

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 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名取泰博

平成 14 (2002) 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	11
2. 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	14
3. 腸炎ビブリオの病体解明とそれに基づく診断・治療方法の開発 分担研究者 本田武司	19
4. 腸炎ビブリオの分子疫学 分担研究者 荒川英二	23
5. 腸管における細菌感染の抑制 分担研究者 土肥多恵子	27
III. 研究結果の刊行に関する一覧表	29

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

腸炎ビブリオとコレラについて発生動向を調べた。1993 年頃から急増した腸炎ビブリオによる食中毒は、1998 年をピークにして 2001 年にかけては減少傾向が見られたが、集団事例での O3:K6 に代表される新型クローンの減少率は低く、全体に占める新型クローンの割合が増加していた。新型クローンによる汚染実態を知るために、国内での分離例や海外からの同定依頼株について菌のゲノム全体の解析を行ったところ、いずれも新型クローンのパターンを示しており、海外のみならず、国内でも新型クローンが広がっていることが改めて示された。また世界的流行を起こした菌株は例外なく ORF8(機能不明)を持つ線状ファージの感染を受けていることから、ORF8 が病原性(流行性)に関与している可能性が考えられた。一方、コレラについては我が国では幸い患者数がまだ少ない。そこで世界のコレラ高浸淫地域における発生動向を把握することを目的として、カルカッタにあるインド国立コレラ及び腸管感染症研究所との共同で、西ベンガル州立伝染病病院に入院した下痢症患者からコレラ菌の分離を試み、どのようなコレラ菌が流行に関与しているかを明らかにした。さらに、薬剤耐性化に関わっているインテグロンの分布と薬剤耐性遺伝子の関係についても解析し、アミノグリコシドやトリメトプリムに対する耐性遺伝子の分布を明らかにした。

新規治療法の開発については以下の研究を行った。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、ヒト消化管粘膜由来膜画分に対するコレラ菌細菌粘着能阻害効果を持つオリゴ糖をスクリーニングした結果、フコース含有血液型関連精製オリゴ糖により、O139 型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として、ベロ毒素/志賀毒素 (Stx) 受容体である Gb3 糖鎖を分子内に多数有する Stx 中和剤・Super Twig の有用性を調べるために、本化合物を用いてマウスの同菌感染症モデルに対する治療実験を行った。その結果、未治療群では接種後 14 日目までに全てのマウスが死亡したのに対して、便中及び血液中に Stx が出現する 3 日目から Super Twig にて治療した群では 7 匹中 6 匹のマウスが生存した。この結果から Super Twig が腸管出血性大腸菌感染症治療薬として有用である可能性が示された。腸炎ビブリオの主要な病原因子として耐熱性溶血毒 (TDH) が考えられているが、その作用機序、特にエンテロトキシン作用については、ほとんど分かっていない。そこで主として電気生理学的手法で解析した結果、TDH の持つエンテロトキシン作用のメカニズム (Ca⁺⁺-activated Cl⁻ channel を介する) が明らかになり、TDH の下痢への関与を確定することができた。また、数種の薬剤が、TDH のエンテロトキシン活性を阻害することが分かったことから、新しい治療薬へのシードになる可能性が開かれた。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設
における職名

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・大阪府立大学大学院農学生命
科学研究科・教授

本田 武司・大阪大学微生物病研究所・教
授

A. 研究目的

本研究では腸管出血性大腸菌、新型コレ
ラ菌及び腸炎ピ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。一方腸炎ピブリオ
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/志賀毒素

(Stx) 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。Stx 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。また、腸炎ピブリオに
ついては、発症病態の理解に基づいた腸炎
ピブリオ感染症の新しい治療法と診断法の
開発に寄与する基礎的解析を行う。

B. 研究方法

1. 腸炎ピブリオ (*V. parahaemolyticus*) の 発生動向

近年増加傾向にある O3:K6 株を中心に
解析を行った。東京都で 1996 年にヒトから
分離された株 7 株、1997 年にヒトから分離
された株 11 株、仙台市で 2000 年にヒト、
食品から分離された株 10 株、韓国で 1999
年に分離された株 43 株、合計 71 株を供試
した。また関西空港検疫所で旅行者下痢症
から分離された腸炎ピブリオについても、
その血清型別を行ない、O3K6 を持つ菌株
を中心に解析した。

tdh (thermostable direct hemolysin)、trh
(tdh-related hemolysin) 遺伝子の検出は PCR

により行った。ウレアーゼ試験及び Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)は常法通り行った。

2. コレラ菌 (*V. cholerae*) の発生動向

インドカルカッタにある西ベンガル州立伝染病院に入院した下痢症患者 5 人毎に 1 検体をランダムに抽出し、コレラ菌の分離を試みた。分離したコレラ菌の血清型別を行った。分離したコレラ菌に存在するクラス 1 とクラス 4 インテグロンについて PCR 法と DNA プローブ法でその分布調べた。クラス 1 インテグロンが陽性となった菌株については、薬剤耐性遺伝子が存在している可変領域を PCR で増幅しその塩基配列を決定し、どのような薬剤耐性遺伝子が存在しているかについて解析した。

3. 細菌性腸管感染症に対する新規予防法の開発

ヒト小腸膜画分への種々のレクチンの結合性について、コレラ菌が認識する消化管上皮では、血液型や部位によって、発現している糖鎖が異なると考えられるため、今回は 3 例の標本についておおまかな糖鎖発現の種類とその個体差をレクチン結合で比較した。ヒト剖検標本より小腸粘膜を採取し、ホモジナイズした後に核分画を遠心分離し、上清をさらに 100,000g 遠心して膜分画を得た。これ ELISA プレートにコーティングして固相化した。これに、ビオチン化した種々のレクチンを加えて ELISA 法によって結合を判定した。

