

side mainly wanted to check the detailed protocol of the screening PCR.

Background information of these isolates was not given to us, including isolation year.

After that, the Nanjin institute performed the investigation of TEM-135 with utilization of 199 strains in 2007 and 77 strains in 2012, we have been informed. ◦

2) **Measurements of MIC:**

E-test sheets (AB bioMerieux, Solna, Sweden) were used following manufacturer's recommendations.

3) **NG-MAST Typing:**

We followed the methods reported by Martin et al.¹⁾

4) **Screening PCR detecting a mutated version of β -lactamase gene, TEM-135:**

We followed the methods reported by our group⁴⁾.

C. **Results**

1) **Surveillance of Japanese isolates:**

NG-MAST typing analysis of isolates in Tokyo metropolitan area year 2005 to 2011:

Among the total isolates (147), those with either of the two NG-MAST Types have gotten the majority: ST2958(19/147), and ST1407(16/147).◦

Number of isolates with other ST types was less than 5 for each type. In Japan, there are two preceding reports on systematic NG-MAST typing. One is in Fukuoka year 2008⁵⁾, and the other is in Kyoto and Osaka year 2010~2012^{6,7)}.

Those two reports also found that those ST types, ST2958 and ST1407, are major ones. Thus, our results meet the preceding reports. However, this

time, we performed the retrospective analysis since year 2005, and we got some novel information which had not been gained only with the preceding 'Snap shot in one or two year(s)'.

They are as follows: First: Both of the two major types, ST 2958 and ST1407 were first detected in year 2006, and reached their prevalence peak in year 2008, followed by some decrease year by year, keeping isolation rates of over 10% of total isolates. Second: In years 2008 and 2009, ST2958 exceeded ST1407 in number, whereas in years 2010 and 2011, they have been replaced. Third: Consequently, it can be supposed that the phase-change of the two ST types has been occurred between years 2009 and 2010. This hypothesis can explain why, in Fukuoka year 2008, ST2958 exceeded ST1407⁵⁾, and in Kyoto/Osaka years 2010 and 2011, ST1407 did ST2958⁶⁾. Thus, we could trace partly the historical profile of ST1407, including the time course since the first emergence to the gain of prevalence majority.

We believe this is very important information, because ST1407 is evaluated as a world wide-successful type and is strongly linked with the characteristic of multi-drug resistance. And there has not been any report implying the first emergence of that type.

Among these isolates, we have detected Azithromycin-resistant isolates since the year of 2007. And the significant expansion in 2011 with a clonarity of NG-MAST ST1407 was evident. The two of the isolates in 2011 also showed the high MIC of 16 and had 23S rRNA mutations

responsible for the high level resistance⁸⁾.

2) Analysis of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) isolates in China:

Until recent years, other type of β -lactamase gene than the prototype TEM-1 has not been reported in PPNG. In the year 2009, in Thailand and Japan, PPNGs with TEM-135 β -lactamase were first reported^{2, 3)}. Although TEM-135 itself is not an extended-spectrum type of β -lactamase (ESBL), it can become an ESBL, TEM-20, by only single nucleotide exchange. On the other hand, the prototype TEM-1 requires at least two nucleotide exchanges to become any known ESBL. Thus, TEM-135, unlike TEM-1, is evaluated as a 'direct precursor to an ESBL'. Accordingly, we analyzed PPNG isolates in Thailand including TEM typing since year 2005 to 2008. In Japan, isolation of PPNG is very rare and we found systematic analysis of PPNG there is not fruitful. In total, 96 PPNG isolates were served for this analysis. Out of them, 9 isolates (9.4%) were with TEM-135. The other 87 isolates (90.6%) were all with TEM-1. No other TEM type was detected. Thus, TEM-135, a direct precursor to an ESBL, is surely circulated in Thailand, although as a minor group of around 10% rate⁴⁾.

Based on this result, we have been convinced that it is very important to analyze PPNG systematically in China, where isolation of PPNG is as frequent as about 30% of total isolation number. Thus, we collaborated to analyze PPNG in China at the institute of counterpart in Nanjing.

This time, however, they wanted mainly to check detailed protocol of TEM-135 screening PCR, And, only two isolates, including one unknown to be PPNG or non-PPNG, were analyzed. Among these two, one was non-PPNG, and the other was PPNG with TEM-135 β -lactamase.

After that, the Nanjin institute performed the investigation of many PPNGs in China, and discovered that TEM-135 rates in the total PPNG is as high as 58%, in 2007 and 2012⁹⁾.

D. Discussion

In our domestic surveillance of clinical isolates, we found that some historical profile of NG-MAST ST1407. Namely, the type, strongly linked with the characteristic of multi-drug resistance and worldwide successfulness, was first emergent in year 2006 in Japan and kept the second prevalence rate next to ST2958 up to year 2008. And, since year 2010, it has been the most prevalent type. Because of its characteristic of multi-drug resistance and worldwide successfulness, we must still carefully monitor this ST type isolates. Moreover, it turned out that since 2007, azithromycin-resistant isolates has started to be detected, and in the year 2011, they are circulated as a clonal group of ST1407 with elevated MIC of around 16⁸⁾.

