

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

「ベトナム共同研究拠点」：北部、南部ベトナムのコレラ流行地域におけるビブリオフィー
ジの分離、ゲノム解析、コレラ予防、治療への応用
研究分担者 江原雅彦 長崎大学助教
研究協力者 Nguyen Dong Tu 長崎大学大学院生

研究要旨：

ベトナムでのビブリオフィージの検出は 2006 年から開始され、現在に至っている。この間、南部、および北部の環境水検体より、線維状ファーージ、fs1、fs2、およびカップファーージの検出を行い、広くこれらのファーージが分布していることを明らかにした。2010 年に北部ベトナムで分離した *Vibrio cholerae* O139 の性状を明らかにし、それより分離した線維状ファーージ ND1-fs1 のゲノムの塩基配列を決定した。また、線毛産生コレラ菌 Bgd17 (fimbriate Bgd17) の固定死菌を家兎に免疫し、アジュバントなしで、抹消血中に抗線毛抗体が上昇することを確認した。

A. 研究目的

- 1) 環境水中のコレラ菌 (非病原性コレラ菌) が大きな流行を起こす病原性株になる機構の解明、
- 2) コレラワクチンの開発

B. 研究方法

- 1) ベトナム南部、An Giang, 北部の Thai Binh, Hai Phong の各 province において、*Vibrio cholerae* O1, O139 および、線維状ファーージ fs1、fs2、カップファーージの分離、検出を行う。コレラ患者由来下痢検体、およびコレラ菌新鮮分離株からのビブリオフィージの検出を行う。
- 2) 家兎に fimbriate Bgd17 株の固定死菌をアジュバントなしで免疫し、抗線毛抗体の上昇を ELISA, Western blot で確認する。

C. 研究結果

- 1) 今年はコレラ患者は出なかったため、患者由来検体は入手できなかった。しかし

環境水からは線維状ファーージ、fs1、fs2 が検出された。カップファーージは広く環境中に分布していた。2010 年に Nam Dinh province で O139 コレラ菌が分離され、その解析を行ったので報告する。

Multiplex PCR で、*ToxR*, *ctxA*, *VCO139*, *VCO1*, 各遺伝子の検出を同時に行った結果、14 検体中に 7 検体から O139 コレラ菌を検出し、その陽性検体 1 からコレラ菌の分離に成功した。この検体は (図 2.) に示すようにエルトール型コレラ菌の毒素を有していた。この菌株 (ND1) は線維状ファーージを保有しており、図 3 に示すように、fs1type であった。このファーージは ND1-fs1 と命じた。

線維状ファーージ ND1-fs1 は CTX-phage の regulator gene である、*rstR*, *rstA*, *rstB*, *rstC* を保有しており、生体内でのコレラ毒素産生の調節に関与していると思われた (図 4)。

分離された O139ND1 株は 1991-1992 年にベンガル湾諸国で分離された O139 コレラ

菌と同様に、多剤耐性遺伝子を保有する SXT element を持っていた (図 5)。

O139 コレラ菌 ND1 株のコレラ毒素遺伝子の解析

ND1 コレラ菌の chromosomal DNA を *Ava*I, *Bgl*II, *Pst*I, *Bgl*III, *Hind*III で消化後 *ctxA*, *core*, *RS*, *rstR*, *zot* の各 probe で Southern blot を行って、それぞれの保有数を決定し、CTX ϕ の

genetic organization を決定した。すでに知られている、他の線維状ファージ VGJ ϕ の integration site のデータを参考に、ND1-fs1 のコレラ菌 chromosome への integration site を決定した (図 7、8、9)。コレラ菌はファージが感染し、lysogenic になると、たとへ single colony を形成していても、そのコロニーの半分はすでに cure されていて non-lysogenic になっている。というのは、図 8 に見られるように、ND1-fs1 の right junction を検索していると、プライマー *attP*-R-F/*rtxA*-Ri でできる amplicon は線維状ファージ ND1-fs1 が integrate していることを示し、同じ template DNA を使って、3' *zot*-F/*rtxA*-Ri や *ctxB*-FII/*rtxA*-Ri でできる amplicon はファージが integrate していない場合にできるもので、この single colony から作製した template DNA は両者の mixture ということになる。

D. 考察 これまでベトナムでの O139 コレラ菌に関するデータはほとんど知られてなく、我々が、2007年にベトナムでコレラの流行が始まってその過程で行った cholera survey で、コレラ流行地の医療施設の周囲で O1,O139 コレラ菌の PCR による検索を行って O139 コレラ菌を検出したのが、多分はじめてのことで、実際 2010年に分離するまで、その性状は不明であった。O1 コレラ菌の抗血清は不十分ながら、入手

はできるが、地方での下痢症の検査には O139 コレラ菌は検索の対象にはなっていない。大流行が起きれば国立衛生疫学研究所 (ハノイ) まで、下痢検体を送ることが想定されるが、小規模の outbreak では無視されるだろう。ベトナムの南部から北部にいたるまで、広範囲にわたって O139 コレラ菌が産生したと思われるファージ (podoviridae) が存在することや線維状ファージ fs1, fs2 が存在することはすでに環境株となった O139 コレラ菌が存在することを示唆している。

ベトナムで下痢の調査をする際には是非 O139 コレラ菌の抗血清、プライマーを準備することを勧める。今回のように分離されたコレラ菌が、*ctxA*, *toxR*, *O139* の 3 遺伝子を保有していた場合、その源は O139 コレラ菌に感染した患者だと思われる。環境水中に存在するいわゆる NAG ビブリオ (Non-O1, non-O139 *V. cholerae*) が O1 抗原、*ctxA*, *B* gene を horizontal gene transfer で獲得し、さらに線維状ファージ fs1, fs2 を獲得することが非病原株から流行株に移行することが示唆される。今後、コレラ患者の下痢検体中に線維状ファージ fs1, fs2 がすべてから検出されるか否か課題となろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ngo, T. C., Nguyen, D. T., Tran, H. H., Le, T. H., Nguyen, H. T., Diep, T. T.,

Nguyen T. P. L., Nguyen, B. M., Tran, N. D., Yamashiro, T., Morita, K.,

Nguyen, T. H., and Ehara, M. 2011. Imported dogs as possible vehicles of *Vibrio cholerae* O1 causing cholera outbreaks in northern Vietnam.

The Open Infectious Diseases
Journal, 5:127-134.

2. 学会発表

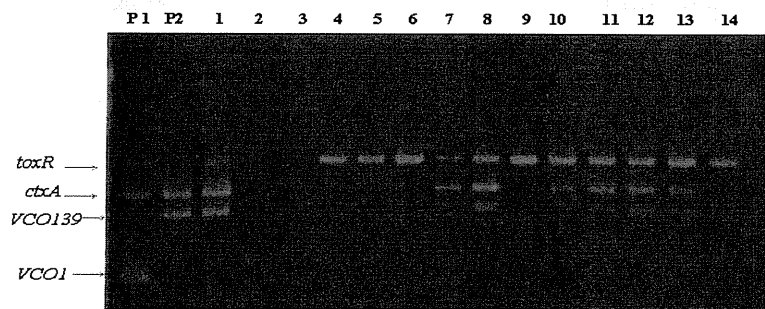
Nguyen, D. T., Iwami, M., and Ehara,
M. Integration of two types of
filamentous phages into the

chromosomal DNA of *Vibrio cholerae*
O1.

