

表3) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況

Prefecture	Samples (Tested)	Positive		Prefecture	Samples (Tested)	Positive				
		No.	(%)			No.	(%)			
Hokkaido	35	1	2.9	Gifu	36	3	8.3			
Aomori	23	0	0.0	Shizuoka	46	1	2.2			
Iwate	16	0	0.0	Aichi	15	0	0.0			
Miyagi	28	0	0.0	Mie	56	0	0.0			
Akita	9	0	0.0	Shiga	5	0	0.0			
Yamagata	20	3	15.0	Hiroshima	47	0	0.0			
Fukushima	16	1	6.3	Kagawa	8	0	0.0			
Tochigi	603	38	6.3	Kochi	10	0	0.0			
Tokyo	605	48	7.9	Nagasaki	20	0	0.0			
Kanagawa	479	12	2.5	Kumamoto	20	0	0.0			
Niigata	24	2	8.3	Miyazaki	20	1	5.0			
Toyama	9	0	0.0	Kagoshima	110	2	1.8			
Nagano	23	1	4.3	Okinawa	35	2	5.7			
Tochigi: 2003-2005, 2012 (in animal care center)				Total				2318	115	5.0
Tokyo: 2007-2013 (in animal care center)				Kanagawa: 2003-2006 (in animal care center)						
				Others: 2009-2013 (hunting dogs)						

表4) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況の経年変化

Tokyo: Dog				Cat		
Year	Samples (Tested)	Positive		Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)		No.	(%)
2007	50	5	10.0	-	-	-
2008	89	12	13.5	98	1	1.0
2009	106	9	8.5	102	0	0.0
2010	70	6	8.6	80	1	1.3
2011	125	7	5.6	-	-	-
2012	113	6	5.3	-	-	-
2013	52	3	5.8	-	-	-
Total	605	48	7.9	280	2	0.7

Tochigi: Dog			
Year	Samples (Tested)	Positive	
		No.	(%)
2002	245	18	7.3
2003	64	5	7.8
2004	99	7	7.1
2005	130	7	5.4
2012	65	1	1.5
Total	603	38	6.3

表 5) Imported brucellosis cases in Taiwan after unseen for 33 years

Year	Age	sex	Disease onset	Symptoms	Confirmed date	Affected region	Infection route
2011	54	F	24-Apr	fever, abnormal liver function	17-May	Morocco, Algeria	raw meat, dairy products
2011	72	F	April (2010)	fever, spinal pain	24-May	Malaysia	goat's milk
2011	59	F	28-Apr	fatigue	5-Jul	Malaysia	goat's milk
2011	28	M	30-Aug	fever	14-Sep	Malaysia	goat's milk
2011	58	M	19-Jul	fever sweating	21-Oct	China	unknown

