

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

新興する細菌性腸管感染症の診断・治療法の開発と

発生動向調査に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名取泰博

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
新興する細菌性腸管感染症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究 主任研究者 名取泰博	1
II. 分担研究報告書	
1. 腸管出血性大腸菌感染症の新規治療法の開発 主任研究者 名取泰博	10
2. ビブリオの分類 分担研究者 島田俊雄	14
3. 腸炎ビブリオの分子疫学 分担研究者 荒川英二	18
4. 腸管における細菌感染の抑制 分担研究者 土肥多恵子	23
5. 新型コレラ菌を含むコレラの発生動向調査 分担研究者 山崎伸二	26
III. 研究結果の刊行に関する一覧表	29

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

総括研究報告書

新興する細菌性腸管感染症の診断・治療法の開発と発生動向調査に関する研究

主任研究者 名取泰博 国立国際医療センター研究所 臨床薬理研究部長

研究要旨

いくつかのビブリオ属病原菌についてその血清型の調査を行い、コレラ菌の 12 の新しい血清型 (O195-O206) 及び *V. vulnificus* の 11 の新しい血清型 (O8-O18) を同定した。また新しい下痢原性菌 *V. hollisae* は他のビブリオとは異なり、胆汁酸塩に感受性が高く、TCBS 寒天には発育できないことを鑑み、臨床材料および海水や魚介類から *V. hollisae* を分離するための新しい選択鑑別培地、SDS マンニット寒天培を考案した。一方、1993 年頃から急増した腸炎ビブリオによる食中毒は、それまで国内で主流を占めていた血清型 O4:K8 ではなく、ほぼ同時期に世界的に流行の見られた血清型 O3:K6 であったことから、輸入例及び過去の国内事例との比較のためにパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法を用い、菌のゲノム全体を対象とした解析を行った。その結果、血清型の異なるものではその PFGE 型は全く異なっており、血清型が同じであっても輸入例や過去に国内で見られた事例とは明らかに異なったパターンが認められ、PFGE による解析が極めて有効であることが明らかになった。オリゴ糖腸管内投与による細菌感染症の予防・治療法の開発を目指して、ヒト消化管粘膜由来膜画分に対するコレラ菌粘着能アッセイシステムを作成し、最長 6 糖からなる様々な血液型関連精製オリゴ糖により、O139 コレラ菌の小腸膜画分への接着を阻害することが出来た。さらに、腸管出血性大腸菌感染症に対する新しい治療法開発のためにペロ毒素中和活性を有する新規化合物・Super Twig の個体における中和の機構を調べた結果、同化合物が肝や脾のマクロファージによるペロ毒素の取込み及び分解を促進することにより、毒性を中和・除去することが示唆された。これらの機構は抗体による中和・除去と類似しており、Super Twig が人工抗体として利用できる可能性が考えられた。

分担研究者

島田 俊雄 国立感染症研究所
細菌部腸管系細菌室 室長
荒川 英二 国立感染症研究所
細菌部腸管系細菌室研究員

土肥多恵子 国立国際医療センター研究所
消化器疾患研究部 部長
山崎 伸二 国立国際医療センター研究所
適性技術開発研究室 室長

A. 研究目的

本研究では腸管出血性大腸菌、新型コレラ菌及び腸炎ビブリオなどによる腸管感染症を対象とし、それらに対する新しい診断・治療法の開発とその発生動向を明らかにすることを目的とする。

最近の分子疫学的解析から、多くの細菌感染症では過去に流行した同一株が再び広がるのではなく、様々な変異を経て新たな流行株が派生することが明らかとなっている。そこでコレラ菌についてエンデミックな地域での系統だった発生動向調査を行うことにより、O139 のような新たな流行株の早期発見やその特徴の把握を試み、それらに対する対策を早期に講じて途上国での流行の広がりを未然に防いで世界的な伝播を阻止することを目指す。一方腸炎ビブリオについては、O3:K6 が 1996 年頃から突然に我が国を含めた世界各地で検出されたことから、この菌株を過去に分離された O3:K6 及び他の血清型と比較し、分子疫学的な解析を行うことが有用であろう。

一方、細菌性腸管感染症に対する現在の治療法は抗生物質以外是对症療法に限られ、疾患の原因となる毒素を標的とした治療法はない。腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは同菌の産生するペロ毒素が引き起こす。従って感染後でも体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発されれば、重症例や死亡例の減少が期待される。ペロ毒素はコレラ毒素と同様に細胞表面の糖脂質糖鎖のクラスターを受容体とし、細胞内で毒性を発揮して病気を起こす。本研究はペロ毒素受容体糖鎖のクラスター構造を持つ中和剤を用いた治療法の開発を目指

す。一方糖鎖は細菌の腸管粘膜への定着にも関与し、さらに消化管免疫能を修飾すると考えられることから、oral rehydration solution や人工乳に加えたときに腸管感染抑制効果のあるオリゴ糖の種類と量を決定することを目指す。これは軽症患者から重症患者まで応用可能で、かつ安価で安全な治療法となると期待される。上記の腸管感染症、特に腸管出血性大腸菌感染は新興感染症として国民に広く不安を与えており、有効な重症化阻止法は社会に貢献すると考えられる。

B. 研究方法

抗血清の作製、凝集テストおよび凝集素吸収テストは Shimada et al (1994)の方法に準拠した。診断用抗血清は全て R 抗体を吸収したものを、また凝集テスト用 O 抗原には加熱 (100℃、1 時間) 後、遠心洗浄した菌を使用した。PFGE は Arakawa らの方法に準じて施行した。PCR 反応液は常法通りの組成で、耐熱酵素は Taq DNA polymerase (Promega)を使用した。ウレアーゼ試験は常法通り行った。