第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3
月 27-29 日 (長崎) で発表予定。

図 1.

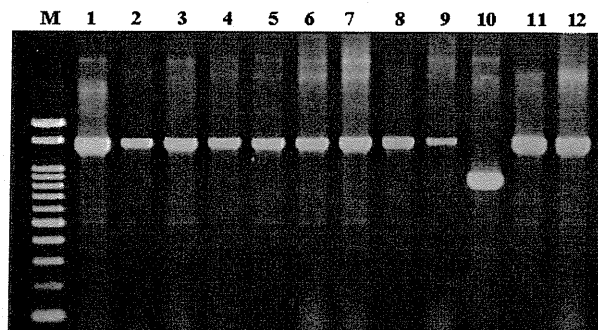
Multiplex PCR to detect *O1*, *O139*, *ctxA* genes in environmental water samples
in Nam Dinh Province in June 2010



Lanes: P1, P2; positive control for O1 (HN1), O139(AI4450) vibrios, 1; ice, 2; deep well (150 m in depth),
3; container for rain covered tightly, 4-14; samples from canal, river and pond

図 2

CTX cassette- typing of the environmental water samples by PCR
using RstB-IIIF and RstR-rev primers

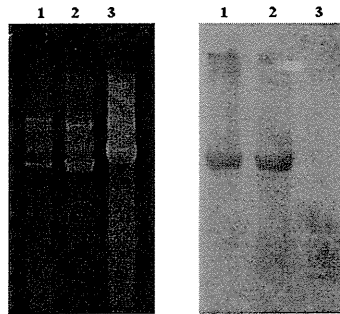


Lanes: M; 100 bp ladder DNA marker, 1; water sample No.1, 2 to 9; water sample No7 to 14,
10; a classical strain (Bgd17), 11, 12; an El tor strain (A107), strain AI4450 (*V. cholerae* O139),
respectively.

Note that all water samples show O139 or El Tor type CTX cassette.

☒ 3.

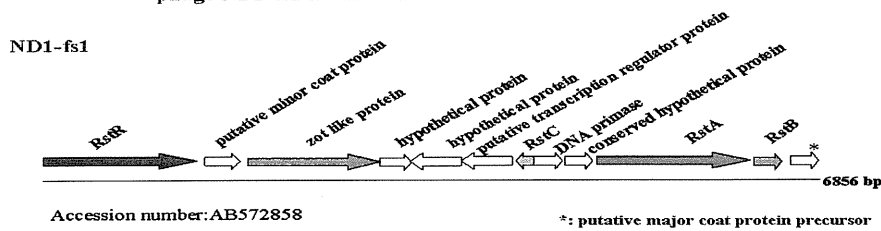
Southern blot analysis of RF-DNA from ND1 strain of *Vibrio cholerae* O139 probed with RF-DNA of fs1



Lanes:1; RF-DNA from *V. cholerae* O139, strain ND1, 2, 3;RF-DNA of filamentous phages, fs1 and fs2.

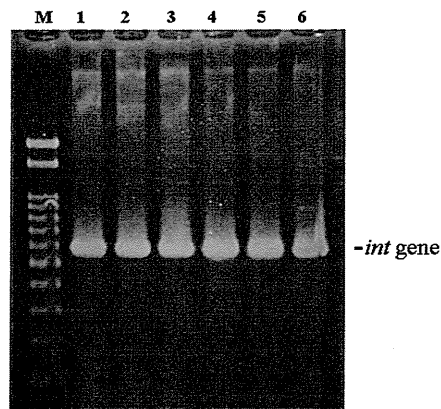
☒ 4

Genetic organization and ORF map of filamentous phage ND1-fs1 isoalted in Nam Dinh in 2010



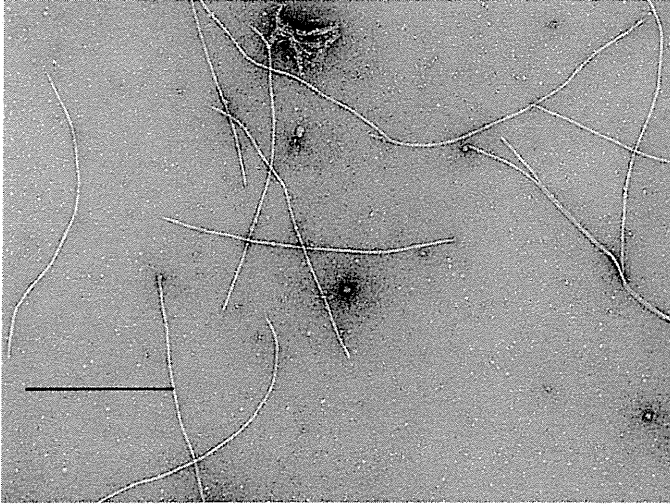
☒ 5

Detection of SXT mobile element in *Vibrio cholerae* O139 strain ND1 isolated in Vietnam in June 2010



Lanes: M; 100 bp ladder, 1; strain ND1, 2-6; VO18, SG20, MDO6, MDO9, MDO11, Respectively.

