

炎由来株は B2_7-4 (*papG II +tia*)が、前立腺炎由来株では B2_7-1(*papG III + cnfl + hly + sfaS + ibeA*)が優性であった。サンプリングバイアスが存在している可能性は否定出来ないことから、新生児髄膜炎由来菌株と同様に菌株の収集をして比較する必要がある。

表 6 由来別ExPECのB2_7内の多様性

	C		NM		P		Z	
n=	30		4		17		12	
B2_7-1	6	20%	1	25%	4	24%	8	67%
B2_7-2	3	10%	0	0%	0	0%	1	8%
B2_7-3	5	17%	3	75%	0	0%	0	0%
B2_7-4	13	43%	0	0%	13	76%	3	25%
UT	3	10%	0	0%	0	0%	0	0%

本年度において、ExPEC の多様性についての解析手法を確立し、さらに多様な菌株の収集と解析を行った。なかでも、病原遺伝子保有の多様性をExPEC菌株の系統関係を基盤として俯瞰することに成功した。ここで得られた情報は、K1 抗原合成遺伝子および Pathogenicity Island の構成遺伝子の塩基配列の多様性・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。現在、国内外からさらに多様な ExPEC 菌株を収集し疫学解析のための情報基盤の構築を目指す。

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

分担研究者 森田昌知 国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 研究員

研究協力者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長

研究要旨

腸チフス・パラチフスはチフス菌・パラチフス A 菌によって起こる局所の腸管病変と菌血症による全身性疾患を特徴とする感染症であり、そのほとんどは海外からの輸入事例である。本研究では、チフス菌・パラチフス A 菌における耐性菌の侵入を監視するため、日本国内で分離された全ての分離株の各種薬剤に対する感受性試験を行った。その結果、ニューキノロン剤に耐性を示すチフス菌が 2 株存在した。ファージ型は UVS4 型に分類され、感染した患者の渡航先は共にインドであった。キノロン耐性決定領域の遺伝子配列を決定したところ、共に DNA ジャイレース GyrA サブユニットに S83F 及び D87N、トポイソメラーゼ IV ParC サブユニットに S80I の変異が確認された。

A. 研究目的

腸チフス・パラチフスはチフス菌・パラチフス A 菌によって起こる局所の腸管病変と細網内皮系での菌の増殖による菌血症を特徴とする感染症であり、日本を除く東アジア、東南アジア、インド亜大陸、中東、東欧、中南米、アフリカなどで現在も流行を繰り返している。日本においてはほとんどが海外からの輸入事例として報告されているが、近年、ニューキノロン低感受性菌が増加し治療上の問題となっている。また海外の一部の地域ではすでにニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の発生が確認されており、日本国内に入ってくるのは時間の問題である。そこで本研究では、これまで日本国内に存在しないこれらの耐性菌の侵入を監視するため、日本国内で分離された全ての分離株の薬剤感受性試験を行うとともに、ファージ型別による疫学的解析を行った。

B. 研究方法

2006 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、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 20 薬剤について、E-test を用いて CLSI 法に従って行った。薬剤は、アンピシリン、セファロチン、セフトキシム、セフトリアキソン、イミペネム、アズトレオナム、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、アジスロマイシン、テトラサイクリン、ホスホマイシン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、ノフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、スパルフロキサシン、レボフロキサシン、ST 合剤の 20 薬剤である。ファージ型別は従来の方法に従って行った。

C. 研究結果と考察

2006 年中に日本国内で分離されたチフス菌 54 株（うち輸入例 44 株）、パラチフス A 菌 16 株（うち輸入例 15 株）を用いて薬剤感受性試験を行った結果、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 16 株分離された。これらは、インド、パキスタン、ネパール等への渡航者からの分

離株であり、フェージ型はE1型がもっとも多くみられ、次いで多かったのがE9型であった。チフス菌・パラチフスA菌ともに、第3世代セフェム系抗菌薬に対する耐性菌は検出されなかった。

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)の割合はチフス菌で59.3%、パラチフスA菌で81.3%であった。ナリジクス酸耐性チフス菌は、インド、パキスタン、ネパール、ペルー等への渡航者から分離された。またナリジクス酸耐性パラチフスA菌は、インド、バングラデシュ、中国等への渡航者から分離された。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見られなかったものの、ナリジクス酸耐性菌の中でニューキノロン剤に耐性を示すチフス菌が2株(060042Ty, 060044Ty)存在した。それら2株のフェージ型はUVS4型に分類され、感染した患者2人の渡航先は共にインドであった。XbaI消化によるパルスフィールドゲル電気泳動による分子疫学的解析の結果、この2株は極めて類似した特有の泳動パターンを示した(図1)。キノロン耐性決定領域の遺伝子配列を決定したところ、DNA ジャイレースGyrAサブユニット遺伝子(*gyrA*)の249番目のシトシンがチミンに、260番目のグアニンがアデニンに変異していた。またトポイソメラーゼIV ParCサブユニット遺伝子(*parC*)においても239番目のグアニンがチミンに変異していた。これらの変異は2株に共通であった。この結果、DNA ジャイレースGyrAサブユニットではS83F及びD87N、トポイソメラーゼIV ParCサブユニッ

トではS80Iのアミノ酸変異が起き、ニューキノロン剤に対する耐性を獲得したと考えられる(図2)。

D. 結論

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、2006年は分離株の80%以上がニューキノロン低感受性菌であった。さらに本年、2株のニューキノロン耐性チフス菌が分離された。今後も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。さらに得られた薬剤感受性試験、フェージ型別試験の結果、渡航先等の情報を整理し、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することで、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。

参考文献

M. Morita, K. Ito, K. Hirose, H. Takahashi, K. Shimuta, J. Terajima, M. Ohnishi, M. Harada, M. Matsuzaki, H. Watanabe, and H. Izumiya. Development of a real-time PCR assay for detection of *gyrA* mutations associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A. *Microbiol. Immunol.* (2006) 50: 707-711.

表. 2006 年に分離されたチブラス菌・パラチブラス A 菌の薬剤感受性試験の結果

Drug (breakpoint [$\mu\text{g/mL}$])	MIC [$\mu\text{g/mL}$] for <i>S. Typhi</i>			MIC [$\mu\text{g/mL}$] for <i>S. Paratyphi A</i>		
	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicillin (≥ 32)	0.5 - >256	2	>256	4 - 8	4	4
Cefalotin (≥ 32)	1 - 32	4	16	4 - 8	8	8
Cefotaxime (≥ 64)	0.125 - 0.5	0.25	0.5	0.25 - 0.5	0.5	0.5
Ceftriaxone (≥ 64)	0.125 - 0.5	0.25	0.25	0.125 - 0.25	0.25	0.25
Imipenem (≥ 16)	0.25 - 0.5	0.25	0.5	0.25 - 1	0.5	0.5
Aztreonam (≥ 32)	<0.016 - 0.25	0.125	0.25	0.125 - 0.25	0.125	0.25
Streptomycin (NA*)	8 - >1024	32	>1024	16 - 32	32	32
Kanamycin (≥ 64)	2 - 8	4	4	2 - 4	2	4
Gentamicin (≥ 16)	0.25 - 1	0.5	0.5	0.25 - 0.5	0.5	0.5
Azithromycin (NA*)	4 - 32	8	16	16 - 32	16	32
Tetracycline (≥ 16)	8 - >256	4	>256	4 - 8	8	8
Fosfomycin (≥ 256)	8 - >1024	16	32	128 - >1024	512	>1024
Chloramphenicol (≥ 32)	2 - >256	8	>256	8 - 16	8	16
Nalidixic acid (≥ 32)	4 - >256	>256	>256	8 - >256	>256	>256
Norfloxacin (≥ 16)	0.125 - 128	2	4	0.25 - 4	4	4
Ofloxacin (≥ 8)	0.064 - 32	1	1	0.25 - 4	4	4
Ciprofloxacin (≥ 4)	0.016 - >32	0.5	0.5	0.032 - 1	1	1
Sparfloxacin (NA*)	<0.016 - 16	0.25	0.5	0.064 - 1	1	1
Levofloxacin (≥ 8)	0.016 - 16	0.5	0.5	0.25 - 2	1	2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (NA*)	0.064 - >32	0.125	>32	0.25 - 2	0.5	1

*: The interpretive breakpoint for *Enterobacteriaceae* is not available in the CLSI breakpoints.

