

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

平成 24 年度 分担研究報告書

研究課題名：「腸内細菌の molecular typing に関する研究」

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、主として食水系由来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。本年度は中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、赤痢菌の分子タイピングに関する共同作業を行った。

A. 研究目的

コレラ菌、赤痢菌、サルモネラといった、食水系腸管感染症起因菌を中心に研究を行う。当該感染症の流行地域であるアジア各国において、流行菌種あるいは菌型を把握するための分子タイピング法の検討を行う。また、必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

分子タイピング法としてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) および multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を主として活用する。

C. 研究結果および考察

赤痢菌 (*Shigella* spp.) は細菌性赤痢の起因菌であり、当該菌によって汚染された飲料水および食品を摂取することによって感染する。わが国では海外渡航者による輸入例が多く、その渡航先のほとんどがアジアである。

赤痢菌は 4 つの種からなるが *S. sonnei* による赤痢が最も多い。赤痢菌の分子タイピングの手法としては、標準法である PFGE が使われることが多いが、*S. sonnei* に関しては MLVA も有用であることが示されている。こうした解析法の標準化は PFGE に関しては米国パルスネットを中心として進められているが、MLVA に関しては発展途上の段階にある。そこで、本研究では CCDC と我々との間で、*S. sonnei* MLVA に関する harmonization ができるかを検討した。

電子メールによる情報のやり取りから、双方が台湾のグループが開発した 8 遺伝子座を使った MLVA を行っていることがわかり、互いに DNA を交換、それぞれのラボで解析し、最終結果 (リポート数に換算したもの) を送付しあい、結果を照合した。

CCDC サンプルの結果：我々のもとで CCDC からの 30 株について解析した結果、Ss11 遺伝子座においてすべて 1 リポートずつずれていたが、これらについては修正がなされ、最

終的には一致した。それ以外の遺伝子座を含めた8遺伝子座30株、計240箇所中233箇所(97%)について一致した。

NIID サンプルの結果：CCDC のラボで我々(NIID)からの供与サンプル32株について解析したところ、当初は256箇所中201箇所(79%)について一致した(表1)。上記CCDC サンプルの解析結果よりも一致率が低かったため、CCDC から解析前の泳動ファイルを電送してもらい、我々の手法でファイルを解析した。その結果、すべての箇所でリピート数が一致した。

MLVA は最終結果が、各遺伝子座に関する遺伝子構造のリピート数に換算されるため、結果がデジタル化されており、比較するのが容易である。一方で、換算手法がラボによって異なる可能性があり、今回のCCDC とのharmonizationにおいても同様のことが明らかとなった。リピート数の算出は、観察された増幅産物の泳動上のサイズを本来の塩基配列からのサイズに置換し、そこからリピート数を整数として計算することからなる。ま

た、PCRによる非特異な増幅産物を解析時に排除しなければならない。こうした細かい点は、意外と見過ごされがちなので、今回実施したように実際にDNAサンプルや解析ファイルをやり取りして、各ステップを確認する必要があることが示された。

分子タイピングのharmonizationはラボ間の連携を深め、また流行が発生した際に正しい情報交換を行うためにも重要な工程である。機会をみて、こうした活動を継続していく必要があると考えられる。

D. 結論

ラボ間のネットワークを構築していくうえで、解析手法の共通化、標準化、harmonizationは重要である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

strain	Consistency (CCDC-NIID)								
	SS1	SS3	SS6	SS9	SS10	SS11	SS13	SS23	
#1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#2	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#3	-3	0	-1	0	0	0	0	1	0
#4	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#5	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#6	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#7	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#9	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#10	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
#11	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#12	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#13	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
#14	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#15	-2	0	-1	0	0	0	0	0	0
#16	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#18	0	0	0	0	-1	0	0	0	4
#19	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#20	-1	0	0	0	0	0	0	1	0
#21	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#23	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
#25	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0
#26	-1	-1	-1	0	-1	3	0	0	0
#27	-1	-1	0	0	-1	0	0	0	0
#28	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
#29	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
#30	-5	-1	-1	0	0	0	0	1	0
#31	0	0	0	0	0	0	0	0	4
#32	-1	0	0	0	0	0	0	0	0

表1 .NIID サンプルの解析結果の比較。CCDC から返送されたリピート数と我々のラボで得られたリピート数との差を表す。0 は両者で一致したことを示す。