Gb3 糖鎖を 3, 6 及び 12 個有する Super Twig (0)3, Super Twig (1)6, Super Twig (1)12 を合成し実験に用いた (括弧内の数字はコアの世代数を表わす)。致死量 (5ng) の 2 型ペロ毒素をマウスに投与する際に、予めあるいは同時に Super Twig をマウスに投与することにより、Super Twig の中和活性を測定した。マウスにおけるペロ毒素の臓器分布及び細胞レベルにおける毒素の代謝はアイソトープ標識ペロ毒素及びウサギ抗 2 型ペロ毒素ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法によって調べた。ヒ

ト小腸粘膜へのコレラ菌粘着能アッセイはヒト剖検標本より採取した小腸粘膜を用いて行い、オリゴ糖による阻害実験は予め菌体をオリゴ糖と10分間インキュベートした後に粘着能アッセイを行った。

C. 研究結果

1. *V. hollisae* の新しい選択分離培地、SDS マンニット寒天培地の開発

SDS マンニット寒天培地上での *V. hollisae* の集落は直径約2mmの暗紫色、半透明である。稀に *V. vulnificus* の中にマンニット分解性の菌株があり、それらでは *V. hollisae* と類似の集落がみられる。一方、マンニットを分解する腸炎ビブリオやコレラ菌を始めとするその他のビブリオはやや大きい黄色集落を作り、その色調によって *V. hollisae* を他の菌から容易に鑑別することができる。多くの腸内細菌やグラム陽性菌はほとんどが発育を阻止されるが、*Proteus* の中には発育を阻止されないものもある。しかし、その集落は灰緑色である。*Proteus* のスォーミングは阻止される。腸球菌にも菌株によって発育するものもあが、その集落は小さく、白色でやや乾燥しており、また多くの緑膿菌は白色の集落を作るので、これらの菌株と *V. hollisae* との識別は容易である。本培地は TCBS 寒天培地と比べその阻止力はかなり弱いので、糞便検体の場合には大量に塗抹することを避ける必要がある。

2. コレラ菌 (*V. cholerae*) , *V. hollisae*, *V. vulnificus* の血清型分類の追加及び発生動向

供試したコレラ菌 non-O1 non-O139 の殆どは既知の血清型に該当したが、32株は既知の血清型の何れの O 抗血清に反

応を示さなかった。型別不明 32 株の代表菌株を用いて免疫血清を作製し、交差凝集テストおよび凝集素吸収テストを行った結果、32 株は 12 の O 群に分けられた。これらの 12 の O 群は新血清型 (O195-O206) としてコレラ菌の抗原構造表に追加した。米国の下痢症患者から分離された *V. hollisae* 5 株は、いずれも同一の O 群 (O1 群) であったが、PFGE による遺伝子解析では、型別不能 1 株、残りの 4 株の遺伝子型はそれぞれ異った (それぞれ A, B, C, D 型と命名)。米国、ドイツ、韓国、台湾、イスラエル、デンマークでヒトの敗血症、魚介類、海水等から分離された *V. vulnificus* 菌株の中に、既知の血清型に該当しない 21 の新しい血清型 (O8-O18) が認められ、抗原表に追加した。

コレラ菌についてのエンデミックな地域としてインドカルカッタ西ベンガル州立伝染病院における発生動向調査を行った。その結果、2000 年の 1 月から 12 月の 1 年間に、検査した下痢便 2028 検体から O1 コレラ菌が 178 株、O139 コレラ菌 40 株、non-O1, non-O139 コレラ菌 87 株が分離された。またコレラの発生は 5 月と 10 月に 2 度ピークがあり、その時期に分離されたコレラ菌のほとんどが O1 コレラ菌であった。しかし O139 コレラ菌や non-O1, non-O139 コレラ菌も一部分離されており、特に 5 月に分離されたコレラ菌のうち、約 23% は non-O1, non-O139 コレラ菌であった。

3. 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) の発生動向

PFGE による解析の結果、腸炎ビブリオ O3:K6 株は A~H に大別され、A はさら

に A1~A16 のサブタイプに分類できることがわかった。1996 年以降に分離された O3:K6 株で tdh+, trh-, ウレアーゼ-を示すものは、その由来にかかわらずすべて A グループに分類されたが、1996 年以前の株は B グループに分類された。また、tdh-, trh+, ウレアーゼ+を示すものは、分離年に関係なく C グループに分類された。tdh-, trh-, ウレアーゼ-を示すものは A、B 以外のそれぞれ別のグループに分類された。他の血清型の菌は O3:K6 のものとはかなり異なる PFGE パターンを示していた。O:K 血清型が同じであればほぼ同じ PFGE パターンを示したが、O 抗原が同じでも K 抗原が異なればその PFGE パターンもかなり異なっていた。しかしながら最近見つかった新しい血清型 O4:K68 は 1996 年以降に分離数の増えた O3:K6 株と全く同様に tdh+, trh-, ウレアーゼ-を示し、PFGE パターンも A グループに分類され、両者は遺伝的に非常によく似た菌株と考えられた。仙台市の分離例では、患者から分離されたものとその原因食品と考えられるポイルシャコの PFGE パターンが完全に一致し、感染源である可能性を強く支持する結果となった。

4. 細菌性腸管感染症に対する新規予防法の開発

菌の粘着に関する実験条件の検討の結果、PVDF 膜にブロッティングするよりマイクロタイタープレートを用いる ELISA 法がより感度よくコレラ菌の粘着を検出できることがわかった。プレートに直接菌体を固相化した場合は数十個から 10 万個までの菌体を定量することが出来た。また小腸膜蛋白を固相化したプレートでも、加えた菌

体数をよく検出することができた。上記の系に 3 糖~6 糖からなる血液型物質関連構造を持つ糖鎖約 10 種類を用いて 50~200 μ M の高濃度で結合阻害活性を解析した結果、H 型、Le 型などフコース含有 2 型糖鎖にカングリオ系列、グロボ系列よりも強い粘着阻害活性が見られた。さらに Fuc α 1-2 結合したラクトースのほうが Fuc α 1-3 結合のものより強い阻害効果の見られる症例があった。

