

FEMS Microbiol. Lett. 311: 10-17.

Gotoh, K., Kodama, T., Hiyoshi, H., Izutsu, K., Park, K.-S., Dryselius, R., Akeda, Y., Honda, T. and Iida, T. 2010. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a therapeutic potential for bile acid-sequestering agents. PLoS One 5: e13365.

Okada, N., Matsuda, S., Matsuyama, J., Park, K.-S., de los Reyes, C., Kogure, K., Honda T. and Iida, T. 2010. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains. BMC Microbiol. 10: 302.

Izutsu, K., and Iida, T. 2010. *Vibrio parahaemolyticus*. Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens, ASM Press p. 77- 84.

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

飯田哲也：腸炎ビブリオの病原性発現機構。第22回微生物シンポジウム～微生物科学の発展と感染症対策～大阪薬科大学 2010年9月3-4日

Kazuyoshi Gotoh, Toshio Kodama, Hirotaka Hiyoshi,, Kaori Izutsu, Takeshi Honda and Tetsuya Iida : Analysis of culture conditions that induce *Vibrio parahaemolyticus* virulence gene expression. 110<sup>th</sup> Genrerall Meeting of American Society for Microbiology, May 23-27,

2010, San Diego, USA

Hirotaka Hiyoshi, Toshio Kodama, Tetsuya Iida and Takeshi Honda : Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. 110<sup>th</sup> Genrerall Meeting of American Society for Microbiology, May 23-27, 2010, San Diego, USA

Toshio Kodama, Kazuyoshi Gotoh, Hirotaka Hiyoshi, Kaori Izutsu, Tetsuya Iida and Takeshi Honda : Identification of two positive regulators for the genes in the Vp-PAI region of *Virbio parahaemolyticus*. 110<sup>th</sup> Genrerall Meeting of American Society for Microbiology, May 23-27, 2010, San Diego, USA

Toshio Kodama, Kazuyoshi Gotoh, Hirotaka Hiyoshi, Kaori Izutsu, Yukihiro Akeda, Takeshi Honda and Tetsuya Iida : Regulatory mechanisms of Vp-PAI ' s gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*. US-Japan Cooperative Medical Science Program 45<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, December 6-8, 2010, Kyoto Univ., Kyoto

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

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

腸管出血性大腸菌 O157 感染症の重症化要因に関する研究

研究分担者	藤井 潤	九州大学准教授
研究協力者	溝上 哲也	国立国際医療センター部長
研究協力者	北 敏郎	産業医科大学准教授
研究協力者	城 宏輔	埼玉県立小児医療センター院長
研究協力者	岸本 宏志	埼玉県立小児医療センター
研究協力者	名矢 結香	栃木県宇都宮保健所
研究協力者	中村 勤	栃木県宇都宮市保健所長
研究協力者	中田 友里	宇都宮市衛生環境試験所
研究協力者	宇賀神 貞夫	宇都宮市衛生環境試験所長
研究協力者	斎藤 京子	香川県小豆総合事務所長
研究協力者	丸山 保夫	香川県中讃保健福祉事務所長
研究協力者	多田 有希	国立感染症研究所感染症情報センター室長
研究協力者	岡部 信彦	国立感染症研究所感染症情報センター長
研究協力者	吉田 真一	九州大学教授

研究要旨：

不慮の事故で死亡した法医学領域での剖検例を用いて、正常腎臓と脳における細胞レベルでのペロ毒素レセプターである Gb3 発現頻度を免疫組織化学法で調べた。その結果、脳における Gb3 陽性率は、小児の方が成人に比べて有意に高かった。腎臓では、男性に比べ女性において Gb3 陽性率は有意に高かった。栃木県と香川県で起きた腸管出血性大腸菌 O157(O157)の集団感染（高齢集団、平均年齢 68.8 歳）において、溶血性尿毒症症候群(HUS)を含めた腎機能障害のリスクは女性が有意に高かった。さらに 2006 年～2009 年の 4 年間に全国で報告された HUS の男女比を調べた結果、20 歳以上の成人において女性が男性に比べ、非常に高い割合を示した。O157 感染による重症化要因は、急性脳症は小児であり、HUS を含む腎機能障害は成人女性、特に高齢女性であった。

- A. 研究目的  
腸管出血性大腸菌 O157 感染症 (O157 と略する)において腸管や脳、腎臓などの特異的臓器障害はペロ毒素レセプター(Gb3)分布によって説明され、Gb3 の組織内分布や細胞レ

ベルで、その発現頻度を調べることは、この感染症の重症化要因を探るうえで重要だと考えた。今回、不慮の事故で死亡した法医学領域での剖検例を用いて、組織学的に Gb3 発現頻度を調べ、Gb3 の組織分布と年齢や性との関連を調べた。さらにこの実験結果を裏付けるため、2 つの疫学調査を加えた。(1) O157 感染症の重症化要因を明らかにすることを目的として 2002 年に栃木県宇都宮市の病院・老人保健施設で起きた O157 の集団感染と 2005 年に香川県で起きた O157 集団感染での有所見者 162 名の臨床疫学研究(観察研究)を行った。(2) 厚生労働省感染症発生動向調査事業において報告された 2006 年～2009 年の 4 年間に報告された溶血性尿毒症症候群(Hemolytic Uremic Syndrome; HUS)の性・年齢別調査資料を基に臨床疫学を行い、性別が HUS のリスク要因になるか調べた。

## B. 研究方法

1) 剖検例は成人 20 例、小児 13 例で、男女比がほぼ 1 : 1 となるよう選択した。脳と腎臓が直接の死因となったものは除き、出血性ショックや乳幼児突然死症候群で死亡した剖検例を選んだ。抗体は Immunotech 社の monoclonal rat anti-human CD77 antibody を用い、免疫組織化学法によって Gb3 の組織内同定を行った。また免疫組織化学法をより厳密に行うため死亡時刻と剖検した時

刻(PostMortem Interval between death and autopsy; PMI)を統一して調べた。剖検対象となった性、年齢、PMI、死因を表 1 に示す。陽性コントロールとして 1990 年埼玉県浦和市幼稚園で起きた井戸水による O157 集団感染で死亡した男児の脳と腎臓を用いた。

2) 2002 年 8 月、栃木県宇都宮市の病院と関連老人保健施設において、香味和えを原因食材とした O157 の集団感染が発生した。876 名が原因食を喫食して、123 名が下痢や血便をきたし、このうち 9 名が死亡した。2005 年 10 月、2 つの香川県の老人福祉で O157 の集団感染が相次いで発生した。425 名が同一食材ある白菜の浅漬けを喫食して、39 名が下痢や出血性下痢をきたし、このうち 7 名が死亡した。今回、これら 2 つの O157 集団感染における下痢や血便をきたした有所見者 161 名のうち HUS を含む腎機能障害の有無と生死を患者カルテや、すでに公表されている平成 15 年精神科病棟等における O157 集団食中毒報告書から調べ、O157 感染有所見者の重症化要因をコホートによる解析を行って調べた。有所見者を①60 歳未満、②60 歳以上 69 歳未満、③70 歳以上 79 歳未満、④80 歳以上の 4 つの年齢別カテゴリーに分け、HUS を含む腎機能障害の有無と生死との関連を統計学的に調べた。検定方法は年齢補正 Mantel-Haenszel  $\chi^2$  検定を用いた。有所見者 161 名の年齢

カテゴリー別男女数を図 1 に示す。なお患者カルテから調べた研究は 2006 年 11 月 9 日付けで九州大学医学研究院等倫理委員会にすでに承認されている。

3) 厚生労働省感染症発生動向調査事業において報告された 2006 年～2009 年の HUS の症例数は 2006 年が 102 例、2007 年が 129 例、2008 年が 94 例、2009 年が 83 例であった。年度別男女比を表 2 に示す。これら症例数を① 5 歳未満、② 5 歳以上 20 歳未満、③ 20 歳以上の 3 つのカテゴリーに分け、それぞれのカテゴリーにおいて男女比に有意差があるか調べた。Stata version 10.1 を用いて one-sample test of proportion で検定した。

### C. 研究結果

1) 法医学剖検例を用いたヒト正常脳では小脳プルキンエ細胞、血管内皮細胞、大脳神経細胞に Gb3 が認められ、特に小児において、これら細胞の Gb3 陽性率が成人に比べ有意に高かった。また正常腎臓ではメサンギウム細胞の Gb3 陽性率が小児において高く、遠位尿細管細胞、集合管細胞の Gb3 陽性率は女性において有意に高かった。近位尿細管細胞は、性、年齢とも有意差を認めなかった。ヒト正常脳と腎臓での Gb3 発現率を細胞レベルで調べた結果を表 3 にまとめた。陽性コントロールとして用いた男児の脳の小脳プルキンエ細胞、血管内皮細胞、大脳神経細胞は Gb3

が強陽性であった。また、プルキンエ細胞数は、ベロ毒素によって破壊されたためか正常男児に比べて著しく減少していた (図 2)。

2) 栃木県と香川県 2 つの O157 集団感染における有所見者 161 名の男女比は 41:59 であり、女性が約 6 割を占め、平均年齢は  $68.8 \pm 19.9$  と高齢であった。年齢を補正した Mantel-Haenszel  $\chi^2$  検定を行った結果、女性が男性に比べ約 4 倍有意に HUS を含む腎機能障害をきたして重症化することが判明した (表 5)。死亡した症例がすべて女性であったが、死亡と性別の関連は認めなかった ( $P=0.18$ )。

3) 2006 年～2009 年の 4 年間に報告された HUS 患者の連結不可能匿名化された性別・年齢データから、性別に有意差があるか調べた。我が国において報告された HUS の年代別男女比を図 3 に示す。その結果、4 年間に報告された HUS 患者のうち 5 歳未満 197 例では男女差が認められなかったのに対して ( $p=0.43$ )、5 歳以上 20 歳未満 161 症例において女性が占める割合は 60% ( $P=0.01$ )、20 歳以上 129 症例では実に 86% ( $P<0.001$ ) が女性であった。女性において加齢が HUS 引き起こす一つの要因となることが判明した。また年度別に解析を行った結果、2008 年のみ 5 歳以上 20 歳未満では、女性が有意に多かった。2006 年、2007 年、2009 年においては 20 歳以上では女性が有意に高かった。

#### D. 考察

法医学剖検例において、小児には主に脳（小脳プルキンエ細胞、脳血管内皮細胞、第脳神経細胞）に Gb3 が発現しており、小児が O157 に感染して重症化した場合に急性脳症を発症して死亡するか、重い中枢神経の後遺症を残す可能性があることが判明した。事実、1990 年埼玉県浦和市幼稚園で起きた井戸水による O157 集団感染で死亡した男児は下痢を発症して HUS の診断基準を満たさないまま、わずか 4 日目に亡くなっている。剖検により、この死亡例は広範囲な脳浮腫と鉤回ヘルニアを認めている。保育所で O157 集団感染が後を絶たず、てんかんや精神遅滞、行動障害などの重い後遺症を残す幼児も報告されている。正常腎臓ではメサングウム細胞の Gb3 陽性率が遠位尿細管細胞、集合管細胞の Gb3 陽性率は女性において有意に高かったことから、女性が O157 に感染した場合に遠位尿細管細胞、集合管細胞が標的細胞となって腎機能障害を生じる可能性がある。高齢であることは O157 感染症のリスク要因であることは、広く知られているが、今回特に高齢女性が高齢男性に比べ有意に腎不全を生じやすいことも明らかとなった。2006 年～2009 年に我が国において報告された全 HUS 症例の年齢や性別との関連を調べた結果、年齢を重ねるごとに HUS 症例の女性の割合が増加していたことから、女性ホルモンや成長因子など

が、Gb3 の腎臓での発現を増加させていることが示唆された。

#### E. 結論

O157 感染によって、下痢や血便を発症し、発症した患者の約 10% が HUS を引き起こし、約 1% が急性脳症で死亡すると報告されている。私達の研究成果により、HUS や腎機能障害のリスク要因は高齢女性であり、急性脳症のリスク要因は男女を問わず、小児である可能性が示された(図 4)。

#### F. 健康危機情報

平成 22 年 4 月 7 日付で食品安全委員会事務局より国民に対して、以下の 3 点について注意喚起されている。

1. レバーなどの牛内臓や牛肉を生で食べることはひかえること。
2. 腸管出血性大腸菌は 75℃ で 1 分以上の加熱で死滅するので、牛内臓や牛肉を調理する際には、中心部までよく加熱すること。
3. 特に乳幼児やお年寄りでは、死亡したり、重い症状になることがあるので、生や加熱不十分なレバーなどの牛内臓や牛肉を食べないように、周りの方も含め注意すること。

同様の内容が厚生労働省から各都道府県に対して、平成 21 年 8 月 21 日付で事務連絡されている。また平成 22 年 6 月 16 日付で全国食品衛生主管課長連絡協議会から厚生労働省医薬食品局に対して、マスメディアの番組内容は国民に対して与える影響が大

きいため、マスメディア関係者に対しても、正しい情報を十分に周知することが盛り込まれた。しかし、国民の生肉の好みを助長するテレビ番組も相次いでいる。ある民放番組は2010年2月、レアのハンバーガーを売りにした店を情報番組で紹介し、7月には、お笑いタレントの究極の焼き肉の食べ方と称し、牛肉を生で食べることを紹介した。別の民放も9月に牛ミスジを生で食べることを紹介した。こうした現状を踏まえ、国は不適切な報道に対しては、食の安全を守るために、報道規制するなど対策を講じる必要があると考える。去年は猛暑が影響した感もあるがO157感染者数は国立感染症研究所感染症情報センターの集計により4,110名に上っており、1999年より集計が始まって以来、2001年、2007年に次いで過去3番目に報告数が多い。国はこうした事態を真摯に受け止め、通達だけでなく、さらなる対策を行う必要がある。私は子供や高齢者に牛の生食を食べさせない、食べることに抵抗感をいださせる必要かあると考えている。そのためには生肉を提供する際に飲食店のメニューに「リスク表示」をさせることを提案している。具体的には焼き肉や居酒屋店などの飲食店のメニューには「レバ刺し、ハツ刺し、ユッケ、センマイは加熱していないため食中毒を含む可能性があります。子供、高齢者、免疫力が低下している方は特に注してください」と表記させるこ

とを各都道府県に推奨している。岡崎市は私の意見を受け、全国に先駆けて、焼き肉店や居酒屋などの飲食店などに対して、メニューにリスク表示するよう行政指導している。平成23年にも北九州から食の安全シンポジウムに招聘され、基調講演を行い、リスク表示の重要性を訴えた。今回の研究結果から、O157に感染することによって女性高齢者がHUSを含めた腎機能障害を来たして重症化すること、小児は脳内にベロ毒素レセプターが多く発現しているので、O157に感染した場合に急性脳症による死亡やけいれん・精神遅滞などの後遺を起こすことが、実験的・疫学的に確かめられた。高齢者や子供の命を守ることを最優先課題として、リスク表示の法令化を期待したい。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1. 藤井 潤 精製ベロ毒素2型をウサギに静注した急性脳症モデルにおけるステロイドパルス療法の有効性、第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会 平成22年7月23日  
宮崎 抄録集 一般演題17

2. Fujii J, Mizoue T, Kita T, Kishimoto H, Joh K, Nakada Y, Ugajin S, Naya Y, Nakamura T, Saitoh K, Maruyama Y, Yoshida Y, Localization of Shiga toxin receptor, globotriasosylceramide (CD77), in human brain and kidney in Japan, Proceeding of United States-Japan cooperative medical science program, 45<sup>th</sup>

annual joint panel meeting on  
Cholera and other bacterial enteric  
infections panel, Kyoto, Japan, Dec.  
6-8th, p98-101

H. 知的財産権の出願・登録状況（予  
定を含む）なし

### 3. その他

1. 藤井 潤監修 エピソードで覚え  
るリザーバー別病原体ガイド レジ  
オネラ 財団法人 日本公衆衛生協  
会出版 公衆衛生情報 vol. 40. No.  
6 p24

2. 藤井 潤監修 エピソードで覚え  
るリザーバー別病原体ガイド ノロ  
ウイルス 日本公衆衛生協会出版  
公衆衛生情報 vol. 40. No. 7 p31

3. 藤井 潤 「食肉の生食の危険性  
を広く伝えることにより、腸管出血性  
大腸菌 0157 やカンピロバクターなど  
の細菌性食中毒の予防を考える」食の  
安全シンポジウム in 北九州 基調  
講演 北九州市保健福祉局主催 平  
成23年1月26日



表 1

Forensic Autopsy cases

	Adult		Infant	
No. of autopsy case	20		13	
Age	46.6 ± 12.2 years		15.1 ± 6.1 months	
No. of gender	male	female	male	female
	10	10	7	6
PMI	14.8 ± 4.5 hr		15.1 ± 6.1 hr	

Cause of death

Adult		Infant	
Loss of blood	50 %	Asphyxia	38 %
Hemorrhagic shock	50 %	Sudden infant death syndrome (SIDS)	24 %
		Unknown	38 %

表 2

Sex distribution of HUS patients infected with STEC  
from 2006 to 2009 in Japan

No. of HUS patients in Japan				
Year	2006	2007	2008	2009
male	41	54	39	31
Female	61	75	55	52
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>129</b>	<b>94</b>	<b>83</b>

表 3

Positive immunodetection of Gb3 (%)

	Infants		Adults		P value	
	Male	Female	Male	Female	Adult vs. Infant	Male vs. Female
<b>Brain</b>						
Purkinje's cells	86	100	50	60	0.05	n.s.
Neurons	86	83	10	40	0.013	n.s.
Blood vessels	43	50	10	10	0.035	n.s.
<b>Kidney</b>						
Mesangial cells	71	100	10	10	0.000026	n.s.
Proximal tubes	29	17	0	0	n.s.	n.s.
Distal tubes	14	67	0	40	n.s.	0.0063
Collecting tubes	43	100	20	70	n.s.	0.0049

表 4

Association between Sex and Renal failure in two O157 outbreaks in Japan

Age (years)	<60	60-69	70-79	≥80
No. of patients with renal failure				
Female (No. of patients with renal failure / total number of diarrheic cases)	1/19	2/8	2/21	10/47
%	5.3%	25%	9.5%	21.3%
Male (No. of patients with renal failure / total number of diarrheic case)	0/24	0/19	2/14	0/10
%	0%	0%	14.3	0%

Odd ratio=4.06 P=0.048

図 1

Age and Sex distribution of patients infected with *Escherichia coli* O157:H7 in two outbreaks in Japan

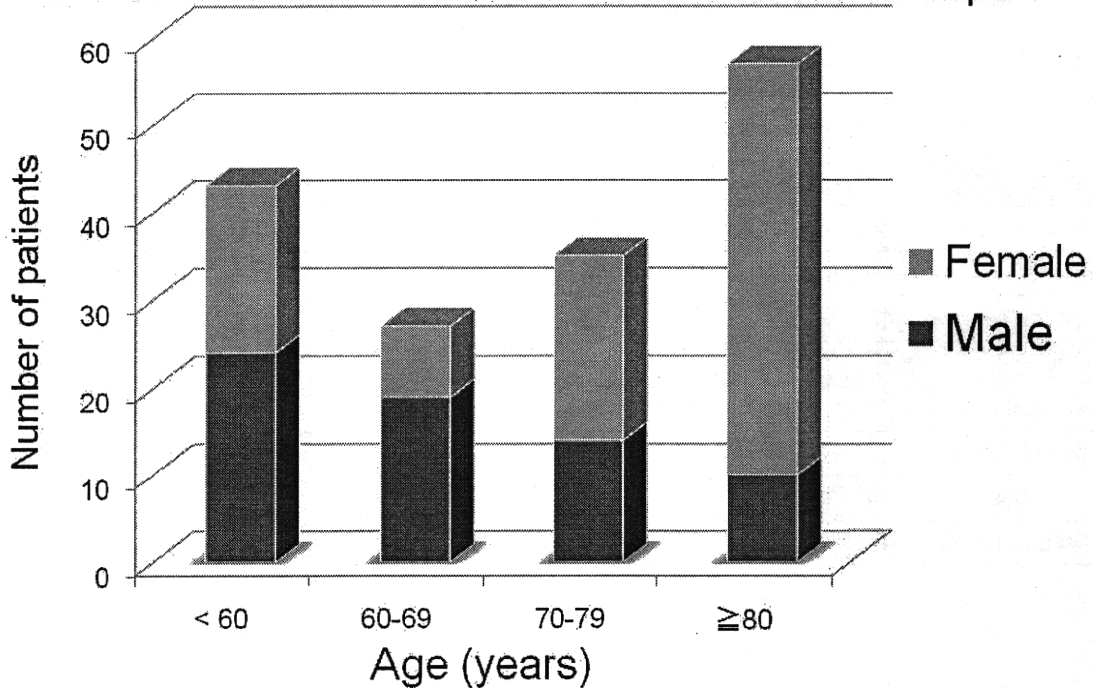


図 2

### Decreased Purkinje's cells in cerebellum of the fatal case in Urawa City

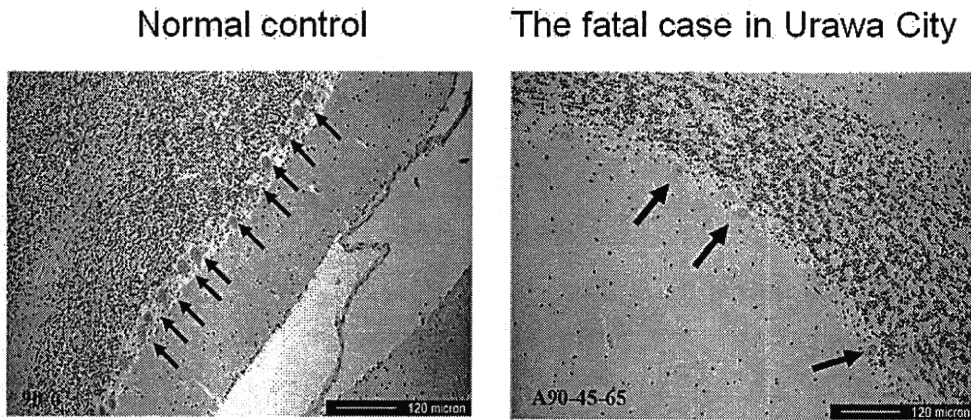


図 3

### Sex distribution of HUS patients infected with STEC in Japan

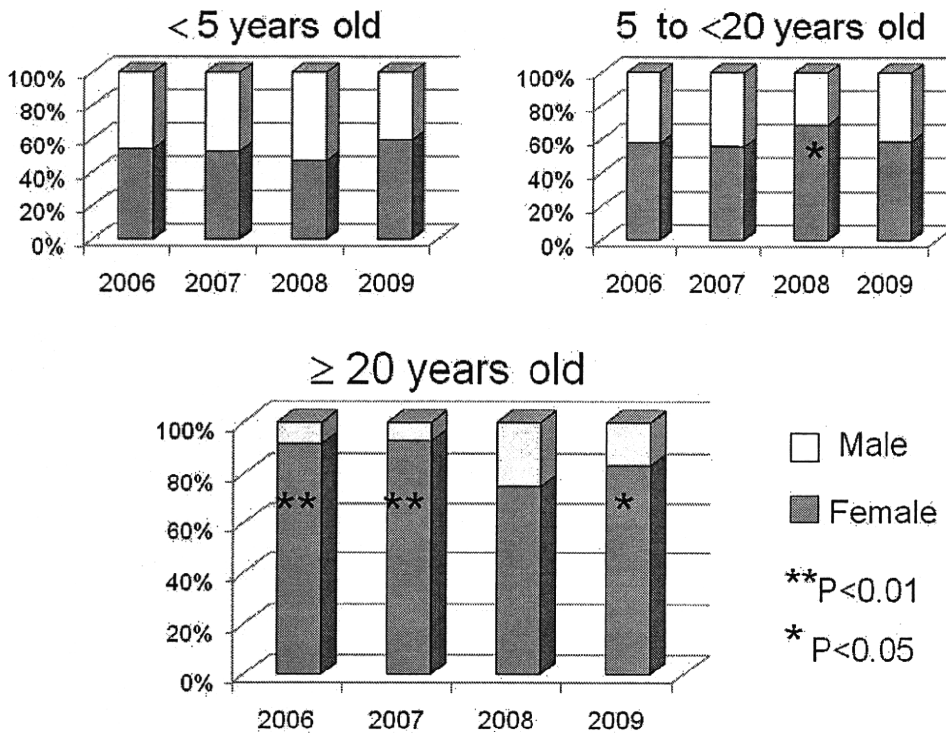
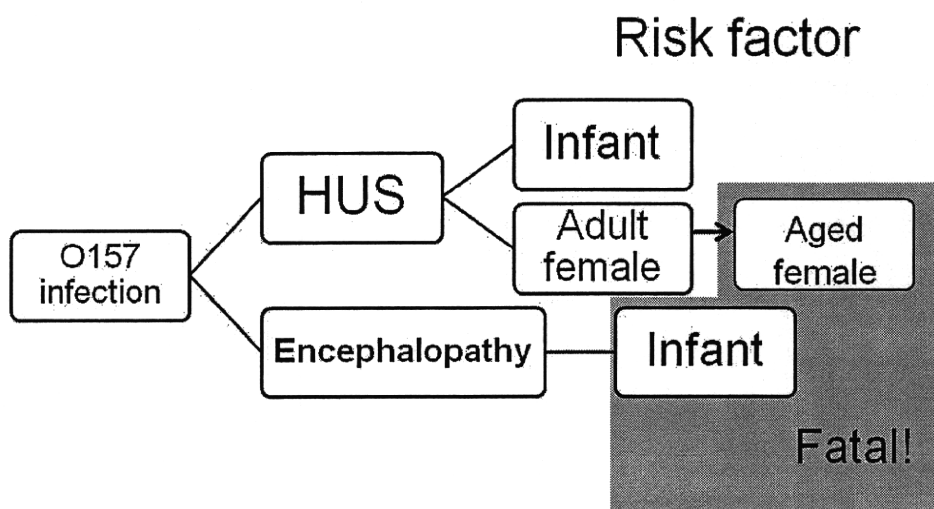


图 4



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

新規コレラワクチン開発に資する疑似腸管内環境培養下での毒素産  
生性コレラ菌の表層抗原性の変化に関する研究

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

現在も世界的に流行している下痢症コレラに対する有効なワクチンの開発のため、コレラ起因菌であるコレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* を培地に  $\text{NaHCO}_3$  を添加して（二酸化炭素を溶存させて）ヒト腸管内環境に似せた培養条件にて培養し、菌体タンパクの抗原性に変化が見られるか SDS-PAGE にて観察した。その結果、 $\text{NaHCO}_3$  添加の培養条件と  $\text{NaHCO}_3$  無添加の培養条件に顕著な差が見られなかった

A. 研究目的

*V. cholerae* は現在も世界規模でコレラ菌を病原体とするコレラ症は、激しい下痢を伴い、治療を行わない場合は、死に至ることもあり得る細菌性の腸管感染症である。そのコレラ症の予防法としてワクチンがいくつか存在するが、いずれも防御期間を長期間持続することが出来ない。そのため、より防御効果を長期間持続出来るワクチンを作成する必要がある。また、コレラ菌は、腸内環境中の温度、pH、栄養状態などを感知し、下痢を引き起こすコレラ毒素（Cholera Toxin;CT）や定着に関与する線毛（Toxin coregulated pilus;Tcp）を含めた多くの病原因子を効率的に発現する。その中で、培地に  $\text{NaHCO}_3$  を添加して培養した場合、CT や Tcp の主要サブユニットである TcpA の発現が増大することが知られている。我々はもし、変化が認められた場合、菌体がより長期間の定着をすることにつながり、効果的なワクチン株として利用することがで

きるのではないかと着想した。そこで、本研究では、まず、コレラ菌がより効率的に CT を産生することが出来る培地に  $\text{NaHCO}_3$  を添加した時、CT、TcpA に加えて菌体表層に存在するタンパクの発現に変化が生じるかを検証した。

B. 研究方法

- 1) 供試菌株：CT 産生性コレラ菌株 17 株、CT 非産生性コレラ菌株 3 株を用いた（表 1）。
- 2) 培養方法：培地中に  $\text{NaHCO}_3$  を添加し、より *in vivo* での培養条件に近づけることで、 $\text{NaHCO}_3$  を添加していない時と比べて産生される CT 量に変化が生じるかを調べた。コレラ毒素産生培地である AKI 培地（※1）の 0.3%  $\text{NaHCO}_3$  入りと無しでそれぞれ培養した時の CT 産生量を比較した。

具体的には

- ①LB 培地で 1 晩培養させた各菌液を AKI 培地で 6 時間静置培養した時の菌液を O. D. 660=0.15 に調整後、1ml 採取。

②菌液を 8000rpm で 1 分間遠心し、上精を検体とした。

③逆受身ラテックス凝集反応キット VET-RPLA (デンカ生研) を用いて CT 産生量を比較した。(2 倍段階希釈により測定)

※1) AKI 培地

0.5% NaCl、0.4% 酵母エキス、1.5% ペプトンを 121°C で 15 分滅菌した。

後に、0.3% NaHCO<sub>3</sub> をフィルター滅菌して加える (pH 7.4)。NaHCO<sub>3</sub> を加えない場合は、NaOH で pH を 7.4 に調整。LB 培地で前培養させた菌液 10 μl を 10ml の AKI 培地に接種した。

3) SDS-PAGE: 上記と同様に、培地中に NaHCO<sub>3</sub> を添加することで、タンパクの発現量に変化が生じるかを検証した。具体的にはコレラ毒素産生培地である AKI 培地の 0.3% NaHCO<sub>3</sub> 入りと無しでそれぞれ培養した時の菌液を用いて、whole cell の SDS-PAGE を行った。

①前述の実験において、NaHCO<sub>3</sub> によって CT 産生量に顕著に差が見られた菌株を 2 株、差がほとんど見られなかった菌株 2 株、コントロールとして CT 非産生性の菌株 1 株を加えた計 5 株 (表 2) を AKI 培地で 6 時間静置培養した時の菌液を LB 培地で前培養した。

② ①で前培養した菌液 10 μl を AKI 培地 10ml に接種した。

③ 6 時間静置培養した菌液を O.D. 660=0.15 に調整後、15,000×g、4°C で 10 分遠心分離し、上精を除去したものを検体とし、SDS-PAGE を行った。

#### C. 研究結果

NaHCO<sub>3</sub> 添加の培養条件での CT 産生量は、NaHCO<sub>3</sub> 無添加の培養条件に比べて大きく増加した。その増加量は、菌株間によって差異が見られた。(図 1)

また、代表株 4 株におけるタンパクの発現を分析した所、NaHCO<sub>3</sub> 添加の培養条件と NaHCO<sub>3</sub> 無添加の培養条件に顕著な差が見られなかった(図 2)。特に、これまで他の研究者らによって報告されている NaHCO<sub>3</sub> 添加の培養条件下で、接着に大きく関与するとされる TcpA の発現が認められなかった。

#### D. 考察

今回用いた菌株は tcpA 遺伝子は保有していたものの、NaHCO<sub>3</sub> 添加の培養条件によって発現が増大される結果にはならなかった。この結果の原因として、供試菌株は、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を感知する何らかのメカニズムが欠如している可能性が示唆される。新規ワクチン開発として、防御効果を長期間持続させることを目的とし、CT、TcpA に加えた他の菌体表層に存在するタンパクの発現に変化が生じるかを検証するため、まずは、TcpA の発現を検証することが必要不可欠であると思われる。今後は、他の臨床分離株を用い、NaHCO<sub>3</sub> 以外の腸管疑似条件 (例えば胆汁酸) を設定し、よりヒト腸管内環境に疑似した培養条件の検討などを行い、菌体表層に存在するタンパクの発現に変化が見られるかを検証する予定である。

#### E. 結論

培地に NaHCO<sub>3</sub> を添加すると、無添加の場合と比べて、CT 産生量は増加したが、その増加量に関しては、菌株間で差が存在した。また、whole cell を用いた SDS-PAGE では、TcpA を含めた表層タンパクの発現に NaHCO<sub>3</sub> 添加、無添加で違いは見られなかった。

## F. 健康危機情報

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

Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita, M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. (2010): Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139. Mol. Cell. Probes.

### 2. 研究発表

1) Osawa R (July 5-7, 2010)  
Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic

*Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139 strains. The international conference on food security during challenging times, University Putra in Malaysia. Abstract book p. 130-131.

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、第 83 回日本細菌学会総会、日本細菌学会誌 65 巻 1 号、p.100 (パシフィコ横浜) (2010.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に無し



表1

菌株番号 菌株番号 血清型 病原遺伝子 由来

	菌株番号	菌株番号	血清型	病原遺伝子			由来
				<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxI</i>	
CT産生性 <i>Vibrio cholerae</i> 生物型はEl Tor型 CTはClassical型の variant	I-1	INDN1	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-2	INDN2	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-3	INDN3	O1 (Inaba),	+	+	+	Clinically isolated
	I-4	INDN4	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-5	INDN5	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-6	INDN6	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-7	INDN7	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-8	INDN8	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-9	INDN9	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-10	INDN10	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-11	INDN11	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-12	INDN12	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-13	INDN13	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-14	INDN14	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-15	INDN15	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-16	INDN16	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-17	INDN17	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
CT非産生性 <i>Vibrio cholerae</i>	K-1	KVC88017	O1	-	-	-	神奈川衛研より譲渡
	K-2	KVC88008	O1	-	-	-	神奈川衛研より譲渡
	K-3	KVC95029	O1	-	-	-	神奈川衛研より譲渡

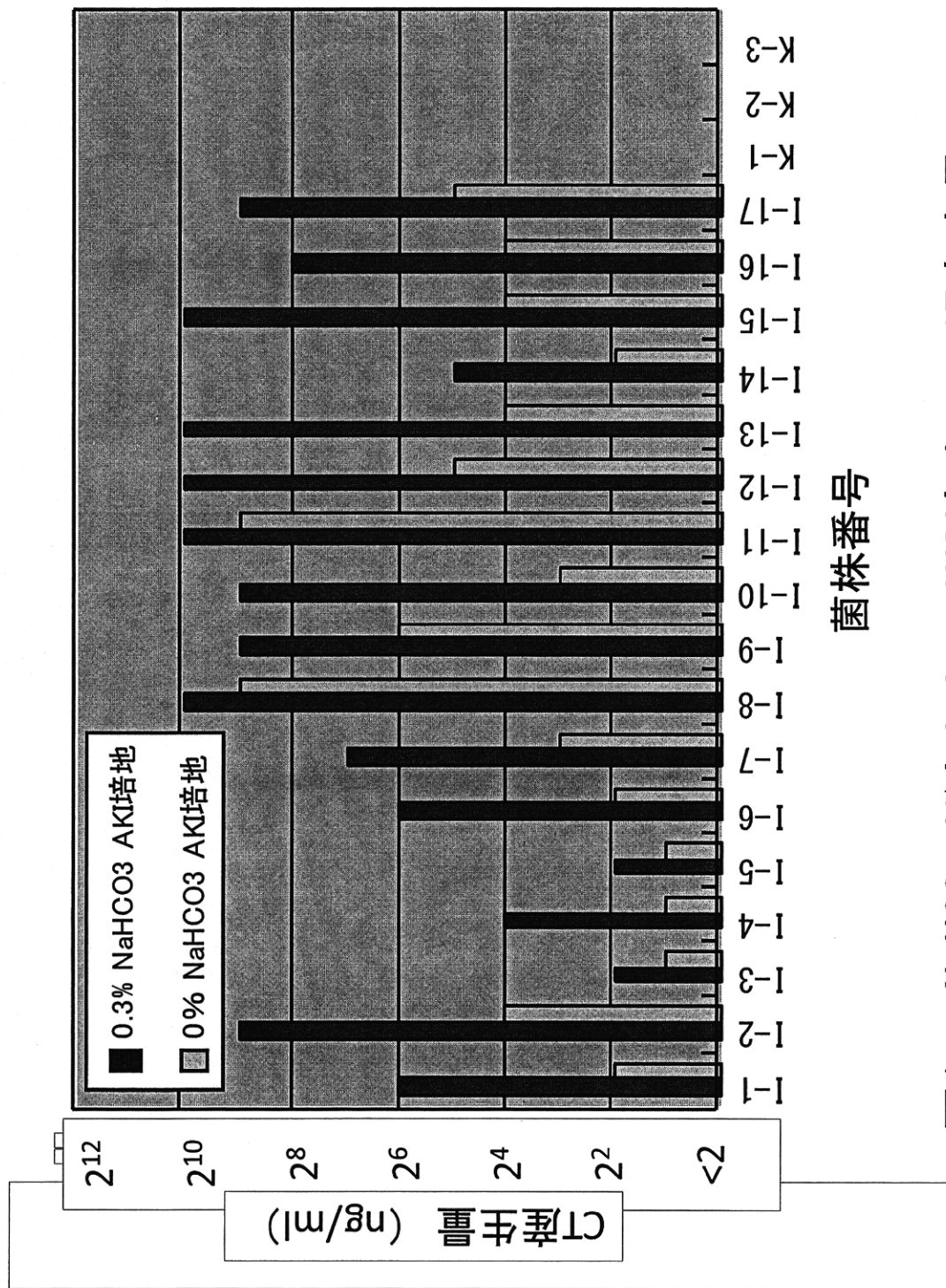


図1. NaHCO<sub>3</sub> 0%と0.3% AKI培地でのCT産生量

表2

	菌株番号	菌株番号	血清型	病原遺伝子			由来
				<i>ctx</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxT</i>	
CT産生性 <i>Vibrio cholerae</i>	I-6	INDN6	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-7	INDN7	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-8	INDN8	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
	I-11	INDN11	O1 (Ogawa)	+	+	+	Clinically isolated
CT非産生性 <i>Vibrio cholerae</i>	K-1	KVC88017	O1	-	-	-	神奈川衛研より譲渡

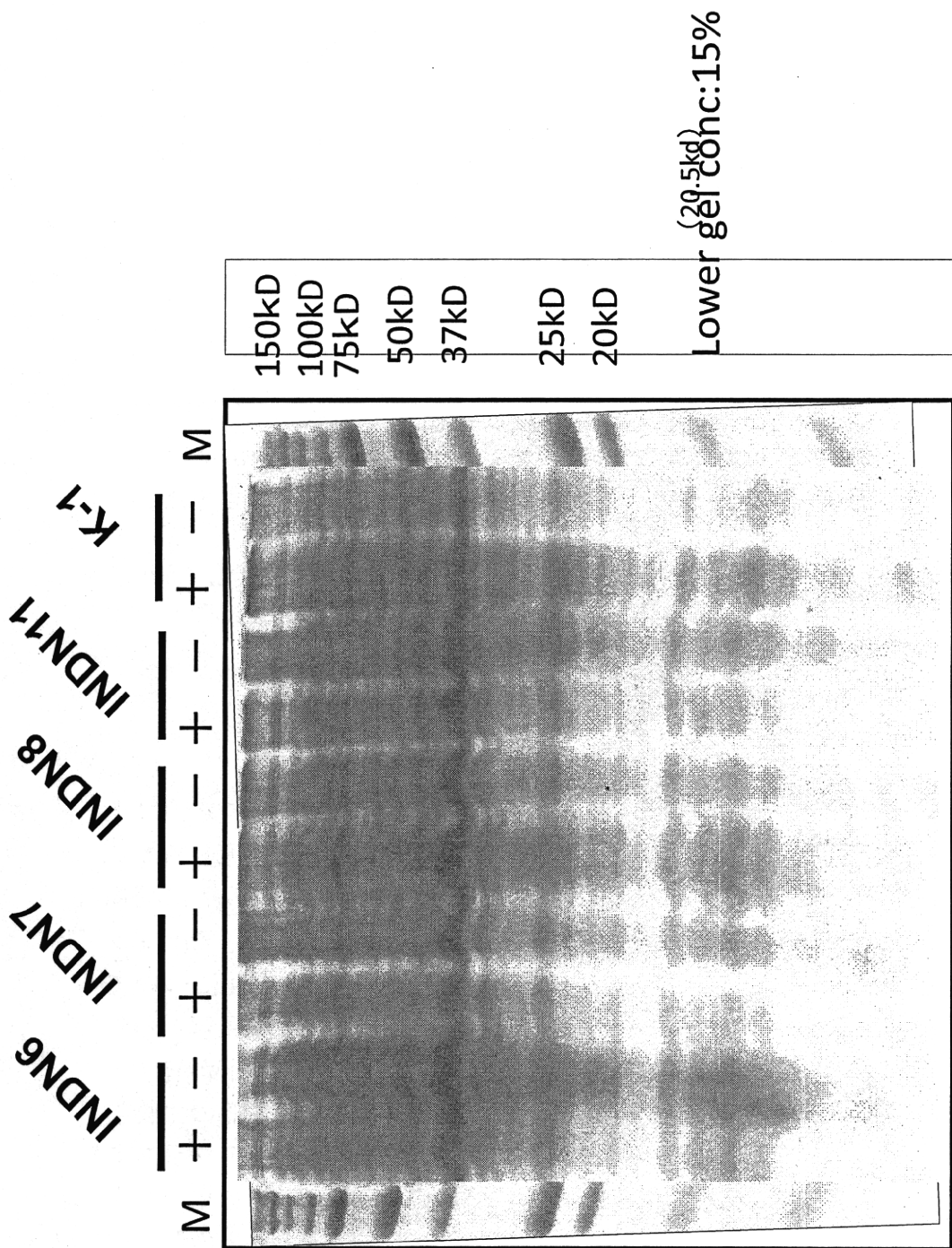


図2.  $\text{NaHCO}_3$  0%と0.3% AKI培地で培養したwhole cellのSDS-PAGE  
 +, 0.3%  $\text{NaHCO}_3$  AKI培地 6h培養: - . 0%  $\text{NaHCO}_3$  AKI培地 6h培養  
 M: marker