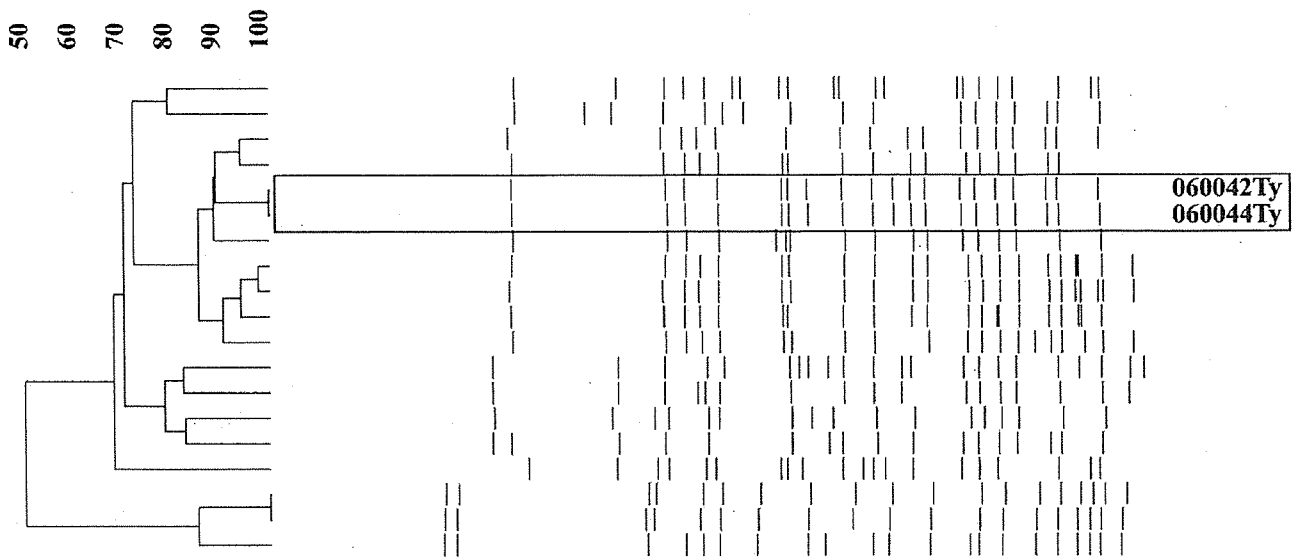


図 1. パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別

*gyrA*変異

		249		260
		atccccacggcgcgattccgcagtgatatgaca		
Ty060042	T	A
Ty060044	T	A
		S83F		D87N

*parC*変異

		239
		catggcgacagcgcctgctatgaagccatg
Ty060042	T
Ty060044	T
		S80I

図 2. キノロン耐性決定領域における変異

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 大倉正稔

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) 新興型腸炎ビブリオの血清型に關与する遺伝子解析：アジアを中心に世界的に流行している新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) の流行の要因については依然として明らかになっていない。我々は新興型腸炎ビブリオが 03:K6 血清型株を起源とし、次々と新しい血清型株が出現していることに注目し、この変換が流行の要因の一つとなりうるのではないかと考え、新興型腸炎ビブリオの O および K 抗原の合成に關わる遺伝子群に着目した。本研究では、まず 03:K6 株から最初に分岐したとされる 04:K68 株の O 抗原合成に關わると推定される遺伝子群の塩基配列を決定し、03:K6 株と比較を行なった。その結果、04:K68 株の推定 O 抗原合成遺伝子群は 03:K6 株のそれとは全く異なっており、03:K6 株の O3 の合成に關わる領域に 04 血清型株群のいずれかの O4 の合成に關わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型が変換したと考えられた。

研究 2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 に特異的な遺伝子マーカーの検索：疫学解析法の一つである Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) の修正型を用いて腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 とその他の血清型大腸菌のパターンを比較した。その結果、0157 に特異的な DNA 断片が認められたため、この DNA 断片のシークエンスの決定を行い、EHEC 0157 の疫学的な指標となりうるマーカーを標的とした同定 PCR 法を開発した。

研究 1) 新興型腸炎ビブリオの血清型に關与する遺伝子解析

A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒において、1996 年以降アジアを中心に同一のクローンを起源とすると考えられる菌株群による事例が世界的に頻発しており、これらの株は新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) と総称されている。しか

しながら、その流行の要因については依然として解明されていない。我々は新興型腸炎ビブリオが 03:K6 血清型株を起源とし、次々と新しい血清型株が出現していることに注目し、血清型の変換が「抗原性を変化させる事による宿主の免疫系回避」あるいは「ファージによる感染の回避等、環境中における生存優位」に寄与しており、この変換を本菌が戦略的に

行なっているのであれば流行の要因の一つとなりうるのではないかと考えた。そこで、新興型腸炎ビブリオの O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群に着目し、この血清型変換のメカニズムの有無を明らかにするべく、まずゲノムが決定されている O3:K6 株の情報より O 抗原合成遺伝子群を推定し、O3:K6 株から分岐したとされる O4:K68 株や O1:K25, O1:KUT 株の O 抗原合成遺伝子領域との比較を PCR-RFLP 解析、および塩基配列に基づく解析により行なった。

B. 研究方法

1) 供試菌株: TABLE 1 に示す新興型腸炎ビブリオ 12 株 (O3:K6 4 株、O4:K68 4 株、O1:K25 2 株、O1:K26、O1:KUT 1 株)、および非新興型腸炎ビブリオ 14 株 (O3:K6 3 株、O3:K4、O3:K5、O3:K24、O3:K46 1 株、O4:K4、O4:K5、O4:K8、O4:K8 1 株、O1:K1、O1:K25、O1:K56 1 株) の計 26 株を使用した。

2) 新興型 O3:K6 株における O 抗原合成遺伝子群の推定: 一般的な腸内細菌の lipopolysaccharide (LPS) は Ripid A, core oligosaccharide (core OS), O 側鎖より構成されているが腸炎ビブリオの LPS 構造は O 側鎖を持たないため、core OS が O 抗原として認識されていることがこれまでに報告されている [FEMS microbiology Letters (1995) Vol. 130 p. 287-292.]。

腸炎ビブリオの O 抗原の合成に関与する遺伝子群についてはこれまでに報告がないが、*Vibrio cholerae* O1 El Tor 株の core OS の合成に関わる遺伝子群については明らかになっており、ゲノム配列が既知の *V. cholerae* O1

El Tor N16961 株における VC0223~VC0240 遺伝子群がその領域に相当している [Infect. Immun. (2002) Vol. 70, p. 2419-2433.]。そこで、BLAST による相同性解析を行ない、ゲノム配列が決定されている *V. parahaemolyticus* O3:K6 RIMD2210633 における O 抗原合成遺伝子群を推定した。

3) PCR-RFLP 解析: TABLE 2 に示したプライマーを用いた PCR により保存されている領域を推定し、VP0195-VP0214 間を増幅するようプライマーを設計した。LA-Taq (takara) を用いた PCR により増幅後、制限酵素 *Hind* III および *Eco*RI により切断し、そのパターンを比較した。

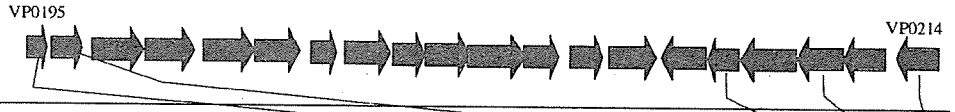
4) シークエンス解析: 新興型 O4:K68 株 NIID 242-200 の上記 LA-PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) を用いて精製し、Primer-walking により決定した。シークエンス反応は BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, .) を用いた。各 ORF は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の ORF finder および BlastX プログラムにより同定・解析した。

