

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的 医薬品等開発推進 研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「腸内細菌の molecular typing に関する研究 - ベトナム」

担当責任者 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細菌性感染症を対象に遺伝子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コレラ菌、赤痢菌、サルモネラなどの解析を行った。

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。起因菌の検出および同定試験を補助する遺伝子検査法の検討を行う。さらに必要に応じて、当該国の能力向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

使用する分子タイピング法としては、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）、multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)および multilocus sequence typing (MLST) などであり、対象菌種に応じて適宜活用する。得られた結果は感染研細菌第一部の in house データベースと比較照合シンドログラム、minimum spanning tree (MST) などを用いて解析する。

LAMP 法は市販の増幅キットおよび蛍光・目視検出試薬を用いた。

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に脅威であり、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モリスクとなりえる。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。

当該国では 2010 年以後、コレラの流行は沈静化しているが、コレラ菌の検出法の普及は当該国の主要命題の一つである。そこで、本年度は LAMP 法の導入について検討した。LAMP 法は 65 前後の一定温度で DNA を増幅する技術であり、PCR と異なりサーマルサイクラを必要としない。そのため、試験設備の脆弱な地方での医療センターにおいても実施可能である。既報のプライマー情報(BMC Microbiol. 2008 Jun 12;8:94.)に基づいて当該カウンターパートのラボで実施可能であることを確認した。

なお、本法はコレラ毒素遺伝子(*ctx*)を標的としており、純培養であれば 1 コピー程度から検出可能である(図 1)。現在、*V. cholerae* の環境調査を実施しており、その検出法は MPN-PCR による定量を行っている。LAMP 法を組み合わせることで最初に定性試験を行い、陽性のものについて MPN-PCR 法にて定量を行う系を計画している。そのために、*ctx* 以外の遺伝子を標的とする LAMP 法の開発検討を考案中である。

2014 年 11 月にディエンビエン省にて集団事例が発生した。詳細は不明だが、患者数は 10 名前後と見られ、死亡者が 1 名発生した。本事例関連者から赤痢菌およびサルモネラが検出された。本件については、当所赤痢菌が患者および食品から 3 株検出されたが、遺

伝子検査から 2 株は赤痢菌ではないことが判明した。1 株について、MLVA を実施し *S. flexneri* 2a/2b を含むクラスターに分類されることが判明した(図 2)。また、サルモネラは無症状者から 2 株分離された。遺伝子検査からこれらはいずれも *Salmonella* I 4:- で血清型 Typhimurium の単相菌であることが推測された。当該菌の MLST の結果は両株とも ST34 であり、MLVA においても一致し、単相菌が含まれるクラスターに分類された(図 3)。本事例は当該カウンターパートのアウトブレイク発生時の対応について、検討の余地があることを示唆するものであった。また、遺伝子検査により、菌種同定、血清型推定、菌株間の関連性を示すなど、今後の体制構築に関して貴重な情報となった。

D. 結論

LAMP 法の有用性が示された。今後 *V. cholerae* の検出法を中心に LAMP 法の拡充を図っていき、環境調査および患者調査への利用を目指す。コレラ菌以外の腸管細菌感染症起因菌について、アウトブレイク対応を主眼においた試験研究体制の構築について検討していく。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

