

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 25 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 - ベトナム」

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。本年度はベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）の腸内細菌部門と共同して *Vibrio cholerae* の解析などを行った。

Molecular typing of enteric pathogens

Hidemasa Izumiya

Molecular epidemiological analyses were performed for *Vibrio cholerae* isolates of 2007-2010 from Vietnam in collaboration with National Institute of Hygiene and Epidemiology, Vietnam. The resulting data revealed the relatedness among isolates. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis identified 24 types which were linked with each other by single locus variations. The analysis suggests that 2010 isolates were more similar to 2007 isolates than to 2009 isolates.

Environmental research was performed for water samples collected from environments in Hanoi and neighboring provinces. Most probable number combined with PCR method (MPN-PCR) was applied to estimate the distribution of *V. cholerae*. Some seasonal variations were suggested though more successive research would be required.

#### 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。

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。

環境調査においては、生活水路等から採水し供試検体とする。検体を MPN (最確数)-PCR 法により試験し、検体中の *Vibrio cholerae* の菌数を推定する。

#### B. 研究方法

#### C. 研究結果および考察

コレラはコレラ菌（コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* 01/0139）によって発生する経口感染症である。上下水道等、いわゆるインフラ整備が不十分な途上国では、コレラの流行は公衆衛生上の脅威である。本研究のカウンターパートであるベトナムでは、しばらくの休眠期間の後、2007年から2010年にかけてコレラの流行が発生した。コレラの流行は当該国において非常な脅威であり、当該国の感染症対策において上位に位置づけられている。また、ベトナムは現在、我が国との交易も盛んな国であることから、当該国でのコレラの流行はわが国にとってもリスクとなりえる。こうした背景から、本研究においてはベトナムにおけるコレラ流行の把握と制御に向けた共同研究を遂行している。

具体的にはベトナム国立衛生疫学研究所（National Institute of Hygiene and Epidemiology; NIHE）の腸内細菌部門・コレラセンターと共同して、コレラ菌のサーベイランスシステムの構築を検討している。

本研究においては2つの活動を基点とする。一つはNIHEの能力向上であり、今一つは感染研との共同研究である。ベトナムで流行した、もしくは流行しているコレラ菌の特徴づけを行うべく、感染研とNIHEとで材料および技術をやり取りすることによって2つの活動が回っていくことを期待している。

本年度は、2010年に発生したコレラ流行に関して、当該菌株の分子疫学解析を行った。そして、これまでに試験した2007-2009年分離株との関連性を調べた。図1に、7遺伝子座を用いたMLVAの解析結果をMinimum Spanning Treeにて表示した結果を表す。

供試菌株（約190株）は24の型に分類された。それぞれの型は1遺伝子座の違い（single locus variant, SLV）によってつなげることができ、流行時の菌の伝播とともにバリエーションが派生していることが窺えた。

なお、PFGEに関しても比較的マイナーなバリエーションが見られ、年によって大きなクラスタが形成された（図2、A1, B1, D）。

2010年分離株は、MSTからすると2007年株より派生していることが窺えた（図1）。

MLVAで使用している7つの遺伝子座のうち2遺伝子座は *V. cholerae* が保有する大小2つの染色体のうち、小染色体にあり、これらはより不安定でバリエーションが出やすい（表1）ことから、大染色体の5遺伝子座のみを使ってMSTを描いたところ、2010年株は2007年株と同じクラスタに分類された。このことは、2010年株が2009年株よりも2007年株に近いことを示唆しており、2010年株が2007年株から派生してきた可能性が示唆された。

実際、2007-2009年はベトナム北部を中心に流行があり、2010年は南部から始まって北部に至ったとされており、2010年が2009年の続きにあるというよりは、近縁だが別の新たな流行波で2010年の流行が生じた可能性が考えられた。

コレラの流行に対応するために環境中の *V. cholerae* の動向を調査することは重要である。流行期間でない時期にはいわゆるコレラ菌ではなく、毒素産生のない *V. cholerae* がほとんど大勢を占めるが、環境調査を行うことで、環境中のリスク要因あるいはポイントの検討および流行発生時の調査を円滑に実