5. 腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法の開発

マウスにおける Super Twig のペロ毒素中和活性を調べた結果、Super Twig (1)6 が毒素の致死活性を完全に抑制することがわかった。2 型ペロ毒素を投与したマウスの小脳や中脳では鬱血や出血像が観察されるのに対して、Super Twig (1)6 を共投与するとこれらの病変がほぼ完全に抑制された。また免疫組織化学的手法により、ペロ毒素単独投与群では脳内の赤血球や血管にペロ毒素の沈着が見られたのに対し、Super Twig (1)6 共投与群ではその沈着が減少していることが明らかとなった。これらの結果から Super Twig (1)6 はペロ毒素の脳への移行あるいは脳での沈着を阻害することにより、ペロ毒素の致死活性を抑制すると考えられた。

Super Twig (1)6 を共投与した場合には、肝や脾へのアイソトープ標識ペロ毒素の分布が増加したが、免疫組織化学的検討では両臓器へのペロ毒素沈着はかえって減少していた。両臓器はいわゆる網内系の組織であり、マクロファージを多く含むことから、これらの臓器のマクロファージがペロ毒素を積極的に取込み、これを分解して抗原性

を失うことが推測された。そこで次にマウス腹腔マクロファージを用いてペロ毒素の結合及び代謝について検討した結果、Super Twig 非存在下ではペロ毒素はマクロファージに結合しないのに対し、Super Twig (1)6 存在下ではマクロファージはペロ毒素を取込み、さらにこれを分解して酸可溶性物として培養液中に放出することが明らかになった。これらの結果から、Super Twig (1)6 は生体内でペロ毒素と結合し、これを肝や脾のマクロファージが貪食・分解することにより、ペロ毒素の解毒が行われると考えられた。

D. 考察

コレラ菌には多数の O 抗原が認められているが、R 抗原は全ての血清型で同一である。コレラ菌の参考菌株で免疫したすべての抗血清中にはかなりの R 抗体が含まれて、このままの血清を希釈したのみで、実際のスライド凝集テストを行った場合には、血清中に含まれる R 抗体による類属反応が強く現れ、正確な血清型別を行うことが不可能である。従って、実際の血清型別に用いる診断用抗血清は、血清中に含まれる全て R 抗体をコレラ菌の R 菌株の参考菌株である CA385 株で吸収する必要がある。エルトールコレラ史上最大の流行となった南米大陸のコレラや、誰しもが予想だにできなかったコレラ菌 O139 "Bengal"による新型コレラの突発など、これからもコレラ菌は新興・再興感染症として、我々に脅威を与え続けることから、今後もこれらの発生を全世界的に監視する必要がある。インドカルカッタでは、2000 年の場合、乾期と雨期の後半にコレラのピークを迎えてい

ることが明らかとなった。分離されるコレラ菌の多くは O1 コレラ菌 (約 8.8%) であるが、O139 コレラ菌 (約 2.0%) や non-O1, non-O139 コレラ菌 (約 4.3%) も分離されていることが明らかとなった。

「食中毒統計」(厚生省生活衛生局食品保健課)によれば、1997 年、1998 年と我が国で発生した食中毒のうち病因物質の判明したものの中では、事件数、患者数ともに腸炎ビブリオの発生がサルモネラの発生を上回っていた。また、その分離菌の血清型はこれまで主流であった O4:K8 という血清型から O3:K6 という血清型が多数分離されるようになってきており、この O3:K6 の増加がそのまま腸炎ビブリオでの事例の増加を反映しているように見受けられる。1994~1998 年の O3:K6、O4:K8 の割合はそれぞれ(1.2%, 46.3%)、(5.5, 17.6)、(31.2, 16.9)、(66.0, 2.1)、(50.6, 3.2)と O3:K6 の割合が徐々に増加し、1996 年を境に O4:K8 を逆転し、今日分離されるものの半数以上を占めるようになった。これはインドカルカッタ伝染病院におけるサーベイランスでの傾向と非常に良く似ており、かつ東南アジアからの帰国者の分離菌でも認められる現象であることから、インドでのものと同じのクローン由来である可能性が示唆される。今回の PFGE による解析において明らかになった 1996 年以降の O3:K6 株が、東南アジア株に極めて類似の遺伝子パターンを示していることは、我が国の流行株が東南アジアでの流行株と同一のクローンであるとする可能性を支持すると考えられる。O3:K6 株による食中毒は米国においても発生しており、CDC より血清型別依頼のあった 1998 年の株に

ついても PFGE による解析を行ったところ、東南アジアでの流行株とほとんど同一のパターンを示していた。さらに、これまでに見られなかった新しい血清型 O4:K68 を示す菌はすでに東南アジアやインド亜大陸で検出されており、また 1998 年には東京都内において食中毒および海外旅行者下痢症から分離されている。今回我々が解析した中で 1 株は 1999 年にタイで、他の 1 株は韓国で分離された株であり、PFGE パターンの類似性から東南アジアでの流行株と同一と考えられる。

腸管における細菌の粘着を阻止することにより感染を予防するという新しい方法を開発する基盤研究として、試験管内のコレラ菌の粘着実験を行い、ヒト小腸に多く発現している発現している血液型糖鎖と同じ構造のオリゴ糖によって、コレラ菌の粘着が阻害されることを明らかにした。特にフコース含有糖鎖である H 型血液型糖鎖や LeX 型糖鎖で阻害効果がみられたことは、O139 型コレラ菌がこの構造のヒト糖蛋白・糖脂質糖鎖を認識するレクチン活性を持つことを示唆し、また消化管におけるムチン型糖鎖の感染防御機構を示唆すると考えられる。

一方これまで、体内に入った細菌毒素の活性を抑制する手段として唯一用いられているのは免疫グロブリン療法であるが、その有効性には疑問が持たれている。Super Twig はペロ毒素への強い結合活性を有し、さらに細胞レベル及び個体レベルにおいてペロ毒素の致死活性を完全に中和することから、体内のペロ毒素の毒性を抑制し、病態の発症を抑制する可能性がある。また本研究から Super Twig は体内においてマク

ロファージによる毒素の代謝を促進し、無毒化する可能性が示唆されたことから、この機構は抗体による毒素中和の機構に類似し、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬として有望と考えられた。