5) PCR によるスキヤニング: 4) で決定した配列を基にプライマーを設計し (TABLE 2)、PCR を行ない各血清型株間の分布を調べた。

C. 結果および考察

V. cholerae O1 El Tor N16961 株の core OS 合成に関わる遺伝子群 VC0223~VC0240 との相同性解析の結果、新興型 O3:K6 RIMD2210633 株において VC0224 が VP0193、VC0225 が VP0194、

TABLE 1 使用した菌株



No.	Strain	O:K serovar	Year of isolation	Country of isolation	Source	PCR results of								
						<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/ne</i> <i>w</i>	<i>orf8</i>	VP-2905	VP-0195	VP-0196	VP-0210	VP-0212
1	AN-16000	O1:KUT	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
2	AO-24491	O1:K25	1999	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
3	AP-18090	O1:K25	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
4	AP-11243-1	O1:K26	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
5	KE10579	O1:K1	2060	Japan	sea water	+	+	-	-	-	-	-	+	+
6	NIID K25	O1:K25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	DMST17875	O1:K56	2003	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	+	+
8	NIID K4	O3:K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	KIH 03-59	O3:K5	2003	Japan	food	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10	KE10484	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+
11	NIID K7	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12	NIID59-99	O3:K6	1999	Thailand	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+
13	AP-9251	O3:K6	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	KE9967	O3:K6	1981	Japan	human	+	-	-	-	-	+	+	+	+
15	KE9984	O3:K6	1981	Japan	human	-	+	-	-	-	+	+	+	+
16	KE10465	O3:K6	1985	Japan	human	-	-	+	-	-	+	+	+	+
17	NIID K29	O3:K24	2002	human	human	+	-	-	-	-	+	+	+	+
18	KE10540	O3:K46	1999	Thailand	human	+	+	-	-	-	+	+	+	+
19	NIID 181-99	O4:K68	1999	Thailand	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
20	NIID242-200	O4:K68	2000	Korea	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
21	KIH 03-57	O4:K68	2003	Japan	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
22	DMST17875	O4:K68	2003	Thailand	human	+	-	+	+	+	-	-	+	+
23	KIH VP19	O4:K4	-	-	human	-	+	-	-	-	-	-	+	+
24	KIH VP25	O4:K5	-	-	food	-	-	-	-	-	-	-	+	+
25	KE10538	O4:K8	1999	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	+	+
26	DMST17873	O4:K9	2003	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	+	+

太字の株は新興型腸炎ビブリオ

VC0227がVP0196、VC0233がVP0211、VC0236がVP0212、VC0240がVP0214とそれぞれ相同性がみられた。この結果に加え、周辺の遺伝子に関するゲノム配列の情報から腸炎ビブリオ O3:K6 株の O 抗原合成遺伝子群を VP0190-VP0214と推定した (TABLE 3)。また、大阪大学微生物研究所による DNA マイクロアレイを用いた腸炎ビブリオゲノムの比較解析により O3:K6 血清型株以外の新興型株において VP0197-VP0209 間および VP0219-VP0238 間の領域の相同性が低かった事が報告されている (第78回日本総会)。これらの報告および PCR による確認 (TABLE 1) から VP0195 と VP0214 遺伝子が保存されていると考え、VP0195-VP0214 間で PCR-RFLP を行なった。その結果、新興型株、非新興型株に関わりなく、

PCR 産物の大きさはおおよそ 20-kb 弱で、同じ O 抗原の株は類似したパターンを示し、他の O 抗原の株とは異なっていた (Fig. 1)。

以上から、これらの遺伝子群が O 抗原の合成に関与していると考えられた。つづいて、O3:K6 株から初めに分岐したとされる O4:K68 株の推定 O 抗原合成遺伝子群の配列を決定したところ、O3:K6 株の VP0197 に相当する配列から全く異なっており、その下流を構成する ORF の半数近くが、現在ゲノム配列解析中の *Vibrio alginolyticus* 12G01 株と相同性が高かった (Table 4, Fig. 2)。腸炎ビブリオの O 抗原合成に関わる遺伝子に関してはほとんど明らかになっていないため、他の O4 血清型株を中心に決定した ORF の分布を調べた結果、ORF 6 を除きほぼ保存されていると考えられ

TABLE 2 プライマーの配列

primer	Locus	sequence(5'-3')	reference
VP-D5	<i>tdh</i>	GGTACTAAATGGCTGACATC	Mol. Cell. Probe.(1992)Vol.6, p.477 - 487.
VP-D3		CCACTACCACTCTCATATGC	
VP-R2	<i>trh</i>	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	Mol. Cell. Probe.(1992)Vol.6, p.477 - 487.
VP-R6		CATTTCGGCTCTCATATGC	
GS-VP1	<i>toxRS/new</i>	TAATGAGGTAGAAACA	J. Clin. Microbiol.(2000) Vol.38, p.578 - 585.
GS-VP2		ACGTAACGGCCCTACA	
VP-ORF85	<i>orf8</i>	GTTCCGATACAGTTGAGG	Emerg. Infect. Dis.(2001) Vol.7, p.477 - 478.
VP-ORF8A		AAGTACAGCAGGAGTGAG	
F2-1-F	VP2905	GGCTGCTATAACATTGAGCAC	J. Clin. Microbiol.(2005) Vol.43, p.3533 - 3536.
F2-1-R		GAGGACTTGTGAAATCCCATG	
VP0195-F	VP0195	GAATCTGGAAAGCCAGGCAA	in this study
VP0195-R		TAGCGACTGGCCAAGATGTA	
VP0196-F	VP0196	GTTTTCAAGTTGGGAGCAAAC	in this study
VP0196-R		ICTAAGCACQAJAAGCGTICAG	
VP0210-F	VP0210	AAAAGAATCCGTCGAGCGTC	in this study
VP0210-R		GTCCTGTGGCCATTTCGTTA	
VP0212-F	VP0212	GCATGGGTTGGTGATATGGTGATGC	in this study
VP0212-R		ATGAACTAGTCGCAATGGCTTCGAGC	
VP0214-F	VP0214	TCATCGTAACCTGGTGGCTGGCAT	in this study
VP0214-R		TCAGCAACACCTTCAGCTACCGTTTTG	
VP0195-F2	VP0195-214	GGCTATACATCTTGCCAGTCGCTACCTA	in this study
VP0214-R2		GTGTTTCTGGCATCTTCAACTGCGGT	
ORF1-F	04K68ORF1	GAATCTGGAAAGCCAGGCAA	in this study
ORF1-R		TAGCGACTGGCCAAGATGTA	
ORF1-F2	04K68ORF1-3	CAGGGATTAAGCCGCT	in this study
ORF3-R		TTCACGACGCTATCTTGGGT	
ORF3-F	04K68ORF3	AATACTAGTAACAGGCGG	in this study
ORF3-R2		GTTGACTGGTTTGTCTGCTT	
ORF3-F2	04K68ORF3-4	GAGTCTTATGAATCTTTG	in this study
ORF4-R		CTCAAGAGATAGCGCCAT	
ORF4-F	04K68ORF4-5	AGTGAAAGATCTGAGCG	in this study
ORF5-R		CTGAAAAGATATTAGCGG	
ORF4-F2	04K68ORF4-6	CGAGGTGAGCTGGAATTT	in this study
ORF6-R		GGGCTGCGTAACGTGTTTTT	
ORF5-F	04K68ORF5-7	CACAAAGCGGTTTAGCGAGA	in this study
ORF7-R		CCAAACGACTGTTCAAACC	
ORF5-F2	04K68ORF5-8	CACAAAGCGGTTTAGCGAGA	in this study
ORF8-R		GGCATTCTTACTCTGCGC	
ORF8-F	04K68ORF8-10	ATCAATGCTCAGCGTGAG	in this study
ORF10-R		GCAATAGTCAGCAGTG	
ORF10-F	04K68ORF10-11	AACCGATGAGGTCAAAGG	in this study
ORF11-R		ATGATTCGGCTTATGCGC	
ORF12-F	04K68ORF12-15	GCTAATGAAGCTTGTCCATAC	in this study
ORF15-R		AACTCAGCGAAGCTGAAG	
ORF13-F	04K68ORF13-15	GGTGTGGAGAGTCTAAC	in this study
ORF15-R2		GAATAACAATATTAATGCG	
ORF15-F	04K68ORF15-16	AAACGTGGAATAAGAAA	in this study
ORF16-R		GCCTATTTGGATCCATGC	
ORF16-F	04K68ORF16-17	CTGTCAAAGCGTTCAGGG	in this study
ORF17-R		CGCAATGCGATCAACATC	
ORF16-F2	04K68ORF16-17	CGTGCAGTTAATCTGGT	in this study
ORF17-R2		CGGCGATCAAGAACTATC	
ORF18-F	04K68ORF18	GTGAGGTGGAGCCATAGA	in this study
ORF18-R		ATACTCATCATCGGACCG	
ORF18-F2	04K68ORF18-20	GTTGAACTACCATGACC	in this study
ORF20-R		GTAGCAAATAAGCCTGAAC	
ORF19-F	04K68ORF19-21	GGAGTGAATACAGCTTC	in this study
ORF21-R		GTGTTTCTGGCATCTTCAACTGCGGT	

