

株が少なくとも 1999 年に存在していたことを明らかにした。この傾向は 2009 年も継続されており、今後の動向が注目される。アジア各国からの輸入事例由来の O157:H7 株には現在のところ clade 8 株は見出されないが、今後も継続して調査が必要であると考えられる。大腸菌の産生する NorV は嫌気条件下において NO を不活化（還元化する）活性を持つ。NO は Stx2 の発現を抑制することから、*norV* 遺伝子内部に欠失が見られない clade 8 では、欠失が見られる clade 1, clade 2, clade 3 に比べて、感染したヒトの腸管内において NO の活性が低く、その結果、Stx2 の産生量が高い可能性が考えられる。今後その正当性について検証する必要がある。

同様に、LEE の発現レベルについてもより詳細な解析が必要である。我々のこれまでの研究から、EHEC O157 の多くが産生することが知られている溶血素、エンテロヘモリシンの発現は LEE にコードされる発現制御因子によって LEE の発現と協調的に制御されていることが明らかとなっている。clade ごとのエンテロヘモリシンの活性レベルについても今後検討していく必要があると考えられる。一方で、clade 8 が臨床症状に関わらず、国内で分離される O157:H7 全体にどれくらい分布しているかについては現時点では不明である。現在、clade 8 かどうかを決定するためには塩基配列の決定が必要であるが（RT-PCR 方が米国の研究者によって提案されているが、特異性に問題があるため使えない）、多検体を処理するためには SNP を利用した特異的な PCR 法を確立する必要がある。これらに関しては来年度の課題としたい。

E. 結論

- ・国内で分離される高病原性株（HUS 患者由来株）の中には、米国で見出されている高病原性株と同一の遺伝系統株（clade 8 株）が 1999 年の国内株に存在することが明らかとなった。

- ・1999 年から 2009 年までに分離された株の解析から、clade 8 株の HUS 患者由来株における割合は、ほぼ同数の無症状保菌者由来株における割合よりも有意に高いことが明らかとなった。

- ・clade 8 株では他の clade 株と比較して、Stx2, LEE およびエンテロヘモリシンの活性が上昇している可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- ・伊豫田淳、寺嶋淳、泉谷秀昌、渡邊治雄：「日本国内における腸管出血性大腸菌感染症の現況と分離株の性状」

獣医畜産新報 62 : 801-806, 2009.

- ・Honda N., Iyoda S., Yamamoto S., Terajima J., and Watanabe H. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB.

Mol. Microbiol. 74:1393-1411, 2009.

表 1

-- clade analysis: SNPs in 96 loci (P.N.A.S 2008 105: 4868–4873)

Year	presence of clade 8 in strains (clade 8 / tested strains) from:	
	HUS	asympt. carriers
1999-2008	16.5% (45/272)	3.33% (5/264)
2009 (as of Dec 15th)	19.4% (7/36)	0% (0/40)

chi-square test, clade 8 / other clades in HUS / asympt strains: χ^2 1999-2003, $p=0.0003$;
 χ^2 2004-2008, $p=0.006$.

-- clade 8 in strains imported from other Asian countries?

during Y2004-2009,
 O157:H7 strains isolated from patients (not develop HUS) who had returned from
 China (7), Korea (7), Turkey (5), Indonesia (1) were examined for the
 presence of clade 8:

so far, no clade 8 strains (There should be more O157:H7 strains from Asian countries).

表 2

PCR results of *norV*, which encodes NO-reductase

clade	<i>norV</i>	
	+	-
clade 1	0	6
clade 2	(1)	15
clade 3	0	16
clade 8	25	0

Since NO has been shown to reduce Stx2 (Shiga-toxin 2 levels) expression level (PNAS 104: 10199-10204, 2007),

the presence of functional *NorV* in clade 8 strain may be responsible for an increase of Stx2-expression level in an anaerobic condition (intestine).

表 3

Evaluation of LEE expression level

Secreted proteins through LEE-T3SS	Expression rate [clade 8 / other clades] (n=18) (n=17)
EspB	1.505
EspA	1.547
EspP(non-LEE encoded)	1.519

Student's t-test (unmatched, 2-tailed):

EspB levels, $p=0.0017$

EspA levels, $p=0.00063$

EspP levels, $p=0.00044$

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「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」

メコン川流域諸国とのラボラトリーネットワークの構築の試みー腸管外病原性大腸菌およびコレラ菌の分子疫学解析ー

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者

泉谷昌秀（国立感染症研究所 細菌第一部）

Dr. Sithivong Noikaseumsy (National Center for Laboratory and Epidemiology, Lao PDR)

Dr. Kiratisin, Pattarachai (Faculty of Medicine Shiriraj Hospital, Mahidol University, Thailand)

研究要旨：メコン川流域諸国の感染症対策戦略として、ラオスおよびタイと連携し、病原細菌の分子タイピング法を用いた共同研究を実施した。最終的に3国間の分子系統解析ネットワークを構築することを目標とし、それぞれ、*Vibrio cholerae* 流行の分子疫学解析、腸管外病原性大腸菌の系統解析と薬剤耐性遺伝子の解析を行った。迅速な解析を行う必要性が高い際には、菌株の輸送に制約が強いため、核酸を用いた解析が重要であると考えられた。

A. 研究目的

細菌感染症対策のためには、分離同定された病原細菌の分子タイピングを行うことが重要となってきた。細菌のフィンガープリンティング法として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulse-field gel electrophoresis) を用いたゲノム DNA の制限酵素切断パターンの比較法が広く実施されている。また、ゲノム上に存在するタンデムリピート配列のリピート数を高精度 DNA フラグメント長解析とそれらの比較に基づいた MLVA 法が次世代フィンガープリ

ンティング法として利用されている。一方、系統解析として Multi-locus sequence typing 法が多く病原細菌の解析に用いられている。しかしながら、PFGE 法および MLVA 法、あるいは塩基配列決定に必要な機器は、開発途上国において必ずしも整備されていない。

タイ、ラオス、カンボジア、ミャンマー、ベトナム、中国南部からなるメコン川流域諸国は、貧困国を内包し、流域としての開発が貧困対策として重要視されている。その結果、近年の本地域経済の発展に伴い流

域諸国間の経済的連携を強めている。道路等の整備とともに、今後さらに人々の移動および食品流通が盛んになることが予想される。そのなかで、地域間の感染症の広がりが危惧されるが、十分な対策、特に病原体の比較解析を行う準備はなされていない。

メコン川流域諸国は、各国間、あるいは各国地域間の経済格差が激しい。コレラ等の腸管感染症の流行が見られると同時に、薬剤耐性菌の問題も先進国同様に認められつつある。

アジアとのラボラトリーネットワークの一部としてメコン川流域諸国との連携を強化するためには、各国の病原体解析技術を高めるとともに、我々がもつ高度解析技術を提供することがひとつの方策であると考えられる。地域外の我々が関与することで、メコン川流域諸国間のネットワーク構築の一助となるばかりでなく、病原体情報をいち早く入手することで国内への侵入監視等にも活用できると考える。

本年度は、病原体の分子タイピング法を利用して、タイおよびラオスとの連携を構築する試みとして、それぞれ腸管外病原性大腸菌とコレラ菌に関する分子タイピング法を用いた共同研究を実施した。

B. 研究方法

1. タイ・バンコクにおける Fluoroquinolone 耐性腸管外病原性大腸菌の解析

1-1 腸管外病原性大腸菌株

Mahidol University Siriraj Hospital に

おいて分離された尿路由来、および血液培養由来の大腸菌のうち Fluoroquinolone, (シプロフロキサシン)耐性株を、それぞれ 24 株ずつ、計 48 株を解析対象株とした。同定および薬剤耐性は Vitek を用いて行った。

1-2 ゲノム DNA の調整

Mahidol University Siriraj Hospital にて、解析対象株を培養後、TE 200 μ l に OD600 =1 になるように懸濁した。懸濁液をボイルしたのち、菌体成分を遠心分離したのち、上清をゲノム DNA 溶液とした。得られたゲノム DNA 溶液は室温にて、国立感染症研究所に送付された。

1-3 Multilocus Sequence Typing

adk, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* 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 処理後、塩基配列決定を行った。それぞれの配列の allele number, および ST number のアサメントは Cork University で維持管理されている Escherichia coli MLST databases (URL:<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)を用いて行った。

1-4 *gyrA* および *parC* 配列決定

gyrA および *parC* 遺伝子の増幅および配列決定に用いたプライマーは表 1 に示した。PCR 増幅は、96°C-2min-(96°C-10 sec-60°C-10 sec-72°C-2min) 30cycles-72°C-2min で行った。

Table 1 Primers *gyrA* and *parC* sequencing.

For amplification
*gyrA*_ECF

ACCTCAAACCTGCGCGGCTG

TG	
gyrA_R2	GGGAGATGGCTCCCTTTTG
GC	
parC_ECF	TGTAGTATCTCCGCAATAT
TGC	
parC_ECR	GGGTTGAATACGCTGCCGG
ATG	
For sequencing	
gyrA_EC_S1	GACGGTCGATTTTCGTTG
gyrA_EC_S2	ATTGAAGTAAAACGCGAC
gyrA_EC_S3	GGGTAGCGCCGATCG
gyrA_EC_S4	GGCGATGAGCTGATCG
gyrA_EC_S5	ATCGCACGGACAGAAG
gyrA_EC_S6	TCGGCGCTGTTAGCGG
gyrA_EC_S7	CATGGTCAATGCCAC
gyrA_EC_S8	TTTCCGTACCGTCATAG
gyrA_ECR	CCCAGACTTTACAGCCTGG
AC	
parC_EC_S1	GCACCACCGGTATTGC
parC_EC_S2	GAATGGCTGGTGTTC
parC_EC_S3	GGCCATGATATCGACG
parC_EC_S4	GATGTTCCCGTAAGC
parC_EC_S5	GCCTTACCTGCACGG
parC_EC_S6	AATCTTCATCTCTCCAG
parC_EC_S7	TCTTCCAAACCGCGCG
parC_EC_S8	CCAGTCCCCTGACC

cholera (n=18) および 1998 年, 2000 年にラオスにおいて分離された *V. cholera* (n=2) を解析対象とした。2007 年分離株「は、Xekong 県における 12 月の集団発生時に分離された、患者由来株 (n=13)、環境由来株 (n=2)、と 10 月に散発例 (n=3) から分離された。(Fig. 1)

これらの菌株は、ラオス National Center for Laboratory and Epidemiology (NCLE) によって分離同定された。国立感染症研究所に送付された、これらの保存菌株を解析に用いた。

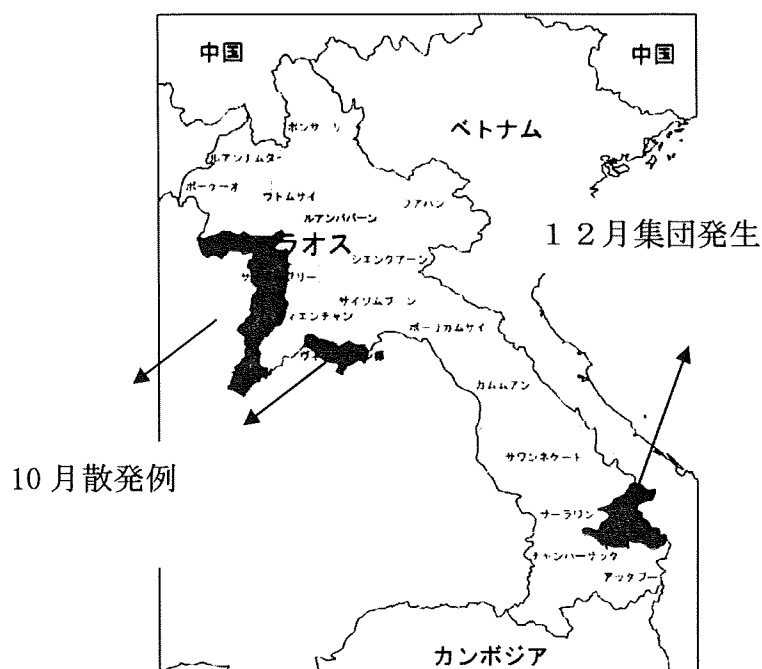
2-2 Pulse-field gel electrophoresis 制限酵素 *NotI* による制限酵素切断パターンの取得は PulseNet protocol (Cooper KL et al. Foodborne Pathog Dis. 2006;3:51-8.) を用いて行った。

2. コレラ菌の分子疫学解析

2-1 コレラ菌株

2007 年にラオスにおいて分離された *V.*

Figure 1 2007 年ラオスにおけるコレラ集団発生



C. 研究結果

1. タイ・バンコクにおける Fluoroquinolone 耐性腸管外病原性大腸菌 の解析

(1) MLST 解析

シプロフロキサシン耐性尿路感染症由来大腸菌および血流感染由来大腸菌それぞれ 24 株、計 48 株の MLST 型別を行い、16 種類の ST 型が見いだされた (Table 2)。多様な大腸菌がシプロフロキサシン耐性を獲得し、タイにおいて拡散していることが示された。その中でも、系統 B2 に属する ST131 が尿路感染、血流感染の両者において最も分離頻度が高かった (それぞれ 37.5%, 33.3%、全体で 35%)。ST648, ST1193, ST1340, ST156, ST405 が 3 株以上で認められたが、いずれも尿路感染由来株と血流感染由来株が混在しており、大腸菌血流感染の原発巣の多くが尿路感染であることと一致する。

日本、韓国ならびにヨーロッパで分離されるシプロフロキサシン耐性大腸菌の中で分離頻度が高い ST393 は、今回の解析株の中には存在しなかった。

(2) *gyrA* および *parC* 配列の多様性

シプロフロキサシンを含むキノロン耐性には 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 位の変異 (例えば、Ser から Leu への変異、Ser83Leu-*gyrA*)、および 87 位の変異 (例えば、Asp87Asn-*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 位および 84 位の変異 (例

えば、Ser80Ile-*parC*、Glu84Val-*parC*) が耐性の高度化に寄与していることが知られている。

タイで分離されたシプロフロキサシン耐性株の *gyrA* および *parC* 塩基配列決定を行い、QRDR の多様性と系統との関係を検討した。今回用いた Primer set によって、48 株中 43 株においては *gyrA* および *parC* の塩基配列決定が可能であった (Table 3)。ST1340 の 3 株を含む 5 株においては *gyrA* の PCR 増幅が認められず、Primer デザインの変更が必要であることが示唆された。

解析可能であった 43 株は系統に関わらず、いずれも Ser83Leu-*gyrA* 変異を持っていた。また、1 株をのぞいて全ての株が Asp87 位に変異を併せて獲得していた (Asp87Asn-*gyrA*, 41 株、Asp87Tyr-*gyrA*, 1 株)。

parC 配列からも Ser80 および Glu84 位に変異が存在する株が 43 株中 41 株および 22 株と高率に存在し、高度耐性を獲得していることが示唆された。

(3) QRDR 型別と系統との関連

Table 4 に示した通り 7 種類の QRDR 型が見いだされた。最も頻度が高い QRDR 型は、Ser83Leu-*gyrA*, Asp87Asn-*gyrA*, Ser80Ile-*parC* (Type 1, N=17) および Ser83Leu-*gyrA*, Asp87Asn-*gyrA*, Ser80Ile-*parC*, Glu84Val-*parC* (Type 3, N=17) であった。Type 1 と Type 3 QRDR の相違は Glu84 位の相違みである。しかしながら、共に Ser80Ile-*parC* を獲得しているが、その Ile に対応するコドンは Type 1 が ATC である一

方、Type 3 が ATT であることから、異なる由来であることが示唆された (Table 4)。MLST 解析の結果からも、Type 1 と Type 3 とは系統が異なる大腸菌であることが示された。Type 3 QRDR は、全てが ST131 でありシプロフロキサシン耐性 ST131 の clonal な広がりが見られた。

一方で、Type 1 QRDR は多様な ST 型の大腸菌が保持していることが示された。Type 1 QRDR が多様な大腸菌で認められることは興味深い。Type 1 の QRDR をコードする菌株であっても、*gyrA* および *parC* 全長配列の比較からは QRDR 領域以外でのアミノ酸置換を伴わない同義置換の多様性が認められた。このことは、同一の QRDR 型であっても、独立して多系統で形成されてきたことを示唆した。

2. ラオスで発生したコレラ集団発生に関する分子疫学解析

2007 年 12 月ラオス南部、ベトナム国境にある Xekong 県において、コレラの集団発生が認められた。360 名を超える重篤な下痢を伴う患者が発生し、3 名が亡くなった。ラオスにおいては、2000 年の集団発生以来のものであった。

ラオス NCLE で分離同定された菌株を PFGE 法にて菌株間の比較解析を行った。図 2 に示すように、Xekong 県で分離された 15 株は、環境から分離された 2 株を含めて、完全に同一であった。また、1998 年、2000 年分離株とは、異なる *NotI* 制限酵素切断パターンを示した。

比較対象として用いた 2007 年 10 月に散发事例として Xekong 県からは地理的に異なる Vientiane, Xaignabouri 県で分離された菌株のバンドパターンも、Xekong 県で分離された菌株のものと完全に一致した。散发事例も集団事例に先行したケースあったことを示唆した。

散发事例の疫学情報からは、Vientiane 県事例は、タイから輸入された海産品との関連が疑われていた。また、Xaignabouri 県での事例ではタイ旅行帰りであった。いずれもタイとの関連で疫学的に捉えられていた。一方、Xekong 県での集団発生は、その地理的な関係から、時を同じくしてコレラの集団発生が認められていたベトナムでの事例との関連が疑われていた。しかしながら、今回の解析から Xekong 県での集団事例も、間接的にはタイとの関連が疑われる結果となり、ベトナム流行例を含めた関連について解析が必要であることが示された。

D. 考察

アジア諸国の感染対策において日本の果たすべき役割は大きい。アジア諸国における細菌分離技術、同定技術レベルの維持あるいは向上に対して様々な支援策を通じて、貢献を果たしてきている。しかしながら、それぞれの国々の発展状況において病原細菌の解析技術レベルは一様ではない。

メコン川流域諸国においても、その解析技術レベルの差は大きい。現地での技術指導を継続する一方で、日本国内で検体の解析を行う方策も準備しておくことが必要であ

る。

本研究において、ラオスとの共同研究ではコレラアウトブレイク解析の支援し、タイとの共同研究においては、腸管外病原性大腸菌の系統解析について支援を行った。コレラのアウトブレイク解析では PFGE 解析を行うために菌株の輸送が必須となった。迅速なコレラアウトブレイク解析を可能にするためには、他の病原細菌で開発が進んでいるゲノム DNA を検体に用いる MLVA 法の開発とその評価が必要である。また、そのデータベース化も必要であろう。

一方で、腸管外病原性大腸菌の系統解析ではゲノム DNA を出発材料とした解析が既に確立しているため、菌株性状の比較解析が容易に行うことが可能であった。腸管外病原性大腸菌感染症は、国内においてもその症例数は極めて多く、今後効果的な対策の構築が求められている。薬剤耐性化が徐々に進んできている腸管外病原性大腸菌において、国際間の比較解析が今後重要になってくると考えられる。今回の解析結果を基盤として、さらに解析対象を広げ解析を行うことで、薬剤耐性菌の出現とその広がりに関して新たな視点を提供することが期待される。

E. 結論

メコン川流域諸国の病原細菌解析レベルの向上を基盤とした、国際間の病原体比較解析が今後一層重要になると考えられる。病

原細菌の分子タイピング法を用いた共同研究を通して、高度解析技術が十分に整備されていないアジア諸国とのネットワークの形態を示した。パルスネットアジアと同様の2国間から多国間の分子タイピングネットワークの構築を、様々な解析方法および対象病原細菌を拡大していく必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Cholera outbreak in 2007, Lao People's Democratic Republic

Sithivong N, Izumiya H, Munnalath K, Phouthavane T, Chomlasak K, Sisavath L, Vongdouangchanh A, Vongprachanh P, Watanabe H, and Ohinishi M.

Emerg. Infect. Dis (in press)

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 2 MLST ST and QIRD type of E. coli isolates from UTI and BSI patients of Thailand

Strain	MLST										Substitution of QIRD					
	ndk	famC	grbB	iod	meth	parA	parB	recA	ST	Sar33	Asp37	Gly78	Sar80	Chu84	Alu80	
CRLECU21	8	4	12	1	20	8	7	7	ST80	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB04	10	11	136	6	8	8	2	2	ST744	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB06	10	11	4	8	8	13	79	79	ST417	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU07	35	37	12	1	20	18	79	79	ST410	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB12	35	37	28	25	4	5	73	73	ST405	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB24	35	37	29	25	4	5	73	73	ST405	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU08	10	11	4	8	8	8	2	2	ST10	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU19	4	28	2	25	5	5	19	19	ST38	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU13	4	28	2	25	5	5	19	19	ST38	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU20	8	4	33	18	11	8	8	8	ST254	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU14	8	4	33	18	11	8	8	8	ST224	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB04	10	11	11	8	8	1	2	2	ST1685	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU09	14	14	10	200	17	7	10	10	ST1183	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB21	14	14	10	200	17	7	10	10	ST1183	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU18	8	65	5	1	9	NEW	6	6	NEW	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB02	8	28	32	18	11	8	44	44	ST156	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB22	8	28	32	18	11	8	44	44	ST156	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU24	8	28	32	18	11	8	44	44	ST156	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB08	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB09	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB10	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB11	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB13	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB16	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB18	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB23	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU01	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU06	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU09	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU10	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU11	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU12	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU15	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU18	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU22	53	40	47	13	36	28	29	29	ST131	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU04	92	4	87	86	70	56	2	2	ST848	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU22	92	4	87	86	70	56	2	2	ST848	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB01	92	4	87	86	70	56	2	2	ST848	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB08	92	4	87	86	70	56	2	2	ST848	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU17	8	4	4	18	43	8	8	8	ST803	Lau (TTG)	Asn (AAG)	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB07	20	45	41	43	5	32	2	2	ST117	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB17	101	88	97	108	28	79	79	79	ST457	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB03	101	88	180	108	28	79	79	79	ST1340	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU02	101	88	180	108	28	79	79	79	ST1340	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECU06	101	88	180	108	28	79	79	79	ST1340	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	
CRLECB14	95	88	78	21	58	58	82	82	ST354	Lau (TTG)	-	-	Ile (ATC)	-	-	

Grey shaded column indicates strains from blood stream infection
 Dashes indicates the identical amino acid residues with a susceptible strain.

平成 21 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：ビ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
	山本章治	国立感染症研究所	細菌第一部
	黒田 誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター
	関塚剛史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

コレラ菌 O1 は、その性状から古典型とエルトール型の 2 つの生物型に分類され、それぞれの生物型に特異的なコレラ毒素を有している。しかしながら、近年、アジアのコレラ流行地域においては、古典型のコレラ毒素を持つエルトール型コレラ菌(変異エルトール型コレラ菌)が多数分離されており、それら菌株間には遺伝的多様性があることが明らかとなっている。そこで本研究では、変異エルトール型コレラ菌のゲノム情報から、新規疫学マーカーの開発を試み、その妥当性について検証した。その結果、インドネシア、タイ等の東南アジア地域由来の菌株について、PCR による変異エルトール型コレラ菌の迅速な判別が可能となった。

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ール型の 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ール型において、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ール型による。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、生物型がエルトール型に関わらず、古典型コレラ毒素を産生するコレラ菌(変異エルトール型コレラ菌)であり、これが現在の流行株となっている。

変異エルトール型コレラ菌は、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。そのため、コレラ流行地域において多検体を迅速に判別する方法が必要であるが、変異エルトール型コレラ菌の菌株間に存在する遺伝的多様性のため、これ

までのところ簡便に鑑別可能な疫学マーカーは見つかっていない。そこで本研究では、変異エルトール型コレラ菌のゲノムシーケンスを行い、その配列から変異エルトール型コレラ菌に特有な遺伝子断片を同定し、その新規疫学マーカーとしての妥当性について検討した。

B. 研究方法

変異エルトール型コレラ菌 V070005 株のゲノムシーケンスを行った。シーケンスはイルミナ社のキット及び機器を使用して定法に従って行った。エルトール型コレラ菌 N16961 株のゲノム配列を参照配列として、エルトール型コレラ菌には存在しない特異的配列を同定した。また、その特異的配列を標的とした変異エルトール型コレラ菌の疫学マーカーの妥当性を変異エルトール型コレラ菌 8 株、エルトール型コレラ菌 3 株を用いて検討した。

C. 研究結果

現在、アジア地域におけるコレラは全て変異エルトール型コレラ菌によるものと考えられる。そこで、変異エルトール型コレラ菌にのみ存在する遺伝子断片を同定するため、変異エルトール型コレラ菌 V070005 株のゲノムシーケンスを行った。エルトール型コレラ菌 N16961 株のゲノム配列に対してマッピングされない出力配列について、全出力配列を用いた *de novo assemble* により得られた contig に対してマッピングを行った。その結果、約 67kb からなる contig (contig480) 上に全てマッピングされ、N16961 株と比較して約 28kb の特異的配列が挿入されていることが示唆された。境界

領域に対する PCR を行い、挿入位置を確認したところ、Large chromosome の VC0002 と VC0003 の間であることが確認された (Figure 1A)。また、約 28kb の特異的配列内の遺伝子を標的としたプライマーを 3 組作成し、その特異性を確認したところ、V070005 株を鋳型とした場合、それぞれ PCR による増幅が見られたが、エルトール型コレラ菌 N16961 株及び古典型コレラ菌 O395 株では増幅産物が得られず挿入配列は存在していなかった (Figure 1B)。

以上の結果から、特異的配列を標的とした PCR が、変異エルトール型コレラ菌の簡便な判別方法となりうることが示唆されたため、他の変異エルトール型コレラ菌を用いてその有用性を検討した。使用菌株は日本国内で分離された輸入事例に由来する変異エルトール型コレラ菌 8 株で、渡航先別ではインド 2 株、フィリピン 1 株、タイ 3 株、インドネシア 2 株である。それぞれの菌株は、MLVA による疫学解析の結果により遺伝的に多様であることが確認されている。特異的配列内の遺伝子を標的としたプライマー3組を用いた PCR の結果、インド及びフィリピン由来の 3 株について当該遺伝子の増幅は見られなかったが、タイ及びインドネシア由来の 5 株については全てのプライマーで遺伝子増幅が見られた。また、タイ由来 1 株、インドネシア由来 2 株の典型的なエルトール型コレラ菌を用いて同様の実験を行ったところ、増幅断片は得られなかった (Figure 2)。

D. 考察

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、簡便に変異エルトール

型コレラ菌の同定を行えるようになる必要がある。そのためには、変異エルトール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。本研究では変異エルトール型コレラ菌 V070005 株のゲノムシーケンスの結果から、エルトール型コレラ菌には存在しない約 28kb からなる特異配列を同定した。この配列を標的とすることで、タイ及びインドネシア由来のコレラ菌について、変異エルトール型と典型的なエルトール型を区別することができ、通常の PCR といった簡便な方法により、それらの型別が可能となる。しかしながら、この配列は変異エルトール型コレラ菌に普遍的に存在しているわけではなく、汎用性が高い方法ではない。そこで今後、より実用性の高い方法として、今回得られたゲノム情報から一塩基多型を抽出することで、変異エルトール型コレラ菌に特有の一塩基多型パターンを集積し、新規マーカーとしての利用を試みる。

また、そ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

変異エルトール型コレラ菌 V070005 株において、エルトール型コレラ菌 N16961 株に存在しない約 28kb の遺伝子断片を同定した。その遺伝子断片を標的とした PCR により、特定地域由来の変異エルトール型コレラ菌の判別が可能であり、迅速な方法として期待される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

なし。

Table 1. Primer designations

Number	Sequence
1	5'-GGCCGGAGAAATCCTCGCCG-3'
2	5'-CCAGCCCCGTGGGTTGAGGT-3'
3	5'-GGGCAATATATGACCAAAG-3'
4	5'-CCAGCCCCGTGGGTTGAGGT-3'
5	5'-ATGCACTCAGTACACATGTC-3'
6	5'-TCATATACAATATCCTTTGC-3'
7	5'-AAAGTCTTCACCCTGCAAAC-3'
8	5'-TCAGTCAAAGAGACGACTCT-3'
9	5'-TTAAGAGTATGGGTAAAACC-3'
10	5'-ATGCCAACCTATGCAAATC-3'

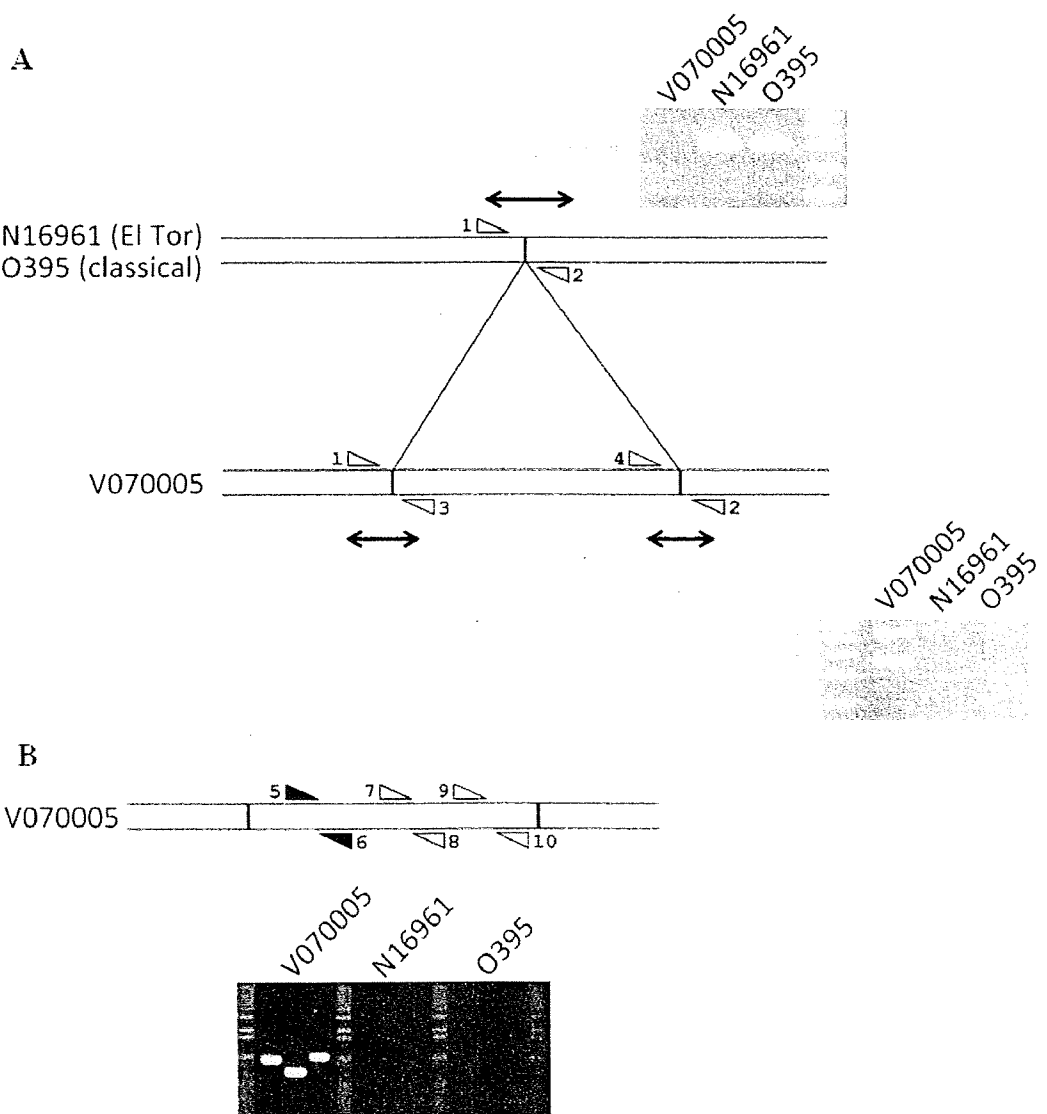


Figure 1. Primer locations used to detect the specific gene cluster.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）

平成21年度 分担研究報告書

（アジア地域におけるラボネットワークの構築に関する研究）

分担研究者 三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部
協力研究者 小泉信夫、志牟田健、寺嶋淳 国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

現在日本国内における細菌性赤痢のほとんどはアジア地域からの輸入例と考えられ、海外での流行形を反映して *Shigella sonnei* 及び *S. flexneri* の分離が多い。一方、*S. dysenteriae* type I (Sd1) は少数であるが、志賀毒素を保有するため感染コントロールの標的として重要であり、ワクチントライアルの対象となっている。一般的に細菌に対するワクチンは血清型特異的な防御効果は認められるものの、菌群一般に対する防御効果は認められず、赤痢においても汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない。本研究では赤痢菌の病原性発現機構の基礎的知見に基づいた汎赤痢菌群に効果のあるワクチン候補株を作成し、アジア地域におけるラボネットワークを生かして、インドNICEDとの共同研究を開始した。

A. 研究目的

現在、日本国内における細菌性赤痢の多くは *Shigella sonnei* 及び *S. flexneri* であり、ほとんどがアジア地域からの輸入例と考えられている。一方、志賀毒素を保有するため重篤な症状を起こす *S. dysenteriae* type I (Sd1) は近年アフリカ地域での集団発生が報告されており、感染コントロールの標的として重要なためワクチントライアルの対象となっている。このように、細菌性赤痢は流行型と、公衆衛生上防御が重要な菌種が異なっていることが特徴であり、現在の流行型は志賀毒素遺伝子を保持していないが、その症状、感染性、伝播性が低下している訳ではないため、その感染コントロールは公衆衛生的、経済的にも依然として重要である。

細菌性赤痢に対して、種々の生ワクチン候補が開発され、幾つかの大規模なトライアルが行なわれている。これらのワクチン株は既存の赤痢菌の病原性を低下させる変

異を導入したものか、大腸菌に赤痢菌の病原遺伝子を導入したものであるが、一般的な細菌ワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている機構が考えられる。実際、赤痢菌の宿主細胞細胞への侵入に必要な病原遺伝子群は、培養細胞に侵入した後に発現が抑制されることが報告されている。

ワクチン開発という側面からも、このような赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は大変重要であり、担当者は細菌のRNA結合蛋白として知られている *hfq* 遺伝子が赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した(発表論文1)。赤

痢菌で *hfq* 遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須な Type III Secretion system (TTSS) の発現が脱抑制され、通常、TTSS が発現しない低温や低浸透圧の条件でも発現が起こり、通常発現の起こる高温 (37°C) では発現が増大し、HeLa 細胞に対する侵入性が野生株の 2~30 倍以上に増加していることが示された。

一方、*hfq* 遺伝子はストレス応答に作用する制御因子であり、赤痢菌以外の病原細菌サルモネラ、コレラ、レジオネラの *hfq* 遺伝子欠損株では動物実験における病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfq* 欠損株でも動物実験における菌の生存性はこれらの菌と同様であることが予想される。こうした、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下する *hfq* 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。そのため、*hfq* 欠損株を用いてワクチン候補の基礎的なデータの収集を開始した。今年度は流行株である *S. sonnei* に加えて志賀毒素を保有する Sd1 での試験を行った。

B. 研究方法

モルモットの角結膜炎モデルは個体に免疫応答を惹起し、ワクチンの評価系として用いることができることが報告されている [2]。攻撃株 Sd1 は東京都健康安全研究センターより譲渡を受け、病原性蛋白発現、及び志賀毒素産生性を確認した。菌が外界に露出する角結膜炎モデルを用いることから、Sd1 を用いた実験は特に安全性に配慮し、国立感染症研究所動物実験施設の P3A 区画

の安全キャビネット内で飼育、感染実験を行った。

ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a 2457T 株の *hfq* 欠損変異株、コントロールとして野生型 2457T 株、および PBS を 4 群計 18 匹の 2 週齢モルモット (Hartley, Male) に、二週間隔で 5×10^8 個を計 4 回、両側眼球に投与した (図 1)。二回目免疫終了後、3 週目に血清の赤痢菌のエフェクター蛋白に対する抗体価を調べるため採血を行い、眼球症状は投与後 2 日目、3 日目、5 日目にデジタルカメラで接写し記録した。

4 週目、血清型の異なる *S. sonnei* HW383 株、もしくは Sd1 TSH1669 株を 5×10^8 個を計 2 回両側眼球に投与し、チャレンジとした。接種後 1 週間で殺処分した個体から眼球を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色で組織を観察した。

ELISA 法は LB 培地で対数後期まで震盪培養した *S. sonnei* HW383 株に Congo Red 色素を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に加えて 2 時間培養することで培養上清中に分泌蛋白を放出させ、濾過滅菌した上清 200 μl を 4°C 18 時間 ELISA プレートに吸着し抗原とした。モルモット血清を PBS で 100, 500, 2500, 12500, 62500 倍希釈し、37°C 1 時間反応し、1000 倍希釈したペルオキシダーゼ付加抗モルモット IgG 抗体を 1 時間反応した。

C. 研究結果

初回免疫後、角結膜炎の症状を比較した。野性型菌と同様にワクチン株も角結膜炎を惹起したが、野性型と比較してワクチン候補株および *hfq* 欠損変異株は角膜、上下眼瞼の炎症性肥厚、膿汁分泌等の症状は有意に軽く治癒期間も、野性型で平均 9 日のところ 5 日と短期であった (図 2)。

以上の観察は赤痢菌でも他の病原細菌と同様、*hfq* 欠損株は動物実験での病原性が低下していることを示した。角膜炎は周囲から角膜中心に治癒が進行し、約二週間で角

膜は完全に透明に回復した。二回目免疫では全群で症状が認められなかった。免疫後のモルモット血清を用いて凝集反応を行ったところ、ワクチン接種群とコントロールである *S. flexneri* 2aの2457T接種群の血清は2457T株の菌体を凝集したが、チャレンジ株である *S. sonnei* HW383株は凝集せず、チャレンジ株に対する血清型抗体は誘導されていないことが示された。

免疫終了後、血清型が異なる *S. sonnei* をチャレンジしワクチンの効果判定を行った。PBSを投与した対照群では角膜炎優位の症状を示した(図3-1)。ワクチン株である *hfq* 欠損変異株では有意な感染症状は認められなかった(図3-2)。対照群と比較して野性型 *S. flexneri* 投与群は、有意に軽い角膜炎を発症した。角膜の混濁は有意であったが、眼瞼周囲の症状は認められなかった(図3-3)。

チャレンジ後一週間目の眼球組織のHE染色像は、PBS投与群では角膜が強度に肥厚し正常な上皮の組織構造が完全に破壊されていた(図3-4)。*hfq*欠損株投与群は有意な病変は認められないと考えられた(図3-5)。野性株免疫群では同様の空包構造が認められた上に、角膜層が有意に薄く、エオジンで強く染色され、その下層にエオジンで弱く染色される層が認められた(図3-6)。

再度、Sd1にたいする防御効果と同じ免疫スケジュールで判定した。免疫後のモルモット血清を用いて凝集反応を行ったところ、ワクチン接種群とコントロールである野性型 *S. flexneri* 2aの2457T接種群の血清は2457T株の菌体を凝集せず、血清型抗体が有効に誘導されていないことが示された。そこで、攻撃を2週間延期し、同量の皮下接種による追加免疫を行い、凝集反応が起こるのを確認してからSd1の接種を行った。

ワクチン接種群は攻撃3日目までは有意に症状の進展が抑えられたが(図4, 1~3)、長期間の観察(5日目)では野性型投与群

のほうが治癒傾向にあり、遅延して発症する傾向が示された(図4, 4~6)。*S. sonnei*での実験の再現性を確認するため、右目に *S. sonnei*を、左目にSd1を接種した個体では *S. sonnei*に対するワクチン効果が認められず、有効な免疫が惹起されていない可能性が示唆された。

そこで、有効だった前回のワクチン株と野生型接種群、及び無効だった今回のワクチン投与群血清を用いて、*S. sonnei*の全菌体蛋白に対するウエスタンブロットを行ったところ、40kDa及び12kDa付近に有効例で強く惹起される抗体が認められた(図5矢印)。特に12kDaの抗体は今回のワクチン株接種群では誘導されておらず、今回の免疫が有効になされていないことが示唆された。

D. 考察

汎赤痢菌群に有効なワクチン開発をめざしてモルモットの角結膜炎モデルで評価した。一回目の *S. sonnei*で攻撃した実験では血清型を超えた一定の免疫効果が認められた。二回目のSd1で攻撃した実験では免疫惹起の再現性が得られず、ワクチン効果は認められなかった。

その理由として、飼育上の都合から(比較的体格が小さい時期に行うため)二週齢のモルモットに免疫したことが挙げられる。あくまで検証されていない風説ではあるが、動物に免疫する場合、ある程度成熟した個体を用いないと免疫トレランスが残存する可能性があるという説があり、二回目にSd1で試験したロットの動物がその微妙な時期に当たっていた可能性が否定できない。

効果のあった一回目の実験で明らかになった点として、野性株での免疫でもある程度の免疫効果が認められたことが挙げられる。もちろん肉眼的に観察した症状は軽