

2004年-2010年の間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、中国(7株)、韓国(7株)、インドネシア(3株)となっており、その他、トルコ(7株)が報告されている。これらの O157:H7 株について同様に clade 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 5)。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。

#### (8) 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月にかけて三重県の同系列 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、日本国内においても高病原性(クレード 8)と考えられている EHEC O157:H7 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。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。

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クレード 8 では、欠失が見られるクレード 1, 2, 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。クレード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、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。本研究で確立したクレード 8 による MAMA-PCR 系を用いて今後さらに解析を進める必要があると考えられる。

#### 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(クレード 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2010年までに分離された株の解析から、クレード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。

・クレード8株では他のクレード株と比較して、Stx2とLEEの活性が上昇している可能性が示唆された。

・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

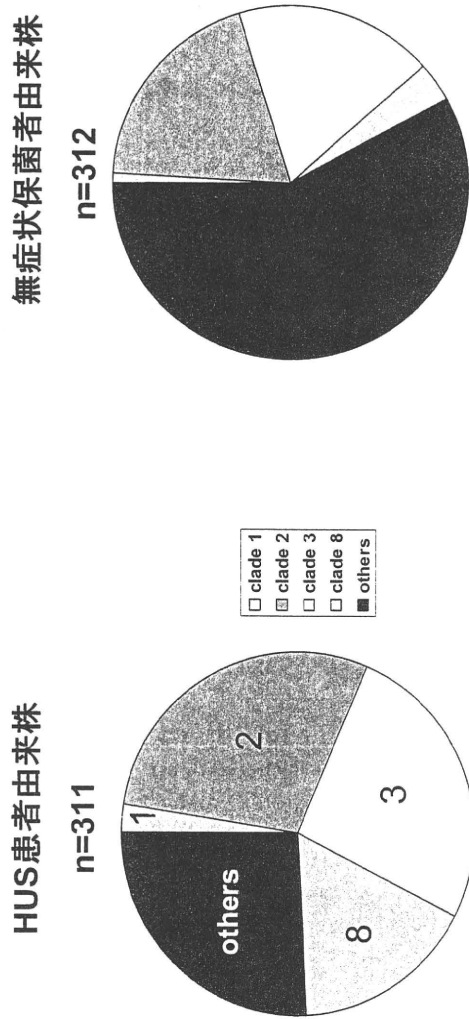
なし

#### G.研究発表

・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.

資料1：国内で分離されたO157:H7株のクレード解析（1999-2009年）



統計解析:

$\chi^2$  自乗検定 (自由度1: clade 8 vs other clades in HUS and asympt strains)

p=5.0E-8,

OR (95% CI): 5.49 (2.81-10.75)

- clade 8 は無症状保菌者由来株と比較して、HUS患者由来株に有意に多く存在する。

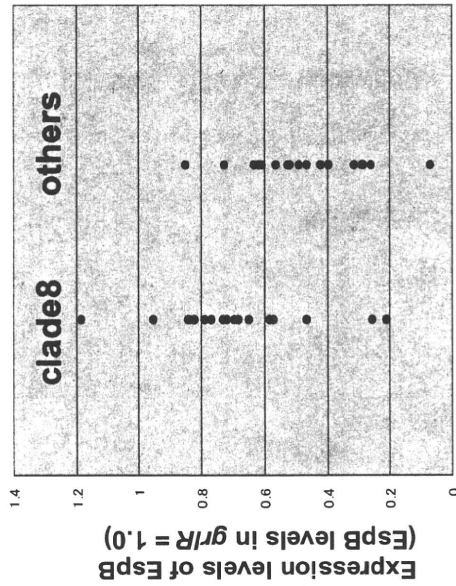
資料2: NO-reductaseをコードするnorV遺伝子のPCR解析

clade	norV	
	+	-
clade 1	0	6
clade 2	(1)	15
clade 3	0	16
clade 8	25	0

NO (一酸化窒素)はStx2 (志賀毒素2型) の発現レベルを低下させる (PNAS 104: 10199-10204, 2007).