ヒト小腸粘膜へのコレラ菌粘着能アッセイは以下のようにして行った。すなわち、小腸粘膜膜分画を ELISA プレートに固相化し、O139 型コレラ菌株 T16 を加え、37°C で 15 分間 incubate し菌を粘着させた。プレートを洗浄、70%エタノールを加えて菌体を固定した後、ウサギ抗 O139 コレラ菌抗体、ビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体、HRP-ヤギ

抗ビオチン抗体を用いて結合した菌体を定量した。オリゴ糖による阻害実験は、この粘着能アッセイ系で、菌株を種々血液型物質関連構造を持つオリゴ糖と preincubation した後に混合液を膜蛋白固相化プレートに加え、粘着した菌数を定量した。

4. 腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法の開発

Gb3 糖鎖を分子内に 6 個有する Super Twig を合成し本研究に用いた。感染実験は以下の方法で行った。3 週令のマウスを 5% 低蛋白食で 2 週間飼育した後に、腸管出血性大腸菌を接種し、その後も低蛋白食で飼育した。この方法により感染させたマウスでは接種後 2 日目には糞便中に Stx が検出され、3 日目には血清中にも Stx が検出される。治療群のマウスには、感染 3 日目から 6 日目まで Super Twig (50 μ g/g 体重) を尾静脈より 1 日 2 回投与した。コントロール群は同じプロトコールにて同量の生理食塩水を投与した。結果の統計解析は Kaplan-Meier 生存解析法にて行った。

5. 腸炎ビブリオ感染症に対する新規治療法の開発

腸炎ビブリオの産生する TDH を単離し、これまで推定されてきた TDH のエンテロトキシン作用を Ussing-chamber 法を用いて電気生理学的に解析した。標的細胞としてはヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を用い、ブチル酸処理で十分分化させた細胞を用いた。主として、Isc (short-circuit current) を指標として記録した。また様々な薬品を用いて TDH の作用に対する阻害活性を薬理的に解析した。

6. 倫理面での配慮

ヒト小腸粘膜は剖検時に病理医により採取され、患者個人への不利益はない。細菌についてはヒト分離株を用いたが、倫理面を配慮し、これらの分離された公的機関か

ら個人の特定できない状態で分与された。動物モデルに関しては動物愛護に十分に配慮して実験を行った。いずれにおいても当該研究施設の規定にのっとり、倫理委員会等の承認を得る必要がある場合にはその審査を受けた。

C. 研究結果

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

最近の世界流行とも言える腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 による食中毒は、過去の発生で検出されたものとは異なる遺伝子型であり、国内例、海外例でも区別できないほど同一の PFGE パターンを示していた。東京都立衛生研究所に保存されていた1996、1997年の O3:K6 の分離株は、解析に供した18株すべて新クローンと同一の NotI-A タイプであった。このことは神奈川県衛生研究所の分離株での状況と全く同一であり、1996年頃からの O3:K6 の増加が新クローンによるものであることをさらに支持するものであった。

1999年の韓国での分離株では、供試した43株のうち37株が O3:K6 であり、その他 O4:K68 が1株 O4:KUK が1株、O4:K9 が1株、O1:K56 が2株であった。O3:K6 はすべて新クローンである tdh+, trh-, NotI-A タイプであった。O4:K68 も新クローンを示す tdh+, trh-, NotI-A タイプであり、O3:K6 とは O 血清型も K 血清型も異なっているのに PFGE では同一のパターンを示し、O3:K6 とは極めて近縁である可能性を強く示唆するものであった。その他の O4 株あるいは O1 株は PFGE では全く異なったパターンを示しており、遺伝子レベルでもかなり異なるものであることがわかった。

仙台市の2000年の分離例では、患者から分離されたものとその原因食品と考えられ

るタラバガニから菌が検出された事例においても、喫食残品のアオヤギから菌が検出された事例においても血清型が同一のものは 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。また、それぞれの事例では PFGE のパターンとして NotI-A となり、大別では同じタイプに分類されるが、サブタイプまで検討すると、それぞれ別のサブタイプに属するものであった。さらに、それらは1999年の事例のパターンともサブタイプのレベルでは異なっており、事例毎の違いを検出することも可能であった。

さらに O3:K6 及び O4:K68 株で新クローンパターンを示す菌は例外なく f237 と名付けた線状ファージ（コレラ菌にコレラ毒素遺伝子 ctx を運んだと考えられる CTXφ に類似したファージ）に感染していた。このファージは ctx を持たない代わりに機能未知の ORF8 をコードする遺伝子を有していた。

2. コレラ菌 (*V. cholerae*) の発生動向

1999年から2001年の3年間のコレラ菌の分離状況及び血清型を調べた。2001年に分離した O1 コレラ菌、O139 コレラ菌および non-O1, non-O139 コレラ菌は、それぞれ、139株、16株、85株であった。流行のピークは、乾季の5月と雨季明けの10月の2回見られた。過去2年の結果と比較し、O1と O139 の分離件数が減少したのに対し non-O1, non-O139 コレラ菌の分離件数は増加した。