施できる体制整備につながる。

本調査は NIHE 腸内細菌部門で継続的に実施されていたが、定量性を加味するために MPN-PCR 法の導入を行った。2013 年 3-8 月の間に、約 100 検体を試験し、20 検体が陽性であった。それらの MPN 値の最低および最高値を図 3 に示す。5-7 月にかけては菌数が低く、3 4 月および 8 月には菌数が高かったことから、*V. cholerae* 分布に関する季節変動の可能性が示唆された。本結果については、ポイントの整理などを行い、また継続して調査を行うことで *V. cholerae* の消長が定期的に発生するかどうかを見ていく必要がある。

#### D. 結論

2007 年から 2010 年にかけてベトナムで発生したコレラの流行に関し、関連菌株を用いた分子疫学解析を通じて互いの関連性およ

び近縁性を明らかにすることができた。

環境調査を定量的に実施することで、環境中の *V. cholerae* の分布および消長をより高い精度で把握することが可能である。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

Yamamoto S, Mitobe J, Ishikawa T, Wai SN, Ohnishi M, Watanabe H, Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2014 Jan;91(2):326-47.

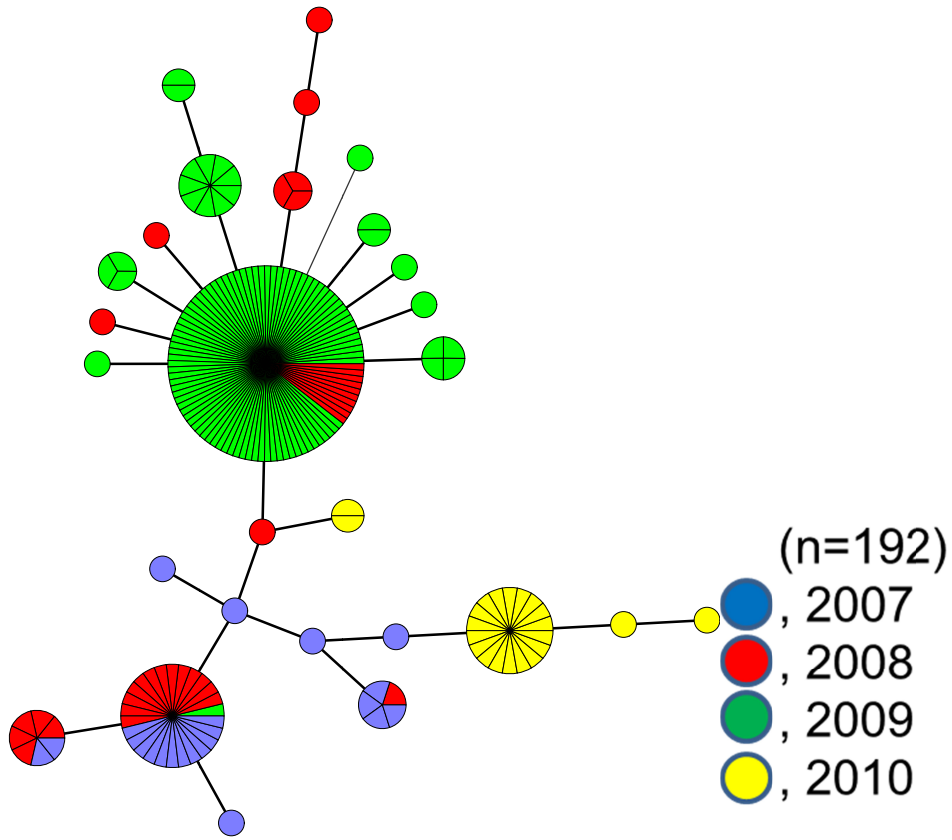
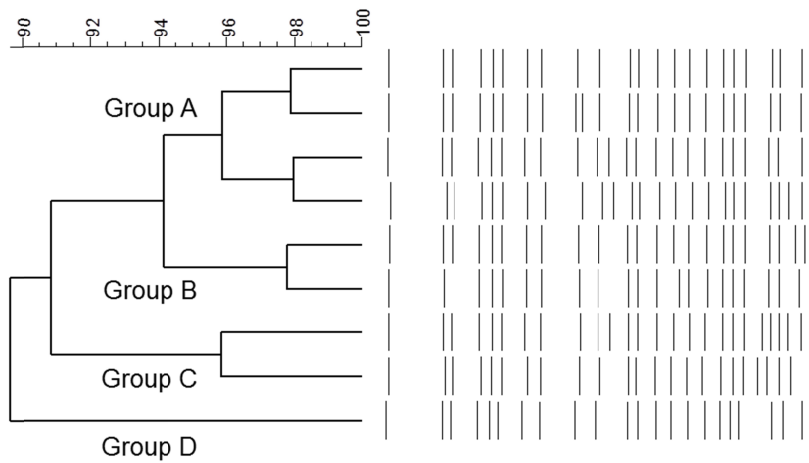


