

厚生労働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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名取 泰博

平成 15 (2003) 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	8
2. 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	11
3. 腸管における細菌感染の抑制 分担研究者 土肥多恵子	15
4. 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	17
5. 腸炎ビブリオの病態解明とそれに基づく診断・治療法の開発 分担研究者 本田武司	19
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21

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

本年度は腸管出血性大腸菌感染症に対する治療法、コレラの発生動向調査と予防・治療法、腸炎ピブリオ感染症の発生動向調査、診断法及び腸管外感染の可能性に関する研究を行った。

本研究班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 Stx 中和剤の利用を検討している。今年度はこれまで報告されている中和剤として最も強力で、経口投与でも治療効果のある化合物を開発した。この化合物はポリアクリルアミド骨格に Gb3 糖鎖を有する直鎖ポリマーで、昨年まで報告した Super Twig より 100 倍以上強い結合活性を示し、また培養細胞に対する Stx1 及び Stx2 の結合及び細胞毒性を低濃度にて中和した。さらにマウスの腸管出血性大腸菌感染モデルに対して、感染後 3 日目から経口投与することにより、その致死活性を抑制することがわかった。以上の結果から、本直鎖ポリマーは Super Twig とともに腸管出血性大腸菌感染症の新しい治療薬として有力な候補と考えられた。

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、バングラデシュとタイで分離されたコレラ菌について、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。その結果、コレラ菌の薬剤耐性化にはクラス 1 インテグロンでなく、クラス 4 インテグロンを含む別なメカニズムで耐性能を獲得していることが明らかとなった。

オリゴ糖腸管内投与によるコレラの予防・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 O1 classical または O1 El tor 型の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。その結果、 α 1,2 フコースを含む Type H 血液型糖鎖およびシアル酸を含有する 3 糖よりなる精製オリゴ糖が、コレラ菌の小腸膜画分への接着を阻害することを明らかにした。血液型 O 型が、コレラ症の発症頻度や重症度に正の相関をしていることは様々な流行地で古くから報告されており、コレラ菌が、宿主の消化管上皮に存在する O 型血液型糖鎖を粘着のレセプターとして使用していることを示唆している。

1993 年頃から急増した腸炎ピブリオによる食中毒は、1998 年をピークにして、事例数、患者数ともに減少し、2001 年の集計では、ピーク時と比較して事例数で 36.1%、患者数では 24.8%となった。発生数は大きく減少したが、集団事例での O3:K6 に代表されるいわゆる新型クローンの減少率は全体の減少率よりも緩やかであったため、相対的に O3:K6 の割合がさらに高くなり、発生のほとんどが新型クローンと言える状況になった。この新型クローンの識別に適した方法として PFGE および PCR 産物の泳動パターンによる 4 つの遺伝子型別を検討した結果、AP-PCR が最も適していることが示唆された。

米国からの報告を見ると敗血症を含む腸管外感染症からの腸炎ピブリオの分離頻度が 30%強に及ぶ。これは、腸炎ピブリオが細胞侵入性を持つ可能性を示唆する。そこで、我が国での分離株について細胞侵入性を調べた結果、数%の菌株が細胞侵入性を示した。この侵入性は、Cyochalasin D で阻害され、アクチン重合との関連が示唆された。しかし、サルモネラや赤痢菌の侵入に関与する Rho family の G

蛋白の活性化と腸炎ビブリオの細胞内侵入性は異なった挙動を示した。腸炎ビブリオは、サルモネラや赤痢菌とは異なった機構で細胞内に侵入すると思われ、我が国でも腸炎ビブリオが腸管外感染を起こす可能性を認識する必要があると考えられた。

分担研究者

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は対症療法に限られ、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 Stx 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

1. 腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法の開発

アクリルアミドと、それにスパーサーを介して Gb3 糖鎖を結合させたモノマーを異なる比率で重合させて 3 種類の直鎖ポリマーを作製した。またコントロールとしてラクトースを結合させたポリマーを調製して用いた。本研究で用いた腸管出血性大腸菌のマウス感染モデルでは接種後 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。そこで治療群のマウスには、感染 3 日目から 6 日目まで直鎖ポリマーを 1 日 2 回経口投与した。

2. コレラ菌 (*V. cholerae*) の発生動向

インド西ベンガル州立伝染病病院に入院した下痢症患者 5 検体毎に 1 検体をランダムに抽出し、コレラ菌の分離を試み、各々の血清型別を行った。バングラデシュとタイで分離されたコレラ菌に存在するクラス 1 とクラス 4 インテグロンの分布を調べ、クラス 1 インテグロン陽性株については、どのような薬剤耐性遺伝子が存在しているか解析し、得られた結果をインド由来株の結果と比較した。

3. 腸管における細菌感染の抑制

ヒト剖検標本より採取した小腸粘膜から膜分画を調製し、ELISA プレートに固相化した。これに *Vibrio cholerae* O1 classical (CI3 株) または O1 El tor 型 (E08 株) を粘着させ、ウサギ抗 O1 コレラ菌抗体を用いて結合した菌体を定量した。またこの粘着能アッセイ系で、菌株を種々の血液型物質関連構造を持つオリゴ糖と混合して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. 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) の発生動向調査及びそれに必要な診断法

新型と旧型腸炎ビブリオ O3:K6 を含む計 55 株について、AP (Arbitrary Primed) -PCR、RS (ribosomal gene spacer sequence) -PCR、REP (Random Amplified Polymorphic DNA) -PCR、ERIC (enterobacterial repetitive inter-

genic consensus sequence)-PCR の4種類の方
法を用いて解析した。また遺伝子型別を行うに
あたり、相互の電気泳動パターンの相同性を数
値化するために Dice coefficient を用いた。上
記の解析とは別に、下痢症患者由来菌株と環境
由来菌株とを比較するために、1969年～2002
年に愛知県内で発生した56事例の患者から分離
された125株、散发性下痢症患者からの分離株
としては、1988年～2002年に愛知県内の特定1
病院の患者から分離された498株、また海産魚
介類に由来する菌株として、1995年～2001年
に名古屋市中央卸売市場で流通していた約80魚
種の海産魚に由来する1,541株を用いた。

5. 腸炎ピブリオの病態解明

患者分離株18株、環境分離株3株を用いて細胞
浸透試験を行った。マイクロプレートで培養
したCaco-2細胞に菌体 10^6 を3時間チャレン
ジし、3回洗浄後さらにカナマイシンを含む培地
で1時間培養した。1回洗浄後、0.1% Triton X-
100で細胞を溶解し、LB寒天平板上で菌数を
測定し、浸入した菌体数の割合を求めた。また
既報に従い RhoN19, RacN17, Cdc42N17 に
FLAG 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、
これらのプラスミドをCaco-2細胞に導入して、
Rho, Rac, Cdc42 の dominant-negative 細胞
を得た。

C. 研究結果

1. 腸管出血性大腸菌感染症に対する新規治療法 の開発

試した Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーはいずれも
Stx1 及び Stx2 の標的細胞への結合を阻害した。
その程度は Super Twig と同程度であり、3種類
のポリマーの中では、糖鎖が最も多い化合物が
最も阻害活性が強く、特に Stx2 に対しては Super
Twig より 10 倍程度強く阻害することがわかっ
た。ラクトース含有直鎖ポリマーは全く中和活
性を示さず、この活性が糖鎖特異的であること
が確認された。細胞毒性に対する中和活性は結
合阻害活性に比べて、糖鎖密度に対する依存性
がさらに高く、特に Stx2 に対して、糖鎖が最も
多い化合物は Super Twig より 20 倍以上強力
な細胞毒性中和活性を示した。さらに Stx1 に対
する Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーの結合の強さを
測定したところ、Super Twig と比べて 100 倍
以上の結合の強さを示し、nM オーダーの K_D 値
であった。

この Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーを用いた治療
法のモデルとして、マウスの腸管出血性大腸菌
感染モデルに対する治療効果を調べた。昨年度
に報告したように、この感染モデルでは菌を接
種後 3～6 日目頃の間には血清中に Stx が検出さ
れ、7～14 日後までにマウスが死亡する。そこ

で血清中に Stx が検出されるこの期間に各 Gb3
糖鎖含有直鎖ポリマーを経口投与した。コント
ロール群として生食投与したマウスは計 8 匹中 7
匹が 10 日目までに死亡したのに対し、直鎖ポリ
マー投与群では計 9 匹中 8 匹が生存した。この
結果から、本研究に用いた Gb3 糖鎖含有ポリア
クリルアミド直鎖ポリマーは腸管出血性大腸菌
感染マウスモデルに対して治療効果があること
が明らかとなった。

2. コレラ菌 (*V. cholerae*) の発生動向

2002 年は合計 2129 検体について調べ、O1
コレラ菌 83 株、O139 コレラ菌 70 株および
non-O1, non-O139 コレラ菌 78 株分離された。
2002 年は 2001 年に比べ、分離された O1 コレ
ラ菌の数が 139 から 83 へとさらに減少したの
に対し、O139 コレラ菌の分離数は 16 から 70 と
増加した。non-O1, non-O139 は 85 から 78 と
ほぼ横這いであった。コレラの流行のピークは、
乾季の 5 月と雨季の 8 月の 2 回あった。乾季に
は、分離されるコレラ菌の大多数が O139 と
non-O1, non-O139 であったのに対し、雨季は、
O139 non-O1, non-O139 コレラ菌の分離件数
はかわらないものの、分離される O1 コレラ菌の
割合が増加した。

1993 年から 2000 年にかけて、バングラデシ
ュで分離された O1 コレラ菌と O139 コレラ菌に
ついてクラス 1 インテグロンとクラス 4 インテ
グロンの分布について調べた。その結果、クラ
ス 4 インテグロンは全てのコレラ菌で陽性であ
ったのに対し、クラス 1 インテグロンは、1992
年に分離された O1 コレラ菌から 2 株、1993 年に
分離された O1 コレラ菌で 1 株が陽性となったが、
それ以外は全て陰性であった。クラス 1 インテ
グロンが陽性となった 3 株について、薬剤耐性
遺伝子がコードされていると考えられる可変領
域を PCR で増幅し、その遺伝子断片の塩基配列
を解析したところ、3 株とも 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。一方、1999 年から 2002
年の間にタイで分離された O1 コレラ菌では、調
べた 235 株全てでクラス 1 が陰性で、クラス 4
が陽性であった。

3. 腸管における細菌感染の抑制

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), 6SL (NeuAca2,6Gal β 1,4Glc),
3SL (NeuAca2,3Gal β 1,4Glc), GD3 (NeuAca2,8
NeuAca2,3Gal β 1,4Glc), GM2 (GalNAc β 1,4[Neu
Aca2,3]Gal β 1,4Glc) を用いた粘着能阻害活性を 3
症例で解析した結果、O1 型コレラ菌は O139 型
に比べて 3FL、シアル酸含有糖鎖など、多くの種

類のオリゴ糖によって粘着阻害が見られた。2FLはO1, O139型いずれのコレラ菌の粘着も阻害した。

4. 腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) の発生动調調査向及びそれに必要な診断法

新型クローンによる汚染実態を知る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。国内での分離例や海外からの同定依頼株について解析を行ったところ、1996年以降の株はいずれも類似の PFGE 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。この新型クローンを迅速かつ簡便に検出する方法として4種類の PCR 法について検討を行った。その結果、AP-PCR が最も適していることが示唆され、また新型クローンの遺伝子マーカーとして ORF8 遺伝子あるいは *toxRS* 遺伝子がかなり確度の高いマーカーではあるが完璧ではないことがわかった。

一方、ヒトに対する病原性に関わる因子を調べるために、患者由来株及び環境由来株について TDH 遺伝子と TRH 遺伝子の有無を比較検討した。その結果、TDH 遺伝子は下痢症由来株の 93.9% から検出されたのに対し、海産魚由来株からはわずか 0.32% から検出されたのみであった。また TRH 遺伝子は下痢症由来株の 4.3% から、海産魚由来株の 0.52% から検出された。TRH 遺伝子について、*trh1* と *trh2* は別のクラスターに分けることが出来、さらに遺伝子型として 13 種類に型別分類された。*trhx* は *trh1* とかなり近い関係にあったが、*trh1* タイプは *trhx* を含めて 8 つの型に分けることが出来た。以上、下痢症においては TRH 陽性株は TDH 陽性株に比べ低率に検出されているが、環境由来株は極めて低率ながらも TRH 陽性株が TDH 陽性株よりも高く検出されていること、さらに TRH 遺伝子の多型性が非常に富んでいることなどが明らかになった。

5. 腸炎ビブリオの病態解明

21 株の腸炎ビブリオについて調べたところ、4 株が細胞侵入性を示した。これらはいずれも臨床分離株であり、環境分離株 3 株には侵入性を示したものはなかった。

赤痢菌やサルモネラの細胞内への侵入作用は、細胞骨格やチロシンリン酸化酵素が関与し、これらに対する阻害剤で細胞侵入性が阻害される。そこで、cytochalasin D, nocodazole, genistein の侵入性への影響を調べたところ、いずれの阻害剤でも腸炎ビブリオの Caco-2 細胞への侵入性が阻害された。この結果から腸炎ビブリオの細胞侵入性には細胞骨格蛋白の関与が疑われたことから、Rho, Rac, Cdc42 の small GTPase 分子の関与を dominant-negative 発現

系で調べたところ、Salmonella や Shigella と異なり、細胞侵入性はかえって促進された。逆に、dominant-active Rho ファミリー蛋白を発現させる系では、腸炎ビブリオの細胞侵入性は阻害されることがわかった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌感染症の新しい治療薬の開発を目的とし、現在まで、Gb3 糖鎖を分子内に複数有する種々の化合物が合成され、Stx の中和剤として報告されているが、個体レベルで効果が報告された例はない。一昨年度の本研究で我々は、マウス個体レベルにおいて、体内に入った Stx の活性を中和する化合物 Super Twig について報告し、さらに昨年度は Stx 産生菌感染マウスにおいて血清内に Stx が検出される時期からでも、Super Twig を静脈投与することにより、その菌の致死活性を有意に抑制できることを示した。これらの結果からこの化合物は、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。

本年度は、さらに実用に近づけるべく、より強力な Stx 中和剤の開発を試み、その結果、ポリアクリルアミドを骨格とする直鎖ポリマーに Gb3 糖鎖を結合させた化合物が Stx1 及び Stx2 と強く結合し、Super Twig よりもさらに低濃度で Stx の毒性を中和することを見出した。さらにこの化合物はマウスの感染モデルにおいて、経口投与により治療効果があることが示された。これまでに Stx の活性を抑制することを目的として開発された抗体や吸着剤などに関する報告では、本研究で示したように、感染モデルにおいて優れた治療効果を示した例は全くなく、本ポリマーの結果は画期的な成果であると考えている。本直鎖ポリマーが感染モデルに有効であった作用機構が、腸管内における Stx の吸着によるものか、あるいは体内に吸収された後に中和剤として働くのか、未だ不明であるが、今後、その点も含めて研究を進めることにより、腸管出血性大腸菌感染症の合併症を予防することで、同菌の感染が原因で死亡することを防ぐという新しい治療法が確立されることが期待される。

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动向を把握することを目的として、本研究では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ている。2002 年の傾向として、O1 コレラ菌の分離率が 30% まで低下した一方、O139 コレラ菌を含め、non-O1, non-