by Taiwan CDC

表 6) Notifiable Infectious Diseases in Taiwan

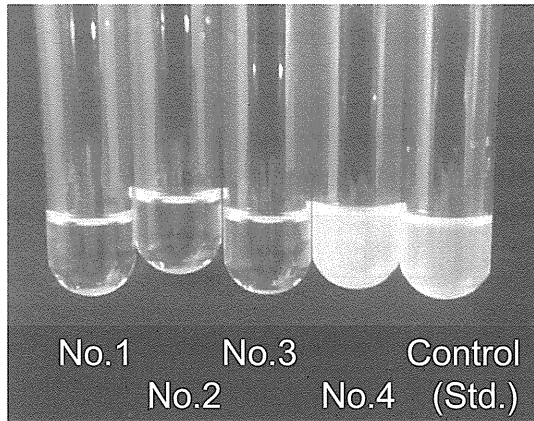
Classification	Infectious Diseases
Category I	Anthrax
	Plague
	SARS
Category II	Acute Flaccid Paralysis and Poliomyelitis
	Amoebiasis
	Cholera
	Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome
	Enterohemorrhagic E. coli Infection
	Hantavirus Pulmonary Syndrome
	Malaria
	Meningococcal Meningitis
	Paratyphoid Fever
	Rubella
Typhoid fever	
Category III	Acute Viral Hepatitis type B
	Acute Viral Hepatitis type D
	Acute Viral Hepatitis untype
	Congenital Rubella Syndrome
	Gonorrhea
	Hansen's Disease
	Japanese Encephalitis
	Mumps
	Pertussis
	Tetanus
Category IV	Botulism
	Cat-scratch Fever
	Creutzfeldt-Jakob Disease
	Herpesvirus B Infection
	Leptospirosis
	Melioidosis
	Q Fever
	Toxoplasmosis
	Varicella
Category V	Ebola Hemorrhagic Fever
	Marburg Hemorrhagic Fever
	Yellow Fever
	H5N1 Influenza
	Rabies
	Smallpox
	Acute Viral Hepatitis type A
	Chikungunya Fever
	Dengue Fever
	Diphtheria
	Epidemic Typhus Fever
	Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome
	Measles
	Multi-drug Resistant Tuberculosis
	Poliomyelitis
	Shigellosis
	West Nile Fever
	Acute Viral Hepatitis type C
	Acute Viral Hepatitis type E
	AIDS
	Enteroviruses Infection with Severe Complications
	Invasive Haemophilus Influenzae Type B Infection
	HIV Infection
	Legionellosis
	Neonatal Tetanus
	Syphilis
	Tuberculosis
	Brucellosis
	Complicated Influenza
	Endemic Typhus Fever
	Invasive Pneumococcal Disease
	Lyme Disease
	New Delhi metallo- β -lactamase -1 Enterobacteriaceae
	Scrub Typhus
	Tularremia
	Lassa Fever
	Rift Valley Fever

Conduct based on the "Communicable Disease Control Act" amended and promulgated on July 18, 2007, and the "Category 4 and Category 5 Communicable Diseases Preventive and Control Measures" announced on October 9, 2007.

図1) 台湾 CDC での試験管凝集反応 (TAT) による家畜ブルセラ菌特異的抗体の検出

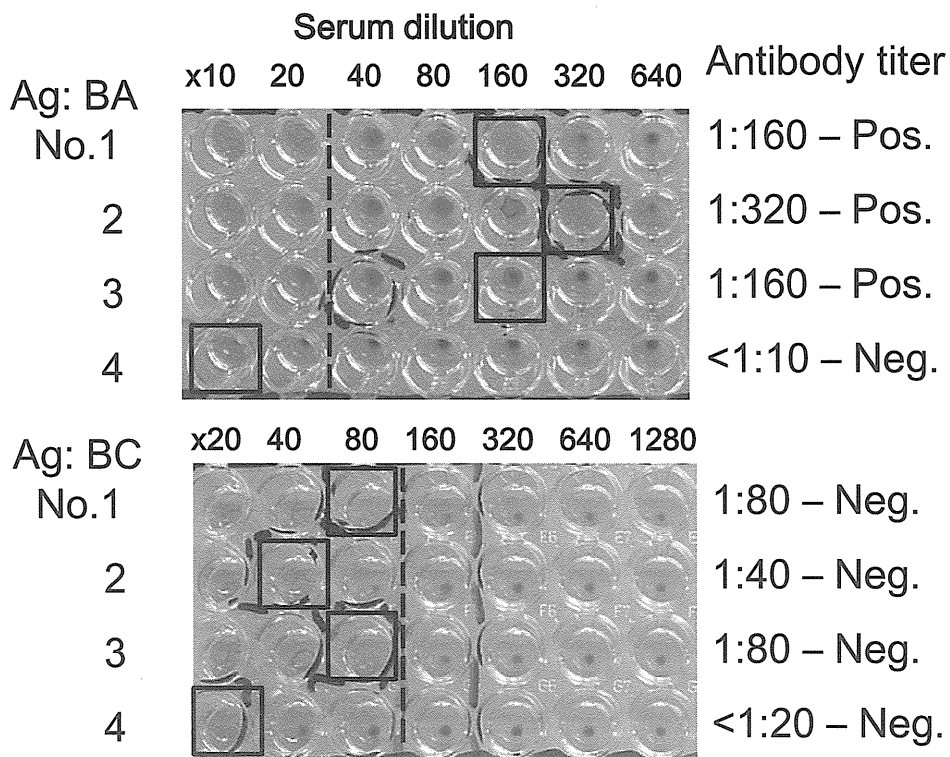
Samples : Brucellosis patients 3 (No.1-3)
 Suspected 1 (No.4)
 Ag : *B. abortus*