E. 結論

血清型あるいは PFGE 解析によりコレラ菌、腸炎ピブリオなどのピブリオ属菌の分類法を更新あるいは作成し、それらを用いて発生動向調査を行った。特に、近年増加傾向にある腸炎ピブリオ O3:K6 株が過去に日本国内で発生したものと明らかに異なること、および東南アジアでの流行株と同一と思われるクローンが日本国内において急速に広まりつつあることを明らかにした。また O3:K6 株と非常によく似た DNA パターンを示す新しい血清型 O4:K68 株の流行が東南アジアで起こっていることから、今後これらの血清型菌に対する監視体制を強化していくとともに、新たな血清型菌の発生に対応するために血清型別および PFGE 等による遺伝子型別などの調査・研究を遂行していくことが必要であると考えられた。

ヒト消化管膜面への O139 新型コレラ菌の粘着能を定量するアッセイ系の作成に成功し、このアッセイ系を用いてフコース含有糖鎖が O139 型コレラ菌の粘着阻害に働くことが明らかになった。さらに腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療薬の候補である Super Twig の個体レベルにおけるペロ毒素中和機構を調べ、これが肝や脾のマクロファージによるペロ毒素の解毒を促進することによることを示唆した。これは新しい人工抗体の創出と考えられ、種々の腸管感染症に対する新しい治療法として

の利用が有望になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE, Nair GB: Cell vacuolation, a manifestation of the eltor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 68:1928-1933, 2000.
2. Chakraborty S, Bhadra RK, Ghosh AN, Mitra R, Shimada T, Yamasaki S, Takeda Y, Colwell RR, Nair GB: Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4022-4028, 2000.
3. Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, Ghose AC: Rapid method for the species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4145-4151, 2000.
4. Ramamurthy T, Rajendran K, Garg P, Shimada T, Basu A, Chowdhury NR, Nandy RK, Yamasaki S, Bhattacharya SK, Takeda Y, Nair GB: Cluster-analysis & patterns of dissemination of multidrug resistance among clinical strains of *Vibrio cholerae* in Calcutta, India. *Indian J. Med. Res.*, 112:78-85, 2000.
5. Mitra RK, Nandy RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Shimada T, Takeda Y, Nair GB: Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 50:268-276, 2001.
6. 島田俊雄, 荒川英二: 最近の腸炎ビブリオ食中毒事情, 防菌防黴誌, 28:157-167, 2000.
7. Arakawa E, Murase T, Matsushita S, Shimada T, Yamai S, Ito T, Watanabe H: Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 38:424-426, 2000.
8. Numata N, Ushimizu M, Ohtomo M, Chida K, Fujita H, Saito T, Suto D, Oguro M, Hayakawa Y, Sasaki K, Arakawa E, Shimada T, Watanabe H: The use of colony hybridization in the isolation of thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* from foods implicated in an incidence of food poisoning. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 53:75-77, 2000.
9. Garg P, Chakraborty S, Basu I, Datta S, Rajendran K, Bhattacharya T, Yamasaki S, Bhattacharya SK, Takeda Y, Nair GB, Ramamurthy T: Expanding multiple antibiotic resistance among clinical strains of

- Vibrio cholerae* isolated from 1992 to 1997 in Calcutta, India. *Epidemiol. Infect.*, 124:393-399, 2000.
10. Basu A, Garg P, Datta S, Chakraborty S, Bhattacharya T, Khan A, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB: Seven-year analysis of the incidence, antibiogram and genotypes of *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, India and comparison of the Calcutta O139 genotypes with those isolated from other parts of India. *Emerg. Infect. Dis.*, 6:20-28, 2000.
 11. Garg P, Nandy RK, Chaudhury P, Roy Chowdhury N, De K, Ramamurthy T, Yamasaki S, Bhattacharya SK, Takeda Y, Nair GB: Reappearance of the Inaba serotype of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor in India exhibiting molecular traits similar to that of the prevailing O1 Ogawa serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4249-4253, 2000.
 12. Dohi T, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR: Mice deficient in Th1-type and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterol.* 119:724-733, 2000.
 13. 土肥多恵子：慢性腸炎モデルが語る消化管粘膜のホメオスタシス維持機構. *生化学*, 72:1341-1344, 2000.
- 学会発表
1. Matsuoka K, Terabatake M, Nishikawa K, Natori Y, Esumi Y, Terunuma D, Kuzuhara H: Systematic synthesis of carbosilane dendrimers functionalized with the globotriaosyl moieties having neutralization potency for verotoxins. 20th International Symposium on Carbohydrate. August 27-September 1, 2000.
 2. Yamamoto ET, Mizuno M, Nishikawa K, Matsuo S, Natori Y: Renal injury caused by perfusion of Shiga toxin and subsequent revascularization in rats. 33rd ASN Meeting. October 13-16, 2000.
 3. Nishikawa K, Natori Y: Carbosilane dendrimer, a new type of Shiga toxin neutralizer. 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (verocytotoxin)-Producing *Escherichia Coli* Infections. October 29-November 2, 2000.
 4. 日野久美子, 西川喜代孝, 名取泰博: Caco-2細胞の分化に伴い膜画分に誘導されるペロ毒素結合活性. 日本薬学会第121年会. 3月28-30日, 2001.
 5. 荒川英二: PFGE型別の腸炎ビブリオ食中毒への応用, 第21回日本食品微生物学会, 2000.
 6. Dohi T, Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawamura YI, McGhee JR: Abrogation of lymphotoxin- β receptor signal pathway inhibits colonic patch genesis and Th2-type colitis, Block symposium: Pathogenic mechanism

in inflammatory bowel disease. The American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society Joint Annual Meeting, May 12, 2000.

