

割合よりも有意に高いことが明らかとなった。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

本研究による発表はなし

研究課題名:「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究」

腸管外病原性大腸菌-血流細菌感染由来大腸菌の解析

分担研究報告書

分担研究者 大西 真

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 腸管外病原性大腸菌は疫学解析が十分にはなされておらず、加えて病原性に関しても未解明な部分が多く残されている。特に高頻度でおこる大腸菌性尿路感染症と、そこから敗血症等の血流感染にいたる病原機構の解明、その診断/予防対策は重要な課題である。平成 20 年度は、高齢者血流感染由来大腸菌の系統解析と、病原因子の保有率の検討を行い、さらに国内のみならず世界各地で分離頻度の高まっているニューキノロン耐性大腸菌の国内分離菌株の系統的特徴に関して検討を加えた。

A. 研究目的

膀胱炎・腎盂腎炎・前立腺炎・敗血症・髄膜炎など腸管外に様々な病変を惹起する腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) と総称される大腸菌が存在する。下痢原性大腸菌がこのような腸管外病原性を持つことは知られておらず、腸管内では非病原性である大腸菌が腸管外に侵入した場合、その一部が病原性を示すと考えられている。

ExPEC 感染症のなかでも、新生児敗血症、新生児髄膜炎とともに重篤な疾患として捉えられているのが成人、特に高齢者の血流感染-敗血症である。その多くは尿路感染症が先行するいわゆる Urosepsis と呼ばれる臨床経過をとるものである。

院内感染サーベイランスでまとめた全国

213 施設からの集められたデータ (2006 年) からは血液培養から分離される大腸菌の分離頻度は、17 万検体中 2.27% で黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌に続き上 3 番目に多く、分離菌株総数の 12% を占めることが知られている。一方で、森らの報告によると尿路感染症が先行する高齢者敗血症のうち約 60% は大腸菌によるものであるとされる。

このような大腸菌性血流感染は先進国をはじめ、アジア諸国でも同様に重要な問題となっている (Piroon et al. 2006, Cheong et al 2007)。

キノロン耐性あるいは Extended-spectrum β ラクタマーゼ産生大腸菌などの薬剤耐性大腸菌の出現で治療薬の選択も限られてきている現状があり、早期診断と適切な投薬

方針の決定が重要である。

本研究では、国内/アジア諸国での現状把握と耐性株の系統解析ならびに性状解析を通して、新規診断ツールの開発に繋がる基盤情報を得ることを目的とする。

本年度は、血流感染由来大腸菌 48 株の Multi-locus sequence typing 法により分類し、ニューキノロン耐性株の分布を検討した。また、*gyrA* および *parC* 塩基配列を決定し、比較解析をおこなった。

B. 研究方法

菌株の収集 2005. 4. 1-2006. 3. 31 に分離された血流感染由来大腸菌 48 株を、東京都老人医療センター稲松博士より分与された。患者の内訳は、男性：女性 = 14 : 34
単純性：複雑性 = 29 : 19
入院中：入院時 = 12 : 36
カテーテル留置者 10 名であった。

系統解析

multilocus sequence typing, MLST:
adk (adenylate kinase),
fumC (fumarate hydratase),
gyrB (DNA gyrase),
icd (isocitrate / isopropylmalate dehydrogenase),
mdh (malate dehydrogenase),
purA (adenylosuccinate dehydrogenase),
recA (ATP/GTP binding motif) の配列を用いた MLST 解析法に準拠し行った。PCR 増幅断片を ExoSAP IT (amersham) 処理後、塩基配列決定を行った。ECOR コレクション株を含めた系統樹解析から大腸菌の系統分類を行った。この解析では、4 つの系統 A, B1, B2,

D のうち、A および B1 を明確に区別することが出来ないため、A/B1 と表記した。

病原因子プロファイリング

5 種類の接着因子、P 線毛 (*papEF*, *papG II*, *papG III*)、S 線毛 (*sfaS*)、F1C 線毛 (*focG*)、*afa/DR* アドヘジン (*afaBC*)、*iha* アドヘジン)、4 種類の毒素遺伝子 *hly*, *cnf-I*, *cdt*, *pks*、および細胞侵入に関わると考えられている *ibeA* を PCR 法により確認した。

Ciprofloxacin MIC の測定

平板希釈法を用いて測定し、 ≤ 0.063 を感受性 (S), $0.125 \leq \leq 1$ を中等度耐性 (I), $2 \leq$ を耐性 (R) とした。

C & D. 研究結果と考察

1. 血流感染由来大腸菌の系統解析

48 株中 36 株 (75%) が系統 B2 に属し最も多く、続いて 10 株 (20.8%) が系統 D に属していた。系統 A/B1 に属している株は 2 株 (4.2%) のみであった。筆者らの単純性膀胱炎由来大腸菌の解析では、A/B1, B2, D の比率はそれぞれ 3.6%, 89.2% および 7.2% であったことと比較すると、系統 D 大腸菌の比率が高いことが明らかになった (Table 1)。

Table 1 Phylogroup of *E. coli* from blood and urine samples

	No. of isolates			
	Blood (n= 48)		Urine (n = 83)	
A/B1	2	[4.2]	3	[3.6]
B2	36	[75.0]	74	[89.2]
D	10	[20.8]	6	[7.2]

MLST 解析で 16 種の ST が見出された。複数の菌株が示す ST 型は 7 種あり、ST95,

ST73, ST144, ST393, ST131, ST550, ST69 がそれぞれ、18, 6, 4, 4, 3, 2, 株存在した。入院/外来別、基礎疾患別、尿路カテテルの有無と、ST型との間に有意な相関は認められなかった (Table 2)。

Table 2. ST of 48 *E. coli* from blood samples

ST	No. of isolates	Phylogroup	Patients		Complication		Carrier	
			Inpatient	Outpatient	-	+	-	+
ST98	18	B2	3	15	13	5	15	3
ST73	6	B2	2	4	3	3	5	1
ST144	4	B2	1	3	2	2	3	1
ST393	4	D	1	3	3	1	4	1
ST131	3	B2	1	2	1	2	1	2
ST550	2	B2		2	2		2	
ST69	2	D	1	1	2		2	
ST1003	1	D		1	1		1	
ST38	1	D	1		1		1	
ST426	1	D		1		1	1	
ST68	1	D		1			1	
ST1002	1	B2	1		1		1	
ST14	1	B2		1	1		1	
ST357	1	B2	1		1		1	
ST10	1	A/B	1		1		1	
ST98	1	A/B	1		1		1	

2. 血流感染由来大腸菌の既知病原因子保持

12 種類の病原因子候補遺伝子の存在を PCR 法により検討した。尿路系細胞への接着に関与していると考えられている因子のうち、*papGII* (66.7%), *tia* (56.3%), *iha* (45.8%) が高率で保持されていることが示された。単純性急性膀胱炎由来大腸菌の病原因子保持率との比較からは、先に述べた 3 つの接着因子の保持率が高齢者血流感染由来大腸菌において有意に高かった。一方で、接着因子 *papGIII* および細胞毒素遺伝子である *cnfI*, *hlyA* の保持率が有意に高齢者血流感染由来大腸菌において低かった。

Table 3. Prevalence of putative virulence factor

	<i>focG</i>	<i>cdtB</i>	<i>hlyE</i>	<i>iha</i>	<i>tia</i>	<i>papGIII</i>	<i>cnfI</i>	<i>hlyA</i>	<i>papGII</i>	<i>stxS</i>	DR	<i>stx</i>
BSI (n = 48)	6	5	12	22	27	32	5	8	4	3	5	31
	12.5%	10.4%	25.0%	45.8%	56.3%	66.7%	10.4%	16.7%	8.3%	6.3%	10.4%	64.6%
UTI (n = 83)	5	5	28	20	27	32	22	30	23	9	3	56
	6.0%	6.0%	33.7%	24.1%	32.5%	38.6%	26.5%	36.1%	27.7%	10.8%	3.6%	67.5%
P value				0.05	0.01	0.01	0.05	0.05	0.01			

papGIII, *cnfI*, *hlyA* 遺伝子は、同一の Pathogenicity island にコードされている

ことが知られている。一方で、*tia* および *papGII* は *papGIII* 等をコードするものとは異なる Pathogenicity island にコードされている。単純性急性膀胱炎由来大腸菌および高齢者血流感染由来大腸菌では、病原因子プロファイルに相違が認められたことから、高齢者血流感染に特異的な病原機構が存在する可能性を示唆した。詳細においては、今後の検討課題であるが、*papGII*, *tia*, *iha* に焦点をあてた大規模なサーベイを実施することが必要であることを示した。

3. 血流感染由来大腸菌の Ciprofloxacin 耐性

大腸菌において、ニューキノロン耐性株が漸増してきていることが知られている。

そこで、血流感染由来大腸菌株の Ciprofloxacin 耐性を検討した。48 株中耐性株は 7 株、中等度耐性株が 4 株存在した。耐性株 7 株のうち、6 株が系統 D に属する菌株であった。このことから、単純性急性膀胱炎由来大腸菌 (UTI D=7.2%) に比べ系統 D に属する菌株が多い (BSI D=20.8%) ことの理由の一つと考えられた。また、7 株中 4 株は ST393 であり、ST393 大腸菌のすべてが耐性であった。

キノロン耐性は *gyrA* および *parC* 遺伝子への変異の集積に依るものが一般的である。

そこで耐性株 5 株、中等度耐性株 3 株、感受性株 4 株の *gyrA* 遺伝子 (2628 bp) および

parC 遺伝子 (2259 bp) 塩基配列の全長を決定し、比較解析を行った。

キノロン耐性には Quinolone-resistant determining region (QRDR) と呼ばれる領域の変異が重要である。*gyrA* 遺伝子の場合には N-末端領域 83 位の Ser から Leu への変異 (S83L-*gyrA*)、および 87 位 Asp から Asn への変異 (D87N-*gyrA*) が耐性化に関与し、さらにこれらの *gyrA* 変異に加えて *parC* 遺伝子 N-末端 80 位の Ser から Ile (S80I-*parC*) への、また 84 位の Glu から Val (E84V-*parC*) への変異が耐性を高めることが知られている。

12 株の *gyrA* および *parC* 塩基配列の比較解析からは、QRDR 部位の変異を含め多型部位がそれぞれ 100 および 144 箇所見出された。その中で、まず QRDR の多様性と系統との関係を検討した。

中等度耐性-耐性株 8 株は系統に関わらず、いずれも S83L-*gyrA* 変異を持っていた。また、中等度耐性株はこの S83L のみであるのとは対照的に、耐性株 5 株はいずれも D87N-*gyrA* あるいは *parC* の QRDR の変異を

かしながら、耐性株であっても系統 B2 に属する菌株 (ST42) は、S83L-*gyrA*; S80I-*parC*; E84V-*parC* と異なるプロファイルを示した。ST42 の S80I のアミノ酸置換も系統 D 菌株の塩基置換とは異なっていたことから、系統ごとに独立して変異が蓄積されてきたことを示唆した。このことは *gyrA* および *parC* の配列全長を使った比較解析からも明らかとなった。つまり、キノロン耐性度にかかわらず、系統に依存した配列多様性みとめられた。

E. 結論

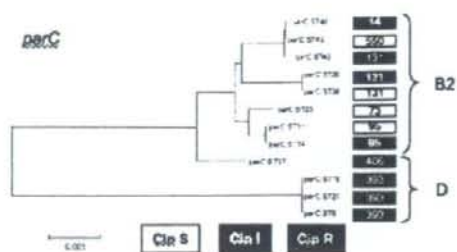
高齢者血流感染由来大腸菌の 75% 近くが尿路感染症において高い頻度で分離される系統 B2 大腸菌であることが示された。しかしながら病原因子プロファイルはそれぞれ異なることが示された。血流感染および尿路感染はその進展において密接に関連していることが知られているが、病原機構になんらかの相違がある可能性がある。今後詳細に検討する必要がある。また、系統 D 大腸菌が高齢者血流感染由来大腸菌では尿路

Strains	Cip	ST	ST complex	Phylogroup	Quinolone resistant determining region				
					<i>gyrA</i>				<i>parC</i>
					R3	R7	R9	R4	
ST09		393		D	Leu (TTG)	Asn (AAG)	Ile (ATG)	Glu (GAA)	
ST16		393		D	Leu (TTG)	Asn (AAG)	Ile (ATG)	Glu (GAA)	
ST27		393		D	Leu (TTG)	Asn (AAG)	Ile (ATG)	Glu (GAA)	
ST37		405		D	Leu (TTG)	Asn (AAG)	Ile (ATG)	Glu (GAA)	
ST42		131		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ile (ATG)	Val (GTA)	
ST14		95		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST26		131		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST48		14	ST14 Cplx	B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST11	S	95		B2	Ser (TCG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST23	S	73		B2	Ser (TCG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST38	S	131		B2	Ser (TCG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST49	S	350	ST14 Cplx	B2	Ser (TCG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	

併せ持っていた。系統 D に属する耐性株の QRDR の変異プロファイルは S83L-*gyrA*; D87N-*gyrA*; S80I-*parC* と同一であった。し

感染由来大腸菌に比べ高率で分離されることが示された。一因としてキノロン耐性株が有意に D 群に多いことと関連している可

能性がある。*gyrA* および *parC* 塩基配列の解析からは、系統 B2 および系統 D に属する大腸菌では、それぞれ独立して QRDR への変異が集積してきていることが示された。本年度得られた情報はキノロン耐性株感染症をいち早く同定するツールの開発に応用されることが期待される。また、タイ国マヒドン大学シリラート病院臨床分離株を対象に国内株との比較解析を行う計画をすすめている。

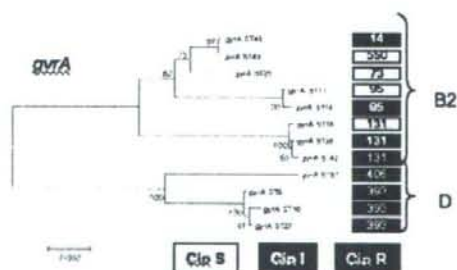


F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

なし。



分担研究課題名：ピブリオの分子疫学マーカーの開発、データベース化

研究分担者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
	荒川英二	国立感染症研究所	細菌第一部
	山本章治	国立感染症研究所	細菌第一部
	高井信子	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

コレラ菌 O1 は、その性状から古典型とエルトル型の 2 つの生物型に分類され、それら生物型間でコレラ毒素の B サブユニット遺伝子に 2 つの 1 塩基変異多型が確認されている。しかしながら、近年、古典型のコレラ毒素を持つエルトル型コレラ菌（非定型コレラ菌）が多数分離されるようになった。本研究では、海外からの輸入事例由来のエルトル型コレラ菌について、コレラ毒素遺伝子型を決定することで、非定型コレラ菌のアジアのコレラ流行地域における分布を確認し、分離株間の遺伝的多様性を分子疫学的手法により解析した。

A. 研究目的

コレラはコレラ菌で汚染された水や食物を摂取することによって感染し、下痢を主症状として発症する。コレラを引き起こす *Vibrio cholerae* は血清型 O1、O139 のみであり、さらに血清型 O1 のコレラ菌は、その生物学的性状の違いから古典型とエルトル型の 2 つの生物型に分類される。コレラの典型的な臨床症状は、1 つの A サブユニットと 5 つの B サブユニットからなるコレラ毒素により引き起こされる。A サブユニットの配列はコレラ菌の生物型によらず保存されているが、B サブユニットの配列は古典型とエルトル型において、115 番目と 203 番目の塩基にアミノ酸の違いを生じる 1 塩基変異多型が存在することが確認されている。

7 回にわたって記録されているコレラの世界的流行は、第 6 次の世界流行まで古典

型コレラ菌によるものであり、第 7 次世界流行からはエルトル型による。しかしながら、近年アジアのコレラ流行地域において分離されるほとんど全てのコレラ菌 O1 が、生物型がエルトル型にも関わらず、古典型コレラ毒素を産生するコレラ菌（非定型コレラ菌）であることが報告されている。つまり、この非定型コレラ菌がアジア地域に蔓延し、現在の流行株となっている可能性がある。

そこで本研究では、アジア地域における流行株の指標として本邦の輸入事例より分離されたエルトル型コレラ菌について解析を行い、現在のコレラ流行株の基盤情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

菌株は 1991 年から 2006 年に日本国内で分離された輸入事例に由来するエルトル

型コレラ菌 67 株を用いた。コレラ毒素 B サブユニット遺伝子の 203 番目における 1 塩基置換を検出する MAMA-PCR によりコレラ毒素遺伝子型を決定した。また供試菌株に古典型コレラ菌 10 株、エルトール型コレラ菌ゲノム株 1 株 (N16961 株) を含め、*NotI* 消化による PFGE 及び 7 遺伝子座を用いた MLVA を行った。

C. 研究結果

MAMA-PCR によるコレラ毒素遺伝子型別を行った結果、エルトール型コレラ菌は 1994 年以前に検出された。一方で、非定型コレラ菌は 1993 年に検出された後、1995 年以降は全ての分離株が非定型コレラ菌であり、1990 年代前半にエルトール型コレラ菌から非定型コレラ菌への流行株の遷移が確認された。

PFGE によるクラスター解析では、非定型コレラ菌はエルトール型コレラ菌を含む古典型コレラ菌とは異なるクラスターを形成した。さらに非定型コレラ菌はサブクラスターに分類され、非定型コレラ菌間での遺伝的多様性を示した。また、PFGE とは異なる基本原理に基づく分子疫学的手法である MLVA による解析でも、古典型コレラ菌と非定型コレラ菌は異なるクラスターに属し、非定型コレラ菌のクラスターにはエルトール型コレラ菌が存在した。

つまり非定型コレラ菌は、エルトール型コレラ菌から派生し、1990 年代半ばからは、アジアのコレラ流行地域における流行株になっていると考えられる。また、非定型コレラ菌間においては、いずれの分子疫学解析を用いてもサブタイプに分類され、遺伝的多様性を示した。これは単一のクローンがアジア各地域に広がったのではなく、複数のクローンが

各地において発生したことを示唆している。

D. 考察

コレラ菌の生物型の決定には、血清型別の後、ニワトリ赤血球凝集能、ポリミキシン B に対する感受性及び生物型特異的ファージによる型別等が必要となる。非定型コレラ菌はエルトール型の生物学的性状を示すが、コレラ毒素遺伝子型は古典型であるので、その検出には生物型に加えてコレラ毒素遺伝子型を判定しなくてはならない。よって、現在の流行株である非定型コレラ菌の同定には、多大な時間と労力を要する。一方、基本原理の 2 つの異なる分子疫学的解析を行ったところ、非定型コレラ菌には遺伝的多様性があることが明らかとなったものの、これまでのところ、この非定型コレラ菌を迅速かつ簡便に鑑別するマーカーは見つかっていない。アジア地域におけるコレラ流行株の情報を共有するためにも、アジア各国において簡便に非定型コレラ菌の同定を行えるようになる必要があり、今後、非定型コレラ菌に共通な新規疫学マーカーの開発が必須である。そして、その新規マーカーの有用性をアジア各国と連携して検討することにより、アジア地域における感染症対策に貢献できるものと考えられる。

E. 結論

現在のアジア地域におけるコレラ流行株は、生物学的性状はエルトール型であるが古典型のコレラ毒素遺伝子をもつ非定型コレラ菌であることが示された。また、非定型コレラ菌株間には遺伝的多様性が存在していることが明らかとなった。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

Morita, M. Izumiya, H. Ohnishi, M. Arakawa, E. Yamamoto, S. Nair, G.B. Alam, M. Matsushita, S. Yokoyama, K. Kai, A. Seto, K. Nishimura, K. Watanabe, H.; Easy

method for detection of the biotype specific cholera toxin B subunit of *Vibrio cholerae* O1 and dissemination of the altered El Tor strains. 43rd U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Fukuoka, Japan, Nov. 2008.

表1 エルトール型コレラ菌のコレラ毒素遺伝子型の年次変化

分離年	<i>ctxB</i> 型		渡航地域‡ (分離株数)
	エルトール型	古典型	
1991	6		Southeast Asia (5), South Asia (1)
1992	5		Southeast Asia (3), Latin America (2)
1993	2	3	Southeast Asia (5)
1994	1	2	Southeast Asia (2†), East Asia (1)
1995		10	Southeast Asia (10)
1996		1	Southeast Asia (1)
1997		14	Southeast Asia (11), East Asia (3)
1998		2	Southeast Asia (1), East Asia (1)
1999		4	Southeast Asia (1), South Asia (3)
2000		1	Africa (1)
2001		2	Southeast Asia (2)
2002		1	Southeast Asia (1)
2003		0	
2004		8	Southeast Asia (3), South Asia (5)
2005		3	Southeast Asia (2), South Asia (1)
2006		2	Southeast Asia (1), South Asia (1)
	14	53	

†: エルトール型 *ctxB* 及び古典型 *ctxB*、それぞれ1株ずつ

‡: Africa; Madagascar. East Asia; China, Korea, North Korea. South Asia; India. Southeast Asia; Indonesia, Philippine, Singapore, Thailand. Latin America; Bolivia, Peru.

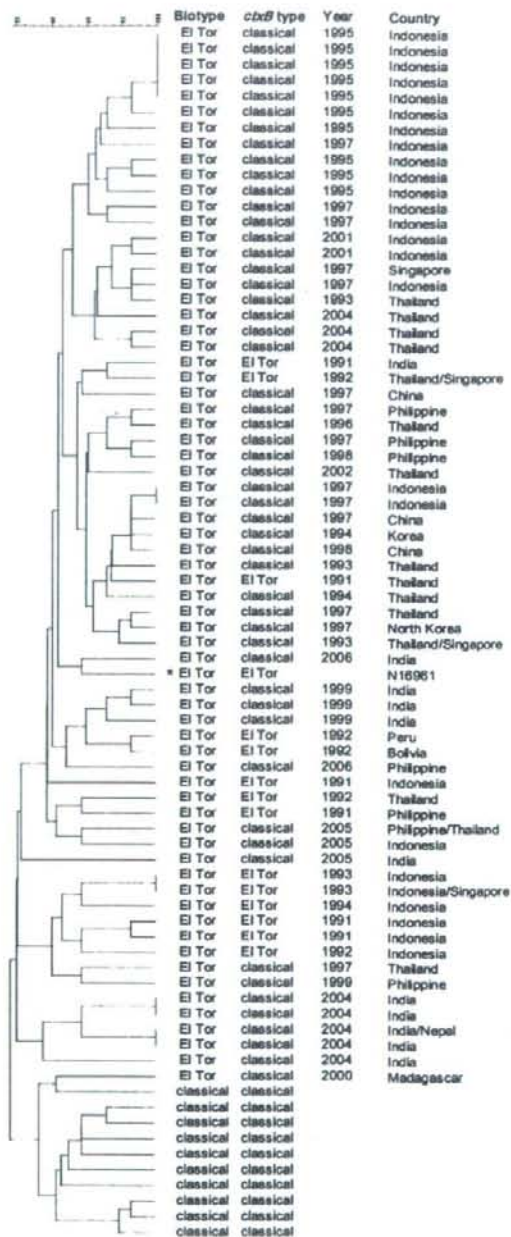


図2 MLVAによるクラスター解析

厚生労働科学研究費補助金
平成20年度 分担研究報告書

研究課題名：「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク」
分担研究報告書

分担研究者 大澤 朗 神戸大学 農学研究科

研究要旨：

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の血清型 O1 および O139 はゲノム DNA が高度に保存されていることから、通常有用な PFGE やリボタイピング法では菌株間の clonality (系統性) の異同の識別は難しいとされている。しかし、最近我々が行ったゲノムサブトラクション法による遺伝子解析で、*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が存在することが示唆された。そこで、我々は本領域に多数散在する *V. cholerae* repeat (VCR) に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法の開発を試みた。VCR を利用したプライマーの有用性を検討したところ、VCR-5' +C と VCR-3' +A の組み合わせが最も優れた識別能を示した。また本プライマーセットを用いて得られた泳動図を基にデンドログラムを作製したところ、O1 は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる 6 つのグループに分類することが可能であった。一方 O139 は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された O1 と酷似するパターンを示し、O1 との系統的関連性を示唆する結果となった。本手法は、MLST や PFGE と比べ、簡便かつ迅速に結果が得られるため、病原性 *V. cholerae* の疫学解析に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

V. cholerae は世界規模で広く蔓延し、多くの死者を出している腸管病原細菌である。これまでの知見から、コレラ毒素産生性の O1 及び O139 血清型の株がコレラ症を引き起こすことが明らかとなっている。我が国におけるコレラの被害は、他のアジア諸国と比べるとまれであるが、その症例は過去 30 年で漸増してきている。これはコレラ症が流行している国々へ渡航する旅行者が増加していることが主な原因であると考えられる。しかしながら、渡航歴がないにもかかわらず国内で発症した例もあるため、すでに病原性 *V. cholerae* 株が日本国内にニッチを形成している、あるいは食品を通じて生きたままコレラ菌が海外から輸入されている可能性が考えら

れる。近年、日本はますます海外からの食料供給に依存するようになってきているため、*V. cholerae* に汚染された輸入食品によっていつ大規模な流行が引き起こされるか分からない。この状況は、他の先進国でも同様である。これらのことから、現在はコレラによる感染症の感染源および伝播経路を特定し、コレラ感染の流行を最小限に食い止めることが最も重要であると考えられる。そこで我々は正確かつ迅速にコレラ感染源および感染経路を特定するための疫学解析の手法を開発する目的で実験を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株：O1 型 19 株、O139 型 18 株の計 37 株のコレラ毒素産生性 *V. cholerae* を用い

た (Table 1)。01 型株は 1971 年から 1997 年の間にアジアや南米諸国から分離され、0139 型株は 1993 年から 2006 年までにアジアやヨーロッパ諸国、デンマークから分離された。

2) Integron island の相同性解析: 過去に行ったゲノムサブトラクション法を用いた解析により、Integron Island と呼ばれる領域が *V. cholerae* の可変 DNA 領域であることが示唆された。全塩基配列が決定されている *V. cholerae* N16961 株の Integron Island の DNA 配列をウェブ上のプログラムである BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi) を用いて Genbank に登録されている他の *V. cholerae* 株のシーケンス (whole genome shotgun sequence) と比較した。

3) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発: Integron Island の相同性解析の結果、本領域に菌株ごとに多型性が見られる可能性が示唆されたため、本領域に多数存在する VCR を標的とした PCR に基づく手法の確立を試みた。PCR に最も適したプライマーセットや条件を決定するため、全ゲノム DNA 配列が利用可能な *V. cholerae* N16961 株の塩基配列をもとに、VCR に「挟み込まれた」領域にある DNA 配列を増幅するようなプライマーを設計し (Fig. 1)、N16961 株の DNA を用いて条件検討を行った。さらに、最適化された PCR 条件を使用し、供試菌株 37 株における多様性を解析した。以下、本 DNA フィンガープリンティング法を VCR-PCR 解析とする。

4) 系統解析: 方法 3) の VCR-PCR を用いて、得られた増幅 DNA 断片の解析を BIO-PROFIL

Bio-ID++ Windows Application 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。

5) 他の手法と識別能比較: 今回我々が開発した手法の有用性を検討する目的で、近年 Chokesajjawatee ら¹¹⁾ によって報告された ERIC-PCR との系統識別能の比較を行った。

C. 研究結果

1) Integron Island の相同性解析: BLAST プログラムを用いた相同性解析の結果、Integron Island は株間で変化に富むことが明らかとなった。

2) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発: VCR の 5' 末端及び 3' 末端の配列を用いて設計したプライマーセット (VCR-5', TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTA & VCR-3', AGCCCCTTAGGCGGGCGTTA) を用いて PCR を行ったところ、どのような条件で PCR を行ってもスメアパターンとなった。そこで、PCR 産物を減らす目的で各プライマーに任意の塩基を一塩基付加したプライマーセットを作製し、最も良いプライマーセットの検討を行った。その結果、VCR5' +C (TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTAC) と VCR3' +A (AGCCCCTTAGGCGGGCGTTAA) を組み合わせた PCR が最も優れた識別能を示した。そこで、本プライマーセットを用いて全 37 株を供試して解析を行ったところ、01 は 7 つの異なるパターンを示した。一方で 0139 全株は独特な単一のパターンを示した (Fig. 2)。

Table 1. *V. cholerae* strains used in the present study.

No.	strain	serogroup	Origin	year	No.	strain	serogroup	Origin	year
	N1991	O1 (Inaba)	Bangladesh	1971	19	1008-96	O139	Hong Kong	1996
1	1002	O1 (Inaba)	Japan	1978	20	1010-94	O139	Denmark	1994
2	1003	O1 (Inaba)	Japan	1989	21	1056-93	O139	Thai, India	1993
3	1010	O1 (Inaba)	India	1991	22	1180-93	O139	Bangladesh	1993
4	05	O1 (Inaba)	Indonesia	1989	23	184-93	O139	Bangladesh	1993
5	1001	O1 (Ogawa)	Japan	1977	24	199-98	O139	India	1998
6	1004	O1 (Ogawa)	Japan	1991	25	21-93	O139	India	1993
7	1005	O1 (Ogawa)	Peru	1992	26	234	O139	China	2004
8	1006	O1 (Ogawa)	Bolivia	1992	27	236-93	O139	India	1993
9	1008	O1 (Ogawa)	Bali	1995	28	252	O139	Japan	2006
10	1009	O1 (Ogawa)	India	1991	29	294-94	O139	Thai	1994
11	1011	O1 (Ogawa)	Mongolia	1996	30	298-95	O139	Thai	1994
12	11	O1 (Ogawa)	Thai	1997	31	387-94	O139	Singapore	1994
13	14	O1 (Ogawa)	Thai	1997	32	435-94	O139	Thai	1994
14	19	O1 (Ogawa)	Singapore	1997	33	495-93	O139	Nepal	1993
15	39	O1 (Ogawa)	China	1997	34	515-95	O139	Bangladesh	1993
16	5	O1 (Ogawa)	Thai	1997	35	63-93	O139	India	1993
17	58	O1 (Ogawa)	Philippines	1997	36	895-94	O139	Bangladesh	1994
18	81	O1 (Ogawa)	Thai	1997					

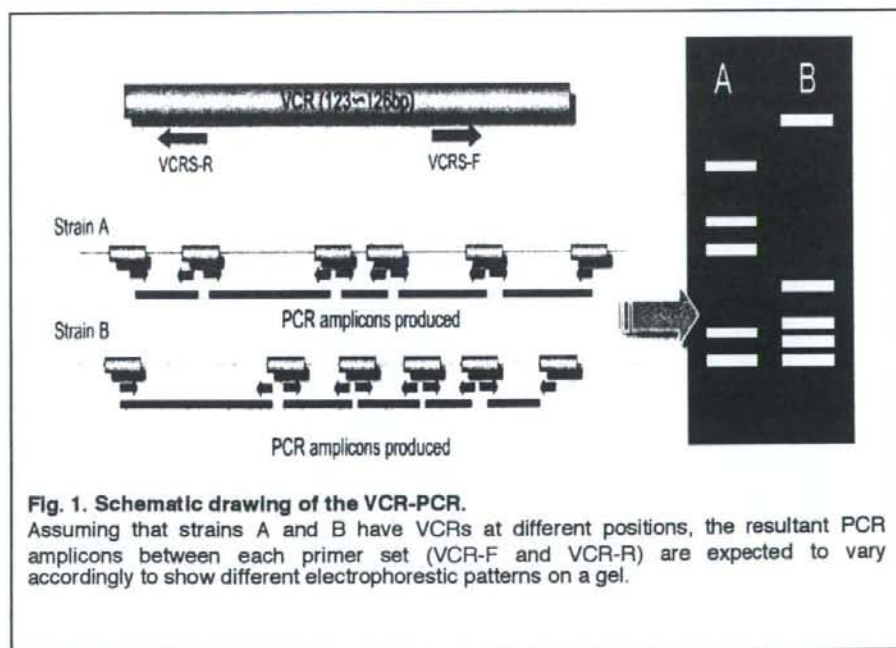


Fig. 1. Schematic drawing of the VCR-PCR.

Assuming that strains A and B have VCRs at different positions, the resultant PCR amplicons between each primer set (VCR-F and VCR-R) are expected to vary accordingly to show different electrophoretic patterns on a gel.

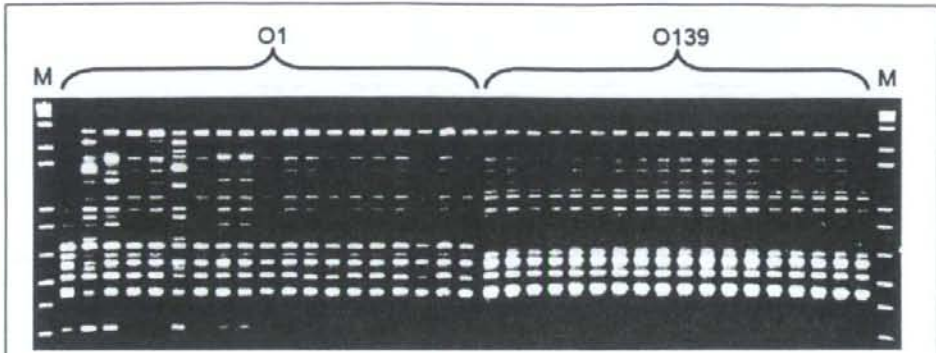


Fig. 2. VCR-PCR patterns of *V. cholerae* O1 and O139 strains on an agarose gel.

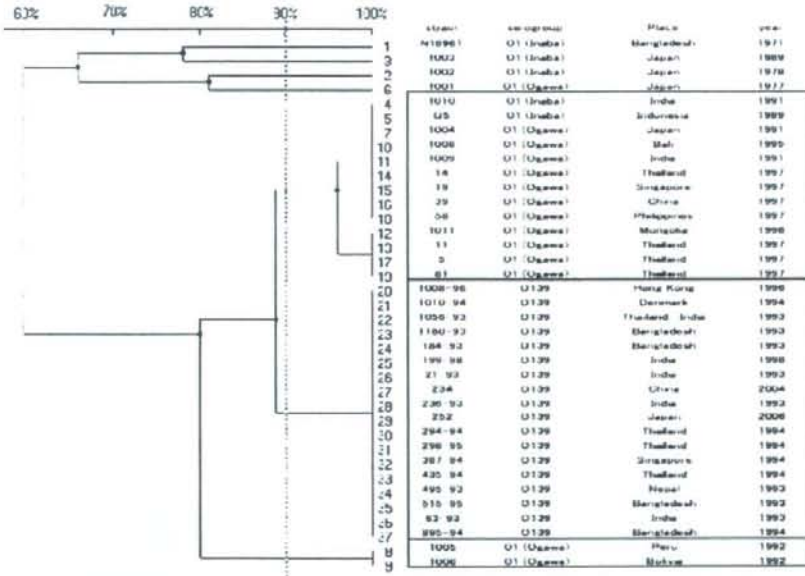


Fig. 3. Variability in similarities of VCR-PCR fingerprints.

3) 供試菌株の系統解析: VCR-PCR の泳動パターンより描かれたデンドログラムにおいて、90%の相同性をもとに各分離菌株を系統分けしたところ、全37株を異なる7つのグループに分類できた(Fig. 3)。01株については1990年以前に分離された株と1990年以後に分離された株との間に系統的な差が見られた。また1990年以後に分離された株間では南米より分離された株がその他の株と系統的に分けられた。これとは対照的に、0139株は分離された土地や年に関わらず同一の系統であることが示された。

4) Chokesajjawatee らの報告したERIC-PCR法との比較: 供試したすべての菌株が90%以上の相同性を示し、01と0139を分類することはできなかった。

D. 考察

過去に行ったゲノムサブトラクション法を用いた解析より、Integron Island が可変異部位であると考えられたため、Integron Island の相同性解析を行った。その結果、本領域が菌株ごとに多様である可能性が示唆された。そこで本領域に多数存在するVCRを標的としたPCR法に基づく手法の確立を試みた。VCRの5'末端及び3'末端の配列を用いて設計したプライマーセット (VCR-5', TCCCTCTTGAGGCGTTGTTA & VCR-3', AGCCCCTTAGGGGGCGTTA) を用いてPCRを行ったところ、どのような条件でPCRを行ってもスメアパターンとなった。我々はこの原因がプライマーのアニール箇所が多過ぎるためではないかと考え、各プライマーに任意の塩基

を一塩基付加したプライマーを設計し、様々な組み合わせで再度条件検討を行った。その結果、目視可能な泳動図が得られ、その中でもVCR5'+C (TCCCTCTTGAGGCGTTGTAC)とVCR3'+A (AGCCCCTTAGGGGGCGTTAA)を組み合わせたPCRが最も優れた識別能を示すことが明らかとなった。そこで、このプライマーセットを用いて供試菌株37株における多様性を確認したところ、01は1990年を境に系統的な違いが確認され、異なる6つのグループに分類することが可能となった。一方0139は、独自のグループを形成するものの、1990年以後分離された01と酷似するパターンを示し、01との系統的関連性を示唆する結果となった。さらに、我々は本PCR法の有用性を検討する目的で、近年報告されたChokesajjawatee らが開発したERIC-PCRとの識別能の比較を行った。その結果、ERIC-PCRでは全株が同一クローンであると認識されたのに対し、VCR-PCRでは7つのグループに系統分けすることが出来たことから、本手法がより識別能に優れた手法であることが明らかとなった。本手法はPCRに基づく手法であり、PFGEやMLSTなどのような特別な機器を必要とせず、簡便かつ迅速に結果が得られるため、一日に大量サンプルを供試することも可能である。これらのことから本フィンガープリンティング法は病原性*V. cholerae*の系統解析に有用であると考えられる。現在、VCR-PCRの信頼性のさらなる検証を行うため、菌株数を増やして解析を進めているところである。

E. 結論

病原性コレラ菌株の Integron Island の多型性を標的とした、01 と 0139 を識別できるだけでなく、01 内での系統解析も可能な新規 DNA フィンガープリンティング法を開発した。

G. 研究発表

学会発表

徳永暁彦, 大澤朗, 森田昌知, 荒川英二, 渡辺治雄「*Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発」第 42 腸炎ビブリオシンポジウム (2008. 10)

徳永暁彦, 大澤朗, 森田昌知, 荒川英二, 渡辺治雄「*Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発」第 4 3 回日米コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 (2008. 11)

F. 参考文献

1) Nipa Chokesajjawatee, Young-Gun Zo, and Rita R. Colwell (2008). Determination of clonality and relatedness of *Vibrio cholerae* isolates by genomic fingerprinting, using long-range repetitive element sequence-based PCR. *Appl. Envir. Microbiol.* 74: 5392-5401.

Annual report of 2008

Title: Molecular Analysis of *Shigella flexneri* 4C emerged in China

Name of researcher: Jianguo Xu

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

Summary:

The causative agents for Shigellosis have been recognized for over 100 years as being in the *Shigella* species with *S. flexneri* serotype F2a the most prevalent. Here we show a new *S. flexneri* serotype Fxb, which was previously identified as *S. flexneri* 4c. Fxb first appeared in 2001; became more prevalent than F2a during 2002 to 2006 in Henan Province; and then spread to become dominant in seven of ten provinces under surveillance in China by 2007. Genome comparison showed Fxb acquired a *Shigella* serotype conversion island and two multiple antibiotic resistance islands. All 37 isolates of Fxb and 69 of 74 isolates from eight other serotypes analyzed were classified into a new sequence type, ST91, using the multi-locus sequence typing method. This data indicates a single sequence type of *S. flexneri* has persistently circulated in China for many years having frequent serotype shifts. Therefore, the current strategies for vaccine development and control for Shigellosis must be redesigned.

Introduction

Shigellosis or bacillary dysentery is one of the major infectious diseases in developing countries where it mainly affects economically poor populations 1,2. A multicentre shigellosis surveillance study involved six Asia countries found that the overall culture-confirmed shigellosis annual incidence was 13.2 per 1,000 children under

age 5 y and 2.1/1,000 in all ages¹. The incidence in developing countries is proximally 100 higher than industries countries¹. Since the Chinese National Infectious Disease Internet Reporting System began operation in 2005, the reported annual incidence of shigellosis in China was within the top four of the 37 notifiable infectious diseases in four consecutive years from 2005 to 2008, with close to half a million cases each year (<http://www.moh.gov.cn>). This is now widely believed to be an underestimate^{2, 3}.

The causative organism is *Shigella* spp. The predominant species in China and other developing countries is *S. flexneri* which is divided into 15 serotypes. Some *S. flexneri* serotypes are more prevalent than others with the 3 most prevalent being F2a, 3a and 1a in Asian countries^{1, 2, 4}. F2a has been recognized as the most frequent serotype in China for many years and probably in other developing countries as well^{1, 2}. However, we reported a new serotype, Fxb, which outcompeted F2a in Henan Province for five years since 2002 and spread to several other provinces of China recently.

Results

Identification of *S. flexneri* Fxb

Surveillance of *Shigella* infections since 2000, conducted by Henan Provincial CDC of China, found a novel serotype *S. flexneri*, which could not be typed according current diagnostic serotyping criteria for *Shigella* species.

It could be named as serotype F4c previously described by Pryamukhina *et al.*, by agglutination with monovalent anti-IV type antisera and monovalent anti-7,8 group antisera (Pryamukhina & Khomenko, 1988). It could also be named as serotype F4x previously described by Carlin *et al.*, by agglutination with group antigen specific monoclonal antibody MASF IV-1 but not with serotype IV type specific antibody