sonnei</i>	205	225	186	79	101	66	91	165	103
計	258	269	257	110	146	103	129	184	151

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>S. dysenteriae</i>	4	1	2	2	2	1	3	1	1
<i>S. flexneri</i>	16	12	8	5	20	20	19	2	16
<i>S. boydii</i>	4	1	1	5	2	1		1	11
<i>S. sonnei</i>	77	55	47	43	72	38	48	59	40
計	101	69	58	55	96	60	70	63	68

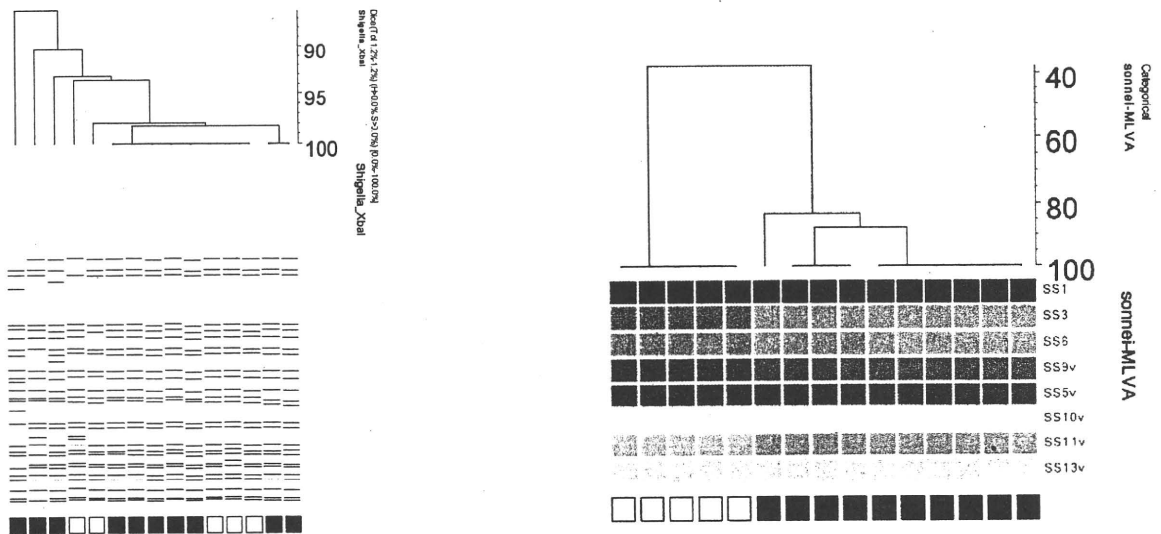