特になし

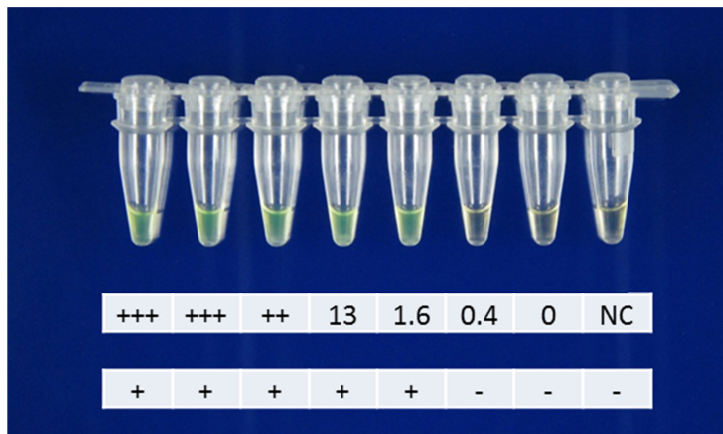


図1 . ctx-LAMP 法の実施例。上段は各チューブに接種した菌量を表す。下段は試験の判定結果；陰性（-）、陽性（+）を表す。

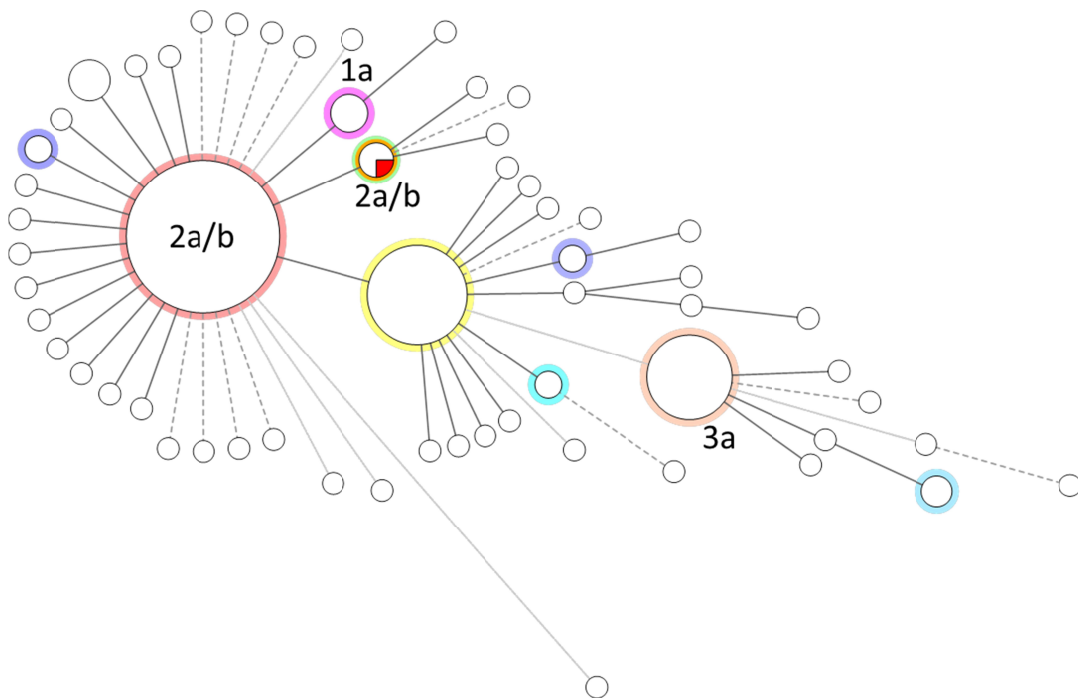


図2 赤痢菌(*S. flexneri*) MLVA24。2014年ベトナム分離株を赤で示す。double locus variantを1つのクラスターにまとめてある。“2a/b”などはクラスターで大勢を占める血清型を表す。

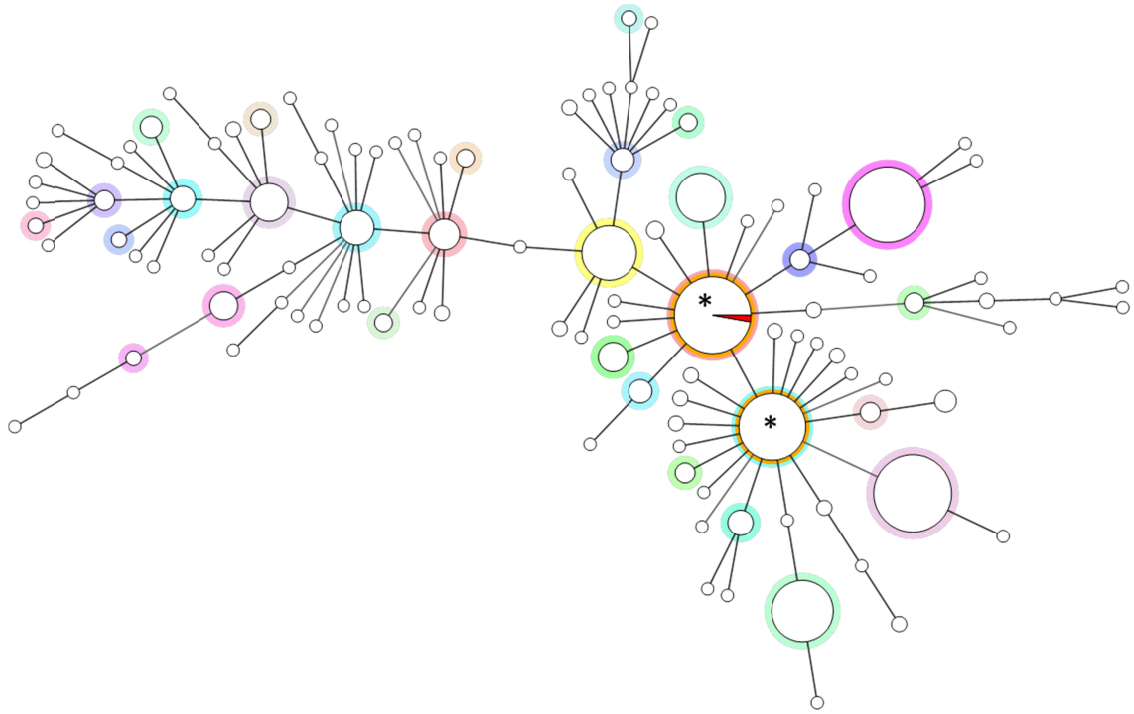


図 3 . サルモネラ MLVA6。2014 年ベトナム分離株を赤で示す。single locus variant を 1 つのクラスターにまとめている。*、主要な *S. I 4:i:-* を含むクラスター。