7. Yamamoto M, Rennert PD, McGhee JR, Kweon M, Yamamoto S, Dohi T, Otake S, Bluthmann H, Fujihashi K, Kiyono H: An alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for gastrointestinal IgA responses, The American Association of Immunologists and Clinical Immunology Society Joint Annual Meeting, May 16, 2000.
8. Dohi T, Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawamura YI, McGhee JR: Th2-type colitis requires the organized gut-associated lymphoreticular tissue, 第 30 回日本免疫学会総会・学術集会, 11 月 15 日, 2000.
9. 土肥多恵子, ヒト消化管リンパ球の低毒性エンドトキシンに対する応答, 第 6 回日本エンドトキシン研究会, 11 月 24 日, 2000.
10. 土肥多恵子: Essential roles for Th2-type responses in chronic intestinal inflammation, 第 86 回日本消化器病学会総会, パネルディスカッション 04. 炎症性腸疾患の病態解明, 4 月 22 日, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究補助費（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

腸管出血性大腸菌感染症の新規治療法の開発

分担研究者 名取泰博 国立国際医療センター研究所 臨床薬理部長

研究要旨

本研究では腸管出血性大腸菌感染症に対する新しい治療法として、細胞レベル及び動物レベルでベロ毒素の毒性を中和する新規化合物・Super Twig の利用を検討している。今年度は個体における Super Twig の毒性中和機構の解析を行った。アイソトープ標識したベロ毒素を Super Twig の存在下あるいは非存在下でマウスに投与し、組織への移行を調べた結果、Super Twig 存在下ではベロ毒素の主要標的臓器である脳や腎への分布は減少し、肝や脾などの網内系組織への分布が増加することが明らかになった。一方、免疫組織化学的検索では肝や脾のベロ毒素の沈着は低下していた。以上の結果から Super Twig 存在下でベロ毒素は選択的に肝や脾に移行し、さらに免疫学的には検出されないようなレベルにまで分解されることが示唆された。そこで次に腹腔マクロファージを用いてベロ毒素の代謝を調べたところ、Super Twig 非存在下ではベロ毒素はマクロファージに全く結合しないのに対し、存在下では結合後、酸可溶性にまで分解されることが明らかになった。この結果から Super Twig は肝や脾のマクロファージによるベロ毒素の取込み及び分解を促進することにより、毒性を中和・除去することが示唆された。これらの機構は抗体による中和・除去と類似しており、Super Twig が人工抗体として利用できる可能性が考えられた。

A. 研究目的

細菌性腸管感染症に対する現在の治療法は抗生物質以外是对症療法に限られ、疾患の原因となる毒素を標的とした治療法はない。腸管出血性大腸菌感染症における主な死因は脳症などの合併症であり、それらは同菌の産生するベロ毒素が引き起こす。従って感染後でも体内で毒素を中和し、合併症の発症を抑制する治療法が開発できれば、重症例や死亡例の減少が期待される。ベロ毒素はコレラ毒素と同様に細胞表面の糖脂質糖鎖のクラスターを受容体とし、細胞内

で毒性を発揮して病気を起こす。

我々はこれまで、腸管出血性大腸菌感染症に対する新規薬剤として個体レベルで有効なベロ毒素中和剤の開発に成功した。この化合物はケイ素原子を分岐核とする放射状高分子（カルボシラン dendrimer）を骨格とし、末端にベロ毒素受容体 Gb3 の糖鎖を高度に集積させた構造を有する。これまで糖鎖を各々 3、6、12 個結合させた計 3 種類の化合物の活性を調べたところ、糖鎖 6 個の化合物がベロ毒素に対して強い結合性を示し、培養細胞に対しても毒性中

和活性を示すことを発見した。さらにこの化合物 (Super Twig と命名) はマウスへのペロ毒素の致死活性を完全に抑制することがわかった。Super Twig 投与で死を免れたマウスでは毒素の脳への沈着が抑えられていることから、ヒトの VTEC 感染症では脳症が死因となることが多いことを考え合わせると、Super Twig が臨床的にも有望であると期待される。本研究は Super Twig を用いた新しい腸管出血性大腸菌感染症治療法の開発を目指し、そのために今年度は個体内での中和機構の解析を行った。

B. 研究方法

Gb3 糖鎖を 3, 6 及び 12 個有する Super Twig (0)3, Super Twig (1)6, Super Twig (1)12 を合成し以下の研究に用いた (括弧内の数字はコアの世代数を表わす)。マウスにおける Super Twig の毒素中和活性の測定については、致死量 (5ng) の 2 型ペロ毒素をマウスに投与する際に、予めあるいは同時に Super Twig をマウスに投与し、その効果を調べた。マウスにおけるペロ毒素の臓器分布及び細胞レベルにおける毒素の代謝はアイソトープ標識ペロ毒素を用いて調べた。マウスにおけるペロ毒素の臓器分布はウサギ抗 2 型ペロ毒素ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法によっても行った。

C. 研究結果

マウスを用いて Super Twig の個体内レベルにおけるペロ毒素中和活性を調べた。5 ng の 2 型ペロ毒素をマウスに投与すると全てのマウスが 7 日以内に死亡するのに対し、2 型ペロ毒素と同時に Super Twig (1)6 を

投与すると毒素の致死活性を完全に抑制した。Super Twig (0)3 は全く効果を示さず、また Super Twig (1)12 の共投与は若干の延命効果は見られたが全ての動物は 7 日以内には死亡した。一方 Super Twig (1)6 を前投与し、6 時間後に 2 型ペロ毒素を投与してもその毒性を完全に抑えることがわかった。この結果から、同化合物は生体内で比較的安定に存在して毒素中和活性を示すことが明らかとなった。Super Twig (1)6 のみあるいは毒素と共投与したマウスは 2 カ月の観察の後にも顕著な毒性は観察されなかった。

2 型ペロ毒素を投与したマウスの小脳や中脳では鬱血や出血像が観察されるのに対して、Super Twig (1)6 を共投与するとこれらの病変がほぼ完全に抑制された。また免疫組織化学的手法により、ペロ毒素単独投与群では脳内の赤血球や血管にペロ毒素の沈着が見られたのに対し、Super Twig (1)6 共投与群ではその沈着が減少していることが明らかとなった。これらの結果から Super Twig (1)6 はペロ毒素の脳への移行あるいは脳での沈着を阻害することにより、ペロ毒素の致死活性を抑制すると考えられた。