た。さらなるシーケンスによる解析の結果、他の04血清型株群にはORF 6は存在せず、その位置には *V. alginolyticus*12G01株のEAS75331.1と相同性が高い遺伝子が挿入していた (Fig. 3)。加えて *V. alginolyticus*12G01

株について、実際に腸炎ビブリオ型別用免疫血清0群血清と反応させたところ、04ではなく010に凝集を示した。以上から、03:K6株の03の合成に関わる領域に04血清型株の本研究で使用した株以外の04血清型株に由来する04の

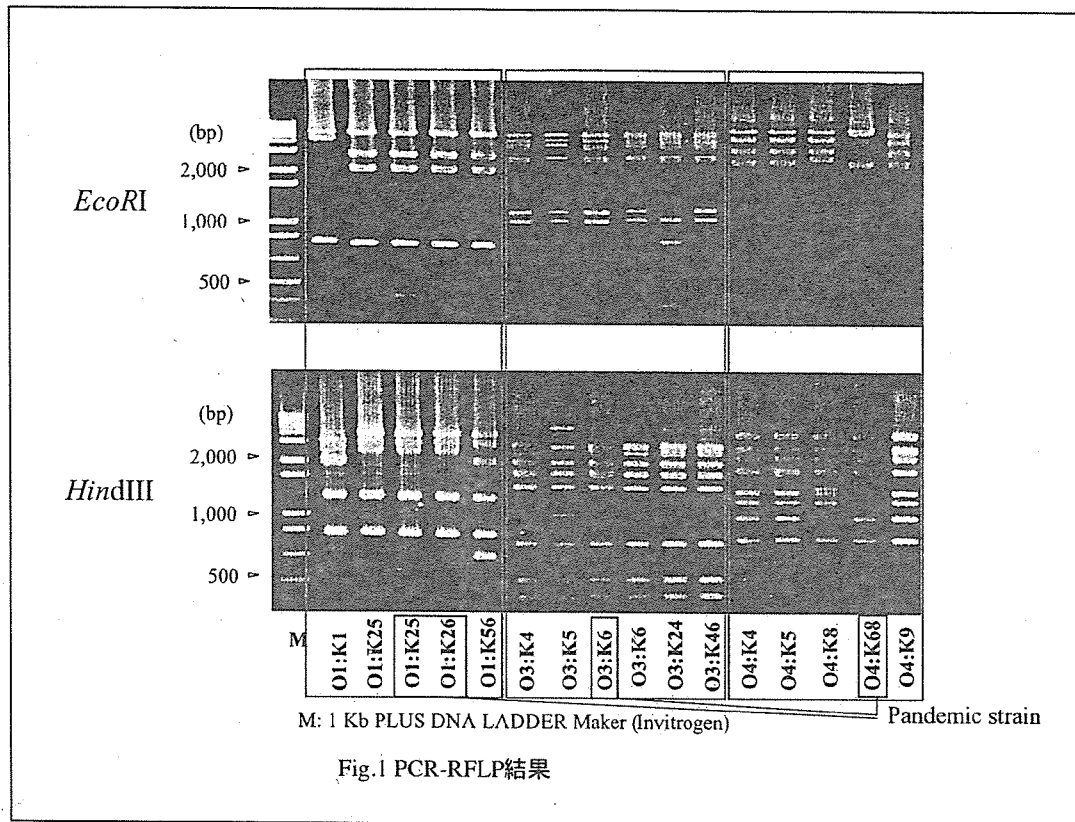
TABLE 3 新興型O3:K6株の推定O抗原合成遺伝子およびその近隣遺伝子

Gene name	Position	Size (bp)	Category	Product
VP0187	198731st~200263rd	1533	Unclassified	putative Dea
VP0188	200333rd~200809th	477	Hypothetical proteins	hypothetical protein
VP0189	200912nd~201721st	810	DNA metabolism	formamidopyrimidine-DNA glycosylase
VP0190	201797th~202300th	504	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	lipopolysaccharide core biosynthesis protein KdtB
VP0191	202267th~203222nd	936	Cell envelope	putative lipopolysaccharide A protein
VP0192	204059th~203271st	789	Cell envelope	hypothetical protein
VP0193	204823rd~204056th	768	Cell envelope	putative lipopolysaccharide biosynthesis glycosyltransferase
VP0194	205914rd~204859th	1056	Cell envelope	putative lipopolysaccharide biosynthesis protein
VP0195	206021st~206428th	408	Fatty acid and phospholipid metabolism	diacylglycerol kinase
VP0196	206439th~207155th	717	Unclassified	conserved hypothetical protein
VP0197	207250th~208440th	1191	Cell envelope	putative capsular polysaccharide biosynthesis protein D
VP0198	208441st~209604th	1164	Cell envelope	putative aminotransferase
VP0199	209621st~210814th	1194	Cell envelope	putative NeuC
VP0200	210822nd~211895th	1074	Cell envelope	putative N-acetylneuraminic acid synthetase
VP0201	211945th~212541st	597	Central intermediary metabolism	putative acetyltransferase
VP0202	212564th~213619th	1056	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	putative sugar-phosphate nucleotide transferase
VP0203	213621st~214340th	720	Cell envelope	putative CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase
VP0204	214325th~215356th	1032	Energy metabolism	putative 3-chlorobenzoate-3,4-dioxygenase dyhydrogenase related protein
VP0205	215353rd~216672nd	1320	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	putative glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
VP0206	216672nd~217487th	816	Unknown function	putative amidohydrolase
VP0207	217516th~218277th	762	Unknown function	putative oxidoreductase (flagellin modification)
VP0208	218339th~219445th	1107	Cell envelope	putative integral membrane protein
VP0209	220507th~219479th	1029	Energy metabolism	putative citrate synthase
VP0210	221223rd~220504th	720	Cell envelope	putative Lex2B
VP0211	222494th~221223rd	1272	Cell envelope	KDO transferase
VP0212	223546th~222488th	1059	Cell envelope	ADP-heptose-LPS heptosyltransferase II
VP0213	224532nd~223543rd	990	Cell envelope	putative lipid A biosynthesis (kdo)2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase
VP0214	225608th~224667th	942	Cell envelope	ADP glyceromanno-heptose 6-epimerase GmhD
VP0215	227947th~225749th	2199	Unclassified	putative OinG protein
VP0216	228711st~227950th	762	Hypothetical proteins	hypothetical protein