過去10年間の研究から、コレラ菌においても薬剤耐性菌が増加傾向にあることが危惧されている。そこで、近年新たに見つかった薬剤耐性化機構に関わっているインテグロンの分布とどのような薬剤耐性遺伝子がコードされているかを1992年から2000年までに分離されたコレラ菌について解析

した。O1 コレラ菌では、43株中42株と7株で、それぞれクラス4とクラス1インテグロンが陽性であった。O139 コレラ菌では、45株中42株と1株でクラス4とクラス1インテグロンが陽性であった。Non-O1, non-O139 コレラ菌では、45株中42株と7株でクラス4とクラス1インテグロンが陽性であった。クラス1インテグロンが陽性となった株の可変領域を PCR で増幅し、その遺伝子断片を解析した結果、O1 の6株では、1009 bp の増幅断片が得られ、アミノグリコシドに耐性な *aadA* 遺伝子をコードしていた。残りの1株では、2483 bp の断片が得られ、リファンピシン耐性の *aar3* 遺伝子、アミノグリコシドに耐性な *aacA4* 遺伝子、トリメトプリムに耐性な *dfrA15* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。一方、O139 コレラ菌で陽性となった1株では、1242 bp の増幅断片が得られ、トリメトプリムに耐性な *dfrA1* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。Non-O1, non-O139 で陽性となった7株中、3株では O139 コレラ菌と同様 1242 bp の増幅断片が得られ、トリメトプリム耐性の *dfrA1* と未知の ORF をコードしていた。残りの4株については、CO248株では、739 bp と 1009 bp の増幅断片が得られ、それぞれトリメトプリムに耐性な *dfrA15* 遺伝子とアミノグリコシドに耐性な *aadA2* 遺伝子をコードしていた。PL91株では、約 400 bp と 1242 bp の増幅断片が得られたが、前者では ORF は得られず、後者では、トリメトプリムに耐性な *dfrA1* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。NLC35株では、739 bp と 1197 bp の増幅断片が得られ、トリメトプリムに耐性な *dfrA15* 遺伝子とベータラクタムに耐性な *blaP1* をコードしていた。NLC38株では、1009 bp と 1197 bp の増幅断片が得られ、それぞれアミノグリコシドに耐性な *aadA2* とベータラクタム

に耐性な *blaP1* をコードしていた。

3. 細菌性腸管感染症に対する新規予防法の開発

腸粘膜に対して GalNAc を認識する HPA レクチン、GlcNAc を認識する WGA レクチンが強く結合した。GalNAc と A 型の血液型物質を認識する DBA、フコースを認識する UEA-1、ガラクトースを中心に認識する PNA は 3 例の間で差が見られた。ヒト小腸においては、コアに GlcNAc を持つ様な糖鎖が多く発現しているが、非還元末端のガラクトース、N アセチルガラクトサミン、フコースの発現に関しては個人差が高いと考えられた。

次に、オリゴ糖 LacNAc (Gal β 1, 4GlcNAc)、Gb3 (Gal α 1, 4Gal β 1, 4Glc)、LEX (Gal β 1, 4[Fuc α 1, 3]GlcNAc)、3FL (Gal β 1, 4[Fuc α 1, 3]Glc)、2FL (Fuc α 1, 2 Gal β 1, 4Glc、FLN (Fuc α 1, 2 Gal β 1, 4GlcNAc)をもちいた粘着能阻害活性を 3 症例で解析した。その結果、ラクトース、ラクトサミンの粘着阻害効果は弱く個人差が見られた。非還元末端に GalNAc 含有糖鎖はコレラ菌の膜面分への接着を促進する傾向があることがわかった。このほか、シアル酸含有糖鎖の粘着阻害効果も個人差が大きかった。フコース含有糖鎖のうち FL2 3 症例全例で、濃度依存性の粘着阻害効果を持つことが明らかとなった。

4. 腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法の開発

コントロール群は感染後 5 日目には震えなどの神経症状が出現し、14 日目までに全例死亡した。一方、Super Twig 投与群では死亡したマウスは 7 匹中 1 匹のみで、残りの 6 匹は少なくとも 40 日目まで無症状のまま生存したことから、Super Twig が腸管出血性大腸菌感染によるマウスの個体死を有意に抑制することが明らかになった ($P < 0.01$)。また死亡した 1 匹のマウスにも神

経症状は全く見られなかった。このことは、ヒトにおける腸管出血性大腸菌感染症の主な死因である脳症の発症に対して Super Twig が有効に抑制することを示しており、同菌感染症の合併症を防ぐ新しい治療法として有望であることを示唆している。

5. 腸炎ビブリオ感染症に対する新規治療法の開発

腸炎ビブリオの主要な病原因子と考えられている耐熱性溶血毒 (TDH/TRH) の腸管毒性の発現機構を主として電気生理学的、薬理的に解析した。その結果、TDH/TRH が腸管上皮細胞に作用すると、TDH は Caco-2 細胞に作用して、Isc を上昇させ、この上昇作用は DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid) で、正常化した。また、TDH を Caco-2 細胞に作用させると、細胞内の Ca^{++} 濃度が上昇し、この上昇は Protein kinase C 阻害剤 (staurosporine など)で阻害された。これらの結果から、TDH が腸管上皮細胞に作用すると、Protein kinase C の活性化、 Ca^{++} の細胞内流入、 Ca^{++} -activated Clチャンネルを通じて Cl (および水)の流失が起こり、下痢を引き起こす事が明らかになった。また、これらの成績から、これらの各ステップの阻害剤 (Monodansylcadaverine, Staurosporine, DIDS など)は、腸炎ビブリオによる下痢の制御薬のシーズとなる可能性も示唆できた。なお、Caco-2 細胞のような腸管上皮細胞の TDH 感受性は、Caco-2 細胞の分化が進むにつれて増すことが分かった。