Concerning to Ceftriaxone resistance, we have not detected second resistant isolates after the first emergence of that with mutated-*penA* type in 2009 in Japan. This might suggest that this type of resistant isolate has not gained secondary mutation compensating the growth cost of the

mutated *penA*. However, we must premise, sooner or later, they would gain such secondary mutation and would expand properly as proved through the past time experiences. In this context, we have to totally keep careful surveillance targeting this kind of isolates.

In addition to this, since now on, we also have to prepare the newly emergence of other type. Namely, PPNG isolates with mutated, extended-spectrum β -lactamase (ESBL). As stated above, existence of TEM-135, a 'direct precursor' to an ESBL, in PPNG has been confirmed. And, the prevalence rate among the total PPNG has also estimated specifically as around 10% in our report⁴⁾.

This time, in China, one PPNG isolate was analyzed and it turned out to be with TEM-135. From the static point of view, we expect that the prevalence of TEM-135 in China is larger than in Thailand. Moreover, in China, isolation rate of PPNG among total *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates are as high as 30%. So, we have worrying that total number of *Neisseria gonorrhoeae* is much higher in China than in Thailand. We must actively conduct TEM-135 surveillance including prevalence rate, and increasing of it, along with monitoring new generation of TEM-20, an ESBL, from TEM-135. Thus, we have actually investigated this issue and found that, in China, as high as 58% of total PPNG have TEM-135 *bla*⁹⁾.

E. Conclusion

We have not detected significant expansion of

mutated-*penA* type Ceftriaxone resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates after first emergence of that in Japan. However, it is required to keep monitoring it carefully.

In Japan, NG-MAST type ST1407, which is strongly linked to multi-drug resistance, world-wide successfully expansion, and also to somewhat decreased susceptibility to Ceftriaxone, is first emergent in year 2006, and has become the most prevalent type since year 2010. We have to keep monitoring this type carefully. Moreover, it turned out that since 2007, azithromycin-resistant isolates has started to be detected, and in the year 2011, they are circulated as a clonal group of ST1407 with elevated MIC of around 16⁸⁾.

A newly generation of another type of Ceftriaxone resistant *Neisseria gonorrhoeae*, with mutated, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) is worrying. We have confirmed the existence of isolates with a direct precursor to an ESBL in Thailand, although as a minor group. In this year, we also investigated the existence also in China, and found that it surely exist in China, and that, from the static point of view, prevalent rate as well as total number of it might be higher in China than in Thailand. As stated above, this was truly the case, and further beyond our worrying; The TEM-135 rate in PPNG in China was as high as 58%⁹⁾. We must monitor increasing of the rate of this type PPNG along with possible new generation of an ESBL, especially TEM-20 from TEM-135 in China.

This project is originally collaboration with Chinese counterpart. However, at present, China

CDC has not officially agreed these projects' conduction in National Center for STD Control in Nanjing. Importance of this surveillance of PPNG in China, where PPNG is frequent, must be repeatedly explained to China side. We hope that even in some unofficial manner, if not thoroughly, we could conduct this kind of surveillance in China.

Acknowledgement

We thank Dr. Minako Takayama, who provided us clinical isolates in Tokyo metropolitan area.

F. References

- 1) Martin, I. M. C., Ison, C. A., Aanensen, D. M., Fenton, K.A., and Spratt, B. G. 2004. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J. Infect. Dis.* **189**:1497-15015.
- 2) Srifuengfung, S., et al. 2009. Prevalence of Chlamidia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-seropositive and gonococcal antimicrobial susceptibility:an update in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**:467-470.
- 3) Ohnishi, M., Ono, E., Shimuta, K., Watanabe, H., Okamura, N. 2010. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains in Japan. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **54**:3021-3023.
- 4) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **56**:916-920.
- 5) Tanaka, M, et al. 2011. Anti-biotic-resistant phenotypes and genotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan: Identification of strain clusters with multidrug-resisstant phenotypes. *Sex. Trans. Dis.* **38**:871-875.
- 6) Shimuta, K., Hida, S., Itoh, M., Fujiwara, M., Ueda, T., Kameoka, H., Furubayashi, K., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2012. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Kyoto and Osaka, 2010-2011, Japanese Journal of Sexually Transmitted Infections **23**:83-89. (Manuscript in Japanese, English abstract available.)
- 7) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **57**:5225-5232.
- 8) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in

- 2005-2011. J. Infect. Chemother. Accepted.
- 9) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo. M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. Sex Transm. Dis. 40:872-876. (Ohnishi, M. is a collaborator)

G. Presentation

1. Oral presentation in society meetings

1) Itoda, I., Nakayama, S., Ishihara, T., Shimuta, K., and Ohnishi, M. 2012. Evaluation of detection of *Treponema pallidum* DNA by PCR and the bacterial body by fluorescence-conjugate antibody. The 25th annual meeting of Japanese Society for Sexually Transmitted Infections. City of Gifu, Dec. 2012.