推定O抗原合成遺伝子

合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型が変換したと示唆された。また、*V. alginolyticus*と*V. parahaemolyticus*のO抗原を構成する糖類が類似していることはこれまでにも報告されていることから [Microbiol. Immunol. (1981) Vol. 25,

p. 127-36.], *V. alginolyticus*と*V. parahaemolyticus*のO抗原の配列も類似しており、O抗原の変換に*V. alginolyticus*が関与している可能性も示された。O3およびO4の変換が起こり始めているVP0196-0197間およびORF 2-3間の配列を比較したところ、VP0196



およびORF 2の654番目が変換の開始点と考えられた (Fig. 4)。01:KUTおよび01:K25についても変換の開始点付近の配列は相同で、新興型株の血清型変換の共通の開始点であると考えられた。また、VP0214およびORF 21の約50bp下流の-ATTGGAAGGAA-が03:K6株の変異開始点より2bp後にみられた事から、この11塩基を介した約18-kbのDNA配列の変換が示唆された (Fig. 4)。今後は、03:K6以外の新興型株で認められなかったと報告のあったVP0219-0238の領域に関して解析を行なうとともに、これらの遺伝子が抗原合成に関与しているのかの確認および、この変換が新興型株に特異的であるのかの検討していく予定である。

D. 結論

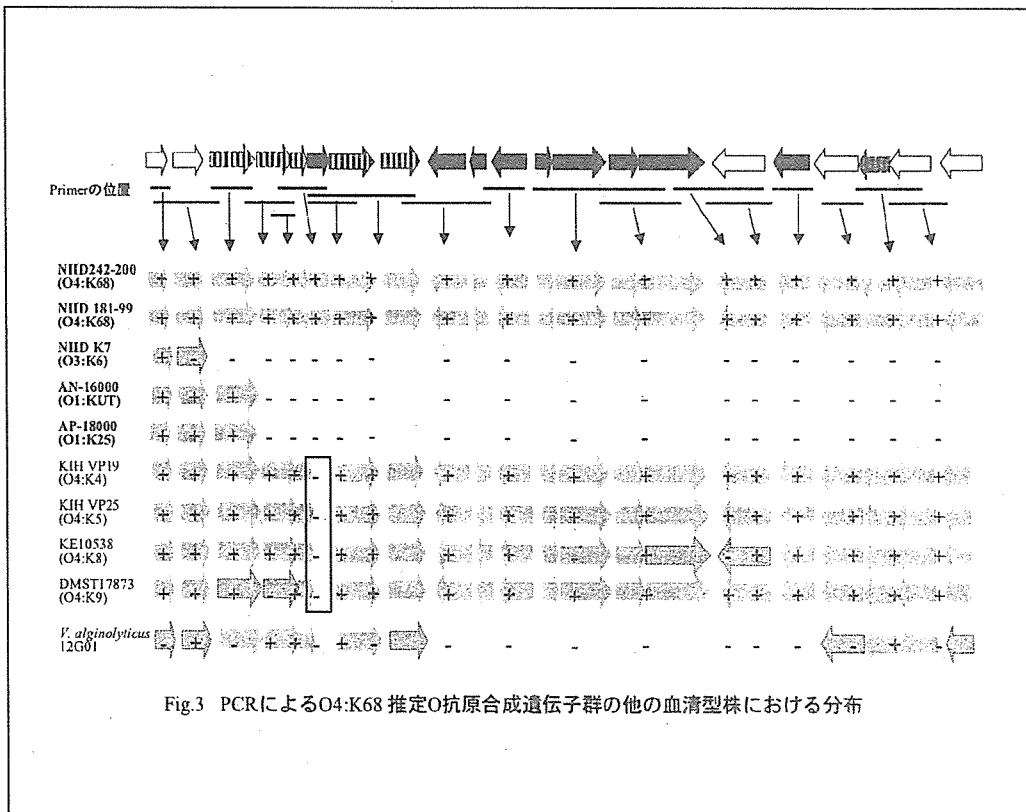
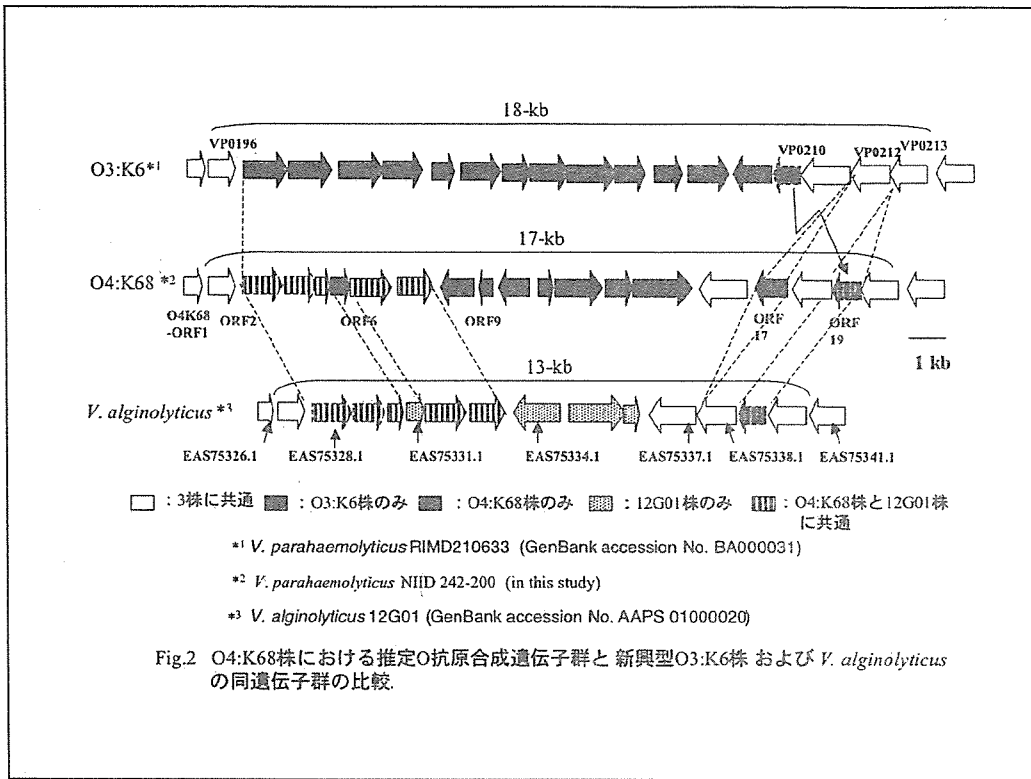
腸炎ビブリオのO抗原合成遺伝子群は各O抗原ごとに別々のクラスターを構成していると考えられた。実際、シーケンス解析により、新興型04:K68株の推定O抗原合成遺伝子群は03:K6株のそれとは全く異なっており、構成ORFの半数近くが *Vibrio alginolyticus* と相同性が高いことが明らかになった。また、PCRによるスキニングの結果、他の04血清型株群にもそのほとんどが保存されていると考えられ、03:K6株の03の合成に関わる領域に04血清型株のいずれかの04の合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型の変換が起こったと考えられた。

