



の多様性・遺伝子構成の多様性等に基づいた迅速疫学解析ツールを構築することが可能であることが示唆された。

参考文献

- 1) Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Oguma, K. : The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 17472-17477, 2005

## 分担研究課題

腸チフス・パラチフスの新型薬剤耐性菌の侵入監視

分担研究者 廣瀬健二 国立感染症研究所細菌第一部第二室 室長

研究協力者 森田昌知 国立感染症研究所細菌第一部第二室 研究員

## 研究要旨

腸チフス・パラチフスにおいては、ニューキノロン低感受性菌が増加し治療上の大きな問題となっている。すでに海外の一部の地域では、ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の発生が報告されはじめている。これらのニューキノロン耐性菌が日本国内に海外事例として入ってくるのは時間の問題である。また、未だ報告はされていないが治療に使用されている第 3 世代セフェム系抗菌薬に耐性を持つチフス菌・パラチフス A 菌の発生も考えられる。本研究ではこのように、日本国内に存在しないチフス菌・パラチフス A 菌の薬剤耐性菌が入ってきたことを迅速に検出することを目的とし、日本国内のすべての分離株の薬剤感受性試験を行った。

### A. 研究目的

腸チフス・パラチフスにおいては、ニューキノロン低感受性菌が増加し治療上の大きな問題となっている。また、低感受性菌の耐性化が進み完全なニューキノロン耐性菌になることは容易に予想できる。また、現在のところ報告のない第 3 世代セフェム系抗菌薬に耐性を示すチフス菌・パラチフス A 菌が出現する可能性も考えられる。本研究では、チフス菌・パラチフス A 菌においてニューキノロン耐性菌や、第 3 世代セフェム系抗菌薬耐性菌の侵入をいち早く検出することを目的とする。

### B. 研究方法

2005 年中に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌を保健所・地方衛生研究所を経て国立感染症研究所細菌第一部に送付してもらい解析に使用した。これらの菌株のファージ型別と薬剤感受性試験を行った。

薬剤感受性試験は、腸チフス・パラチフスに有効と考えられている薬剤を含む 19 薬剤の感受性を調べた。薬剤は、アンピシリン、クロラムフェニ

コール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ST 合剤、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、オフロキサシン、ノルフロキサシン、スパルフロキサシン、レボフロキサシン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフトリアキソン、イミペネム、アズトレオナム、ホスホマイシンの 19 薬剤である。薬剤感受性試験は、E-test を用いて NCCLS 法に従って行った。ファージ型別も従来の方法に従って行った。

### C. 研究結果

薬剤感受性試験の結果、現在腸チフス・パラチフスの治療上の問題となっているナリジクス酸耐性菌(ニューキノロン低感受性菌)の割合は、2000 年分離株中チフス菌が 29.2%、パラチフス A 菌では 87.5%であった。前年と比較しチフス菌では約 65%から 29.2%と大幅に減少した。パラチフス A 菌では約 78%から 87.5%と大幅に増加した。チフス菌・パラチフス A 菌のニューキノロン剤に対する 90%MIC と 50%MIC は前年と比較して大きな変動はみられなかった。また、ニューキノロ

ン剤に対する耐性菌も分離されなかった。チフス菌では、アンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、ST 合剤の 5 薬剤に耐性を持つ多剤耐性菌が 5 株分離された。これらは、インド、バングラデッシュ、パキスタンへの渡航者から分離された。ファージ型は、チフス菌では従来 E1 型がもっとも多くみられたが本年は B1 型が多かった。B1 型はインドネシア、タイ、フィリピンへの渡航者から分離された。また、B1 型に次いで多かったのが E1 型で、すべてがインドへの渡航者から分離された。チフス菌ナリジクス酸耐性株は、インド、バングラデッシュ、パキスタンへの渡航者から分離された。パラチフス A 菌ナリジクス酸耐性株は、アフリカ、アジアなどの渡航先から分離された。また、ニューキノロン耐性菌や、第 3 世代セフェム系抗菌薬に耐性をもつ新しいタイプの耐性菌は検出されなかった。

#### D. 考察

腸チフス・パラチフスにおいては、ニューキノロン低感受性菌が増加し治療上の大きな問題となっている。パラチフス A 菌では、1998 年頃よりニューキノロン低感受性菌が増加しつづけ、本年は分離株の 87.5% がナリジクス酸耐性菌でニューキノロン低感受性菌であった。このようにニューキノロン低感受性菌が増加しつづればニューキノロン耐性菌となっていくことは容易に予想ができる。耐性菌になれば、治療にニューキノロン剤は全く無効となり使用できない。このような耐性菌の日本への侵入をいち早く見つけるため、常に分離株の薬剤感受性を調べる必要がある。

#### E. 結論

本研究での、薬剤感受性試験の結果を渡航先などの情報とともにデータベースを整理する。また、同様な薬剤耐性パターンを持つ株の由来を区別するために、さらにファージ型別を行う。これらの情報を整理し、データベース化し世界中のどの地方でどんな薬剤に対する耐性菌が流行しているかを

常に把握し新型薬剤耐性菌の日本国内への侵入の予防に役立てることが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hirose, K., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., Arakawa, E., Takai, N., Watanabe, H.

Antimicrobial susceptibility of *Shigella sonnei* isolates in Japan and molecular analysis of *S. sonnei* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones.

Antimicrob. Agents Chemother. 2005. 49, p1203-1205.

##### 2. 学会発表

ナリジクス酸耐性チフス菌・パラチフス A 菌の日本国内における分離状況

廣瀬健二 田村和満 泉谷秀昌 高井信子 渡辺治雄

第 79 回日本感染症学会総会 名古屋、2005. 4. 14-15

腸チフスパラチフスの治療に関する調査 2000 から 2003 年

相楽裕子 大西健児 角田隆文 今村顕史 小花光夫 大羽健一 廣瀬健二 渡辺治雄

第 79 回日本感染症学会総会 名古屋、2005. 4. 14-15

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 12005 年に分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の薬剤感受性試験の結果