(Presentation in Japanese, English abstract not available.)

2. Published articles

1) Nakayama, S., Tribuddharat, C., Prombhul, S., Shimuta, K., Srifuengfung, S., Unemo, M., and Ohnishi, M. 2012. Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. Antimicrob. Agents Chemoter. **56**:916-920.

2) Shimuta, K., Unemo, M., Nakayama, S., Morita-Ishihara, T., Dorin, M., Kawahata, T., and Ohnishi, M. 2013. Antimicrobiol resistance and molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae*

isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified surveillance after identification of the first strain (H041) with high-level ceftriaxone resistance, Antimicrobiol. Agents Chemother. **57**:5225-5232.

3) Takayama, Y., Nakayama, S., Shimuta, K., Ishihara-Morita, T., and Ohnishi, M. 2014. Characterization of azithromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Tokyo in 2005-2011. J. Infect. Chemother. Accepted.

4) Chen, S. C., Yin, Y. P., Dai, X. Q., Yu, R. X., Han, Y., Sun, H. H., Ohnishi, M., Unemo. M., and Chen, X. S. 2013. Prevalence and molecular epidemiological typing of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* and their *bla*(TEM-135) gene variants in Nanjing, China. Sex Transm. Dis. 40:872-876. (Ohnishi, M. is a collaborator)

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 23-25 年度 分担研究報告書

研究課題名：「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

「腸内細菌の molecular typing に関する研究－中国」

研究分担者 荒川英二

国立感染症研究所 細菌第一部

「*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する研究－中国」

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行った。また、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* お対象に O 血清型別ならびに病原因子の探索を行い、その発生と流行の傾向についての調査を行った。共同研究にあたり中国 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、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別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。

コレラ流行地においては、コレラ菌 *V. cholerae* 01, 0139 以外に *V. cholerae* non-01/non-0139(以下、ナグビブリオ)による下痢症も発生しており、また、その選択分離培地である TCBS 寒天培地に *V. cholerae* と同様の黄色集落を形成する *V. fluvialis* も検出される。コレラ流行地以外においても、ナグビブリオによるコレラ様の下痢症の報告もあり、0 血清型別による発生の疫学解析が大いに有効であることが示されている。本研究はナグビブリオ及び *V. fluvialis* の血清型分布とその病原因子保有状況について、中国における状況調査を主たる目的とする。

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。

中国においてヒト及び環境水から分離されたナグビブリオ及び *V. fluvialis* を中国側カウンターパートの Dr. Biao Kan よりそれぞれ 30 株、10 株分与してもらい、生化学性状試験と簡易同定キット EB20 による菌種の同定、菌種特異的検出 PCR により各菌株の確認試験を行った。*V. cholerae* の病原因子の探索のため、

ctx、*nag-st*、*hly*、T3SS、MARTX についてそれぞれの遺伝子検出 PCR を行った。

C. 研究結果および考察

I.

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 (リピ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 リピ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 3)。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、すべての箇所でもレポート数が一致した。

MLVA は最終結果が、各遺伝子座に関する遺伝子構造のレポ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。レポート数の算出は、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、そこからレポ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。

II.

菌株リストは表 1 の通り。ナグビブリオは患者下痢便由来が 10 株、環境水由来が 20 株の計 30 株、*V. fluvialis* は患者下痢便由来が 9 株、魚由来株が 1 株であった。分離年はナグビブリオが 2007~2010 年、*V. fluvialis* が 1963~2010

年であった。

まず常法に従い、ビブリオ属菌の選択分離培地である TCBS 寒天培地に接種したところ、約 1/4 が全く発育しないか、発育不良であった。特に *V. fluvialis* は 6 株(60%)が発育不良であった。それらの株は、非選択培地の TSA 培地に接種しなおし、全てが発育することを確認し、そこで発育したものを再度 TCBS 寒天培地に接種したが、やはり同様に発育不良であった。

それぞれの菌株を、TCBS 寒天培地で発育したものはそこから発育の良い黄色集落を、それ以外は TSA から任意の集落を 1 つ選択し、TSI 培地、LIM 培地、NaCl 濃度 0、0.1、3、8% の Nutrient broth に接種し、また日水製薬の簡易同定キット EB20 にも接種し一夜培養した。

生化学的性状から得られた成績を表 1 に示した。その結果、ナグビブリオとして送付された VUN7 は *V. parahaemolyticus*、VUN21、22 は *Aeromonas sobria*、MJ-34、35 は *A. hydrophila* として同定された。*V. fluvialis* は 1 株を除き、*V. fluvialis* として同定された(後述)。

V. parahaemolyticus は極めて稀に白糖分解菌が分離される例があるが、VUN7 は白糖非分解菌であった。また、*Aeromonas* は白糖分解菌ではあるが、通常 TCBS 寒天培地には発育しない。実際 VUN21、22、MJ-34、35 は、我々の試験では TCBS 寒天培地には発育しなかった。培地メーカーによっては抑制力が弱く、*Aeromonas* 等が発育する場合もあるという。中国におけるこれらの培地や生化学的性状試験のやり方については、今後連絡を取り合って同定の精度管理として進めていくべきであると考えられた。