Serum dilution = 1:40



Results :
 No.1 Pos.
 No.2 Pos.
 No.3 Pos.
 No.4 Neg.

図2) 台湾 CDC でのマイクロプレート凝集反応 (MAT) による抗ブルセラ属菌抗体の検出



BA : 使用抗原 *B. abortus*、1:40 以上が陽性

BC : *B. canis*、1:160 以上が陽性

図3) 国内のイヌにおける *B. canis* 遺伝子の検出

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca
D1	<×10 (-)						
D2	×20 (-)			+		+	+
D3	×320 (+)	+	+			+	
D4	×10 (-)						
D5	×10 (-)						
D6	×10 (-)						
D7	<×10 (-)						
D8	×10 (-)						
D9	<×10 (-)						
D10	×10 (-)						
D11	×640 (+)	+	+	+			
D12	×20 (-)						
D13	<×10 (-)						
D14	<×10 (-)						
D15	×10 (-)	+		+			
D16	×10 (-)						
D17	<×10 (-)						
D18	<×10 (-)						
D19	×10 (-)						
D20	×10 (-)						

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca
D21	×10 (-)						
D22	<×10 (-)						
D23	×10 (-)			+			
D24	×10 (-)						
D25	×10 (-)						
D26	<×10 (-)						
D27	×10 (-)						
D28	×10 (-)						
D29	<×10 (-)						
D30	×40 (-)						
D31	×10 (-)						
D32	×10 (-)	+					
D33	×10 (-)						
D34	×20 (-)						
D35	×10 (-)						
D36	×10 (-)						
D37	<×10 (-)						
D38	≥×1280 (+)					+	
D39	×10 (-)						
D40	×10 (-)						

No.	Anti-BC Ab	Real-time PCR					
		Urine		Urethra swab		Serum	
		bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca	bosp31	omp2ca
D41	<×10 (-)						
D42	<×10 (-)						
D43	<×10 (-)						
D44	<×10 (-)						
D45	<×10 (-)						
D46	<×10 (-)			+	+		
D47	<×10 (-)			+		+	
D48	<×10 (-)						
D49	<×10 (-)						
D50	<×10 (-)						
D51	<×10 (-)						
D52	<×10 (-)						
D53	nt						
D54	nt						
D55	nt						
D56	nt						
D57	nt						
D58	nt						

台湾および日本の蚊相の違いと蚊によって媒介される病原体の遺伝的關係
蚊相ならびに採集蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