	serovar Typhi 23 isolates				serovar Paratyphi A 8 isolates			
	range	MIC50	MIC90	(%)R	range	MIC50	MIC90	(%)R
ampicillin	0.5->256	1	>256	21.7	4-8	4	8	0
chloramphenicol	2->256	4	>256	21.7	8-16	8	16	0
gentamicin	0.125-16	0.25	0.5	0	0.064-0.25	0.125	0.125	0
kanamycin	2->256	4	4	4.3	1-4	2	2	0
streptomycin	8->1024	16	>1024	-	8-32	16	16	-
trimethoprim/ sulfamethoxazol	0.032->32	0.125	>32	-	0.125-0.5	0.25	0.25	-
tetracycline	1->256	2	>256	17.4	0.25-8	4	4	0
nalidixic acid	2->256	4	>256	30.4	8->256	>256	>256	87.5
ciprofloxacin	0.016-0.5	0.064	0.5	0	0.064-2	1	1	0
cefoperazon	0.5-32	2	16	0	1-2	1	2	0
cefotaxime	0.008-1	0.25	0.25	0	0.25-0.5	0.25	0.5	0
sparfloxacin	0.002-1	0.016	0.25	-	0.064-1	1	1	-
imipenem	0.125-1	0.25	0.5	0	0.25-4	0.5	0.5	0
ceftriaxone	0.064-0.25	0.125	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0
aztreonam	0.016-0.125	0.016	0.125	0	0.125-0.25	0.125	0.125	0
ofloxacin	0.064-1	0.125	1	0	0.25-4	4	4	0
norfloxacin	0.064-2	0.125	2	0	0.25-2	2	2	0
fosfomicin	1-32	8	16	0	128-512	128	256	12.5
levofloxacin	0.008-0.25	0.032	0.25	0	0.125-1	0.5	1	0
tosufloxacin	0.016-1	0.016	0.064	-	0.016-2	2	2	-

表2 フェージ型とNA感受性

serovar Typhi		NA 耐性	NA 感受性	serovar Paratyphi A	
B1			5	1	1
D1	1		1	2	
D2			1	3	
E1	3			4	3
E2			1	5	
J1	1			6	3
M1			2	UT	1
46			1		
DVS			2		
UVS1			1		
UVS4	3		1		

表3 渡航先とNA感受性

serovar Typhi		NA 耐性	NA 感受性	serovar Paratyphi A	
ネパール			1	カンボジア	1
タイ			1	モルジブ	2
インドネシア			5	ネパール	1
フィリピン			3	ミャンマー	2
インド	4			インド	1
バングラデッシュ	1			中国	1
パキスタン	1				
渡航歴なし	1		6		

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者 大澤 朗

神戸大学 農学部

協力研究者 井口 純

神戸大学 自然科学研究科（学術振興会特別研究員）

研究要旨

研究 1) EHEC 0157 の多様な PFGE パターンの要因解明に関する研究：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。本実験では過去の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結果、変異の一部は DNA 複製軸に対してほぼ対称な位置に存在する 2 つのファージ DNA 間での逆位により起こったことが分かった。ゲノム上に存在するファージ DNA を介した逆位が 0157 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。

研究 2) 新興型腸炎ビブリオの新規疫学マーカーの検索：新興型株 (NI ID K7) と 1980 年代に分離された新興型株に近縁な 03:K6 株 (KE10491) 株間でゲノムサブトラクション法を行い、このような遺伝子の検出を試みた結果、新興型株に特異的に挿入した 16-kb の DNA 配列を特定したこの挿入配列には putative phage protein をコードしていること、また挿入部位の前後に共通した配列 (TTCTTCAG) が認められたことから、ファージ由来であることが示唆された。

研究 1) 「EHEC 0157 の多様な PFGE パターンの要因解明に関する研究」の報告

A. 研究目的

EHEC 0157 は 1982 年にアメリカ合衆国のオレゴン州及びミシガン州で発生した、ハンバーガー一食中毒における出血性大腸炎患者から初めて分離された。日本においては 1990 年、埼玉県浦和市の幼稚園において井戸水を原因とする集団感染事例が発生し園児 2 名が死亡するに至り、これ以来社会的に注意を要する食中毒細菌として注目されるようになった。また、1996 年には大阪府堺市での学校給食による大規模

な事例をはじめ、日本各地で多数の感染事例が発生し社会問題となった。1996 年に日本各地で分離された EHEC 0157 株の制限酵素 *Xba*I 消化による PFGE 解析がおこなわれた結果、集団感染事例を中心に大きく 6 つの型に分類されたが、家族内感染事例や散発感染事例から分離された EHEC 0157 株の多くは上記の 6 型には属さず、細かく分類すると 200 種類以上にも分類された。またそれ以後に分離された EHEC 0157 についても PFGE 解析が行われたが、新しく分離される株のほとんどが過去の株とは異なる PFGE パターンを示したことから、EHEC 0157 の染色体 DNA

の構造は非常に多様であることが明らかとなった。しかし、そのような多様性がどのようにして起こるかはこれまでにほとんど解明されておらず、PFGE パターンの結果を正しく理解するためにはそれらを知ることが必要であると考へた。そこで本研究では EHEC O157 ゲノム多様化の要因を解明することを目的とし、PFGE パターンの変化に影響を及ぼす変異の解析をおこなった。

## B. 研究方法

1. 供試菌株：EDL933 全塩基配列解析株およびハートインヒュージョン寒天培地による連続的な継代操作により派生した PFGE パターンの異なる EDL933 派生株 19 株（継代初代株を含む）を用いた。

2. PFGE パターンの比較：*Xba*I 処理による PFGE パターンの比較をおこなった。また、EDL933 株全ゲノム配列より *Xba*I サイトマップを作製し、比較する 2 株間で変化したパターン（フラグメント）のゲノム上での位置を特定した。

3. 変異の解析：サイズが変化したフラグメントの多くは、その内部に構造多型領域として知られるプロファージを含んでいたことからこれらの領域に注目し、ラムダ型ファージ DNA とファージ様 DNA の両端を標的としたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション、およびプロファージとその周辺領域を標的とした PCR により PFGE パターンの変化に関与した変異の解析をおこなった。