コレラの流行地においては、ナグビブリオによる下痢症も多発しており、また、それと同時

に *V. fluvialis* による下痢症の発生も見られる。患者便からのコレラ菌の選択分離には通常 TCBS 寒天培地をもちいるため、白糖分解菌である両者を区別することは出来ない。そこで、迅速簡便に両者を区別する PCR をすでに開発してあったので、今夏にの分離株についてもこれを行ったところ、表 1 に示すようにナグビブリオのみ *ompW* 陽性で、*V. fluvialis* のみ *VftoxR* 陽性の成績が得られた。この PCR の系についても今後中国側に検討を依頼する予定である。

ナグビブリオに関しては、ヒトに対する病原因子の有無が下痢症との関連から重要な点である。表 2 に示すように、VUN3 は *ctx* 陽性で、コレラ毒素産生性であることが考えられる。また、ZJ201-1 は環境水からの分離菌であるが、*nag-st* 陽性であった。その他は、III 型分泌機構が VUN1 を除くすべての患者株で陽性であり、同様に MARTX も VUN1 を除くすべての患者株で陽性であった。環境水からの分離菌で III 型分泌機構や MARTX 陽性の株はヒトに対する病原株である可能性が高いことが推測される。

生化学的性状がオキシダーゼを除き *V. fluvialis* に一致する 1 株 (JS2) と TCBS 寒天培地に発育しなかった株 (VF12) をハウスキーピング遺伝子である *gyrB* の塩基配列について、参照株やデータベース上の他の菌種との比較を行った。図 1 に示すように、JS2 (93gyrB)、VF12 (92gyrB) は参照株の *VflugyrB* とほとんど同一の配列であり、オキシダーゼ陰性の *Vibrio* である *V. metschnikovii* とは異なることが明

らかになり、JS2 (93gyrB)、VF12 (92gyrB) は *V. fluvialis* と同定された。

D. 結論

MLVA 等の菌株の解析手法の共通化、標準化、harmonization は、流行時における迅速な情報交換につながり、ラボ間のネットワークを構築していくうえで重要である。

今回中国との共同研究において、中国での分離株を日本側に分与してもらうことが出来、共同研究の基本となる材料の共有ができたことは、今後の共同研究を行う上でも非常に重要な点である。

菌種の同定に関して一部問題が見られるが、情報の共有を行うことや技術の支援を行うことでこれからさらに発展が見込まれるものと期待される。

中国側からは *V. fluvialis* の血清型について、非常に興味を持って取り組みたいと申し入れがあり、今後さらに発展させていくことが両国ラボラトリーの共通認識である。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

strain n	Consi stency (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	1	0	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	4	0
#19	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0
#20	-1	0	0	0	0	0	1	0	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	1	0	0
#31	0	0	0	0	0	0	0	4	0
#32	-1	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3. 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。

[GENETYX-MAC: Evolutionary Tree]

