

表 2, 01 古典型コレラ菌の解析比較

PFGE (28)	PFGE	AFLP	RFLP
Q1 (13)			
Q1a (4)	Q1a (1)	C1 (1)	D1 (1)
	Q1a (3)	C4 (3)	D1 (3)
	Q1b (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1c (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1d (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1e (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1f (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1g (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q1h (1)	C8 (1)	D1 (1)
Q2 (3)	Q2a (1)	C2 (1)	D1 (1)
	Q2b (1)	C2 (1)	D1 (1)
	Q2c (1)	C2 (1)	D1 (1)
	Q2d (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q2e (1)	C5 (1)	D1 (1)
	Q2f (1)	C5 (1)	D1 (1)
	Q2g (1)	C4 (1)	D1 (1)
	Q2h (3)	C4 (3)	D2 (3)
	Q2i (1)	C4 (1)	D1 (1)
Q3 (5)			
Q3a (3)	Q3a (1)	C3 (1)	D1 (1)
	Q3a (1)	C6 (1)	NA (1)
	Q3a (1)	C7 (1)	NA (1)
Q3b (2)	Q3b (1)	C6 (1)	NA (1)
	Q3b (1)	C9 (1)	NA (1)

表 3, 0139 コレラ菌の解析比較

PFGE	PFGE	AFLP	RFLP
R1 (52)			
R1a (13)	R1a (1)	B1 (1)	F1 (1)
	R1a (2)	B1 (2)	F2 (2)
	R1a (7)	B1 (7)	F3 (7)
	R1a (1)	B1 (1)	F4 (1)
	R1a (2)	B1 (2)	NA 2)
	R1b (1)	B1 (1)	NA (1)
R1c (3)	R1c (1)	B1 (1)	F1 (1)
	R1c (2)	B1 (2)	F3 (2)
R1d (7)	R1d (1)	B1 (1)	F1 (1)
	R1d (3)	B1 (3)	F3 (3)
	R1d (3)	B1 (3)	NA (3)
R1e (8)	R1e (4)	B1 (4)	F3 (4)
	R1e (1)	B1 (1)	F4 (1)
	R1e (3)	B1 (3)	NA (3)
R1f (2)	R1f (1)	B1 (2)	F1 (1)
	R1f (1)	B1 (1)	F4 (1)
	R1g (1)	B1 (1)	NA (1)
	R1h (1)	B1 (1)	NA (1)
R1i (4)	R1i (2)	B1 (2)	F1 (1)
	R1i (2)	B1 (2)	F2 (2)
	R1j (1)	B2 (1)	F1 (1)
	R1k (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1l (1)	B1 (1)	NA (1)
	R1m (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1n (1)	B1 (1)	F1 (1)
	R1o (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1p (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1q (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1r (1)	B1 (1)	F4 (1)
	R1s (1)	B1 (1)	NA (1)
	R1t (1)	B1 (1)	F3 (1)
	R1u (1)	B1 (1)	NA (1)
R2 (2)	R2 (2)	B1 (2)	NA (2)

表4. Non-O1, non-O139 コレラ菌の解析比較

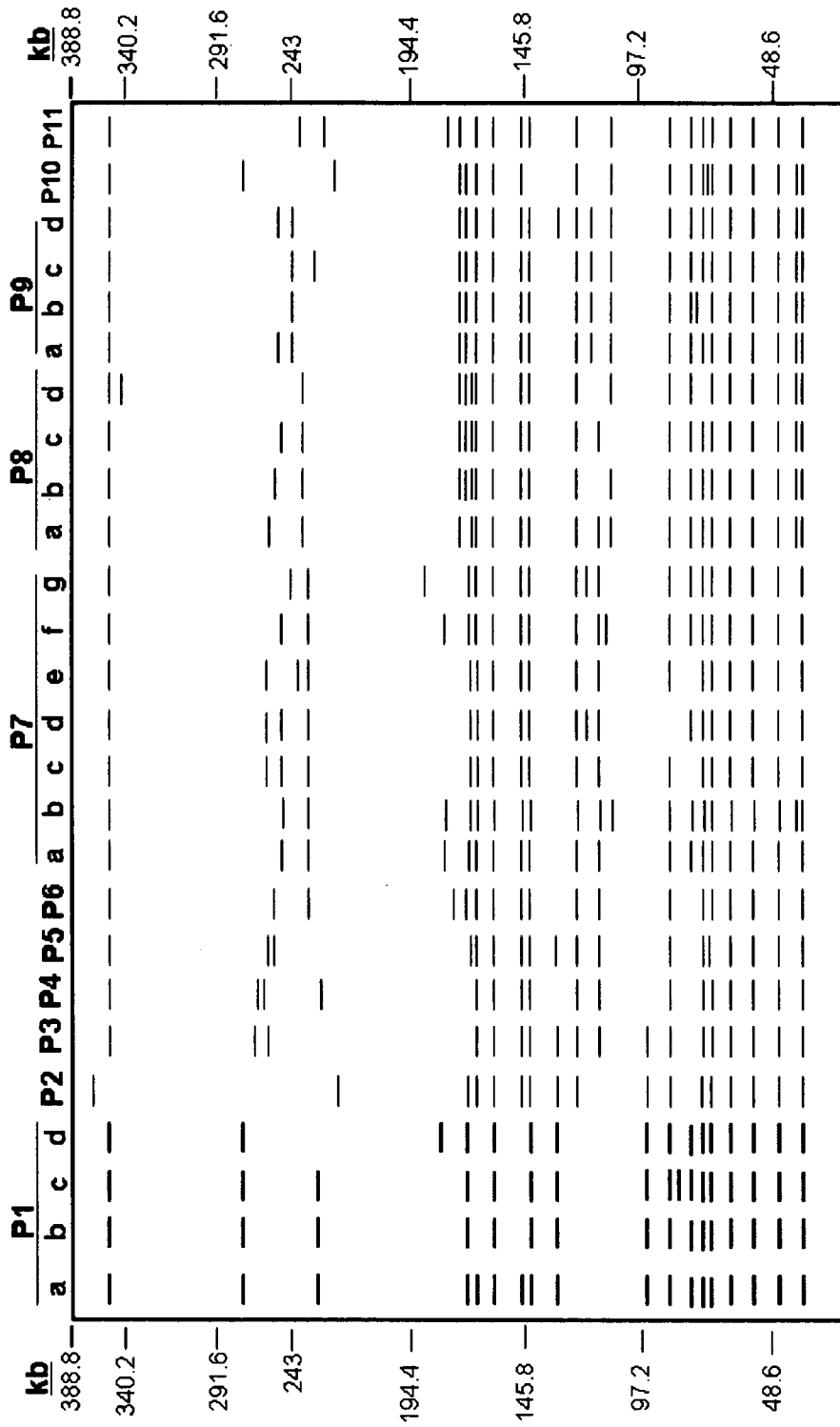
PFGE	PFGE	AFLP	RFLP
	S1 (3)	N1 (3)	NA (3)
	S2 (1)	N2 (1)	NA (1)
S3 (2)	S3a (1)	N4 (1)	NA (1)
	S3b (1)	N4 (1)	NA (1)
	S4 (1)	N5 (1)	NA (1)
	S5 (1)	N7 (1)	NA (1)
	S6 (1)	N5 (1)	n5 (1)
	S7 (1)	N3 (1)	NA (1)
	S8 (1)	N6 (1)	NA (1)
	S9 (1)	N8 (1)	NA (1)
	S10 (1)	N6 (1)	NA (1)
	S11 (1)	N6 (2)	NA (1)
	S12 (1)	N22 (1)	NA (1)
	S13 (1)	N9 (1)	NA (1)
	S14 (1)	N10 (1)	NA (1)
	S15 (1)	N11 (1)	NA (1)
	S16 (1)	N12 (1)	NA (1)
	S17 (1)	N1 (1)	NA (1)
	S18 (1)	N14 (1)	NA (1)
	S19 (1)	N13 (1)	n6 (1)
	S20 (1)	N15 (2)	NA (1)
	S21 (1)	N17 (1)	n1 (1)
	S22 (1)	N19 (1)	n1 (1)
	S23 (1)	N20 (1)	n2 (1)
	S24 (1)	N21 (1)	NA (1)
	S25 (1)	N23 (1)	n1 (1)
	S26 (1)	N25 (1)	n1 (1)
	S27 (1)	N26 (1)	n1 (1)
	S28 (1)	N27 (1)	n1 (1)
	S29 (1)	N28 (1)	n4 (1)
	S30 (1)	N29 (1)	n1 (1)
	S31 (1)	N5 (1)	n1 (1)
	S32 (1)	N31 (1)	n1 (1)
	S33 (1)	N32 (1)	n1 (1)
	S34 (1)	N33 (1)	n1 (1)
	S35 (1)	N30 (1)	n1 (1)
	S36 (1)	N21 (1)	n1 (1)
	S37 (1)	N34 (1)	n1 (1)
	S38 (1)	N35 (1)	n3 (1)
	S39 (1)	N36 (1)	n1 (1)
	S40 (1)	N37 (1)	n1 (1)
	S41 (1)	N33 (1)	n1 (1)
	S42 (1)	N16 (1)	NA (1)
	S43 (1)	N18 (1)	n1 (1)
	S44 (1)	N24 (1)	n1 (1)
	S45 (1)	N30 (1)	NA (1)
	S46 (1)	N30 (1)	n1 (1)

	S47 (1)	N30 (1)	NA (1)
--	---------	---------	--------

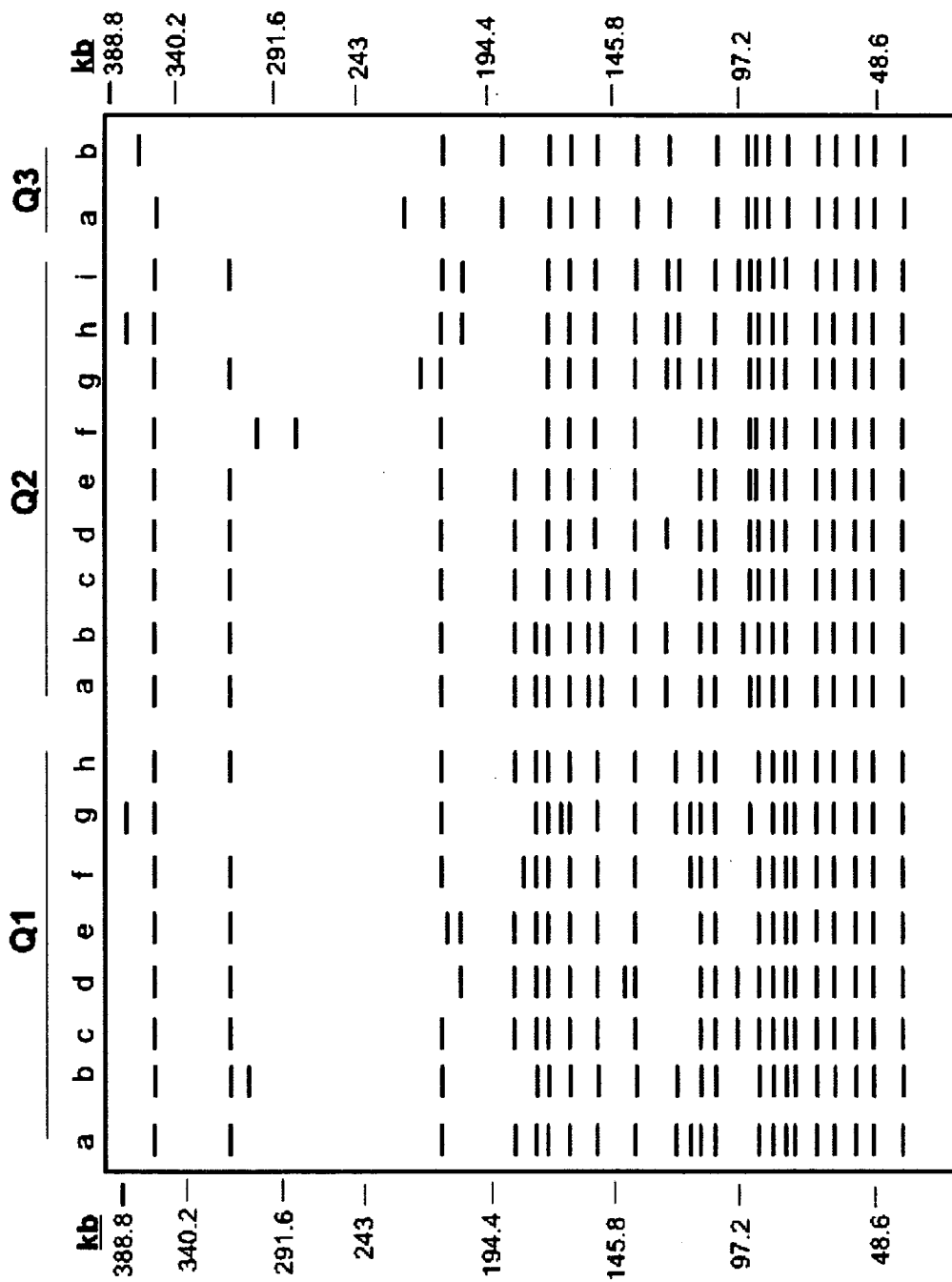
AFLP	AFLP	PFGE	RFLP
N1 (11)	N1 (3)	S1 (3)	NA (3)
	N1 (1)	S17 (1)	NA (1)
	N2 (1)	S2 (1)	NA (1)
	N3 (1)	S7 (1)	NA (1)
N4 (2)	N4 (1)	S3a (1)	NA (1)
	N4 (1)	S3b (1)	NA (1)
N5 (3)	N5 (1)	S4 (1)	NA (1)
	N5 (1)	S6 (1)	n5 (1)
	N5 (1)	S31 (1)	n1 (1)
N6 (4)	N6 (1)	S8 (1)	NA (1)
	N6 (1)	S10 (1)	NA (1)
	N6 (2)	S11 (1)	NA (1)
	N7 (1)	S5 (1)	NA (1)
	N8 (1)	S9 (1)	NA (1)
	N9 (1)	S13 (1)	NA (1)
	N10 (1)	S14 (1)	NA (1)
	N11 (1)	S15 (1)	NA (1)
	N12 (1)	S16 (1)	NA (1)
	N13 (1)	S19 (1)	n6 (1)
	N14 (1)	S18 (1)	NA (1)
	N15 (2)	S20 (1)	NA (1)
	N16 (1)	S42 (1)	NA (1)
	N17 (1)	S21 (1)	n1 (1)
	N18 (1)	S43 (1)	n1 (1)
	N19 (1)	S22 (1)	n1 (1)
	N20 (1)	S23 (1)	n2 (1)
N21 (2)	N21 (1)	S24 (1)	NA (1)
	N21 (1)	S36 (1)	n1 (1)
	N22 (1)	S12 (1)	NA (1)
	N23 (1)	S25 (1)	n1 (1)
	N24 (1)	S44 (1)	n1 (1)
	N25 (1)	S26 (1)	n1 (1)
	N26 (1)	S27 (1)	n1 (1)
	N27 (1)	S28 (1)	n1 (1)
	N28 (1)	S29 (1)	n4 (1)
	N29 (1)	S30 (1)	n1 (1)
N30 (4)	N30 (1)	S45 (1)	NA (1)
	N30 (1)	S46 (1)	n1 (1)
	N30 (1)	S47 (1)	NA (1)
	N30 (1)	S35 (1)	n1 (1)
	N31 (1)	S32 (1)	n1 (1)
	N32 (1)	S33 (1)	n1 (1)
N33 (2)	N33 (1)	S34 (1)	n1 (1)
	N33 (1)	S41 (1)	n1 (1)
	N34 (1)	S37 (1)	n1 (1)
	N35 (1)	S38 (1)	n3 (1)
	N36 (1)	S39 (1)	n1 (1)

	N37 (1)	S40 (1)	n1 (1)
--	---------	---------	--------

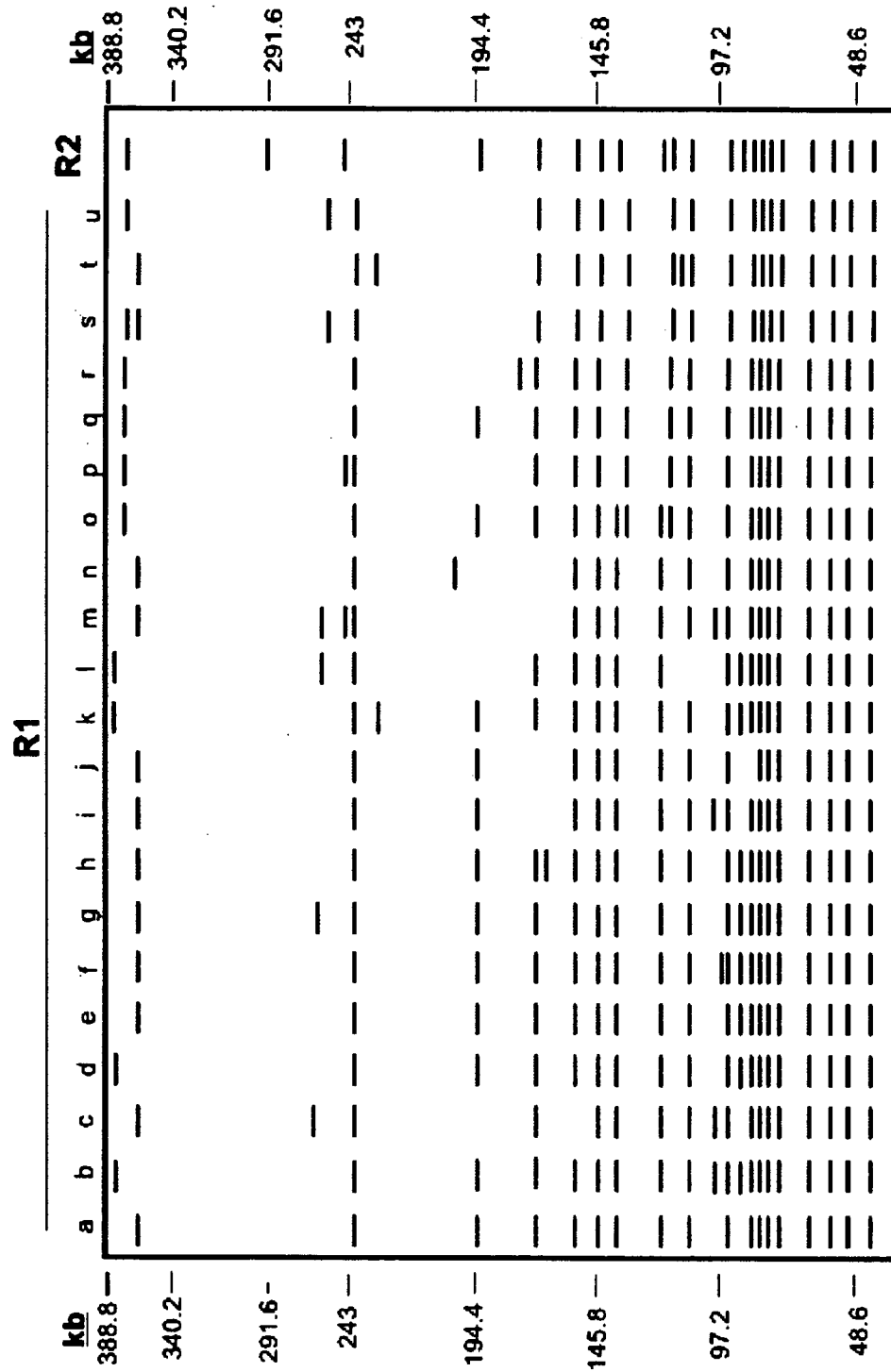
Representative PFGE patterns of *V. cholerae* O1, ElTor Strains



Representative PFGE patterns of *V. cholerae* O1, Classical Strains



Representative PFGE patterns of *V. cholerae* O139 Strains



「O157 および non-O157 EHEC のゲノム多様性解析とそれに基づく新規疫学ツール・マーカーの検索」

林 哲也（宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター・生命環境科学分野）

小椋義俊（宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター・生命環境科学分野）

大岡唯祐（宮崎大学 医学部・感染症学講座・微生物学分野）

研究要旨

これまで進めてきた O157 マイクロアレイと WGPS 法を用いた O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性の解析がほぼ終了し、O157 EHEC におけるゲノム多様化機構や O26・O111・O103 EHEC 菌株と O157 の違いが明らかとなった。一方、IS629 の多様性を利用した O157 EHEC の迅速菌株識別システムの改良を行い、キットとして完成させることができた。また、O26・O111・O103 EHEC の全ゲノム配列決定および遺伝子のアノテーション等が終了し、各株が多数のプロファージ、IS、菌株得配列を有することが明らかとなった。これらの遺伝子や遺伝因子は、O26・O111・O103 EHEC 対策のための疫学マーカー等の有力候補となる。そのほか、O157/O55 系統菌株における溶血活性の解析、O 抗原合成遺伝子群の解析、RTX タンパク質コード様遺伝子の解析などの個別解析からも、O157 の病原性等に関する種々の新知見を得た。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）は国内的にも世界的にも大きな問題となっている病原体であり、病原性の全体像の解明、迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。また、EHEC には主要な血清型である O157 以外にも、多数の血清型が存在する（non-O157 EHEC）。我が国では、O157 EHEC が主に分離されてきたが、O26・O111・O103 などの non-O157 EHEC の分離頻度も徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となっている。本研究では、ゲノム解析を基盤として、

それぞれの血清型の EHEC の遺伝学的・細菌学的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC に特異的な病原遺伝子の検索や解析を行い、疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) ゲノム多様性解析

O157 菌株のゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析、および全ゲノム PCR スキャンニ

ング (WGPS) 法を用いて、O157 EHEC および non-O157 EHEC 菌株の遺伝子レパートリの解析および構造多型領域網羅的な検索を行った。O157 株 (8 株) において同定した構造多型領域については、すべての構造を決定した。

2) non-O157 EHEC の全ゲノム解析

主要な non-O157 EHEC である、O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法およびフォスミドライブライヤーを使って全ゲノム配列を決定した。遺伝子の同定とアノテーションに関しては、O157 菌株の配列情報をレファレンスとして使用することによって、データの標準化を計った。

3) O157 迅速菌株識別システムの開発

O157 株間での IS629 分布の違いをマルチプレックス PCR 反応により検出する迅速菌株識別システム (O157 IS-printing system) に関しては、昨年度までの研究でプロトタイプが作成できている。今年度は、菌株識別解像度の向上を図るため、新たな IS629 挿入部位の利用を検討した。また、新たに *e-hlyA* 遺伝子の検出系の primer セットへの組み込みを行った。システムの検定には、2004 年度分離株の中から *XbaI* による制限酵素切断パターンの異なる 200 株の O157 株と 2004~2005 年度に国内で発生した集団感染事例から 9 件を選定して使用した。いずれの菌株も国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与を受けた。

4) その他

O157 EHEC の近縁株である O55:H7 の O 抗原合成遺伝子領域を、long PCR-RFLP や long PCR 産物の配列解析等によって解析した。比較対象として O55:H6 の O 抗原合成遺

伝子領域の解析も行った。また、O157 および O55:H7 菌株における溶血活性と RTX 様タンパク質コード遺伝子の解析を行った。

C. 研究結果

1) IS629 を標的とした疫学ツール開発

O157 IS-printing system に関しては、新たな IS629 挿入部位を利用して菌株識別解像度の向上を図るとともに、プロトコールの改良を行った。最終的には、32 カ所の IS 挿入部位を標的とする 2 組の Multiplex PCR primer set を構築した。同時に、既に導入済みの *stx1*, *stx2*, *eae* 遺伝子の検出系に加え、新たに *e-hlyA* 遺伝子の検出系を primer セットへ組み込んだ。これによって、O157 の主要病原遺伝子マーカーをすべて同時検出できることになる。また、2004~2005 年度に国内で発生した集団感染事例から 9 件を選定し、集団感染株の検出ができることを確認した。最終的には、TOYOBO (株) への技術移転を行い、キット化を行った後、マーケティング販売を開始した。現在、国立感染症研究所及び全国の地方衛生研究所の協力を得て、実際の検査機関で、システムの有効性についての最終的な検討を進めている。

2) non-O157 EHEC のゲノム解析

主要な non-O157 EHEC である O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法およびフォスミドライブライヤーを使って全ゲノム配列を決定した。最終的には、O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド (85, 63, 5.6, 4.1 Kb)、O111 のゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド (201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb)、O103 のゲノムは、5.5 Mb の染色体と 1 種類のプラスミド (71 Kb) から

なることが判明した。3株のゲノムについて、遺伝子探索とそのアノテーション作業、プロファージ領域と IS エLEMENTの同定作業が終了し、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロファージと IS エLEMENTが存在することが明らかとなった。現在、O157 EHEC 等の全ゲノム配列が既に決定されている他の大腸菌との全ゲノム比較を進めており、各 non-O157 EHEC から、それぞれ数百の菌株特異的遺伝子が同定されている。

3) その他の解析

EHEC O157 の近縁株である O55:H7 の O 抗原合成系遺伝子領域の解析を行い、O55:H7 には、O157 に近縁の系統以外の系統も存在することを明らかにした。また、3系統の O55 抗原合成遺伝子領域の配列解析から、O55 抗原合成遺伝子領域が 40 Kb 以上の大きなセグメントとして水平伝達していることが明らかとなった。

また、O55/O157 系統の溶血活性の解析を行い、O55/O157 系統の菌株を嫌気条件で培養した場合には、K-12 株など様々な大腸菌株も広くの保存されている *hlyE* 遺伝子による溶血活性が発現していることが明らかになった。さらに、O157 堺株のゲノム解析で新たに見つかった RTX 様タンパク質コード遺伝子に関して、O55/O157 系統の菌株間での分布と配列解析を行った。この遺伝子は O157 では偽遺伝子化しているのに対して、一部の O55 が構造的に *intact* と思われる遺伝子を保有していることが明らかとなった。

D. 考察

O157 の迅速菌株識別システム (O157 IS-finger printing system) に関しては、解像度の向上、プロトコールの改良、*e-hlyA* 遺伝子

の検出系の組み込みにより、実用性がさらに高まったといえる。また、集団感染の検出にも十分使用できることも判明した。最終的な評価は、現在行っている臨床検査機関での検討結果を待つ必要があるが、当初のねらい通り、O157 のサーベランスの一次スクリーニングツールあるいは PFGE の補助ツールとして使用できると期待される。

O26・O111・O103 EHEC のゲノム解析に関しては、ゲノムサイズの大きさもあって、遺伝子探索とアノテーション作業に時間を要した。しかし、全作業を終了することができたため、現在は O157 等の他の大腸菌との全ゲノム比較を進めている。この解析も、データ量が多いために時間を要しているが、この解析によって EHEC に共通のゲノム特性や各血清型の特徴が浮き彫りになると期待される。また、このゲノム解析により、各菌株が保有する多数のプロファージ、IS、菌株特異遺伝子を同定できたが、これらの遺伝子や遺伝因子は、O26・O111・O103 EHEC 対策のための有力な疫学マーカーであり、IS に関しては、O157 IS-finger printing system と同様な疫学ツール開発に利用できる可能性が高い。

一方、O55:H7 の O55 抗原合成遺伝子領域の配列解析から、O55 抗原合成遺伝子領域が 40 Kb 以上の大きなセグメントとして水平伝達していることが明らかとなったことは、O55 から O157 への抗原変換の過程を考える上でも興味深い知見である。現在、O55 と O157 の間で、同様な解析を進めているが、100 kb 程度のゲノム領域の入れ替えによって O55/O157 の抗原変換が生じた可能性が示唆されている。また、O55/O157 系統の菌株が、嫌気条件で培養した場合に、K-12 株など様々な大腸菌株も広くの保存されている

hlyE 遺伝子による溶血活性を発現することは、予想外の知見である。O157 の分離・同定を行う際に、エンテロヘモリジン培地を用いた溶血活性の検出が行われていることを考えた場合、この知見の臨床的な意義は大きいと考えられる。

E. 結論

O157 EHEC のゲノム多様性解析の結果を基に開発を進めてきた O157 の迅速菌株識別システム (O157 IS-finger printing system) が実用レベルにまで到達できた。また、主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の全ゲノム配列の決定、全遺伝子の同定、プロフェージと IS エLEMENTの網羅的な同定が終了し、これらの主要 non-O157 EHEC に対する有力な疫学マーカー候補を同定できた。そのほか、O55/O157 系統の菌株の O 抗原合成領域、溶血活性、RTX 様遺伝子などの個別解析からも、O157 の病原性等に関する種々な新知見が得られた。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

- (1) Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Browne, R. R., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization *Infect. Immun.* 75(2) :604-612, 2007.
- (2) Ooka, T., Vieira, M.A., Ogura, Y., Beutin, L., Ragione, R.L., van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Aktan, I., Cawthraw, S., Best, A., Hernandez, R.T., Krause, G., Gomes, T.A.T., Hayashi, T., and Frankel, G. Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 271: 126-135, 2007.
- (3) Whale, A., Hernandez, R.T., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, M.A., Ogura, Y., Phillips, A.D., Beutin, L., Gomes, T.A., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 1743-1755, 2007.
- (4) Morita, H., Kuwahara, T., Okushima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., and Takami, H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* 22(3): 214-222, 2007.
- (5) Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., and Hayashi, T. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8(7): R138, 2007.
- (6) Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y.,

- Hayashi, T., and Hattori, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14: 169-181, 2007.
- (7) Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kerouredan, M., Brugere, H., Schmidt, H., Hayashi, T., and Oswald, E. Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(1): 275-285, 2008.
- (8) Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G., and Hayashi, T. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology* 154(2): 559-570, 2008.
- (9) Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 2008; doi:10. 1093/dnares/dsm033.
- (10) Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., and Iida, T. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates strong correlation between presence of Vp-PAI and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* (online publication, 2008 :IAI.01535-07v1.)
- (11) Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imaohji, H., Ichimura, M., Hayashi, T., and Shiota, H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 527-532, 2008.
- 2.学会発表
- (1) Hayashi, T.: Genomics of different enterohaemorrhagic *E.coli* serotypes. Genomics for Animal Health (E. coli and Salmonella workshop), 2007.6/4-8, Utrecht (Invited Speaker)
- (2) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌におけるO抗原合成遺伝子群を含む水平伝播領域の解析—O55からO157への入れ替わりとO55の伝播について—. 第11回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 2007, 8/23-24, 安曇野
- (3) 林哲也 (シンポジスト): 病原性大腸菌O157-ゲノム解析から見た病原細菌の多様性と適応戦略. 日本生物科学研究所 創立60周年記念シンポジウム「新興・再興するヒトと動物の共通感染症-その現状と対策を探る」, 2007,10/2, 東京.
- (4) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 病原性大腸菌におけるRTXの保有状況および溶血毒素としての可能性. 第60回日本細菌学会九州支部総会, 2007, 10/12-13, 長崎.
- (5) 林哲也 (特別講演): ゲノム解読による生物学の変貌～病原細菌の場合～. 第1回ぜん虫研究会, 2007.11.26-27, 宮崎.
- (6) Hayashi T.: Comparative genomics of O157

- and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The 24th RIB International Symposium on The Frontier of Microbiology -Resources, Environment, and Genome-, 2008, 1/25, Okayama. (Invited Speaker)
- (7) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程の解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (8) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型の形成機構に関する詳細な解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (9) Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T.: A genome-wide survey on phage induction and propagation revealed defective prophages spread virulence determinants from Sakai prophage pool. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (10) 中山恵介, 黒川顕, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (11) 小椋義俊, 大岡唯祐, 山下敦, Asadulghani, 井口純, 黒川顕, 安倍裕順, 戸邊亨, 児玉年央, 寺嶋淳, 中山恵介, 渡部治雄, 服部正平, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 (O26, O111, O103) の全ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (12) 小椋義俊 (シンポジスト): 腸管出血性大腸菌の進化におけるファージの役割. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (13) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (14) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (15) 山崎和子, 矢野貴久, Kyaw Kyaw Moe, 大岡唯祐, 林哲也, 三澤尚明: ウシの趾乳頭腫症病変組織から分離された *Treponema phagedenis* 近縁種の分子系統解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (16) Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T.: Lateral transfer of virulence or related genes by defective prophages of Sakai prophage pool. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (17) 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (18) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: EPEC O55:H7株の溶血活性. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.

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：「アジアを中心に世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定法に関する研究」

分担研究者	西淵光昭	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	清水理香	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	山崎涉	大阪府公衆衛生研究所感染症部細菌課

研究要旨 アジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンが我が国に侵入することを防止するために、新型クローンを特異的にかつ簡便に同定するのに最も適した PCR 法を明らかにするための研究を実施している。昨年度までに、系統発生的解析結果と PCR 法による検査結果の照合により、臨床的に重要な新型クローンの同定には GS-PCR (group-specific PCR、*toxRS* 遺伝子の特異的塩基置換を標的) 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適しており、次いで、新型クローンに特異的とされる 23 kb の挿入配列および 16 kb の挿入配列を標的とする PCR 法もかなり有望であるという結論が得られた。しかし、新型クローン同定用の遺伝マーカーおよび *tdh* 遺伝子を検出する PCR 法はトランスポジション活性のある挿入配列によって影響を受けるということを示す結果も得られた。そこで、本年度の研究では、1995 年から 2007 年までに 24 カ国（検疫所での推定感染国を含む）で患者から分離された 579 菌株を対象に網羅的に PCR 検査を実施し、最も適した PCR 法（新型クローン同定用の遺伝マーカーを対象とした既報の PCR 法）がいずれであるかを評価した。その結果、GS-PCR 陽性を検出（必ずしも必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的）する方法が最も適していると判定された。この方法では、擬陰性を示す 1 株が検出されたが、特異性はこの方法が最も高く、23-kb 挿入配列検出 PCR 法（擬陰性 2 株）、16-kb 挿入配列検出 PCR 法（擬陰性 4 株）、ORF8 検出 PCR 法（擬陰性 25 株）の順であった。ただし、23-kb 挿入配列検出 PCR 法では 29 菌株が擬陽性を示したので、この挿入配列中の他の領域を標的とするプライマーの探索が今後の課題であると考えられた。また、16-kb 挿入配列検出 PCR 法において、増幅 DNA 中に ISVpa2 の挿入が起こっている菌株（かつて報告した部位に近接した部位）が 1 株発見され、この PCR 法の標的領域に ISVpa2 の挿入ホットスポットが含まれると言えるので、注意を要すると考えられる。

A. 研究目的

1996年以後、腸炎ビブリオ新型クローンがアジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている。このクローンには少なくとも多数の血清型バリエーションが出現していることが知られており、時間の推移や地域的な広がりとともに性状が変化した菌株が派生していることが想定される。最近我が国では、魚介類の監視徹底政策のためだと思われる腸炎ビブリオ感染症の激減が顕著になっている一方で、このクローンによる感染症の勢いは世界的には衰えていない。そこで新型クローンの我が国への侵入を防止する必要がある。そのために、我々は新型クローンに属する菌株の同定に最も適した簡便な遺伝学的方法を明らかにするための研究を実施している。

初年度には、アジア各地で21年間に分離された61菌株（新型クローンおよび関連菌株）を対象に、11種類のhouse keeping遺伝子中の塩基配列の変化を総合的に比較解析し、これに基づく被検菌株間の系統関係を示した。同時にこれらの菌株を対象に新型クローン同定用のPCR法（各種遺伝マーカーを標的とした）を比較した。系統解析結果とPCR法の検査結果を照合した結果、GS-PCR陽性かつ*tdh*遺伝子陽性（PCR法）を指標とする同定法が最も適していると結論した。またこれに次いで、新型クローンに特異的とされる23 kbの挿入配列および16 kbの挿入配列を標的とするPCR法もかなり有望であると判断された。

しかし、これらのPCR検査の一部において活性のある挿入配列によって結果が影響を

受けるケースを見いだした。16 kb挿入配列検出用PCR検査において、全ゲノム配列が報告されている菌株で増幅DNA断片のサイズが増加するケースが認められた。これはそれまで未知のトランスポジション活性をもつ挿入配列（ISVpa2と命名）が複製・挿入するためであることがわかった。またGS-PCR陽性株は通常*tdh*遺伝子陽性であるが、ごく一部に*tdh*遺伝子陰性株が報告され、そのような菌株の系統的位置が微妙であり、*tdh*遺伝子脱落の可能性が考えられた。我々は*tdh*遺伝子に隣接する挿入配列（かつてISVと総称し、トランスポジション活性が認められなかったグループに属する）で活性を有するものを発見し、これが実際に*tdh*遺伝子脱落をおこなっていることを示す証拠を得た。

したがって、本研究では、GS-PCRと*tdh*遺伝子（PCR法）の組み合わせ、23 kbの挿入配列および16 kbの挿入配列を標的とするPCR法の結果のバラツキを検討するため、1995年以後に世界各地で分離された多数の菌株を網羅的に検査した。このアプローチにより、新型クローンに特異的で最も安定した遺伝子マーカー（標的）を明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

腸炎ビブリオ被検菌株は分担研究者が現在までにアジアを中心として、世界各地における共同研究において分離あるいは入手・保存していたものおよび関西空港検疫所で分離され大阪府公衆衛生研究所で血清型別して保存されていたものである。

tdh 遺伝子および *trh* 遺伝子を検出する

PCR法は過去に報告した方法に従って実施した¹⁾。

新型クローンに特有な遺伝子マーカーを検出するためのPCR法(表1)は既報に従って実施した²⁻⁴⁾。被検菌株が腸炎ビブリオであることを確認するために *toxR* 遺伝子の特異配列の検出は既報⁵⁾に従ってPCR法によって実施した。

ISVpa2の上流および下流の塩基配列の決定は、site-finding PCR法⁶⁾によるDNA walkingによって決定した。

C. 研究結果と考察

1. 被検菌株のPCR検査の結果

1995年から2007年までに24カ国(検疫所での推定感染国を含む、各年の国数5~13)で患者から分離された579菌株を対象に検査を実施した(表2)。

すべての被検菌株が腸炎ビブリオであることを *toxR* 遺伝子の特異配列の検出によって確認した後、被検菌株における *tdh* 遺伝子および新型クローンに特有な遺伝子マーカー(表1)の分布をPCR法によって検査した。*tdh*陽性でGS-PCR陽性を示した株が374株(64.6%)、*tdh*陽性でGS-PCR陰性を示した株が166株(27.7%)、*tdh*陰性でGS-PCR陰性を示した株が39株(6.7%)含まれていた。かつて他の研究者が報告した非常に希なGS-PCR陽性で*tdh*陰性を呈する菌株は検出されなかった。

GS-PCR陽性を示した374株のうち343株(91.7%)が、GS-PCR以外の新型クローン遺伝子マーカー(23-kb挿入配列、16-kb挿入配列、ORF8)を保有していた。しかし、374

株中で31株(8.3%)は、GS-PCR以外のいずれかの新型クローン遺伝子マーカーが陰性であった(表3)。その中ではORF8陰性株が最も多く(25菌株、80.6%)、次いで16-kb挿入配列陰性株(4菌株、12.9%)、23-kb挿入配列陰性株(2菌株、6.5%)であった。したがって、GS-PCR以外の新型クローン遺伝子マーカーの中では、23-kb挿入配列が最も特異性が高いと判定した。

GS-PCR陰性を呈した205株中に、他の新型クローン遺伝子マーカーの一部(ORF8を除く)またはすべてが陽性を示す非典型的な菌株が31株検出された(表3)。そのうち1株(3.2%)はGS-PCR以外のすべての遺伝子マーカーが陽性であり、新型クローン菌株がGS-PCR擬陰性を呈したと判断した。その他はいずれかの遺伝子マーカーのみが陽性であり、擬陽性であると判定した。その中では23-kb挿入配列陽性株が最も多く(29菌株、93.5%)、次いで16-kb挿入配列陽性株(1菌株、3.2%)であった。23-kb挿入配列擬陽性株が非常に多いが、限られた数の菌株を対象にした検査結果から、今回PCRプライマーの標的とした以外の23-kb領域の中には擬陽性を起こさない領域もあることが示唆されている。今後この点について、すべての被検菌株を用いて確認するとともに、この特異領域について系統発生的解析を試みたい。

2. 挿入配列がPCR検査の結果におよぼす影響

昨年度の研究において腸炎ビブリオで初めてトランスポジション活性のある挿入配列を2つ発見し、それらが16-kb挿入配列検

出用 PCR (ISVpa2)⁷⁾ および *tdh* 遺伝子検出用 PCR (ISVpa2) の結果に影響を及ぼすことを明らかにした。本研究において検査した 579 菌株の中でも ISVpa2 が 16-kb 挿入配列中に挿入したため、増幅 DNA のサイズが増加した菌株を 1 株発見した (図 1)。挿入した ISVpa2 周辺の塩基配列の解析の結果、先に報告した ISVpa2 の挿入部位とは異なるがその近傍の部位 (227 bp 離れている) に挿入していることが明らかになった。したがって、16-kb 挿入配列のこの部位周辺には ISVpa2 が挿入する確率が高く、ISVpa2 のホットスポットの 1 つと言える。ISVpa2 は現在までに検査した腸炎ビブリオ菌株すべてに分布しており、トランスポジション活性が高い⁷⁾ ので、今後、16-kb 挿入配列検出用 PCR 検査において注意する必要があると言える。

D. 結論

(1) 過去 12 年間に 24 カ国の患者由来 579 菌株を対象に網羅的に PCR 検査を実施した結果、新型クローンを同定するための PCR 検査法としては、GS-PCR 陽性を検出 (必ずしも必要ではないが、あわせて *tdh* 遺伝子陽性も検査するのが理想的) 方法が最も適していると思われる。特異性から判断すると、GS-PCR 陽性より劣るが、23-kb 挿入配列の検出、次に 16-kb 挿入配列の検出が有用であると言える。ただし、23-kb 挿入配列の検出では、ある程度擬陽性が発生する可能性があるため、今後より良い PCR プライマーの配列の選定が必要であると考えられる。また、16-kb 挿入配列の検出においては、増幅 DNA サイズの増加 (ISVpa2 の挿入による) がおこる可能性

する可能性を想定しておく必要があると言える。

引用文献

- 1) Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- 2) Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. DePaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585.
- 3) Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains

of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130:395-406.

- 4) Okura, M., R. Osawa, E. Arakawa, J. Terajima, and H. Watanabe. 2005. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *J. Clin. Microbiol.* 43:3533-3536.
- 5) Kim, Y. B., C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.
- 6) Tan, G., Gao, Y., Shi, M., Zhang, X., He, S., Chen, Z., An, C., 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.* 33(13), e122.
- 7) Muhammad, K., and M. Nishibuchi. 2008. Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* 409:92-99.

E. 健康危機情報

我が国では、最近腸炎ビブリオ感染症患者数が激減している。これは厚労省が

中心となって指示した魚介類の監視を徹底する対策が有効であることを示唆している可能性が高い。一方で、海外では新型クローンによる感染の勢いはそれほど衰えていないので、海外からの輸入魚介類中の新型クローン菌株のモニタリング検査を実施して情報を収集する必要があると考えられる。そのためには、本研究で有効性が確認できた GS-PCR 法をベースにした方法を用いることが適当であると言える。

F. 研究発表

[論文]

- 1) Muhammad, K., and M. Nishibuchi. 2008. Detection and characterization of a functional insertion sequence, ISVpa2, in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* 409:92-99.
- 2) Nishioka, T., M. Kamruzzaman, M. Nishibuchi, and Y. Satta. 2008. On the origin and function of an insertion element VPai-1 specific to post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Genes & Genetic Systems*, in press.

[学会発表]

- 1) 西岡輔, M. Kamruzzaman, 阿部健一, 堀田葉子, 西淵光昭. 世界的大流行を引き起こしている新型腸炎ビブリオにおける pandemicity の解明. 日本遺伝学会第 79 回大会. 2007/9/19. 岡山市.

表 1 新型クローンの遺伝子マーカーを検出するための PCR 法

検出法名（または仮称）	標的遺伝子	所在	文献
GS-PCR	<i>toxRS</i> *	染色体 1	2
ORF8	ファージ f237 ゲノムの ORF8	染色体 1	3
16-kb 挿入配列	ヒストン様蛋白（HU- α ）遺伝子	染色体 1	4
23-kb 挿入配列	内膜蛋白様遺伝子	染色体 1	Kamruzzaman 他

*置換した塩基を標的

表 2 被検菌株の分離年および分離国

分離年	分離国数（推定感染国を含む）	被検菌株数
1995	7	39
1996	5	39
1997	7	47
1998	11	52
1999	12	49
2000	13	64
2001	11	22
2002	10	20
2003	11	77
2004	8	50
2005	11	52
2006	11	54
2007	9	14
合計	24	579

表 3 新型クローンの遺伝子マーカーを検出するための PCR 検査の結果が非典型的であった被験菌株の性状と菌株数

<i>tdh</i>	PCR の標的と結果				菌株数
	GS-PCR	23-kb 挿入配列	16-kb 挿入配列	ORF8	
+	+	-	+	+	2
+	+	+	-	+	4
+	+	+	+	-	25
+	-	+	+	+	1
+	-	+	-	-	25
+	-	-	+	-	1
-	-	+	-	-	4

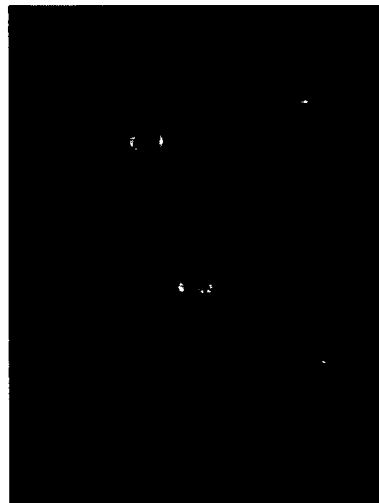


図 1 ISVpa2が 16-kb 挿入配列中に挿入したため、サイズが増加した増幅 DNA。レーンは左から、2-log DNAladder、ISVpa2が 16-kb 挿入配列中に挿入した増幅 DNA、本来のサイズの増幅 DNA、1 kb DNAladder。

Title: annual report of PulseNet China

Name of researcher: Jianguo Xu

Affiliation: National Institute for Communicable Disease Control and Prevention,
Chinese Center for Disease Control and Prevention.

1, Achievements of PulseNet China

PulseNet China held the first meeting in Beijing on September 24, 2004. The central laboratory was set up in National institute for Communicable Disease Control and Prevention, and State Key laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, China CDC. Within these years PulseNet China has been working on central laboratory establishment, technical learning, protocol optimization and evaluation of some special pathogens, database construction, PFGE training to other laboratories, and practice in response to outbreaks. Up to now the foodborne pathogens which have been surveyed in PulseNet China include *E. coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhi and Paratyphi, non-typhoid *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*. In addition, other bacterial pathogens such as *Nesseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Leptospira interrogans*, and *Streptococcus suis* have been also included in surveillance program.

Up to January, 2008, high-quality patterns of more than 5,000 strains were recorded in the database of the central laboratory, including:

S. Typhi and Paratyphi A: 1268 strains (443 patterns of *Xba*I);