D. 考察

「食中毒統計」(厚生省生活衛生局食品保健課)によれば、1995 年ころから急増した腸炎ビブリオ食中毒の事例数は 1999、2000 年と続けて減少傾向が見られている。この傾

向はサルモネラ食中毒の事例数でも同様に認められており、1999 年にはそれまでの急増が頭打ちとなって 2000 年には減少に転じた。腸炎ビブリオ食中毒の発生患者数においても同様で、1985 年以降では、1992、1993 年に次いで少ない発生数であった。発生患者数の激減は腸炎ビブリオ食中毒の特徴でもある、散发事例が多いということによる可能性もある。1999 年からは 2 名以上を報告するようになったため、統計上さらに減少が見られたのかもしれない。

感染研発行の病原微生物検出情報に報告された 1994~2000 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)、(53.1, 3.1)、(81.1, 0)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。10 名以上の集団事例も総数の減少傾向と同様であるが、O3:K6 の減少傾向はそれほど大きくないようである。そのため 2000 年では O3:K6 の発生が腸炎ビブリオ食中毒の大半を占めるようになった(81.1%)。O3:K6 と PFGE パターンでは区別のつかない O4:K68 も総数の減少のため 2000 年の集団発生例では検出されていないが、10 名に満たない事例では検出されており、引き続きその動向には注意が必要である。

さらに、PFGE パターンでは区別のつかないこれらの O3:K6 及び O4:K68 の菌株は、機能不明な ORF8 を持つことが明らかになり、ORF8 が世界的流行に関与している可能性がある。何らかの病原性と ORF8 が関係している可能性があるが、これについては今後の研究が必要である。

インド・カルカッタで採取されたコレラ菌を分析した結果、コレラ菌の薬剤耐性化にインテグロンが関与していることが明らかとなった。また、1992 年から 1993 年に分

離された O139 コレラ菌は、クローナルと
考えられていたがクラス 1 インテグロンを
持つ菌と持たない菌があることとコードし
ている薬剤耐性遺伝子は、O1 コレラ菌型の
ものでなく、non-O1, non-O139 タイプのも
のであると言う興味深い結果が得られた。
このことは、インテグロンの解析がコレラ
菌の分子疫学的解析の 1 つとして非常に有
益である事を示す結果を得ることができた。

腸管内におけるコレラ菌の粘着に重要な
役割をもつ糖鎖を解明し、菌の粘着阻害に
よる新しい治療法を開発するために、小腸
粘膜由来試料に対するコレラ菌の粘着実験
を行った結果、ヒト小腸に多く発現してい
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がわ
かった。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、またオリゴ
糖経口投与による消化管での感染防御の可
能性を示唆している。阻害効果の得られた
オリゴ糖濃度は、oral dehydration solution 1
リットル中に約 0.1 g 加えればよいことにな
り、オリゴ糖の安全性などから、投与試験
も可能であると考えられる。今後はさらに
Type2 糖鎖の繰り返し構造を持つ長鎖オリ
ゴ糖やオリゴ糖混合物の活性についても検
討する。また、ヒト消化管上皮細胞株も用
いて、粘着阻害効果の生物学的な確認も必
要と考えている。

一方、腸管出血性大腸菌感染症の治療法
について、現在まで、体内に入った Stx 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
対して我々が開発した Super Twig は Stx へ
の強い結合活性を有し、さらに細胞レベル

及びマウス個体レベルにおいて Stx の致死
活性を完全に中和する。さらに昨年度に報
告したように、Super Twig は体内において
マクロファージによる Stx の代謝を促進し
て無毒化するという、抗体による毒素中和
の機構に類似した、これまでにない全く新
しいタイプの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。また本年度
の研究から Stx 産生菌感染動物で血清内に
Stx が検出される時期からでも、その菌の致
死活性を有意に抑制できることが明らかにな
った。この化合物の生体内における動態
や代謝については今後の課題であるが、Stx
産生性赤痢菌や腸管出血性大腸菌感染症の
治療薬としての可能性を秘めた化合物と言
える。さらに細菌毒素の中にはコレラ毒素
などのように Stx 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、本研究の応用範囲は広いと
思われる。

腸炎ピブリオ感染症の病態について、こ
れまで推定の域が出なかった TDH のエンテ
ロトキシンとしての作用が本研究により明
らかになった。TDH は、コレラ毒素と同様
Cl⁻イオンチャンネルを利用して下痢を引き
起こすと言う点では似ているが、TDH は Ca⁺⁺
濃度に依存する、コレラ毒素は cAMP に依
存する Cl⁻イオンチャンネルをそれぞれ利用
する点は異なる。また、この結論を出すに
至る過程で得た薬理的解析結果から、腸
炎ピブリオの下痢に有効である可能性がある
薬剤が数種見つかかり、今後類似薬を探す
事で、ヒトに使える新しい治療薬が開発で
きるかもしれないと考えている。

