

## 資料

# Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)を用いた

## *Shigella sonnei*のクラスター解析の試み

市原祥子・竹中重幸・江藤良樹・濱崎光宏・村上光一・堀川和美・泉谷秀昌\*

当所に搬入された *Shigella sonnei* のうち、保育所で発生した集団感染事例株5株（うち3株は家族由来株）及び渡航歴のあるヒト由来5株の計10株について multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) によるクラスター解析を試みた。その結果、10株は9種類のクラスターに分類された。保育所関連株は互いに一遺伝子座のみリピート数が異なるだけで、近縁のクラスターを形成した。異なる地域への渡航歴のあるヒト由来株は、すべて異なるクラスターを形成した。今後、MLVA により *S. sonnei* の疫学的関連性を解析する上で有用な情報を得ることができると考えられた。

[キーワード: *Shigella sonnei*, multilocus variable-number tandem-repeat analysis]

### 1 はじめに

*Shigella sonnei* は細菌性赤痢感染症の中で最も多く分離されており、食品媒介性感染や海外渡航と関係があると報告されている<sup>1), 2)</sup>。例えば、日本国内における2007年から2011年までの赤痢菌分離報告数は497件あり、国内例282件のうち231件(81.9%)、海外例215件のうち157件(73.0%)と多くの部分を占めた。さらに、2007年から2010年までの、当所への赤痢菌搬入数は17件であり、そのうち *S. sonnei* 14株(82.4%)と大部分を占めた。このように、*S. sonnei* がもっとも原因として多いため、その動向を調査することは公衆衛生学上重要である。

*S. sonnei* の疫学調査の指標として、一般的にパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed field gel electrophoresis; PFGE) が用いられるが、一部の施設では、コリシン型別法も利用され、当所においても実施している。近年 PFGE と原理の異なる multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) も応用されている。MLVA は菌種によって違いはあるものの、PFGE と同等あるいはそれ以上の識別能力をもち、大腸菌や髄膜炎菌などいくつかの病原体について応用されている<sup>4), 5)</sup>。*S. sonnei* の東南アジア等の輸入例を中心に、類似の PFGE パターンが観察されることがあり、国立感染症研究所では、PFGE に加えて MLVA による遺伝子型別を実施<sup>6)</sup>し、MLVA でも地域間の関連性

を示唆するクラスターを形成することが報告されている<sup>7)</sup>。そこで、近年当所に搬入された *S. sonnei* について、疫学的関連性を解析を行い、併せて本法の有用性を評価するため、従来から実施しているコリシン型別法に加えて MLVA による型別を試みたのでその結果について報告する。

### 2 材料及び方法

#### 2・1 材料

供試菌株は2008年から2010年にソネ赤痢菌感染者から分離され、当研究所に搬入された10株(1人1菌株)を用いた。供試菌株の詳細を表1に示す。08S015、08S16、08S017、08S22 及び 08S23 は保育所で発生した *S. sonnei* 集団感染事例関連株である(08S015、08S16 及び 08S017 は同一家族)。09S03 はインド、09S04 はカンボジア、09S07 はタイ、09S08 はカンボジアとベトナム、10S19 はヨルダンへ渡航歴があった。これら5株は渡航歴があること以外は共通点は認められなかった。

#### 2・2 方法

同定は生化学性状および菌体抗原(O抗原)を用いた血清学的性状により実施した。また、病原遺伝子 *invE* 及び *ipaH* の確認試験は、polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて行った。プライマーは、特殊細菌検出用 Primer Set INV-1/2 と IPA-1/2(タカラバイオ、大津)を用いた。また、反応条件はプライマーの使用説明書に従った。コリシン型別試験は、微生物検査必携 細菌・真菌検査(第3版、日本公衆衛生協会、東京)に従った。

福岡県保健環境研究所(〒818-0135 太宰府市大字向佐野39)

\*国立感染症研究所細菌第一部

(〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

MLVA に用いた DNA の調整は、TSB 寒天培地上に発育した *S. sonnei* の加熱処理液を TOHO クリーンカラム (バクテリア DNA 用 06303x0、トーホー) を用い、キットの使用説明書に従って行った。また、赤痢菌標準 DNA は、国立感染症研究所より分与されたリピート数既知の DNA : R1~R7 及び R-A を用いた。