## C. 研究結果と考察

### 1. 大規模な逆位

サザンハイブリダイゼーションの解析により PFGE パターンの変化に関与した変異の一部は大規模な逆位であることがわかった（図 1）。

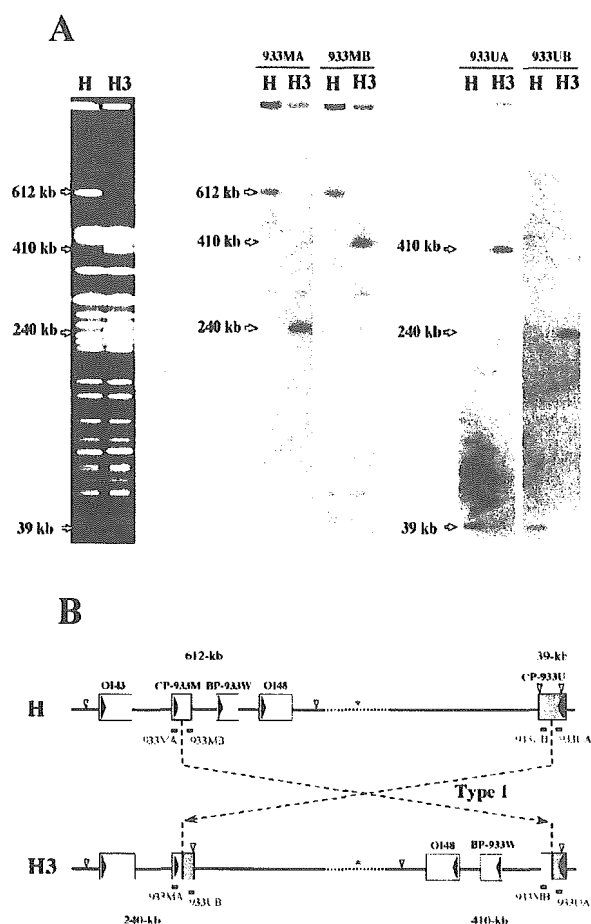


図 1. PFGE とサザンハイブリダイゼーションによる 2 株間の変異の解析 (A) PFGE パターンの変化とファージ DNA の両端を標的としたプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果。(B) 2 つのファージ DNA 領域を介した大規模な逆位の模式図。灰色四角は逆位が起こったファージ DNA 領域を示し、白抜き四角はその他のファージまたはファージ様 DNA 領域を示す。四角内の黒三角は領域内にコードされたインテグラーゼ遺伝子の位置と向きを示す。白抜き矢頭は *Xba*I サイトを示し、\*印は複製終結点を示す。最上部または最下部の太線は逆位により変化したフラグメントのサイズを示す。下部の黒四角はサザンハイブリダイゼーションで用いたプローブの標的領域を示す。逆位の多くはゲノム上の複製軸に対してほぼ対称な位置に存在する 2 つのファージまたはフ



ファージ様 DNA 領域を介して起こっていた。

複製終結点周辺に存在する5つのラムダ型ファージ DNA 領域を介した4タイプの逆位がみられた (図2. Type 1-3 および5)。

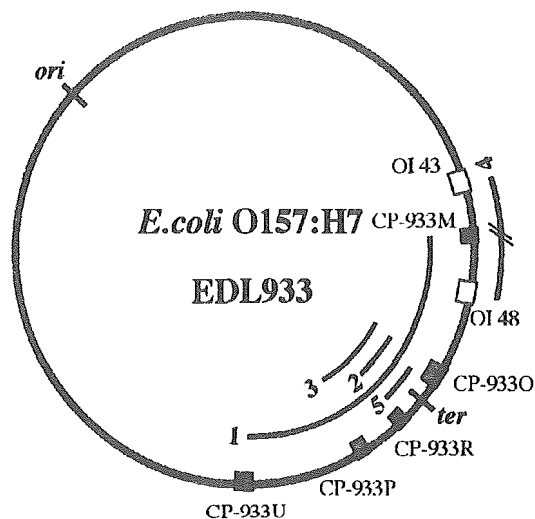


図2. EDL933 ゲノム上で起こった5タイプの逆位領域 灰色四角は逆位が起こったプロファージ DNA 領域を示す。

Type 1 の逆位が一度起こった菌株をさらに継代培養することにより得られた PFGE パターン変化株の中には、Type 1 の逆位が再度起こり、PFGE パターンが元に戻った菌株もあった。また Type 1 の逆位により複製軸に対して向かい合う状態となった EDL933 ゲノム上に2セット存在するファージ様 DNA 領域 (OI43 と OI48) (図1B) を介した逆位もみられた (図2. Type 4)。

今回の研究で合計5タイプの逆位が明らかとなり、その大きさは250-kb から1.4-Mb であった (図2)。また一度の逆位で PFGE パターン間の4バンドの変化が観察された。

逆位はプロファージ DNA 領域が共有する相同性の極めて高い領域を介して起こったと予想された。現在、変異箇所の特特定をおこなっている。ゲノム上でラムダ型ファージ DNA 領域を介

した逆位が高頻度で起こった理由として、EDL933 ゲノム上に12個存在するラムダ型ファージ DNA のうち10個が複製終結点側に集中して挿入していることや、すべての挿入方向が複製開始点から複製終結点に向かって同一方向であること、またラムダ型ファージ DNA は相同性の高い配列を数多く共有しているなど、逆位に適した複数の要因が考えられた。このような特徴は全塩基配列が解読されている他の EHEC O157 株にも共通してみられ、ラムダ型ファージ DNA を介した大規模な逆位が EHEC O157 のゲノムを多様に変化させ、PFGE パターンの変化に参与していることが示唆された。大規模な逆位が O157 ゲノムの多様化に参与する可能性が予想されたことから、環境や臨床より分離される菌株の逆位によるゲノム多様化についても検討すべきであると考えられた。

## 2. その他の変異

Stx2 ファージ (BP-933W) DNA の欠落による PFGE パターンの変化が3株でみられた。いずれの欠落もファージ DNA のみが抜け落ち、ファージ DNA が挿入していた *wrbA* 遺伝子は挿入前に予想される完全な配列に戻っていた。他のファージ DNA の欠落はみられなかった。一方、挿入配列を介した欠失も観察された。プロファージ CP-933Y 上に存在する挿入配列 (IS629) を介した30から50-kb に及ぶ欠失が3株の PFGE パターンの変化に参与していた。以上の結果より、ゲノムの多様化に参与していると予想されてきた可動因子であるファージ DNA や IS が PFGE パターンの多様化に参与していることが示唆された。

## D. 結論

PFGE パターンの変化に参与した変異の一部

は EDL933 ゲノム上に挿入しているラムダ型フ  
ァージ領域を介した大規模な逆位であった。本  
研究で明らかとなった PFGE パターンの変化に  
影響を及ぼした変異の全てがプロファージ DNA  
領域で起こっていたことから、ゲノム上でのフ  
ァージ DNA の存在は単なる「挿入 DNA 断片」に  
留まらず、「変異スポット」としてさらにゲノ  
ムの多様化を加速させている可能性が示唆さ  
れた。実験室などでの連続した継代培養がこの  
ような変異を引き起こすことに留意しなければ  
ならない。また PFGE パターンから得られる  
情報をより正しく理解するために、環境や臨床  
から分離される菌株のゲノム多様化の要因と  
して、これらの変異の関与についても検討すべ  
きであると考えられた。

#### 参考文献

1) Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J.,  
Watanabe, H. and Osawa, R. Spontaneous  
recombination between homologous  
prophage regions causes large-scale  
inversions within the *Escherichia coli*  
O157:H7 chromosome. Gene (掲載予定)