TABLE 4 新興型O4:K68株の推定O抗原合成遺伝子およびその産物

ORF	No. of amino acids	Conserved domain(s) ^a	Related sequences ^b	Accession no.	% Identity / positive
1	135	DAGK prokar; diacylglycerol kinase (pfam01219)	VP0195; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11438; <i>Vibrio alginolyticus</i>	BAC58458 EAS75326	99 / 100 91 / 99
2	236	Kdo; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid kinase (pfam06293)	VP0196; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11443; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58459 EAS75327	93 / 94 80 / 87
3	354	RfbB; dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (COG1088), FabG; Dehydrogenase (COG1028)	V12G01 11448; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75328	95 / 98
4	288	RfbA; glucose-1-phosphate-thymidyltransferase (COG1209), NTP transferase; Nucleotidyl transferase (pfam00483)	VP0222; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11453; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58485 EAS75329	73 / 83 96 / 98
5	137	WxcM C; WblP protein (pfam05523)	VP0223; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11458; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58486 EAS75330	71 / 85 91 / 91
6	173	RimL; acetyltransferases (COG1670)	ORF9; <i>Campylobacter jejuni</i>	ABF93223	44 / 59
7	368	DegT DnxJ EryC1; WblQ protein (pfam01041)	V12G01 11468; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75332	96 / 98
8	309	WcaA; glycosyl transferase (COG0463), Glyco transf 2; glycosyl transferase (pfam00535)	V12G01 11473; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75333	87 / 92
9	309	UPF0104; predicted integral membrane protein (pfam03706)	Noe 1947; <i>Nitrosococcus oceanii</i>	ABA58409	27 / 43
10	137	DUF212; Uncharacterized (pfam02681)	V12B01 01067; <i>Vibrio splendidus</i>	EAP95344	64 / 79
11	283	UbiA; prenyltransferase (COG0382)	V12B01 01062; <i>Vibrio splendidus</i>	EAP95343	63 / 78
12	133	No domain	MaquDRAFT 1150; <i>M. aquaeolei</i>	EAC09023	53 / 73
13	427	GlcD; oxidoreductase, FAD-binding (COG0277), FAD binding 4; FAD-binding (pfam01565)	MaquDRAFT 1149; <i>M. aquaeolei</i>	EAC09022	55 / 72
14	245	DIE; oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase (COG0300)	PaerP_01000960; <i>P. aeruginosa</i>	ZP_01296984	50 / 69
15	540	No domain	unknown		
16	426	KdIA; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase (COG1519), Glyco transf N; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase (pfam04413), Glyco transf 1; glycosyl transferases group 1 (pfam00534)	VP0211; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11493; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58474 EAS75337	66 / 80 66 / 80
17	289	Glyco transf 11; alpha-1,2-fucosyltransferase (pfam01531)	BF3688; <i>Bacteroides fragilis</i> WblA; <i>Vibrio cholerae</i>	CAH09369 BAA33632	39 / 61 33 / 49
18	351	RfaA; ADP-heptose-LPS heptosyltransferase II (COG0859), Glyco transf 9; heptosyltransferase (pfam01075)	VP0212; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11498; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58475 EAS75338	87 / 94 86 / 93
19	240	Glyco transf 25; glycosyl transferase, Lex2B (pfam01755)	V12G01 11503; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75339	90 / 94
20	328	Lip A acyltrans; lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase (pfam03279) HtrB; lipid A biosynthesis (kdo)2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase (COG1560)	VP0210; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11508; <i>V. alginolyticus</i> VP0213; <i>V. parahaemolyticus</i>	BAC58473 EAS75340 BAC58476	37 / 58 89 / 97 86 / 96
21	313	WcaG; ADP glyceromanno-heptose 6-epimerase GmhD (COG0451)	V12G01 11513; <i>V. alginolyticus</i> VP0214; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75341 BAC58477	98 / 99 95 / 97

^a Conserved domains were identified by NCBI Conserved Domain Search via BlastP.

^b Deduced amino acid sequence of an entire ORF was used by NCBI ORF finder and BlastP.



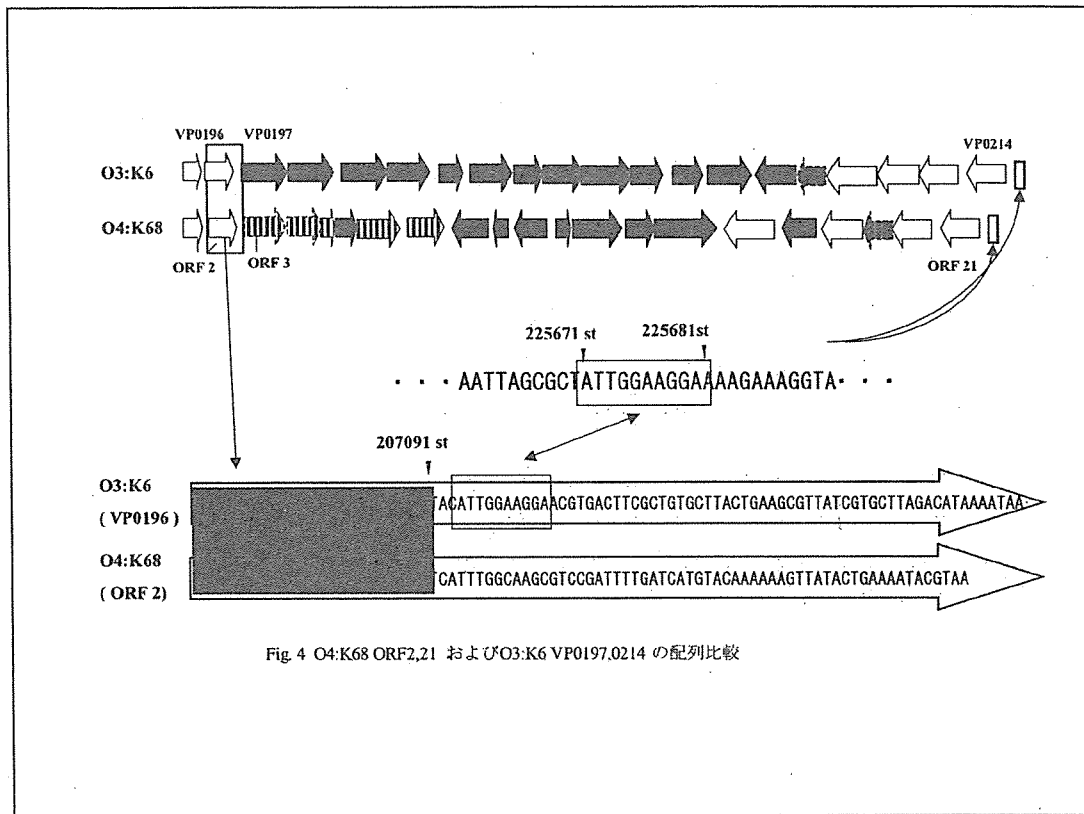


Fig. 4 O4:K68 ORF2,21 およびO3:K6 VP0196,0214 の配列比較

研究 2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 に特異的な遺伝子マーカーの検索

A. 研究課題 2 の研究目的

志賀毒素産生大腸菌 (STEC)、特にそのうち EHEC と呼ばれているグループは、軽い下痢から溶血便や溶血性尿毒症 (HUS) を伴う重篤な症状に至るまで、広範囲な疾患を引き起こす。STEC の産生する志賀毒素 (Stx) は宿主の腎細胞に致死的な障害を引き起こす事から、これらの病状に関わる主な毒素因子として考えられており、大きく 2 つのタイプ (Stx1, Stx2 及びその亜型) に分けられている。また、A/E 病巣の形成も EHEC の病原性に関与している。

A/E 病巣は腸管病原性大腸菌 (EPEC) で初めて報告されたもので、局部における微絨毛の消滅、及び細菌と宿主のインチミンを介した接着を特徴としている。EHEC は Stx (*stx1* あるいは *stx2* もしくはその両方) と A/E (*eae*) 遺伝子の双方の遺伝情報を有していることから、STEC と EPEC の性質を兼ね備えている。EHEC 感染症には 026 や 0103、0111 などの血清型株による事例も存在するが、0157 による事例はヒトに重篤な病原性を示しており、また集団

事例が最も多い。このことに関し、EHEC 0157 が Stx や A/E 因子以外の特定の病原因子を有しているという仮説が立てられるが、現在のところその因子については明らかになっていない。

