

## 下痢原性病原細菌に関する研究

国立感染症研究所 細菌第一部

担当責任者 氏名 大西 真

研究協力者 森田昌知

研究協力者 泉谷秀昌

研究要旨 下痢原性病原細菌に関し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を取得し、系統解析、病原因子プロファイリング、抗原合成遺伝子系の体系的解析の研修を企画し、実行した。コレラ菌、赤痢菌に関して、ベトナム、タイ、インド、フィリピンの研究者を国立感染症研究所に招いて、ゲノム DNA 調整ならびに次世代シーケンサー解析のためのライブラリー作りを研修した。また、既存の分子タイピングの実際を経験し効率のよいゲノム解析を実施する技術を研修した。

### A．研究目的

下痢原性病原細菌の国際間伝播の様式を理解することが、国内の細菌性下痢症の制御に重要である。細菌の分離・同定、それに続く性状解析技術から得られた情報を比較解析することが主となってきた。近年、DNA 塩基配列決定とその比較解析や、より簡便な DNA 塩基配列多型を DNA 増幅とサイズ比較等で行うことが主流となりつつある。前者の比較解析は、血清型、ファージ感受性型、薬剤感受性型等があり従来からの知見が蓄積されている利点がある。一方で後者は系統を反映することから、変化速度を詳細に設定出来る可能性があり、より詳細な世界的な拡散の様子をトレースすることが可能となりうる。地域内、地域間の菌株比較が可能となることで、各地での対策、地域を超えたより国際的な対策立案に資することが可能となる。

DNA 塩基配列多型を最も広範に実施することが、DNA 塩基配列決定の技術革新（次世代

シーケンサーと一般には称される）により可能となってきた。また、ランニングコストの低減で、ハイスループット化も可能となりつつあり、海外研究機関との大型共同研究も各地で進められている。本研究では、JGRID 拠点をもつ複数の大学との連携を強化する目的で、下痢症細菌のゲノム調整プロトコールの共通化とその技術研修を実施すること、次世代シーケンサーの共通利用促進のための技術研修を実施すること、さらに解析対象菌株の選定のための従来法での比較解析について、研修を実施することを目的とした。

### B．研究方法

菌株は、国立感染症研究所に保存されているコレラ菌、赤痢菌を利用した。常法に従い培養を行った。

コレラ菌ゲノム DNA は、LB 寒天培地で培養した菌体を DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) キットを用いて調整した。菌量と、

RNase 処理について添付プロトコールと異なる方法を用いた。

ILLUMINA MiSeq 解析は、Nexta XT DNA 調整キット、Nextera インデックスキットを用いてゲノム DNA のインデックス化と調整を行った。MiSeq における塩基配列決定は、ILLUMINA 社のインストラクトに従って実施した。

## C. 研究結果

### 1 コレラ菌ゲノム解析研修

期間：平成27年2月2日～13日

研修参加者：

- 1 今村大輔（岡山大学インド感染症共同研究センター）
- 2 岡田和久（大阪大学 日本・タイ感染症共同研究センター）
- 3 竹村太地郎（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点）
- 4 NGO Tuan Cuong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点 National Institute of Hygiene and Epidemiology, NIHE）
- 5 TRAN Thi Luong（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 6 NGUYEN Hai Tuan（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）
- 7 PHAM Duc Tho（長崎大学 アジア・アフリカ感染症研究施設 ベトナム拠点, NIHE）

コレラ菌16株についてゲノム DNA を取得し、ILLUMINA MiSeq による配列決定を行った。それぞれの国で分離株をそれぞれが調

整し、解析を実施した。また、得られた配列の品質評価法について研修した。品質評価をクリアした配列生データを利用して、系統解析を実施した。

## D. 考察

ゲノム DNA を取得し ILLUMINA MiSeq 解析を実施し、期間内に解析の流れの一連を各人が研修することができた。次世代シーケンサーは高価な機器であり、現状では各研究施設に配備することは困難な面もある。また、その保守については、特に発展途上国においては、万全な体制が整っているとはいえない。

海外研究機関において分離された株のゲノム配列情報を所得するためには、3つの方策が考えられる。

- 1) 海外研究機関から国立感染症研究所に菌株を輸送し、国立感染症研究所においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定・解析の全てを実施する。
- 2) 海外研究機関においてゲノム DNA を取得し、ゲノム DNA を国立感染症研究所に輸送し、国立感染症研究所において、解析 DNA 調整、配列決定・解析を実施する。
- 3) 海外研究機関においてゲノム DNA 取得、解析 DNA 調整、配列決定を実施する。他地域との比較解析のためには、決定された配列情報を国立感染症研究所に設置するデータベースに格納して解析する。

1)においては、病原体輸送にコストがかかることが問題であり、迅速な解析が難しい。次世代シーケンサーが設置可能な研究機関では、3)の方策が可能である。また、設置不能であるか、あるいは保守が困難な場合には、2)ゲノム DNA を輸送することで(菌株の輸送に比較して簡易である)ゲノム配列の取

得が可能となる。

本研修において、2)および 3)が実施できる体制が整いつつあることが認識された。また、今村博士、岡田博士、竹村博士に関しては国立感染症研究所の協力研究員として登録することで、自らの研究を進展させるためにも、国立感染症研究所の機器を利用することが可能である。

赤痢菌性状解析に関する研修(開催予定時期  
3月2日～6日)

Mark Philip Bugayong (Research Institute  
for Tropical Medicine, 東北大)

既に研修にもちいらフィリピン分離赤痢菌  
25株の輸送の準備が整っている。本研修  
においては赤痢菌の分子型別ならびに薬剤感  
受性試験に関する研修の依頼があり、その準  
備を整えている段階である。

#### E . 結論

今後の、海外研究機関等と国立感染症研究  
所との感染症に関する共同研究および連携  
強化の流れのなかで、様々な手段において迅

速にゲノム配列情報を集積することを可能  
とする道筋が、本研究によって明らかにされ  
たと考える。研究者の交互の交流と、技術の  
共有化を押し進めて行くことで、共同研究の  
進展の原動力となりうる。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他