研究 2) 「新興型腸炎ビブリオの新規疫学マー  
カーの検索」の報告

#### A. 研究目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は、  
海水程度の塩を含む環境を好み、海産魚介類、  
沿岸部の海水や海泥中などに広く分布する細  
菌である。この中で耐熱性溶血毒 (TDH) ある  
いは TDH 類縁溶血毒 (TRH) を産生する菌株  
が下痢、腹痛、発熱伴う重度の食中毒を起こす。  
わが国では魚介類の生食を嗜好することから、  
本菌に汚染された食品の喫食による食中毒事例  
が毎年、多発している。本菌は菌体表層の菌体  
(O) 抗原と夾膜 (K) 抗原のタイプの組み合  
わせにより血清型別され、わが国では 1995 年  
まで食中毒事例で最も分離頻度の高い血清型  
は O4:K8 であった。ところが、1996 年以降  
O3:K6 という血清型がそれに入れ替わる形で  
頻繁に分離されるようになった。しかも、この  
O3:K6 血清型株による事例は日本だけでなく、  
他のアジア諸国や米国でもほぼ同時期に頻繁  
に報告されている。さらに、1998 年以降には、  
O4:K68 や O1:KUT、O1:K25 といった新たな血  
清型株による事例も国内外で発生するようにな  
った。

興味深いことに、1996 年以降頻繁に分離され  
る O3:K6 や O4:K68 等の新血清型株についてパ  
ルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 等によ  
る DNA フィンガープリンティング解析を行っ  
た結果、株間の遺伝子型プロファイルが相互に  
極めて類似性が高いことが明らかとなり、以上  
からこれらの菌株が同一のクローンを起源と  
し、それが世界規模で拡大している可能性を多  
くの研究者が支持しており、現在これらの一群  
の菌株は pandemic strains あるいは pandemic

clones (新興型腸炎ビブリオ) と総称されている [J. Clin. Microbiol. (1997) Vol.35, p3150 - 3155.、J. Clin. Microbiol. (1999) Vol.37, p2354 - 2357.]. しかしながら、なぜこのように、世界的流行をおこしているのかについては依然として解明されていない。このような背景をふまえて、我々は「新興型腸炎ビブリオは未だに特定できない何らかの遺伝子を獲得し、この遺伝子が流行に優位となるような形質に關与しているのでは?」という仮説を立て、この仮説の真偽を検証するべく、その準備段階の研究として国立感染症研究所細菌部と共同で新興型腸炎ビブリオの遺伝子プロファイルの再検討を行い、さらに後述する特異的遺伝子を検出するゲノムサブトラクション法により新興型腸炎ビブリオに特異的な遺伝子(群)の検索を行った。

## B. 研究方法

### 1. 遺伝子プロファイルの再検討

新興型株 30 株を含む計 54 株の腸炎ビブリオについて、Marshall ら [J.Clin.Microbiol. (1999) vol.37,p.2473-2478.] の方法に基づく制限酵素 *Not I* 消化による PFGE および Matsumoto ら [J.Clin.Microbiol.(2000) Vol.38,p.578-585.] の方法に基づき、Ready-To-Go RAPD Analysis Primer 2 (Amersham Biosciences) を用いた AP-PCR による遺伝子型解析を行い、GelComparII (Applied Maths) を用いて系統樹を作製した。

さらに、新興型腸炎ビブリオの遺伝子マーカーとして報告のあった *toxRS* 配列の塩基の相違 (*toxRS/new,toxRS/old*) に基づく GS-PCR を Matsumoto ら [ J.Clin.Microbiol.(2000) Vol.38,p.578-585.] の方法に準拠して、新興型株

に特異的に溶原化するファージ上の *orf8* 遺伝子を標的とした PCR を Iida ら [Emerg.Infect.Dis.(2001) Vol.7,p.477-478] の方法に準拠して行った。

### 2. ゲノムサブトラクション法

ゲノムサブトラクション法は Tester および Driver の 2 種のゲノム DNA を用い、制限酵素等で断片化した後、Driver と相同性のある DNA 断片を取り除いていくこと(引き算していく)により、Tester に特異的な DNA 断片を検出する手法である。本研究では新興型株を Tester、非新興型株を Driver としてゲノムサブトラクション法を行った。この際、新興型株に遺伝子型の類似した非新興型株を使用することでより効率よく特異的な断片が得られると考え、Driver 株は上記の遺伝子プロファイルの再検討で PFGE および AP-PCR パターンを基に作製した系統樹で新興型株と同じクラスターに含まれた株 (KE10491 株; 1983 年、患者より分離) を使用した(図 3、4)。また、Tester 株は新興型 O3:K6 株で最も多くが属したパターンの株 (NIIDK7 株; 1998 年、患者より分離) を使用した。Tester 特異 DNA 断片の検出には GeneFisher PCR Subtraction System (Takara) を用いた RDA (Representational Difference Analysis) 法に従って行った。得られた Tester 特異 DNA 断片候補は T ベクターにクローン化し、dot blot hybridization 法により、Tester 特異性を確認した後、塩基配列を決定した。そして、その配列をもとにプライマーを設計し、新興型株 6 株、非新興型株 6 株の計 12 株を用いて、PCR により新興型株に対する特異性のスクリーニングを行った。

