

科学フォーラム、Wuhan, China, March 15-16,
2010

11) Iida, T. : Metagenomic analysis of
infectious diseases. The 10th Japan-Korea
International Symposium on Microbiology,
Pacifico Yokohama, March 26, 2010

12) Iida, T. : Metagenomic analysis of
intestinal microbiota in infections. 国際
シンポジウム Gut defense and microbial
infections, 第83回日本細菌学会総会 パ
シフィコ横浜、2010年3月27-29日

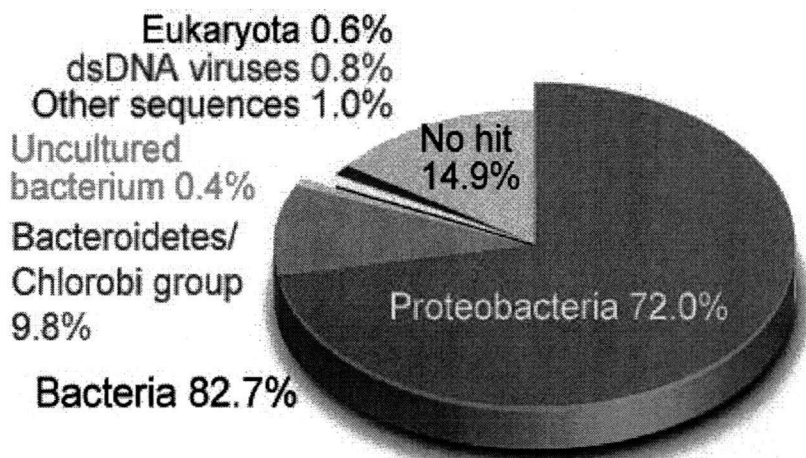
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

図1. 急性下痢症患者由来糞便検体に対し次世代シーケンサを用いたメタゲノミック解析を行った結果の一例. 腸管侵入性大腸菌 (EIEC) による下痢症の成績



Total reads: 178,197

表1. 上記検体より得られたDNA断片が由来する生物種

	178,197	No. total reads
	138,404	No. total BLAST hit (100%)
Ranking	No. (%)	Species
1	83,283 (60.2)	<i>Escherichia coli</i>
2	26,887 (19.4)	<i>Shigella flexneri</i>
3	9,924 (7.2)	<i>Bacteroides fragilis</i>
4	5,200 (3.8)	<i>Shigella boydii</i>
5	3,875 (2.8)	<i>Shigella sonnei</i>
6	1,545 (1.1)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
7	1,353 (1.0)	Enterobacteria phage
8	1,172	Cloning vector
9	1,146	<i>Shigella dysenteriae</i>
10	878	Uncultured bacterium

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

下痢を起こす細菌性病原体の網羅的な生菌遺伝子検査法の
作成に関する研究

研究分担者 江崎 孝行 岐阜大学教授

研究要旨

昨年度開発した病原体 10 種類を一つの増幅試薬で検査するカクテル試薬で食品中の病原体を高感度に検査する際には、食材を培地で増菌し検査する必要がある。増菌に必要な培地は病原体ごとに設定されており、カクテル増幅検査を行うには共通の増菌培地がなければそのメリットは生かされない。*Campylobacter*, *Listeria* を含む、すべての標的菌が一つの無血液培地で増菌できることを確認した。さらに従来から使用されてきた増菌培地と比較し、新しく開発した培地では、*Campylobacter*, *Listeria* の増殖は特に優れており、そのほかの菌種は従来の培地とほぼ同等の発育がみられたため、開発した培地一種類で食材の病原体を短時間増殖させ、遺伝子検査する手法が完成した。

A. 研究目的

安全な食品を供給するためにはすべての病原微生物を迅速に漏れなくスクリーニングするカクテル増幅法を開発してきたが、この検査を行う前に菌の増幅に使用する培地が、従来の方法では病原体ごとに異なるため、カクテル増幅法の利点が十分に反映されない。そこで、*Campylobacter*, *Listeria* を含む 10 種類の病原体を一つの培地で増幅することを目的に、新しい増殖培地を試作し、従来の選択培地との増殖を比較した。

B. 研究方法

スクリーニングの対象病原体すべてを増幅する増殖培地 EZ-broth を作成し、既存の増殖培地と比較した

C. 結果

血液無添加の EZ-broth ですべての標的病原体 406 時間で 1000- から 10000 倍まで増殖した。

そのうち増殖に血液が使用される *Campylobacter* は緩衝ペプトン水では 3 時間で菌が死滅したが血液無添加の EZ-broth では血液添加のボルトン選択培地と短時間培養では同等以上の増殖を示した。一方、*Listeria* 菌は従来の EB broth より EZ-broth が迅速に増幅させることが分かった。

D. 考察

新しく開発した EZ-broth は *Campylobacter* を含む標的病原体を短時間で増殖させる培地として利用できることが証明された。食材の検査には通常緩衝ペプトン水が使われるが、この培地では *Campylobacter* や *Listeria* 菌を増殖させることができないので、EZ-broth 一つで増殖培養する方法が確立されたことは意義が大きい。このことで生きた菌の網羅的な検査法が単一培地で実施する道が開けた。

E. 結論
 網羅的な遺伝子検査の前培養法として血液非添加培地を開発し、*Campylobacter*をはじめとするすべての標的病原体をこの培地で4-6時間培養検査したのち、遺伝子検査に移行する手法を開発した。

F. 該当なし

G. 研究発表

第21回 臨床微生物学回総会、久保田佐代子、林将大、吉田茂、江崎

孝行、短時間培養を用いた遺伝子検査法による生きた病原体のスクリーニング法
 東京、2010,1.31

H. 知的財産権の出願・登録状況
 国際特出願済み：US12/311,217
 Detection of bacterium by utilizing *dnaJ* gene and use thereof

出願国は米国、中国、ベトナム、タイ、フランス、ドイツ、イギリス、

表1. EZ-broth との比較に使用した培地

標的菌種	比較用増菌培地	定量培養用培地
<i>Bacillus cereus</i>	緩衝ペプトン水	HI 寒天培地
<i>Campylobacter jejuni</i>	ボルトン選択増菌ブイオン	ヒツジ血液寒天培地
<i>Escherichia coli-Shigella spp.</i>	EE ブイオン	マツコンキー寒天培地
<i>Listeria monocytogenes</i>	EB 培地	ヒツジ血液寒天培地
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5 % NaCl, 1 %ピルビン酸 Na 添加 TSB	マンニット食塩培地
<i>Salmonella enteritidis</i>	緩衝ペプトン水	DHL 寒天培地
<i>Vibrio cholerae</i>	アルカリペプトン水	TCBS 寒天培地
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	アルカリペプトン水	TCBS 寒天培地
<i>Yersinia enterocolitica</i>	緩衝ペプトン水	HI 寒天培地

図1. EZ-brothでの各病原体の増殖

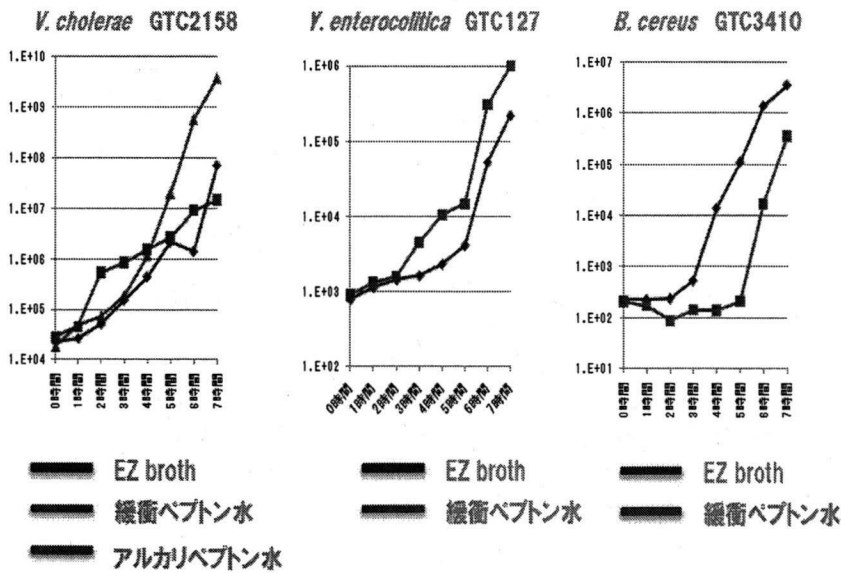
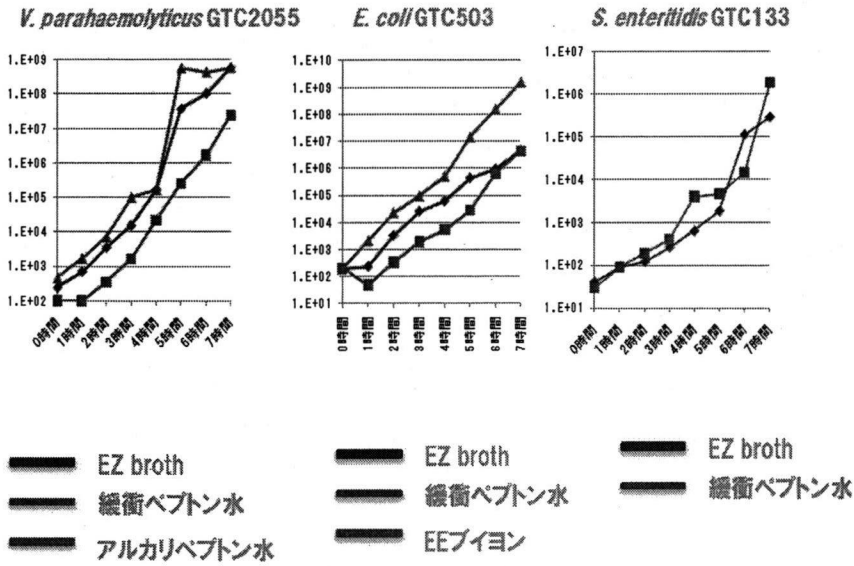
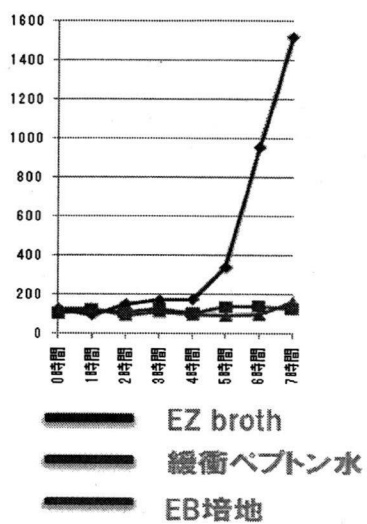
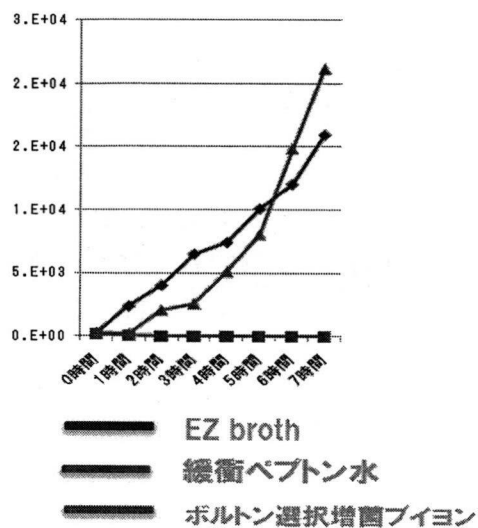


図2. *Campylobacter* と *Listeria* の増殖を既存の増殖培地と比較した。

L. monocytogenes GTC149



C. jejuni GTC259



食品を対象とした下痢症起因菌の試験法に関する研究

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者	小西 典子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	尾畑 浩魅	//
	下島優香子	//

研究要旨

食品から VTEC を分離するには、ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養後、免疫学的手法および PCR 法を併用することで、比較的効率良く分離できた。血清型 O157 および O157 以外の血清型菌ともに牛肉（特にレバー等の内臓肉）由来が多かった。しかし、O157 以外の血清型では、牛肉のほか豚肉由来株も認められた。

検出された血清型 O157 菌株の毒素型は、VT2 産生性が 43 株（59.7%）、VT1&VT2 産生性が 24 株（33.3%）、VT1 単独産生が 5 株（6.2%）であった。VT2 variant 遺伝子保有株は、O157 で 61.4%、O157 以外の血清型菌で 40.6% であり、ヒト由来株に比べて高い割合であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 等の人の発症菌量は、数 100 個と非常に少量であるため、少量の EHEC(VTEC)で汚染された食品でさえも食中毒の原因となりうる。一般に食品の VTEC 汚染菌量は少なく、その検出は、糞便からの検出に比べて遥かに困難である。一方、O157 を始めとするベロ毒素産生性大腸菌（VTEC）による食中毒の原因食品や汚染源を明らかにするためには、食品からの VTEC 検出が非常に重要である。食品からの VTEC 分離状況と分離菌株の性状について報告する。

B. 研究方法

1) VTEC の検出方法

食中毒の原因食品および感染源を調べる目的で当センターに搬入された食品を対象とした。食品にノボビオシン加 mEC 培地を加え、42°C 18～20 時間培養後、その培養液について、免疫学的方法（酵素免疫測定法、イムノクロマト法）で O157 抗原を、遺伝子学的方法（PCR 法、LAMP 法、real-time PCR 法）で VT 遺伝子の有無をスクリーニングした。いずれかの方法で陽性の場合には、培養液を CT-SMAC, CHROMagar O157TAM, DHL 寒天等へ塗抹し、O157 あるいは

その他の血清型の VTEC の分離を試みた (図 1)。

2) 分離菌株の血清型および毒素型

1997 年～2008 年に食品から分離された VTEC O157 の 72 株および O157 以外の VTEC 32 株を供試した。これらの菌株を対象に、血清型別及びベロ毒素産生性試験 (ラテックス法又は PCR 法) を行った。また、VT2 variant 株の検出を PCR 法で行った (表 1)。

C. 研究結果

1) 食品からの VTEC 検出

血清型 O157 の検出数を食品別にみると、牛肉関連 (レバー, ホルモン, カルビ等) が 38 株 (52.7%), 豚肉関連 (コブクロ, 軟骨等) 5 株 (6.9%), 野菜 (大豆もやし, ぜんまい) 2 株 (2.7%), 肉種不明の食肉・内臓肉が 27 株 (37.5%) であった。O157 以外では、牛肉関連が 20 株 (62.5%), 豚肉関連 10 株 (31.3%), カクテキおよび鶏肉由来が各 1 株 (3.1%) であった (表 2)。O157 が検出された食品は牛肉由来が多いのに対して、O157 以外の血清型では牛肉のほか豚肉由来も多かった。

2) 検出菌の毒素型

(1) 血清型 O157 菌株

毒素型は、VT2 産生性が 43 株 (59.7%), VT1&VT2 産生性が 24 株 (33.3%), VT1 単独産生が 5 株 (6.2%) であった。この内、44 株 (61.1%) に VT2 variant 遺伝子保有株が認められた (表 3)。これらは、いずれも VT2c (VT2h) で、牛肉、豚肉、

野菜等から分離された菌株である。

(2) O157 以外の血清型菌株

分離された菌株の血清型は、O26, O74, O103 が各 2 株, O153, O91, O8 が各 1 株, 型別不能 (OUT) が 23 株であった (表 4)。VT2 variant 遺伝子保有株は、牛由来の 5 株はいずれも VT2c (VT2h) 遺伝子保有, 豚由来の 7 株はすべて VT2e (VT2p) 遺伝子保有株であった。

D. 考察

食品から VTEC を血清型に関わらずに全体的に分離する方法としては、ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養後、免疫学的手法および PCR 法を併用することで、比較的効率良く分離できた。しかし、血清型 O111 などはノボビオシンを含まない mEC 培地で増菌培養した方が良い場合もある。

血清型 O157 および O157 以外の血清型菌ともに牛肉由来が多く、牛肉、特にレバーなどの内臓肉はリスクの高い食肉である事が示唆された。豚肉から O157 以外の血清型菌が 10 株 (31.3%) 認められたが、その内 7 株 (70%) は、豚の浮腫病に関与すると考えられている VT2e (VT2p) 産生菌であり、ヒトの下痢症には関係しないものと考えられる。

食品から検出された血清型 O157 菌株の毒素型は、VT2 産生性が 42 株 (58.3%), VT1&VT2 産生性が 25 株 (34.7%), VT1 単独産生が 5 株 (6.9%) であった。東京都で分離されたヒト由来株は VT1&VT2 が 59%,

VT2 が 40%、VT1 は 1%であることと比較すると、食品由来株は VT2 単独産生株が多い傾向であった。

VT2 variant 遺伝子保有株は、O157 で 61.4%、O157 以外の血清型菌で 40.6%であり、ヒト由来株に比べて高い割合であった。

E. 結論

食品から VTEC を分離するには、ノボビオシン加 mEC 培地で増菌培養後、免疫学的手法および PCR 法を併用することで、比較的効率良く分離できた。

血清型 O157 および O157 以外の血清型菌ともに牛肉（特にレバー等の内臓肉）由来が多かった。検出された血清型 O157 菌株の毒素型は、VT2 産生性が 42 株（58.3%）、VT1&VT2 産生性が 25 株（34.7%）、VT1 単独産生が 5 株（6.9%）であった。食品由来株の VT2 variant 遺伝子保有状況は、O157 で 61.4%、O157 以外の血清型菌で 40.6%であり、ヒト由来株に比べて高い割合であった。

F. 健康危険情報

腸管出血性大腸菌 O157 等は、牛肉（特にレバー等の内臓肉）から分離された。牛肉（特にレバー等の内臓肉）は O157 に汚染されている可能性が高いので、取り扱いには十分注意が必要である。

G. 研究発表

1) 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、

上原さとみ、齊木 大、新井輝義、門間千枝、高橋正樹、仲真晶子、甲斐明美：食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出と分離菌株の性状、第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、大阪、2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食品(10~50g)

ノボビオン加mEC培地
42°C(あるいは37°C)
18~20時間培養

スクリーニング試験

O157抗原の検出:免疫学的手法
(酵素免疫測定法, イムノクロマト法等)
VT遺伝子の検出:遺伝学的手法
(PCR法, LAMP法等)

免疫磁気ビーズ法で集菌
選択分離培地に塗抹

ベロ毒素産生性試験
生化学的性状試験
血清型別試験等

図1. 食品からのベロ毒素産生性大腸菌検出方法

表1. 分離菌株の性状試験法

1. 血清型別

2. ベロ毒素産生性試験:

1)ラテックス凝集反応

2)PCR法:

VT1, VT2 : Pollard *et al.*, J.Cln.Microbiol.28,540-545,1990

VT2 variant株の検出

VT2h(VT2c):

Tyler *et al.*, J.Cln.Microbiol.29,1339-1343,1991

VT2p(VT2e):

Yamasaki *et al.*, Microbiol.Immunol.40,345-352,1996

VT2f :

Schmidt *et al.*, Appl.Env.Microbiol.66,1205-1208,2000

表2.ペロ毒素産生性大腸菌が検出された食品

食品	O157	O157以外の血清型
牛肉 *	38 (52.7%)	20 (62.5%)
豚肉 **	5 (6.9%)	10 (31.3%)
野菜	2 (2.7%)	1 (3.1%)
鶏肉	0	1 (3.1%)
不明	27 (37.5%)	0
合計	72	32

* 牛肉・豚肉にはレバー、ホルモン等の内臓肉を含む
 ** 野菜 O157 :大豆もやし, ゼンマイ
 O157以外の血清型:カクテキ

表3. 食品由来O157株のVT2 variant遺伝子保有状況

由来	菌株数	VT1	VT2	VT1+VT2	VT1+VT2h	VT2h	VT2p
牛肉	38	2	2	10	2	22	0
豚肉	5		1	2		2	0
野菜	2				2		0
不明	27	3	4	4	4	12	0
合計	72	5	7	16	8	36	0

VT2: 43株(59.7%), VT1+VT2: 24株(33.3%)
 VT1: 5株(6.2%),

44株(61.1%)

表4. 食品由来VTEC株の血清型(O157以外)およびベロ毒素産生性

由来	血清型	菌株数	ベロ毒素産生性					
			VT1	VT2	VT1+VT2	VT1+VT2h	VT2h	VT2p
牛肉	O26	2	1	1				
	O74	2		2				
	O103	2	2					
	O153	1		1				
	OUT	13	5	2	1	2	3	
豚肉	O91	1	1					
	O8	1						1
	OUT	8	2					6
鶏肉	OUT	1		1				
カクテキ	OUT	1						1
合計		32	11	7	1	2	4	7

13株(40.6%)

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

病原性 *Vibrio cholerae* の新規検出法の開発に関する研究

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

前年度の研究より明らかとなったコレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の血清型 01 株および 0139 株のゲノム DNA 上に存在する Integron Island 領域の多様性に多様性をより詳細に解析するために PCR-RFLP 法を用いて解析を行った。その結果、1990 年以前と 1994 年以後に分離された株間で RFLP パターン違いが見られる領域が明らかとなり、違いは後者当該領域における約 20 kb の DNA の「欠失」によるものであることが明らかとなった。

A. 研究目的

V. cholerae は現在も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。*Vibrio cholerae* による世界的流行は過去に 7 回あり、7 回目の世界流行はコレラ毒素産生性の *V. cholerae* 01 El Tor によって 1961 年から始まり、1992 年に出現した 0139 株による流行も含め現在も継続中である。前年度の研究補助により Tokunaga ら¹⁾ は過去に、Integron Island 上に散在する「*Vibrio cholerae* repeats」を利用した DNA フィンガープリンティング法を開発し、その結果得られたパターンが 1990 年頃を境に大きく 2 つに分けられることを報告した。歴史的にみて *Vibrio cholerae* に 1990 年前後起こった出来事は、コレラ毒素産生性血清型 0139 株の流行、*ctxB* 遺伝子に変異の起こった El Tor variant の出現、多剤耐性株の増加などが挙げられる。本研究では新たに Integron island 領域における変異がみられた。株間にみられるこの領域の多様性をより詳細に調べる

ため PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 解析を行った。さらに菌株分離年と RFLP パターンの推移の関連について検討した。

B. 研究方法

1) 供試菌株：1971 から 2006 年に分離された毒素産生性 01 EL Tor 株を 70 株、1993 から 2006 年に分離された 0139 株を 18 株、計 88 株を供試した (Table 1)。01 型株は 1971 年から 2004 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 年までにアジアや欧州のデンマークから分離された株を含んでいる。
2) Long-PCR 領域の選定：N16961 株の塩基配列情報を基に Integron Island (約 120 kb) 内で任意選択した遺伝子群についてその保有を PCR にて上記菌株を供試して確かめた。次に全株で保有が確認された 7~17 kb の遺伝子間を「挟み込む」PCR プライマーセット (Table. 2) を作成し、全領域を 11 領域 (I - XI) に分割した (Fig. 1)。

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

No	Strain	Serogroup	Origin	Year	No	Strain	Serogroup	Origin	Year	
*	1	N16961	O1(Inaba)	Bangladesh	1971	45	7H285	O1(Ogawa)	Japan	1995
*	2	1002	O1(Inaba)	Japan	1978	46	7H449	O1(Ogawa)	Japan	1995
	3	1003	O1(Inaba)	Japan	1989	47	8H215	O1(Ogawa)	Japan	1996
	4	1010	O1(Inaba)	India	1991	48	9H235	O1(Ogawa)	Japan	1997
	5	Q5	O1(Inaba)	Japan	1989	49	10H1	O1(Ogawa)	Japan	1998
*	6	1001	O1(Ogawa)	Japan	1977	50	10H53	O1(Ogawa)	Japan	1998
	7	1004	O1(Ogawa)	Japan	1991	51	10H169	O1(Ogawa)	Japan	1998
	8	1005	O1(Ogawa)	Peru	1992	52	10H664	O1(Ogawa)	Japan	1999
	9	1006	O1(Ogawa)	Bolivia	1992	53	11H215	O1(Ogawa)	Japan	1999
*	10	1008	O1(Ogawa)	Indonesia	1995	54	11H558	O1(Ogawa)	Japan	2000
	11	1009	O1(Ogawa)	India	1991	55	13H59	O1(Ogawa)	Japan	2001
	12	1011	O1(Ogawa)	Mongol	1996	56	13H82	O1(Inaba)	Japan	2001
*	13	11	O1(Ogawa)	Thailand	1997	57	13H173	O1(Inaba)	Japan	2001
*	14	14	O1(Ogawa)	Thailand	1997	58	13H183	O1(Inaba)	Japan	2001
	15	19	O1(Ogawa)	Singapore	1997	59	13H257	O1(Ogawa)	Japan	2001
	16	39	O1(Ogawa)	China	1997	60	15H245	O1(Inaba)	Japan	2004
*	17	5	O1(Ogawa)	Thailand	1997	61	15H438	O1(Inaba)	Japan	2004
	18	58	O1(Ogawa)	Philippines	1997	62	17H16	O1(Ogawa)	Japan	2005
*	19	81	O1(Ogawa)	Thailand	1997	63	18H24	O1(Ogawa)	Japan	2006
	20	1008-96	O139	China	1996	64	63H194	O1(Ogawa)	Japan	1983
	21	1010-94	O139	Denmark	1994	65	52H15	O1(Ogawa)	Japan	1977
	22	1056-93	O139	Japan	1993	66	53H54	O1(Ogawa)	Japan	1978
	23	1180-93	O139	Japan	1993	67	53H55	O1(Ogawa)	Japan	1978
	24	184-93	O139	Bangladesh	1993	68	53H164	O1(Ogawa)	Japan	1979
	25	199-98	O139	India	1998	69	56H43	O1(Ogawa)	Japan	1981
*	26	21-93	O139	India	1993	70	56H90	O1(Inaba)	Japan	1981
	27	234	O139	Japan	2004	71	56H92	O1(Inaba)	Japan	1981
	28	236-93	O139	Japan	1993	72	57H193	O1(Ogawa)	Japan	1983
	29	252	O139	Japan	2006	73	59H179	O1(Ogawa)	Japan	1984
	30	294-94	O139	Japan	1994	74	59H290	O1(Inaba)	Japan	1985
	31	298-95	O139	Thailand	1994	75	61H151	O1(Inaba)	Japan	1986
	32	387-94	O139	Korea	1994	76	63H189	O1(Ogawa)	Japan	1978
	33	435-94	O139	Japan	1994	77	63H192	O1(Ogawa)	Japan	1981
	34	495-93	O139	Japan	1993	78	63H193	O1(Ogawa)	Japan	1982
	35	515-95	O139	Bangladesh	1993	79	63H196	O1(Ogawa)	Japan	1984
*	36	63-93	O139	India	1993	80	63H197	O1(Inaba)	Japan	1984
	37	895-94	O139	Japan	1994	81	63H198	O1(Inaba)	Japan	1984
	38	2H284	O1(Inaba)	Japan	1991	82	63H200	O1(Ogawa)	Japan	1984
	39	4H77	O1(Ogawa)	Japan	1992	83	63H201	O1(Ogawa)	Japan	1985
	40	5H172	O1(Ogawa)	Japan	1993	84	63H202	O1(Ogawa)	Japan	1985
	41	5H176	O1(Ogawa)	Japan	1993	85	63H203	O1(Ogawa)	Japan	1985
	42	5H297	O1(Ogawa)	Japan	1994	86	63H206	O1(Ogawa)	Japan	1987
	43	5H332	O1(Ogawa)	Japan	1994	87	58H164	O1(Ogawa)	Japan	1983
	44	6H58	O1(Ogawa)	Japan	1994	88	63H199	O1(Ogawa)	Japan	1984

* Used for the preliminarily PCR-RFLP analysis

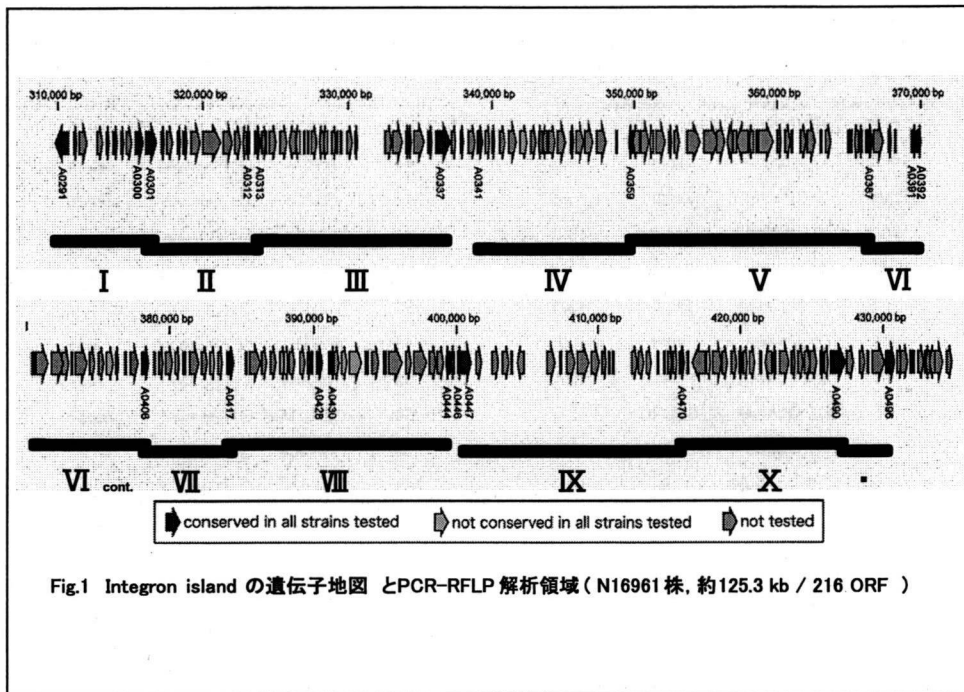


Table.2 PCR-RFLP解析に用いたプライマーの配列の一覧

領域	標的遺伝子(領域)	プライマー配列	相同領域(N16961)	推定産物長(kbp)
I	VC_A0291-0301	TGGGCTTAAACACCGCTTG	309765-309784	7.1
		ACCACCGGCTAAATCCAGAA	316842-316823	
II	VC_A0301-0313	GCTCAAACGGTTTTCCG	316168-316186	7.7
		GTGTAAGTCCCAAATGTCCTT	323890-323868	
III	VC_A0313-0337	ATCATCTAGCGATGGCTGTCGTA	323512-323534	13.5
		TGCTTTTACCCAACGATCTTC	337029-337009, 396243-396223	
			329881-329903, 338994-339016, 412384-412406, 349926-349903	
IV	VC_A0341-0359	GTCACCTTGATCATTGGTTCTG	329881-329903, 338994-339016, 412384-412406	10.9
		GAAACCATTTAATCTTACCGTCGC	349926-349903	
V	VC_A0359-0387	TATTGGTTCACATCCATGCTCT	349641-349663	17
		TAAAGCGGACTCTACGTTAAGCG	366677-366655	
VI	VC_A0387-0406	GAAGATATTGCGGCATTACCGACATCTT	366195-366224 325735-325706, 344507-344478, 378593-378564, 399155-399126	12.4
		GCTGCTGAACGTAAATGAGCCGATTTGTAT		
VII	VC_A0406-0417	TGAATGTTGCTTGGCA	378120-378137, 325262-325279	6.3
		CTCTCGGATAAAACGGACA	325073-325054, 384453-384434	
			324577-324597, 383957-383977	
VIII	VC_A0417-0447	GGCTTCGTTCACTTGAAGTGG	400973-400953, 618-598	17
		AGTGCAATTAAGTTGAGCC		
IX	VC_A0447-0470	GTTAGGTTATGCGTTTTCCCTCG	400358-400379	15.8
		CTGGTTACTCGAACTGTTGTACG	416145-416122	
X	VC_A0470-0490	CGATTACAACGAAGTGATTGC	415748-415768	11.5
		CAGACTCACTTACACCGACA	427281-427261	
-	VC_A0490-0496	GTTGCGCTATCATCTCGAGCTT	426363-426384	4.5
		TGTGGTTCTGAAACGGCTACTC	430843-430822	

3) 代表 10 株を供試しての予備実験：分離地、分離年の異なる代表 10 株の選択を行った (Table 1 において星印をつけた株)。これを用いて上記 11 領域に対する long PCR を行い、全 10 株で増幅産物が得られた領域について HaeIII 処理による RFLP 解析を行った。

4) 全株 (88 株) を供試しての IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析：明らかなパターンの違いが見られた領域について前項 10 株を含む全 88 株を用いて PCR-RFLP 解析を行った。

5) VI 領域における更なる解析：全塩基配列の決定されている 2 株を用いての Integron Island 領域の配列比較：全塩基配列の決定されている N16961 株と MJ-1236 株について GenomeMatcher 1.332 (Copyright (c) 2007 Y. Ohtsubo, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda) を用いて *in silico* の比較解析を行った結果、1990 年以後に分離された株 MJ-1236 株で約 20 kb の欠失が起こっていることが予測された。これを全株で確かめるために、予測欠失領域上に増幅産物が得られるようなプライマーセットを作成し (Fig. 2)、さらにこの領域外から先のプライマーセットのうち一方との間で同じく増幅産物が得られるようなプライマー (Fig. 2) を作成し追補の PCR を行った。

C. 研究結果

1) 代表 10 株を供試しての予備実験：10 株での解析の結果、III、VII、VIII を除く 8 領域において全株で増幅産物が得られた (Table 3)。

2) 上記 PCR 産物の RFLP 解析の結果、上記 8 領域中 I・IV・V・VI・X、特に IV と VI 領域において RFLP パターンに違いが見られた (Fig. 3)。

3) 全株 (88 株) を供試しての IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析：明らかなパターンの違いが見られた IV・VI 領域において残りの供試菌株 78 株を加えて同様の解析を行った。その結果、IV 領域では 0139 全株が共通のパターンとなり、他方、VI 領域では 2 つのパターン (A, B) がみられ、1990 年以前の分離株では A パターンを示すのに対し、1994 年以後の分離株では総てが B パターンを示した。 (Fig. 4)

4) VI 領域における追補 PCR によって B パターンを示す株はこの領域の一部を含む約 20 kb が欠失していることが判明した。

D. 考察

前年度の研究にて行われた VCR-PCR では、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であった。このうち南米で分離された 2 株は他の株では見られない特異的なパターンを示した。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。本実験で行った IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析によっても同様の結果が得られた。IV 領域では 01 株と 0139 株が識別されたものの、VI 領域では血清型による違いは見られなかった。しかし VI 領域の結果は分離年と相関がみられ VCR-PCR にて示唆された 1990 年以前と以後に分離された菌株間の差異が、この領域によるものであることが予測された。この領域で何が起こったのかを知るために、全塩基配列が利用可能な 2 株を用いて Integron 領域の配列比較を行った。

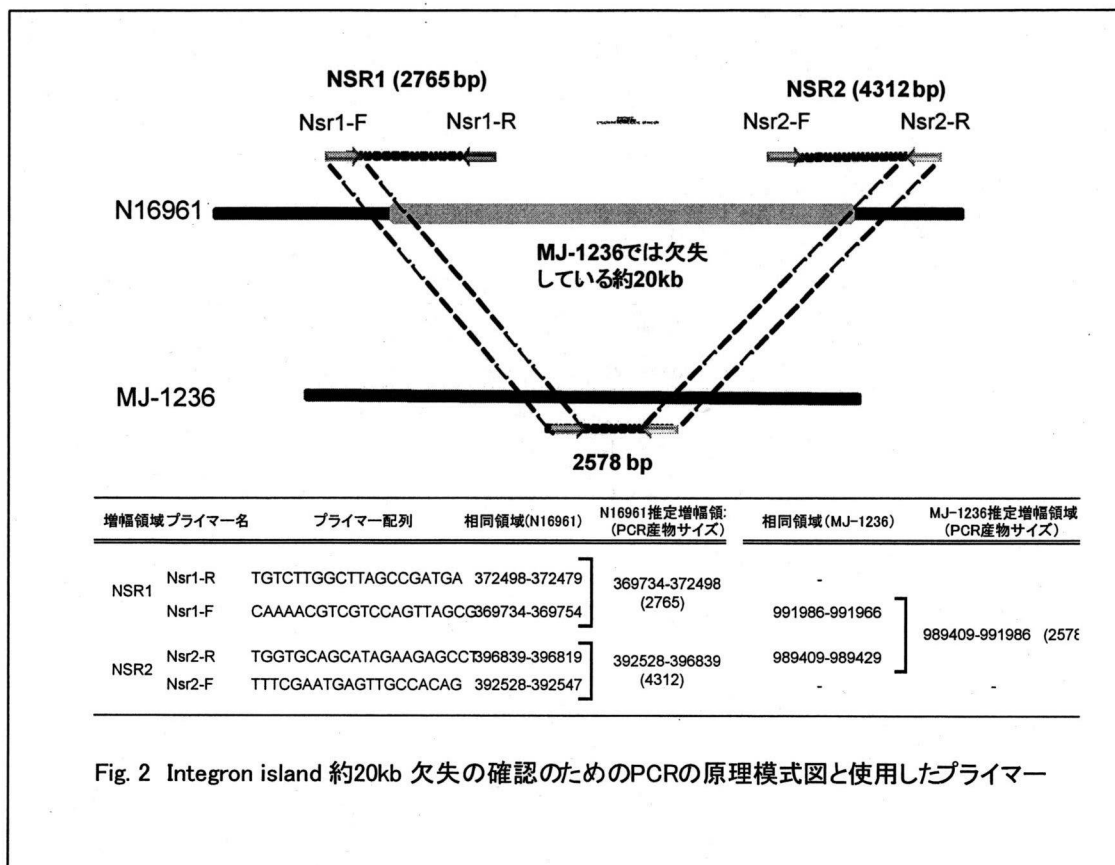
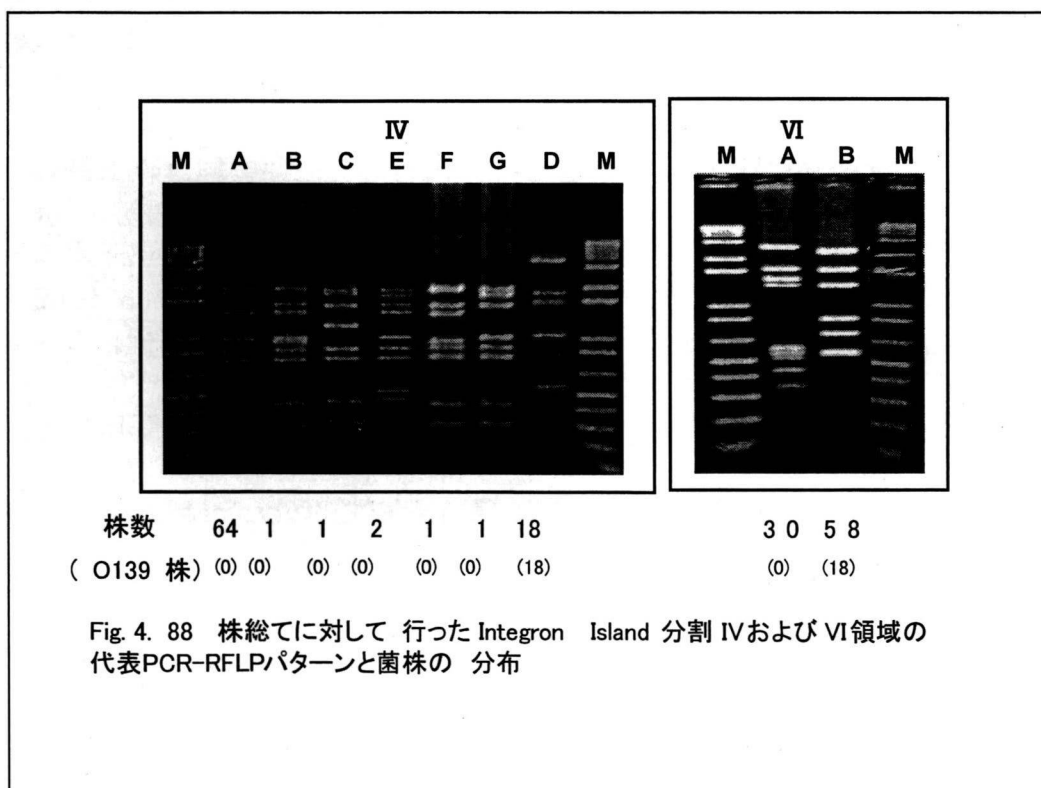
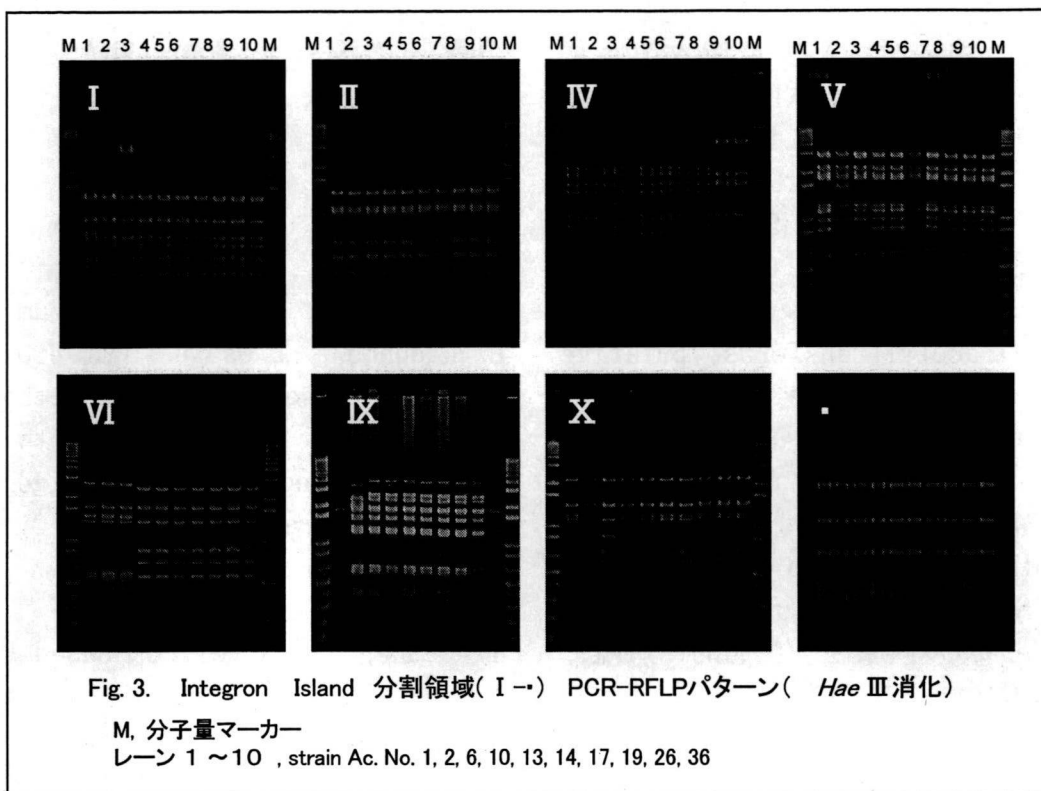


Fig. 2 Integron island 約20kb 欠失の確認のためのPCRの原理模式図と使用したプライマー

Table.3 Integron Island I⁺ の有無確認PCRの結果

Strain Ac. No.	Integron Island 分割領域番号										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	・
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	[+]	+	+	[+]	+	+	+	+	+	+	+
6	[+]	+	+	[+]	+	+	+	+	+	[+]	+
10	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
13	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
14	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
17	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
19	[+]	+	+	+	+	[+]	-	-	+	+	+
26	[+]	+	-	+	+	[+]	-	-	+	+	+
36	[+]	+	-	+	+	[+]	-	-	+	+	+

[+]: N16961株と異なるサイズの増幅産物が得られた



その結果、1990年以前に分離された N16961 株を含む毒素産生性 *V. cholerae* 01 El Tor 株に特異的な領域が判明した。VI領域においてみられた 1994年以降に分離された PCR-RFLP パターンの違いは、約 20 kb の「欠失」によるものであった。Genbank のデータベースによると当該の約 20kb には 4つの acetyltransferase putative gene と 1つの lipoprotein 構築に係る gene を含む 42 の open reading frame が存在するとされているが、残り 37 個の orf は機能未知の hypothetical protein である。これらの hypothetical protein 群に *V. cholerae* の病原性や生態的に遊離に働く遺伝子に抑制する遺伝子が含まれていれば、その欠失は新たな病原性の発現につながり、それによって 1990年以降の世界的流行を説明することができるかもしれない。したがって今後は、約 20 kb 領域にコードされる遺伝子の欠失による表現型（薬剤耐性、ファージ感受性等）や病原性（接着性、毒素産生性等）への影響について検証する予定である。

他方、そのこの「欠失」を検出するべく本年度の研究によって開発された PCR 法は、今後流行しうる“新型”菌株を早期、簡便に検知する上で有用であると考えられる。

E. 結論

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の血清型 01 株および 0139 株のゲノム上に存在する Integron Island の PCR-RFLP 法を用いて解析を行った結果、1994 年以後に分離され株総てに 20 kb の「欠失」が認められた。

F. 健康危険情報

現段階で国民に緊急知らせた方がよい情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tokunaga, A., H. Yamaguchi, M. Morita, E. Arakawa, H. Izumiya, H. Watanabe, R. Osawa. (in press) Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139. Mol. Cell. Probes.

2. 学会発表

1) Osawa, R.: Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139 strains, The 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, in Kolkata, India (2009. 4).

2) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析」日米コレラ国内総会(2009. 7)

3) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: 「コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析」第 43 回腸炎ビブリオシンポジウム (2009. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況 特に無し

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御に関わる因子の研究

研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所・副所長
研究協力者 三戸部治郎 同細菌第一部・主任研究官

研究要旨

赤痢菌のType III secretion system (TTSS) 遺伝子群は生育環境によって発現が厳密に制御され、環境中での生育には不要なTTSS遺伝子群の発現を抑えることで、生存に有利に働いている。この制御はTTSSのレギュレータであるInvE 蛋白発現の転写後制御で調節され、その制御に関わる新たな蛋白因子としてRNA 結合蛋白RodZを同定し、その機能を遺伝学的、生化学的に解析した。

A. 研究目的

赤痢菌のTTSS遺伝子群は温度と浸透圧によって発現が厳密に制御されている。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時には極めて分子量の大きな構造体であるTTSSの発現を抑えることで、環境中での生存に貢献しているものと考えられる。

TTSSの発現制御はレギュレータ遺伝子 *virF*, *invE*の転写レベルでの調節とされていたが、これらのmRNAは発現抑制時でも転写されており、制御の本態は長らく不明であった。分担者はこれらの調節がInvE蛋白発現のPost-transcriptionalな段階で調節されていることを明らかにし、細菌の主要なRNA結合蛋白Hfqが関与することを明らかにしてきた（発表論文）。

また、二成分制御系のセンサーCpxAの欠損でもPost-transcriptionalな段階でInvE 発現が減少することが示されており、転写後制御に関与する別のカスケードが示唆されていた。

本研究ではCpxA欠損下で増加しInvE発現を抑制する因子が存在する

と考え、*cpxA*欠損株のTTSS発現を回復させ

る変異体のスクリーニングを行った。得られた変異体は形態が球状に変化しており、他の研究グループよりが報告されている桿菌の形態形成にかかわる細胞骨格蛋白をコードする遺伝子*rodZ*であることが分かった。

この研究ではTTSS制御に関わる新たな蛋白因子としてのRodZの機能を遺伝学的、生化学的に解析した。

B. 研究方法

1) 遺伝学的解析：D群赤痢菌 *Shigella sonnei* HW383株の病原性プラスミドpSS120 並びに、TTSS発現のレポーターとして *mxiC-lacZ* fusionプラスミドpJM1717を保持した大腸菌K-12株の *cpxA*欠損変異体ME2824に常法を用いてEZ::Tn5を導入し、TTSSの発現が回復するコロニーをX-gal含LB培地で37°C 18時間培養し選択した。常法により *S. sonnei*の*rodZ*遺伝子の欠損変異株MS5201株を作成した。菌株はLB培地で30°Cで一晩培養したものを、LB培地で100倍希釈し30°Cないし37°CでOD₆₀₀が1.0になるように培養し、50 µlを用いてβ-galactosidase活性を測定した。また10 µlを10% SDS-PAGEで泳動し、InvEおよびIpaBに対する抗体を用いてウエスタンブロー