図 1. 各遺伝子型別によるクラスター解析。左) PFGE。右) MLVA。

2001年輸入カキ事例関連株（□）、2004年ハワイ便事例関連株（■）。

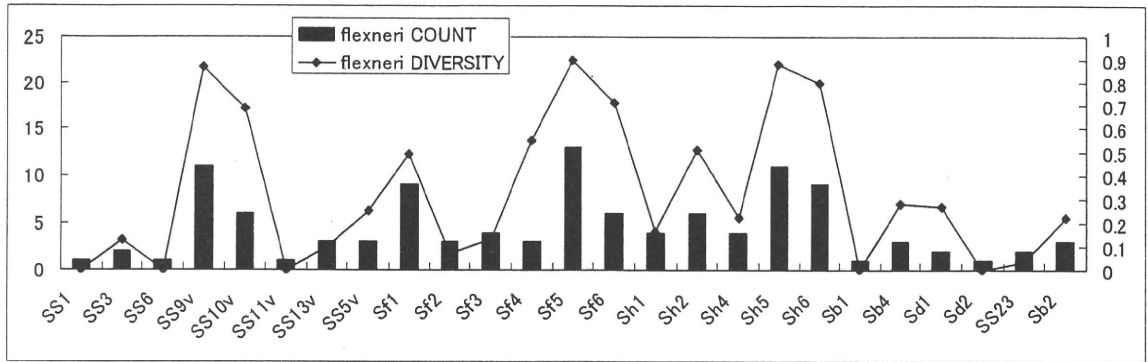


図2. 25 遺伝子座について、*S. flexneri*を解析した際に観察されたアリル数（左縦軸；棒グラフ）および分解能（右縦軸；折れ線）

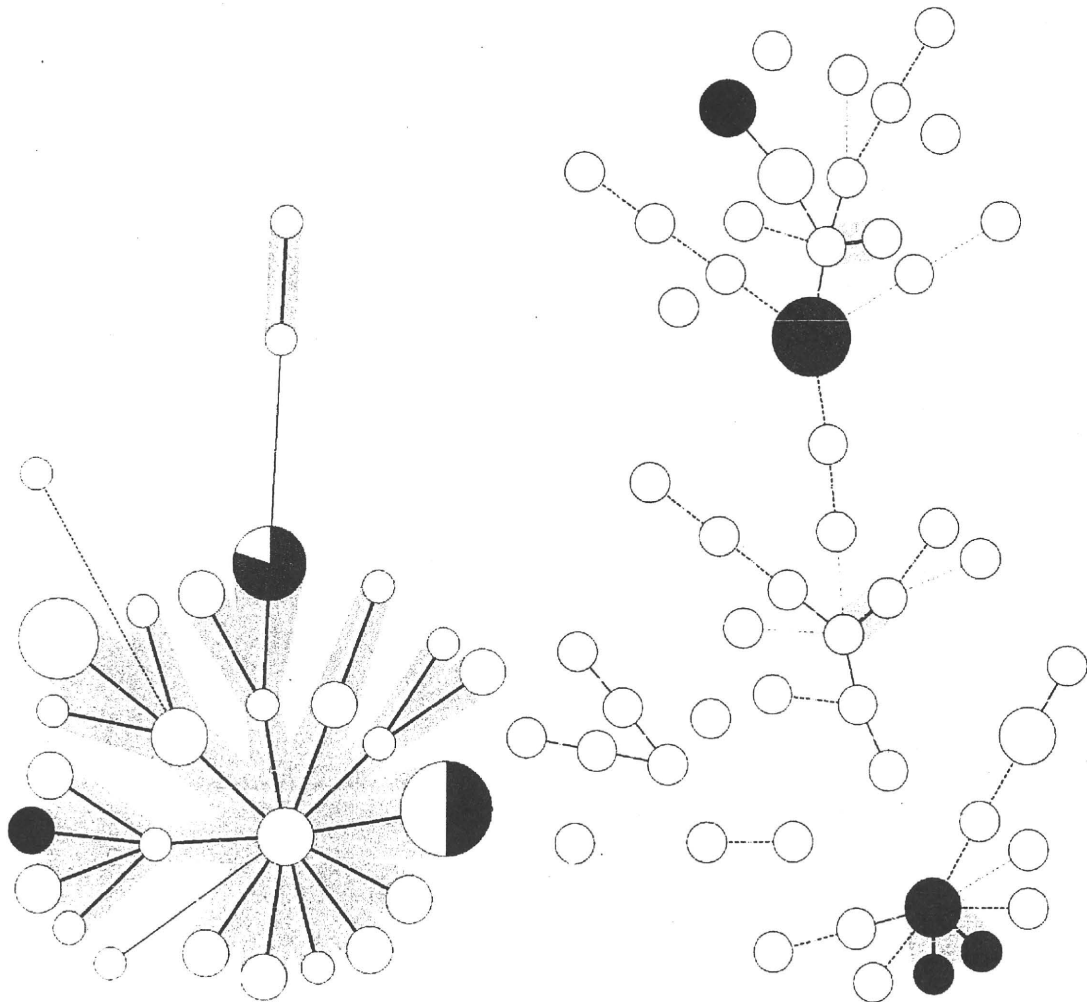


図3. *S. flexneri* MLVA からの最小域木 (Minimam Spanning Tree) によるクラスター解析。左) 8 遺伝子座によるもの。右) 25 遺伝子座によるもの。1 遺伝子座の違いの範囲内の分岐には網掛けがなされている。色分けされている円は家族内事例など、疫学的な関連がある、もしくは疑われる事例を示す。