Date : 2014.02.14

Method: UPGMA

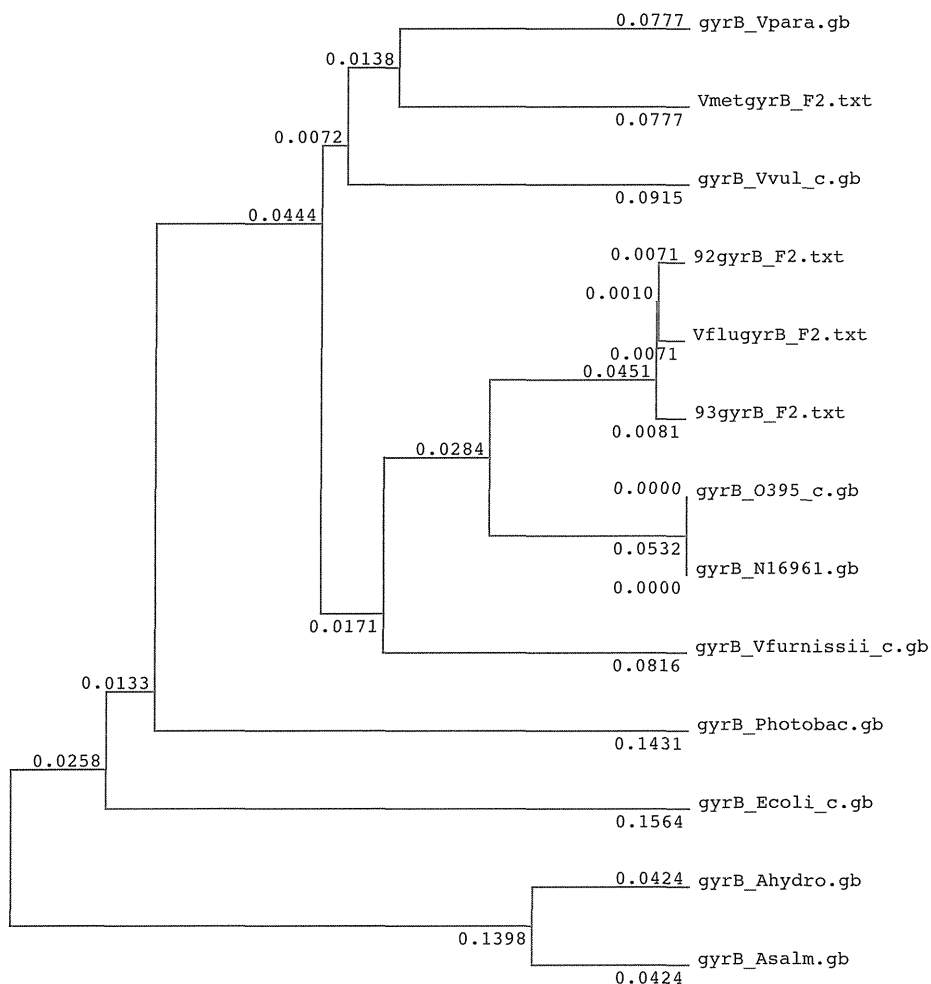


図1 オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis* の *gyrB* シークエンスによる解析。

92gyrB: TCBS で発育しない *V. fluvialis*, 93gyrB: オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis*, VflugrB: *V. fluvialis* 参照株、VmetgyrB: *V. metschnikovii* 参照株、gyrB_: データベースに登録されている *gyrB* 遺伝子(Vpara: *V. parahaemolyticus*, Vvul: *V. vulnificus*, O395: *V. cholerae* O395, N16961: *V. cholerae* N16961, Vfurnissii: *V. furnissii*, Photobac: *Photobacterium damsela*, Ecoli: *E. coli*, Ahydro: *A. hydrophila*, Asalm: *A. salmonisida*)

表1 中国CDCの分離株

Strain ID	Province/Country	Year isolated	Source	Serogroup	Species	ompW	VftoxR
VUN1	Xinjiang/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN2	Xinjiang/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN3	Sichuan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN5	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN6	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN7	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. parahaemolyticus	-	-
VUN8	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN9	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
VUN21	Hainan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	A. sobria	-	-
VUN22	Hainan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	A. sobria	-	-
MJ-33	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-34	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	A. hydrophila	-	-
MJ-35	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	A. hydrophila	-	-
MJ-36	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-37	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-38	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-39	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-40	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-41	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
MJ-42	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ193-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ194-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ194-3	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ195-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ196-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ197-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ198-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ199-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ200-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
ZJ201-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-
85-142	Fujian/China	1985	Fish	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
63112	Guangdong/China	1963	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
VF2	Fujian/China	1985	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
VF12	Fujian/China	1985	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
JS2	Jiangsu/China	1987	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
JS54	Jiangsu/China	1987	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
EF85001	Xinjiang/China	1985	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
EF85002	Xinjiang/China	1985	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
liao85-50	Liaoning/China	1984	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+
Ma2598	Anhui/China	2010	Stool	V. fluvialis	V. fluvialis	-	+

表2 ナグビブリオのPCRによる病原因子検索

Strain ID	Province/Country	Year isolated	Source	Serogroup	Species	ctx	nag-st	hly	T3SS(vscV2)	MARTX
VUN1	Xinjiang/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
VUN2	Xinjiang/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
VUN3	Sichuan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	+	-	+	-	+
VUN5	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
VUN6	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
VUN7	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. parahaemolyticus	-	-	-	+	-
VUN8	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
VUN9	Anhui/China	2010	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
VUN21	Hainan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	A. sobria	-	-	-	-	-
VUN22	Hainan/China	2008	Stool	non-O1/O139 V.cholerae	A. sobria	-	-	-	-	-
MJ-33	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	+
MJ-34	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	A. hydrophila	-	-	-	-	-
MJ-35	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	A. hydrophila	-	-	-	-	-
MJ-36	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	+
MJ-37	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
MJ-38	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	+
MJ-39	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	+
MJ-40	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
MJ-41	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
MJ-42	Fujian/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ193-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ194-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ194-3	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ195-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ196-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	-
ZJ197-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
ZJ198-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	+	+
ZJ199-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	;	+	+
ZJ200-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	-	+	-	+
ZJ201-1	Guangdong/China	2007	Water	non-O1/O139 V.cholerae	V. cholerae	-	+	+	-	+

プロジェクト 2 : 台湾

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業） 総合分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と 共同研究体制の強化に関する研究（H23－新興－指定－020）

赤痢アメーバに関する研究

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により起こるアメーバ症は近年日本においても報告が増加している重要な原虫感染症である。本研究では日本と感染様式が類似している台湾と共同研究を行うことで、東アジアにおけるアメーバ症の分子疫学調査方法の確立と病原性を規定する遺伝子の発見を目指す。