研究分担者	津田良夫	国立感染症研究所
研究協力者	金 京純	鳥取大学農学部
	鄧 華眞	台湾 CDC
	陳 典煌	台湾 CDC

蚊媒介性病原体の自然の侵入経路のひとつとして、渡り鳥による持ち込み（侵入）・定着に関する検討を行った。野鳥由来の蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫に着目して、台湾と石垣島の調査地で蚊を採集し、蚊からの鳥マラリア原虫の検出を行った。台湾の調査地では2011年～2013年に、20種類13,373個体、石垣島では24種類7,499個体の蚊成虫を採集した。これらの蚊サンプルから、チトクロームb遺伝子をターゲットとしたPCR法によって鳥マラリア原虫の検出を行った。その結果、台湾で採集された20種の蚊のうち、9種類の蚊から鳥マラリア原虫が検出された。検出された鳥マラリア原虫は、チトクロームb遺伝子の塩基配列の相同性によって9つの遺伝的系統に分類された。このうち3つの系統は3年連続して原虫が検出されており、調査地に生息するクシヒゲカ的一种と*Cx. murrelli*などの蚊によって感染サイクルが維持されていると推測された。これに対して、これら3系統以外の系統は、いずれも3年間の調査で1回しか検出されておらず、感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生息していた蚊の吸血を通じて一時的に取り込まれた系統であると推測された。本研究の調査結果は、渡り鳥による病原体の持ち込みが実際に行われていることを示唆している。

A.研究目的

蚊が媒介する病原体がある地域に侵入する経路には、大きく2つを区別することができる。ひとつは、病原体に感染した人（患者）やペット、家畜、あるいは感染した蚊が人為的な手段によって移動することによる侵入である。このような経路は、ある程度コントロールすることが可能であり、検疫によって侵入が阻止されている。もうひとつの侵入経路として、自然の経路が考えられる。これは、感染した蚊が強風によって長距離を移動したり、感染した野生動物、例えば渡り鳥が飛来することによって病原体が持ち込まれる経路である。この自然の経路による蚊媒介性病原体の侵入が、実際にどの程度頻繁に起きているのかはよくわかっていない。

日本列島と台湾はユーラシア大陸の東沿岸に位置し、千島列島、フィリピン、ボルネオ島、インドネシア、オーストラリア大陸とともに、渡り鳥の重要な渡りルートを形成している。そのため、渡り鳥による病原体の侵入に関する調査研究に適した位置にあるといえる。蚊によって媒介される病原体の場合、ある地域に病原体に感染した人や動

物が移動してきても、そこに媒介可能な蚊が生息していなければ病気の伝播は起らない。したがって、蚊媒介性病原体の侵入や伝播の実態は、その地域に生息している蚊から病原体の検出を行うことによって明らかにすることが可能である。

本研究は、蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫を対象として、台湾と石垣島の調査地で媒介蚊の現地調査を行い、蚊相と蚊から検出される鳥マラリア原虫の種類を比較考察することによって、渡り鳥による蚊媒介性病原体の侵入・定着の実態を明らかにすることを目的に行われた。

B.研究方法

台湾における現地調査：台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳、無尾港水鳥保護区）を調査地として2011年から2013年の3シーズンに疾病媒介蚊の現地調査を行った。調査は渡り鳥が飛来する5月と9月または10月に各1回ずつ実施した。成虫調査は1kgのドライアイス誘引源とするトラップ10台を設置して、連続した2日間採集を行った。捕獲された成虫は毎日回収し、台湾CDCの実験室

に持ち帰って種類同定を行った。サンプルはその後の分析のために冷凍で保存した。

石垣島における現地調査：台湾北東部の蚊相と比較するために石垣島南部の水田地帯で、2011年6月、8月、2012年3月と9月の計4回の現地調査を実施した。成虫調査はドライアイスストラップ15台を用いて、連続した3日間行った。

蚊からの病原体の検出：台湾の調査で捕獲されたコガタアカイエカ成虫サンプルは、台湾CDCで日本脳炎ウイルスの分離を試みた。それ以外の成虫サンプルを用いて、鳥マラリア原虫の検出を行った。石垣島のサンプルと台湾の2011年および2012年のサンプルからの鳥マラリア原虫の検出は国立感染症研究所昆虫医科学部で行い、2013年の台湾のサンプルは台湾CDCで分析した。蚊からの鳥マラリア原虫の検出は、チトクロームb遺伝子をターゲットとしたPCR法によって行い、陽性サンプルは遺伝子の塩基配列を決定して種類を同定した。