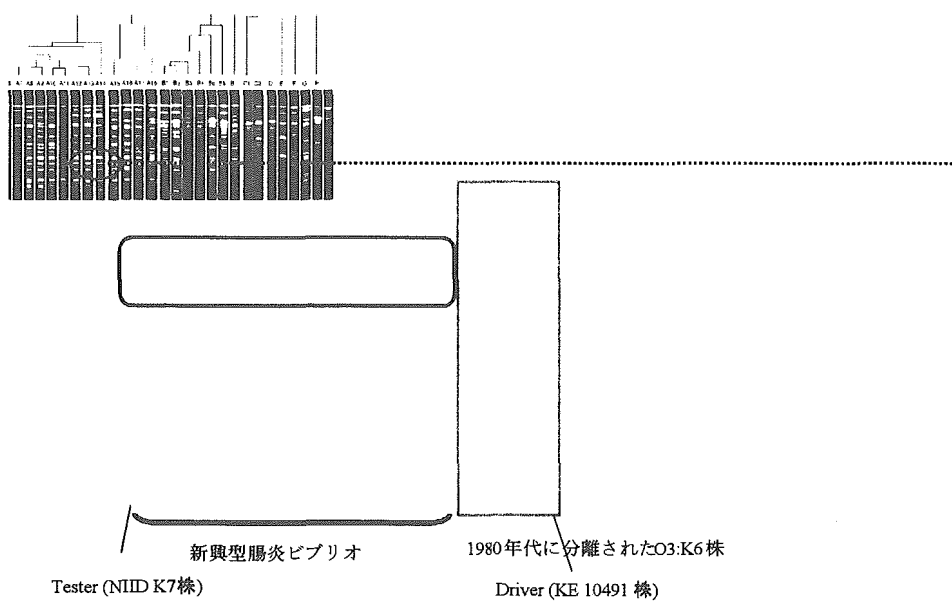


図3 NotI 消化によるPFGEパターンとその系統樹

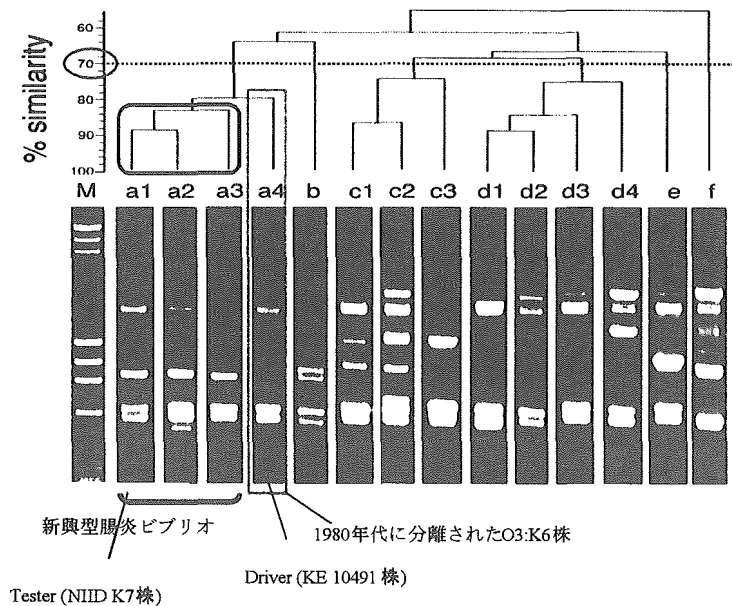


図4 primer 2によるAP-PCRパターンとその系統樹

このスクリーニングで新興型株に特異的であった遺伝子については153株(新興型株55株、非新興型株98株)によりその特異性を確認した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 遺伝子プロファイルの再検討

PFGEの結果、計33のパターンに分類され、70%以上の相同性を基準に型別を行ったところ、A~Iの9のクラスターに分類することができた(図3)。Aのクラスターは75%以上の類似性を基準にA1~A14およびA15~A18の2つのサブクラスターに分けることができ、A1~A14には、新興型腸炎ビブリオすべてが含まれ、それ以外の株は含まれなかった(図3)。A15~A18は1980年代に分離された*tdh*、*trh*が共に陰性のO3:K6の4株(KE10491, KE-10465, KE10462, KE-10464)が属した(図3)。

AP-PCRの結果、計14のパターンに分類され、70%以上の相同性を基準に型別を行ったところ、a~fの6のクラスターに分類することができた(図2、表1)。前述のPFGEにおいてAのクラスターに含まれたすべての株がaに含まれ、それ以外の株でaに属する株は認められなかった(図2、表1)。新興型株はすべてa1~a3のパターンを示し、PFGEにおいてA15~A18に属した4株(KE10491, KE-10465, KE10462, KE10464)はすべてa4であった(図4)。

GS-PCRの結果、前述のPFGEの遺伝子型がA、AP-PCRの遺伝子型がaであったすべての株が*toxRS/new*配列を所有し、それ以外の株は*toxRS/old*配列を所有していた(表1)。

*orf8*を標的としたPCRの結果、PFGEの遺伝

子型がA、AP-PCRの遺伝子型がaの株のうち、1998年から2000年の間にバングラディッシュで分離されたO3:K6の3株(AN-2416, AN-8373, AP-9251)と1980年代に分離された*tdh*、*trh*が共に陰性のO3:K6の4株(KE10491, KE10465, KE10462, KE10464)を除いて*orf8*が陽性であった(表1)。

以上から、これまでに新興型株に特異的であると報告のあった*toxRS*配列および*orf8*遺伝子とともに新興型株を同定する遺伝子マーカーとしては不十分であることが示された。また、1980年代に分離された*tdh*、*trh*が共に陰性のO3:K6の4株(KE10491, KE10465, KE10462, KE10464)はPFGEおよびAP-PCRにおいてともに新興型株と同じクラスターに属し、*toxRS/new*配列を保有する事から系統的に近縁であることが示唆された。

そこで、本研究では「これらの株が*tdh*やその他の遺伝子(群)を獲得し、新興型O3:K6株が出現したのでは？」という仮説を立て、これらの株と新興型株のゲノムDNAを用いて、ゲノムサブトラクション法を行う事により新興型腸炎ビブリオが獲得したと考えられる特異的な遺伝子(群)の検索を試みた。

### 2. ゲノムサブトラクション法により得られたTester特異DNA断片

ゲノムサブトラクション法を行った結果、表2に示す計3のNIIDK7株特異DNA断片が得られた。1の断片のみがchromosome1上、2、3の断片はchromosome2上の遺伝子の一部で、このうち、2の断片を含むVPA1367のみがputative type III secretion system lipoprotein precursor EprKと機能が明らかになっていたが1を含む