マウスにおけるアイソトープ標識ペロ毒素の臓器分布に対する Super Twig (1)6 の影響を調べたところ、肝や脾への分布を増やすことがわかった。一方、免疫組織化学的検討では両臓器へのペロ毒素沈着は Super Twig (1)6 投与によりかえって減少していたことから、両臓器に移行した毒素は何らかの代謝を受け、抗原性を失った可能性が考えられた。両臓器はいわゆる網内系の組織であり、マクロファージを多く含む

ことから、これらの臓器のマクロファージがペロ毒素を積極的に取込み、これを分解することが推測された。そこで次にマウス腹腔マクロファージを用いてペロ毒素の結合及び代謝について検討した。その結果、Super Twig 非存在下ではペロ毒素はマクロファージに結合しないのに対し、Super Twig (1)6 存在下ではマクロファージはペロ毒素を取込むようになることがわかった。さらに pulse-chase 法を用いてマクロファージによるペロ毒素の代謝を調べたところ、同細胞は毒素を取り込んだ後にこれを分解し、酸可溶性物として培養液中に放出することが明らかになった。これらの結果から、Super Twig (1)6 は生体内でペロ毒素と結合し、これを肝や脾のマクロファージが貪食・分解することにより、ペロ毒素の解毒が行われると考えられた。

D. 考察

現在まで、体内に入ったペロ毒素の活性を抑制する手段として唯一用いられているのは免疫グロブリン療法であるが、その有効性には疑問が持たれている。これに対して Super Twig はペロ毒素への強い結合活性を有し、さらに細胞レベル及び個体レベルにおいてペロ毒素の致死活性を完全に中和することが明らかになった。さらに本研究から Super Twig は体内においてマクロファージによる毒素の代謝を促進し、無毒化する可能性が示唆された。この機構は抗体による毒素中和の機構に類似し、腸管出血性大腸菌感染症の治療薬として有望と考えられた。

最近、培養細胞に対するペロ毒素の毒性を中和する化合物が報告され、腸管出血性

大腸菌感染症に対する新しい治療薬として注目されている (Nature 403:669-672, 2000)。これは我々と同じアイデアから設計され、Gb3 糖鎖を 10 個含有する水溶性の化合物であり、本研究で用いる中和化合物と同様に、糖鎖のクラスター構造により強力に毒素と結合して中和するものである。しかし彼らは培養細胞による効果判定のみでその有効性を主張しており、個体レベルでの検討は行っていない。一方我々は培養細胞に対する毒性中和活性は個体における毒性中和とは必ずしも一致しないことを明らかにし、さらに個体レベルで有効な中和剤として Super Twig (1)6 を既に見出している。また本研究で用いる化合物の骨格は上記化合物とは異なって分岐点にケイ素を用いることで生体内での安全性と安定性を高めている。これらのことから、本研究で用いた Super Twig の方が薬剤としての利用価値は高いと考えている。

本研究から Super Twig がマクロファージによる毒素の代謝を積極的に促進したことから、他のリガンドに対する受容体活性を付与してカルボシランデンドリマーが人工抗体としてそれらリガンドの中和や除去に応用する理論的裏付けができたと考えている。例えば細菌毒素の中にはコレラ毒素などのようにペロ毒素と同じく B サブユニットがペンタマー構造を有し、糖脂質糖鎖を受容体とするものがある。従って本研究で用いた Gb3 糖鎖の代わりに例えばコレラ毒素の受容体である GM1 糖鎖を結合させた化合物はコレラ毒素の中和剤として有効であると考えられる。さらに同様の機構でウィルスとの結合に関与するリガンドをカルボシランデンドリマーに結合させたも

のは、ウィルスの除去にも有効となる可能性が考えられ、その応用性は広い。

E. 結論

新規化合物 Super Twig の個体レベルにおけるベロ毒素中和機構を調べ、これが肝や脾のマクロファージによるベロ毒素の解毒を促進することによることを示唆した。これは新しい人工抗体の創出と考えられ、腸管出血性大腸菌感染症に対する新しい治療法としての利用が有望になったと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. Matsuoka K, Terabatake M, Nishikawa K, Natori Y, Esumi Y, Terunuma D, Kuzuhara H: Systematic synthesis of carbosilane dendrimers functionalized with the globotriaosyl moieties having

neutralization potency for verotoxins. 20th International Symposium on Carbohydrate. August 27–September 1, 2000.

2. Yamamoto ET, Mizuno M, Nishikawa K, Matsuo S, Natori Y: Renal injury caused by perfusion of Shiga toxin (ベロ毒素) and subsequent revascularization in rats. 33rd ASN Meeting. October 13–16, 2000.
3. Nishikawa K, Natori Y: Carbosilane dendrimer, a new type of Shiga toxin neutralizer. 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (verocytotoxin)-Producing Escherichia Coli Infections. October 29–November 2, 2000.
4. 日野久美子, 西川喜代孝, 名取泰博: Caco-2細胞の分化に伴い膜画分に誘導されるベロ毒素結合活性. 日本薬学会第121年会. 3月28–30日, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ビブリオの分類に関する研究

分担研究者 島田俊雄 国立感染症研究所腸管系細菌室長

研究要旨

(1) O139（ベンガル型）コレラの勃発と同様な事態の発生を全世界的に監視する目的で、世界各地から収集した *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 菌株について血清型別を行った結果、それらの中に 12 の新しい血清型（O195-O206）を認め、*V.cholerae* 抗原構造表に追加した。