E. 結論

食中毒原因菌である腸炎ビブリオの PFGE 解析を行うことによって、近年増加傾向の新型クローンの O3:K6 株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。すなわち腸炎ビブリオ食中毒の疫学解析においても PFGE 型別は非常に有効な手法であることが確認された。また、新型クローンの 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 株の流行が国内で引き続き起こっていることは、今後これらの血清型菌に対する監視体制も強化していく事が重要であると考えられる。さらに、それとともに新たな血清型菌の発生に対応するため、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。またこれらの新型クローンはほぼ例外なく ORF8 を持つ線状ファージの感染を受けており、ORF8 が病原性(流行性?)に関与している可能性が考えられた。またコレラ菌について、インドカルカッタで分離されるコレラ菌の多くは O1 コレラ菌であるが、non-O1, non-O139 コレラ菌の分離件数が増加傾向にあった。インドで分離されたコレラ菌からインテグロンが見つかり、薬剤耐性化に寄与していることが明らかとなった。

ヒト消化管膜面分へのコレラ菌の粘着能を定量するアッセイ系を用いてフコース含有糖鎖、特にH型血液型糖鎖が O139 型コレラ菌の粘着阻害に働くことが明らかになった。また腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法として、同菌の主要な病原因子・Stx に対する新しい中和剤による系を創出した。これは腸管出血性大腸菌が感染した後でも早期に同薬剤を投与することにより、溶血性尿毒症症候群や脳症といった重大な合併症を防止する可能性を示していると考えられる。この系が腸管出血性大

腸菌感染症の有効な対応策となることが期待される。さらに腸炎ビブリオの TDH の持つエンテロトキシン活性のメカニズムが解明でき、TDH の下痢への関与が確定できた。また数種の薬剤が TDH のエンテロトキシン活性を阻害したことから、新しい治療薬開発への基盤が確立されたと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. R.K. Mitra, R.K. Nandy, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S.Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, G.B. Nair. Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized diarrhea patients. J. Med. Microbiol., 50: 1-9, 2001.
2. S. Chakraborty, P. Garg, T. Ramamurthy, J.K. Gautam, C. Sharma, C. Kumar, S. Maiti, S.Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, A. Ghosh, G.B. Nair. Comparison of antibiogram, virulence genes, ribotypes and DNA fingerprints of *Vibrio cholerae* of matching serogroups isolated from hospitalized diarrhea cases and from the environment during 1997-98 in Calcutta, India. J. Med. Microbiol., 50: 879-888, 2001.
3. Dohi T, Rennert PD, Fujihashi K, Kiyono H, Shirai Y, Kawamura YI, Browning JL, McGhee JR: Lymphotoxin- α receptor-immunoglobulin fusion protein inhibits murine colonic patch genesis and Th2-type colitis. J Immunol 167: 2781-2790, 2001.
4. 土肥多恵子: Th1/Th2型粘膜免疫応答と消化管炎症、医学のあゆみ、199: 75-

- 78, 2001.
5. Takahashi A, Y.Sato, Y.Shiomi, V.Cantarelli, T.Iida, M.Lee, T. Honda: Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. *J.Med.Microbiol.* 49:1-10, 2001
 6. Hayashi T, K.Makino, M.Ohnishi, K.Kurokawa, K.Ishii, K.Yokoyama, C.G.Han, E.Ohtsubo, K.Nakayama, T.Murata, M.Tanaka, T.Tobe, T.Iida, H.Takami, T.Honda, C.Sasakawa, N.Ogasawara, T.Yasunaga, S.Kuhara, T.Shiba, M.Hattori, H.Shinagawa: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Reseach.* 8:11-22, 2001
 7. Hayashi T, K.Makino, M.Ohnishi, K.Kurokawa, K.Ishii, K.Yokoyama, C.G.Han, E.Ohtsubo, K.Nakayama, T.Murata, M.Tanaka, T.Tobe, T.Iida, H.Takami, T.Honda, C.Sasakawa, N.Ogasawara, T.Yasunaga, S.Kuhara, T.Shiba, M.Hattori, H.Shinagawa: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Reseach.* 8 Supplement 47-52, 2001
 8. Naim R, I.Yanagihara, T.Iida, T.Honda: *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin can induce an apoptotic cell death in Rat-1 cells from inside and outside of the cells. *FEMS Microbiol.Lett.* 195:237-244, 2001
 9. Iida T., A. Hattori, K. K. Tagomori, H. Nasu, R. Naim, T.Honda: Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerging Infectious Diseases* 7: 477-478, 2001
 10. Iijima Y., M. Karama, J.O. Oundo, T.Honda: Prevention of bacterial diarrhea by pasteurization of drinking water in Kenya. *Microbiol. Immunol.* 45: 413-416, 2001
 11. Naim R., T. Iida, A. Takahashi, T.Honda: Monodansylcadaverine inhibits cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin on cultured rat embryonic fibroblast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 99-105, 2001
 12. Takahashi A., T. Iida, R. Naim, Y. Nakakaya, T.Honda: Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* depends on colonic cell maturation. *J.Med. Microbiol* 50: 870-878, 2001
 13. Taniguchi T., Y. Akeda, A. Haba, Y. Yasuda, K. Yamamoto, T.Honda, K. Tochikubo: Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 5864-5873, 2001
 14. Murata T., T. Iida, Y. Shiomi, K. Tagomori, Y. Akeda, I. Yanagihara, S. Mushiake, F. Ishiguro, T.Honda: A Large outbreak of foodborne infection attributed to *Providencia alcalifaciens*. *J. Infect. Dis.* 184: 1050-1055, 2001
 15. Vlademir V. C, A. Takahashi, I. Yanagihara, Y. Akeda, K. Imura, T. Kodama, G. Kono, Y. Sato, T.Honda: Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic *Escherichia coli*, and is

