

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成 19 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：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 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検出するため、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、腸チフス・パラチフスの治療上の問題となっているニューキノロン低感受性菌の割合はチフス菌で 42.9%、パラチフス A 菌で 72.2%であった。さらにチフス菌においては、ニューキノロン剤に耐性を示す菌が 1 株分離され、この株は昨年分離された 2 株のニューキノロン耐性チフス菌と遺伝的に近縁であることが示唆された。

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。また昨年、2 株のニューキノロン耐性チフス菌が日本国内で分離されており、ニューキノロン耐性チフス菌・パラチフス A 菌の増加は時間の問題である。

そこで本研究では、これら耐性菌の日本国内へ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

2007 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・パラチフスの治療に有効と考えられている薬剤を含む 15 薬剤について、CLSI 法に従って行った。薬剤は、アンピシリン、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、カナマイシン、ゲンタマイシン、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、

ST 合剤の 15 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

2007 年中に日本国内で分離されたチフス菌 35 株（うち輸入例 26 株）、パラチフス A 菌 18 株（うち輸入例 15 株）の薬剤感受性試験とファージ型別試験の結果を表 1、2 に示す。チフス菌では、多剤耐性菌（アンピシリン、クロラムフェニコール、ST 合剤に耐性を持つ菌）が 3 株分離された。これらは、いずれも南アジア（バングラデシュ 2 株、インド 1 株）への渡航者からの分離株であり、ファージ型はすべて E9 型であった。一方で、パラチフス A 菌では多剤耐性菌は分離されなかった。またチフス菌・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）はチフス菌で 15 株分離され、ファージ型では E1、E9、E14 等において高い割合で存在した。一方、パラチフス A 菌では 13 株分離されたがファージ型による偏りは見られなかった。ナリジクス酸耐性チフス菌は、南アジア諸国（インド、バングラデシュ、ネパール等）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、その多くがインド、バングラデシュ等の南アジア地域への渡航者から分離されたが、中国、シンガポールへの渡航者からも分離された。

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 1 株（070017Ty）存在した。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、この株は、昨年分離された 2 株のニューキノロン耐性チフス菌（060042Ty、060044Ty）と極めて類似した特有の泳動パターンを示した。また、キノロン耐性決定領域の遺伝子配列を決定したところ、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（図 1）。キノロン耐性決定領域における変異、ファージ型による分類（UVS4）及び、感染した患者の渡航先（インド）も昨年分離された 2 株のニューキノロン耐性チフス菌と同一であった。

### 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問題となっているが、昨年引き続き今年もニューキノロン耐性チフス菌の分離が確認された。この菌株はファージ型別、分子疫学解析等の結果から、昨年分離された 2 株のニューキノロン耐性チフス菌と遺伝的に近縁であることが示唆された。しかしながら、今後、他のファージ型に分類されるチフス菌やパラチフス A 菌がニューキノロン剤に対する耐性を獲得することが考えられるため、今後もチフス菌・パラチフス A 菌の発生動向を注視しなければならない。

### E. 結論

2007 年中に日本国内でチフス菌 35 株、パラチフス A 菌 18 株が分離された。ナリジ

クス酸耐性菌の割合はチフス菌 42.9%、パラチフス A 菌 72.2%であり、ナリジクス酸耐性菌の中に、ニューキノロン耐性チフス菌が 1 株存在した。ニューキノロン耐性菌の増加、及び新型薬剤耐性菌の発生を監視のため、今後も継続して薬剤感受性試験を行う必要がある。

#### F.健康危機情報

ファージ型別及び薬剤耐性の結果を病原

微生物検出情報 (IASR) に報告し、公表している。

#### G.研究発表

1) 森田昌知・泉谷秀昌・渡辺治雄・相楽裕子・大西健児：2007年に日本国内で分離されたチフス菌・パラチフス A 菌の各種薬剤感受性の検討、第 47 回感染性腸炎研究会総会、東京、2008 年 3 月

表 1. 2007 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

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 <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub> resistant [%]	range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub> resistant [%]
Ampicillin ( $\geq 32$ )	0.25 - >256	1	1	1 - 8	2	4
Cefotaxime ( $\geq 64$ )	0.032 - 0.5	0	0	0.064 - 0.125	0	0
Ceftriaxone ( $\geq 64$ )	0.032 - 0.125	0	0	0.064 - 0.25	0	0
Imipenem ( $\geq 16$ )	0.032 - 0.25	0	0	0.125 - 2	0	1
Aztreonam ( $\geq 32$ )	0.016 - 0.25	0	0	0.064 - 0.25	0	0
Kanamycin ( $\geq 64$ )	1 - 4	2	2	1 - 4	2	4
Gentamicin ( $\geq 16$ )	0.25 - 1	0	1	0.25 - 1	0	1
Tetracycline ( $\geq 16$ )	0.5 - 2	1	2	1 - 2	2	2
Fosfomycin ( $\geq 256$ )	1 - 64	8	64	16 - 256	64	128
Chloramphenicol ( $\geq 32$ )	2 - >256	4	8	4 - 16	8	16
Nalidixic acid ( $\geq 32$ )	0.5 - >128	4	>128	4 - >128	>128	>128
Norfloxacin ( $\geq 16$ )	0.064 - 128	0	2	0.125 - 8	4	4
Ofloxacin ( $\geq 8$ )	0.064 - 8	0	1	0.25 - 4	2	4

Ciprofloxacin ( $\geq 4$ )	0.016 - 16	0.064	0	2.9	0.064 - 1	1	1	0
		.5						
Trimethoprim/Sulfamethoxazole ( $\geq 4/76$ )	0.064 - >160	0	4	8.6	1 - 4	2	4	0
		5						

表 2. ファージ型と推定感染地域

	ファージ型	株数:推定感染地域
<i>S. Typhi</i>	A	2: 東南アジア 1、国内・不明 1
	B1	1: 東南アジア 1
	D2	1: 東南アジア 1
	E1	10: 南アジア 7、国内・不明 3
	E9	3: 南アジア 3
	E14	1: 南アジア 1
	M1	5: 東南アジア 2、国内・不明 3
	DVS	3: 南アジア 1、東南アジア 1、国内・不明 1
	UVS1	2: 東南アジア 2
	UVS2	3: 東南アジア 2、南アジア 1
	UVS3	1: 東南アジア 1
	UVS4	2: 南アジア 1、南米 1
<i>S. Paratyphi A</i>	1	7: 南アジア 3、東南アジア 1、アフリカ 1、国内・不明 2
	2	3: 南アジア 3
	3	1: 国内・不明 1
	4	2: 南アジア 2
	6	2: 南アジア 1、東南アジア 1
	UT	3: 南アジア 1、東南アジア 1、東アジア 1



厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）  
平成19年度 分担研究報告書

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 農学研究科  
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関連する遺伝子解析：新興型腸炎ビブリオの O:K 抗原変換の詳細を明らかにするため、新興型 O3:K6 株のゲノム配列と既知の *Vibrio cholerae* の lipopolysaccharide (LPS) 合成に関連する遺伝子群と比較・解析することにより、O:K 血清型に関連する遺伝子群を推定した。さらに、新興型腸炎ビブリオ O4:K68 株の同遺伝子群の塩基配列を決定し、O3:K6 株と比較した結果、O4:K68 株はこの遺伝子領域が全く異なっており、大規模な DNA 配列の変換が起こっていることが明らかになった。以上から、次々に出現する異なる新興型の新興型腸炎ビブリオはこの遺伝子領域が外来性の遺伝子領域と入れ替わる事により出現したと考えられた。

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：腸管出血性大腸菌 (EHEC) の病原性遺伝子には、志賀毒素 (*stx*) やインチミン (*eae*) などが主として知られているが、これら以外にも多くの推定病原性遺伝子が報告されている。本研究で我々は、推定病原性遺伝子のひとつである *tox*B (*efal*) に着目し、EHEC 株 59 株、EPEC 株 6 株、STEC 株 2 株における本遺伝子の保有状況を調べた。その結果、本遺伝子が EHEC の 0157、026 という血清型に特徴的な遺伝子であることが確認された。これを利用して、本遺伝子を利用した EHEC 0157、026 を一次スクリーニングするための PCR 法を開発した。

研究1)

A. 研究目的

新興型腸炎ビブリオは単一のクローンを起源とし、アジアを中心に世界的な拡大を起こしている。しかしながら、その流行の要因は依然として解明されていない。そこで、本研究では新興型腸炎ビブリオにおいて、O3:K6 血清型株から次々と異なる血清型株が出現し、臨床的に分離されていることに着目した。血清型の変換は宿主の免疫系やファージによる感染を逃れうることから、流行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血清型に関連する遺伝子群の同定し、それにより血清型変換のメカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株：20 の分離株と 43 の血清型参照株の総計 63 株を使用した(表1)。こ

れらの菌株は 11 の O および 53 の K 血清型に分類され、このうち 9 株が新興型腸炎ビブリオで 4 の血清型 (O3:K6 および O4:K68、O1:K25、O1:KUT) に分類される株である。

2) 新興型 O3:K6 株の推定 O:K 抗原関連遺伝子群：一般的に細菌の O 抗原は LPS の O-side chain 領域が認識されているが、腸炎ビブリオについては LPS の core oligosaccharide (core OS) 領域である事が報告されている。また K 抗原は Capsular polysaccharide (CPS) が認識されているが、腸炎ビブリオについてはその詳細は明らかになっていない。そこで、既知の *V. cholerae* O1 の core OS 領域、および O1、O139、O31 の O-side chain 領域と既知の新興型腸炎ビブリオ O3:K6 RIMD2210633 株のゲノム配列間で BLAST による相同性解析を行った。



表1 および抗原関連遺伝子群のPCR-RFLP解析に供試した菌株およびそのlong PCR結果

Strain	O:K Serotype	Year of isolation	Country of isolation	Source	Results of the multiplex PCR			Results of LA-PCR targeting following region;		Experimental no. <sup>a)</sup>
					<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/new</i>	VP0195-VP0214	VP0217-VP0239	
Pandemic strains										
RIMD2210633	O3:K6	1996	Japan	Human	+	-	+	+	+	1
NIID K7	O3:K6	1998	Japan	Human	+	-	+	+	+	2
NIID 59-99	O3:K6	1999	Thailand	Human	+	-	+	+	+	3
NIID 242-200	O4:K68	2000	Korea	Human	+	-	+	+	+	4
KIH 03-57	O4:K68	2003	Japan	Human	+	-	+	+	+	5
DMST 17875	O4:K68	2003	Thailand	Human	+	-	+	+	+	6
AO-24491	O1:K25	1999	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	7
AP-18000	O1:K25	2000	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	8
AN-16000	O1:KUT	1998	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	9
Non-pandemic strains <sup>a)</sup>										
ATCC17802	O1:K1	Unknown	Japan	Human	-	+	-	+	+	10
REF-K25*	O1:K25	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	11
REF-K64*	O1:K64	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	12
REF-K69*	O1:K69	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	13
DMST17876	O1:K56	2003	Thailand	Human	+	-	-	+	+	14
REF-K3*	O2:K3	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	-	-	
REF-O2*	O2:K28	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	-	-	
REF-K4*	O3:K4	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	15
REF-K5*	O3:K5	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	-	16
KE9967	O3:K6	1981	Japan	Human	+	-	-	+	+	
REF-K7*	O3:K7	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	17
REF-K29*	O3:K29	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	18
REF-K30*	O3:K30	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	19
REF-K31*	O3:K31	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	20
REF-K33*	O3:K33	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	21
REF-K37*	O3:K37	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	22
REF-K43*	O3:K43	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	23
REF-K45*	O3:K45	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	24
KE10542	O3:K48	1999	Thailand	Human	-	-	-	+	+	25
REF-K54*	O3:K54	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	26
REF-K58*	O3:K58	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	27
REF-K59*	O3:K59	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	
REF-K65*	O3:K65	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	28
KIH VP19	O4:K4	Unknown	Unknown	Human	-	+	-	+	+	29
KE10538	O4:K8	1999	Thailand	Human	+	-	-	+	+	30
DMST17873	O4:K9	2003	Thailand	Human	+	-	-	+	+	31
REF-K10*	O4:K10	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	32
KIH 03-60	O4:K11	2003	Japan	Food	-	-	-	+	+	33
RIMD2210587	O4:K12	1996	unknown	unknown	+	-	-	+	+	34
REF-K13*	O4:K13	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	35
REF-K42*	O4:K42	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	36
REF-K48*	O4:K49	Unknown	Unknown	Unknown	-	+	-	+	+	37
REF-K53*	O4:K53	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	38
REF-K63*	O4:K63	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	
REF-K15*	O5:K15	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	39
REF-O5*	O5:K17	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	-	40
REF-K60*	O5:K60	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	41
REF-K68*	O5:K68	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	42
REF-O6*	O6:K18	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	-	+	43
REF-K46*	O6:K46	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	-	+	44
REF-O7*	O7:K19	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	45
REF-O8*	O8:K20	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	46
REF-K22*	O8:K22	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	47
REF-K39*	O8:K39	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	48
KE10541	O8:K41	1999	Thailand	Human	+	-	-	+	+	49
REF-K70*	O8:K70	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	
REF-O9*	O9:K23	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	-	+	50
KIH VP28	O10:K19	Unknown	Japan	Human	-	-	-	+	-	51
REF-K52*	O10:K52	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	52
REF-K71*	O10:K71	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	53
REF-K36*	O11:K36	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	54
REF-O11*	O11:K40	Unknown	Unknown	Unknown	-	+	-	+	-	55
REF-K50*	O11:K50	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	-	56
REF-K51*	O11:K51	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	-	

<sup>a)</sup> は血清型参照株

<sup>a)</sup> Experimental numbersは図2の各RFLPパターンに対応している

3) PCR-RFLP: 上記より推定した領域について、血清型との関連性をPCR-RFLPにより解析した。coreOS 相当領域について VP0195F; 5' -GGCTATACATCTTGGCCAGTCGCTACCTA-3' および VP0214R; 5' -GTGT TTCTGGCATCTTCAACTGCGGT-3' O-side chain 相当領域については VP0217-F; 5' -CCCTTTCAGAATCGTCAAT -TCAACAGGC-3' および VP0239R; 5' -CAGTATGTGCACGTCAAATCAACGCAG-3' をプライマーとしてPCRを行い、制限酵素 *Hind*III で切断した。

4) 推定04:K68抗原関連遺伝子群の比較・解析: 上記より推定した抗原関連遺伝子群の塩基配列を新興型腸炎ビブリオ04:K68株NIID242-200(2000年、韓国で分離)を用いて、決定した。決定した配列を03:K6株と比較し、さらに、配列をもとに21のプライマーセットを作製し、PCRにより代表的な血清型株を用い、その保有分布を調べた。

### C. 研究結果

1) 推定推定04:K68抗原関連遺伝子群抗原関連遺伝子群: 図1に示すように *V. cholerae* の core OS 相当領域が新興型腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0214 と O-side chain 相当領域が VP0214-VP0238 と部分的に相同性がみられた。そこで、様々な血清型株を用いて、PCR-RFLP 解析を行った結果、PCRにより増幅できなかった株がみられたものの(表1)、*V. cholerae* の core OS 相当領域はO血清型とO-side chain 相当領域はK血清型と相関がみられた(図2)。以上から、この領域を新興型腸炎ビブリオ03:K6株の推定抗原関連遺伝子群とした。

2) 推定04:K68抗原関連遺伝子群との比較: 新興型04:K68株の推定O:K抗原関連遺伝子群を決定した。決定した配列は、DNAData Bank of Japan に登録されている (Accession number AB353134)。03:K6抗原関連遺伝子群と比較した結果、図3AのようにOおよびKの各抗原関連遺伝子

群両端に相同性がある領域が認められたものの、その他の領域に関しては、相同性が全くあるいはほとんどみられなかった。以上から、04:K68株の出現において、この領域で大規模なDNA配列の変換が起こっている事が明らかになった。

3) 推定04:K68抗原関連遺伝子群の保有分布: 上記で決定した配列をもとに図3Bのように21のプライマーセットを設計し、PCRによりその保有分布を調べた結果、他の04血清型株および05:K68株において、04:K68株のO抗原およびK抗原関連遺伝子群と類似した遺伝子群を保有していると考えられた(表2)。以上から、水平伝播を介し、他の血清型株(あるいは他菌種)から相同組み替えによりこれらの遺伝子領域が外来の遺伝子領域と入れ替わり、新興型04:K68株が出現したと考えられた。

### D. 考察

新興型腸炎ビブリオ03:K6株 RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0214 間 (*V. cholerae* の core OS 相当領域) が O 抗原と VP0214-VP0238 間 (*V. cholerae* の O-side chain 相当領域) が K 抗原と関連していると考えられ、この領域が水平伝播を介して相同組み替えにより変換する事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオ株が出現していると考えられた。

### E. 結論

- ・ RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0238 間が 03:K6 血清型に関連することを明らかにし、04:K68 株における同領域の塩基配列を決定した。
- ・ 本研究で同定した推定 O:K 抗原関連遺伝子群が入れ替わる事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオが出現していることが示唆された。

### F. 健康危機情報

新興型腸炎ビブリオは今後も新たな血清型の出現が予想される。

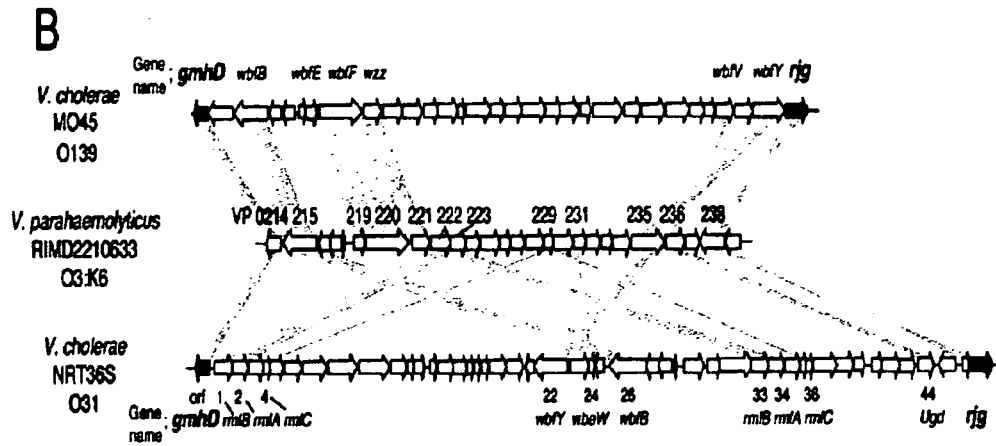


図1 新興型腸炎ビブリオO3:K6株RIMD2210633と *V. cholerae* のcore OS関連遺伝子領域およびO-side chain関連遺伝子群の比較  
矢印はORFを表している。黒塗りの矢印は*coaD*、*gmhD*、*rjg*遺伝子を示す。灰色領域は相同性がある事を示している。

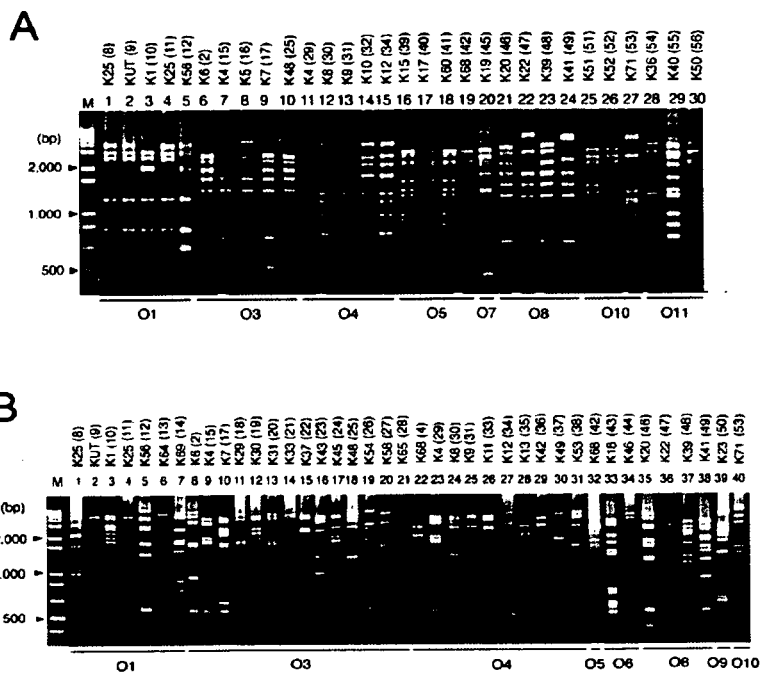


図2 OおよびK抗原関連遺伝子群候補領域のRFLP解析

試験した菌株のK血清型をレーン番号の上に表示した。なお、括弧内の数字は表9の Experimental no. に対応している。また、横線は同一O血清型に属する事を示している。

A: *V. cholerae* のcore OS関連遺伝子遺伝子群に相当する領域

B: *V. cholerae* のO-side chain関連遺伝子遺伝子群に相当する領域

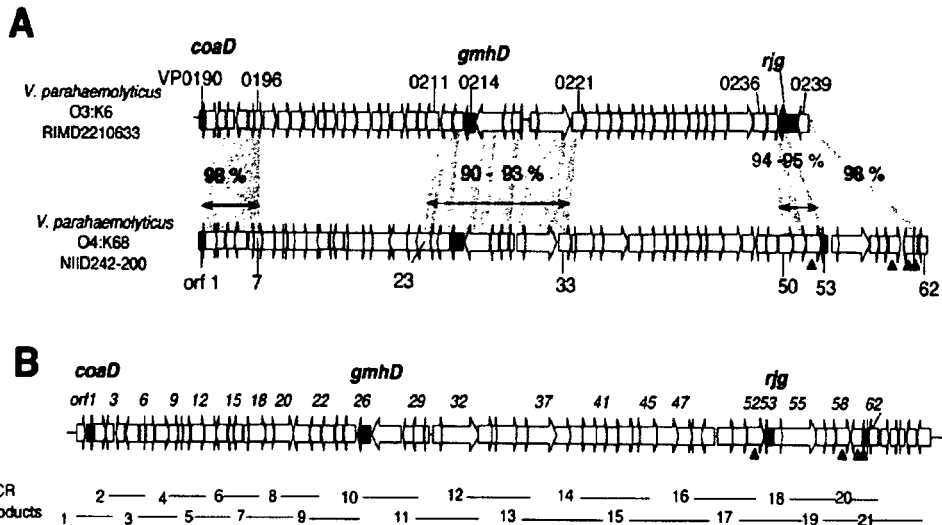


図3 新興型腸炎ビブリオO4:K68株 NIID242-200の推定OおよびK抗原関連遺伝子群

A: 新興型腸炎ビブリオO3:K6株RIMD2210633の同遺伝子群との比較

灰色領域は相同性がある事を示す。黒塗り三角の示すORFはtransposaseをコードしている。

B: O4:K68遺伝子群のPCRによる解析に使用したプライマーの位置

表2 PCRによる推定O4:K68抗原関連遺伝子群の様々な血清型株における保有分布試験に使用した菌株およびその結果

Stain	O:K serotype	Results of PCR assays with following primer pairs <sup>a</sup> :																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Pandemic strains																						
RIMD2210633	O3:K6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NIID 242-200	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KIH 03-57	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMST 17875	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AO-24491	O1:K25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AP-18000	O1:K25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
AN-18000	O1:KUT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Non-pandemic strains																						
ATDC17802	O1:K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K25	O1:K25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K3	O2:K3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-O2	O2:K23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K29	O3:K29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
KIH VP19	O4:K4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KE10538	O4:K8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMST17873	O4:K9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K10	O4:K10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KIH 03-60	O4:K11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIMD 2210587	O4:K12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K13	O4:K13	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K42	O4:K42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K63	O4:K63	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K15	O5:K15	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-O5	O5:K17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K68	O5:K68	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O6	O6:K18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K46	O6:K46	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-O7	O7:K19	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-O8	O8:K20	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
KE10541	O8:K41	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-O9	O9:K23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K52	O10:K52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K71	O10:K71	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K38	O11:K38	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
REF-K50	O11:K50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

<sup>a</sup> 図3のプライマーセットが増幅する領域

<sup>b</sup> O4:K68株よりも産物サイズが1.3 kbp小さかった。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arakawa, E., and Watanabe, H.: Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* (印刷中)

### 2) 学会発表

大倉正稔、徳永暁彦、大澤朗：「新興型 04:K68 株の抗原性に関連する遺伝子群の解析」第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)

大倉正稔、大澤朗、徳永暁彦、森田昌知、荒川英二、渡邊治雄：「新興型腸炎ビブリオ 03:K6 株と 04:K68 株の O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群の比較解析」第 41 腸炎ビブリオシンポジウム (2007. 11)

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arakawa, E., and Watanabe, H.: Comparative and genetic analyses of the putative O and K-antigen gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group 03:K6 and 04:K68 strain, 42th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, at Hyatt Regency Hotel Austin, Abstract p. 62-65 (2007. 12).

## 研究 2)

### A. 研究目的

志賀毒素産生大腸菌 (STEC)、特にそのうち Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) と呼ばれているグループは、軽い下痢から血便・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。また、EHEC 感染症を引き起こす菌株については、血清型による特徴も報告されている。過去数年間、本菌による食中毒事例は大部分が EHEC 0157 によるものであった。しかしながら、近年になって EHEC 026 による事例が増加傾向にあり、まだまだ 0157 による事例が多いものの、EHEC 026 による被害も軽視できないものとなっている。

これらの背景を受け、昨年 11 月に厚生労働省より EHEC 026 を検査対象に含めた新たな衛生管理法が制定された (厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長発行第 1102004 号)。このことから、現在 EHEC 0157 と 026 を同時に検出する簡便で迅速な手法が求められているが、現在のところそのような検出法は確立されていない。また、我々は昨年度の研究で、EHEC 0157 に特異的な DNA 断片を検出した。その DNA 断片の塩基配列を決定したところ、*toxB* (または「*efal*」と呼称) というプラスミド上に存在する遺伝子であることを明らかにしたが、今年度は 0157 と 026 間で相同性の高い *toxB* 領域に着目して EHEC 0157 と 026 を一括して検出できる PCR 法の開発を試みた。

### B. 研究方法

1) 供試菌株 : EHEC 株 61 株、並びに EHEC 0157 と系統的に近い血清型とされる Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) 055 株 6 株の計 67 株 (Table1) を使用した。

2) PCR による *toxB* の分布解析 : GenBank に登録されている EHEC 0157:H7 str. Sakai の塩基配列データ (accession no. AB011549) を参考に、大きさ約 9.5kb の *toxB* を約 1kb ごとに分割した。次に、それら各々の領域におけるプライマーを製作し、67 株病原性大腸菌について PCR を行い本遺伝子の分布を調べた。

3) シークエンス解析 : EHEC 026:H11 str.

HW1(961244)より抽出したDNAをテンプレートとし、*toxB*のシークエンス解析を行った。まず、2)においてPCR産物が確認された領域のPCRを再度行い、得られた産物をHigh Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Germany)を用いて精製した。精製したDNAをpGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI.)にクローン化、目的のDNA断片をBigDye terminator cycle sequencing kit v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)を用いてシークエンス反応させ、ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によりシークエンスを決定した。2)において増幅が見られなかった5'末端側の配列はHindIIIを用いたinverse PCRにより決定した。3'末端側の配列は、*E. coli* O157:H7 str. Sakaiの塩基配列データを参考に作製した*toxB*の外側領域におけるプライマー*toxB* 65493-65510 (5' -CCGCATACAGGA AATCAG-3')及び2)の*toxB*7F (5' -TTGGATTATCAGATGGGAGG-3')を用いたPCRにより増幅された産物をPCRウオーキングすることにより決定した。得られたシークエンスは、GenBank及びEMBLに登録されている*E. coli* O157:H7 str. Sakaiの*toxB*の塩基配列と相同性解析に使用した。

4) EHEC O157・O26を一括検出するPCR法の確立：GenBankに登録されている*E. coli* O157:H7 str. Sakai、及び今回我々が決定した*E. coli* O26:H11 str. HW1(961244)の*toxB*の塩基配列データをもとに、O157とO26を一括して増幅できるプライマー(*toxB*O157/26-sp F : CTCATGGGCTGTCA -GAAA、及び*toxB*O157/26-sp R : ACATGATATAACCT CTCGGAG)を設計し、供試菌株67株におけるPCR増幅確認を行った。

### C. 研究結果

本研究で行った*toxB*の分布解析において、EHEC O157株では全ての領域で全株の増幅が見られたことから、本遺伝子がEHEC O157で安定して保有されているこ

とが明らかとなった(Table 1)。他方、本遺伝子はEHEC O157以外にもEHEC O26やEHEC O121にも存在しており、特にEHEC O26では、高度に保存されている可能性が示唆された。

上記の所見より我々は、EHEC O26の保有する*toxB*がEHEC O157のものとの程度異なるのかを調べるため、EHEC O26:H11 str. HW1(961244)株の*toxB*の塩基配列を決定した。その結果、EHEC O26が保有する*toxB*は、EHEC O157のものと同等の大きさ(9501bp)であり、相同性は塩基配列レベルで91%、アミノ酸レベルで89%と非常に高いことが示された。そこで、本遺伝子を利用したEHEC O157とO26の一括検出系の確立を試みた。今回設計したプライマーを用いて、供試菌株67株における増幅の有無を調べたところ、目的としているEHEC O157とO26の全株で産物が確認された。一方、本PCRにおいては、意図していない血清型株であるEHEC O121においても4株中3株において産物が確認された(Table 2)。

### D. 考察

本研究で行った*toxB*の分布解析より、本遺伝子はEHEC O157のみならず、EHEC O26, O121にも存在していることが明らかとなった。また、EHEC O26株を用いた*toxB*のシークエンス解析から、EHEC O157とO26間における本遺伝子の相同性は非常に高いことが明らかとなった。

現在、我が国におけるEHEC感染症の大部分は、EHEC O157とO26の2つの血清型によって引き起こされているが、この原因については未だ解明されていない。*toxB*は、EHECの宿主細胞への接着性に関与していることが示唆されている(Tatsuno et al., Infect. Immun., 68:5943-5952 [2000])。これらのことから、*toxB*はEHECの接着性を増強される機能を有しており、その結果、EHEC O157やO26は他の血清型よりも強い病原性を引き起こしているのではないかという可能性が示された。今後はこの点にも注目して更なる解析を行う予定である。

Table 1. *toxB* の分布解析の結果

QuickTime<sup>®</sup> C<sup>2</sup>  
 TIFFFAJjQaekAj @LiEÉvÉçÉOÉaÉÄ  
 Ç™Ç±ÇÄÉsÉNE`EEÇ¼a@ÇÉÇZÇ¼Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇAB

Table 2. EHEC O157・O26 検出用 PCR の結果

QuickTime<sup>®</sup> C<sup>2</sup>  
 TIFFFAJjQaekAj @LiEÉvÉçÉOÉaÉÄ  
 Ç™Ç±ÇÄÉsÉNE`EEÇ¼a@ÇÉÇZÇ¼Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇAB

E. 結論

EHEC O157 と O26 の *toxB* において相同性の高い遺伝子領域を標的としたプライマーセットを用いて PCR によって暫定的な EHEC O157・O26 の一括検出が可能となった。

F. 健康危機情報

過去に EHEC O157 を検出するための手法に関しては多くの報告があるが、O26 を含めた検出系の報告はほとんどなされていない。本研究で開発された PCR 法は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長発行第 1102004 号の定めるところの EHEC O157 と O26 の検出において、有用な一次スクリーニング手法と考えられる。

G. 研究発表

1) 論文発表

Tokunaga, A., Kawano, M., Okura, M., Iyoda, S., Watanabe, H., and Osawa, R. : Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157-specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiology and Immunology*, 51(9) :883-888(2007)

2) 学会発表

徳永 暁彦、川野 雅典、大倉 正稔、大澤 朗 : AFLP 解析より検出された腸管出血性大腸菌 O157 に特異的な DNA 断片の同定、第 80 回日本細菌学会総会、日本細菌学会誌 62 巻 1 号、p. 182(大阪 ATC ホール) (2007. 3)

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

平成 19 年度 分担研究報告書

研究課題名：「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 コレラ菌の新しい疫学マーカーの開発を目的として、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 ベースで行える簡便で迅速な分子疫学的解析法の開発を試みた。いくつかのコレラ菌（01、0139 及び non-01, non-0139）の SI 領域の塩基配列を解析し、得られた結果と既に報告されているコレラ菌の SI 領域の塩基配列も含め相同性を比較した。その結果、01 古典型コレラ菌および 01 エルトール型コレラ菌のビブリオリコレラピート（VCR）の相同性の高い領域とインテグラーゼをコードした遺伝子領域から PCR-RFLP 用のプライマーを設計し、PCR-RFLP を行った。その結果、01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株及び NAG ビブリオ 50 株をそれぞれ 9、3、6 及び 7 タイプに型別できた。さらに昨年度報告した RAPD を組み合わせると、11、10、7 及び 41 に型別することができた。一方、PFGE では、11 タイプと 15 サブタイプ、3 タイプと 18 サブタイプ、2 タイプと 20 サブタイプ、47 タイプと 1 サブタイプにそれぞれ型別できた。以上の結果より、SI 領域を標的とした RAPD と PCR-RFLP を組み合わせた場合、PFGE にも勝るとも劣らない解像度を得ることができた。

A. 研究目的

アジアやアフリカにおいては、コレラは今日なお、致死率の高い病気であり、特に乳幼児において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からもコレラが発生し、その対策が求められている。感染源や感染経路を特定する為の菌の分子疫学的解析法として PFGE が繁用されている。しかしながら、PFGE には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、より簡便で迅速な分子疫学

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）領域の多様性に着目し、SI 領域を標的とした種々の PCR プライマーを設計し、PCR-RFLP 法を開発を試みた。さらに、開発した PCR-RFLP 法を様々なコレラ菌を用いて解析し、PFGE で得られた結果と比較した。

B. 研究方法

1. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

昨年度までの取り組みに引き続き、01 古典型コレラ菌 C19385 株、0139 コレラ菌 VC406 株及び NAG ビブリオ（NAG）X79 株の SI 領域のそれぞれ、約 7 kb、80 kb 及び 20 kb に相当する塩基配列を解析した。01 古典型 C19385



株と 0139 コレラ菌 VC406 株については PCR 産物を、NAG、X79 株についてはクローニングした遺伝子断片の塩基配列を解析した。X79 株の染色体 DNA を精製し、*Sau3AI* で切断後約 30~40 kb 断片の遺伝子をコスミドベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換した。得られたコロニーを  $^{32}\text{P}$  で標識した X79 株の VCR と *intI4* 遺伝子断片を DNA プローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、SI 領域の遺伝子を含むクローンを検出した。コロニーハイブリダイゼーションで陽性となったクローンのプラスミド DNA を精製後、Big Dye Terminator を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、BLAST と FASTA を用いて解析した。

## 2. PCR-RFLP 法の開発とコレラ菌の型別

得られた塩基配列及び 01 エルトール型コレラ菌 N16961 株と 01 古典型コレラ菌 0395 株の SI 領域を比較し、約 7~14 kb の SI 領域を増幅できる PCR プライマーを 21 組設計した。この 21 組の PCR プライマーを用いて、本実験の代表菌株として用いた 01 エルトール 6 株 (N16961 株、VC2 株、CRC148 株、AI-091 株、AL30457 株、GP156 株)、01 古典型 5 株 (569B 株、CL504 株、CL614 株、L362 株、C19385 株)、0139 コレラ菌 2 株 (VC406 株、AP32549 株)、NAG4 株 (SG6 株、CRC24 株、SCE4 株、X79 株) を含む 01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株、NAG、50 株から合計 5~50 株選び PCR プライマーの評価を行った。最も増幅率の高かった PCR プライマーの組み合わせ (IntU-312R) を用いて、01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレ

ラ菌 54 株と NAG、50 株全てについて本 PCR-RFLP 法にて解析した。得られた PCR 産物を *BglII* で消化し、切断パターン (RFLP) を解析し、コレラ菌を型別した。得られた PCR 産物及び酵素消化物は 2%アガロースゲル電気泳動で解析した。

## 3. PFGE によるコレラ菌の型別

先に述べた 01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株と NAG、50 株全てについて PFGE で解析した。それぞれのコレラ菌を L-寒天培地上で培養後 CDC が推奨している簡便法によりアガロースプラグを作製した。得られたアガロースプラグは *NotI* で 3 時間消化後、CHEF Mapper を用いて解析をした。PFGE の条件はオートアルゴリズムモード 20~300 kb で解析した。得られた切断断片は Tenover の定義に基づき型別した。

## C. 結果

### 1. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

01 古典型コレラ菌 C19385 株、0139 コレラ菌 VC406 株及び NAG、X79 株の SI 領域のそれぞれ、約 5 kb、80 kb 及び 20 kb に相当する塩基配列を解析した。その結果、C19385 株 (01 古典型) は *intI4* を含む約 5 kb の領域は、N16961 株 (01 エルトール型) と極めて相同性が高かったが、N16961 株と比べ *intI4* に近接した 2 つの ORF が欠損していた。0139 コレラ菌の SI は、N16961 株のそれと比べて約 98% 以上の相同性があった。SI 領域を 11 当分にした、領域 5-7 で本来約 34 kb の増幅断片が得られる領域で、0139 コレラ菌では少なくとも約 7.9 kb の増幅断片が得られた。この遺

伝子断片の塩基配列を解析したところ、領域 5 に一致した ORF が認められた。一方、X79 株 (NAG) については、領域 5、7 や 9 の ORF が混在したモザイク様構造をしていた。さらに、*V. metschnikovii* の *intI* 遺伝子と相溶性のある遺伝子も見つかった。

## 2. PCR-RFLP の開発とコレラ菌の型別

01 エルトール型コレラ菌 N16961 株と 01 古典型コレラ菌 0395 株の SI 領域を比較し、*intI4* 遺伝子から VCR まで、あるいは VCR 間の約 7~14 kb の SI 領域を増幅できる PCR プライマーを 21 組設計し、01 エルトール型、01 古典型及び 0139 コレラ菌を 5 株から 50 株用いて PCR を行った。その結果、01 エルトール型で高率に増幅断片が得られたもの、あるいは古典型 01 コレラ菌で比較的高率に増幅断片が得られたものが見つかったが、両方で高率に増幅断片が得られたものは、IntU と 312R の PCR プライマー 1 組しか見つからなかった。この PCR プライマーを用いて合計 226 株のコレラ菌 (01 エルトール型 94 株、01 古典型 28 株、0139 コレラ菌 54 株、NAG、50 株) を用いて PCR-RFLP 解析を行ったところ、94 株の 01 エルトールから 86 株で PCR 産物が得られ、PCR-RFLP では 9 タイプに分類された (表 1)。01 古典型では、28 株中 24 株で PCR 産物が得られ、3 タイプに分類された (表 2)。0139 コレラ菌では、54 株中、39 株で増幅断片が得られて、6 タイプに分類することができた (表 3)。NAG では、50 株中 25 株で増幅断片が得られて、7 タイプに分類することができた (表 4)。

## 3. PFGE によるコレラ菌の型別

本実験に供した全てのコレラ菌 226 株について、PFGE による解析を行った。その結果、*NotI* 消化で 94 株の 01 エルトール型は 11 タイプと 15 サブタイプに、28 株の 01 古典型は 3 タイプと 18 サブタイプに、0139 コレラ菌は 2 タイプと 20 サブタイプに、NAG は 47 タイプと 1 サブタイプに分類することができた。

## D. 考察

本年度の研究において、コレラ菌の SI 領域の塩基配列の解析をさらに進め、SI 領域を標的とした PCR-RFLP 法の開発を試みた。また、01 エルトール型コレラ菌 94 株、01 古典型コレラ菌 28 株、0139 コレラ菌 54 株及び NAG、50 株を用いて PFGE による型別を行い、本 PCR-RFLP 法による解析結果と昨年度報告した RPAD 法との結果を比較した。本 PCR-RFLP 法単独では、01 エルトール型コレラ菌 94 株が 9 タイプ、01 古典型コレラ菌 28 株が 3 タイプ、0139 コレラ菌 54 株が 6 タイプ、NAG、50 株では PCR で増幅される株が少なく 7 タイプにしか型別できなかつた。一方、PFGE では、01 エルトール型コレラ菌 94 株が 11 タイプと 15 サブタイプに、01 古典型コレラ菌 28 株が 3 タイプと 18 サブタイプに、0139 コレラ菌 54 株が 2 タイプと 20 サブタイプに、NAG、50 株が 47 タイプと 1 サブタイプに型別することができた。昨年度報告した RAPD では、01 エルトール型コレラ菌 94 株は 5 タイプに、01 古典型コレラ菌 28 株は 9 タイプに、0139 コレラ菌 54 株は 2 タイプに、NAG、50 株は 37 タイプに型別された。これらの結果を総合すると SI 領域を標的とした PCR ベー

スの簡便・迅速な分子疫学的手法は PFGE よりも優れた解像度を得る場合があることもわかった。すなわち表に示したように、PFGE では同じタイプに属したのもでも 01 エルトール型や 0139 コレラ菌の場合、PCR-RFLP 法でさらに型別されたものや、01 古典型では RAPD でさらに型別されたものも存在した。また、RAPD と PCR-RFLP 法を組み合わせた場合は、全ての種類のコレラ菌に対して PFGE に勝るとも劣らない高い解像度を示した。

#### E. 結論

コレラ菌の SI 領域は、NAG 間のみならず 01 エルトール型コレラ菌間、01 古典型コレラ菌間や 0139 コレラ菌間においても多様性があり、SI 領域を標的とした PCR-RFLP 法と RPAD を組み合わせることで、コレラ菌の解析において PFGE に勝るとも劣らない解像度が得られることがわかった。これらの方法は、PFGE のような特殊な機器を必要とせず、PCR と電気泳動装置を有する研究室であれば迅速・簡便にコレラ菌の分子疫学的解析を行うことができる。よって、我が国のみならず開発途上国においても有益な手法であると考えられる。

#### F. 健康危害情報

特に該当なし。

#### G. 研究発表

- 1) P. Tapchaisri, M. Na-Ubol, W. Tiyasuttipan, S.C. Chaiyaroj, S. Yamasaki, T. Wongsaroj, H. Hayashi, G.B. Nair, M. Chomgsa-Nguan, H. Kurazono and W. Chaicumpa. Molecular typing of *Vibrio cholerae* 01 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. J. Health Popul. Nutr., in press.
- 2) P. Tapchaisri, M. Na-ubol, J. Jaipaew, P. Srimanote, M. Chongsa-nguan, S. Yamasaki, H. Hayashi, G.B. Nair, H. Kurazono, and W. Chaicumpa. Virulence genes of clinical *Vibrio cholerae* 01 isolates in Thailand and ribotypes. J. Infect., 55: 557-565, 2007.
- 3) J. Okuda, T. Ramamurthy and S. Yamasaki. Antibacterial activity of ciprofloxacin against clinical strains of *Vibrio cholerae* 0139 recently isolated from India. Yakugaku Zasshi, 127: 903-904, 2007.
- 4) J. Okuda, S. Yamasaki, T. Ramamurthy and K. Sato. The potent antibacterial activity of sifloxacillin against fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Vibrio cholerae* 01. Microbiol. Immunol., 51: 467-469, 2007.

表1、01 エルトール型コレラ菌の解析比較

PFGE	PFGE	AFLP	RFLP
P1 (11)	P1a (1)	E1 (1)	A1 (1)
	P1b (7)	E1 (7)	A5 (7)
	P1c (2)	E1 (2)	A5 (2)
	P1d (1)	E1 (1)	A5 (1)
P2 (1)	P2 (1)	E2 (1)	NA (1)
P3 (1)	P3 (1)	E1 (1)	A4 (1)
P4 (1)	P4 (1)	E1 (1)	A4 (1)
P5 (1)	P5 (1)	E1 (1)	A3 (1)
P6 (1)	P6 (1)	E3 (1)	A2 (1)
P7 (64)	P7a (1)	E1 (1)	A4 (1)
	P7a (2)	E1 (2)	A6 (2)
	P7a (21)	E1 (21)	A5 (21)
P7b (26)	P7b (1)	E1 (1)	A4 (1)
	P7b (20)	E1 (20)	A5 (20)
	P7b (3)	E1 (3)	A6 (3)
	P7b (2)	E1 (2)	NA (2)
	P7c (9)	E1 (9)	A5 (9)
	P7d (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P7e (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P7f (2)	E1 (2)	A5 (2)
	P7g (1)	E1 (1)	A5 (1)
P8 (7)			
P8a (4)	P8a (1)	E1 (1)	A4 (1)
	P8a (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P8a (1)	E1 (1)	NA (1)
	P8a (1)	E4 (1)	A7 (1)
	P8b (1)	E1 (1)	NA (1)
	P8c (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P8d (1)	E1 (1)	NA (1)
P9 (5)			
P9a (2)	P9a (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P9a (1)	E1 (1)	A8 (1)
	P9b (1)	E5 (1)	A7 (1)
	P9c (1)	E1 (1)	A5 (1)
	P9d (1)	E1 (1)	NA (1)
P10 (1)	P10 (1)	E1 (1)	NA (1)
P11 (1)	P11 (1)	E1 (1)	A5 (1)

AFLP	AFLP	PFGE	RFLP
E1 (90)	E1 (1)	P1a (1)	A1 (1)
	E1 (7)	P1b (7)	A5 (7)
	E1 (2)	P1c (2)	A5 (2)
	E1 (1)	P1d (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P3 (1)	A4 (1)
	E1 (1)	P4 (1)	A4 (1)
	E1 (1)	P5 (1)	A3 (1)
	E1 (1)	P7a (1)	A4 (1)
	E1 (2)	P7a (2)	A6 (2)
	E1 (21)	P7a (21)	A5 (21)
	E1 (1)	P7b (1)	A4 (1)
	E1 (20)	P7b (20)	A5 (20)
	E1 (3)	P7b (3)	A6 (3)
	E1 (2)	P7b (2)	NA (2)
	E1 (9)	P7c (9)	A5 (9)
	E1 (1)	P7d (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P7e (1)	A5 (1)
	E1 (2)	P7f (2)	A5 (2)
	E1 (1)	P7g (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P8a (1)	A4 (1)
	E1 (1)	P8a (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P8a (1)	NA (1)
	E1 (1)	P8b (1)	NA (1)
	E1 (1)	P8c (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P8d (1)	NA (1)
	E1 (1)	P9a (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P9a (1)	A8 (1)
	E1 (1)	P9c (1)	A5 (1)
	E1 (1)	P9d (1)	NA (1)
	E1 (1)	P10 (1)	NA (1)
	E1 (1)	P11 (1)	A5 (1)
E2 (1)	E2 (1)	P2 (1)	NA (1)
E3 (1)	E3 (1)	P6 (1)	A2 (1)
E4 (1)	E4 (1)	P8a (1)	A7 (1)
E5 (1)	E5 (1)	P9b (1)	A7 (1)