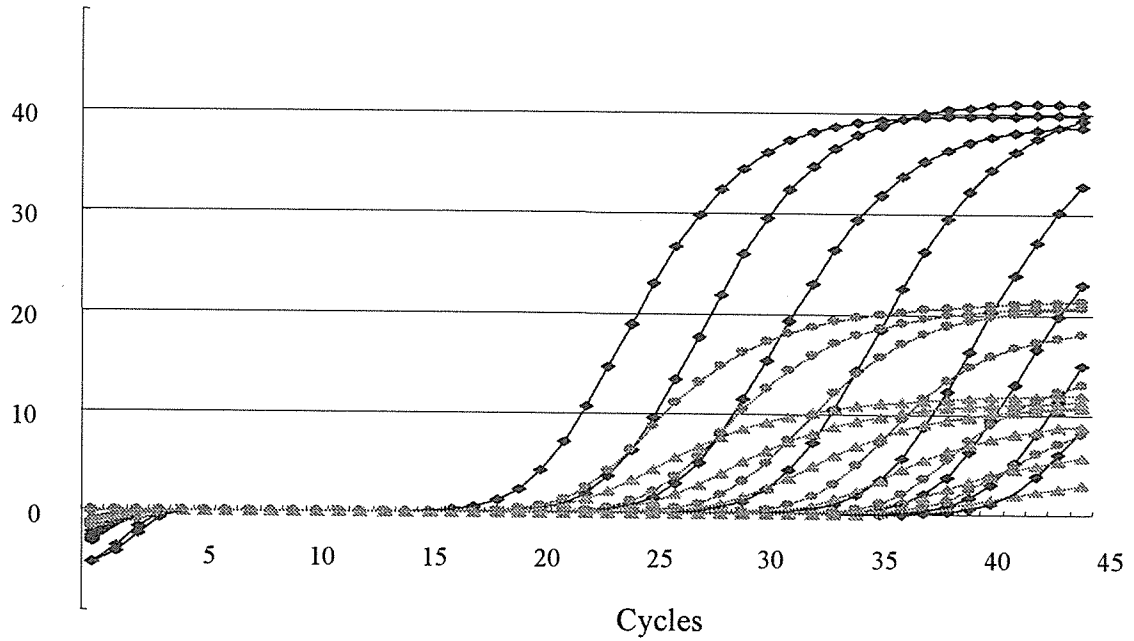


図 8. *V. cholerae* 及び類縁菌における *ret*, *ompW* 遺伝子の保有状況



Probes	gene	primer/probe
—●—	<i>ctxA</i>	250nM/900nM
- - -■-	<i>ret</i>	//
.....▲.....	<i>ompW</i>	//

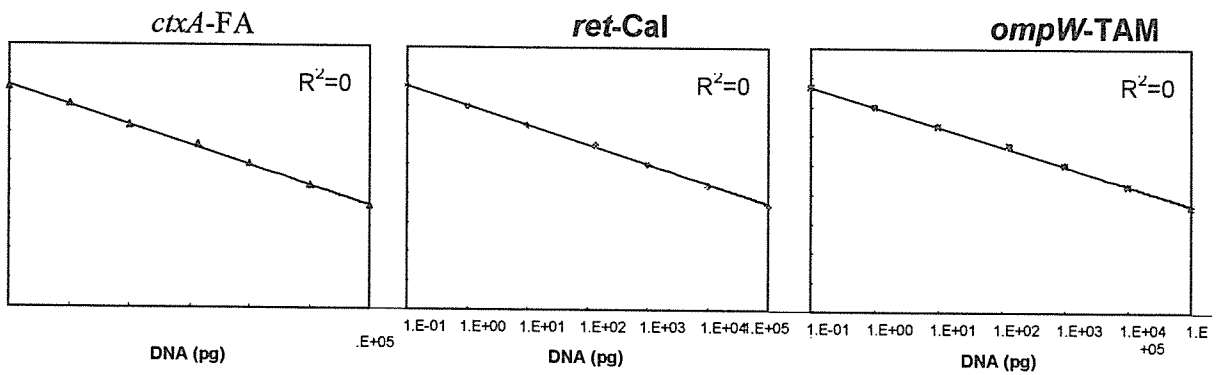


図9. リアルタイムPCRにおける定量曲線と標準曲線

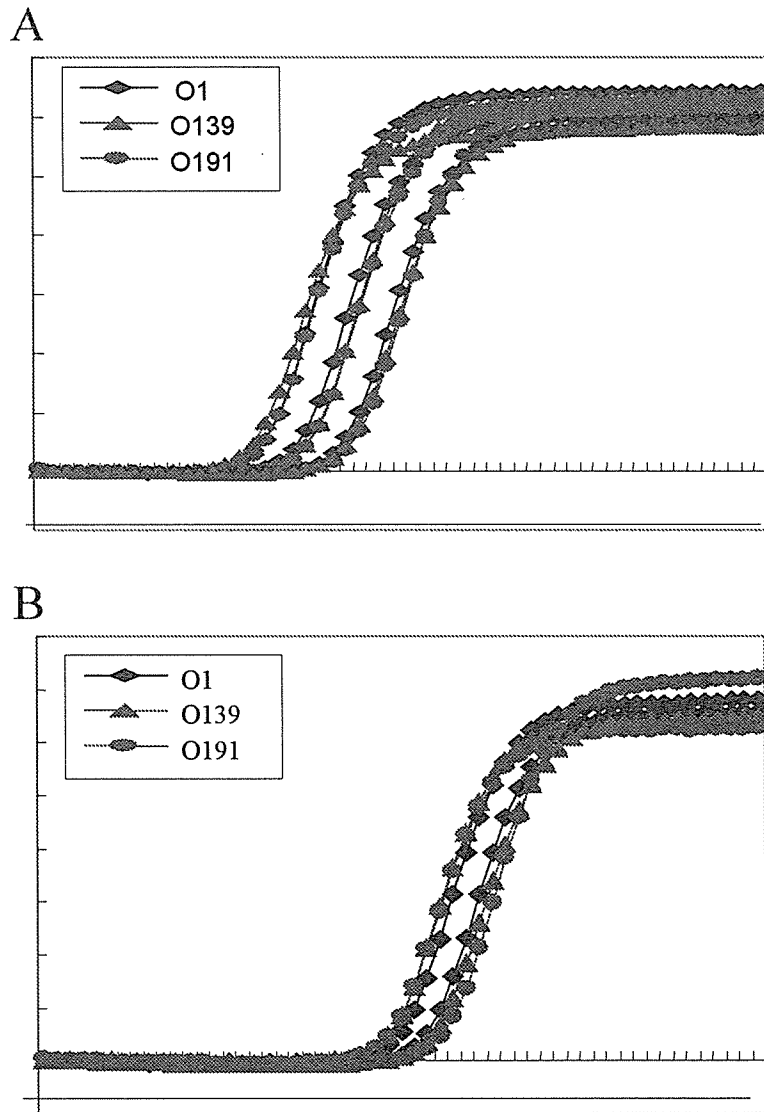


図10. 食品からのコレラ菌由来DNA (*ctxA*) 抽出効率

V. cholerae O1, O139, O191 各代表株 10^0 - 10^2 CFU を市販冷凍エビ 25g に接種し、APW で10倍希釈・懸濁した後、2mlよりDNA抽出を行い、全量をリアルタイムPCRに供した。抽出はMora Extraction kitを用いたフェノール濃縮法 (A) および熱変性 (B) により行なった。

表 1. 供試菌株一覽

Strain	Serotype (Biovar)	Isolation Source	<i>ctxA</i> gene
<i>V. cholerae</i>			
NIH35A3	O1 (Inaba, classical)	Human	+
NIID281-03	O1 (Inaba, classical)	Human	-
NIH41	O1 (Ogawa, classical)	Human	+
TVC343	O1 (Ogawa, classical)	Human	-
P6973	O1 (Inaba, El Tor)	Human	+
P1418	O1 (Ogawa, El Tor)	Human	+
NIID236-93	O139	Human	+
NIID1061-93	O139	Turtle	+
ATCC51394	O139	Human	+
NIHS12-06	O31	Squid	-
NIHS0013	O59	Shrimp	-
NIHS0014	O79	Shrimp	-
YCH11	O136	Shellfish	-
NIID455-92	O138	Crab	-
NIID863-94	O179	Prawn	-
NIID372-95	O186	Prawn	-
NIID626-95	O187	Prawn	-
NIID366-96	O191	Prawn	-
<i>V. parahemolyticus</i>			
NIID-K1	<i>tdh</i> +	Human	-
NIID-K4	<i>trh</i> +	Human	-
<i>V. vulnificus</i>			
NIID459-95	O1, <i>vvh</i> +	Human	-
NIID-1115-80	O4, <i>vvh</i> +	Human	-
<i>V. fluvialis</i> NIHS-060222		Shrimp	-
<i>V. mimicus</i> NIHS-060223			-
<i>Ple. pneumophila</i>			-
<i>Mor. morgani</i>			-
<i>Aeromonas spp.</i> 62-11291		Shrimp	-
<i>Ent. cloacae</i>			-
<i>E. coli</i>			-
C600			-
H4-54	O26:H11	Cattle	-
EDL933	O157:H7	Human	-
<i>Sh. flexneri</i> YSH6000			-
<i>L. monocytogenes</i> EGD			-
<i>Ery. rhusiopathiae</i> Tama-96			-
<i>Sa. Enteritidis</i> 273			-
<i>Sa. Typhimurium</i> LT2		Reference	-

表 2. PCR スクリーニング検査における内部標準設計用プライマー

Primer	Oligonucleotides (5' to 3')
1 16s-1	GCGGCAGCACAGAGGAACTTG
16s-2	GTCTCCGCTAGATTCTCTGG
2 16s-ctxA-F	ACAGAGTGAGTACTTTGACCGCGGCAGCACAGAGGAACTT
16s-ctxA-R	ATACCATCCATATATTTGGGAGGTCTCCGCTAGATTC

表 3. TCBS 寒天培地上で冷凍エビより優勢に分離された代表株

菌種	コロニー数	備考
<i>V. fluvialis</i>	3	
<i>V. parahemolyticus</i>	2	<i>tdh-</i> , <i>trh-</i>
<i>V. vulnificus</i>	2	
<i>Aeromonas</i> spp.	2	
<i>Enterobacter</i> spp.	1	
計	10	

表 4. PCR 検出用プライマー

Gene		Sequences (5' to 3')	Size(bp)	GC%	Tm(°C)
<i>ctxA</i>	Forward	ACAGAGTGAGTACTTTGACC	308		
	Reverse	ATACCATCCATATATTTGGGAG			
<i>ompW</i>	Forward	ATGAAACAAACCATTTGCCTAGCC	654		
	Reverse	TTAGAACTTATAACCACCCGCGATG			
<i>ret</i>	Forward	TTGAATATACTAACCACATTAAGAGA	449		
	Reverse	TTAGTACTTCCTCTGAGAATTT			

表 5. リアルタイム PCR 用プライマー/プローブ

Gene	Primer/probe	Sequences (5' to 3')	Oligo length	GC%	Tm (°C)
<i>ctxA</i>	Forward primer	GTTCCCTCCGGAGCATAGA	20	55.0	61.5
	Reverse primer	GATCTTGAGCATTCCCACAA	21	47.6	62.3
	Probe (FAM)	CTTGGAGGGAAGAGCCGTGGATTCA	25	56.0	72.1
<i>ompW</i>	Forward primer	AGTTGCCTTCGTCGTAAGTGGAT	22	50.0	62.3
	Reverse primer	GCCGGTTTCTATCCAAGTACGTAG	24	50.0	62.3
	Probe (Cal560)	CTAAAGGCAAACCTTTCACCCGTCGGTG	27	51.9	71.5
<i>ret</i>	Forward primer	GCGCATCCTTCTAGTAAGCTCAA	23	47.8	62.1
	Reverse primer	GCATAGCTTGAGTCATGTACCTTCA	25	44.0	61.8
	Probe (Cy5)	TTTGTGAGCGCCATTTGAATGCTATCCT	28	42.9	71.4
16s rRNA	Forward primer	CTCCTACGGGAGGCAGCA	18	66.7	62.5
	Reverse primer	AACCCGAAGGCCTTCTTCA	19	52.6	62.0

表 6. *ctxA*, *ompW*, および *ret* 遺伝子の検出状況

菌種	菌株数	Detection for		
		<i>ctxA</i>	<i>ompW</i>	<i>ret</i>
<i>V. cholerae</i>				
O1, Ctx-positive	4	4	4	4
O1, Ctx-negative	2	-	2	2
O139, Ctx-positive	3	3	3	3
non-O1, non-O139	9	-	9	-
<i>V. parahemolyticus</i>	2	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	2	-	-	-
Other bacterial spp.	14	-	-	-

表 7. リアルタイム PCR を用いた冷凍エビ中のコレラ菌定量性について

Inoculum (CFU/g)	Cal.	<i>ret</i>			<i>ompW</i>			<i>ctxA</i>		
		O1	O139	O191	O1	O139	O191	O1	O139	O191
100	CP	33.58±0.18	34.19±0.12	ND*	33.68±0.05	34.51±0.18	32.27±0.17	32.55±0.22	33.08±0.11	32.10±0.08
	CFU	91.58	103.61	-	92.63	91.51	109.29	106.69	100.56	103.14
10	CP	35.89±0.21	37.66±0.33	ND	35.69±0.12	37.48±0.16	35.33±0.37	35.32±0.19	35.80±0.09	35.46±0.22
	CFU	8.99	9.88	--	7.66	7.49	11.35	10.47	11.24	10.59
1	CP	38.36±0.12	39.43±0.09	ND	38.30±0.18	39.71±0.23	40.23±0.22	39.17±0.42	38.37±0.07	39.82±0.20
	CFU	0.81	1.09	-	1.21	0.94	1.87	0.98	0.86	1.07

研究課題名： 食品由来の2類感染症のリスクアセスメントモデル構築に関する研究

分担研究課題： 海外渡航者由来のコレラ菌分離株の疫学解析に関する研究

分担研究者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究協力者 荒川英二、森田昌知、三戸部治郎（国立感染症研究所 細菌第一部）

西村聖美、竹内真人、岡村徳子（成田空港検疫所）

研究要旨

コレラは、コレラ菌（コレラ毒素産生性の *Vibrio cholerae* O1 もしくは O139）によって生じる経口感染症であり、本菌に汚染された食品や水を介してヒトに感染する。コレラは現在 1961 年頃から始まった第7次世界的流行が現在も続いている状態であり、その原因はエルトル型 *V. cholerae* O1 である。我が国ではコレラは主としてアジアを中心とした海外渡航者による輸入例が大半を占めている。国内例の報告もあるが、そのほとんど全てが散発例ということもあり原因究明にいたることはほとんどない。こうした国内例の原因究明にあたり、現在の海外の流行菌株を把握することは非常に重要であると考えられる。本研究では主として海外渡航者由来のコレラ菌分離株に着目しこれらの特徴づけを行うべく、最近報告された国際的な統一手法となりつつあるパルスネット プロトコールによるコレラ菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析を行った。

A. 研究目的

コレラはコレラ菌に汚染された食品や水を介して感染する。現在は 1961 年から始まった *V. cholerae* O1 El Tor による第7次世界流行の最中にあり、開発途上国を中心に年間数十万人のコレラ患者が発生している。

国内では 1822 年に初めてのコレラ流行が発生した。その後、1897年に制定され、1988年に改訂された伝染病予防法に基づいた防疫が行われてきた。1999年4月にはいわゆる感染症法が施行され、コレラは2類感染症に位置づけされた。1999年12月には食品衛生法施行規則の改正に伴い、食中毒統計の病因物質の種別に追加されている。

最近の我が国におけるコレラ患者については、年によって多少の変動はあるが、ほぼ7-8割が海外輸入例である。そして、そのほとんどがアジアへの渡航歴を有している。残り2割程度が国内例であるが、散発例であることがほとんどのため、

感染源の究明にいたることはほとんどない状態である。本研究では、まず、我が国を取り巻くコレラ菌の現状を把握することを目的とし、海外渡航者由来のコレラ菌分離株を材料に型別を行い、流行菌株を特徴づけ、そのデータベースの構築を試みる。

B. 研究方法

当部に保存されている海外由来株、および成田空港検疫所で分離された海外渡航者由来株を供試菌株とした。

型別の方法として、昨年、国際的共同研究で提唱されたパルスネット プロトコールに基づいたパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を使用した (K. L. F. Cooper, et al., *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 51-58, 2006)。泳動像の解析には同じくパルスネットで利用されている Bionumerics (もしくは Fingerprinting II) ソフトウェアを使用して、コンピューターに取り込

んだ泳動像の解析を行った。

C. 研究結果

感染研細菌第一部保存株（1992年-1997年）30株、および成田空港検疫所保存株（1999年-2006年）18株について、パルスネット プロトコールによる PFGE を行った。DNA 消化に使用した制限酵素は NotI であった。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株の DNA を XbaI 消化したものを使用した。泳動像の代表例を図 1 に示す。泳動像はスキャナーを用いてコンピューターに取り込み、Bionumerics ソフトウェアによるクラスター解析を行った。比較のため、異なる 5 種類の血清型からなる NAG ビブリオ (non-O1, non-O139 *V. cholerae*) 分離株 15 株についても同様に処理を行い、クラスター解析に供した。その結果を図 2 に示す。*V. cholerae* O1 株は 1 株を除き、NAG ビブリオ株とは異なるクラスターを形成し、また、NAG ビブリオはそれぞれの血清型でクラスターを形成した。各クラスター間を分ける類似度の閾値は約 75% であった。

V. cholerae O1 株に関しては、ほとんど全てが 80% 以上の類似度を示した一方で、類似度 100% を示したのは 4 組 (8 株) のみであった。このうち 3 組はそれぞれ 1992 年南米、1997 年フィリピン、2005-6 年フィリピンで分離されたもので、年代および/もしくは地域によって異なるクラスターに分類された (図 3)。

2005 年 5 月にはインドネシア バリ島への旅行者においてコレラの集団事例が発生した。感染者のほとんどがバリ島の同一ホテルに宿泊し、またコレラ感染のリスク行動でもある生野菜の喫食やプールでの水泳をしていた。病原微生物情報 (第 27 巻、8-9 頁、2006 年 1 月号) に掲載された本集団事例関連株の PFGE 泳動像を本研究のクラスター解析にあてはめると 1997 年のシンガポールおよびインドネシア分離株と近縁であることが示唆された (図 4)。しかしながら、同じインドネシア分離株でも上記のように同じ小クラ

スターに入らないものもあり、こうした結果から、PFGE による解析が今後のコレラ患者の疫学解析において有用であることが示唆された。

今回供した菌株の海外渡航者の疫学情報 (n=33) としては、年齢では 20 代が多く、6 割を占めた。性別では男性が 7 割を占めた。また、リスク要因となりうる食品等の喫食情報は果物、乳製品、ジュースが多く、生野菜、氷などがそれに次いでいた (図 5)。

D. 結論

最近発生する海外渡航歴のないコレラの感染源はほとんど不明のままである。しかしながら、コレラのそもそもの発生地はアジアにあり、渡航歴のあるコレラ患者の原因菌を解析することでコレラ菌の現状を把握することは、国内例の感染源の解明にも役立つことと考えられる。患者の喫食調査、行動調査とともに、こうした菌株の疫学解析も重要と考えられる。

E. 研究発表

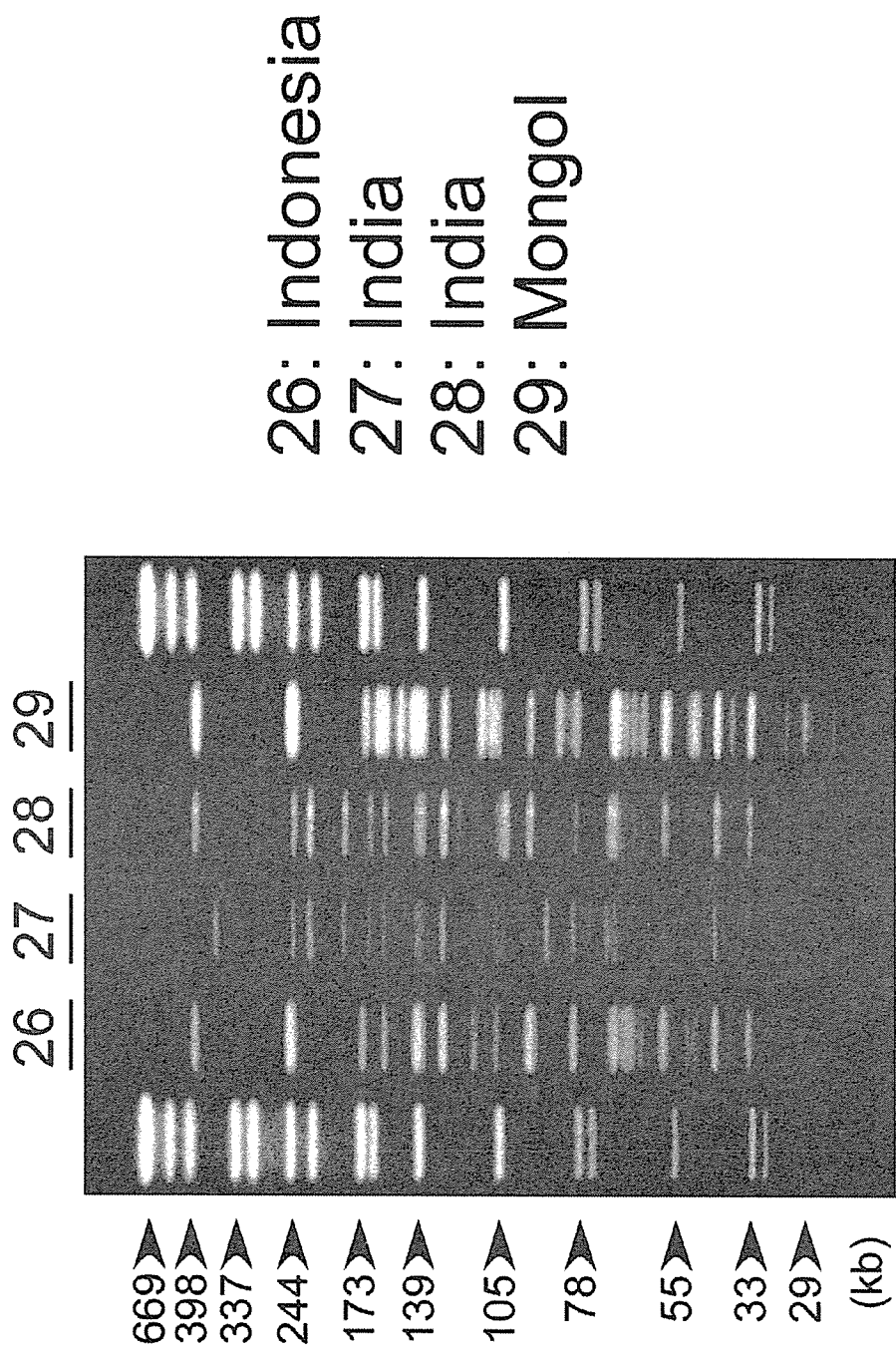
論文発表

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.* 50, 707-711, 2006.

F. 知的所有権取得状況

- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案
なし
- 3 その他
なし

図1. コレラ菌O1株PFGE泳動像(例)



マーカー: *Salmonella* Braenderup H9812

図2. 泳動像解析-1

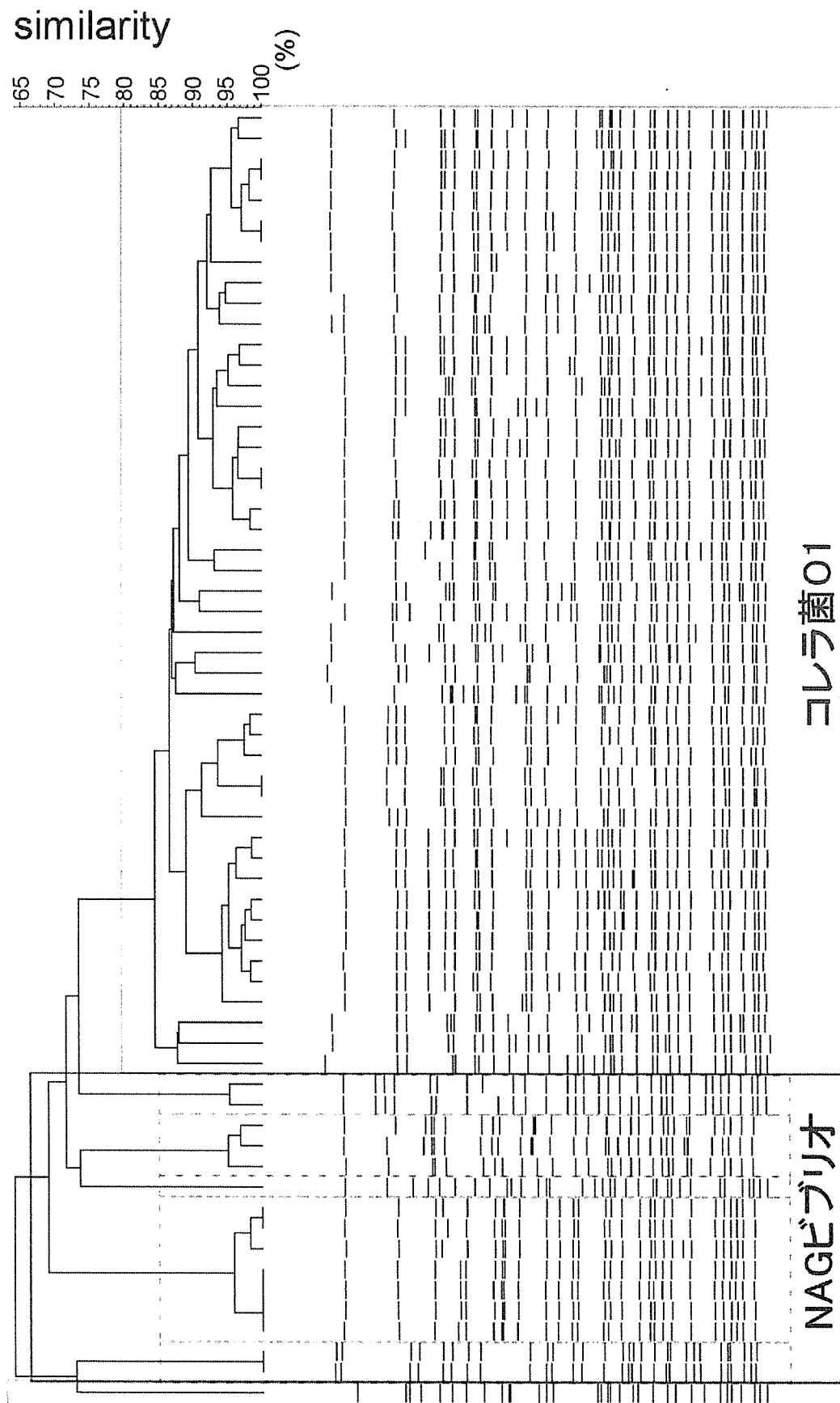
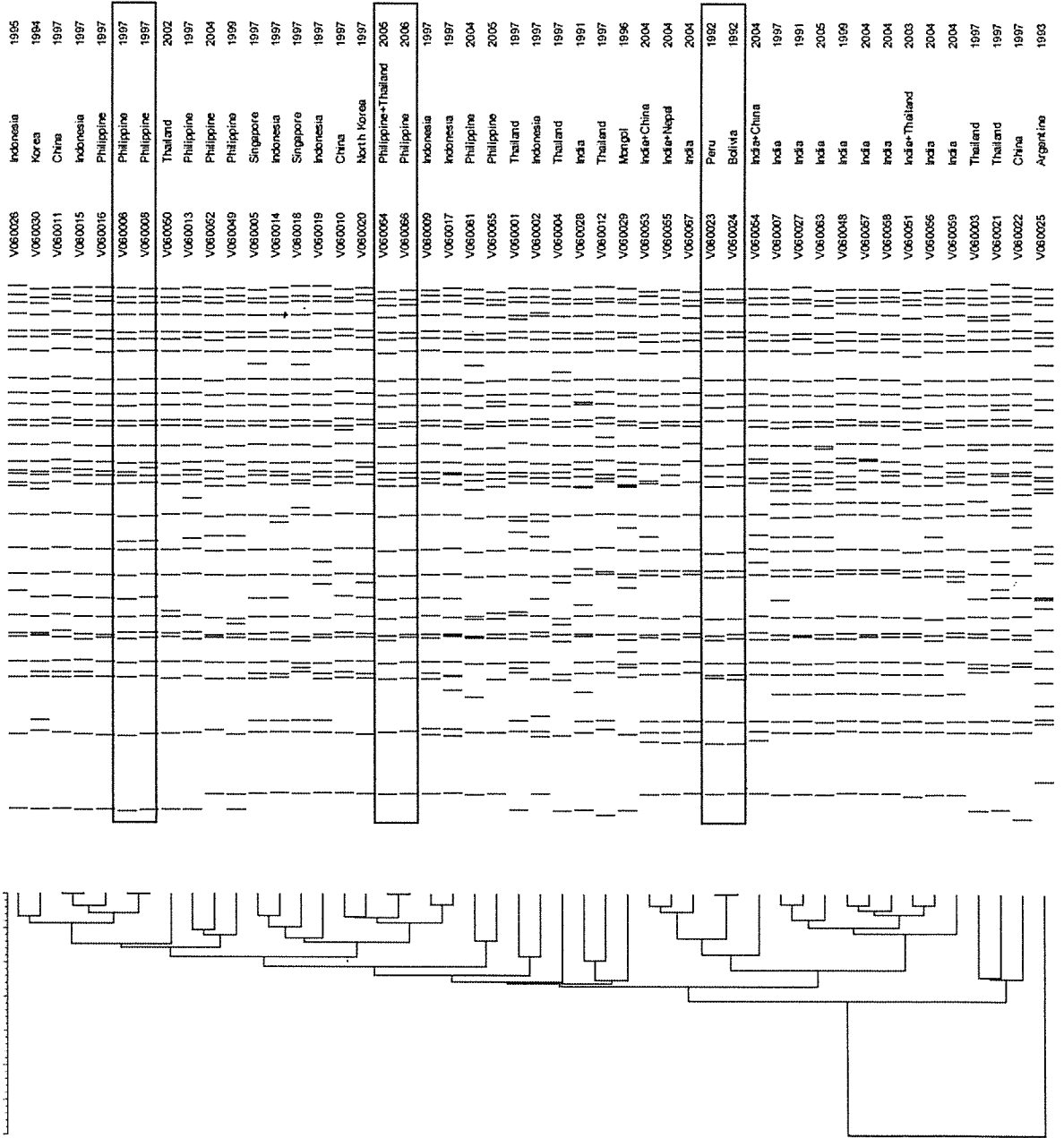


図3.泳動像解析-2

similarity (%)
70 80 90 100



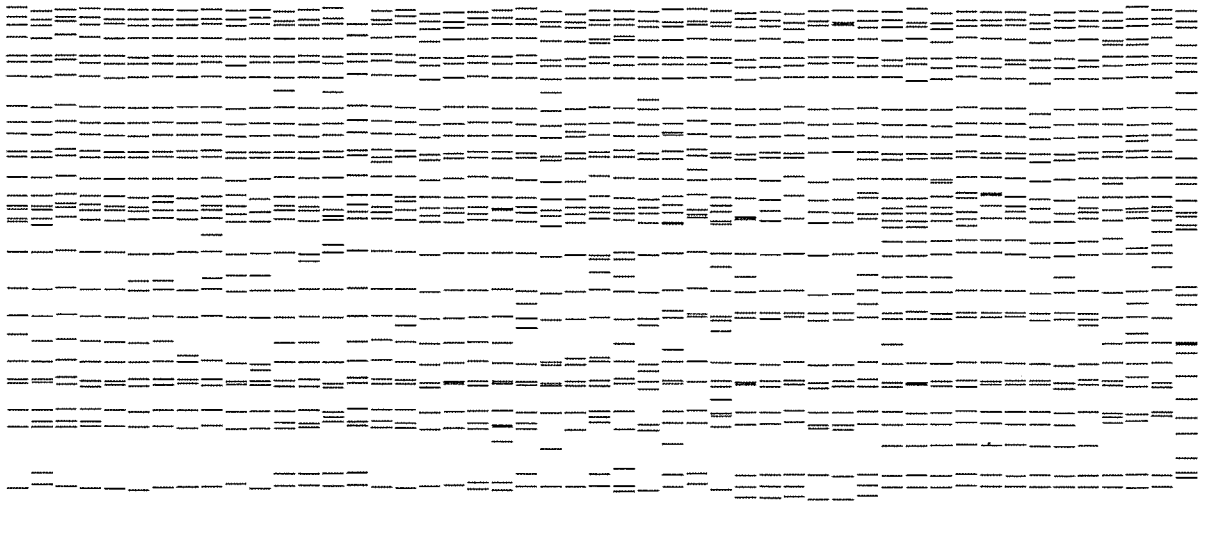
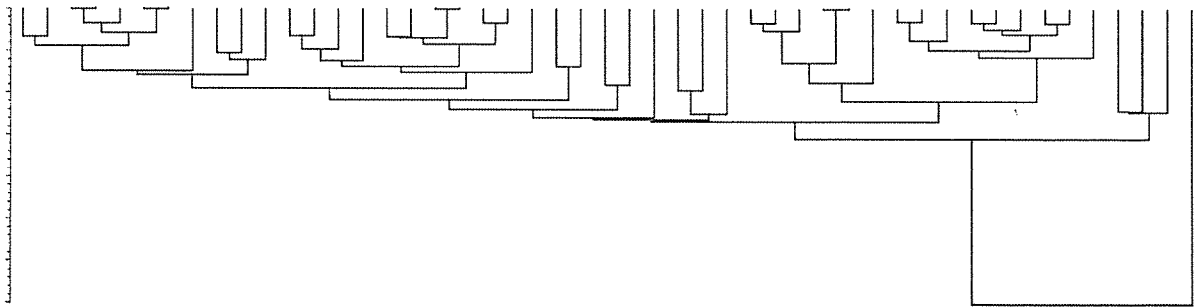
1997年
フィリピン

2005、6年
フィリピン

1992年
南米

図4. 泳動像解析-3

similarity (%)
70 80 90 100



V560026	1-Ogawa	Indonesia	1985
V560030	1-Ogawa	Korea	1994
V560011	1-Ogawa	China	1987
V560015	1-Ogawa	Indonesia	1997
V560016	1-Ogawa	Philippine	1997
V560006	1-Ogawa	Philippine	1997
V560009	1-Ogawa	Philippine	1997
V560030	1-Inaba	Thailand	2002
V560013	1-Ogawa	Philippine	1987
V560052	1-Ogawa	Philippine	2004
V560048	1-Ogawa	Philippine	1989
V560035	1-Ogawa	Singapore 1997	1997
V560014	1-Ogawa	Indonesia 1997	1997
V560018	1-Ogawa	Singapore 1997	1997
236	1-Ogawa	Indonesia 2005	2005
V560010	1-Ogawa	China	1997
V560020	1-Ogawa	North Korea	1987
V560004	1-Ogawa	Philippine+Thailand	2005
V560066	1-Ogawa	Philippine	2006
V560009	1-Ogawa	Indonesia	1987
V560017	1-Ogawa	Indonesia	1987
V560019	1-Ogawa	Indonesia	1987
V560051	1-Ogawa	Philippine	2004
V560005	1-Ogawa	Philippine	2005
V560001	1-Ogawa	Thailand	1987
V560002	1-Ogawa	Indonesia	1987
V560004	1-Ogawa	Thailand	1987
V560028	1-Inaba	India	1991
V560012	1-Ogawa	Thailand	1987
V560029	1-Ogawa	Myanmar	1986
V560053	1-Ogawa	India+China	2004
V560055	1-Ogawa	India+Nepal	2004
V560087	1-Ogawa	India	2004
V560023	1-Ogawa	Pecu	1992
V560024	1-Ogawa	Bolivia	1982
V560054	1-Ogawa	India+China	2004
V560007	1-Ogawa	India	1987
V560027	1-Ogawa	India	1981
V560003	1-Inaba	India	2005
V560046	1-Ogawa	India	1999
V560057	1-Ogawa	India	2004
V560058	1-Ogawa	India	2004
V560051	1-Ogawa	India+Thailand	2003
V560056	1-Ogawa	India	2004
V560059	1-Ogawa	India	2004
V560003	1-Ogawa	Thailand	1987
V560021	1-Ogawa	Thailand	1987
V560022	1-Ogawa	China	1987
V560025	1-Ogawa	Argentina	1983

2005年
バリ島株

図5. 海外渡航者コロナ患者の喫食状況(複数回答)