表1 PFGE, AP-PCRパターン、及び新興型腸炎ビブリオの遺伝子マーカーに関するPCR結果

Group and strain no.	Serotype	Year of isolation	Country of isolation	Source	Genotype		Results of PCR			
					PFGE	AP-PCR	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	GS-PCR	<i>otf8</i>
O3:K6, isolated since 1996										
KE10495	O3:K6	1996	Japan	human	A2	a1	+	-	+	+
KE10457	O3:K6	1998	Japan	human	A1	a1	+	-	+	+
KE10472	O3:K6	1998	Japan	human	A1	a1	+	-	+	+
KE10481	O3:K6	1998	Japan	human	A1	a1	+	-	+	+
KE10484	O3:K6	1998	Japan	human	A8	a2	+	-	+	+
KE10524	O3:K6	1998	Japan	environment	A9	a1	+	-	+	+
KE10527	O3:K6	1998	Japan	food	A3	a1	+	-	+	+
KE10531	O3:K6	1998	Japan	human	A1	a1	+	-	+	+
NIID956-98	O3:K6	1998	USA	human	A5	a1	+	-	+	+
NIID K7	O3:K6	1998	Japan	human	A1	a1	+	-	+	+
AN-2416	O3:K6	1998	Bangladesh	human	A1	a1	+	-	+	+
AN-7410	O3:K6	1998	Bangladesh	human	A1	a1	+	-	+	+
AN-8373	O3:K6	1998	Bangladesh	human	A6	a1	+	-	+	+
NIID59-99	O3:K6	1999	Thailand	human	A10	a1	+	-	+	+
AO-97	O3:K6	1999	Bangladesh	human	A1	a1	+	-	+	+
AP-9251	O3:K6	2000	Bangladesh	human	A6	a3	+	-	+	+
AP-14861	O3:K6	2000	Bangladesh	human	A1	a1	+	-	+	+
O3:K6, isolated before 1996										
KE9967	O3:K6	1981	Japan	human	B7	d3	+	-	-	-
KE9971	O3:K6	1981	Japan	food	B7	d3	+	-	-	-
KE9984	O3:K6	1981	Japan	human	B1	c1	-	+	-	-
KE10461	O3:K6	1982	Japan	environment	G	f	-	-	-	-
KE10491	O3:K6	1983	Japan	human	A18	a4	-	-	+	-
KE10492	O3:K6	1984	Japan	human	B6	a4	-	+	-	-
KE10465	O3:K6	1985	Japan	human	A16	c1	-	-	+	-
KE10462	O3:K6	1986	Japan	food	A17	a4	-	-	+	-
KE10463	O3:K6	1987	Japan	food	B5	c1	-	-	-	-
KE10464	O3:K6	1988	Japan	food	A15	c1	-	-	+	-
KE10443	O3:K6	1995	Japan	human	B1	c1	-	+	-	-
KE10466	O3:K6	1996	Japan	human	B2	c1	-	+	-	-
TVP 1919	O3:K6	before 1996	Japan	human	B1	c1	-	+	-	-
TVP 1908	O3:K6	before 1996	Japan	human	B1	c1	-	+	-	-
TVP 1841	O3:K6	before 1996	Japan	human	B4	c1	-	+	-	-
TVP 1499	O3:K6	before 1996	Japan	human	B3	c1	-	+	-	-
TVP 1894	O3:K6	before 1996	Japan	human	B3	c1	-	+	-	-
Other serovars										
AN-2189	O4:K68	1998	Bangladesh	human	A7	a1	+	-	+	+
AN-11127	O4:K68	1998	Bangladesh	human	A7	a1	+	-	+	+
AN-14142	O4:K68	1998	Bangladesh	human	A7	a1	+	-	+	+
KE10545	O4:K68	1999	Indonesia	human	A7	a1	+	-	+	+
NIID 181-99	O4:K68	1999	Thailand	human	A11	a1	+	-	+	+
NIID242-200	O4:K68	2000	Korea	human	A7	a1	+	-	+	+
AN-16000	O1:KUT	1998	Bangladesh	human	A12	a1	+	-	+	+
AP-11243-2	O1:KUT	2000	Bangladesh	human	A12	a1	+	-	+	+
AP-32241	O1:KUT	2000	Bangladesh	human	A13	a1	+	-	+	+
AO-24491	O1:K25	1999	Bangladesh	human	A4	a1	+	-	+	+
AP-18000	O1:K25	2000	Bangladesh	human	A4	a1	+	-	+	+
AP-18296	O1:K25	2000	Bangladesh	human	A14	a1	+	-	+	+
AP-11243-1	O1:K26	2000	Bangladesh	human	A12	a1	+	-	+	+
KE10471	O4:K6	1997	Japan	human	E	e	+	-	-	-
KE10460	O3:K56	1998	Japan	human	I	c3	-	-	-	-
KE10538	O4:K8	1999	Thailand	human	H	c2	+	-	-	-
KE10540	O3:K46	1999	Thailand	human	C1	d1	+	+	-	-
KE10541	O8:K41	1999	Thailand	human	D	d4	+	-	-	-
KE10542	O3:K48	1999	Thailand	human	C2	d2	-	-	-	-
KE10579	O1:K1	2000	Japan	sea water	F	b	+	+	-	-

表2 RDA法により検出されたNIID K7株に特異的なDNA断片のシーケンス解析結果

Fragment name	Sequence size(bp)	Protein with similarity (Vibrio parahaemolyticus strain RIMD 2210633)	% Nucleotide identity	Location <sup>a</sup>	Position <sup>b</sup>
1	433	VP2905 <sup>c</sup> , hypothetical protein	99 (432/433)	chromosome 1	3091310th~3091742nd
2	213	VPA1367 <sup>c</sup> , putative type III secretion system lipoprotein precursor EprK	99 (212/213)	chromosome 2	1437231st~1437443rd
3	188	VPA1370 <sup>c</sup> , hypothetical protein	99 (187/188)	chromosome 2	14439871st~1440058th

VP2905 および、3 を含む VPA1370 は hypothetical protein と機能が判明していなかった (表 2)。

## 2. 上記 DNA 断片の新興型株に対する特異性

1. で検出した 3 遺伝子よりプライマーを設計し、新興型株 6 株、非新興型株 6 株を用いて PCR を行ったところ、表 3 のようになった。VP2905 のみが新興型 6 株すべてが陽性を示し、非新興型株 6 株すべてが陰性であった。VPA1367 および VPA1371 は新興型株 6 株に加え *tdh* のみを保有する非新興型株が陽性を示した。VPA1367 と VPA1371 は近傍な位置にあり、ともに腸炎ビブリオの pathogenicity island を構成する遺伝子であり、この中には *tdh* 遺伝子も含まれていることが分かっている [Lancet (2003) Vol.361,p743-749.]。以上から、Driver 株は *tdh* を保有していないため、このような pathogenicity island 内の遺伝子が検出されたと考えられる。

VP2905 についてさらに株数を増やし、総計 153 株 (新興型株 55 株、非新興型株 98 株) を用いて、その特異性を検討したところ、非新興型株はすべて陰性を示し、新興型株については 1 株 (KIH 03-57;O4:K68,2003 年分離) を除いてすべて陽性を示した (表 4)。

## 3. VP2905 遺伝子に関して

VP2905 は Williams ら [J.Clin.Microbiol. (2004)Vol.42,p.1657-1665.] により報告された新興型株に特異的な 16-kb の挿入配列を構成する遺伝子の 1 つであり、またこの配列はヒストン様タンパク HU- $\alpha$  の ORF (VP2911) の 3' 末端に挿入している (図 5)。

この挿入配列は VP2900~VP2910 の 11 の遺伝子で構成されており、このほとんどが hypothetical protein と機能が未知であり、VP2903 のみが putative phage protein をエンコードしていることが明らかになっている (図 5)。さらに、挿入前後に重複した配列 (ttcttcag) が存在する事 (図 5)、および 16-kb の配列の GC 含量が 38% と全ゲノムの平均の 45% より低い事からこの挿入配列がファージ等の外来に由来することが示唆された。