マルチプレックス PCR は 7 種類の蛍光標識したプライマーを用いた<sup>7)</sup>。泳動はシークエンサー (3130xl、Applied Biosystems) を用いて実施した。各プライマーで増幅された産物のリピート数の解析は、Gene Mapper (Applied Biosystems) 及び BioNumerics Version 6.0 (Applied Maths) を用いた。

### 3 結果及び考察

生化学性状および菌体抗原 (O 抗原) を用いた血清学的性状により、10 株はいずれもソンネ赤痢菌 (*S. sonnei*, D 亜群) と同定した。 *invE* が不検出であった 10S019 を除き、その他の株はすべて *invE* 及び *ipaH* が検出された(表 1)。

コリシン型と MLVA のクラスター解析の結果を図 1 に示す。コリシン型は、8 株が 9A 型、1 株が 7 型、1 株が 12 型で 3 タイプに分類された。

MLVA の結果から、本試験に用いた 10 株は 9 パターンに分けられた。また、レファレンスと同じリピート数の株は認められなかった。渡航歴のないヒト由来株 5 株は、同一保育所で発生した集団発生事例関連株であった。08S15、08S22 及び 08S23 は園児で、08S016 及び 08S17 は 08S15

の家族であった。これらの株はいずれも、互いに一遺伝子座のみリピート数が異なるだけで、近縁のクラスターを形成した。一方、渡航歴のあるヒト由来株のうち、東南アジアに渡航歴にあった 09S07、09S04 及び 09S08 と、南アジア及び中東・西アジアに等歴のあった 09S03 及び 10S19 は離れたクラスターを形成した。今回は 10 株の解析であったが、疫学的関連性と相関すると推察される結果が得られた。

今後、*S. sonnei* の分子疫学的解析法の一つとして MLVA を実施することにより、疫学的関連性を解析する上で有用な情報を得ることができると考えられた。

### 文献

- 1) Chiou CS, Watanabe H, Wang YW, *et al.*, J Clin Microbiol. 2009. 47. 1149-1154.
- 2) Liang SY, Watanabe H, Terajima J, *et al.*, J Clin Microbiol. 2007. 45. 3574-3580.
- 3) 病原微生物検出情報, (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-lj.html>).
- 4) Liao JC, Li CC and Chiou CS. BMC Microbiol. 2006. 11. 44.
- 5) Noller AC, McEllistern MC, Shutt KA *et al.*, J Clin Microbiol. 2006. 44. 374-377.
- 6) 病原微生物検出情報, 2009. 30. 319.
- 7) Hidemasa I, Yuki T, Kenichiro I, *et al.*, J Med Microbiol. 2009. 58. 1486-1491.

表 1 供試菌株

菌株番号	病原遺伝子		海外渡航歴	
	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>		
08S15	+	+	無し	同一家族 保育所集団発生例
08S16	+	+	無し	
08S17	+	+	無し	
08S22	+	+	無し	
08S23	+	+	無し	
09S03	+	+	インド	
09S04	+	+	カンボジア	
09S07	+	+	タイ	
09S08	+	+	カンボジア、ベトナム	
10S19	-	+	ヨルダン	

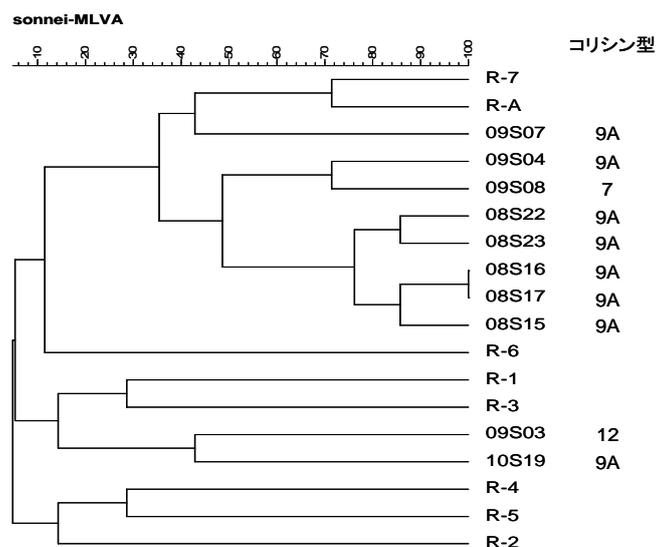


図1 MLVAクラスター解析とコリシン型の結果