A. 研究目的

赤痢アメーバにより発症するアメーバ症は毎年 10 万人の死者を出す、世界的に重要な原虫感染症である。アメーバ症は飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国においては下痢の主要原因の一つであるが、日本を含めた先進国では渡航者の他、自己の衛生環境を保てない障害者や老人施設、糞口感染の可能性のある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) や commercial sex worker の女性が主なリスク群となる。また、*E. histolytica* 感染を疑う場合、形態学的に見分けられない、非病原性の *E. dispar* 感染との鑑別が問題となる。*E. dispar* であれば便中に栄養体やシストが検出されても治療の必要はないとされるが、無症候性の *E. histolytica* 感染者も多く存在するため確実な鑑別と適正な治療が必要である。欧米では MSM におけるアメーバ感染は *E.*

histolytica と *E. dispar* の両方が同定されるため特に鑑別が重要とされている。しかし日本においては *E. dispar* が同定されることはほとんどない。この事実は日本に独特な要因が存在することを示唆しているが、研究対象とすることが可能な症例数が限られる状況では研究を進めることが困難であった。また、現在の日本では症状のある患者が来院した場合にアメーバ症と診断され、検体を得る機会が生じるが、無症候性のキャリアからの検体を募るのは非常に難しくなっている。一方同じ東アジアにある台湾ではアメーバ症のリスク群は日本と同じであり、*E. dispar* 感染がほとんど見られないという状況も一致している。しかし台湾では外国人労働者に寄生虫検査を課していることから検査対象が非常に広く、多様な遺伝子型や株の取得が可能である。本研究では台湾 CDC と共同研究から東ア

ジアの赤痢アメーバ症の疫学調査方法と新たな病原因子の発見を目指す。

B. 研究方法

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

日本、台湾で得られた臨床株について6種類の tRNA sort tandem repeat (STR) を指標とした方法により遺伝子型別を行った。さらに系統解析を行い日本株、台湾株の特徴、病原性との関連を示した。さらに日本の臨床分離株を使った比較ゲノミクスで見出された、病原性に関与すると予想される ORF (AIG1-17) について、台湾株さらに日本株についても病原性との関与が見出されるか、評価を行った。

2) 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF (AIG1-17) の機能解析

2-1) AIG1-17 強発現株の作成。

E. histolytica HMI:c16 株に pEhExHA, pEhExHA-AIG1-17 プラスミドをリポフェクション法により導入し、G418 による薬剤選択を行い、AIG1-17-HA, HA 株を樹立した。

2-2) AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、形態を観察した。すると突起 (protrusion) が AIG1-17-HA 株で多く形成されているように観察された。そこで突起の幅 0.8 μ m 以上、突起の長さ 0.7 μ m 以上、さらに長さが幅の 1.5 倍以上という条件で各細胞種に付き 60 個の細胞を観察する実験を 3 回行った。

2-3) AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、共焦点顕微鏡 (LSM510META, Zeiss) で観察し、その運動の様子を画像デ

ータとして取得した。40 倍対物レンズを用い、1.57 秒/フレームの速度で一画像を撮り、5 秒ごとに 10 分、合計 120 フレームの画像としてデータを得た。この画像を ICY (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) の Active Contours と Track Manager Plug In を用いて解析した。

2-4) AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を通常の BIS 培地またはシステインを除去した BIS 培地で培養し、増殖速度を検討した。各細胞 1 \times 10³/mL を各培地に調製し、24 時間ごとにトリパンブルー染色にて生細胞のみ計測した。

3) 台湾での臨床分離株の確立と解析

台湾 CDC に送られてくる外国人労働者からの便検体は寄生虫調査のために採取されるためアメーバ症の症状がないシストキャリアーサンプルを見出すことが比較的容易である。日本では健康な人物から便検体の供与を受けることや、そこにシストキャリアを見つけることはほぼ不可能であり、台湾 CDC の赤痢アメーバ検体は非病原性赤痢アメーバ株の研究に必須な材料である。よって台湾 CDC における臨床分離株の確立とその解析を行った。

3-1) 台湾での臨床分離株確立

日本からプロトコールの提供と YIMDAH 培地用の試薬 (Yeast Extract) の供与を行い、台湾 CDC での臨床分離株の確立を行った。

3-2) 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

2 種類の台湾由来非病原性臨床分離株 (TC1446 株, TC1198 株) について、ハムスターを用いた肝膿瘍形成実験を行った。

TC1146 株と TC1189 株と陽性コントロールとしてアメーバ肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)から回収して病原性を増強した HM1 株 (ALA 株) をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹で摂取し、7 日後の ALA の大きさを評価した。

C. 研究結果

1) 日本・台湾株の分子疫学調査と系統樹の作成。

1-1) 臨床株の遺伝子型別

台湾株 132、日本株 37 に関して 6 つの tRNA STR を指標とした遺伝子型別を行い、系統解析を行った。大きく 3 つのグループに分類されたことからこれをクラス A, B, C とした。クラス A には 52 株 (うち日本株 6)、クラス B には 62 株 (うち日本株 17)、クラス C には 18 株 (うち日本株 14) が含まれた。また臨床症状はクラス A では無症候 42、下痢症状 2、肝膿瘍 3、下痢と肝膿瘍 2、その他 3、クラス B では無症候 36、下痢症状 13、肝膿瘍 11、その他 2、クラス C では無症候 1、下痢症状 7、肝膿瘍 7、下痢と肝膿瘍 1、その他 2 であった。