O139 コレラ菌の分離率が増加した事を挙げる事ができる。過去5年間のデータを比較すると、コレラの発生件数は年々減少傾向にあるが、O139 コレラ菌と non-O1, non-O139 コレラ菌によるコレラの発生件数は増加傾向にある。血清型によって、薬剤耐性パターンが異なることから、特に non-O1, non-O139 コレラ菌で耐性化傾向の強いテトラサイクリンの使用は注意を要する。一方、昨年度の本研究により、インテグロンが、アミノグリコシド、トリメトプリム、ベータラクタム等の薬剤耐性化に寄与していることを明らかとなったが、インドだけでなく、バングラデシュ、タイの結果からも、O1 及び O139 コレラ菌からクラス1インテグロンが全く見つからなかった。従って近年の薬剤耐性化に、クラス1インテグロンは関係なく、クラス4インテグロンかまたは全く別の機構が関与している可能性が考えられた。クラス4インテグロンは、126 kb もの大きさを有するので解析に時間を要するが、薬剤耐性遺伝子をクローニングし、その上流下流の塩基配列を解析し、どのように耐性能が賦与されたかを検討していくことにより、近年の薬剤耐性化のメカニズムを明らかにすることができると考えられる。

コレラ菌に対する予防・治療法としてオリゴ糖による小腸への菌の粘着阻止を目指して実験を行った結果、コレラ菌は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、粘着が阻害されることが明らかとなった。特にフコース含有糖鎖であるH型血液型糖鎖はO139, O1 型に共通して粘着阻害活性が見られた。血液型O型が、コレラ症の発症頻度、重症度に正の相関をしていることは様々な流行地で報告されており、コレラ菌が、宿主のO型血液型糖鎖を粘着のレセプターとして使用していることを示唆する結果であった。オリゴ糖の安全性について投与の際に予測される問題点は特になく、oral rehydration solution に2FLを中心としたコレラ阻害活性を持つオリゴ糖混合物を加えて、血液型O型患者の重症化を予防できる可能性が示唆された。

1993年頃から我が国で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、事例数、患者数ともに減少し、2001年の集計では、ピーク時と比較して事例数で36.1%、患者数では24.8%となった。発生数は大きく減少したが、集団事例でのO3:K6に代表されるいわゆる新型クローンの減少率は全体の減少率よりも緩やかであったため、相対的にO3:K6の割合がさらに高くなり、発生のほとんどが新型クローンと言える状況になった。本研究でこの新型クローンの識別に適した方法としてPFGEおよびPCR産物の泳動パターンによる4つの遺伝子型別を検

討した結果、AP-PCRが最も適していることが示唆された。しかし、AP-PCRは特にその再現性に頻繁に問題が認められ、この手法のみで識別するのは困難であった。したがって、PFGEなどの他の手法と組み合わせて解析・識別等行うことが望ましいと考える。他方、遺伝子マーカーとして報告されているtoxRS配列もORF8も必要十分な遺伝子マーカーにはなりえない、すなわち、toxRS配列が新型と同一であるから新型腸炎ビブリオであるとは限らないこと、新興型腸炎ビブリオであるからORF8を持つとは限らないということが本研究から示唆された。新興型腸炎ビブリオの遺伝子マーカーに関してはさらなる検討を加える必要のあることが指摘された。

一方、患者由来株と環境由来株の間の差異について、塩基配列を解析した結果からは、遺伝子型と血清型とに相関が認められ、遺伝子型も血清型同様、疫学解析に応用できることが示唆された。これまでの報告の通り、trh1とtrh2は別のクラスターに分けることが出来、さらに13の型に細分することが出来た。食中毒由来株、海産魚由来株はtrh1タイプ、trh2タイプのどちらの型も検出されたが、海産魚由来株の型は食中毒で認められた株の型でしか検出されず、trh遺伝子の多型性を調べることは、この毒素による食中毒の原因を推定するうえで有効である可能性が示唆された。今後、TRH遺伝子の多型性がTRH陽性株の下痢起病性とどのように関係するのかを明らかにするために、食中毒、散发例及び環境中におけるTRH陽性株の分布調査、及びTRHの病原性の検討の必要性が考えられた。

我が国での患者からの腸炎ビブリオの分離情報のほとんどは、下痢便由来であり、敗血症や創傷感染からの分離例はほとんどない。これに対して米国では、腸管外病変からの分離がかなりの高い率で報告されている。そこで、我が国の下痢便由来の腸炎ビブリオの細胞侵入性をしらべたところ、約20% (4/18)の菌株でCaco-2細胞に対する細胞侵入性を有することが明らかとなった。この細胞侵入性は、細胞骨格蛋白が関与していると考えられるが、サルモネラや赤痢菌の侵入性と異なり、Rho family GTPaseの関与の仕方が異なり、既知の侵入経路とは別の侵入機構を有している可能性が示唆された。腸炎ビブリオの感染部位が日米間で違うのは、侵入能を持つ菌株の自然界での分布の違い、あるいは日本人は早くから腸炎ビブリオに曝され(生菌・無毒菌・死菌)、何らかの基礎免疫がある可能性などが考えられる。いずれにしても、我が国においても腸炎ビブリオが腸管外感染を起こす可能性があることを認識する必要があり、今後の警戒が必要であると考えられる。

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、経口投与でも有効な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。

小腸におけるコレラ菌の粘着に対してフコースあるいはシアル酸を有するある種のオリゴ糖が阻害活性を有することがわかった。その安全性には問題がないことから、今後、コレラの予防や治療の新しい手法として有望な方法と考えられる。

世界のコレラ高浸淫地域の一つであるインドカルカッタでは、コレラの発生件数、特に O1 コレラ菌によるコレラが減少傾向にあるが、O139 コレラ菌と non-O1, non-O139 コレラ菌によるコレラの発生件数は増加傾向にある。従って、我が国への輸入感染症としてコレラとして、O1 コレラ菌のみならず O139 と non-O1, non-O139 コレラ菌についても注意を払う必要がある。

新型腸炎ビブリオの遺伝子型分類について有用な手法を見出した。また下痢症患者由来と環境由来の腸炎ビブリオの TDH 及び TRH 遺伝子遺伝子について調べた結果、両遺伝子とも環境由来菌株では極めて低い率で検出されることがわかった。

腸炎ビブリオの 1 部の菌株は、既知の侵入性細菌（サルモネラ、赤痢菌）とは異なる細胞侵入性を持つことがわかった。これが、米国における腸管外感染症からの腸炎ビブリオの分離率が高い理由かもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Akeda Y, Kodama T, Kashimoto T, Cantarelli V, Horiguchi Y, Nagayama K, Iida T, Honda T: Dominant-negative Rho, Rac, and Cdc42 facilitate the invasion process of *Vibrio parahemolyticus* into Caco-2 Cells. *Infect. Immun.* 70:970-973, 2002.
2. Tagomori K, Iida T, Honda T: Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J. Bacteriol.* 184:4351-4358, 2002.
3. Iida T, Makino K, Nasu H, Yokoyama K, Tagomori K, Hattori A, Okuno T, Shinagawa H, Honda T: Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the dif-Like site of the host chromosome. *J. Bacteriol.* 184:4933-4935, 2002.
4. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T: Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 361:743-749, 2003.
5. 本田武司 (分担): 細菌学 「腸炎ビブリオ」、(竹田美文、林 英生編) 朝倉書店 p409-418, 2002.
6. Dohi T, Fujihashi K, Koga T, Shirai Y, Kawamura YI, Ejima C, Kato R, Saitoh K, Mcghee JR: T Helper Type-2 Cells Induce Ileal Villus Atrophy, Goblet Cell Metaplasia And Wasting Disease In T Cell-Deficient Mice. *Gastroenterology*. in press, 2003.
7. Hashimoto M, Kirikae F, Dohi T, Adachi S, Kusumoto S, Suda Y, Fujita T, Naoki H, Kirikae T: Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur. J. Biochem.* 269:3715-3721, 2002.
8. Chhotray GP, Pal BB, Khuntia HK, Chowdhury NR, Chakraborty S, Yamasaki S, Ramamurthy T, Takeda Y, Bhattacharya SK, Nair GB: Incidence and molecular analysis of *Vibrio cholerae* associated with cholera outbreak subsequent to the super cyclone in Orissa, India. *Epidemiol. Infect.*, 128:131-138, 2002.
9. Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB: *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Odyssey of a fortuitous variant. *Microbiol. Infect.*, in press.
10. Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H: Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *J. Clin. Microbiol.* 40:2708-2709, 2002.
11. Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, Hino K, Miyazawa S.