図 1 . 2007-2010 年コレラ流行株の MLVA による MST 解析

PFGE-VC



PFGE Pulsotype(isolate(s))	No. of	Year/ Region
A1	71	(36)2008/North (35)2009/North
A2	1	2009/North
A3	2	(1)2008/North (1)2009/North
A4	1	2010/South
B1	21	2007/North
B2	1	2009/North
C1	2	2007/North
C2	6	2010/North
D	53	(26)2010/North (27)2010/South

図 2 . 2007-2010 年コレラ流行株の PFGE によるクラスター解析

Chromosome	locus	# allele	Diversity
Large	VC-1	3	5.1
	VC-2	1	0
	VC-3	1	0
	VC-5	3	47
	VC-6	1	0
Small	VC-7	7	56.1
	VC-8	8	64.1

表 1 . MLVA の各遺伝子座において観察されたアリル数および分解能 ( Diversity )

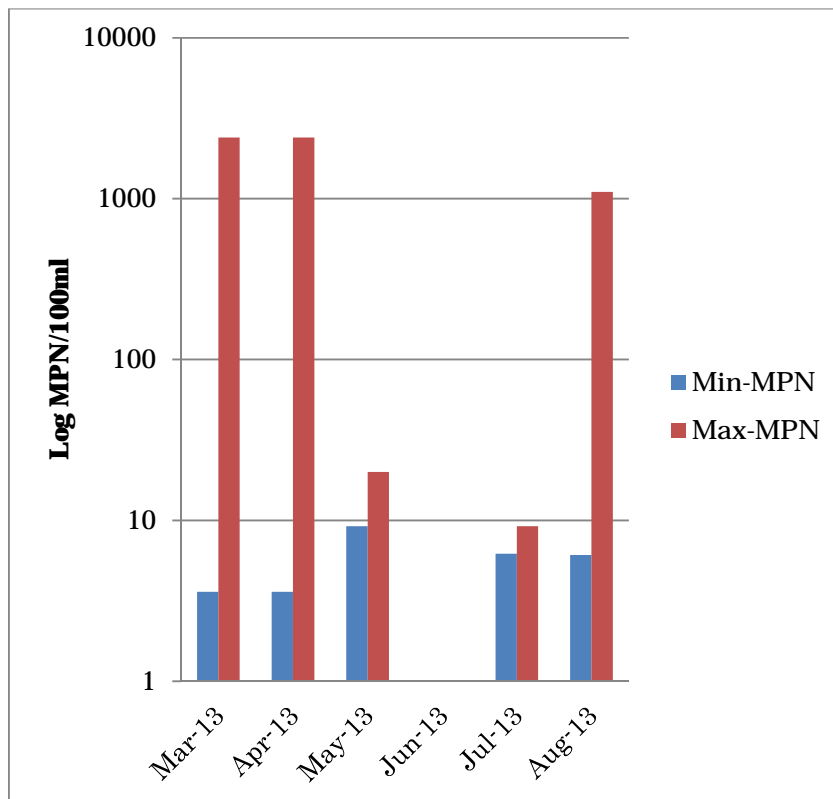


図 3 . ハノイおよび周辺の province における環境調査。検出された MPN 値の最低値および最高値を表す。