(2) 新しい下痢原性菌、*Vibrio hollisae* は他のビブリオとは異なり、胆汁酸塩に感受性が高いことから、TCBS 寒天には発育できない。この点に鑑み、臨床材料および海水や魚介類から *V.hollisae* を分離するための新しい選択鑑別培地、SDS マンニット寒天培を考案した。また、*V. hollisae* の疫学マーカーとして O 群別および遺伝子型別を確立した。(3) 最近注目されている *Vibrio vulnificus* 感染症は、かつて“人食いバクテリア”症と呼ばれた劇症型 A 群レンサ球菌感染症にその軟部組織壊死像が類似し、死亡率も極めて高く、欧米、韓国や台湾でも重要視されている疾病である。本感染症の原因追究の手段の一つとして、*V.vulnificus* の血清型をこれまでの O1-O7 から O18 までに拡大した。

A. 研究目的

(1) O139（ベンガル型）コレラの勃発と同様な事態の発生を全世界的に監視する目的で、世界各地から収集した *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 菌株について、血清型別を施行し、型別不明菌株に関しては、新血清型の追加を試み、*V.cholerae* 抗原構造表の更なる充実を計った。

(2) 新しい下痢原性ビブリオ、*Vibrio hollisae* は他のビブリオとは異なり、胆汁酸塩に感受性が高いことから、TCBS 寒天には発育できない。この点に鑑み、臨床材料および海水や魚介類から *V.hollisae* を

分離するための新しい選択鑑別培地、SDS マンニット寒天培地を考案した。

Vibrio hollisae の疫学マーカーとして O 群別および遺伝子型別を検討した。

(3) 最近注目されている *Vibrio vulnificus* 感染症は、かつて“人食いバクテリア”症と呼ばれた劇症型 A 群レンサ球菌感染症にその軟部組織壊死像が類似し、死亡率も極めて高く、欧米、韓国や台湾でも重要視されている疾病である。本感染症の原因追究の手段の一つとして、該菌の血清型の拡大を試みた。

B. 研究方法

抗血清の作製、凝集テストおよび凝集素吸収テストは Shimada et al (1994)の方法に準拠した。

診断用抗血清は全て R 抗体を吸収したものを、また凝集テスト用 O 抗原には加熱 (100℃、1 時間) 後、遠心洗浄した菌を使用した。

PFGE は Arakawa et al. (1999, 2000)の方法に準じて施行した。

SDS マンニット寒天培の考案の基礎は、殆どの *Vibrio* はマンニットを分解するのに対し、*V.hollisae* はマンニットを分解しない点に着眼し、培地にマンニットを加え、またグラム陽性菌の発育阻止剤として、胆汁酸塩に代えて、*V. hollisae* の発育に影響が少ないドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いたことである。さらに、*Vibrio* 以外のグラム陰性菌の発育を阻止する目的で亜テルル酸カリウムを添加した。SDS マンニット寒天培地の組成および培地の作り方は次のとおりである。

基礎培地の組成

“ラブレムコ” 粉末 5g

ポリペプトン (BBL) 10g

塩化ナトリウム 5g

マンニット 20g

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.1g

寒天 15g

プロムチモールブルー 0.04g

フェノールレッド 0.04g

精製水 1L pH8.0

基礎培地を加熱溶解し、約 60℃に冷却後、0.1%亜テルル酸カリウム溶液 1.0ml を加えてよく混和し、シャーレに注いで平板に

固める。高圧滅菌する必要はない。一般に SDS を含む培地の表面は乾き難いので、孵卵器でよく表面を乾燥させる。

C. 研究結果

(1) *V.cholerae* の新血清型

供試した *V.cholerae* non-O1 non-O139 の殆どは既知の血清型に該当したが、32 株は既知の血清型の何れの O 抗血清に反応を示さなかった。

型別不明 32 株の代表菌株を用いて免疫血清を作製し、交差凝集テストおよび凝集素吸収テストを行った。その結果、型別不明 32 株は 12 の O 群に分けられた。

これらの 12 の O 群は新血清型 (O195-O206) として *V.cholerae* の抗原構造表に追加した。

なお、新血清型 O195 から O206 の参考菌株で免疫した抗血清の凝集素価は、640-1,280 倍の範囲にあったが、それらの中にはかなりの R 抗体 (80-160 倍) が含まれていた。

(2-1) *V. hollisae* の新しい選択分離培地、SDS マンニット寒天培地の開発

SDS マンニット寒天培地上での *V.hollisae* の集落は直径約 2mm の暗紫色、半透明である。稀に *V.vulnificus* の中にマンニット分解性の菌株があり、それらでは *V.hollisae* と類似の集落がみられる。一方、マンニットを分解する腸炎ビブリオやコレラ菌を始めとする、その他のビブリオはやや大きい黄色集落を作り、その色調によって *V.hollisae* を他の菌から容易に鑑別することができる。

多くの腸内細菌やグラム陽性菌はほとんどが発育を阻止されるが、*Proteus* の中には

発育を阻止されないものもある。しかし、その集落は灰緑色である。Proteus のソーミングは阻止される。腸球菌にも菌株によって発育するものもあが、その集落は小さく、白色でやや乾燥しており、また多くの緑膿菌は白色の集落を作るので、これらの菌株と *V.hollisae* との識別は容易である。

本培地は TCBS 寒天培地と比べその阻止力はかなり弱いので、糞便検体の場合には大量に塗抹することを避ける必要がある。

(2-2) *Vibrio hollisae* の O 群別および遺伝子型別に関する研究

米国のヒトの下痢症から分離された *Vibrio hollisae* 5 株 (ルイジアナおよびフロリダ各 2 株、メリーランド 1 株) は、いずれも同一の O 群 (O1 群) であることが判明した。

しかしながら、制限酵素 NotI および SfiI を用いた PFGE による遺伝子解析では、ルイジアナの 1 株がスメアーになり型別不能であったが、残りの 4 株の遺伝子型はそれぞれ異った (それぞれ A, B, C, D 型と命名)。

(3) *V.vunificus* の血清型の拡大

米国、ドイツ、韓国、台湾、イスラエル、デンマークでヒトの敗血症、魚介類、海水等から分離された *V.vunificus* 菌株の中に、既知の血清型に該当しない 21 の新しい血清型 (O8-O18) が認められ、抗原表に追加した。