essential for pedestal formation. Cellular Microbiology 3:1-8, 2001

16. Miyagi K., Y. Takegaki, T. Nakano, Y. Nakano, T. Honda, K. Sano ; Frequency of failure to isolate *Shigella spp.* by the direct plating technique and improvement of isolation by enrichment in selenite broth. Epidemiol. Infect. 127: 375-379, 2001
 17. 本田武司 (分担) : 細菌感染症をめぐって---現状と展望、感染症研究の今、(本田武司、生田和良、堀井俊宏 編)、大阪大学出版会、2001年
 18. 本田武司 (分担) : 概説 細菌毒素の構造と作用。細菌毒素ハンドブック、(櫻井純、本田武司、小熊恵二 編)、サイエンスフォーラム、2001年
3. 荒川英二:PFGE法による食中毒細菌/腸管感染症菌の疫学への応用, 「PCRの基礎と応用」, 工業技術会,2002
 4. 土肥多恵子、藤橋浩太郎、恵谷ゆり、吉野直人、白井裕子、河村由紀、清野宏、JR McGhee: Adoptive transfer of IL-4 deficient CD4+CD45RBhi T cells to T cell receptor α - β -/- (TCR-/-) mice induced gastritis. 第31回日本免疫学会総会、2001年12月13日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

学会発表

1. 渡邊美帆、西川喜代孝、松岡浩司、照沼大陽、名取泰博:直鎖ポリマーを基材とした高親和性ペロ毒素阻害剤の開発. 日本薬学会第122年会. 3月26日, 2002.
2. 松岡浩司、宮川 淳、照沼大陽、西川喜

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 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部 名取泰博

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、ペロ毒素/志賀毒素 (Stx) 受容体である Gb3 糖鎖を分子内に多数有するのペロ毒素中和剤・Super Twig の利用を検討している。これまで我々は分子内に Gb3 糖鎖を 6 個有する Super Twig が Stx に強く結合すること、培養細胞及びマウス個体レベルにおいて Stx の毒性を中和することを明らかにした。今年度は本化合物の腸管出血性大腸菌感染症の治療薬としての有用性を調べるために、マウスにおける同菌感染症モデルに対する治療実験を行った。その結果、未治療群では接種後 14 日目までに全てのマウスが死亡したのに対して、便中及び血液中に Stx が出現する 3 日目から Super Twig にて治療した群では 7 匹中 6 匹のマウスが生存した。この結果から Super Twig が腸管出血性大腸菌感染症治療薬として有用である可能性が示された。

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 Stx 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。Stx はコレラ毒素と同じく、酵素活性を有する A 鎖 1 本と受容体結合活性を有する B 鎖 5 本から構成される。Stx B 鎖は細胞表面の中性糖脂質 Gb3 (Gal₁ → 4Gal₁ → 4Glc₁ → ceramide) のクラスターに結合して細胞内に取り込まれ、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 Stx 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 Stx 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 Stx 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 Stx 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、ヒトの腸管出血性大腸菌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マウスを用いた腸管出血性大腸菌感染モデルに対する

Super Twig の治療効果について調べた。

B. 研究方法

Gb3 糖鎖を分子内に 6 個有する Super Twig を合成し以下の研究に用いた。感染実験は以下の方法で行った。3 週令のマウス (C57BL/6、♀) を低蛋白 (5%) の餌で 2 週間飼育した後に、志賀毒素産生性大腸菌を接種し、その後も低蛋白食で飼育した。この方法により感染させたマウスでは接種後 2 日目には糞便中に Stx が検出され、3 日目には血清中にも Stx が検出される (Infect. Immun. 66:1726-1734, 1998)。治療群のマウスには、感染 3 日目から 6 日目まで Super Twig (50 μ g/g 体重) を尾静脈より 1 日 2 回投与した。コントロール群は同じプロトコールにて同量の生理食塩水を投与した。結果の統計解析は Kaplan-Meier 生存解析法にて行った。

C. 研究結果

コントロール群は感染後 5 日目には震えなどの神経症状が出現し、14 日目までに全例死亡した。一方、Super Twig 投与群では死亡したマウスは 7 匹中 1 匹のみで、残りの 6 匹は少なくとも 40 日目まで無症状のまま生存したことから、Super Twig が腸管出血性大腸菌感染によるマウスの個体死を有意に抑制することが明らかになった ($P < 0.01$)。また死亡した 1 匹のマウスにも神経症状は全く見られなかった。このことは、ヒトにおける腸管出血性大腸菌感染症の主な死因である脳症の発症に対して Super Twig が有効に抑制することを示しており、同菌感染症の合併症を防ぐ新しい治療法として有望であることを示唆している。

D. 考察

現在まで、体内に入った Stx 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 Stx への強い結合活性を有し、さらに細胞レベル及びマウス個体レベルにおいて Stx の致死活性を完全に中和する。さらに昨年度に報告したように、Super Twig は体内においてマクロファージによる Stx の代謝を促進して無毒化するという、抗体による毒素中和の機構に類似した、これまでにない全く新しいタイプの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。

本研究から Stx 産生菌感染動物で血清内に Stx が検出される時期からでも、その菌の致死活性を有意に抑制できることが明らかになった。この化合物の生体内における動態や代謝については今後の課題であるが、Stx 産生性赤痢菌や腸管出血性大腸菌感染症の治療薬としての可能性を秘めた化合物と言える。

また細菌毒素の中にはコレラ毒素などのように Stx 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、本研究の応用範囲は広いと思われる。

E. 結論

腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法として新しい毒素中和剤による系を創出した。これは菌が感染した後でも早期に同薬剤を投与することにより、重大な合併症を防止する可能性を示していると考えられる。この系が腸管出血性大腸菌感染症の有効な対応策となることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 渡邊美帆、西川喜代孝、松岡浩司、照沼大陽、名取泰博：直鎖ポリマーを基材とした高親和性ペロ毒素阻害剤の開発. 日本薬学会第122年会. 3月26日-28日, 2002.

