

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 0 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、O 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、すべての箇所での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 による非特異的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	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	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 から返送されたレポート数と我々のラボで得られたレポ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

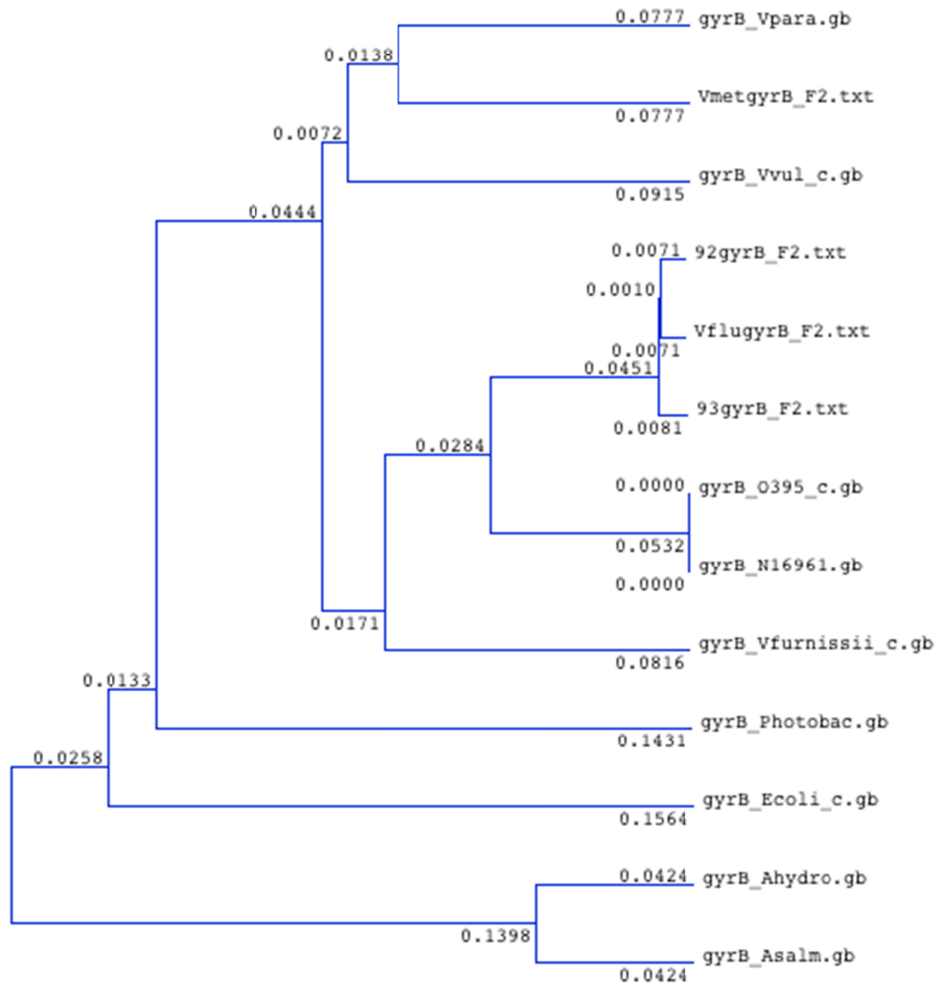


図1 オキシダーゼ陰性の *V. fluvialis* の *gyrB* シークエンスによる解析。

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*)