吸血蚊の吸血源動物の同定：トラップ採集及び捕虫網採集によって採集された吸血蚊からは、DNAを抽出して、吸血源動物の同定と鳥マラリア原虫の検出を行った。

蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の検出は台湾のサンプルについてはほぼ終了したが、石垣島の2012年のサンプルはまだ分析が済んでいない。そのため、分析が済んだ台湾のサンプルの結果を中心に報告する。

C. 研究結果

台湾と石垣島の現地調査によって採集された蚊の種類とその個体数を表1にまとめて示した。台湾では合計20種類、13,373個体、石垣島では合計24種類、7,499個体の成虫が採集された。このうち台湾と石垣島の両方の調査地で採集されたのは、12種類であった。これら12種類のほとんどは捕獲個体数が多く、いわゆるふつうに採集される種類であった。石垣島の調査地で採集されていない種類の中には、キンバラナガハシカやアカツノフサカ、サキジロカクイカ、ミナミハマダライエカのように、生息しているのだが発生量が少ないために本調査では採集されなかった種類が含まれていた。

台湾で採集されたコガタアカイエカのサンプルからは日本脳炎ウイルスの検出を試みたが、検出できなかった。

台湾の調査地で採集されたコガタアカイエカ以外の蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の

検出結果を表2~4に示した。分析を行った16種について、鳥マラリア原虫の感染率を表2に示した。鳥マラリア原虫は9種類の蚊から検出され、プール単位で求めた感染率は2.4%から50%であった。1つの陽性プールに感染個体が1個体だけ含まれていたと仮定して、感染率を分析した総個体数に対する1000分率(MIR)で表現すると、2.8から200であった。分析個体数が10以上の種類に限ると、クシヒゲカ的一种とカラツイエカの感染率がMIR=43.8, 25.5とかなり高い感染率を示した。これら2種の蚊は我国にも生息しており、我国で採集されたサンプルからも鳥マラリア原虫が検出されている。石垣島で採集された蚊の中で、これまでに鳥マラリア原虫が検出されているのは、ネッタイエカとムラサキヌマカの2種類である。我国のサンプルで鳥マラリア原虫が検出されておらず、台湾のサンプルでのみ陽性個体が見つかる蚊の種類は、ヨツホシエカと*Cx. murrelli*, アシマダラスマカの3種類であった。

台湾産の蚊から検出された原虫の遺伝的系統と陽性プール数を表3に示した。合計10系統が検出され、そのうち4つはこれまで全く報告のない新規の系統であった(Yilan01, Yilan02, Yilan03, Yilan04)。陽性サンプルの総数が5以上の系統は3つあり、いずれも3年続けて陽性個体が見つかる。このうち*P. rouxi*と*P. elongatum*は全北区、東洋区、エチオピア区と広範囲に分布している系統で、*P. rouxi*は石垣島のサンプルからも検出されている。*P. tacyi*7は埼玉県のリビタキで最初に報告された系統で、地理的分布の詳細は不明である。これら3系統以外の7系統は、いずれも1回の調査でしか検出されていないが、*P. juxtannucleare*は広範囲に分布する種類で石垣島や新潟県で採集された蚊からも検出されている。また、*P. gallinaceum*は本州のいくつかの地域で蚊から検出されている種類である。

本研究で検出された鳥マラリア原虫の系統ごとに、検出された蚊の種類を整理して表4に示した。毎年検出されている3つの系統について見てみると、*P. elongatum*は合計5つの陽性サンプルはすべてクシヒゲカ的一种から得られている。*P. rouxi*は8個の陽性サンプルのうち4個が*Cx. murrelli*から毎年検出されており、カラツイエカとサキジロカクイカからそれぞれ1回だけ見つかる。*P. tacyi*7は3年続けて検出されているが、検出され

