

施設紹介 平成17年 フォーラム富山「創薬」第15回研究会

富山県衛生研究所

-健康とくらしの安全を科学する-

-細菌部の取り組み、ゲノムから細菌を見る



富山県衛生研究所・細菌部
副主幹研究員 綿引 正則

細菌部の業務概要

1. 伝染病・食中毒の発生にともなう行政的検査
原因病原体の究明
感染源・感染経路の追及
保菌者検察による流行拡大防止
2. 食品・医薬品・飲料水等の依頼検査
3. 伝染病・食中毒予防のための調査研究
微生物生態学的調査研究
病原性の本体の究明
4. 研修・指導
厚生センター・医療機関検査担当者
製薬会社・食品製造業の製造管理担当者
5. 情報の収集・還元
病原細菌情報の収集と還元
国内・国外の学会情報・文献の収集と紹介

細菌検査

重要なスキル

1. ターゲット細菌を効率的に分離すること
2. 迅速、正確に細菌を鑑別すること

Phenotyping (表現型別)
生化学性状・ファージ型別・血清型別
抗生物質感受性試験

問題点

1. 育の長時間増殖
2. 病原性とは直接関係のない代謝産物が対象
3. 発現状況の変化・突然変異

Genotyping (遺伝子型別)
プラスミドプロフィール解析法・PCR法・PFGE法
塩基配列決定

DNA同定法 (遺伝子型を指標とした検査)

1. DNAプローブ法とPCR法
2. 病原因子等の特異的な遺伝子を検出する
3. 細菌の一般的な同定分類への利用

問題点

1. 染色体DNAへの外来遺伝子の取り込み
2. 検査コスト

細菌ゲノム解析の進展

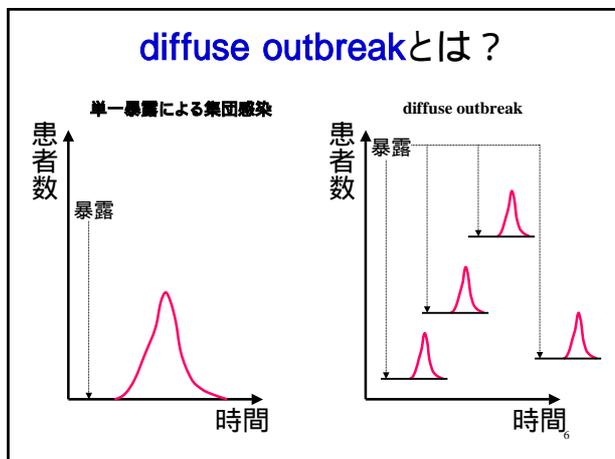
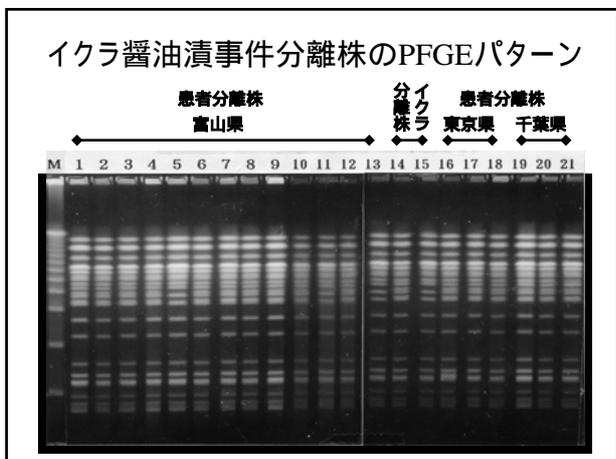
新しい検査法の予感

膨大な細菌ゲノム配列情報を細菌検査や公衆衛生に活かしたい!

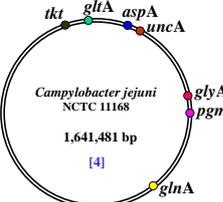
細菌部に保管されている臨床、環境株を用いた細菌の比較ゲノム学的手法を用いた調査研究

1998年大腸菌O157感染症広域散発事件の概要

日付	富山県	東京都	神奈川県	その他の府県	北海道
5月		O157発生 (寿司屋調査)	O157発生	千葉、山梨	
5月26日	O157発生 (A寿司店疑い)				
6月3日	O157発生 (B寿司店疑い)				
6月11日	小学生O157発生 (C寿司店疑い)				
6月14日	小学校検疫 (600名) 2名陽性 イクラを疑う DNAパターン一致				
6月16日	北海道に調査依頼				製造業者立入り調査など
6月17日	事件を公表 3寿司店営業停止処分	患者5人イクラ寿司を喫食と発表 北海道に調査依頼	富山県の発表を受け、イクラ調査開始		イクラ出荷状況調査 イクラ醤油漬製品 自主回収指示
6月18日	北海道・製造業者名公表	寿司店等12,940施設に立入り、調査・回収指導		千葉県、寿司店営業停止処分 北海道に調査依頼	営業自粛指示 全国各自治体に調査依頼
20日以降	(23日)イクラからO157検出。患者由来株とDNAパターン一致		(20日)イクラからO157検出 (23日)DNAパターン一致	(30日以降)山梨、横浜市、茨城県DNAパターン一致	(20日)イクラ醤油漬回収命令 (22日)営業停止命令 (24日)後、調査継続