2. 松岡浩司、宮川 淳、照沼大陽、西川喜代孝、名取泰博：ペロ毒素を標的としたアフィニティークロマトグラフ担体の調製. 第50回高分子学会年次大会. 5月23日-25日, 2002.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

新型コロナウイルスを含むコレラの発生動向調査

分担研究者 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻教授 山崎伸二

研究要旨

コレラの発生動向調査を行うことを目的として、カルカッタにあるインド国立コレラ及び腸管感染症研究所との共同で、西ベンガル州立伝染病病院に入院した下痢症患者からコレラ菌の分離を試み、どのようなコレラ菌が流行に関与しているかを調べた。さらに、薬剤耐性化に関わっているインテグロンの分布と薬剤耐性遺伝子の関係についても解析した。

A. 研究目的

最近の分子疫学的解析から多くの微生物は過去に流行していたものが数年後に流行するという図式ではなく、様々な変異を経て新たな流行株が派生していることが明らかとなってきた。コレラの流行は、エンデミックな地域で流行性のコレラ菌が派生し、それが我が国を含め、世界流行を引き起こしている。患者から分離されるコレラ菌の性状を分子疫学的解析を含め様々な角度から解析することは、新たな流行株の特徴を知ることができ、流行株の出現を早期に感知し対策を講じることができる。本研究では、どのようなコレラ菌が流行に関与しているか、また薬剤耐性化に関わっているインテグロンと薬剤耐性遺伝子の関係を調べることを目的とした。

B. 研究方法

インドカルカッタにある西ベンガル州立伝染病病院に入院した下痢症患者5人毎に1検体をランダムに抽出し、コレラ菌の分離を試みた。分離したコレラ菌の血清型別を行った。分離したコレラ菌に存在するクラス1とクラス4インテグロンについてPCR法とDNAプローブ法でその分布調べた。クラス1インテグロンが陽性となった菌株については、薬剤耐性遺伝子が存在している可変領

域をPCRで増幅しその塩基配列を決定し、どのような薬剤耐性遺伝子が存在しているかについて解析した。

C. 研究結果

1999年から2001年の3年間のコレラ菌の分離状況及び血清型別の結果を表1に示した。2001年に分離したO1コレラ菌、O139コレラ菌およびnon-O1, non-O139コレラ菌は、それぞれ、139株、16株、85株であった。流行のピークは、乾季の5月と雨季明けの10月の2回見られた。過去2年の結果と比較し、O1とO139の分離件数が減少したのに対し、non-O1, non-O139コレラ菌の分離件数は増加した。

過去10年間の研究から、コレラ菌においても薬剤耐性菌が増加傾向にあることが危惧されている。そこで、近年新たに見つかった薬剤耐性化機構に関わっているインテグロンの分布とどのような薬剤耐性遺伝子がコードされているかを1992年から2000年までに分離されたコレラ菌について解析した。表2にその結果を示したように、O1コレラ菌では、43株中42株と7株で、それぞれクラス4とクラス1インテグロンが陽性であった。O139コレラ菌では、45株中42株と1株でクラス4とクラス1インテグロンが陽性であっ

Table 1. Incidence of *Vibrio cholerae* among acute diarrhea cases between 1999-2001

Month	O1			O139			Non-O1, non-O139		
	1999	2000	2001	1999	2000	2001	1999	2000	2001
January	5	3	3	0	0	0	10	1	3
February	0	0	0	1	1	0	4	0	2
March	7	4	6	7	0	0	6	1	9
April	7	20	18	24	4	1	14	6	11
May	13	38	19	23	6	1	11	13	2
June	22	31	15	19	13	2	3	9	10
July	24	13	16	7	1	4	5	7	14
August	30	12	8	4	2	1	4	5	2
September	29	17	20	13	0	0	4	1	10
October	34	27	17	14	6	3	7	2	4
November	12	11	13	5	7	2	3	1	10
December	7	2	4	0	1	2	0	1	8
Total	190	178	139	117	41	16	71	47	85

Table 2. *V. cholerae* strains isolated in India from 1992 to 2000. were detected for presence of *intI4* and *intI1* genes by PCR

Strain	Yr. isolation	No.	No. positive for	
			<i>intI4</i>	<i>intI1</i>
<i>V. cholerae</i>				
O1	1992	5	5	4
	1993	3	3	2
	1994	5	4	1
	1995	5	5	0
	1996	5	5	0
	1997	5	5	0
	1998	5	5	0
	1999	5	5	0
	2000	5	5	0
	Sub Total		43	42
O139	1992	6	6	1
	1993	5	5	0
	1994	5	5	0
	1995	5	5	0
	1996	5	5	0
	1997	4	4	0
	1998	5	5	0
	1999	5	2	0
	2000	5	5	0
	Sub Total		45	42
non-O1/non-O139	1992	6	6	1
	1993	5	5	1
	1994	5	5	1
	1995	4	4	0
	1996	5	3	0
	1997	6	5	1
	1998	4	4	1
	1999	5	4	2
	2000	5	5	0
	Sub Total		45	42
Total		133	126	15