DNA フィンガープリンティングの手法の一つである増幅断片長多型 (Amplified Fragments Length Polymorphism, AFLP) は、ゲノムの制限酵素断片を PCR により選択的に増幅する手法であり、EHEC の遺伝的解析において菌株のサブタイピングに適していることが示されている (Hahn, B. K. *et al.*, *J. Microbiol. Methods* 53, p. 387-399 及び Iyoda, S. *et al.*, *Microbiol. Immunol.* 43, p. 803-806)。そこで我々は、様々な血清型の EHEC 並びに EHEC 0157 と系統的に近縁であると考えられている 055 血清型株を用いて AFLP を行い、0157 と他の血清型株群との比較を行なった。

また、本研究で行った、2つの制限酵素 *Xba*I/*Hind*III を用いた AFLP において、約 1,100bp の位置に 0157 に特異的な DNA 断片が確認された。そこで、我々はこの特異的な DNA 断片が 0157 の疫学マーカーとなりうると思え、この DNA 断片のシーケンスを決定し、EHEC 0157 同定 PCR 法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株: EHEC 株 63 株、並びに EHEC 0157 と系統的に近い血清型とされる EPEC 055 株 6 株の計 69 株 (Table1) を使用した。

(*Journal of Clinical Microbiology* (1995), 33, p. 248-250, Cebula *et al.*, 及 *Journal of Clinical Microbio-*

logy (2002), 40, p. 3613-3619, Wang *et al.*)

2) AFLP: Table1 に記載されている病原性大腸菌 69 株を用い、*Nucleic Acids Res.* (1995), 23, p. 4407-4414, Vos *et al.* の論文を参考に AFLP を行った。本研究においては、大腸菌のゲノムが 6Mb 以下と小さいため、増幅の際の塩基による選択は 1 塩基のみで行った。

まず、ゲノム DNA を *Xba*I 及び *Hind*III で処理し、DNA Ligation Kit (Takara) を用いて切断断片とアダプターをライゲーションさせた。後に 1 塩基を付加した選択的プライマー *Xba*I+T, (5'-GATGAGTCCTGACCTAGA/T-3') 並びに *Hind*III+T, (5'-GACTGCGTACCAGCTT/T-3') を用いて PCR を行った。従来の AFLP においては、増幅産物をキャピラリーシーケンサーもしくはポリアクリルアミドで電気泳動する手法が採用されるが、本研究においては 1.5% アガロースゲル (TaKaRa) を用いた一般的な電気泳動法により分離、解析した。

3) コンピューター解析: AFLP で得られた増幅 DNA 断片の解析を Bio-ID software version 11.06 (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) を用いて行い、the unweighted-pair group method with arithmetic means (UPGMA) 法によりデンドログラムを作成した。

4) シーケンス解析: NIID220 (0157:H7) の DNA を用いた AFLP により得られた、0157 に特異的な DNA 断片をゲルから抽出し、GENECLEAN II KIT (Q-BIO Gene, Montreal, Canada) を用いて精製した。その後、精製した DNA を pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI.) にクローニング、目的の DNA 断片を BigDye terminator cycle sequencing kit v3.0 (Applied

Table1(a): EHEC O157菌株のPCR検査結果と血清型PCRの結果

Strain No.	Source/Localty/year of isolation	Serotype	PCR results targetting:						
			stx1	stx2	eae	stx2toxB ₀₁₅₇	stx2	lpfA _{0157/01-158}	lpfA _{0157/01-1}
KE-59	HW 1 cattle /Japan/1966	patient/Japan/1996 O157:NM	-	O26:H11	+	+	-	+	-
KE-62	HW 2 cattle /Japan/1966	patient/Japan/1996 O157:NM	-	O26:H11	+	+	-	+	-
KE-214	HW 10 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Miyagi)/2003 O157:H7	-	O26:H11	+	+	-	+	-
KE-241	HW 11 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Ishikawa)/2003 O157:H7	-	O26:H11	+	+	-	+	-
KE-243	HW 12 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Hyogo)/2003 O157:H7	+	O26:H11	+	+	-	+	-
CDC 10	HW 13 cattle /USA/ 1993	patient/Japan (Kagawa)/2003 O157:H7	-	O26:H11	+	+	-	+	-
KE 31	HW 14 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Hiroshima)/ 2003 O157:H7	+	O26:H-	+	+	-	+	-
KE 149	HW 1 cattle /Japan/1966	patient/Japan/1996 O157:H7	+	O103:H2	+	+	-	++	-
KE 181	HW 1 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Chiba/Choshi)/ 2003 O157:H7	-	O103:H2	+	+	-	++	-
KE 188	HW 1 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Hiroshima)/ 2003 O157:NM	-	O103:H2	+	+	-	++	-
KE 302	HW 1 cattle /Japan/1966	patient/Japan (Hiroshima)/ 2003 O157:H7	+	O103:H2	+	+	-	++	-
KE 373	HW 3 cattle /Japan/1966	patient/Japan/1996 O157:H7	+	O111:H-	+	+	+	+	-
KE 114	HW 4 food /Japan/1966	patient/Japan/1996 O157:H7	+	O111:H-	+	+	+	+	-
KE-424	HW 18 food /Japan/2000	patient/Japan (Okayama)/ 2003 O157:H7	+	O111:H-	+	+	-	+	-
CDC 8	HW 19 Hamburger/USA/1993	patient/Japan (Kagoshima)/2003 O157:H7	+	O111:H-	+	+	-	+	-
CDC 9	HW 19 Hamburger/USA/1993	patient/Japan (Aichi)/ 2003 O157:H7	+	O111:H-	+	+	+	+	-
NIID 457	HW 20 implicated food/Japan/1996	patient/Japan (Ibaragi)/ 2003 O157:H7	+	O111:H-	+	+	-	+	-
NIID 1856	HW 21 implicated food/Japan/1996	patient/Japan/1996 O157:H7	+	O111:H-	+	+	-	+	-
NIID 1646	HW 5 implicated food/Japan/1996	patient/Japan/1996 O157:H7	-	O121:H19	+	-	+	+	-
KE 1	HW 5 implicated food/Japan/1996	patient/Japan/1996 O157:H7	-	O121:H19	+	-	+	+	-
EDL 933	HW 23 patient/USA/1982	patient/Japan (Kanagawa)/ 2003 O157:H7	+	O121:H19	+	-	+	+	-
CDC 1	HW 24 patient/USA/June 1993	patient/Japan (Miyagi)/ 2003 O157:H7	+	O121:H19	+	-	+	+	-
CDC 2	HW 24 patient/USA/June 1993	patient/Japan/1987 O157:H7	+	O55:H-	+	-	+	+	+
CDC 3	HW 80 patient/USA/June 1993	patient/Japan/1980 O157:H7	+	O55:H-	+	-	+	+	+
NIID 2	HW 33 patient/Japan (Hiroshima)/June 1996	patient/Japan/1983 O157:H7	+	O55:H-	+	-	+	+	+
NIID 23	HW 33 patient/Japan (Okayama)/May 1996	patient/Japan/1983 O157:H7	+	O55:H-	+	-	+	+	+
NIID 42	HW 34 patient/Japan (Aichi)/June 1996	patient/Japan/1984 O157:H7	+	O55:H7	+	-	+	+	+
NIID220	HW 10 patient/Japan (Osaka)/Aug 1996	patient/Japan O157:H7	+	O55:H7	+	-	+	+	+
NIID 437	KB-10 patient/Japan/1996	patient/Japan O157:H7	+	O55:H7	+	-	+	+	+
NIID 1124	HW 7 patient/Japan/1996	patient/Japan/1996 O157:H7	+	O160:H21	+	-	+	+	-
CDC 4	HW 8 patient/USA/1983	patient/Japan/1997 O157:H7	+	O167:H32	+	+	-	+	-
CDC 5	HW 8 patient/USA/June 1983	patient/Japan/1997 O157:H7	+	O167:H32	+	+	-	+	-
CDC 6	HUS patientt/USA/June 1983	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+
CDC 7	HUS patientt/USA/June 1983	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+
NIID212	patient/Japan/1996	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+
NIID225	patient/Japan/1996	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+
KE 87	swab from sink/Japan/1966	O157:NM	-	+	+	+	+	+	+
KE 24	sewage water/Japan/1966	O157:H7	+	+	+	+	+	+	+