Yamasaki C, Aoki J, Takashima S, Yamakawa Y, Nishijima M, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori Y: A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Proc Natl Acad Sci USA 99:7669-7674, 2002

学会発表

1. 河村由紀, 白井裕子, 加藤理恵, 濱端崇, 山本正文, 古川鋼一, Kohtaro, F, McGhee, JR, 土肥多恵子: GM1 ganglioside functions as a receptor for pathogen-associated molecular patterns (PAMP). 第32回日本免疫学会総会・学術集会(東京), 2002.
2. Dohi, T, Fujihashi, K, Shirai, Y, Kawamura, YI, Kato, R, McGhee, JR: Small intestinal transformation and wasting disease induced in T cell deficient mice by adoptive transfer of CD45RBhi Th2 cells. AGA Research Forum, Epithelial cell-

immune cell interactions, Digestive Disease Week Annual Meeting (San Francisco), 2002.

3. 大倉正稔, 大澤朗, 井口純, 荒川英二, 渡邊治雄, 新興型および旧型腸炎ビブリオO3:K6の遺伝子型, 第36回腸炎ビブリオシンポジウム, 2002
4. 鈴木理恵子, 沖津忠行, 楠本正博, 荒川英二, 新川隆康, 魚介類の腸炎ビブリオおよび *Vibrio vulnificus* 定量調査 - 培養法とPCR法による遺伝子検出法との比較 -, 第36回腸炎ビブリオシンポジウム, 2002
5. 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. 第6回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム(東京). 6月24日-25日, 2002.

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

「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」
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 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部

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 Stx 中和剤の利用を検討している。昨年度までに我々は、Gb3 糖鎖含有樹脂状化合物・Super Twig が Stx に強く結合すること、マウス感染モデルにおいて同薬剤の尾静脈投与が治療効果を示すことを明らかにした。今年度は Super Twig よりもさらに強力な Stx 中和活性を示す化合物を開発した。この化合物はポリアクリルアミド骨格に Gb3 糖鎖を有する直鎖ポリマーで、Super Twig より 100 倍以上強い結合活性を示した (グルコ3糖のモル濃度に換算して $1.1 \times 10^{-10} \text{M}$)。また培養細胞に対する Stx1 及び Stx2 の結合及び細胞毒性を低濃度にて中和した。さらにマウスの腸管出血性大腸菌感染モデルに対して、感染後3日目から経口投与することにより、その致死活性を抑制することがわかった。以上の結果から、本直鎖ポリマーは Super Twig とともに腸管出血性大腸菌感染症の新しい治療薬として有力な候補と考えられた。

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 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 (Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc α 1 \rightarrow 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 (Super Twig と命名)。これまで種々の構造の Super Twig について、その活性を調べた結果、糖鎖を6個結合させた Super Twig は Stx に対して強い結合性を示し、培養細胞及びマウス個体に対する Stx の毒性を中和することを見出した。さらにこの化合物は腸管出血性大腸菌のマウス感染モデルにおいて、菌が定着し、Stx

が糞中や血中に検出される感染3日目から尾静脈投与すると、菌の致死活性を抑制することを明らかにした。

今年度は Super Twig よりもさらに強力な Stx 中和剤の開発を試み、ポリアクリルアミド骨格に Gb3 糖鎖を結合させた化合物について検討した。

B. 研究方法

アクリルアミドにスパーサーを介して Gb3 糖鎖を結合させたユニット (X) と結合させていないユニット (Y) を調製し、それらを 1:0、1:8.5、1:11 の割合でポリマー化させた3種類の化合物を作製した。またコントロールとしてラクトース (Gb3 糖鎖の非還元末端のガラクトースの無い糖鎖) を結合させたポリマーを調製して用いた。

直鎖ポリマーの Stx への結合を調べるために、Stx の A1 サブユニットを GST に置き換えた融合蛋白質を調製し、これを抗 GST 抗体を介して BIAcore™ のセンサーチップに結合させたものを用いた。標的細胞への結合実験は30分、細胞毒性の実験では3日間、Stx と細胞とともに中和剤を加えてインキュベートし、その中和活性を測定した。腸管出血性大腸菌のマウス感染実験は以下のように行った。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、同菌を接種し、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日目まで直鎖ポリマー (50 $\mu\text{g/g}$ 体重) を1日2回経口投与した。コントロール群は同じプロトコルにて同量の生理食塩水を投与した。

C. 研究結果

試した Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーはいずれも Stx1 及び Stx2 の標的細胞への結合を阻害した。Stx1 に対する IC50 はいずれも Super Twig と同程度であり、Stx2 に対しては 1:8.5 のポリマーは Super Twig と同程度、1:0 ポリマーはひと桁低い濃度であり、1:0 ポリマーが Stx2 の結合を強力に阻害することがわかった。ラクトース含有直鎖ポリマーは全く中和活性を示さず、この活性が糖鎖特異的であることが確認された。

Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーの細胞毒性に対する中和活性は結合阻害活性に比べて、糖鎖密度に対する依存性が高く、特に Stx2 に対しては 1:0 ポリマーの IC50 は 1:11 ポリマーの値より約 40 倍低かった。また 1:0 ポリマーの IC50 は Stx2 に対しては Super Twig とほぼ同じ値であったが、Stx1 に対しては 20 倍以上低く、Super Twig よりさらに強力な細胞毒性中和活性があることがわかった。

Stx1 に対する Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーの結合の強さを BIAcore™ を用いて測定した。その結果、いずれもポリマーも Super Twig と比べて 100 倍以上の結合の強さを示し、nM オーダーの K_D 値であった。

最後にマウスの感染モデルに対する Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーの治療効果について調べた。昨年度に報告したように、この感染モデルでは菌を接種後 3~6 日目頃の間には血清中に Stx が検出され、7~14 日後までにマウスが死亡する。そこで血清中に Stx が検出されるこの期間に各 Gb3 糖鎖含有直鎖ポリマーを経口投与した。コントロール群として生食投与したマウスは計 8 匹中 7 匹が 10 日目までに死亡したのに対し、直鎖ポリマー投与群では計 9 匹中 8 匹が生存した。この結果から、本研究に用いた Gb3 糖鎖含有ポリアクリルアミド直鎖ポリマーは腸管出血性大腸菌感染マウスモデルに対して治療効果があることが明らかとなった。

D. 考察

現在まで、Gb3 糖鎖を分子内に複数有する種々の化合物が合成され、Stx の中和剤として報告されているが、個体レベルで効果が報告された例はない。一昨年度の本研究で我々は、マウス個体レベルにおいて、体内に入った Stx の活性を中和する化合物 Super Twig について報告し、さらに昨年度は Stx 産生菌感染マウスにおいて血清内に Stx が検出される時期からでも、Super Twig を静脈投与することにより、その菌の致死活性を有意に抑制できることを示した。これらの結果からこの化合物は、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。

本年度は、さらに実用に近づけるべく、より強力な Stx 中和剤の開発を試み、その結果、ポリアクリルアミドを骨格とする直鎖ポリマーに Gb3 糖鎖を結合させた化合物が Stx1 及び Stx2 と強く結合し、Super Twig よりもさらに低濃度で Stx の毒性を中和することを見出した。さらにこの化合物はマウスの感染モデルにおいて、経口投与により治療効果があることが示された。これまでに Stx の活性を抑制することを目的として開発された抗体や吸着剤などに関する報告では、本研究で示したように、感染モデルにおいて優れた治療効果を示した例は全くなく、本ポリマーの結果は画期的な成果であると考えている。

本直鎖ポリマーが感染モデルに有効であった作用機構が、腸管内における Stx の吸着によるものか、あるいは体内に吸収された後に中和剤として働くのか、未だ不明であるが、今後、その点も含めて研究を進めることにより、腸管出血性大腸菌感染症の合併症を予防することで、同菌の感染が原因で死亡することを防ぐという新しい治療法が確立されることが期待される。

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、経口投与でも有効な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。第6回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム（東京）。6月24日-25日, 2002.

2. Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, Hino K, Miyazawa S, Yamasaki C, Aoki J, Takashima S, Yamakawa Y, Nishijima M, Terunuma D,

Kuzuhara H, Natori Y: A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Proc Natl Acad Sci USA 99:7669-7674, 2002

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

「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」
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

研究要旨

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、事例数、患者数ともに減少し、2001年の集計では、ピーク時と比較して事例数で36.1%、患者数では24.8%となった。発生数は大きく減少したが、集団事例でのO3:K6に代表されるいわゆる新型クローンの減少率は全体の減少率よりも緩やかであったため、相対的にO3:K6の割合がさらに高くなり、発生のおほとんどが新型クローンになったと言っても過言ではなくなった(50.6%→81.1%)。2002年の速報値においても、10名以上の発生における血清型の分布は、O3:K6が23例中14例(60.9%)であり、引き続きO3:K6が主流を占めていることに変わりはない。

新興型と旧型腸炎ビブリオ O3:K6 を含む計 55 株について PFGE および PCR 産物の泳動パターンによる 4 つの遺伝子型別 (AP-PCR、RS-PCR、REP-PCR、ERIC-PCR) を行った結果、新興型の識別には AP-PCR が最も適していることが示唆された。他方、RS-PCR では新興型株と旧型を含むそれ以外の株との識別ができなかった。さらに上記の株について新興型 DNA に特異的に存在する toxRS 配列、ORF8 の PCR による検出を行った結果、toxRS 配列を持つ新興型以外の株、ORF8 を持たない新興型株が見られ、いずれも新興型と同定するに足る必要十分的な遺伝子マーカーとはならないことが確認された。

また下痢症患者由来と環境由来の腸炎ビブリオの TDH 及び TRH 遺伝子について調べた結果、食中毒及び散发性下痢症に由来する 623 株のうち、TDH 陽性株は 93.9%、TRH 陽性株は 4.3%であったのに対し、海産魚由来の 1,541 株のうち TDH 陽性株は 0.32%及び TRH 陽性株は 0.52%と非常に少なかったが、ヒト由来株とは反対に TRH の方がわずかながら高率であることがわかった。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒で検出される腸炎ビブリオの血清型は様々であるが、1995年まではO4:K8血清型菌による事例がわが国で主流であった。ところが、1996年以降は優勢を占めていたO4:K8からO3:K6に激変した。このO3:K6型菌の急増が1997年以降の激増の原因と考えられる。しかし、O3:K6型株は1996年以前にも臨床的に分離されており、この腸炎ビブリオ食中毒の優勢血清型の変換が何に起因したのかは不明である。海外でもO3:K6型菌による事例が、インド、東南アジア、アメリカなどで発生している。また、1998年以降、O4:K68というこれまでにない新しい血清型やO1:KUT、O1:K25などによる事例がわが国を含め、タイやインドなどで発生している。これまで起こった腸炎ビブリオ食中毒の歴史上、このように特定の血清型菌がこれほど広範囲で流行したことは、初めてのことであり、現在その動向が注目

されている。

近年、菌株間の遺伝子型の異同を識別する手法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis : PFGE) による解析が広く用いられている。その結果、新興型 O3:K6 株は単一クローンが拡大した可能性が示唆され、さらに新血清型 O4:K68 株や O1:KUT 株が新興型 O3:K6 株と PFGE パターンに類似性が見られることから、これらの血清型株の起源は新興型 O3:K6 株と系統的に密接な関係があると考えられるようになった。

本研究では、新興型腸炎ビブリオの遺伝的特徴をあきらかにするべく、1996年以前、以降のO3:K6株を中心に、対象菌株数を大幅に増やし、これらについて多角的に系統解析を行った。同時に、新興型腸炎ビブリオの遺伝子マーカーとして報告されている toxRS 配列と ORF8 を標的とした PCR を行い、その有用性についてさらなる検討を加えた。

一方、腸炎ビブリオの主要病原因子としては、耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) 及び TDH 類似毒 (TDH related hemolysin: TRH) がこれまでに報告されている。PCR 法を用いた検出法においては、患者分離株からは *tdh* 遺伝子はかなり高率に検出される。また、少数ではあるが、*trh* 遺伝子も患者分離株から検出される。ところが環境分離株からは *tdh* 遺伝子保有の腸炎ビブリオの検出率は極めて低い。

腸炎ビブリオ食中毒は、原因菌が海水中を生息域とするため、魚介類が原因食品となる例が多い。2001 年の食中毒統計によれば、原因食品の明らかになった事例のうち、腸炎ビブリオでは 31.1 %が魚介類によるものであった(サルモネラでは 0.7%)。そこで *tdh* 遺伝子あるいは *trh* 遺伝子を保有する腸炎ビブリオの下痢症及び環境中における分布を調査した。また、*trh* 遺伝子は多型性のあることがこれまでに知られており、*trh1*、*trh2*、*trhx* などが報告されている。そこで、*trh* 遺伝子の多型性を調べることにより、環境分離株と患者分離株の *trh* 遺伝子の近縁関係について解析を行った。

B. 研究方法

計 55 株を用いた。1996 年以降に分離された O3:K6 株は 18 株、1995 年以前に分離された O3:K6 株は 17 株である。他の血清型に関しては、O4:K68 株が 6 株、O1:KUT 株が 3 株、O1:K25 株が 3 株、O1:K26 株、O1:K4?株、O3:K56 株、O4:K8 株、O3:K46 株、O8:K41 株、O3:K48 株、O1:K1 株が 1 株ずつである。また解析には AP (Arbitrary Primed) -PCR、RS (ribosomal gene spacer sequence) -PCR、REP (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR、ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence)-PCR の 4 種類の方法を用いた。

遺伝子型別を行うにあたり、相互の電気泳動パターンの相同性を数値化するために Dice coefficient を用いた。Dice coefficient とは以下の式により数値化される 2 種の泳動パターンの similarity index (類似性の度合) の値である。すなわち、2 つの泳動パターンを比較した場合、共通の大きさの断片数を A、それぞれに特有の断片数をそれぞれ B、C とすると、式：
$$\left[\frac{2A}{2A+B+C} \right] \times 100$$
 で表わされる。本研究では、新興型株で分離された年が最も古かった Ac No.1 の KE 10495 との similarity index を求めた。

上記の解析とは別に、下痢症患者由来菌株と環境由来菌株とを比較するために、1969 年～2002 年に愛知県内で発生した 56 事例の患者から分離された 125 株、散発性下痢症患者からの分離株としては、1988 年～2002 年に愛知県内の特定 1 病院の患者から分離された 498 株、また海産魚介類に由来する菌株として、1995 年～2001 年に名古屋市中央卸売市場で流通していた約 80 魚種の海産魚に由来する 1,541 株を用いた。

C. 研究結果

新型クローンによる汚染実態を知る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。国内での分離例や海外からの同定依頼株について解析を行ったところ、1996 年以降の株はいずれも類似の PFGE 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。

PFGE 法は同一の菌種、同一の血清型に対して、さらに遺伝子レベルでの解析ができるということで、これまでの血清型やファージ型等の表現形質を用いた疫学手法よりも有効であることが示されてきた。血清型による分類は今でも有効な疫学手法ではあるが、より詳細な解析には PFGE 法が多く病原菌で応用されている。ところが、腸炎ビブリオにおける新型クローンと呼ばれる一群に関しては、極めてよく似た PFGE パターンを持つが血清型の異なる株が含まれている。このことは菌の染色体構造の変化が少なくても、抗血清による菌体表面構造認識が異なる(血清型が異なる)ということである。

本研究では、腸炎ビブリオの新型クローンを中心として PFGE 法を用いた解析を行ってきたが、新型クローンには上記のような特徴があり、PFGE 法だけでは充分とは言えない。また、PFGE 法による解析には時間と特別な装置を必要とするため、より迅速で、簡便な PCR 法を用いた新興型菌の検出、あるいは病原因子を標的とした解析手法についても検討を行った。

PCR 法としては、特定の遺伝子を対象としない RAPD(random amplified fragment polymorphic DNA-PCR)法や、リボソーム RNA の 16S と 23S の間の配列や染色体上に多数散らばる繰り返し配列を標的とした。PFGE 法とこれらの PCR 法をあわせて、また、dice coefficient を用いて数値化することにより、各方法の有効性について詳細に解析を行った。

さらに、近年新興型菌に特異的に認められる

と報告されたファージ由来 ORF8 遺伝子を標的とした PCR と *toxRS* 遺伝子上に新興型菌特異的に見られる変異を利用した PCR を行い、新興型の遺伝子マーカーとしての有用性について比較検討した。

その結果、新興型 O3:K6 および O4:K68、O1:K25、O1:KUT は類似性の高い PFGE パターンを示し、また新興型の遺伝子マーカーとして ORF8 遺伝子あるいは *toxRS* 遺伝子がかなり確度の高いマーカーではあるが完璧ではないことが示された。

一方、患者由来株及び環境由来株の比較について、TDH 遺伝子は下痢症由来株の 93.9% から検出されたのに対し、海産魚由来株からはわずか 0.32% から検出されたのみであった。また、TRH 遺伝子は下痢症由来株の 4.3% から、海産魚由来株の 0.52% から検出された。

TRH 遺伝子は、下痢症由来株 (27 株) からは O1:KUT、O6:K18、O1:K69 などの 11 種類の血清型から、海産魚 (8 株) からは O4:KUT、O3:K72、O5:K17 などの 5 種類の血清型から検出された。また TRH 遺伝子について、*trh1* と *trh2* は別のクラスターに分けることが出来、さらに遺伝子型として 13 種類に型別分類された。また *trhx* は *trh1* とかなり近い関係にあったが、*trh1* タイプは *trhx* を含めて 8 つの型に分けることが出来た。

愛知県内で発生した食中毒 3 事例に由来する TRH 陽性株の O1:KUT (2 事例) と O3:K72 (1 事例) の遺伝子型は、系統樹の中で一つのクラスターを形成していた。

以上、今回の研究から、下痢症においては TRH 陽性株は TDH 陽性株に比べ低率に検出されているが、環境由来株は極めて低率ながらもわずかに TRH 陽性株が TDH 陽性株よりも高く検出されていること、さらに TRH 遺伝子の多型性が非常に富んでいることなどが明らかになった。

D. 考察

我々の PFGE 解析では新興型株間において Ac No.1 の KE 10495 と他の新興型株間の Similarity index は 100~73% の間であったが、O4:K68 株や O1:KUT 株などで比較的低い値にある傾向がみられた。新興型株を除く株に関しては、Ac No.37 の KE 10465 を除いて、73% 以下であった。AP-PCR を行った結果、新興型株と KE 10495 との Similarity index は primer 2 の場合は 100~67% の間で、primer 4 の場合は 100~88% の間であった。新興型株を除く株

に関しては、primer 2 の場合は Ac No.35 の KE 10491、Ac No.37 の KE 10465、Ac No.38 の KE 10462、Ac No.40 の KE 10464 の 4 株を除いて、67% 以下であった。一方、primer 4 の場合は全て 88% を超える値を示さなかった。RS-PCR を行った結果、新興型株の KE 10495 との Similarity index はすべて 100% であり、新興型株を除く株に関しては、ほとんどの O3:K6 株が 100% であった。このことから、RS-PCR を用いて、新興型腸炎ビブリオと 1996 年以前の O3:K6 株を識別するのは困難であることが示された。

また REP-PCR を行った結果、新興型株と Ac No.1 の KE 10495 との Similarity index は 100~77% の間であり、O4:K68 株や O1:KUT 株などではやや減少の傾向がみられた。新興型株を除く株に関しては、Ac No.35 の KE 10491、Ac No.37 の KE 10465、Ac No.38 の KE 10462、Ac No.40 の KE 10464 の 4 株を除いて、77% 以下であった。ERIC-PCR 新興型株の Ac No.1 の KE 10495 との Similarity index は 100~94% の間であったが、O4:K68 株や O1:KUT 株などでは一律に低い値を示した。新興型株を除く株に関しては、Ac No.35 の KE 10491、Ac No.38 の KE 10462 を除いて、94% 以下であった。

以上の結果から、新興型腸炎ビブリオとそれ以外の腸炎ビブリオを識別するには、primer 4 を用いた AP-PCR が最も適していると示唆される。しかし、AP-PCR は特にその再現性に頻繁に問題が認められ、この手法のみで識別するのは困難であった。したがって、PFGE などの他の手法と組み合わせて解析・識別等行うことが望ましいと考える。

GS-PCR を行った結果、新興型株はすべて GS-PCR 陽性であった。新興型株を除く株に関しては、Ac No.35 の KE 10491、Ac No.37 の KE 10465、Ac No.38 の KE 10462、Ac No.40 の KE 10464 の 4 株が陽性を示した。前述したように、Matsumoto らによると新興型腸炎ビブリオとそれ以外の腸炎ビブリオの間では少なくとも 7ヶ所において塩基の置換がみられた。そこで、これら 4 株に関して、その *toxRS* 配列が新興型と同一かを調べるため、GS-PCR とは別の塩基の違いを利用して、プライマーを 3 セット (*toxRS/new 1*、*toxRS/new 2*、*toxRS/new 3*) を設計し、PCR 反応により確認した。その結果、すべての反応で、4 株とも新興型株 (NIID 956-98) と同じ大きさの断片が観察された。このことから、これら 4 株の

toxRS 配列は新興型と同一であると推定された。

ORF8 を標的とした PCR を行った結果、新興型株を除く株はすべて ORF8 陰性であった。新興型株に関しては、Ac No.11 の AN-2416、Ac No.13 の AN-8373、Ac No.16 の AP-9251 の 3 株が陰性を示した。これらの株はすべて Bangladesh の患者由来の O3:K6 株である。Nasu らによると、新興型 O3:K6 株に溶原化するファージは核酸が一本鎖の環状 DNA である繊維状ファージで、その複製型 (Replicative Form: RF) である pO3K6 は 10 の ORF を有しており、その中の ORF8 がこのファージに特有である。そこで、これらの 3 株が、ORF8 遺伝子のみが欠失や変異を起こしているのか、あるいはファージ DNA すべてが欠失しているのかを明らかにするため、他の ORF や ORF8 の別の領域を標的にプライマーを 5 セット (ORF3 +4、ORF5、ORF6+7、ORF8 EXTRA、ORF9 +10) 設計し、PCR 反応により確認した。その結果、すべての反応で、他の新興型 O3:K6 株 (NIID 956-98) では観察される断片が 3 株では観察されなかった。このことから、これらの 3 株は ORF8 のみを欠失や変異を起こしているのではなく、溶原化するファージ自体を欠失した株と考えられた。

他方、新興型株を除く株で toxRS 配列が新興型と同一と考えられる 4 株 (Ac No.35 の KE 10491、Ac No.37 の KE 10465、Ac No.38 の KE 10462、Ac No.40 の KE 10464) はそれぞれの系統解析法において、新興型株との高い Similarity index が示された。これらの株は 1996 年以前に日本で分離された TDH、TRH を共に産生しない O3:K6 株である。すなわち、これらの株は新興型腸炎ビブリオに系統的に最も近い 1996 年以前の O3:K6 株と推定される。

以上の所見から、遺伝子マーカーとして報告されている toxRS 配列も ORF8 も必要十分的な遺伝子マーカーにはなりえない、すなわち、toxRS 配列が新興型と同一であるから新興型腸炎ビブリオであるとは限らないこと。そして、新興型腸炎ビブリオであるから ORF8 を持つとは限らないということが本実験から示唆された。新興型腸炎ビブリオの遺伝子マーカーに関してはさらなる検討を加える必要のあることが指摘された。

一方、患者由来株と環境由来株の間の差異に

ついて、塩基配列を解析した結果からは、遺伝子型と血清型とに相関が認められ、遺伝子型も血清型同様、疫学解析に応用できることが示唆された。これまでの報告の通り、*trh1* と *trh2* は別のクラスターに分けることが出来、さらに 13 の型に細分することが出来た。食中毒由来株、海産魚由来株は *trh1* タイプ、*trh2* タイプのどちらの型も検出されたが、海産魚由来株の型は食中毒で認められた株の型でしか検出されず、*trh* 遺伝子の多型性を調べることは、この毒素による食中毒の原因を推定するうえで有効である可能性が示唆された。今後、TRH 遺伝子の多型性が TRH 陽性株の下痢起病性とどのように関係するのかを明らかにするために、食中毒、散発例及び環境中における TRH 陽性株の分布調査、及び TRH の病原性の検討の必要性が考えられた。

E. 結論

新型腸炎ビブリオの遺伝子型分類について有用な手法を見出した。また下痢症患者由来と環境由来の腸炎ビブリオの TDH 及び TRH 遺伝子遺伝子について調べた結果、両遺伝子とも環境由来菌株では極めて低い率で検出されることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 大倉正稔、大澤朗、井口純、荒川英二、渡邊治雄、新興型および旧型腸炎ビブリオ O3:K6 の遺伝子型、第36回腸炎ビブリオシンポジウム、2002
2. 鈴木理恵子、沖津忠行、楠本正博、荒川英二、新川隆康、魚介類の腸炎ビブリオおよび *Vibrio vulnificus* 定量調査 - 培養法と PCR 法による遺伝子検出法との比較 -, 第36回腸炎ビブリオシンポジウム、2002
3. Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. J Clin Microbiol. 2002 Jul;40(7):2708-9.

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

「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」
腸管における細菌感染の抑制

分担研究者 土肥多恵子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部長

研究要旨

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 O1 classical または O1 El tor 型の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。その結果、 α 1,2 フコースを含む Type H 血液型糖鎖およびシアル酸を含有する 3 糖よりなる精製オリゴ糖が、コレラ菌の小腸膜画分への接着を阻害することができた。血液型 O 型が、コレラ症の発症頻度や重症度に正の相関をしていることは様々な流行地で古くから報告されており、コレラ菌が、宿主の消化管上皮に存在する O 型血液型糖鎖を粘着のレセプターとして使用していることを示唆している。

A. 研究目的

経口投与されたオリゴ糖は、宿主の腸内の細菌叢やその発酵に影響を及ぼして、宿主側の代謝や消化管免疫能も修飾すると考えられ、様々な生物活性が期待されるため、食品添加物としても加えられているが、腸管感染症への効果は確立していない。本研究は感染症予防・治療対策としてのオリゴ糖経腸投与の効果を解析し、最終的には 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標としている。この治療法が確立すれば、軽症患者から重症患者まで応用することができ、かつ、安価で安全な治療法となると期待される。本年度は O1 型コレラ菌の粘着阻害活性を持つオリゴ糖についてスクリーニングを行なった。

B. 研究方法

1. ヒト小腸粘膜へのコレラ菌粘着能
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。これを ELISA プレートにコーティングして固相化した。*Vibrio cholerae* O1 classical (CI3 株) または O1 El tor 型 (EO8 株) を CFA broth で overnight culture の後 CFA 寒天培地上で 3 時間培養した。小腸膜蛋白固相化プレートに 2 価イオン含有りん酸緩衝液に浮遊させたコレラ菌菌体を加え、37°C で 15 分間 incubate し菌を粘着させた。プレートをりん酸緩衝液で 3 回洗浄の後、70% エタノールを加えて菌体を固定した。非特異反応のブロック後、ウサギ抗 O1 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。蛋白を固相化しないウェルに菌体を定量的に加えてエ

タノールで固定し、同様の方法で、検量線を作成し、粘着した菌数を定量した。

2. オリゴ糖による結合阻害アッセイ

上記の粘着能アッセイ系で、菌株を種々の血液型物質関連構造を持つオリゴ糖（最終濃度 ~0.8-100nM）と混合して膜蛋白固相化プレートに加え、粘着した菌数を定量した。

3. 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たもので、患者個人への不利益はない。

C. 研究結果

オリゴ糖 LacNAc (Gal β 1,4GlcNAc), Gb3 (Gal α 1,4Gal β 1,4Glc), LEX (Gal β 1,4[Fuca α 1,3]GlcNAc), 3FL (Gal β 1,4[Fuca α 1,3]Glc), 2FL (Fuca α 1,2 Gal β 1,4Glc), FLN (Fuca α 1,2 Gal β 1,4GlcNAc), 6SL (NeuAca α 2,6Gal β 1,4Glc), 3SL (NeuAca α 2,3Gal β 1,4Glc), GD3 (NeuAca α 2,8 NeuAca α 2,3Gal β 1,4Glc), GM2 (GalNAc β 1,4[NeuAca α 2,3]Gal β 1,4Glc) をもちいた粘着能阻害活性を 3 症例で解析し、次のような結果が得られた。

表 1. オリゴ糖のコレラ菌粘着阻害活性

	O139	CI3	EO8
LacNAc	+-	-	-
Gb3	-	-	-
LEX	+-	-	-
3FL	-	+	+
2FL	+	+	+
FLN	+	+-	+-
6SL	-	-	+
3SL	-	-	+
GD3	-	+	+
GM2	-	+	+

+ 3 症例で阻害活性あり, +- 阻害活性のな

い症例あり、- 阻害活性はみられない

このように、O1 型コレラ菌は O139 型に比べて 3FL、シアル酸含有糖鎖など、多くの種類のオリゴ糖によって粘着阻害が見られた。2FL は O1, O139 型いずれのコレラ菌の粘着も阻害した。

D. 考察

コレラ菌は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、粘着が阻害されることが明らかとなった。特にフコース含有糖鎖である H 型血液型糖鎖は O139, O1 型に共通して粘着阻害活性が見られた。血液型 O 型が、コレラ症の発症頻度、重症度に正の相関をしていることは様々な流行地で報告されており、コレラ菌が、宿主の O 型血液型糖鎖を粘着のレセプターとして使用していることを示唆する結果であった。オリゴ糖の安全性について投与の際に予測される問題点は特になく、oral rehydration solution に 2FL を中心としたコレラ阻害活性を持つオリゴ糖混合物を加えて、血液型 O 型患者の重症化を予防できる可能性が示唆された。

E. 結論

フコース含有、またはシアル酸含有オリゴ糖は O1 型コレラ菌の粘着阻害活性をもつ。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

論文発表

1. Dohi, T, Fujihashi, K, Koga, T, Shirai, Y,

Kawamura, YI, Ejima, C, Kato, R, Saitoh, K, Mcghee, JR: T Helper Type-2 Cells Induce Ileal Villus Atrophy, Goblet Cell Metaplasia And Wasting Disease In T Cell-Deficient Mice. *Gastroenterology*. in press: (2003)

2. Hashimoto, M, Kirikae, F, Dohi, T, Adachi, S, Kusumoto, S, Suda, Y, Fujita, T, Naoki, H, Kirikae, T: Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur J Biochem*. 269: 3715-21 (2002)

学会発表

1. 河村由紀, 白井裕子, 加藤理恵, 濱端崇, 山本正文, 古川鋼一, Kohtaro, F, McGhee, JR, 土肥多恵子: GM1 ganglioside functions as a receptor for pathogen-associated molecular patterns (PAMP). 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 2002, 東京

2. Dohi, T, Fujihashi, K, Shirai, Y, Kawamura, YI, Kato, R, McGhee, JR: Small intestinal transformation and wasting disease induced in T cell deficient mice by adoptive transfer of CD45RBhi Th2 cells. AGA Research Forum, Epithelial cell-immune cell interactions, Digestive Disease Week Annual Meeting, 2002 San Fransisco

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

「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」
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 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

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、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参与しているかを調べた。さらに、バングラデシュとタイで分離されたコレラ菌について、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、インド由来株の結果と比較した。

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言う図式ではなく、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参与しているか、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検体毎に1検体をランダムに抽出し、コレラ菌の分離を試みた。患者便を直接 TCBS 寒天培地上に塗布し、37 度で一夜培養した。得られた黄色のコロニーを LB 寒天培地に植え替え、オキシダーゼテストと O1 及び O139 に対する抗血清を用いてコレラ菌の同定を行うと同時に、分離したコレラ菌の血清型別を行った。バングラデシュとタイで分離され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を調べると同時に、クラス1インテグロンが陽性となった菌株については、どのような薬剤耐性遺伝子が存在しているか解析し、得られた結果をインド由来株の結果と比較した。

C. 研究結果

1998 年から 2002 年の 5 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。2002 年は、合計 2129 検体について調べ、O1 コレラ菌 83 株、O139 コレラ菌 70 株および non-O1, non-O139 コレラ菌 78 株分離された。2002 年は 2001 年に比べ、分離された O1 コレラ菌の数が、139 から 83 へとさらに減少した。一方、O139 コレラ菌の分離数が、16 から 70 と増加し、non-O1, non-O139 は 85 から 78 とほぼ横這いであった。コレラの流行のピークは、乾季の 5 月と雨季の 8 月の 2 回あった。乾季は O139 コレラ菌と non-O1, non-O139 コレラ菌が分離されるコレラ菌の大多数を占めたのに対し、雨季は、分離される O1 コレラ菌の割合が増えたものの、O139 non-O1, non-O139 コレラ菌の分離件数もそれほど減らなかった。

1993 年から 2000 年にかけて、バングラデシュで分離された O1 コレラ菌と O139 コレラ菌、それぞれ約 3 株についてクラス1インテグロンとクラス4インテグロンの分布について調べた。その結果、クラス4インテグロンは全てのコレラ菌で陽性であったのに対し、クラス1インテグロンは、1992 に分離された O1 コレラ菌から 2 株、1993 に分離された O1 コレラ菌で 1 株が陽性となったが、それ以外は全て陰性であった。クラス1インテグロンが陽性となった3株について、薬剤耐性遺伝子がコードされていると考えられる可変領域を PCR で増幅し、その遺伝子断片の塩基配列を解析したところ、3株とも 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。一方、1999 年から 2002 年の間にタイで分離された O1 コレラ菌では、調べた 235 株全てでクラス1が陰性で、クラス4が陽性であった。

D. 考察

2002年の傾向として、O1 コレラ菌の分離率が30%まで低下した一方、O139 コレラ菌を含め、non-O1, non-O139 コレラ菌の分離率が増加した事を挙げる事ができる。過去5年間のデータを比較すると、コレラの発生件数は年々減少傾向にある。しかし、O139 コレラ菌と non-O1, non-O139 コレラ菌によるコレラの発生件数は増加傾向にある。血清型によって、薬剤耐性パターンが異なるので、特に non-O1, non-O139 コレラ菌で耐性化傾向の強いテトラサイクリンの使用は注意を要する。一方、昨年の結果よりインテグロンが、アミノグリコシド、トリメトプリム、ベータラクタム等の薬剤耐性化に寄与していることが明らかとなった。しかし、インドの結果だけでなく、バングラデシュ、タイの結果からも、1994年以降2002年間のO1及びO139 コレラ菌からクラス1インテグロンが全く見つかっていない。例えばO1の場合、1994年以前ではアミノグリコシドに耐性な遺伝子がクラス1インテグロンに高い率で見ついているが、1994年の前後で、ストレプトマイシンに対する耐性度には変化がない。このことは、近年の薬剤耐性化に、クラス1インテグロンは関係なく、クラス4インテグロンが関与している可能性と全く別の機構が関与している可能性が考えられる。クラス4インテグロンは、126 kbもの大きさを有するので解析に時間を要するが、薬剤耐性遺伝子をクローニングし、その上流下流の塩基配列を解析し、どのように耐性能が賦与されたかを検討していくことにより、近年の薬剤耐性化のメカニズムを明らかにすることができる。以上の結果より、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、コレラの発生件数、特にO1 コレラ菌によるコレラが減少傾向にある。一方、non-O1, non-O139 コレラ菌によるコレラの発生件数が増加傾向にあった。また、インド由来株に限らず、バングラデシュやタイで分離されたコレラ菌においても、1994年以降のコレラ菌では、O1やO139 コレラ菌に限らず、クラス1インテグロンが存在しないことが明らかとなった。すなわち、コレラ菌の薬剤耐性化に、クラス1インテグロンではなく、クラス4インテグロンを含む

別なメカニズムで耐性能を獲得していることが明らかとなった。我が国への輸入感染症としてコレラとして、O1 コレラ菌のみならずO139とnon-O1, non-O139 コレラ菌についても注意を払う必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. S.S. Sinha, P. Chowdhury, N.R. Chowdhury, M. Kamruzzaman, S.M. Faruque, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, S. Yamasaki, Y. Takeda and G.B. Nair. Molecular comparison of toxigenic clinical & non-toxigenic environmental strains of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa isolated during an outbreak of cholera in south India. *Indian J Med Res.* 114:83-9, 2001.
2. G.P. Chhotray, B.B. Pal, H.K. Khuntia, N.R. Chowdhury, S. Chakraborty, S. Yamasaki, T. Ramamurthy, Y. Takeda, S.K. Bhattacharya, and G.B. Nair. Incidence and molecular analysis of *Vibrio cholerae* associated with cholera outbreak subsequent to the super cyclone in Orissa, India. *Epidemiol Infect.*, 128:131-138, 2002.
3. T. Ramamurthy, S. Yamasaki, Y. Takeda and G.B. Nair.: *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Odyssey of a fortuitous variant. *Microbiol. Infect.*, in press.

H. 知的財産の出願・登録状況 なし