クラス A, B, C を比較するとクラス C は日本株が大半を占め、さらに無症候は 1 しかないことから、日本に多い病原性の高い遺伝子型が存在することが示唆された。また日本由来の非病原性株はクラス A に分類され、このクラスは無症候株が一番多いことから、日本の無症候株はアジアに広く存在する無症候株の一つであることが示唆された。

1-2) 病原性関連 ORF の解析

日本国内で分離された非病原性株と病原性株との比較ゲノミクスにより以前我々の

研究室で見出した、AIG1 family protein (EHI_176590): 以降 AIG1-17、の ORF が台湾株にどの程度存在するのか、ゲノム DNA を鋳型にした PCR により検討した。AIG1-17 は非病原性株に存在していない ORF として同定されたため、台湾株でも無症候性株には存在せず、患者由来の株に存在がみられることが期待された。クラス A, B, C それぞれから DNA サンプルが残っているものを優先に 14、20、4 サンプルから PCR を行ったところ、各クラスで 1、5、2 の陽性クローンが確認された。この結果を症状別に整理すると無症候 29、下痢症状 5、肝膿瘍 2、その他 2 のサンプルのうち、陽性であったのは無症候 4、下痢症状 2、肝膿瘍 0、その他 2 であり、%で見ると無症候 14、下痢症状 40、肝膿瘍 0、その他 100 であった。

以前無症候株で欠損しているとして同定された AIG1-17 の ORF を PCR にて確認したところ、台湾の無症候株から 14%検出された。よってすべての無症候株に共通の特徴ではないと考えられた。しかしクラス A に関しては PCR を行った 14 サンプル中 1 サンプルのみポジティブであり、20 サンプル中 5 サンプルがポジティブだったクラス B とは差があると考えられた。よって AIG1-17 の存在が赤痢アメーバの系統に依存する可能性が示唆された。今後サンプル数を増やし、検討を重ねる必要がある。

2) 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

2-1) AIG1-17 強発現株の作成。

トランスフェクションと薬剤 (G418) 選択により $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ G418 に耐性の HA 株、AIG1-17-HA 株を確立した。

2-2) AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。
AIG17-HA 株には多くの protrusion が観察された (図 1)。

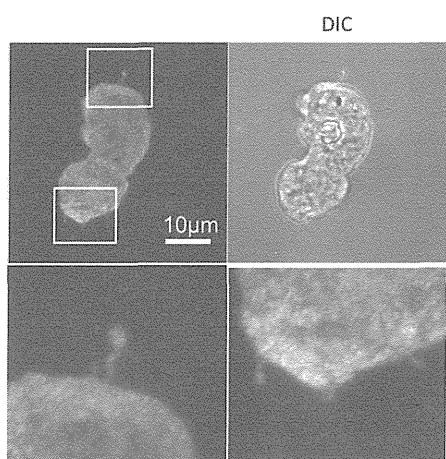


図 1. AIG1-17-HA の protrusion
そこで研究方法に記述した基準に合った protrusion の数を 60 細胞について 3 回計測した。この結果、HA 株に比べ AIG1-17-HA 株で有意に protrusion の数が増していたことが明らかとなった ($P < 0.01$) (図 2.)。よって AIG1-17-HA 発現は細胞骨格の制御に関与があると考えられた。

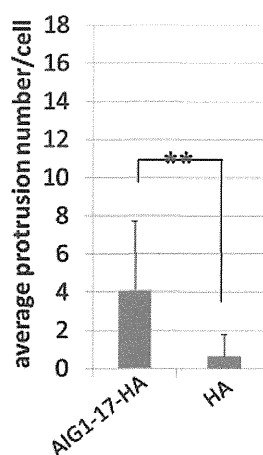


図 2. 一細胞当たりの protrusion 数

2-3) AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。
AIG1-17-HA 株と HA 株の細胞運動を数値

化し、20 細胞程度の観察を 4 回行い比較した。しかし HA, AIG1-17-HA 株どちらも $0.6\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の移動能力を示し、有意差は見られなかった。よって AIG1-17 は細胞運動への関与は少ないと考えられた。

2-4) AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

通常培地とシステイン除去培地での細胞増殖を検討した。下に示すように通常培地で HA 株、AIG1-17-HA 株に差は見られなかったが、システイン除去培地で 120 時間の培養の後、AIG1-17-HA 発現株で HA 株より増殖が改善する傾向が見られた (図 3)