Biosystems, Foster City, Calif.)を用いて

シーケンス反応させ、ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によりシーケンスを決定した。

得られたシーケンスを、BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) を用いて GenBank 及び EMBL に登録されて

いる配列と相同性解析を行なった。

本研究により決定された塩基配列をもとに、Web Primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) を用いてプライマー (tox_B-af1pF: 5' - CAGCCCGTTCATTCCATTCTT - 3', tox_B-af1pR: 5' - TCACCGTGAATATTG - GAGGA - 3') を作成し、PCR を行った。

C. 研究結果

AFLP 解析により、350 bp~3,000 bp の範囲に 11~19 本の明確な DNA 断片が得られた。これらのバンドパターンをもとに作成したデンドログラム (Fig. 1) において、0157 株間は 85%以上の相同性を示し、他の血清型とは異なる特有のクラスターを形成した。また、その他の血清型 (055, 026, 0103) も血清型特有のクラスター (約 70%の相同性) を形成し、0157 に最も近縁であるとされる報告されている 055 は、0157 に最も近い位置にクラスターを形成した (相同性約 55%)。

本研究において、約 1,100bp の位置に 0157 特有の DNA 断片が検出された (Fig2)。我々はこの DNA 断片が、0157 の疫学的解析の有用なツールとなるのではないかと考え、この DNA 断片のシーケンスを決定した。BLAST を用いた相同性解析の結果、この DNA 断片は 0157 が安定して保有しているとされる巨大プラス

ミド、p0157 上に存在する遺伝子 *tox_B* の一部とほぼ一致していた (99.7%; GenBank accession no. AB011549, 61,112~62,201)。

さらに、決定したシーケンスをもとにプライマー (tox_B₀₁₅₇) を設計し、PCR を行ったところ、0157 においてのみ約 960bp の増幅産物が得られた (Table1)。

D. 考察

本研究で行った AFLP の結果、0157 及びその他の血清型で血清型特有のクラスターを形成する傾向が見られたことから、本実験で選択した制限酵素 (*Xba* I / *Hind* III) を用いた AFLP が、病原性大腸菌の疫学解析の手法として有用である可能性が示唆された。

また、本研究で得られた 0157 に特異的な DNA 断片をもとに設計したプライマーを用いて PCR を行ったところ、0157 のみで産物が増幅されたことから、このプライマーが EHEC 0157 を検出する際の有用なツールとなることが示唆された。

本研究でシーケンスを決定した DNA 断片が含まれる *tox_B* 遺伝子は、大きさが 9.5kb で、この遺伝子により産生されるタンパクが III 型分泌機構に関わるタンパクの産生もしくは分泌、あるいはその両方を促進させることで、Caco-2 細胞への EHEC 0157 の接着能に関与していることが報告されている (Tatsuno *et. al*, *Infect. Immun*, 2000, vol. 68, p. 5943-5952)。また、本遺伝子は EHEC 0157 のみではなく、その他の血清型の EHEC, EPEC にも分布しているが、この領域には遺伝的多様性があると報告されている (R. Tozzoli

et. al, *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, p. 4052-4056)。

以上から、我々は「EHEC 0157の *toxB* は宿主細胞への接着能を増強する性質が他の血清型のものよりも強く、それゆえに EHEC 0157 の臨床事例並びに病原性の優位性が生じているのではないか」という仮説を立てた。今後はこの点に着目し、0157 とその他の血清型の *toxB* 遺伝子の機能を比較していく予定である。

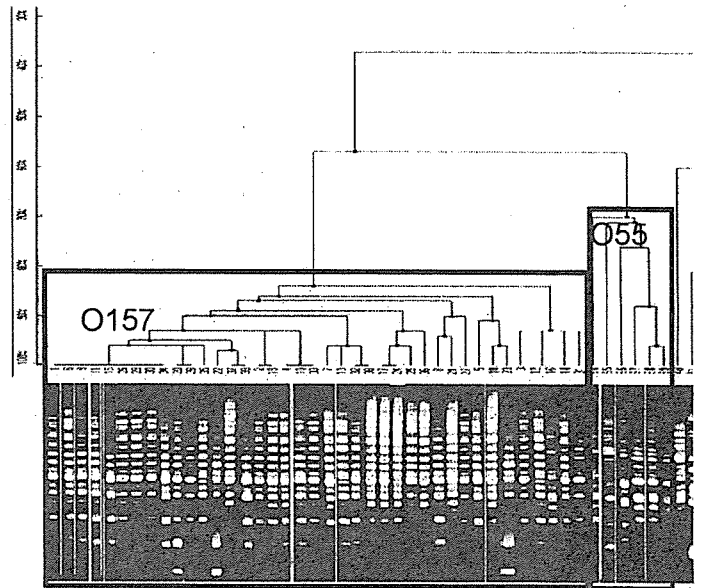


Fig. 1 AFLP より作製したデンドログラム

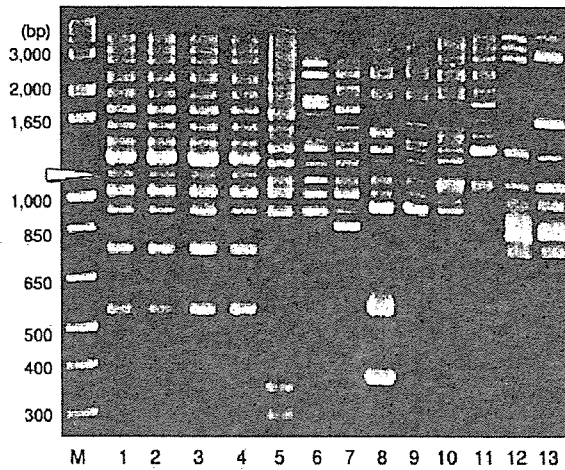


Fig. 2 AFLPにより得られた泳動図(一部)及び0157特異的DNA断片

Lanes 1-4: EHEC O157 strains; EDL 933, NIID 2, NIID 220, CDC 6

Lanes 5-13: other non-EHEC O157 strains; HW1 [EHEC O26:H11], HW 14 [O26:NM], HW 10 [O103:H12],

HW 3 [O111:NM], HW 5 [O121:H19], 80 [O55:NM], 663-84 [O55:H7], HW 7 [O160:H21], HW 8 [O167:H32]

Lane M: molecular size marker (1 Kb Plus DNA Ladder ,Invitrogen, Carlsbad, Calif.)

矢印 : 0157に特異的に見られたDNA断片

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 パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)は、分子疫学的解析法のゴールドスタンダードとして広く用いられているが、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が開発が求められている。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)の多様性に着目し、PCR ベースでのコレラ菌の分子疫学的解析法を開発を試みた。コレラ菌の SI 領域の塩基配列を解析し、ビブリオコレラリポート(VCR)の相同性の低い領域から約 20 種類の PCR プライマーを設計し様々な組み合わせで PCR を行った。その中の、VCRU1 と VCRR1 の組み合わせで最も識別度が高く、少なくとも O1 エルトール型コレラ菌、O1 古典型コレラ菌および non-O1, non-O139 コレラ菌を識別することができた。

A. 研究目的

アジアやアフリカにおいては、今日なお、コレラは致死率の高い病気であり、多数の散発事例や集団事例が発生し大きな問題となっている。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においてもコレラが発生し、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た。コレラ菌のスーパーインテグロン(SI)領域の多様性に着目し、SI 領域の塩基配列を解析し、ビブリオコレラリポート(VCR)の保存性の高い領域と低い領域からいくつかの PCR プライマー設計し、様々なコレラ菌を用いてどの程度識別可能かを解析した。

B. 研究方法

1. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

昨年度に引き続き 1948 年から 2000 年の間にインド、バングラデシュ、オーストラ