また、この挿入により HU- $\alpha$  の構成アミノ酸の N 末端に付加および変異が起こっている事も分かっている (図 6)。

以上からこの挿入配列内の機能未知遺伝子あるいは挿入による HU- $\alpha$  の変異が新興型腸炎ビブリオの流行要因に関与していると考えられた。

前述した新興型株にも関わらず、VP2901 遺伝子を標的とした PCR で陰性を示した株 (KIH03-57) について、図 7 のようにプライマーを設計し、PCR によりこの株が挿入配列すべてを欠失しているのかを確認した結果、すべてを欠失している事が明らかになった。

そこで今後はこの株を利用し、本研究でサブトラクションにより得られた 16-kb 挿入配列および HU- $\alpha$  への影響が新興型株の流行要因にどのように関与しているのかを明らかにしていく予定である。

表3 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	VP2905a (1)	VPA1367a (2)	VPA1371a (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	+	+	-	-	-	-

<sup>a</sup> GenBank accession no.BA000031,BA00003に基づく

表4 VP2905を標的としたPCR結果

Strain grouping	Serovars included	No. of strains tested	No. of strains with positive PCR result
Pandemic group	O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:K26, O1:KUT	55	54
Non-pandemic group	O1:K1, O1:K2, O1:K12, O1:K32, O1:K56, O1:KUT, O2:K3, O2:K28, O2:KUT, O3:K4, O3:K5, O3:K6, O3:K7, O3:K20, O3:K29, O3:K46, O3:K48, O3:K56, O3:K57, O4:K4, O4:K5, O4:K8, O4:K9, O4:K10, O4:K11, O4:K34, O4:K44, O5:K17, O5:KUT, O6:K18, O6:K38, O6:K46, O7:K19, O8:K20, O8:K41, O9:K23, O10:K9, O10:K19, O10:K24, O10:KUT, O11:K11, O11:K40, O11:KUT, O12:K40, O13:K65, O13:K72	98	None



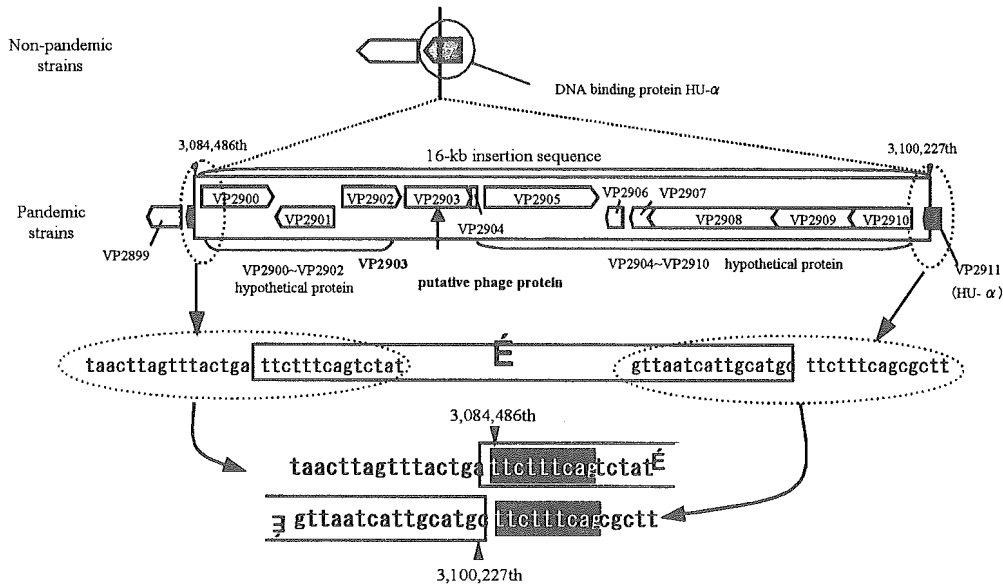


図5 16-kb挿入配列の構造遺伝子および、挿入部位の塩基配列

▶ は *V. parahaemolyticus* RIMD2210633株の全ゲノム配列 (GenBank accession no.BA000031) に基づく位置を表す

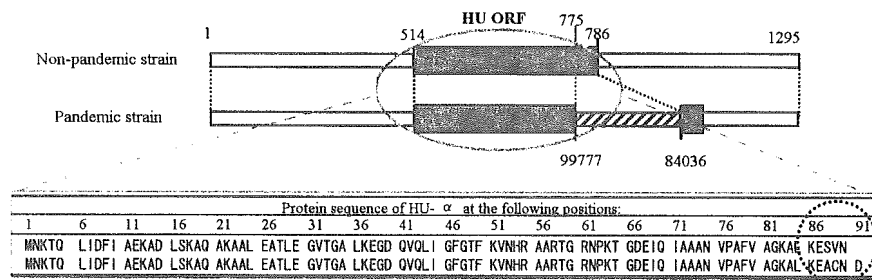


図6 挿入配列によるHU-αアミノ酸配列への影響

図はWilliamsら [J.Clin.Microbiol. (2004)Vol.42,p.1657-1665.] のFig. 3およびTABLE 3.を参照にした。

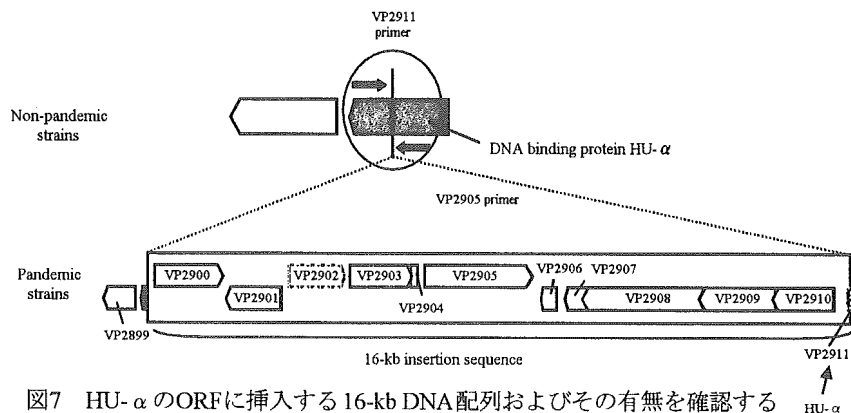
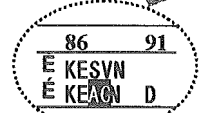