D. 考察

V.cholerae には多数の O 抗原が認められているが、R 抗原は全ての血清型で同一である。*V.cholerae* の参考菌株で免疫した

すべての抗血清中にはかなりの R 抗体が含まれて、このままの血清を希釈したのみで、実際のスライド凝集テストを行った場合には、血清中に含まれる R 抗体による類属反応が強く現れ、正確な血清型別を行うことが不可能である。従って、実際の血清型別に用いる診断用抗血清は、血清中に含まれる全て R 抗体を *V.cholerae* の R 菌株の参考菌株で

ある CA385 株で吸収する必要がある。

エルトルコレラ史上最大の流行となった南米大陸のコレラや、誰しもが予想だにできなかった *V.cholerae* O139 "Bengal" による新型コレラの突発など、これからも *V.cholerae* は新興・再興感染症として、我々に脅威を与え続けることから、今後もこれらの発生を全世界的に監視する必要がある。

供試した *V. hollisae* 菌株は同一の O 群でありながら、PFGE 型別から、それぞれが異なった由来に起源することが示された。このことから、遺伝子型別が本菌の疫学調査に極めて有効であることを示唆している。今後、拡大された *V.vunificus* の血清型は該菌の疫学マーカーとしてさらに有用となる。

E. 結論

(1) O139 (ベンガル型) コレラの勃発と同様な事態の発生を全世界的に監視する目的で、世界各地から収集した *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 菌株について血清型別を行った結果、それらの中に 12 の新しい血清型 (O195-O206) を認め、*V.cholerae* 抗原構造表に追加した。

(2) 新しい下痢原性ビブリオ、*Vibrio*

hollisae は他のビブリオとは異なり、胆汁酸塩に感受性が高いことから、TCBS 寒天には発育できない。この点に鑑み、臨床材料および海水や魚介類から *V.hollisae* を分離するための新しい選択鑑別培地、SDS マンニット寒天培を考案した。また、*Vibrio hollisae* の疫学マーカーとして O 群別および遺伝子型別を確立した。

(3) 最近注目されている *Vibrio vulnificus* 感染症は、かつて“人食いバクテリア”症と呼ばれた劇症型 A 群レンサ球菌感染症にその軟部組織壊死像が類似し、死亡率も極めて高く、欧米、韓国や台湾でも重要視されている疾病である。本感染症の原因追究の手段の一つとして、*V.vulnificus* の血清型をこれまでの O1-O7 から O18 までに拡大した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Mitra,R., Figueroa,P., Mukhopadhyay,A.K., Shimada,T., Takeda,Y., Berg,D.E., Nair,G.B. (2000): Cell vacuolation, a manifestation of the eltor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*,68,1928-1933.
- (2) Chakraborty,S., Bhadra,R.K., Ghosh,A.N., Mitra,R., Shimada,T., Yamasaki,S., Takeda,Y.,Colwell,R.R.,

Nair,G.B. (2000): Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4022-4028.

(3) Nandi,B., Nandy,R.K., Mukhopadhyay,S.Nair,G.B., Shimada,T., Ghose,A.C. (2000):

Rapid method for the species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J. Clin. Microbiol.*,38,4145-4151.

(4) Ramamurthy,T., Rajendran,K., Garg ,P., Shimada,T., Basu,A., Chowdhury, N.R., Nandy,R.K., Yamasaki,S., Bhattacharya,S.K., Takeda,Y., Nair,G.B. (2000): Cluster-analysis & patterns of dissemination of multidrug resistance among clinical strains of *Vibrio cholerae* in Calcutta, India. *Indian J. Med. Res.*, 112, 78-85.

(5) Mitra,R.K., Nandy,R.K., Ramamurthy,T., Bhattacharya,S.K., Yamasaki,S., Shimada,T., Takeda,Y., Nair,G.B. (2001): Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 50, 268-276.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

腸炎ビブリオの分子疫学に関する研究

分担研究者 荒川英二 国立感染症研究所細菌部研究員

研究要旨

1993年頃から急増した腸炎ビブリオによる食中毒は、それまで国内で主流を占めていた血清型 O4:K8 ではなく、ほぼ同時期に世界的に流行の見られた血清型 O3:K6 であった。輸入例及び過去の国内事例との比較のため、近年細菌にも応用されるようになったパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法を用い、菌のゲノム全体を対象とした解析を行った。血清型の異なるものではその PFGE 型は全く異なっており、血清型が同じであっても輸入例や過去に国内で見られた事例とは明らかに異なったパターンが認められ、PFGE による解析が極めて有効であることが明らかになった。

A. 研究目的

食中毒の原因究明には、まず原因病原体の同定、性状の解析が必要である。また、同定された病原体の特徴により疫学的解析を行うことは、集団事例や昨今問題となっている一見各地域での散発事例に見られる同時多発的発生事例において、それぞれの差異を検討することによって根源を推定するためにも重要である。腸炎ビブリオによる食中毒においても、これまで生化学的性状や血清型別、毒素産生性などによって違いを識別してきたが、近年遺伝学的解析手法が開発され、様々な方法が応用されてきている。

細菌の遺伝学的解析手法としては、これまで主に病原因子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションや rRNA をプローブとしたリボタイピングによって行われていたが、PCR を応用した Arbitrary primed PCR (AP-PCR) 法や、

腸管出血性大腸菌の疫学解析で威力を発揮した Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法が開発され、解析能力の向上が見られるようになってきた。

腸炎ビブリオにおいてもこの PFGE 法を活用し、分子疫学解析を行うことは急増している腸炎ビブリオ食中毒の原因解明にも有用であるものと期待される。

B. 研究方法

PFGE 法は染色体 DNA を比較的切断頻度の少ない制限酵素により切断し、生成した巨大 DNA 断片を通常のアガロースゲル中で移動させるために、電場の方向を頻繁に変化させて分離するものである。染色体全体に散らばっている制限酵素認識部位とそれに挟まれた DNA 断片のサイズの変動を検出することから、特定遺伝子だけを指標とした今までの遺伝子解析よりも広範囲の変化をとらえる