NorVは嫌気条件下でNOの活性を低下させる。クレード1, 2, 3ではnorV内に欠失が見られることから、腸管内などの嫌気条件下ではNOによってStx2の産生量が低下するが、クレード8ではNorVによってNOの産生量が低下するため、Stx2の発現量が上昇している可能性が示唆された。

資料3: LEEにコードされる3型分泌蛋白質EspBの発現レベル解析

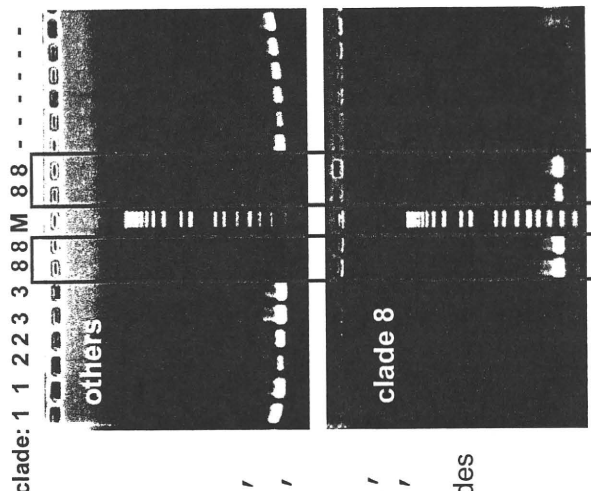


病原性遺伝子群LEEは腸管上皮細胞への接着に必須である。

LEEにコードされる3型蛋白質分泌装置を介して宿主細胞へターゲティングされるEspBの発現レベルは他のクレードと比較してクレード8で有意に上昇している (Student's t-test (unmatched, 2-tailed):  $p=0.0017$ ).



資料4：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' - TTCTCgTgACCTTTTgCgAqAA-5'  
 5' - TTACgAgCCACTgAAAAACgCgCTg-3'

others 5' - TTCCgAgCCACTgAAAAACgCgCTg-3'  
 5' - gTCTCgTgACCTTTTgCgAqAC-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5：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  
「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の連携を通じて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ている。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。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。

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. 菌株

#### コレラ菌

2007年にラオスにおいて Xekong 県で発生したアウトブレイクに関連する *V. cholera* および2010年 Attapeu 分離株を解析に用いた。

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。

#### 大腸菌

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。

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。

### 2. コレラ菌の 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。

### 3. コレラ菌の multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

MLVA 法は7カ所のタンデムリピート領域を解析対象として、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.)

4. 大腸菌の 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 のアサイメントは York 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。

5. 大腸菌の *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	
<i>gyrA</i> _ECF	ACCTCAAAGTGGCGGGCTGTG
<i>gyrA</i> _R2	GGGAGATGGCTCCCTTTGGC
<i>parC</i> _ECF	TGTAGTATCTCCGGCAATATTGC
<i>parC</i> _ECR	GGTTGAATACGCTGCCGGATG
For sequencing	
<i>gyrA</i> _EC_S1	GACGGTCGATTTCTGTG
<i>gyrA</i> _EC_S2	ATTGAAGTAAACGGGAC
<i>gyrA</i> _EC_S3	GGGTAGCGCCGATCG
<i>gyrA</i> _EC_S4	GGCGATGAGCTGATCG
<i>gyrA</i> _EC_S5	ATCGCACGGACAGAAG
<i>gyrA</i> _EC_S6	TGGCGCTGTTAGCGG
<i>gyrA</i> _EC_S7	CATGGTCAATGCCAC
<i>gyrA</i> _EC_S8	TTTCCGTACCGTCATAG
<i>gyrA</i> _ECR	CCCAGACTTTACAGCCTGGAC
<i>parC</i> _EC_S1	GCACCACCGGTAATTGC
<i>parC</i> _EC_S2	GAATGGCTGGTGTTC
<i>parC</i> _EC_S3	GGCCATGATATCGACG
<i>parC</i> _EC_S4	GATGTTCCCGGTAAGC
<i>parC</i> _EC_S5	GCCTTACCTGCACGG
<i>parC</i> _EC_S6	AATCTTCACTCTTCCAG
<i>parC</i> _EC_S7	TCTTCAAACCGCGG
<i>parC</i> _EC_S8	CCAGTTCCCTGACC

## C. 研究結果

1. ラオスにおけるコレラ集団発生に関する分子疫学解析

(1) 2007年コレラアウトブレイク

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。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 (図 1)。

比較対象として用いた 2007 年 10 月に散発事例として Xekong 県からは地理的に異なる Vientiane, Xaignabouri 県 (図 2) 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。散発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。

散発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貝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。

## (2) 2010 年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 株のコレラ菌株を分離同定した。血清型別は O1, 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。

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

### (1) 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, 図 3)。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。

### (2) MLVA 法による解析

9 株中 8 株は MLBA 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 (表 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ピング

#### 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) が示された (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 (Sithivong *et al.* *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (4):745-6)。

### (4) Attapeu\_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 部位異なり明瞭に異なっている。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 (図 3)。

## 4. 国内分離血流感染由来大腸菌の解析

### (1) 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。

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、尿路カテーテルの有無と、ST型との間に有意な相関は認められなかった。

### (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*cnf1*, *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。

*papGIII*, *cnf1*, *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耐性率を検討した。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*)への変異が耐性度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。

表2に示す通り、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。いずれ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、本研究で示された通り、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。

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。

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。

## 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

### 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. 16: 745-746, 2010.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 PFGE analysis of isolates from Xekong\_2007 cholera outbreak

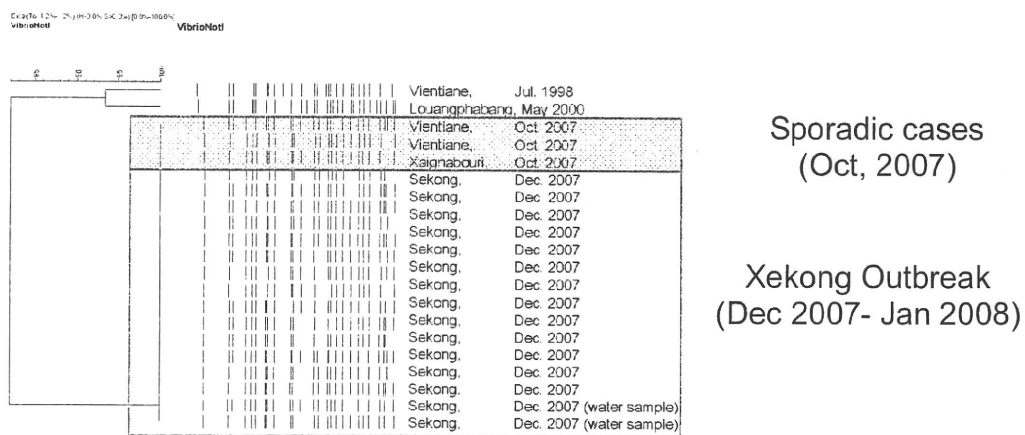


図2 2007年ラオスにおけるコレラ発生

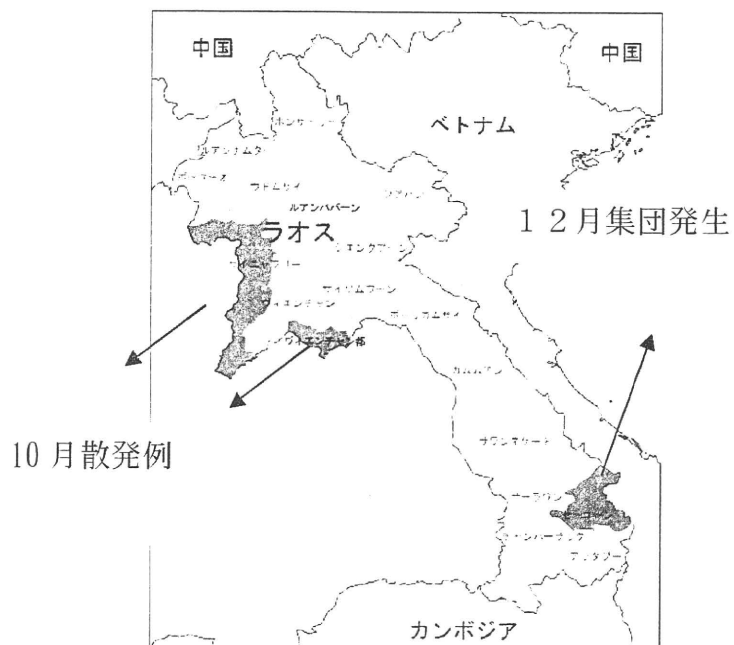


图 3  
 PFGE analysis of Attapeu\_2010  
 (n=9) and Xekong\_2007 (n=19)

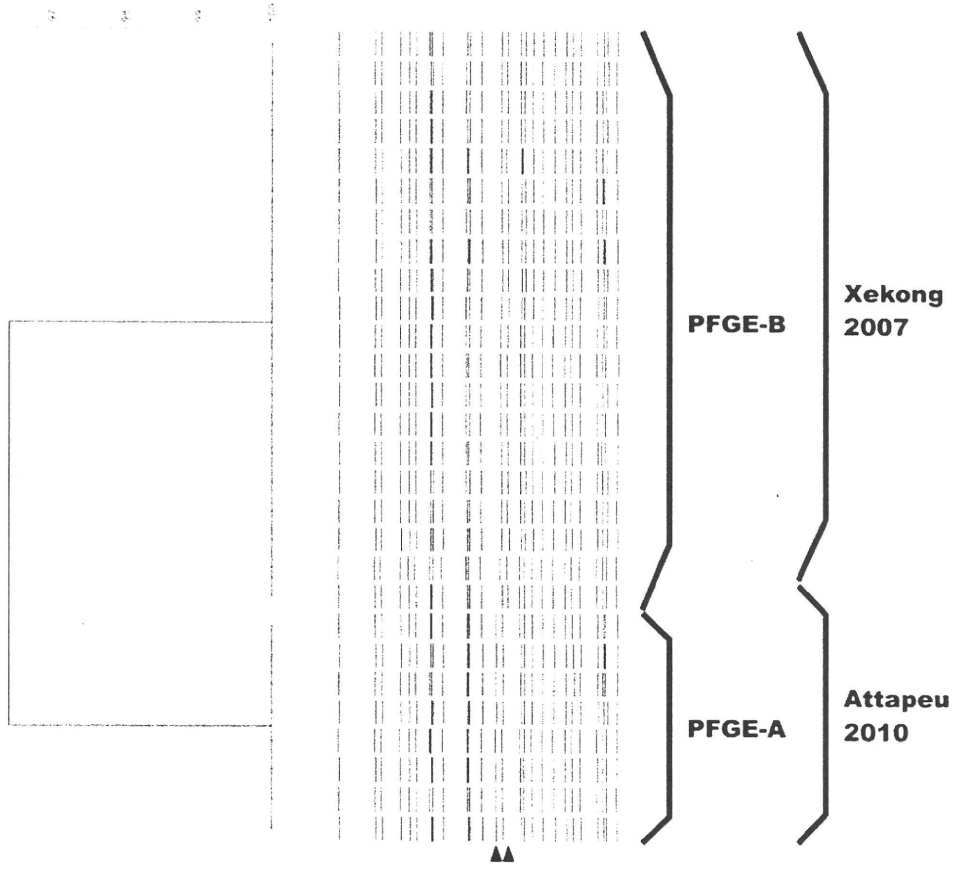


表 1. MLVA types identified in this study.

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

表 2 国内分離大腸菌の QRDR の多様性

Quinolone resistant determining region									
gyrA									
Strains	Cip	ST	ST complex	Phylogroup	83	87	80	parC	
ST09	R	393		D	Leu (TTG)	Asn (AAC)	Ile (ATC)	Glu (GAA)	
ST16	R	393		D	Leu (TTG)	Asn (AAC)	Ile (ATC)	Glu (GAA)	
ST27	?	393		D	Leu (TTG)	Asn (AAC)	Ile (ATC)	Glu (GAA)	
ST37	?	405		D	Leu (TTG)	Asn (AAC)	Ile (ATC)	Glu (GAA)	
ST42	R	131		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ile (ATT)	Val (GTA)	
ST14	I	95		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST26	I	131		B2	Leu (TTG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	
ST48	I	14	ST14 Colx	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	550	ST14 Colx	B2	Ser (TCG)	Asp (GAC)	Ser (AGT)	Glu (GAA)	

Table 4 QRDR types and relationship with MLEST.

QRDR Type	Substitution of QRDR						No. of isolates from			ST No. of isolates)								
	gyrA		parC		Others		Urine (N=34)	Blood (N=34)	Total (N=40)	ST_131 (17)	ST_848 (4)	ST_1118 (3)	ST_1340 (3)	ST_158 (3)	ST_405 (3)	ST_234 (2)	ST_38 (2)	Others
Type 1	Leu (TTG)	Asn (AAC)	-	Ile (ATC)	-	-	8	8	17									
Type 2	Leu (TTG)	Asn (AAC)	-	Ile (ATC)	Ala (GCA)	-	1	2	3			3		3	2	1	7	
Type 3	Leu (TTG)	Asn (AAC)	-	Ile (ATT)	Val (GTA)	-	8	8	17	17								
Type 4	Leu (TTG)	Asn (AAC)	-	Ile (ATT)	-	-	2	1	3		3							
Type 5	Leu (TTG)	Asn (AAC)	-	-	Lys (AAA)	-	1	1	1								1	
Type 6	Leu (TTG)	-	-	-	-	-		1	1								1	
Type 7	Leu (TTG)	Tyr (TAC)	-	Ile (ATT)	Gly (GGA)	-		1	1		1							
	not determined						2	3	5			3						2

## 平成 20～22 年度 総合分担研究報告書

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
	荒川英二	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
	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、classical 型のコレラ毒素を持つ *V. cholerae* O1 El Tor (El Tor variant) が多数分離されるようになった。本研究では、*V. cholerae* O1 El Tor variant 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、*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は特有な遺伝子断片を有しており、その領域を標的とした PCR による型別が可能となった。さらに、*V. cholerae* O1 El Tor variant に特有な一塩基多型を用いた型別方法を示した。

### 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。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 *V. cholerae* O1 El Tor variant

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た。また、*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する必要があるが、コレラ流行地域においては多検体を判別しなければならない。そこでゲノム情報を利用し、簡便に鑑別可能な新規疫学マーカーの開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1. *V. cholerae* O1 El Tor variant の遺伝的多様性の解析

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 *V. cholerae* O1 El Tor 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。供試菌株に *V. cholerae* O1 classical 10 株、*V. cholerae* O1 El Tor 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。

### 2. ゲノム情報を利用した新規疫学マーカーの開発

*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 株のゲノム配列を参照配列として、*V. cholerae* O1 El Tor には存在しない特異的配列を同定した。また、*V. cholerae* O1 El Tor variant に特有な SNPs を同定するため、*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検討した。

## C. 研究結果

### 1. *V. cholerae* O1 El Tor variant の遺伝的多様性の解析

コレラ毒素遺伝子型別を行った結果、*V. cholerae* O1 El Tor は1994年以前に検出された。一方で、*V. cholerae* O1 El Tor variant は1993年に検出された後、1995年以降は全ての分離株が *V. cholerae* O1 El Tor variant であり、1990年代前半に *V. cholerae* O1 El Tor から *V. cholerae* O1 El Tor variant への流行株の遷移が確認された (Table 1)。

PFGE によるクラスター解析では、*V. cholerae* O1 El Tor variant は *V. cholerae* O1 El Tor を含む *V. cholerae* O1 classical とは異なるクラスターを形成した。さらに *V. cholerae* O1 El Tor variant はサブクラスターに分類され、菌株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 による解析でも同様であった。

### 2. ゲノム情報を利用した新規疫学マーカーの開発

*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株のゲノム解析から、*V. cholerae* O1 El Tor variant にのみ存在する約 28kb の遺伝子断片を同定した。境界領域の PCR から、挿入位置は 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、*V. cholerae* O1 El Tor N16961 株及び *V. cholerae* O1 classical 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)。

このことから、特異的配列を標的とした PCR が *V. cholerae* O1 El Tor variant の簡便な判別方法となりうることを示唆されたため、他の *V.*

*cholerae* O1 El Tor variant 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 *V. cholerae* O1 El Tor variant 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。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 *V. cholerae* O1 El Tor 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)。

約 28kb の特異的配列は *V. cholerae* O1 El Tor variant に普遍的に存在しているわけではなく、これを標的とした PCR による型別方法は汎用性がない。そこで、より実用性の高い方法として、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。

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。解析結果から得られた ORF 上にある 15 カ所の SNPs を用いて、他の *V. cholerae* O1 El Tor variant の型別を試みた(Table 2)。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輸入事例に由来する *V. cholerae* O1 El Tor variant 12 株を用いた。15 カ所の 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(Figure 3)。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。

#### D. 考察

*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ため、多大な時間と労力を要する。さらにアジアのコレラ流行地域では、多検体を判別しなくてはならない。このような状況下で、コレラ流行株の情報を共有するためには、アジア各国において簡便な *V. cholerae* O1 El Tor variant の同定を可能にする新規疫学マーカーの開発が必須である。

はじめに本研究では *V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株のゲノムシーケンスの結果から、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 PCR により、タイ及びインドネシア由来の *V. cholerae* O1 El Tor variant については、型別が可能であったが、全ての *V. cholerae* O1 El Tor variant に適用できる方法ではなかった。次に *V. cholerae* O1 El Tor variant に特有の SNPs を集積し、15ヶ所の SNPs を用いた El Tor variant の型別法を考案した。これにより生物型試験を行うことなく El Tor variant の型別が可能となり、現行の方法と比べて、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El Torであるがclassical型コレラ毒素遺伝子をもつ *V. cholerae* O1 El Tor variantであった。また、その菌株間には遺伝的多様性が存在していた。

*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株のゲノム解析から、*V. cholerae* O1 El Tor N16961 株に存在しない約 28kb の特異的挿入配列を同定した。この遺伝子断片を標的とした PCR により、特定地域由来の *V. cholerae* O1 El Tor variant を型別することができた。また、*V. cholerae* O1 El Tor variant V070005 株に特有な SNPs を同定した。それらの中で 15 ヶ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、より有用性の高い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

1. 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. 43<sup>rd</sup> U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Fukuoka, Japan, Nov. 2008.

2. 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. Type of *ctxB* encoded in El Tor *V. cholerae* strains from 1991 to 2006

Year	<i>ctxB</i> type		Region‡(no. of strains)
	El Tor	classical	
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	

†: One strain harboured El Tor *ctxB* and the other harboured classical *ctxB*.

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