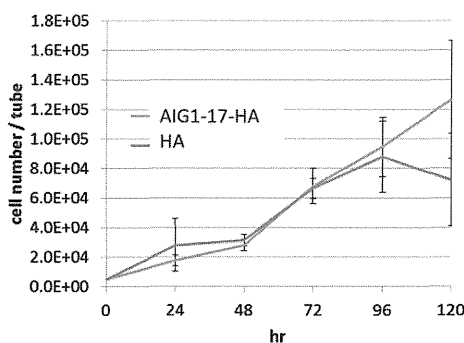
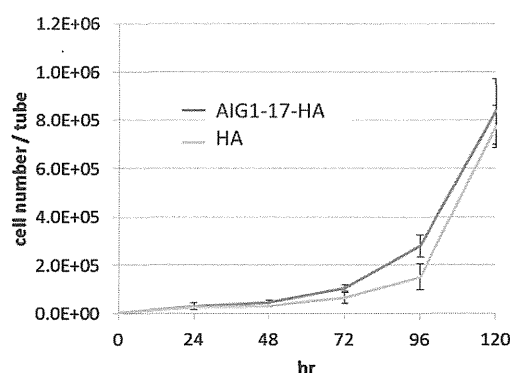


図 3. 通常培地 (上) とシステイン除去培地 (下) での増殖曲線

よって AIG1-17-HA 強発現により酸化ストレス条件下での増殖が改善する可能性が示された。

以上より、AIG1-17の強発現は細胞運動に関与はないものの、protrusion形成が促進されること、システイン除去培地での増殖が改善する傾向を示すことが明らかとなった。赤痢アメーバの病原性にはさまざまな表現型が関与することが知られている。AIG1-17が全ての表現型を強く変化させるわけではないが、ストレスに強い傾向や細胞骨格の活性が強い傾向が協調的に働き、宿主組織内での生存に有利であったり、侵襲性を増す表現型へと向かわせることが考えられた。引き続き細胞骨格の変化が関与すると考えられる表現型、貪食・細胞接着について検討を行う。

3) 台湾での臨床分離株の確立と解析

3-1) 台湾での臨床分離株確立

2013年10月、台湾で分離培養に成功した二株の供与を受けた。TC1146株とTC1198株。両者とも*Crithidia fasciculata*(Cf)と共培養されていた。

日本での培養も順調に開始され、ゲノム解析に向け、Cfを除いた培養を確立すべくCf量を減らした培地での培養を開始している。

3-2) 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

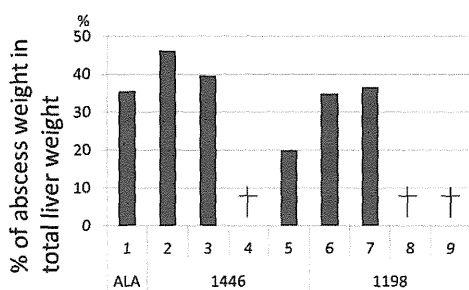


図4. TC1446株、TC1198株のALA形成

TC1146株とTC1189株をシリアンハムスター肝臓に 1×10^6 細胞/匹摂取し、7日後のアメーバ肝膿瘍(amoebic liver abscess: ALA)の大きさを評価した(図4)。

陽性コントロールであるALA株が肝臓の35%程度の大きさの膿瘍を形成した一方、二つの台湾株もTC1446株の一つが20%程度であった以外、全ての動物で35~45%程度のALAを形成した。図4で十字で示した動物は手術翌日に志望した個体であり、摂取した株の病原性が高かったことを示すと考えられる。

以上より、今回台湾より供与された非病原性株はハムスターに対してALA形成能を有していた。これはヒトへの病原性とハムスターへの病原性が異なる、または腸管と肝臓への病原性が異なるという二つの可能性があると考えている。今後腸管への病原性の評価方法を確立する必要がある。一つはマウスの盲腸へ接種して腸アメーバ症を模した病態を作らせるマウス腸管モデルでの評価、もう一つはまだ確立途中であるが、屠殺されたブタの大腸を用いたex-vivoでの評価系があり、これらを用いた検討を考えている。

台湾で無症候性患者からの赤痢アメーバ株が確立できるようになったことは大きな進歩であった。今後ヒトに症状を示さない赤痢アメーバ株の解析を、特にAIG1-17に注目しながら展開していきたいと考えている。

D. 健康危険情報

該当なし

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

Kumiko Tsukui: Unique genomic features of an *avirulent Entamoeba histolytica* strain found in Japan

The eighth Japan-Taiwan symposium on Antibiotics resistance and foodborne diseases, October, 2011, Tokyo, Japan

Kumiko Tsukui, Genomic features of *Entamoeba histolytica* Japanese clinical isolates The 9th Taiwan-Japan Symposium on Preparedness, Surveillance and Response to New Emerging, Re-emerging Infectious Diseases and Infectious Diseases Associated with Disaster, September, 2013, Taipei, Taiwan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in *comparative* genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases & Cooperative Project Report, September 12-13, 2013, Tokyo, Japan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in *comparative* genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi

Nozaki, 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and Parasitic Diseases, February, 9-13, Dhaka, Bangladeshi

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし