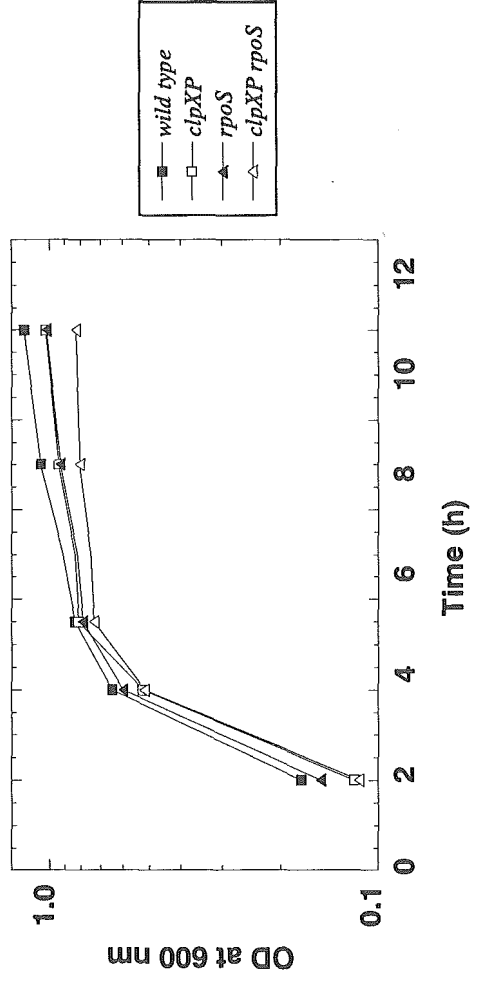


増殖曲線



抗FLAG抗体によるイムノブロットイング(全菌体)

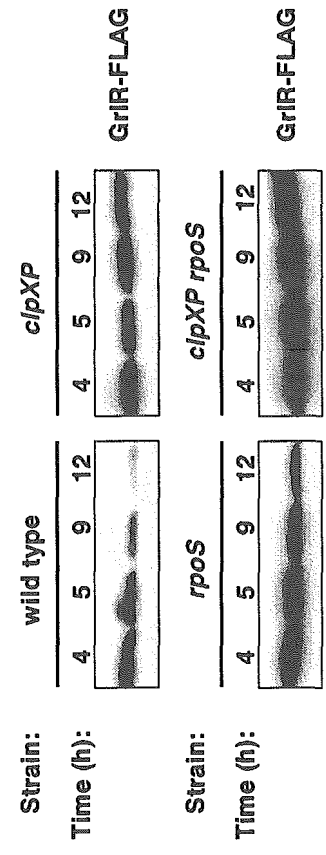


図3. 各増殖期におけるGrIRの細胞内存在量

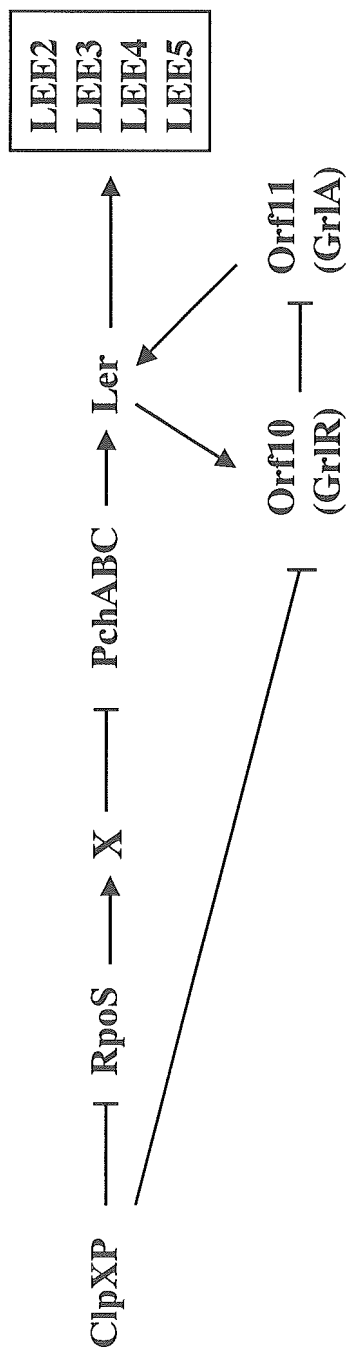


図5. ClpXPによるLEE発現制御のキャスケードモデル

表 1. Effect of *clpXP* deletion on the transcriptional of LEE-regulator genes

Strain	Activity of β -galactosidase ^a (Standard deviation)		
	pRL124 (control vector)	pRLER (carrying <i>ler-lacZ</i>)	pRLPA (carrying <i>pchA-lacZ</i>)
Wild type	63.7 (4.74)	43,100 (4,510)	12,500 (1,280)
<i>clpXP</i>	56 (5.43)	11,100 (1,190)	5,950 (499)

^a β -galactosidase activity was measured, in Miller units, in late-log-phase cells grown in DMEM plus 0.5% glycerol.

表 2. Effect of *rpoS* deletion on the activity of *pchA* transcription

Strain	Activity of β -galactosidase ^a (Standard deviation)		
	pRL124 (control vector)	pRLPA (carrying <i>pchA-lacZ</i>)	Ratio (pRLPA/pRL124)
wild type	60.4 (8.63)	9,940 (913)	165
<i>rpoS</i>	49.5 (4.00)	15,600 (1,340)	315

^a β -galactosidase activity was measured, in Miller units, in late-log-phase cells grown in DMEM plus 0.5% glycerol

平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：EspB 迅速同定のための免疫クロマトグラフィーの開発

分担研究者：仲宗根 昇、トーマ・クラウディア、岩永 正明

琉球大学大学院、病原因子解析学

研究要旨：

病原性大腸菌 (EPEC) および志賀毒素産生大腸菌 (EHEC) が産生する EspB を 10 分以内に判定する免疫クロマトグラフィーを開発した。検出用の担体には、15 nm の金コロイド粒子を用いた。組み替え EspB (rEspB) をウサギに免疫して得た抗体は、rEspB リガンド-アフィニティークロマトグラフィーにかけて精製し、これを金コロイドに感作させた。作成した EspB 免疫クロマトグラフィー (IC) の検出限界は、4 ng で、*eae* gene (-) 40 株、*eae* gene (+) 33 株での EspB 検出能を調べた結果、感度 96.5%、特異性 100%であった。この結果から、今回開発した EspB-CI は、EPEC および EHEC の推定を行うのに有効なテストであることが示された。

A. 研究目的

我々は、これまで EPEC と EHEC を迅速に判定するため、これらの菌が産生する EspB を標的とした Reversed passive Latex agglutination (RPLA) テストを開発し、研究室や野外調査などに広く応用できる有効な検査法であることを報告してきたが、判定に長い時間を要した。今回、この判定時間をさらに短くするため、免疫クロマトグラフィーによる EspB の検出法を検討した。

B. 研究方法

1) EspB の調整： EspB は、組み替え EspB (rEspB) として調整した。すなわち、EspB をコードしている遺伝子を

PCR で増幅させ、TA クローニングキット (Invitrogen) で pCR2.1 プラスミドに組み込み、EspB クローニング株を作成した。このプラスミドを制限酵素で切断後、同じ酵素で切断した His タグをもつプラスミド pQE30 に組み込んで、大腸菌に導入した。導入大腸菌が産生した rEspB は、His-high trap column で精製した。

2) 抗 rEspB 抗体の調整：精製 rEspB をウサギに免疫して、抗 rEspB IgG を得た。これを、rEspB を感作させた High trap column にかけて、精製抗 rEspB IgG を得た。

3) 抗 rEspB IgG 感作金コロイド粒子の調整：塩化金とクエン酸 Na の混合

比を変え、2から100 nmまでのいろいろなサイズの粒子を作成し、最適の条件を検討した。作成した金コロイドは、1% Bovine serum albumin-0.02% polyvinyl alcohol-0.2% TritonX-100 - 0.2% NaN₃-25% trehalose - 10 mM Tris/HCl pH8.0 に浮遊させた。金粒子にさまざまな濃度の抗 rEspB IgG を反応させ、感作金コロイドの反応最適条件を検討した。感作金コロイドの安定性は、60°C に加熱したオープンにいれ、一日毎に取出して、rEspB との反応をみて判定した。ニトロセルロース (NC) 膜上に塗布する抗 rEspB IgG や抗ウサギ IgG と感作金コロイドとの最適反応を示す抗体量は、金コロイド粒子の浮遊濃度を 0.01% から 0.08% まで変化させたものを準備した。抗 rEspB IgG, 抗ウサギ IgG 量を 1.6 mg/ml から 2 倍段階希釈したものを NC 膜にスポットし、これに各濃度の金コロイド浮遊液を加え、反応の度合いをみた。

4) 免疫クロマトグラフィー (IC) の調整: IC に必要なセットは、Millipore 社の Hi-Flow Plus Assembly Kit を使用した。1cm x 6 cm のガラスウールには、400 μ l の感作金コロイド浮遊液を添加した。抗 EspB IgG, 抗ウサギ IgG の塗布面積は、5 mm x 1 mm とした。

5) 菌株の調整: 腸管病原性大腸菌 (EPEC), 毒素産生性大腸菌 (ETEC), 腸管凝集性大腸菌 (EAEC), 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 細胞侵入性大腸菌 (EIEC) は、いろいろな国 (ラオス、ケニア、

日本、インドネシア) から集めた臨床分離株を使用し、コントロールとしての非病原性大腸菌は、健康人から分離したものをを使用した。eae gene の存在とその variant の種類は、Lu らによる PCR 法で確認した。eae gene 陽性 33 株、陰性 40 株は、DMEM で 37°C、8 時間振とう培養した。EspB 検出を調べる際には、各菌株をランダム化記号化し試験者にも株提供者にもわからないようにした。

6) rEspB 含有ヒト便の調整: 1 ml の PBS に健康便 0.1g を加えて溶かし、これに rEspB を加えて作成した。

7) EspB の検出: 最適条件や温度安定性の検討では、rEspB を浮遊させた buffer を 100 μ l, サンプルパッドに加えて反応を見た。菌の培養液中の検には、各菌株の培養液を 3000 rpm, 10 分遠心し、その上清に直接 IC を浸し、10 分間観察してテトラインとコントロールラインが反応したものを陽性、コントロールラインのみが反応したものを陰性、両方のラインに反応がないものを判定不能とした。検査の正誤は、結果判定後、各菌株のカテゴリーを照合して行った。結果は、2 項分類法で感度と特異性を算定した。

C. 研究結果

1) 金コロイド粒子

金コロイド粒子の大きさは、2, 8, 15, 24, 40, 70, 100 nm を調整した。

粒子を飽和するのに必要な抗体量は、粒子サイズが大きくなるほど増加し、2 nm で 10 μ g/ml, 100 nm で 10mg/ml を必要とした。2, 8 nm 粒子は、15,000 rpm の遠心では沈殿しづらく、70, 100 nm 粒子は、保存中に沈殿した。また、2 から 24 nm 粒子の色は、あざやかなワインレッドであったが、40, 70, 100 nm のコロイド粒子の色は、薄紫色になり、rEspB との反応がはっきりしなかった。飽和抗体量、色の鮮明度、取り扱いやすさなどから、金コロイドの大きさを 15 nm に決定し、抗 EspB IgG 感作コロイドを作成した。

2) NC 膜上の抗 EspB IgG 量と抗ウサギ IgG 量

0.01%と 0.02%の感作コロイド液は、抗ウサギ IgG 抗体希釈液とは 1.6 から 0.1 mg/ml まで鮮やかに反応したが、0.04 と 0.08%浮遊液では、1.6 から 0.4 mg/ml までが鮮明であった。同じ所見は、抗 EspB IgG を希釈してスポットした NC 膜上でも見られた。

3) IC の検出限界と安定性

rEspB を 10 μ g/ml から 2 倍段階希釈したものを IC で調べた結果、検出限界は、4 ng/ml であった。60℃の加熱では、trehalose を加えたものでは、25 日まで安定であったが、加えてないものでは、1 日で失活した。

4) 菌からの EspB の検出

eae gene 陽性 33 株中 1 株を除きすべての株に反応した。この反応しなかつた 1 株をさらに詳細に検討した結果、

EspB の産生が 4 ng/ml 以下であった。*eae* gene 陰性の 40 株は、全てが陰性の結果であり、これを統計処理したところ感受性 97 %, 特異性 100 %であった (Table 1)。

5) 便中からの EspB の検出

便中の EspB の検出限界を調べたところ 60 ng/ml であった。

D. 考察

EspB は、EPEC や EHEC のもつ locus of enterocyte effacement (LEE) にコードされた Type III 分泌系で分泌される蛋白であり、分泌蛋白中、最も多く分泌される蛋白である。従って他の蛋白を検出の標的とするよりも、この蛋白を指標にすることは、検出できる確率を高めるという観点から、妥当な選択であると思われた。我々は、この EspB を標的とした RPLA は、これらの診断に有効であることを既に報告した。今回、さらにこの判定を迅速にするため、EspB 免疫クロマトグラフィー作成を試みた。今回開発した EspB-IC の検出限界は、RPLA のものより高く、感度としては RPLA より劣っていた。RPLA も IC も免疫反応が基本原理であるため、反応の感度は時間と相関する。すなわち、時間が経過するほど、反応感度は上昇する。従って、10 分以内で判定するということが、感度が低下するということのを免れない。しかし、EHEC 感染の場合、患者の一部が脳症や

溶血性尿毒症群(HUS)などの重篤な症状を引き起こすことを考慮に入れると、迅速な判定法の確立は、必要であると思われた。

今回、調査した73株の調査結果は、感度97%、感度100%であった。これらの数値は、研究所、野外調査などの検査に十分耐えうる数値であると考えられた。感度の比率を低下させた *eae* gene 陽性で IC 陰性の株は、さらに詳細に調べたところ EspB の産生量が極めて少なく、検出限界以下であった。この株を拾い上げるためには、さらに感度を高めるか、EspB の産生が増えるような培地を考案する必要があると思われた。これまで、M9 培地、LB 希釈培地、LB 培地に重曹を添加した培地などが報告されており、これらの培地で培養したときの IC の反応を調べる必要があるであろう。

rEspB をヒト便浮遊液に加え、糞便から直接 EspB の検出を試みたところ、検出限界は、60 nm であった。この値は、rEspB 浮遊液を用いたものより高く、糞便中の成分が EspB IC の反応に干渉したため感度が低下したものである。事実、糞浮遊液を遠心せずにそのまま IC を浸すと、糞便成分が IC に吸着して、金コロイド粒子の上昇を阻止し、IC には何の変化も見られなかった。今後、便中の障害物を除くための工夫をする必要がある。また、実際の EPEC、EHEC 患者の便中にどれだけの EspB が分泌されているかの情報も得る必要があると思われた。もし、便中の EspB 含量が IC の検出限界以上

なら、直接 IC を便に浸すことでさらに判定を早めることができるものと思われた。

便中からの直接的な検出には、まだ開発の検討を必要とするが、菌を培養した培養液を使用する限り、今回開発した EspB-IC は、研究所や野外調査に十分利用できるものであると思われる。

E. 結論

今回開発した EspB-IC は、*eae* gene 陽性の EPEC や EHEC を迅速に判定できる検査法である。

F. 健康危機情報

本研究成果で、国民の健康被害等を考慮したとき国民に至急知らせた方がよい情報は含まれていない。

G. 研究発表

Nakasone N., Toma C., and Iwanaga M. 2005. Development of immunochromatographic test for detection of EspB. The 40 th U.S.-Japan Conference Medical Science Program Cholera and Other Related Enteric Infections Joint Panel Boston, U.S.A.

Table 1.

Detection of EspB by IC

Category	No. of strains	positive	negative
EPEC	18	18	0
EHEC	15	14	1
EAEC	11	0	11
ETEC	9	0	9
EIEC	7	0	7
Normal EC	13	0	13

All strains were identified by PCR. Target gene: *eaeA*, *stx* (EPEC, EHEC), *aggR* (EAEC), *elt*, *est* (ETEC), *ipaH* (EIEC).

平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：志賀毒素産生性大腸菌の Long Polar Fimbriae (LPF) と phylogenetic group の関連性

分担研究者：岩永正明、琉大・院・病原因子解析学

協力研究者 トーマ クラウディア、比嘉直美、仲宗根 昇

研究要旨：

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の long polar fimbriae (LPF) gene cluster の分布を他の下痢原性大腸菌及び standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) の株で調べた。その結果、LPF は STEC 以外の下痢原性大腸菌及び非病原性大腸菌にも存在することが明らかになった。また、LPF の存在とその variant は phylogenetic group と関連していることが示唆された。

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の血清型は分離頻度や HUS 等の重症疾患との関連性で seropathotype A から E までの 5 つのグループに分けられる。この分類によると、seropathotype A は O157:H7 を含み高い頻度で分離され、大きなアウトブレイクや HUS との関連性がある血清型である。我々は以前、seropathotype A の一つの特徴は O-islands141 (OI-141) 及び OI-154 に特異的な long polar fimbriae (LPF) gene cluster (LPF_{0157/01-141}, LPF_{0157/01-154}) を持つことであると報告した。その他に STEC には O113:H21 株で同定された LPF₀₁₁₃ と、我々が O26:H11 株で同定した LPF₀₂₆ がある。本研究の目的は、これら 4 種類の LPF が STEC に特有なものであるかを解明することである。

B. 研究方法

- 1) LPF の分布: 下痢原性大腸菌 97 株及び ECOR 株 71 株について 4 種類の LPF に対するプライマーを用いた PCR で調べた。
- 2) *fliC* typing: Machado et al (Res. Microbiol., 151:535) の *HhaI* 制限酵素による PCR-RFLP で行った。
- 3) *lpfA*₀₄₄ のシーケンス: 0154-F 5' CTG GCA AAA TCG GTA ACG GT 3' と 0154-R 5' CCA CCG GAA GAA CCG AT 3' プライマーを用いた PCR で得られた 6-kbp 産物をベクター-pCR2.1 にクローニングした。プラスミド DNA を Qiagen-tip 100 で精製し、塩基配列の解析を行った。
- 4) Phylogenetic tree: MEGA version 3.0 (Kumar et al. Brief. Bioinformatics, 5:150) で作製した。

C. 研究結果

4種類のLPFの分布をTable 1で示す。*LpfA*₀₁₁₃の陽性率は、enteroaggregative *E. coli* (EAEC)では64.9% (37株中24株)、enteroinvasive *E. coli* (EIEC)では20% (5株中1株)、enteropathogenic *E. coli* (EPEC)では43.3% (30株中13株)、enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)では52% (25株中13株)であった。*LpfA*₀₂₆の陽性株はEAECで1株、EPECで8株、ETECで4株であった。*LpfA*_{0157/01-141}の陽性株はEPECで2株、ETECで1株であった。*LpfA*_{0157/01-141}陽性のEPECは*LpfA*_{0157/01-154}も陽性であった。0157:H7の特異的な*lpfA*を持つ2株は血清型055:H7と0119:NMであった。*fliC*及び*eae* typingを行ったところ0119:NMの株は*fliC* type 9, *eae* type betaであり、EPEC 055:H7とSTEC 0157:H7は*fliC* type 7, *eae* type gammaであった。

EAECの*lpfA*は01-154に相当する領域に存在し、その配列はSTEC-*lpfA*と高い相同性を示し、*lpfA*₀₄₄と命名した。

ECORの株における分布をTable 2で示す。その結果、検査した71株中31株がいずれかのLPFを有しており、phylogenetic group別に見るとgroup B2は*lpfA*₀₁₁₃陰性で、group Dは*lpfA*₀₁₁₃陽性、group Eのみが*lpf*_{0157/01-141}と*lpf*_{0157/01-154}陽性であった。

01-154及び01-141にコードされる*lpfA*遺伝子を解析し、

phylogenetic treeを作製した結果01-154ではgroup Eは0157-like, Dは044-like, AとB1は0113-likeの*lpfA*を持っていた。また01-141でもgroup Eは0157-like, B1とAは026-likeの*lpfA*をもっていた (Fig. 1)。

D. 考察

STECの接着因子と同定されたLPFは他の大腸菌にも存在し、phylogenetic groupとLPFのvariantの関連性が見られた。EPEC 055:H7はSTEC 0157:H7の祖先であるため、0157:H7と同じ*lpfA*を持っていると考えられる。一方、EPEC 0119:NM株の*fliC*及び*eae* typeがEPEC 055:H7やSTEC 0157:H7と異なっていたことは、LPFが大腸菌進化の早い段階で取得されたと示唆している。この仮説を明らかにするために*lpfA*のphylogenetic treeを作製したところ、Group DとEの株は別々にClusterを作ったが、group AとB1は同じclusterになり、*lpfA*は一度進化の早い段階で獲得され、最近水平伝達により、group A, B1の株が獲得したと考えられた。

LPFはSTEC以外の下痢原性大腸菌および非病原性大腸菌にも存在することが明らかになったが、99%のSTECがいずれかのLPFを持っていることはSTECにとって必要なgenetic background 或いは必要なfitness islandであることが示唆された。

E. 結論

LPFはSTEC以外の下痢原性大腸菌及び非病原性大腸菌にも存在することが明らかになった。また、LPFとそのvariantの存在はphylogenetic groupと関連していることがわかった。STEC 0157:H7の特有な*lpfA*と考えられていたものはphylogenetic group Eに特有なものであることが明らかになった。

standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. Res. Microbiol. 2006. In Press.

F. 健康危機情報

研究成果で、国民の健康被害等を考慮したとき国民に至急知らせた方がよい情報はない。

G. 研究発表

- 1) Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Nakasone, N., Rivas, M., and Iwanaga, M. The relationship between long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and phylogenetic groups. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. Fortieth Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections. 2005. Boston, MA.
- 2) Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M., and Iwanaga, M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the

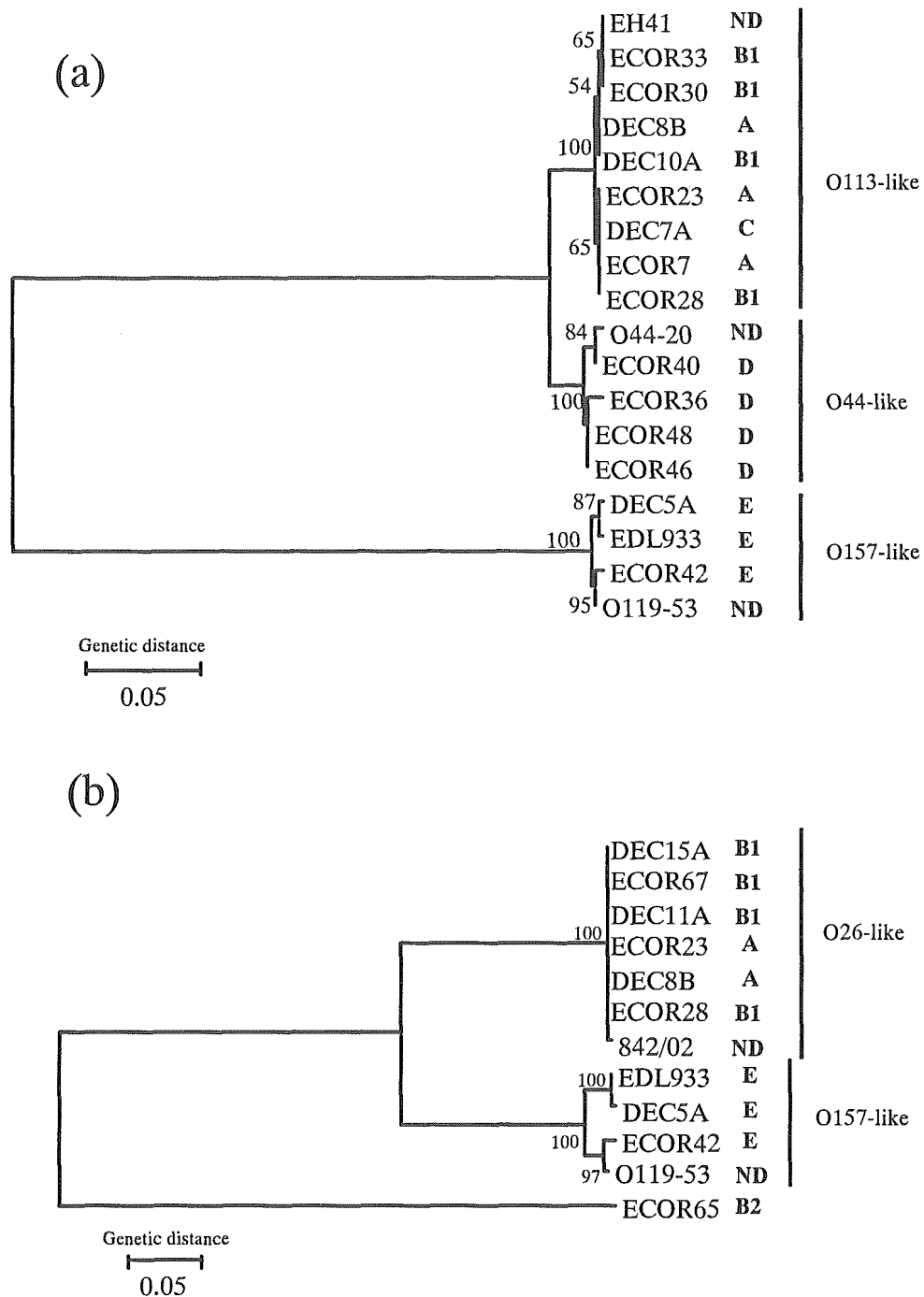


Fig 1. Neighbor-joining tree based on the *lpfA* gene sequences encoded in the region corresponding to OI-154 (a) and OI-141 (b). Numbers at the nodes are bootstrap confidence values based on 1,000 replicates. Phylogenetic groups assignment of strains are indicated (ND: not determined). Variants of *lpfA* are indicated on the right. The *lpfA* sequences of strains EH41 (O113:H21), EDL933 (O157:H7) and 842/02 (O26:H11) were extracted from the databases.

Table 1. Distribution of STEC-*lpfA*s in non-STEC diarrheagenic *E. coli*

Category	No. (%) of strains				
	Tested ^a	Positive by PCR for:			
		<i>lpfA</i> _{O113}	<i>lpfA</i> _{O26}	<i>lpfA</i> _{O157/O1-154}	<i>lpfA</i> _{O157/O1-141}
EAEC	37	24 (65)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
ETEC	25	13 (52)	4 (16)	0 (0)	1 ^b (4)
EPEC	30	13 (43)	8 (27)	2 ^c (7)	2 ^c (7)
EIEC	5	1 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	97	51 (53)	13 (13)	2 (2)	3 (3)

^a strains isolated in Laos, Vietnam, Indonesia, Kenya, Argentina and Japan

^b O152:H47 (strain O152-12)

^c O55:H7 (strain O55-4) and O119:NM (strain O119-53)

Table 2. Distribution of STEC-*lpfA*s in ECOR strains

Phylogenetic Group	No. Tested	No. (%) of strains positive by PCR for:			
		<i>lpfA</i> _{O113}	<i>lpfA</i> _{O26}	<i>lpfA</i> _{O157/O1-154}	<i>lpfA</i> _{O157/O1-141}
B2	13	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)
D	12	10 (83)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
E	4	0 (0)	0 (0)	2 (50)	4 (100)
B1	17	15 (88)	7 (41)	0 (0)	0 (0)
A	25	2 (8)	1 (4)	0 (0)	0 (0)

平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：(研究課題1) 新興型腸炎ビブリオの疫学マーカーの検索
(研究課題2) 腸管出血性大腸菌の PFGE パターンの多様性
メカニズムに関する研究
分担研究者：大澤 朗・神戸大農学部

研究課題1 要旨：腸炎ビブリオ食中毒において 1996 年以降、新型クローン (Pandemic strain) による事例が世界的に頻発しているが、その流行の要因は未だ解明されていない。本研究では Pandemic strain が特異的に保有する遺伝子とその要因に関与していると考え、Genomic subtraction によりその同定を試みた。その結果、DNA 結合タンパク HU- α をエンコードする塩基配列領域に特異的に挿入されている約 16-kb の DNA 配列の一部である DNA 断片が同定された。以上からこの挿入配列内の遺伝子あるいは、挿入による HU- α のアミノ酸配列への影響が pandemic strain の世界的流行の要因に関与していると考えられた。

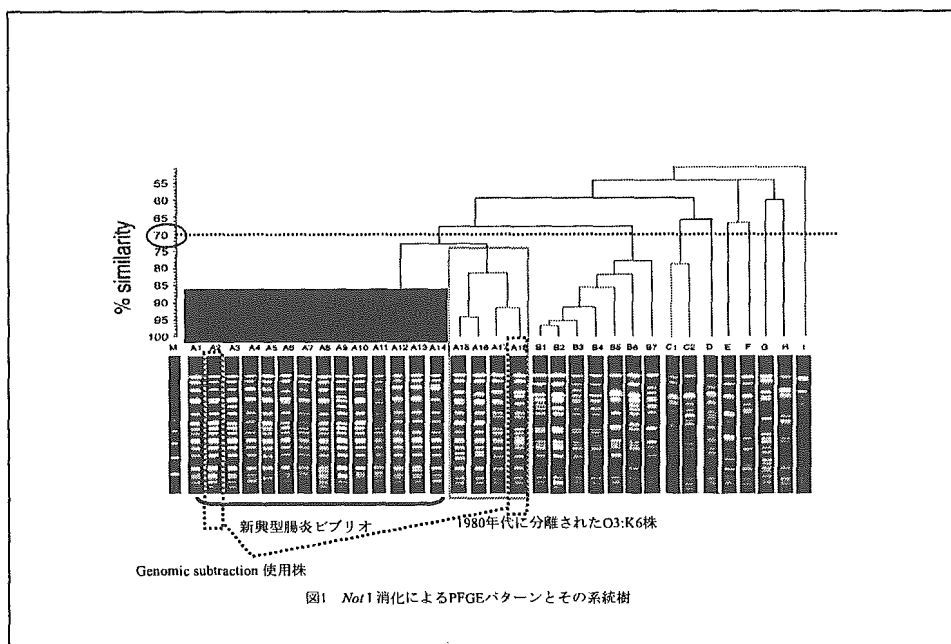
研究課題2 要旨：EDL933 株は全塩基配列が報告されており、ゲノム上には 18 個のファージ DNA およびファージ様 DNA が存在する。本実験では継代実験で得られた EDL933 株およびその派生株を用い、PFGE パターンの変化に影響を及ぼした変異の解析をおこなった。その結果、変異の一部はゲノム上の DNA 複製軸に対してほぼ対称な位置に存在する 2 つのプロファージまたはファージ様 DNA 上の領域を介した大規模な逆位であることが分かった。逆位は 7 つのラムダ型ファージまたはファージ様 DNA を介した 5 つの組み合わせでみられ、ゲノム上に存在するファージ DNA を介した逆位が O157 における PFGE パターンの多様化に関与していることが示唆された。

A. 研究課題1の研究目的

1996 年以降、腸炎ビブリオ食中毒において、Pandemic strain と称される PFGE 等の多型解析により単一のクローンから派生したと考えられている菌株による事例が国内外で頻発している。しかしながら、Pandemic strain の世界的流行の要因は現在のところ明らかになっていない。

本研究では、Pandemic strain が特

異的な遺伝子 (群) を獲得し、その遺伝子 (群) が世界的流行に関与していると考え、Pandemic strain と Pandemic strain に属さない (Non-pandemic strain) で PFGE パターンが比較的類似している腸炎ビブリオ株 (図 1) を用い、Genomic subtraction により Pandemic strain に特異的な遺伝子 (群) の同定を試みた。



B. 研究方法

1) 供試菌株：国立感染症研究所、神奈川県衛生研究所、神戸市環境保健研究所、岡山県環境保健センター、東京都健康安全センター、

International Center for Diarrhoeal Disease Research (バングラデッシュ) および、National Institute of Health (タイ) を経由して送付された腸炎ビブリオ 153 株を用い、Genomic subtraction による特異的遺伝子の同定には、表 1 の 12 株を使用した。

2) Genomic subtraction：表 1 の菌株のうち、Pandemic strain である NIID K7 (O3:H6) を Tester 株、より効率よく特異的遺伝子を同定するため Non-pandemic strain の中でも PFGE パターンが類似していた KE10491 (O3:H6) を Driver 株とし、GeneFisher PCR Subtraction System (Takara)

を用い、Representational differential analysis (RDA) 法により、Tester 特異 DNA 断片の候補を T ベクターにクローン化し、dot blot hybridization 法により、Tester 特異性を確認した。その後、塩基配列を決定し、それをもとにプライマーを設計し(表 2)、表 1 の 12 株を用い、PCR により Pandemic strain に対する特異性のスクリーニングを行った。最終的には 153 株 (新興型株 55 株、非新興型株 98 株) により特異性を確認した。

C. 研究結果

RDA 法により表 3 に示す 3 種のテスター特異的 DNA 断片が得られた。PCR によるスクリーニングにより表 4 のように Pandemic strain に特異的と考えられる DNA 断片が 1 つ得られ、この断片は chromosome 1 の VP 2905 遺伝子

表1 Genomic subtractionおよびスクリーニングPCRに使用した菌株

Strain	O:K serovar	Year of isolation	Country of isolation	Source	Results of PCR targeting the following gene(s)			
					<i>tdh</i> ^a	<i>trh</i> ^a	<i>toxRS</i> / <i>new</i> ^b	<i>orf8</i> ^c
Pandemic group								
NIID K7 (Tester)	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+
KE 10495	O3:K6	1996	Japan	human	+	-	+	+
AN-2416	O3:K6	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+
AN-8373	O3:K6	1998	Bangladesh	human	+	-	+	-
AN-2189	O4:K68	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+
NIID 242-200	O4:K68	2000	Korea	human	+	-	+	+
Non-pandemic group								
KE 10491 (Driver)	O3:K6	1983	Japan	human	-	-	+	-
KE 10465	O3:K6	1985	Japan	human	-	-	+	-
KE 9967	O3:K6	1981	Japan	human	+	-	-	-
KE 9984	O3:K6	1981	Japan	human	-	+	-	-
KE 10538	O4:K8	1999	Thailand	human	+	-	-	-
KE 10579	O1:K1	2000	Japan	sea water	+	+	-	-

a: Tada ら [Mol. Cell. Probes. (1992) Vol.6 p477-487.] に準拠して行った。

b: Matsumoto ら [J. Clin. Microbiol. (2000) Vol.38 p578-585.] に準拠して行った。

c: Iida ら [Emerg. Infect. Dis. (2001) Vol.7 p477-478.] に準拠して行った。

表2 スクリーニングPCRに使用したプライマーおよびPCR反応条件

Target gene	forward/reverse	sequence	size of PCR product (bp)
VP2905	F2-1-F	5'- GGCTGCTATAACATTGAGCAC-3'	385
	F2-1-R	5'-GAGGACTTGTGAAATCCCATG-3'	
VPA1367	F3-1-F	5' - TTAGTTGTTTCAGGTTGCCG - 3'	504
	F3-1-R	5' - GAGGACTTGTGAAATCCCATG - 3'	
VPA1371	F3-4-F	5' - GTGCGCCTAAATCGAGTTCT - 3'	584
	F3-4-R	5' - GCGACAGAAAGCCTGAACAT - 3'	

表 3 RDA法により検出されたNIID K7株に特異的なDNA断片

Fragment name	Sequence size(bp)	Protein with similarity (Vibrio parahaemolyticus strain RIMD 2210633)	% Nucleotide identity	Location ^a	Position
1	433	VP2905 ^a ; hypothetical protein	99 (432/433)	chromosome 1	90860th~91292nd
2	213	VPA1367 ^a ; putative type III secretion system lipoprotein precursor EprK	99 (212/213)	chromosome 2	235181st~235393rd
3	188	VPA1371 ^a ; hypothetical protein	99 (187/188)	chromosome 2	237821st~238008th

^a ; GenBank accession no.BA000031,BA000032に基づく

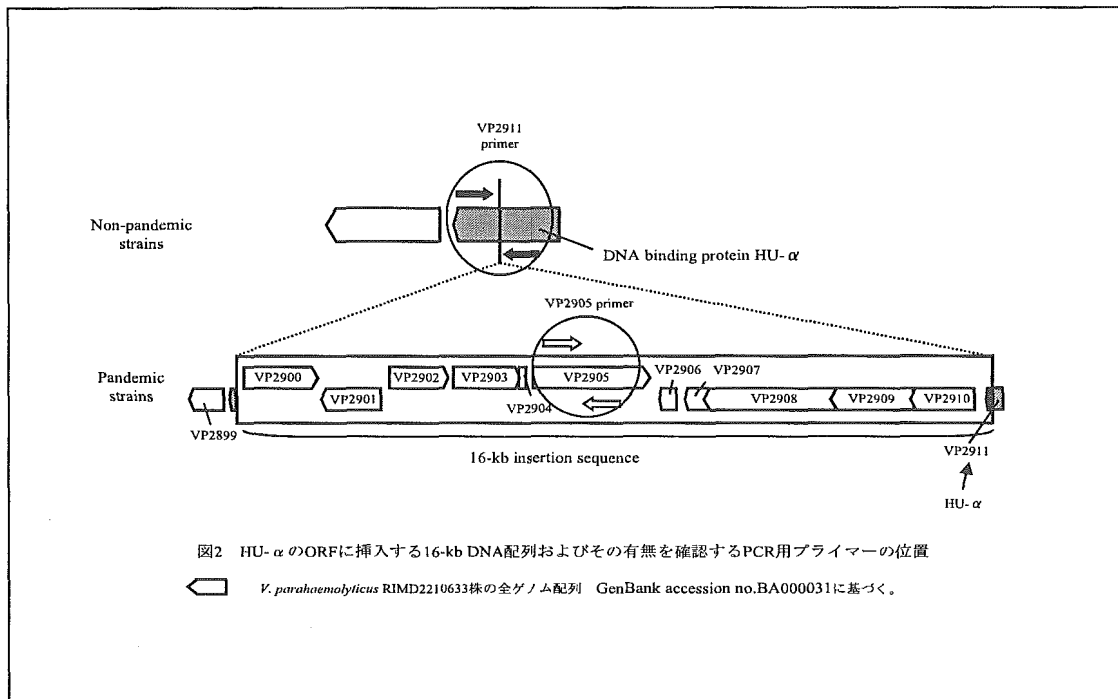
表 4 スクリーニングPCR結果

Strain	O:K serovar	Year of isolation	Country of isolation	Source	Gene encoding:			Subtraction derived gene sequence of: (Fragment name)		
					<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS</i> /new	VP2905 ^a (1)	VPA1367 ^a (2)	VPA1371 ^a (3)
Pandemic group										
NIID K7 (Tester)	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+	+	+
KE 10495	O3:K6	1996	Japan	human	+	-	+	+	+	+
AN-2416	O3:K6	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	+
AN-8373	O3:K6	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	+
AN-2189	O4:K68	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	+
NIID 242-200	O4:K68	2000	Korea	human	+	-	+	+	+	+
Non-pandemic group										
KE 10491 (Driver)	O3:K6	1983	Japan	human	-	-	+	-	-	-
KE 10465	O3:K6	1985	Japan	human	-	-	+	-	-	-
KE 9967	O3:K6	1981	Japan	human	+	-	-	-	+	+
KE 9984	O3:K6	1981	Japan	human	-	+	-	-	-	+
KE 10538	O4:K8	1999	Thailand	human	+	-	-	-	+	+
KE 10579	O1:K1	2000	Japan	sea water	+	+	-	-	-	-

^a GenBank accession no., (BA000021,BA000022))

の一部で、近年 Williams ら [J. Clin. Microbiol. (2004) Vol.42 p1657-1665.] により報告された DNA 結合タンパク HU- α をエンコードする塩基配列領域に Pandemic strain にのみ特異的に挿入されている約 16-kb の配列の一部であった (図 2)。さらに

153 株を用いて、その特異性を確認したところ、Non-pandemic group に属する菌株はすべて陰性で、Pandemic strain は 1 株 (04:K68, 2003 年分離) を除き、すべて陽性であった。



D. 考察

Genomic subtraction により Pandemic strain に特異的な遺伝子としてDNA結合タンパク HU- α をエンコードする塩基配列領域に特異的に挿入されている約 16-kb の配列の構成遺伝子である VP2905 が得られた。この 16-kb についてさらに調べると、図3のように構成するほとんどすべての遺伝子が機能未知のタンパクをエンコードしていた。さらに VP2903 が putative phage protein をエンコード

している事および、挿入の前後に重複した配列が認められたことから、この 16-kb 挿入配列がフェージ等の外来に由来することが示唆された。また、Williams らによるとこの 16-kb の挿入により図 4 のように HU- α のアミノ酸配列の末端にアミノ酸の置換および付加が起こっている事も報告されている。以上から外来に由来する 16-kb の挿入配列および挿入による HU- α への影響のいずれかあるいは両方が Pandemic strain の世界的流