Table 3 Resistance gene cassettes found in *V. cholerae* strains containing class1 integron

<i>V. cholerae</i> strain	Yr. Isolation	Size(s) (bp) of PCR product(s) obtained with in-F and in-B	Inserted gene cassettes
O1			
VC2	1992	1009	<i>aadA</i>
VC12	1992	1009	<i>aadA</i>
VC18	1992	1009	<i>aadA</i>
VC19	1992	1009	<i>aadA</i>
CO361	1993	1009	<i>aadA</i>
CO371	1993	1009	<i>aadA</i>
CO747	1994	2483	<i>aar</i> -3 + <i>aacA</i> 4+ <i>dfra</i> 1+unknown ORF
O139			
CO406	1992	1242	<i>dfra</i> 1 + unknown ORF
non-O1/non-O139			
SG6	1992	1242	<i>dfra</i> 1 + unknown ORF
CO248	1993	739, 1009	<i>dfra</i> 15 , <i>aadA</i> 2
CO775	1994	1242	<i>dfra</i> 1 + unknown ORF
AS416	1997	1242	<i>dfra</i> 1 + unknown ORF
PL91	1998	395, 1242	None, <i>dfra</i> 1 + unknown ORF
NLC35	1999	739, 1197	<i>dfra</i> 15 , <i>blaP</i> 1
NLC38	1999	1009, 1197	<i>aadA</i> 2 , <i>blaP</i> 1
<i>aadA</i> : Aminoglycosides resistance			<i>dfra</i> 1 : Trimethoprim resistance
<i>aadA</i> 2 : Aminoglycosides resistance			<i>dfra</i> 15 : Trimethoprim resistance
<i>aar</i> 3 : Rifampicin resistance			<i>blaP</i> 1 : Beta lactams resistance
<i>aacA</i> 4 : Aminoglycosides resistance			

た。Non-O1, non-O139 コレラ菌では、45株中42株と7株でクラス4とクラス1インテグロンが陽性であった。クラス1インテグロンが陽性となった株の可変領域をPCRで増幅し、その遺伝子断片を解析した。表3にその結果を示したように、O1の6株では、1009 bpの増幅断片が得られ、アミノグリコシドに耐性な *aadA* 遺伝子をコードしていた。残りの1株では、2483 bpの断片が得られ、リファンピシン耐性の *aar3* 遺伝子、アミノグリコシドに耐性な *aacA4* 遺伝子、トリメトプリムに耐性な *dfiA15* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。一方、O139 コレラ菌で陽性となった1株では、1242 bpの増幅断片が得られ、トリメトプリムに耐性な *dfiA1* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。Non-O1, non-O139 で陽性となった7株中、3株では O139 コレラ菌と同様1242 bpの増幅断片が得られ、トリメトプリム耐性の *dfiA1* と未知の ORF をコードしていた。残りの4株については、CO248 株では、739 bp と1009 bpの増幅断片が得られ、それぞれトリメトプリムに耐性な *dfiA15* 遺伝子とアミノグリコシドに耐性な *aadA2* 遺伝子をコードしていた。PL91 株では、約400 bp と1242 bpの増幅断片が得られたが、前者では ORF は得られず、後者では、トリメトプリムに耐性な *dfiA1* 遺伝子と未知の ORF をコードしていた。NLC35 株では、739 bp と1197 bpの増幅断片が得られ、トリメトプリムに耐性な *dfiA15* 遺伝子とベータラクタムに耐性な *blaP1* をコードしていた。NLC38 株では、1009 bp と1197 bpの増幅断片が得られ、それぞれアミノグリコシドに耐性な *aadA2* とベータラクタムに耐性な *blaP1* をコードしていた。

D. 考察

以上の結果より、コレラ菌の薬剤耐性化にイン

テグロンが関与していることが明らかとなった。また、1992年から1993年に分離されたO139コレラ菌は、クローナルと考えられていたがクラス1インテグロンを持つ菌と持たない菌があることとコードしている薬剤耐性遺伝子は、O1コレラ菌型のものでなく、non-O1, non-O139タイプのものであると言う興味深い結果が得られた。このことは、インテグロンの解析がコレラ菌の分子疫学的解析の1つとして非常に有益である事を示す結果を得ることができた。

E. 結論

インドカルカッタでは、分離されるコレラ菌の多くはO1コレラ菌であるが、non-O1, non-O139コレラ菌の分離件数が増加傾向にあった。インドで分離されたコレラ菌からインテグロンが見つかり、薬剤耐性化に寄与していることが明らかとなった。

F. 研究発表

- 1 R.K. Mitra, R.K. Nandy, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S. Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, and G.B. Nair. Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized diarrhea patients. *J. Med. Microbiol.*, 50: 1-9, 2001.
- 2 S. Chakraborty, P. Garg, T. Ramamurthy, J.K. Gautam, C. Sharma, C. Kumar, S. Maiti, S. Yamasaki, T. Shimada, Y. Takeda, A. Ghosh and G.B. Nair. Comparison of antibiogram, virulence genes, ribotypes and DNA fingerprints of *Vibrio cholerae* of matching serogroups isolated from hospitalized diarrhea cases and from the environment during 1997-98 in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.*, 50: 879-888, 2001.