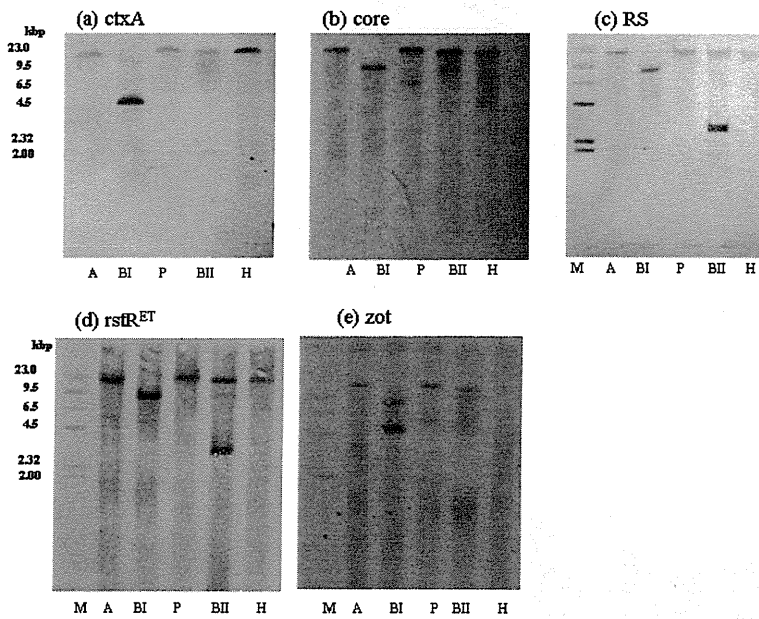
図 6



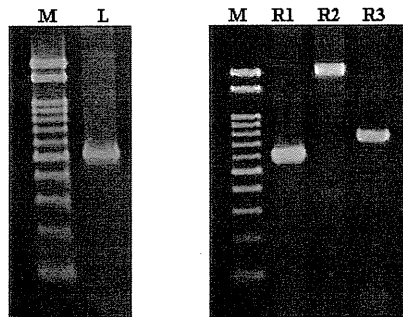
線維状ファージ ND1-fs1 の電顕写真 バーは 500 nm を示す

図 7

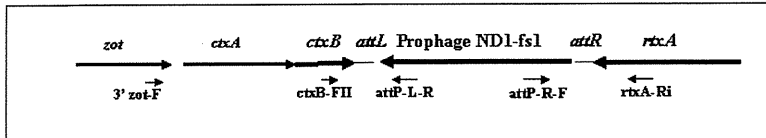
Results of Southern blot hybridization obtained with DNA from ND1 strain of *V. cholerae* O139 digested with restriction enzymes, *Ava*I, *Bgl*II, *Pst*I, *Bgl*III, and *Hind*III, and probed with (a) *ctxA*, (b) core, (c) RS, (d) *rstR*^{ET}, and (e) *zot*.



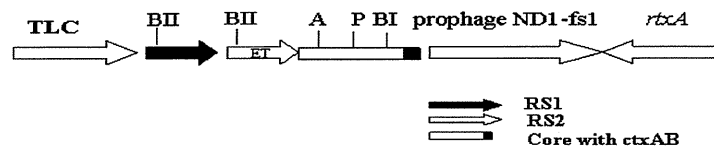
Determination of the left and right junction of the integrated filamentous phage ND1-fs1 by PCR



Lanes: M; marker DNA, 100 bp ladder, L, R1, R2, R3; PCR products obtained using *ctxB*-FII /attP-L-R (left junction), attP-R-F / *rtxA*-Ri (right junction), 3' *zot*-F / *rtxA*-Ri, and *ctxB*-FII/ *rtxA*-Ri primers (ND1-fs1 not integrated).



Schematic representation of genetic organization of CTXφ of *V. Cholerae* O139, strain ND1



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

下痢原性大腸菌に関するインド・韓国との共同疫学調査
研究分担者 西川 禎一 大阪市立大学教授

研究要旨：

下痢原性大腸菌（DEC）のコロニーを混在する非病原性の類似菌との確に識別し分離するための手法を開発した。疎水性格子膜を用いてコロニーハイブリダイゼーションを実施したところ、増菌後の培養液中に DEC が $10^3/\text{ml}$ 前後の低濃度で存在する場合でも分離が可能となった。先に報告したマルチプレックスリアルタイム PCR 法によるスクリーニングと併用すれば精度の高い疫学調査を行えることが、食品や糞便を用いた試験でも実証された。

A. 研究目的

大腸菌の多くは腸管内にとどまる限りにおいては病原性を発揮しない無害な常在菌である。しかしながら、一部の腸菌は特殊な病原性を有しており、人に下痢症を起こすので下痢原性大腸菌（**Diarrheagenic *Escherichia coli***、以後 DEC と略す）と呼ばれる。常在大腸菌との鑑別が煩雑なために検査の対象外としている臨床検査室がほとんどである。原因不明にされた食中毒事件の中には、未知の下痢原性大腸菌によるものもあったと考えられる。また、DEC は発展途上国において小児下痢症の主要な原因と推定されており、その予防策を講じるには汚染源や感染経路の特定が必須である。

DEC は、その病原機構に基づいて(1)腸管病原性大腸菌 (*Enteropathogenic E. coli*, EPEC)、(2)腸管毒素原性大腸菌 (*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)、(3)腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC)、(4)腸管侵入性大腸菌 (*Enteroinvasive E. coli*, EIEC)、以上の4群に古くから大別されており、その

下痢原性については専門家の間でも見解が一致しており、これらは定型的 DEC と言える。しかしながら、これらの他にも下痢の原因になる可能性が否定できないものとして、(5)腸管凝集接着性大腸菌 (*Enteroaggregative E. coli*, EAEC)、(6)分散接着性大腸菌 (*Diffusely adherent E. coli*, DAEC)、(7)腸管凝集接着性大腸菌耐熱性腸管毒素 (EAST1) 遺伝子保有大腸菌 (*Enteroaggregative E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*, EAST1EC)、(8)付着性侵入性大腸菌 (*Adherent-invasive E. coli*, AIEC)、(9)細胞剥脱性大腸菌 (*Cell-detaching E. coli*, CDEC)、などがある。これらの的確な検出は途上国のみならず先進各国においても困難なものとなっている。

共同研究者のいる韓国やインドにおいて検査員の技量に左右されることなく DEC を迅速的確に検出するため、先にマルチプレックスリアルタイム PCR 法 (RTi-PCR) を用いたスクリーニング法を開発した (Hidaka et al. J.

Appl. Microbiol. 2009;106:410-420.)。しかしながら、陽性と判定された検体から常在大腸菌に混在する DEC を識別分離することは極めて困難であった。そこでコロニーハイブリダイゼーション(CH)を適用した新たな分離方法の開発を試み、食品や糞便検体に応用してその有用性を評価した。

B. 研究方法

1) 供試菌株: EPEC E2348/69、ETEC H10407、EIEC E35990、EHEC V-122、V-424、V-687、EAEC E59152、EAST1EC V-96 および DAEC V-561、以上9株の DEC を実験に供した。

2) ジゴキシゲニン (DIG) 標識DNAプローブの合成: 各種DECの指標としてインチミン遺伝子(*eae*)、志賀毒素(*Stx*)遺伝子(*stx1* and *stx2*)、易熱性エンテロトキシン(LT)遺伝子(*elt*)、耐熱性エンテロトキシン(ST)遺伝子(*est*)、EAECの遺伝子(*aggR*)、EAST1の遺伝子(*astA*)、EIECの遺伝子(*virB*)、DAECの遺伝子(*afaB*) をPCR DIG Probe Synthesis kit (GEヘルスケア) を用いて増幅しプローブを作製した(表1)。

3) 疎水性格子膜 (HGMF) を用いた CHによるDEC分離方法の検討: 10^3 から最大 10^6 cfu/mlの大腸菌を含ませた希釈培養液1 mlを、HGMF Spreadfilter (Filtaflex Ltd, Almonte, ON, Canada) 上にセットしたHGMFに注ぎ、ピペットを用いてHGMF全体に広げた。その後、吸引によって培養液をろ過し、大腸菌をHGMF上に濾し取った。乳糖の代わりにスクロースを溶解したマッコスキー寒天培地にHGMFを載せ、37°Cで培養した。標的遺伝子を持っている株のコロニーと持っていない株のコロニーをスクロース発酵性の有無によって容易に識別できるように組み合わせ、CHを実施して本法の精度を試験した。

HGMFは1600の小区画に分けられているが、 10^6 cfu/mlの試料をろ過した場合、1つの区画には最大500 cfu以上の菌が分配されることになる。1区画

に陽性菌と陰性菌がどの程度の比率で存在すれば検出できるか予め確認するため、EPECと陰性菌としてDH5 α を1:1、1:5、1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000の割合で混合した菌液1 μ lを小区画に接種、培養後にCHを実施した。

4) CH: 培養後のHGMF (マスターメンブレン) に生じたコロニーは Microbial Colony Replicator (Filtaflex Ltd)を用いて新しいHGMFに移植し、トリプトソーヤ寒天平板上で37°Cで培養してレプリカを作製した。定法に従い、前処理液 (100 mM炭酸水素ナトリウム、5 mMリン酸ナトリウム、0.0066% polyethyleneimine [pH 6.0] を含ませた7 cm 角の濾紙 (Whatman 3MM) 上にHGMFを30分間載せ、コロニーをブロットした。10分間風乾してから溶解液(150 mM NaOH の70% エタノール溶液) を含ませた濾紙に載せ電子レンジで30秒間加熱した。その後、0.01% proteinase Kと0.1% SDSを溶解した20 mlの2 \times SSCと1時間以上37°Cで反応させた。その後、0.1% SDSを含む2 \times SSCで5分間、2 \times SSCで5分間洗浄、残渣をキムワイプで拭き取った。ブロット用紙上で水気を取り、30分間乾燥させてから120 mJの紫外線照射によりDNAをHGMFに固定した。

DIG標識したプローブとのハイブリダイゼーションはDIG Easy Hyb (GEヘルスケア)溶液中で、*astA*、*stx1*、*stx2*、*elt*は42°Cで、*eae*、*est*、*aggR*は39°C、*afaB*は45°C、*virB*は37°Cで実施した。CH陽性の小区画は、GEヘルスケアのDIG Wash and Block Buffer Set、anti-DIG antibody solutionおよび Detection Buffer supplemented with BCIP and NBT を使用した酵素抗体反応によって紫色に呈色させた。

5) 食品および糞便検体からの疎水性格子膜コロニーハイブリダイゼーション法 (HGMF-CH) によるDECの分離: 先に開発した方法 (Hidaka et al. J. Appl. Microbiol. 2009;106:410-420.) に基づき、食品や糞便の増菌培養液中のDECの有無をスクリーニングした。陽性と判定された菌液については、示されたDECの濃度に基づいて 10^3 - 10^6 にTween 80を1%含むPBSで希釈した。前述のように増菌培養液をHGMFで

濾した後、陽性および陰性対照菌をHGMPの角にある小区画にそれぞれ接種、トリプトソーヤ寒天平板上で37°Cで培養した後、上記の方法でCHに供した。CHで陽性反応を示した小区画に相当するマスターメンブレン上のコロニーを釣菌した。陽性反応が弱く、1小区画に陰性菌多数と混合状態でコロニーを形成していると判断された場合は、釣菌したコロニーをDHL寒天平板（ニッスイ製薬）などに画線培養し、再分離を試みた。

6) 培養法による分離：スクリーニングで陽性と判定された増菌培養液をDHL寒天平板に白金耳を用いて画線し37°Cで培養した。3-10個のコロニーをTSI半斜面培地に釣菌し、生化学的性状に基づいて同定した。病原遺伝子の有無はPCR法を用いて調べた。

C. 研究結果

1) HGMP-CHの確立

標的遺伝子の有無をスクロース分解性で識別できるように2種の大腸菌を組み合わせ、HGMP上にコロニーを形成させた。そのレプリカを用いてCHしたところ、正確に標的遺伝子陽性コロニーのみが紫に呈色することが確認された（図1）。陽性菌と陰性菌を1:500の比で混合した菌液1μlを各小区画にスポットした場合でも10区画のうち6区画で呈色反応が観察された。

2) HGMP-CHによる各種検体からのDEC分離

679件の各種検体（食肉80件、食品253件、家畜糞便227件、ヒト糞便119件）について調べたところ、47.9%にあたる325検体において1種以上のDECが含まれていることがRTi-PCRによって明らかとなり、延べ陽性検体数は615件となった（表2）。最も高率に検出されたのは*astA* (292/679, 43.0%)であり、次いで*eae* (184/679, 27.1%)であった。一方、EIECの指標とした*virB*は検出されなかった。

HGMP-CHを用いることでPCR陽性検体の72.5% (446/615) からDECを分離することができた。一方、従来の釣菌法では26.3% (162/615)の分離成功率にとどまった。表2に示した通り、

PCRによって測定された検体中のDEC菌数が高ければ高いほど分離成功率も高かった。例えば、EAST1ECやDAECはそれぞれ42.5% (124/292)と73.9% (17/23)の検体で 10^7 cfu/ml以上の濃度を示し、これらの検体では従来の釣菌法でもそれぞれ42%および35%の検体で分離に成功した。しかしながら、EHECやETECのように増菌培養液中の菌数が低値を示したDECではHGMP-CHの優位性が顕著であった。例えばETECは従来法では分離できなかったがHGMP-CHでは44%および67%の成功率で*est*および*elt*陽性菌を分離できた。

D. 考察

1996年の堺市でおきたEHEC O157による大規模集団食中毒事例以来、久しく一般市民には忘れられていた感のあるEHECであるが、2011年に富山県で起きたO111による死者4名を含む食中毒事件、そしてドイツを中心に欧米で発生したO104による集団感染事例は、EHECの恐ろしさを改めて知らしめるとともに、DECの汚染源調査がいかに難しいか明らかになった。本研究は、DEC全般の網羅的スクリーニング法として先に開発したマルチプレックスリアルタイムPCR法で陽性と判定された検体から確実にDECを分離する方法として、HGMPをCHに応用することを試みたものである。

通常のCHでは夥しい数の細菌コロニーがランダムにメンブレンに形成されるため、CHによって陽性コロニーが検出されても、これに相当するマスターメンブレン上のコロニーを特定し難いことが多かった。HGMPは40×40の小区画に整然とコロニーを形成させるため特定しやすく、また1つの検体で複数のDECが混在している場合でもMicrobial Colony Replicator (Filtaflex Ltd)を用いて必要な枚数のレプリカを容易に作製できるため便利である。実際、本法を用いて多数の検体からDECの分離に成功し、従来法に対する優越性が証明された。

HGMPには1600の小区画があるが2区画は陽性陰性対照として使用するため、残りの1598区画が検体用として用いられる。したがって、検体中の総菌数に対するDECの割合が1/1598より

も高いときには、1598 cfu以下の菌をHGMFに濾し取ることで理論上は1小区画あたり1cfuとなり、CHによって陽性と判定されたコロニーを釣菌すればDEC分離を全うできる。しかしながら、RTi-PCRによるスクリーニングでDECの割合が低く示された場合は、これに応じてHGMFに濾し取る菌数を多くせねばならない。

今回の実験で1小区画あたりの菌数がDECの500倍であっても検出できることが少なくなかった。1600区画のうち陽性対照と陰性対照に使用される2区画を除いた1598区画のそれぞれに500 cfuの陰性菌が濾し取られていたとして、そのいずれかの区画に1 cfuの陽性菌が存在すれば検出できる可能性が示された。したがって、HGMF 1枚あたりの総菌数(1598区画×500 cfu=8×10⁵ cfu/HGMF)の80万分の1の割合でDECが含まれていたとしても検出できることになり、増菌培養液中の総菌数が通常は10⁸から10⁹ cfu/mlあることからすると、RTi-PCRによるスクリーニングでDECの含量が10²から10³ cfu/mlと計測された場合でも分離できることを意味している。

Heikinheimoらもウェルシュ菌の分離にHGMF-CHを応用し、エンテロトキシン遺伝子陽性のウェルシュ菌の含まれる割合が6×10⁻⁵でも分離できたと報告しており本研究の感度と類似している (J. Clin. Microbiol. 2004;42:3992-7)。実際の調査においても、HGMF-CHを用いることで、PCRによってDECの含有が10³/ml程度と示された検体の17%で分離に成功した。ただし、DEC以外の多数の菌と混住してコロニーを形成しているような弱い呈色反応時には、コロニーを再分離してDECの純培養を得る必要がある。

次年度は、これらの分離菌株について分子疫学的手法を用いてその異同を検討し、各種DEC感染症における保菌動物としての家畜や人の役割を明らかにするとともに、共同研究先のインド南カシミール大学への本法の研修などを通じてDECの疫学情報の充実に寄与する予定である。

E. 結論

・DECが菌液中の総菌数の0.001%程度しか含まれていない場合でもHGMF-CHを用いれば的確に分離でき

る、先に開発報告したマルチプレックリアルタイムPCR法によるスクリーニングとの併用により効率よく高い精度で疫学調査を実施することが可能となった。

F. 健康危機情報

現時点ではなし。

G. 研究発表

1.論文発表

Wang, L., M. Wakushima, Y. Kamata, and Y. Nishikawa. 2011. Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 53:264-70.

2.学会発表

1. Wang, L., Wakushima, M., Nishikawa, Y., and Kamata, Y. (2011) Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among foods, domestic animals, and human: isolation by a colony-hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:60.

2. Nakashima, R., Nishikawa, Y., and Kamata, Y. (2011) Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) and guanylin on barrier integrity in intestinal epithelial cells. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:72.

3. Tanimoto, Y., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. (2011) Comparison of abilities to induce IL-8 secretion on Caco-2 cells of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients and healthy carriers. ECMIS 2011 *E. coli* and the Mucosal

Immune System, Ghent, Belgium, Abstract:72.

4. Tanimoto, Y., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. (2011) Abilities to induce IL-8 secretion on Caco-2 cells of diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients and healthy carriers. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology/XIII International Congress of Mycology, Sapporo Convention Center, Abstract:237.

5. Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. (2011) Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among foods, domestic animals, and human: isolation by a colony-hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 46th Conference, Kolkata, India, Abstract:159-164.

6. 中島 涼、西川禎一、鎌田洋一。T84 細胞における大腸菌耐熱性エンテロトキシン(STa)と Guanylin の影響、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.33

7. 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一。下痢症患者および健康者に由来する分散接着性大腸菌の腸粘膜上皮細胞に対する炎症性サイトカイン誘導性、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.34

8. Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., and Nishikawa, Y. Prevalence and properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from foods and faecal specimens of pigs, cattle, and healthy humans. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会、平成 23 年 11 月 19 日 大阪 p.20.

9. 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一。下痢症患者および健康者から分離された分散接着性大腸菌の腸粘膜上皮細胞に対する炎症性サイトカイン誘導の比較、第 32 回日本食品微生物学会学術総会、平成 23 年 10 月 6-7 日 東京 p.30

10. 谷本佳彦、有川健太郎、西川禎一。下痢症患者および健康者から分離された分散接着性大腸菌の Caco-2 細胞に対する IL-8 誘導性、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、平成 23 年 5 月 13-15 日 東京 p.107

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
特願 2007-131077 「下痢原性大腸菌検出方法」 発明者：西川禎一、権利者：公立大学法人大阪市立大学、株式会社KAL S、株式会社三共刃型工業 出願年月日：平 19 年（2007 年） 5 月 16 日

表 1. ジゴキシゲニン標識 DNA プローブの作製に用いた PCR プライマー

標的遺伝子	プライマー	Genbank accession no.	プライマー塩基配列(5'-3')	PCR 産物 サイズ(bp)	増幅位置	アニーリング 温度 (°C)
<i>astA</i>	astA61-f astA171-r	L11241	ATGCCATCAACACAGTATATCCG CGCGAGTGACGGCTTTGTA	111	61-83 153-171	53
<i>eae</i>	eae-f eae-r	AF200363	CCGATTCCTCTGGTGACGA CCACGGTTTATCAAACCTGATAACG	105	1141-1159 1222-1245	61
<i>stx1</i>	Stx1-414F Stx1-545R	M16625	ACTTCTCGACTGCAAAGACGTATG ACAAATTATCCCCTGAGCCACTATC	132	414-437 521-545	55
<i>stx2</i>	H•Stx2-f H•Stx2-r	X07865	CCACATCGGTGTCTGTTATTAACC GGTCAAAACGCGCCTGATAG	93	408-431 481-500	58
<i>est</i>	St.2-f St.2-r	M25607	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAGTC CCAGCACAGGCAGGATTAC	170		55
<i>elt</i>	Lt.2-f Lt.2-r	M15362	TCTCTATGTGCACACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322		55
<i>afaB</i>	afaB49-f afaB160-r	AF329316	GTCTCCCTGAATGTACAGCTTTCA CCCTCTGCCACTCCACCTT	112	1645-4668 1738-1756	64
<i>aggR</i>	aggR-3 aggRks-1	AF411067	CATCTCTTTGATAAGTCCTTCTCG GTATACACAAAAGAAGGAAGC	434	10694-10717 11107-11127	55
<i>virB</i>	virB-f virB-r	AF283289	GGATTTGTGCAACGACTTGTTAAG GAGGAATCTTGGCTTTGATAAAGG	101	6-29 83-106	55

表 2. 食品、家畜および人糞便検体の増菌培養液中における各種 DEC の菌数別にみた分離成功率

RTi-PCR が示した DEC の菌数*	EAST1EC	EPEC	STEC		ETEC		DAEC	EAEC	DEC
	<i>astA</i>	<i>eae</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>elt</i>	<i>est</i>	<i>afaB</i>	<i>aggR</i>	
HGMF-CH									
10 ⁸	36/36 [†] 100.0%	4/4 100.0%	nd	2/2 100.0%	nd	nd	13/13 100.0%	nd	55/55 100.0%
10 ⁷	87/88 98.9%	20/22 90.9%	3/3 100.0%	5/5 100.0%	1/1 100.0%	nd	4/4 100.0%	1/1 100.0%	121/124 97.6%
10 ⁶	85/88 96.6%	34/40 85.0%	8/9 88.9%	12/17 70.6%	1/1 100.0%	2/4 50.0%	1/1 100.0%	1/2 50.0%	144/162 88.9%
10 ⁵	40/49 81.6%	33/63 52.4%	11/17 64.7%	5/20 25.0%	1/1 100.0%	2/4 50.0%	nd	nd	92/154 59.7%
10 ⁴	10/29 34.5%	16/43 37.2%	2/12 16.7%	1/8 12.5%	1/3 33.3%	0/1 0.0%	1/5 20.0%	0/1 0.0%	31/102 30.4%
10 ³	0/2 0.0%	2/12 16.7%	1/3 33.3%	0/1 0.0%	nd	nd	nd	nd	3/18 16.7%
Total	258/292 88.4%	109/184 59.2%	25/44 56.8%	25/53 47.2%	4/6 66.7%	4/9 44.4%	19/23 82.6%	2/4 50.0%	446/615 72.5%

従来法 Total	122/292 41.8%	26/184 14.1%	1/44 2.3%	4/53 7.5%	0/6 0.0%	0/9 0.0%	8/23 34.8%	1/4 25.0%	162/615 26.3%

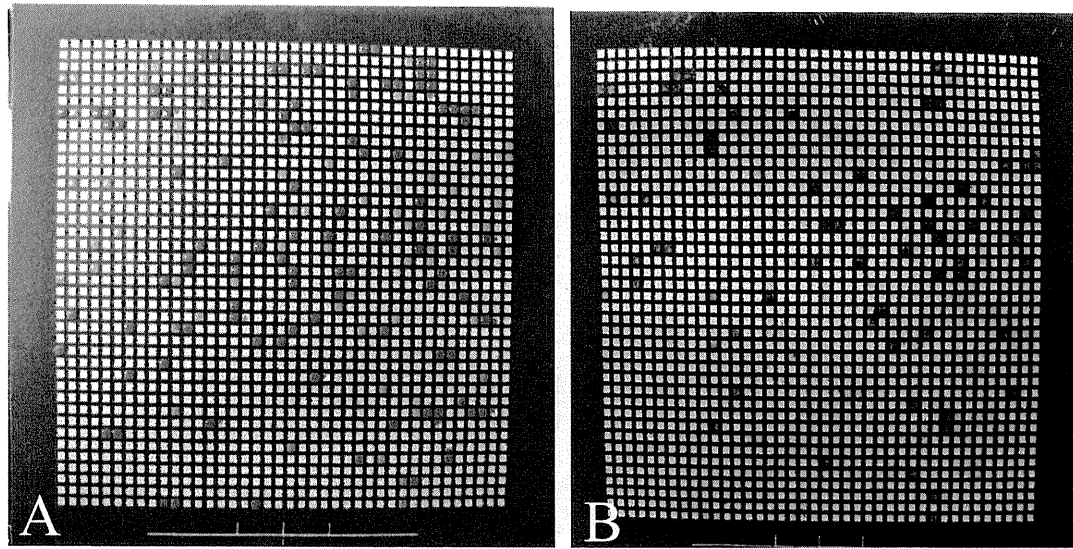


図1. HGMF マスターメンブレン上のコロニー(A)およびハイブリダイゼーション用のレプリカ (B)。

(A) スクロース非分解の DAEC V-561 株 (*afaB*+)は、スクロース分解性の EHEC V-122 株と容易に識別される。

(B) *afaB* の DNA プロブとハイブリダイゼーション後は、DAEC コロニーのみが呈色している。

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

インドネシア環境水より分離されたコレラ毒素遺伝子保有
非コレラ菌株に関する研究

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

PMT 寒天培地上で *V. cholerae* 様の性状を示すインドネシアの環境水由来の菌に対し、コレラ毒素遺伝子 (*ctxAB*) を標的とした Primary-PCR、Nested-PCR を行ったところ、7 株で約 1kb の PCR 産物が得られた。*ctxAB* の塩基配列を解析したところ、3 株が Classical 型、4 株が El Tor 型のコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) を保有し、コレラ毒素 A サブユニット (*ctxA*) の配列に関してはいずれも共通の配列を保有していた。7 株は Ribosomal DNA の塩基配列解析より、1 株が *V. cholerae*、3 株が *V. cholerae* とは異なる種の *Vibrio* 属菌、3 株が *Aeromonas* 属菌と同定された。これらの所見より、コレラ毒素を保有するバクテリアオファージが種や属を越えて水平伝播することが示唆された。

A. 研究目的

コレラの流行は、現在までに 7 回の世界的流行が報告されている腸管感染症である。7 回目の世界的流行より、ポリミキシン B 耐性能などを持ち、Classical 型よりも生残性が高いとされる El Tor 型 *V. cholerae* が出現した (HAN & KHIE, Am. J. Hyg. 77, 184-6 [1963])。現在、世界中に流行している El Tor 型 *V. cholerae* が出現した 7 回目の世界的流行の“発祥地”とされるインドネシアの環境水から菌を採取し、今後、コレラを引き起こす可能性を持つ新たな生物型の *V. cholerae* の検出を試みた。

コレラを引き起こす要因となる病原関連因子は数多く存在するが、その中で最も主要なものはコレラ毒素とされている。そのコレラ毒素は A サブユニット、B サブユニットの 2 つに分かれており、各々 *ctxA*、*ctxB* にコードさ

れている。コレラを引き起こす可能性を持つ菌を検出することが目的であるため、まず始めに、*ctxA*、*ctxB* の保有を PCR により検証した。

コレラ毒素に関して、*ctxB* における変異から現在 3 つの多型が存在しているということが報告されている (Olsvik et al., J. Clin. Microbiol. 31, 22-5 [1993])。この *ctxB* の塩基配列は宿主細胞への結合性に関与し、毒性に大きく影響するため、塩基配列を解析することは非常に重要なことである。本実験の供試菌株は環境株であるため、新たな変異を有する毒素遺伝子検出の可能性を考えた。そこで、*ctxA* と *ctxB* (*ctxAB*) を包括的に標的とした PCR において明瞭なバンドを得ることが出来た環境由来株については、その *ctxB* ならびに *ctxA* の塩基配列を解析し、新たな多型遺伝子の検出を試みた。さらに、*ctxAB* を保有して

いた菌株について、ribosomal DNA の塩基配列に基づく菌種同定および生化学的性状に基づく菌種同定を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株

2010年3月および2011年5月にインドネシアのスラバヤ市やバリ島より環境水を採取し、アルカリペプトン水（関東化学，東京）で暗所にて、30℃、24時間、好気条件下の培養条件で増菌培養を行った。この培養条件は水生環境に近い環境に揃えるためである。分離培養においては、ポリミキシンBや亜テルル酸カリウムによって、El Tor型 *V. cholerae* が選択的に発育する PMT 寒天培地（日水製薬，東京）(Shimada et al., Jpn. J. Med. Sci. Biol., 43, 37-41 [1990]) を用い、増菌培養時と同様の培養条件にて培養した。培養後、同平板において *V. cholerae* と同定された株に類似したコロニー性状を示す黄色のくすんだコロニーを釣菌した。2010年3月の環境水からは37株、2011年5月の環境水からは28株を釣菌し、計65株を供試菌株とした。

2) DNA 抽出、精製

供試菌株からの DNA 抽出は The Illustra Bacteria GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) を用い、方法は製品説明書のプロトコルに従って以下の手順で行った。

アルカリペプトン水で暗所にて、30℃、24時間、好気条件下で培養後、培養液1mlをマイクロチューブに移し、卓上遠心機 Mini spin (Eppendorf, Hamburg, Germany) による遠心分離 (16,000 ×g, 30秒間) で菌体を回収

した。上清除去後、Lysis buffer type 2 (GE healthcare) を40μl、20mg/ml に調整した Proteinase K (GE healthcare) を10μl、Lysis buffer type 3 (GE Healthcare) を10μl 加え、10秒間攪拌後、遠心 (1,000 ×g, 5秒間) を行った。55℃、7分間のインキュベート後、攪拌、遠心 (1,000 ×g, 5秒間)、更に55℃、8分間のインキュベートを行った。遠心 (1,000 ×g, 5秒間) 後、20mg/ml に調製した RNase (和光純薬、日本) を5μl加え、遠心 (1,000 ×g, 5秒間) を行った。室温で15分間のインキュベート後、500μl の Lysis buffer type 4 (GE healthcare Japan) を加え、10秒間攪拌した。室温で5分間インキュベート後、攪拌、遠心 (1,000 ×g, 5秒間) を行い、更に室温で5分間のインキュベートを行った。illustra bacteria mini column (GE Healthcare) を collection tube (GE Healthcare) にセットし、混合液を column に移した。遠心分離 (11,000 ×g, 1分間) 後、collection tube 内の溶液を捨て column を再びセットした。500μl の Lysis buffer type 4 (GE Healthcare) を添加し、遠心分離 (11,000 ×g, 1分間) 後、collection tube 内の溶液を捨て、500μl の Wash buffer type 6 (GE Healthcare) を加え、遠心分離 (16,000 ×g, 3分間) した。column を DNase free の 1.5ml マイクロチューブ (Eppendorf Japan) にセットし、事前に70℃に温めておいた Elution buffer type 5 (GE healthcare Japan) を加え、室温で1分間のインキュベート後、遠心分離 (11,000 ×g, 1分間) しゲノムDNAを溶出した。純度が 0. D. 260 / 0. D. 280 = 1.8~2.0 のDNAを、PCR のために 10ng/μl の濃度に調節

した。

3) *ctxA*, *ctxB* を標的としたプライマーの設計、PCR 条件の設定

ctxA に関するプライマーは Fields ら (Fields et al., J. Clin. Microbiol., 30, 2118-21 [1992]) が設計したものを使用した。また、*ctxB* に関しては、全塩基配列解析株である N16961 (El Tor 型 *V. cholerae*, *ctxAB* positive [El Tor 型]) の配列を基にプライマーセットを設計した。プライマーの配列、PCR のアニーリング温度、伸長時間、サイクル数の設定は表 1 に示す。図 1 に示す様に、この際用いたプライマーはいずれも各 ORF の内側に接着するように設計している。また、コントロールに関しては、N16961 (*ctxAB* positive)、KVC88008 (El Tor 型 *V. cholerae*, *ctxAB* negative) の DNA を用いた。PCR 反応液は全容量を $10\ \mu\text{l}$ とし、サンプル DNA $1\ \mu\text{l}$ 、各プライマー ($10\ \mu\text{M}$) $0.25\ \mu\text{l}$ ずつ、dNTP (2.5mM 、タカラバイオ、日本) $0.8\ \mu\text{l}$ 、 $10\times\text{Ex Taq Buffer}$ (タカラバイオ) $1\ \mu\text{l}$ 、Takara Ex Taq (タカラバイオ) $0.05\ \mu\text{l}$ となるよう調整し、GeneAmp PCR system 2700 thermalcycler (Applied Biosystems, California, USA) を用いて PCR 反応を行った。各プライマーに対し最適アニーリング温度、伸長時間、サイクル数を設定した。反応後、PCR 産物 $3\ \mu\text{l}$ を $1\times\text{Tris-Borate-EDTA}$ (TBE) buffer に溶かした 1.5% Agarose L003 (タカラバイオ) を用い、電気泳動装置 Mupid-2plus (アドバンス、日本) にて 100V 定電圧で 25 分間、電気泳動を行った。泳動バッファーは $1\times\text{TBE buffer}$ 、サイズマーカーは $1\text{kb PLUS DNA LADDER}$ (Invitrogen) を用いた。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマ

イド溶液 ($1\ \mu\text{g/ml}$) で 15 分間染色、蒸留水で 10 分間脱色し、UV 照射下で DNA 増幅を確認した。

4) Nested-PCR の実施、*ctxAB* を標的とした PCR

ctxA, *ctxB* 各々を標的とした PCR において、ポジティブコントロールよりもシグナルが弱い、あるいはバンドが検出されなかった菌株に関しては、上述のプライマーより内側の位置に更にプライマーを作成し、Nested-PCR を行った。テンプレート DNA としては、PCR 産物を 50 倍希釈したものを $1\ \mu\text{l}$ 用い、全 $10\ \mu\text{l}$ の PCR 反応液を上記の 3) と同様の組成で作成した。最適アニーリング温度、伸長時間、サイクル数の設定は同様に表 1 にて示す。*ctxA* を標的とした Nested-PCR まで行い、明瞭なバンドを得られたもの株のみ、*ctxB* の保有を検証した。

2 度の PCR を各々区別するため、以下、1 度目の PCR を「Primary-PCR」、2 度目の PCR を「Nested-PCR」とする。

更に、*ctxA*, *ctxB* を標的とし、Nested-PCR まで行い、明瞭なバンドを得ることが出来た株については、プライマーを組み合わせ、*ctxAB* を標的とした Nested-PCR を行った (図 1)。

5) *ctxAB* の配列解析

ctxAB を標的とした Nested-PCR で明瞭なバンドを得ることが出来た株については、PCR 産物の配列解析を行った。配列解析においては、Nested-PCR に用いたプライマーを使用した。

始めに、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) $20\ \mu\text{l}$ 、 $5\times\text{ABI dilution buffer}$ $30\ \mu\text{l}$ 、超純水 $10\ \mu\text{l}$ を混合した。この溶液 $4\ \mu\text{l}$ に PCR 産物を $1\ \mu\text{l}$ 、プライマー ($1\ \text{pmol}/\mu\text{l}$) を $1.6\ \mu\text{l}$ 、超純水を加えて全容量を

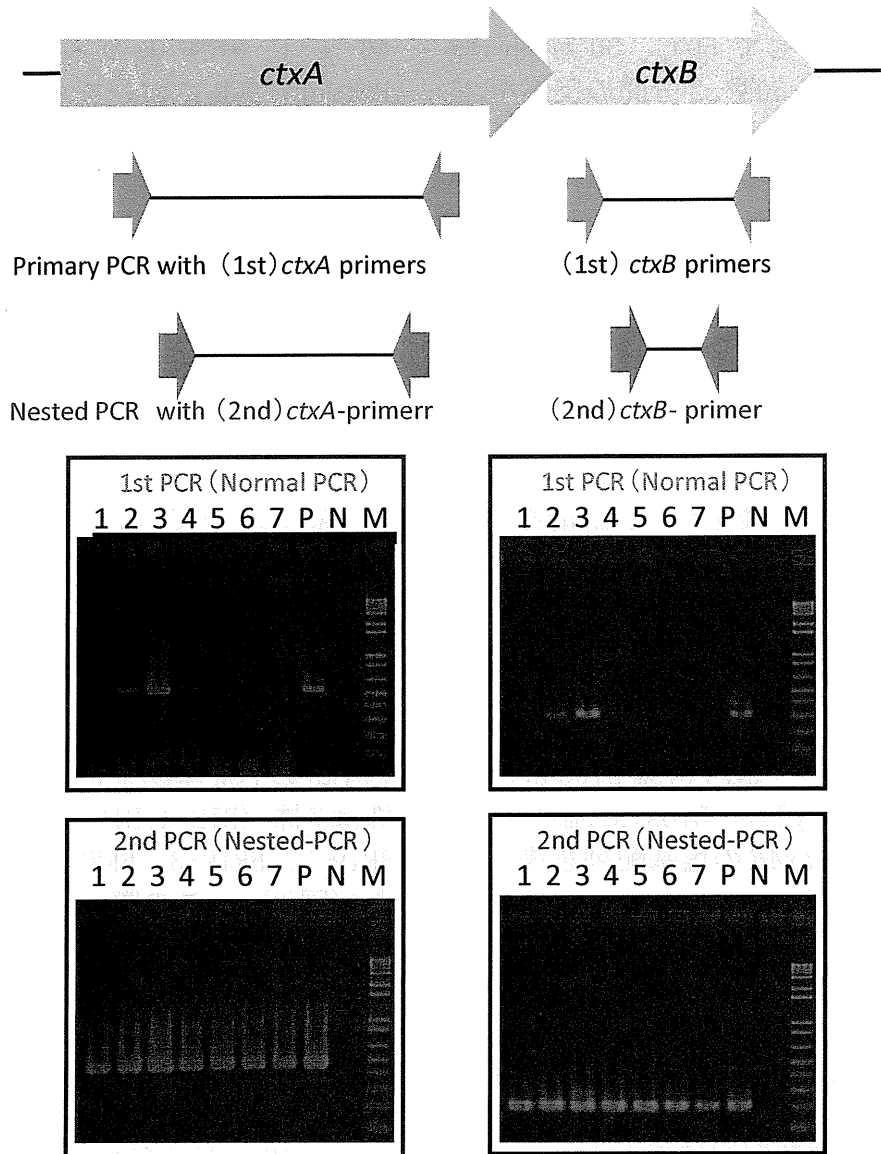


図1 プライマー接着部位とPCR画像 (*ctxA*、*ctxB*)

1:BI2-4, 2:BI3-4, 3:BI4-1, 4:BI7-3, 5:BR19-2, 6:BR19-3, 7:BR29-1
 P:N16961 [El Tor *ctxAB* positive], N:KVC88008 [*ctxAB* negative],
 M:1kb marker

10 μ l とし、シーケンス反応を行った。反応はまず、96°C で 1 分間熱変性を行い、その後 2 本鎖 DNA の熱変性として 94°C、10 分間、プライマーのアニーリングとして 50°C、30 秒間、伸長反応として 60°C、2 分間の反応を 25 サイクル繰り返した。反応後、反応液が入ったマイクロチューブに、3M 酢酸ナトリウム：100% エタノール：超純水 = 30：600：180 の割合で混合した溶液 40 μ l を加えて混和し、15 分間室温で放置した。その後、卓上遠心機 Mini spin で 13,000 rpm、20 分間遠心分離を行い、上清を捨て、75% エタノール 50 μ l を加えた。13,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を捨てた後、減圧乾燥器にて乾燥させた。乾燥後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) 20 μ l に溶解し、これをシーケンス解析用のサンプルとした。シーケンスサンプルをオートシーケンサー (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) により解析し、*ctxAB* の塩基配列を決定した。

6) 16S rDNA 配列解析

上記の試験により *ctxAB* を有することが確認された菌株について Bacterial 16S rDNA PCR Kit (Takara) を用い、供菌株における約 1,500bp の 16S rDNA の塩基配列解析を行った。解析結果を BLAST (NCBI) に入れ、菌種同定を行った。また、*V. cholerae* に類似したコロニー性状を示す株を選抜しているため、全塩基配列解析株である *V. cholerae* O1 El Tor N16961 の 16S rDNA の塩基配列と比較した。

C. 研究結果

1) PCR 結果と菌株選抜

PMT 寒天培地上において *V.*

cholerae 様のくすんだ黄色のコロニーを示す株から抽出した DNA をテンプレートとして、まず *ctxA* を標的とした Primary-PCR、Nested-PCR を行った。図 1 に示すように BI4-1 は、Primary-PCR においてもポジティブコントロールと比較しても明瞭なバンドが得られている一方、BI2-4 や BI3-4 などは、同サイズではあるが、不明瞭なバンドしか得ることが出来なかった。Primary-PCR の PCR 産物をテンプレートとして Nested-PCR を行った所、ポジティブコントロールと同様の明瞭なバンドを得ることが出来た株が 65 株中 53 株であった。さらに、この 53 株において *ctxB* を標的とした Primary-PCR、Nested-PCR を行ったところ、26 株で明瞭なバンドが得られた。このプライマーを組み合わせ、26 株に対して *ctxAB* を標的とした Primary-PCR、Nested-PCR を行った所、約 1kb の PCR 産物を得ることが出来た株は 7 株 (BI2-4、BI3-4、BI4-1、BI7-3、BR19-2、BR19-3、BR29-1) のみであった (図 2)。この際、ネガティブコントロールとして用いた KVC88008 (*ctxAB* negative *V. cholerae*) に関しては、Primary-PCR、Nested-PCR において全くバンドは出現しなかった (図 1, 2)。

2) *ctxAB* の配列解析

ctxAB を標的とした Nested-PCR を行い、約 1kb の明瞭なバンドを得ることが出来た 7 株に関しては、*ctxAB* の塩基配列解析を行った。図 3 に示されるように、7 株のうち、3 株の *ctxB* は Classical 型、4 株の *ctxB* は El Tor 型の配列を保有していた。また、に示すように *ctxA* の配列に関しては、新たな変異を保有するものは存在せず、7 株ともに共通の配列であった。