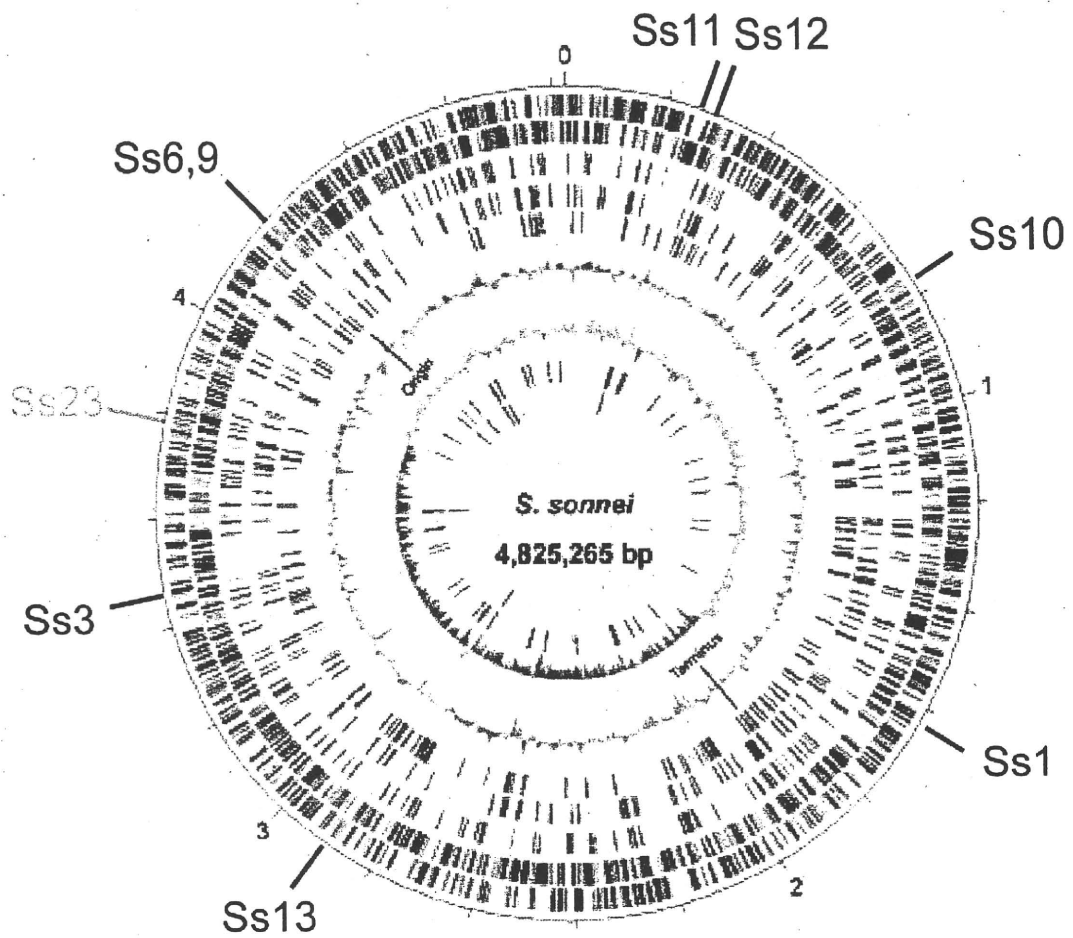


図4. 台湾 CDC との validation に使用された遺伝子座。
 Ss23 は従前台湾 CDC から有用性が示唆された遺伝子座。Ss12 は今回の validation にて初めて使用された。Ss1, 3, 6, 9, 10, 11, 13 は日本と共通で使用されている。

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)

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 1999-2009 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 患者由来株で有意に高いことが判明した。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。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。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（10-15%、通常は 0-7%）から、原因となった菌株の病原性が高い（高病原性株である）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、米国で 2006 年に集団発生が報告され、高病原性と考えられている一群の系統株(クレード 8)と同様な株について、国内分離株および輸入感染事例由来と考えられる株における分布解析を行うこと、クレード 8 がその他のクレードと比較して高い病原性を示す可能性について解析すること、さらに、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目的とした。

B. 研究方法

1) 1999-2009 年に国内で分離された EHEC O157:H7 株の SNP 解析法

クレード 1, 2, 3, 8 については合計 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(J.C.M 46: 2070-2073, 2008)から、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。1999 年-2009 年の間で総計 311 株の HUS 株、これとほぼ同数の無症状保菌者由来株(312 株)について解析した。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、2010 年に単離された HUS 患者由来株(34 株)と無症状保菌者由来株(35 株)については、本研究で明らかとなったクレード 8 に特異的な

PCR 法による解析のみを行った。

2) DNA の単離精製, PCR, DNA シークエンスは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) クレード 1 の分布解析

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クレード 1 の割合は低かったが、1999-2003 年の間では、クレード 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) クレード 8 の分布解析

1999 年から 2009 年までの結果をまとめると、資料 1 の通りとなり、HUS 株で有意にクレード 8 が多く存在することがわかる。

(3) 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、クレード 8 のゲノム解読株では保存されている一方でクレード 1 およびクレード 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、クレード 1, クレード 2, クレード 3 およびクレード 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、クレード 1, 2, 3 のほぼ全ては *norV* 内部に欠失が見られる一方、すべてのクレード 8 は少なくともクレード 1, 2, 3 で見られるような欠失はないものと考えられた(資料 2)。

(4) LEE 発現レベルの解析

資料 3 の通り、クレード 8 以外のクレードにおける EspB 分泌量 (17 株の平均) に対するクレード 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 倍クレード 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、クレード 8 は LEE の発現レベルが他のクレードと比較して有意に高いことが示唆された。

(5) 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 4)。

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℃ 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。

(6) 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)。この結果からは有意差はなかったが、1999 年から 2010 年までの全解析で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クレード 8 が多いことが確認された。

(7) アジア各国における邦人の EHEC O157:H7 感染事例由来株