カンピロバクター-MLST



Campylobacter jejuni
NCTC 11168
1,641,481 bp
[4]

MLSTの利点

1. ハウスキーピング遺伝子(7遺伝子)の配列多型解析による型別によるサーベイランスが可能
2. 地域的あるいは全世界的なレベルで、特定細菌の定量的なクローン解析が可能

MLSTの作業工程

1. ゲノムDNA抽出
2. PCRと増幅物の精製
3. サイクルシーケンス法による塩基配列決定
4. 解析

カンピロバクター MLSTのターゲット遺伝子

Target genes	Structure of Gene and PCR and Sequencing	Amplicon size (bps)	No. of allele*
aspartase (<i>aspA</i>)		940	83
glutamine synthetase (<i>glnA</i>)		1,304	112
citrate synthase (<i>gltA</i>)		1,111	83
serine hydroxy methyl transferase (<i>glyA</i>)		1,051	120
phospho glucomutase (<i>pgm</i>)		1,132	155
ATP synthase α subunit (<i>uncA</i>)		1,194	70
transketorase (<i>tkt</i>)		1,258	123

*http://pubmlst.org/campylobacter/

カンピロバクター 分離株のMLST解析

分離株番号	由来	遺伝子型				
		<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>t</i>
Cj#9	鳥糞A (平成3年)	2	1	1	10	
Cj#69	市販鶏肉A	2	17	73	2	
Cj#70	市販鶏肉A	2	17	1	2	
Cj#87	鳥糞B (平成16年)	9	25	2	10	
Cj#115	市販鶏肉B (平成16年)	2	17	2	10	
Cj#122	市販鶏肉C (平成16年)	9	30	2	2	
Cj#136	市販鶏肉D (平成16年)	9	25	2	10	



MLST解析により、食中毒分離株と同一の遺伝子型を示す株が市販の鶏肉に存在することを検出した。

腸炎ビブリオ分離株の比較ゲノム学的解析

腸炎ビブリオのゲノム構造 (Makino, K., et al. Lancet 361:743-749, 2003)
 染色体2つ、食中毒には*dh*あるいは*trh*毒素遺伝子が関与。他の病原性因子については、不明の点が多い。
 VPマリン事業：漁港海水中の腸炎ビブリオ数の定量

腸炎ビブリオ分離保存株	
海水由来	184
ヒト(食中毒)由来	262
魚	4
その他	69
合計	519

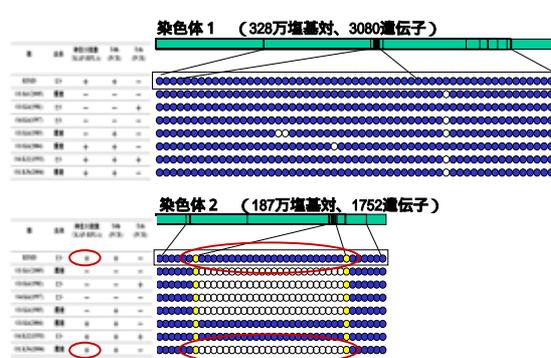
1970 ~ 2004年

これらの株の病原性因子の比較解析研究は、本菌の病原性に関する研究や、環境中のサーベイランスに有効である。

腸炎ビブリオ分離株のPCRゲノムスキャン解析

染色体1 (328万塩基対、3080遺伝子)

染色体2 (187万塩基対、1752遺伝子)



細菌部の今後の方向性

ゲノムから細菌を見る、ゲノムから環境を見る、細菌からゲノムを見る、環境からゲノムを見る、そして、最後に細菌からヒトを見る。

- 調査研究の重要性
 - 迅速、正確な細菌検査
 - 新しい検査方法の導入・開発
 - 細菌ゲノム配列の利用
 - 細菌の地域における系統解析、データベース化による情報の利便性向上
 - 情報のグローバル化
 - 食品、環境中のモニタリングから流行予測へ
 - 地震予知とは異なる流行予知は可能か?
 - 危機管理に応用