図7 HU-αのORFに挿入する16-kb DNA配列およびその有無を確認するPCR用プライマーの位置

◁ はMakinoら [Lancet (2003) Vol.361,p743-749.] が決定した *V. parahaemolyticus* RIMD2210633株の全ゲノム配列に基づくaccession no.を表している。

#### D. 結論

ゲノムサブトラクション法により、新興型腸炎ビブリオに特異的な DNA 断片が 1 つ得られた。この断片は新興型株に特異的な 16-kb の挿入配列を構成する遺伝子の 1 つである VP2901 遺伝子の一部であり、この配列はヒストン様 DNA 結合タンパク HU- $\alpha$  の ORF の 3' 末端に挿入している。挿入配列内の遺伝子のほとんどが機能未知である事、そして挿入により HU- $\alpha$  のアミノ酸配列に変異が起こっている事から、この挿入配列内の遺伝子あるいは挿入による HU- $\alpha$  への影響が新興型腸炎ビブリオの流行要因に関与していると考えられた。

#### 参考文献

- 1) Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. Genotypic Analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and Development of a Pandemic Group-Specific Multiplex PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4676-4682, 2003.
- 2) Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Pandemic Group-Specific DNA Sequence by Genomic Subtraction. J. Clin. Microbiol. 43: 3533-3536, 2005.

研究課題名:

「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

分担研究報告書

「コレラ菌の多様性、新しい疫学マーカーの開発研究」

分担研究者:山崎伸二

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 感染症制御学講座

研究要旨 感染源や感染経路を特定する為の手段として分子疫学的解析法が大きな威力を発揮している。中でも、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)が、その再現性と識別度の高さのため分子疫学的解析法のゴールドスタンダードとして用いられている。しかしながら、PFGE にもいくつかの問題点があり、より簡便で迅速な分子疫学的解析法の開発も求められている。本研究では、コレラ菌の新しい疫学マーカーを見つけ出すことを目的として、コレラ菌のスーパーインテグロン(SI)に着目し、その多様性を解析した。その結果、SIに存在するインテグラーゼ遺伝子は、血清型を問わず調べた全てのコレラ菌に存在し、コレラ菌の SI には、菌株間でかなり多様性があることを見いだした。

#### A. 研究目的

アジアやアフリカにおいては多数の散发事例や集団事例が発生している。我が国においても、海外渡航者のみならず海外渡航歴のない人からもコレラが発生し、その対策が求められている。菌の分子疫学的解析法として PFGE が繁用されているが、いくつかの問題点があり、PFGE の問題点を克服できる新たな分子疫学的解析法が開発が望まれている。本研究では、コレラ菌の新しい疫学マーカーを見つけ出し、新たな分子疫学的解析法を開発を目的として、コレラ菌のスーパーインテグロン(SI)に着目し、解析した。

#### B. 研究方法

インドの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重症下痢症患者から分離した O1 コレラ菌 44 株、O139 コレラ菌 45 株、non-O1, non-O139 コレラ菌 44 株について、インテグラーゼ 4 (*intI4*) 遺伝子をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションにより SI の存在を確認した。また、SI の多様性の解析は 1948 年から 2000 年までにインド、バンラデシュ、オーストラリアの患者及び環境から分離したエルトル型 O1 コレラ菌 5 株 (VC2, CRC148, AI091, AL30457, GP156)、古典型 O1 コレラ菌 5 株(569B,

CL504, CL614, L362, C19385)、O139 コレラ菌 2 株 (VC406, AP32549)、non-O1, non-139 コレラ菌 4 株 (SG6, CRC24, SCE4, X79)を用いた。また、陽性コントロールとして、全ゲノム配列が明らかとされているエルトール型 O1 コレラ菌 N16961 株を用いた。約 126 kb の SI 領域の 5' 末端側、すなわち *IntI4* をコードした領域から約 6kb の領域を 5 つの領域に分けて増幅できる PCR プライマーを、N16961 株の塩基配列を基に設計した。また、126 kb を 11 個の領域に分けて増幅できる PCR プライマーも N16961 株の塩基配列を基に設計し、Long accurate PCR (LA-PCR)を用いて PCR Scanning を行った。得られた PCR 産物の一部について塩基配列を解析した。

## C. 研究結果と考察

### 1. SI のコレラ菌における分布

SI のコレラ菌における分布を調べたところ、分離年、血清型にかかわらず調べた 133 株全てで陽性となった。このことから、SI を標的としたコレラ菌の分子疫学的解析法の開発が可能であると考えられた。

### 2. コレラ菌 SI の多様性の解析

*intI4* から約 1.5 kb、2.7 kb、4.7 kb、*intI4* から約 4 kb 離れた領域から 1.5 kb、2 kb をそれぞれ増幅する PCR プライマーで増幅した。1.5 kb に関しては N16961 株のみ予想される大きさの断片が増幅されたが、その他の株では増幅断片は得られなかった。2.7 kb と 4.7 kb については、VC2 で同じサイズのものが増幅されたが、塩

基配列の解析から *intI4* から 2 つ目までの ORF が異なっていることがわかった。CRC148, AI09, AL30457, CL614, VC406, AP32549 では、それぞれ 1.4 kb と 3.3 kb の断片が増幅されたが、それ以外の菌株では増幅断片は得られなかった。さらに、1.5 kb と 2 kb については、VC2, CRC148, AI091, AL30457, CL614, VC406, AP32549 で、N16961 株と同じ 1.5 kb 及び 2 kb の断片が増幅された。しかし、その他の株では、全く増幅断片が得られなかった。一方、Table に示したように、126 kb を 11 箇所の領域に分けた場合、N16961 株と全てにおいて同じ増幅産物が得られた株はなかった。エルトール型 O1 コレラ菌は GP156 を除き、お互い比較的良好似た PCR Scanning パターンが得られた。ただ、AL30457 では、Region 4 で増幅断片が得られず、CRC148 では、Region 9 で 10.6 kb の代わりに 9.8 kb の増幅断片が得られ、AI091 では、Region 11 で、9.2 kb の代わりに 25.2 kb の大きな断片が得られた。GP156 は、他のエルトール型 O1 コレラ菌とはあまり類似していないが、むしろ N16961 株と局所的に類似していた。例えば、Region 5 と Region 7 では、N16961 株と同じ大きさの増幅産物が得られた。しかし Region 2, Region 3 及び Region 6 では増幅断片が得られなかった。Region 9 と Region 11 では、7.9 kb と 9 kb と N16961 株より短い増幅断片が得られた。GP156 を除く残りの 4 株では、Region 5 から 7 では全く増幅断片が得られなかった。後に示したように、Region 5 に存在す