

からは有意差はなかったが、1999年から2010年までの全解析では無症状保菌者由来株と比較して、HUS患者由来株で有意にクレード8が多いことが確認された。

### (3) アジア各国における邦人の EHEC O157:H7 感染事例由来株

2010年にアジア各国への海外渡航によって O157:H7 に感染したと推定される事例のうち、渡航先ごとに、ベトナム（1株）、インドネシア（2株）となっており、その他、トルコ（1株）が報告されている。これらの O157:H7 株について同様にクレード解析を行ったが、いずれの株もクレード8株ではないことが明らかとなった（資料2下）。邦人のアジア各国への渡航における O157:H7 感染事例は、実際にはこれより多いことが予想されることから、今後のクレード8の動向が注目される。

### (4) 集団発生事例とクレード8

2010年に発生した O157:H7 による集団発生事例のうち、5月から6月にかけて三重県と同系列 N 高校二校で発生した集団発生食中毒事例は、陽性者数（感染者数）が189名、有症者数275名の大規模な集団発生であった。100名以上の感染者を数えた集団発生事例は2007年に東京都の M 大学で発生した食中毒事例（204名の感染者数、445名の有症者数）以降、発生していなかった。2010年に発生した集団発生由来株のクレード解析から、2007年および2010年に発生した上記のいずれの大規模集団発生についても、クレード8が原因となっていることが明らかとなった。

## D. 考察

本研究から、クレード8を特異的に検出可能な MAMA-PCR 系を構築した。このシステムを用いて、実際に2010年に発生した集団発生を解析したところ、三重で発生した最も大きな集団発生がクレード8によって発生していることを早期に検知することが可能となった。寺嶋らの報告によれば、このクレード8株と同様なパルスフィールドゲル電気泳動解析パターンを示す株は広域に散在的に発生している株であることが明らかとなったことから、同様な系統株が全国的に拡がっているものとして、今後警戒を要する。

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クレード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。一方で、クレード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。今後も継続して監視を続ける必要がある。

## E. 結論

・クレード8を特異的に検出可能な MAMA-PCR 系を確立し、地方衛生研究所の協力を得て、その再現性について確認した。

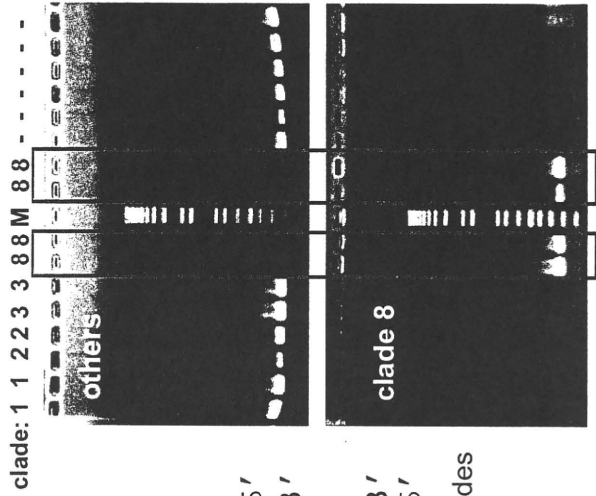
## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

なし

資料1 : MAMA-PCR によるクレード 8 の特異的検出系の確立



**MAMA:** mismatch amplification mutation assay

**SNP in ECs2357 (539 [C/A])**

specific primer for clade 8

clade 8 5' -TTACgAgCCACTgAAACgCgCTg-3' TTC TCg gTgACCTTTTgCgAqAA-5'

others 5' -TTCCgAgCCACTgAAACgCgCTg-3' gTC TCg gTgACCTTTTgCgAqAC-5'

specific primer for other clades

colony PCR condition

95°C, 2 min  
 95 °C, 30 sec  
 65 °C, 30 sec  
 72 °C, 30 sec  
 4 °C  
 25 cycles

クレード 8 に特異的なコンベンショナルPCR系を確立した。

資料2：国内分離0157:H7株におけるクレード8の分布（1999-2010）

年	クレード8 / 解析菌株数	
	HUS発症者由来	無症状保菌者由来
1999-2010	16.2% (56/345)	3.74% (13/347)

2004-2010年に分離された中国(7名), 韓国(7名), トルコ(6名), インドネシア(3名), ベトナム(1名)からの帰国者由来の0157:H7株(すべて有症者由来株, ただし、HUS発症者はなし)にはクレード8株は検出されなかった。

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（H22年度）  
「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コレラ菌の分子疫学解析

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)

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。最終的にメコン川流域諸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を行った。菌株の輸送に制約が強いため、迅速な解析を行う必要性が高い際には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 法が多くの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 MLST 解析の際の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ラオスとの連携を深めるために、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。2007年度にラオス南部におけるコレラ集団発生は、PFGE 解析により同年度におきた散发例との関連が明らかになった (Figure 1)。疫学情報からは、散发例はタイとの関連が深いため、タイおよびラオスにおける国際的なアウトブレイクであることが推測された(Sithivong N et

al. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(4):745-6). さらに 2010 年度に起きたカンボジア国境でおきたアウトブレイク関連株の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. コレラ菌株

2007 年にラオスにおいて Xekong 県で分離された *V. cholera* (n=19) および 2010 年 Attapeu 分離株 (n=9) を解析に用いた。

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。2007 年株は菌株の分与が国立感染症研究所に対してなされた。2010 年に分離された菌株は、NCLE によって PFGE 解析用にプラグ作成を行い、その後、国立感染症研究所に送付され解析を行った。

### 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。

を解析対象として、既報にしたがって行った (Morita M et al. *J Med Microbiol.* 2010; 59(Pt 6):708-12, Danin-Poleg Y et al. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(3):736-46.)

## C. 研究結果

### 1. 2010 年ラオスにおけるコレラアウトブレイク

ラオス南部、カンボジアとの国境に存在する、Attapeu 県において 2010 年 7 月 5 日から 9 月 16 日にかけてコレラアウトブレイクが発生した。Attapeu 県内の 17 村において発生がみられ、4 名の死者を含む 237 のコレラ症例が認められた。

Attapeu 県から NCLE に搬入されたコレラ発症症例から 42 の便検体から、NCLE は 9 株のコレラ菌株の分離同定した。血清型別は 01, Ogawa 型であった。ctx-B 型別からは El-Tor variant であると考えられた。

### 2. Attapeu\_2010 アウトブレイク株の分子タイピング

Attapeu\_2010 アウトブレイクから分離された 9 株の解析を行った。

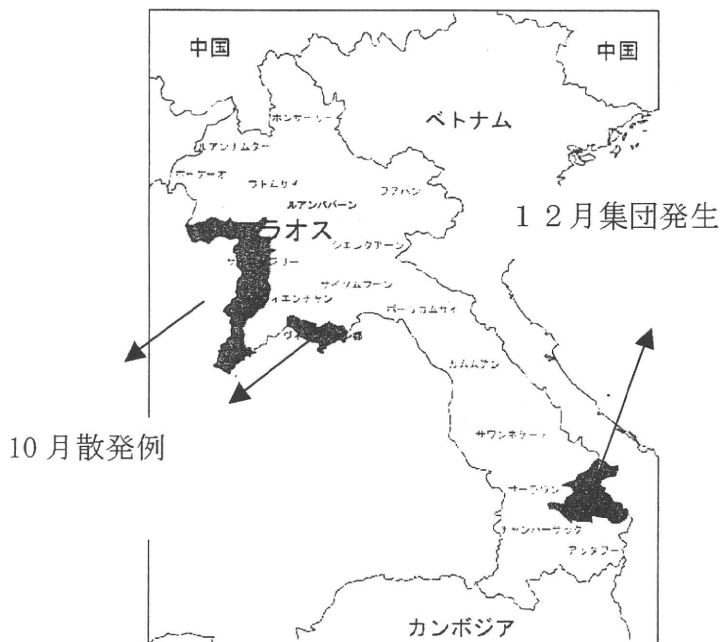


Fig. 1  
2007 年コレラアウトブレイク

PFGE 解析から、10月散發例と 12月集団発生例からの分離株は PFGE 型が一致した。ベトナム/ラオス/タイに広がる広域アウトブレイクであったことが推測された

### 3. multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

MLVA 法は 7 カ所のタンデムリピート領域

### PFGE 法による解析

9株中8株は非常に類似したNotI-切断プロファイルを示した(Profile A, Fig. 2)。1株は、Profile Aから2バンド違いの類似プロファイル(Profile B)を示した。つまり、Attapeu\_2010株は非常に類似の菌株によるものであることが示された。

### MLVA 法による解析

9株中8株はMLVA解析を行っている7部位全ての解析部位で同一のリピート数(MLVA-I)を持つ菌株集団であった(Table 1)。残りの1株は、7部位中1部位(VC-7)のみ、MLVA-Iタイプと異なっていた(MLVA-II)。VC-7部位はMLVA-Iでは17リピート存在し、MLVA-IIでは18リピートである単部位1リピート差のみを示すsingle locus variant (SLV)であり、近縁であることが示唆された。

PFGE profile Bを示す1株はMLVA-Iを示し、MLVA-IIを示す1株はPFGE profile Aを示したことから、解析したAttapeu\_2010分離株9株は、それぞれ遺伝的に近縁であることが示され、単一の原因が推定された。

### 3. Xekong\_2007アウトブレイク株の分子タイプ

#### MLVA 法による解析

19株の解析で3種類のMLVAパターンMLVA-III (n=17), MLVA-IV (n=1), MLVA-V (n=1)示された(Table 1)。MLVA-IVおよびMLVA-Vはそれぞれ、MLVA-IIIからのSLV(MLVA-III/MLVA-IV: VC-8でのSLV, MLVA-III/MLVA-V: VC-1でのSLV)。この結果は、PFGEによる解析結果からえられる結論を支持することとなった(昨年度の報告書, (Sithivong N et al. Emerg Infect Dis. 2010; 16(4):745-6)。

### 4. Attaper\_2010 および Xekong\_2007 原因株の比較解析

Attapeu\_2010とXekong\_2007菌株とのMLVAタイプは、3~4部位異なっており明確に異なっている。しかしながら、PFGEプロファイルの比較から、比較的近縁である可能性が示された。つまり、Xekong\_2007株は、profile Bを示しAttapeu\_2010の1株と極めて類似していることが示された

(Figure 2)。

### D. 考察

MLVA法を用いた分子タイプングにより精度の高いアウトブレイク解析ができることが示された。Attapeu\_2010アウトブレイク株は、MLVA解析によりSLV(MLVA-II)1株を含む近縁株であることが示された。アウトブレイクの原因は明らかにされていないが、単一の原因であることが推測された。

ラオスと国境を接しているカンボジアでは、2009年11月よりコレラアウトブレイクが11ヶ月間持続したのち、2010年10月に収束した。この間、611名の患者、1名の死者が報告された。国境を接している、ベトナム、ラオス、タイへの波及が危惧されていた。ベトナムでは、南部地方において2010年1月からコレラが発生し始めた。しかしながら、菌株比較解析は行われておらず、カンボジアコレラアウトブレイクとの関連は必ずしも明らかになっていない。

今回の解析において、Attapeu\_2010アウトブレイクの細菌学的解析により十分な知見を与えることが出来た。今後、カンボジア、ベトナム分離株との比較することで、メコン川流域諸国でのコレラの伝播について解析可能となる。その際にはPFGEとともに、MLVA解析を並行することでより精度の高い解析が可能となることが示された。

ラオス国内でのコレラアウトブレイク間の比較解析を行うことができた。Xekong\_2007アウトブレイクは、PFGE profileの類似性からAttapeu\_2010との関連性が示されている。Xekong\_2007アウトブレイクが発生した同時期(2007年-2008年)にベトナムでのコレラ発生が認められていた。その際の分離株の部分的MLVA解析がChoiらによって行われ報告された(Choi SY et al. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 7):763-9.)。その結果と今回のXekong\_2007アウトブレイクの解析結果との比較からは、Xekong\_2007アウトブレイク株とベトナム\_2007/2008アウトブレイクは極めて類似の菌株を原因としたものであることが示された。

メコン川流域諸国では、近年毎年のようにコレラアウトブレイクが報告されている。どのケースにおいても、その原因は明らかにされていない。しかしながら、本研究で

しめされた通り、2007/2008年のベトナムおよびラオスにおけるアウトブレイク菌株同一性と、Xekong\_2007とAttapeu\_2010との菌株の類似性から、ある特定の菌株グループが共通した原因となっている可能性が示唆された。

類似するPFGE profileを持つコレラがどのような伝播経路で拡散しているのか、あきらかにしていく必要がある。そのためにも、国際間の比較解析を押し進める必要がある。現在、WHOの各国事務所をとおして、その重要性の認識していただくために各国の関係機関との連絡を取り始めている。

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必要がある。

#### 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。病原細菌の複数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

投稿準備中

Cholera outbreak in 2010, Lao People's Democratic Republic- Implication of use of molecular subtyping method.

Noikaseumsy Sithivong, Tomoko Morita-Ishihara, Arounapha Vongdouangchanh, Traykhouane Phouthavane, Khampheng Chomlasak, Lay Sisavath, Bouaphanh Khamphaphongphane, Bounthanom Sengkeopraseduth, Phengta Vongprachanh, Onechanh Keosavanh, Kongmany Southalack, Reiko Tsuyuoka, Makoto Ohinishi, and Hidemasa Izumiya

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Figure 2  
PFGE analysis of Attapeu\_2010  
(n=9) and Xekong\_2007 (n=19)

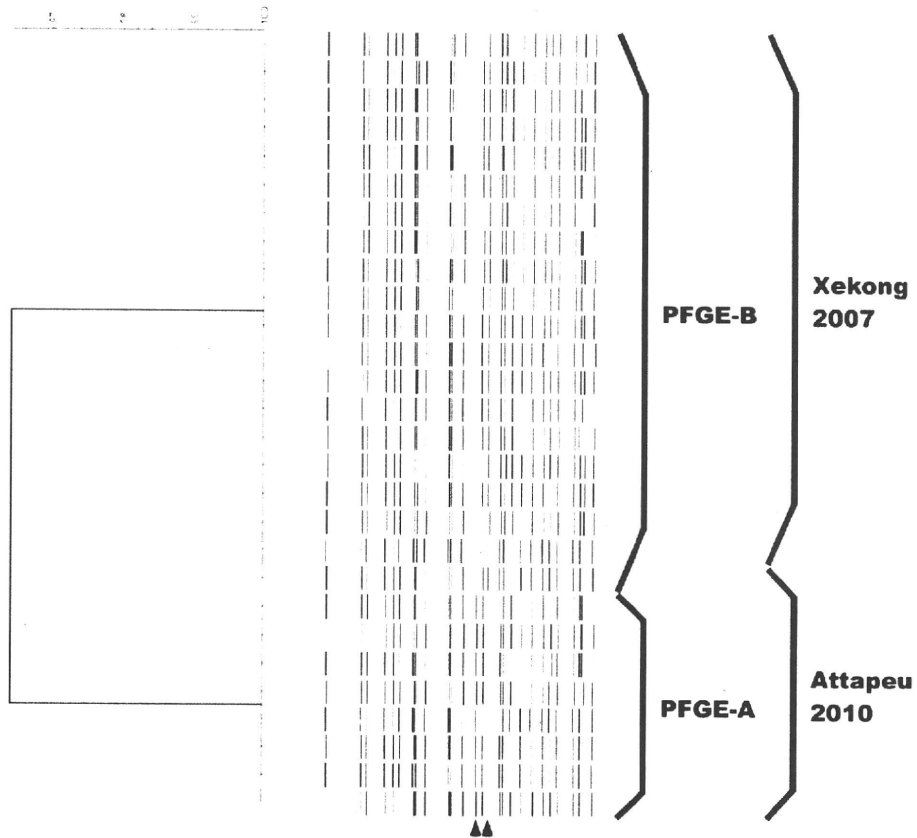




Table. MLVA types identified in this study.

MLVA-type	n	Repeat copy number <sup>a</sup>							PFGE profile <sup>b</sup>
		VC-1	VC-2	VC-3	VC-5	VC-6	VC-7	VC-8	
MLVA-I	8	8	6	-2	-2	7	17	17	A (7), B (1)
MLVA-II	1	8	6	-2	-2	7	18	17	A (1)
MLVA-III	17	10	6	-2	4	7	16	16	B (17)
MLVA-IV	1	10	6	-2	4	7	16	17	B (1)
MLVA-V	1	9	6	-2	4	7	16	16	B (1)

<sup>a</sup>, -2 indicates that no PCR product.

<sup>b</sup>, number of each profile is indicated in the parenthesis

## 平成 22 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
	大西 真	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

*Vibrio cholerae* O1 は、その性状から classical 型と El Tor 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、classical 型のコレラ毒素を持つ *V. cholerae* O1 El Tor (El Tor variant) 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、*V. cholerae* O1 El Tor variant 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、El Tor variant に特有な一塩基多型を用いることで、El Tor variant の型別が可能となることが示唆された。

### A. 研究目的

コレラは *Vibrio cholerae* 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 *V. cholerae* は血清型 O1、O139 のみであるが、血清型 O1 の *V. cholerae* は、その生物学的性状の違いから classical 型と El Tor 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 classical 型と El Tor 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 塩基多型 (SNPs) 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 *V. cholerae* O1 classical によるものであり、第 7 次世界流

行からは *V. cholerae* O1 El Tor 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 *V. cholerae* O1 が、生物型が El Tor 型にも関わらず、classical 型コレラ毒素を産生する *V. cholerae* O1 (*V. cholerae* O1 El Tor variant) であり、これが現在の流行株となっていると考えられる。

*V. cholerae* O1 El Tor variant 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。コレラ流行地域においては多検体の判別が必要であるが、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、*V. cholerae* O1 El Tor variant のゲノムシーケンスを行い、*V. cholerae* O1 El Tor 及び *V. cholerae* O1 classical との間に存在する SNPs を用いた *V. cholerae* O1 El Tor variant の新規疫学マーカーの開発を試みた。

## B.研究方法

*V. cholerae* O1 El Tor variant に特有な SNPs を同定するため、*V. cholerae* O1 El Tor variant 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。*V. cholerae* O1 El Tor N16961 株及び *V. cholerae* O1 classical O395 株のゲノム配列と比較し、SNPs を検索した。また、それらを標的とした *V. cholerae* O1 El Tor variant の疫学マーカーの妥当性を *V. cholerae* O1 El Tor variant を 12 株、*V. cholerae* O1 El Tor を 3 株用いて検討した。

## C.研究結果

El Tor と classical に共通で、El Tor variant では塩基が異なる SNPs を検索するため、*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株のゲノム配列と *V. cholerae* O1 El Tor N16961 株及び *V. cholerae* O1 classical O395 株のゲノム配列を比較した。その結果、Large chromosome 上に 22 ヲ所、Small chromosome 上に 5 ヲ所、基準を満たす SNPs が存在することが確認された。それらの中で ORF 上にある 15 ヲ所の SNPs (Large chromosome 上 12 ヲ所、Small chromosome 上 3 ヲ所) を用いて、他の *V. cholerae* O1 El Tor variant の型別を試みた (Table 1)。使用菌株は日本国内で分離された輸入事例に由来する *V. cholerae* O1 El Tor variant 12 株であり、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 (Figure 1)。渡航先別ではインド 4 株、フィリピン 2 株、タイ 2 株、インドネシア 2 株、中国 1 株、マダガスカル 1 株である。

15 ヲ所の SNPs についてシーケンス解析したところ、全ての株において、*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株と同一の SNPs であるこ

とが明らかとなった。一方、*V. cholerae* O1 El Tor 3 株についても同様に解析した結果、*V. cholerae* O1 El Tor N16961 株及び *V. cholerae* O1 classical O395 株と同一の SNPs であった。以上のことから、*V. cholerae* O1 El Tor variant は特有の SNPs を有しており、それらを解析することで *V. cholerae* O1 El Tor variant を型別することが可能であると考えられる。

## 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は、簡便に *V. cholerae* O1 El Tor variant の同定を可能とする新規疫学マーカーの開発が必須である。本研究では *V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株のゲノムシーケンスの結果から、*V. cholerae* O1 El Tor variant に特有の SNPs を集積し、22 ヲ所を明らかにした。その中から抽出した 15 ヲ所を用いた El Tor variant の型別法を考案した。これにより菌株の培養を必要とする生物型試験を行うことなく El Tor variant の型別が可能となり、現行の型別法と比べて、作業の簡便化と時間の短縮を図ることができる。本研究では、日本国内で分離された輸入事例に由来する *V. cholerae* O1 El Tor variant を用いて、その妥当性を評価したが、アジア地域全域を網羅しているとは言えない。そこで、今後その有用性をアジア各国と連携して検討し、新規疫学マーカーとしての利用を試みる。そして、得られた情報を整理、データベース化し、アジア地域でのコレラ流行株の動向を常に把握することで、アジア地域における感染症対策に資することができる。

## E.結論

*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株に特有な 22 ヲ所の SNPs を同定した。それらの中で 15 ヲ所を標的とすることで、*V. cholerae* O1

El Tor variant の判別が可能であり、新規型別方法として期待される。

F.健康危機情報

特に該当なし。

G.研究発表

Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Yamamoto S., Nair G.B., Matsushita S., Yokoyama K., Kai A., Seto K., Watanabe H., Izumiya H. Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. J. Med. Microbiol. (2010) 59: 708-712.

Table 1. Positional details of SNPs

SNPs	Gene	El Tor	Classical	Elt-var.
1	phosphoribosylamine--glycine ligase	g	g	A
2	arginine/ornithine antiporter	g	g	A
3	DNA mismatch repair protein	t	t	C
4	nitroreductase A	c	c	T
5	preprotein translocase subunit YajC	g	g	T
6	outer membrane protein OmpV	a	a	T
7	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	c	c	A
8	ribonuclease E	t	t	C
9	ferrous iron transport protein B	c	c	T
10	flagellar capping protein	t	t	C
11	2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	c	c	T
12	cholera toxin secretion protein EpsM	g	g	A
13	dihydropteridine reductase	g	g	A
14	chitodextrinase	g	g	A
15	methyl-accepting chemotaxis protein	g	g	A



厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）  
平成22年度 分担研究報告書  
（アジア地域におけるラポネットワークの構築に関する研究）

研究課題名：アジアで流行する汎赤痢菌群に対するHfqワクチンの共同研究  
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：

病原細菌に対するワクチンは一般的に血清型特異的な防御効果を主体としたものが多く、多様な血清型で構成される病原菌群全てに対するユニバーサルな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に汎赤痢菌群に効果のあるワクチン候補株を試作し、アジア地域におけるラポ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アジア地域からの輸入例と考えられており、海外での流行を反映して *Shigella sonnei* 及び *S. flexneri* である。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 1 (Sd1) は現在の流行株ではないが、臨床的に重要であり、感染コントロールの標的としてワクチントライアルの対象となっている。このように、細菌性赤痢は現実的な流行型と、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プラスミドで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り、通常発現の起こる高温 (37℃) 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  $5 \times 10^8$  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  $5 \times 10^8$  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  $\mu\text{l}$  を 4 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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生型 *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)では野生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1回目のワクチン株と野生型接種群、及び無効だった2回目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2回目のワクチン株接種群では誘導されておらず、2回目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。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ある。

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度であり、組織学的には感染を疑わせる変化が認められた。おそらく野生型の強い炎症から回復した群では血清型に非特異的な食細胞群が増加しており、効果のあったワクチン株の作用にもこのような局所の細胞性免疫が関与していることが予想される。これは、二回目の実験で皮下接種により誘導された液性免疫だけでは有効な効果が得られなかったことから支持されることが考えられる。

抗体の産生量は、培地中に分泌される可溶性の病原蛋白に関する限り、炎症の程度が強い野性型投与群が有意に多いことがELISA法で示されている。ELISAの抗原として用いた*S. sonnei*の分泌蛋白は主としてTTSSのエフェクターであるIpaBCD蛋白群であり、このことはワクチン効果の中心となるprotective antigenが、これまで考えられてきた分泌因子以外の病原蛋白である可能性も考慮する必要があると思われる。こうした結果を踏まえて、今後効果のあったワクチン接種個体で示された抗体の認識する蛋白の局在を調べる予定である。

評価系の問題として実際の感染部位と異なる角結膜炎による評価でワクチン効果を判定することは説得力に欠けるため、アジアにおけるラボネットワークを生かしシメチジン投与モルモットを用いた腸管感染系 [2] を開発した、インドNICEDのDr. Hamanta Koleyと共同研究を開始した。

最終年度は十分に早い時期にNICEDへワクチン候補株を送付し現地での実験開始に備えた。インドでの実験系はすでに完成しているが、実際の動物実験は共同研究者が別のワクチンプロジェクトに関わっているという理由で新規の動物実験の許可を待つ状況が長く続いた。こうした中、平成22年12月に京都大学で行われた日米医学会コレラ部会にDr. KoleyとNICEDの所長であるDr. Nairが来日し、直接プロジェクトについて会談した。さらに同時期に行われた感染研とNICEDとのMOU締結の記念セミナーで上記のモルモットでの実験データのプレゼンテーションを行い現地での研究の進展を促進した。

#### E. 結論

汎赤痢菌群に効果が認められる赤痢ワクチンの候補株として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型の違いに関わらず一定のワクチン効果が認められた。再試験では免疫能が不良で再現性が得られなかった。

#### F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

#### G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

##### 1. 論文発表

Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 2009 Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

##### 2. 学会発表

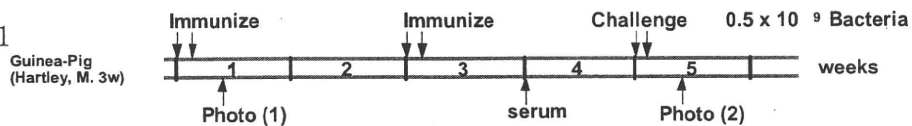
第83回日本細菌学会総会 2011年3月27-29日 横浜国際会議場

2011, Dec. 5-8 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kyoto Univ. Kyoto Japan

#### <参考文献>

1. Kotloff, K. L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77 (8) : p. 651-66.
2. Hartman, A. B., et al., *Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains*. Infect Immun, 1991. 59 (11) : p. 4075-83.

☒ 1



#

6	Vaccine strain	HW383
6	Wild-type (control)	HW383
3	2457T $\Delta hfq$	HW383
3	LB (control)	HW383

Vaccine strain : *S. flexneri* 2a 2457T  $\Delta hfq$  (pACYC177-*lpgC-ipaD*)

Wild-type (control): *S. flexneri* 2a 2457T

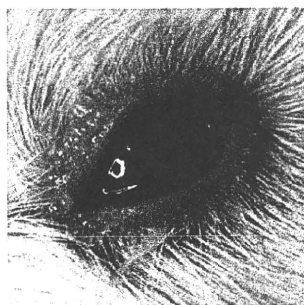
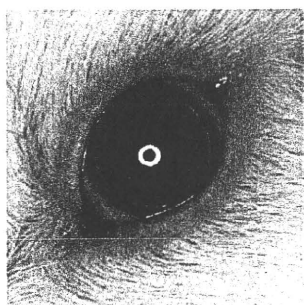
Challenge strain : *S. sonnei* HW383

☒ 2

control

$\Delta hfq$

wild-type



PBS 投与群

*hfq* ワクチン投与群

野生型投与群

☒ 3

Control (PBS)

Vaccine

Control (野生型)

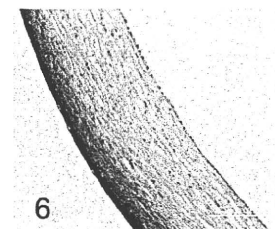
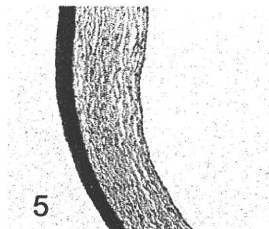
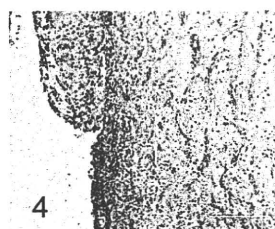
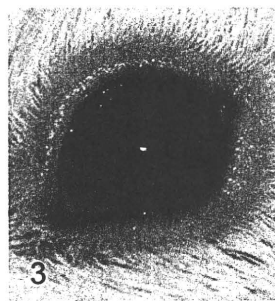
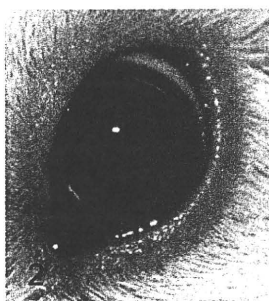
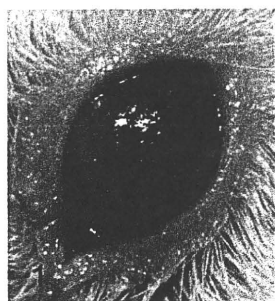


図 4

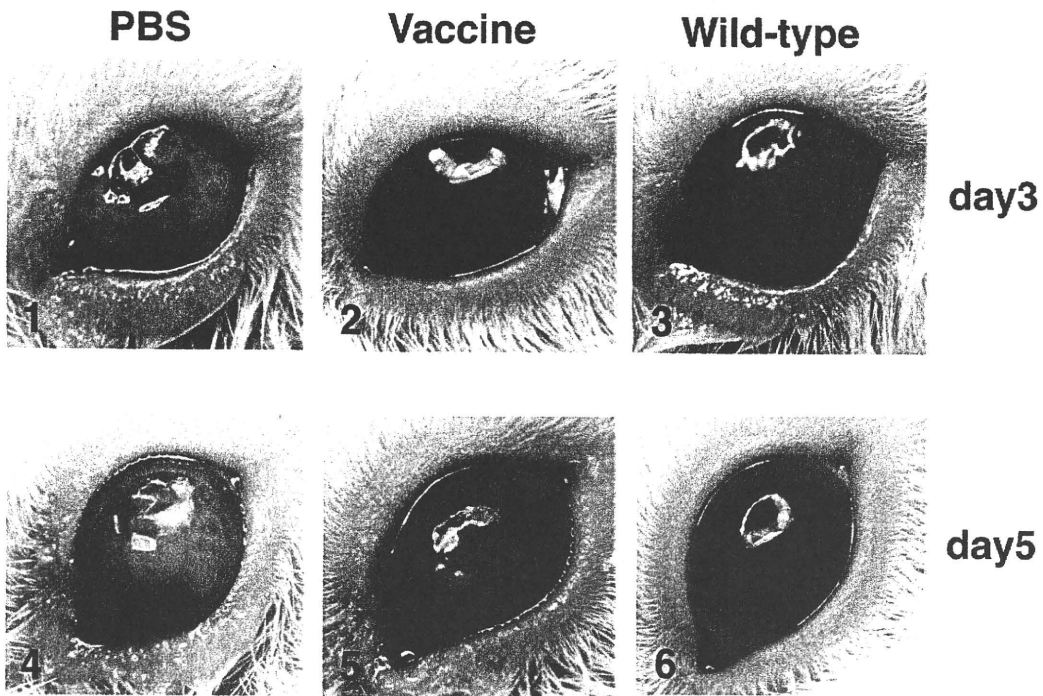
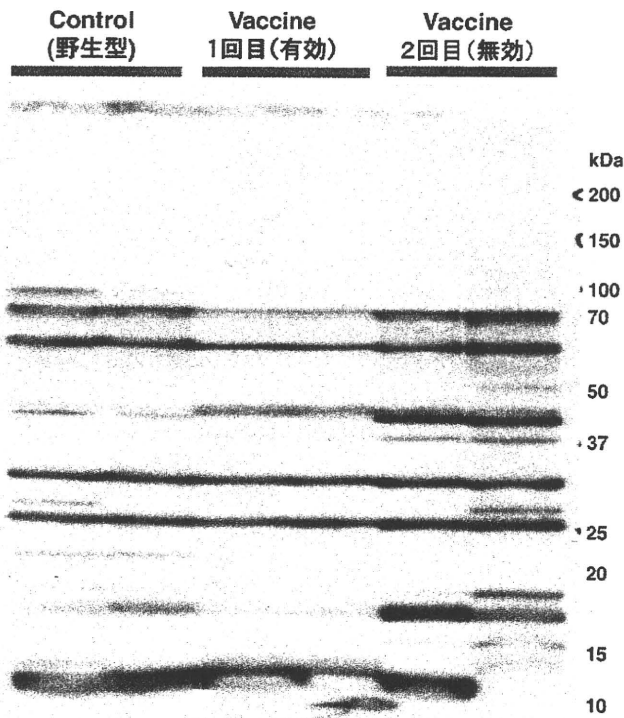


図 5



ワクチン投与モルモット血清によるD群 *S. sonnei* (攻撃株)の蛋白に対するウエスタンブロット。