た蚊の種類は調査によって異なり、合計 7 種類の蚊からそれぞれ 1 回検出されている（カラツイエカからは 2 回）。

D. 考察

台湾北東部と石垣島の地理的な位置関係から予想されるように、両地域の蚊相、鳥マラリア原虫感染蚊の種類および蚊から検出された鳥マラリア原虫の系統には、少数だが共通するものが含まれていた。それぞれの地域に飛来する渡り鳥の種類とその個体数には違いがあるはずであり、したがって感染した渡り鳥によって持ち込まれる鳥マラリア原虫の系統にも地域による明らかな違いがあると推測される。さらに、飛来した感染野鳥から吸血して鳥マラリア原虫を受け取る蚊の種類にも、地域による違いがあるので、これらの違いを反映してそれぞれの地域に固有の鳥マラリア原虫の感染サイクルが形成されているように思われる。

本研究で台湾の調査地に感染サイクルが成立していると推測されるのは、毎年継続的に検出されている *Pelongatum*, *Prouxi* さらに *Ptacy7* の 3 系統である。前者の 2 系統は主要な媒介蚊種も決まっており、*Pelongatum* はクシヒゲカ的一种、*Prouxi* は *Cx. murrelli* によって伝播されている可能性が高い。これに対して、*Ptacy7* は毎年検出されているのだが、検出される蚊の種類はばらばらで、7 種類もの蚊から検出されている。このように、多数の媒介蚊種が鳥マラリア原虫の感染サイクルに関与している事例はこれまで報告がないことから、非常に興味深い。

3 年間 6 回の調査で 1 回しか検出されていない系統も、別の意味で重要である。それぞれの系統が 5 月と 9-10 月のどちらで検出されているかを調べてみると、5 月に検出されているものが 4 系統、9-10 月に検出されているものが 3 系統とほぼ半々に分かれている。これら 2 組の系統は、恐らく 5 月に飛来する鳥を宿主とする系統と 9-10 月に飛来する鳥を宿主とする系統を意味していると考えられる。つまり、これらの系統はそれに感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生

息していた蚊の吸血を通じて一時的に取り込まれた系統であると推測される。このような系統が蚊から検出されるという本研究の調査結果は、渡り鳥による病原体の持ち込みが実際に行われていることを示唆しており、病原体の渡り鳥による拡散を支持する重要な結果であるといえる。

E. 結論

台湾と北部の調査地で 2011 年～2013 年に、20 種類 13,373 個体、石垣島南部で 24 種類 7,499 個体の蚊成虫を採集した。これらの蚊サンプルから、チトクローム b 遺伝子をターゲットとした PCR 法によって鳥マラリア原虫の検出を行った。台湾で採集された 20 種の蚊のうち、9 種類から鳥マラリア原虫が検出された。検出された鳥マラリア原虫は、チトクローム b 遺伝子の塩基配列の相同性によって 9 つの遺伝的系統に分類された。このうち 3 つの系統は 3 年連続して採集蚊から鳥マラリア原虫が検出されており、調査地に生息するクシヒゲカ的一种と *Cx. murrelli* などの蚊によって感染サイクルが維持されていると推測された。これに対して、これら 3 系統以外の系統は、3 年間の調査で 1 回しか検出されておらず、感染した渡り鳥によって偶然に持ち込まれ、飛来時期に生息していた蚊によって一時的に取り込まれた系統であると推測された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 台湾北東部宜蘭県および石垣島の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査結果 (2011 年～2013 年のまとめ)

Species	Taiwan			Ishigakijima	
	2011	2012	2013	2011	2012
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	565	5223	2755	1081	884
<i>Cx. murrelli</i>	151	325	351		
<i>Ma. uniformis</i>	38	305	26	246	278
<i>Ae. albopictus</i>	217	49	269	332	71
<i>Ar. subalbatus</i>	23	210	171	32	18
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	90	129	95	27	359
<i>Cq. crassipes</i>	27	182	144	150	204
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	161	27	31	239	327
<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	28	100	49		
<i>Cx. sitiens</i>	69	38	874	474	563
<i>Cx. vishnui</i> gr	1	13	557	1016	202
<i>Cx. pseudovishnui</i>	2	10		747	132
<i>Cx. nigropunctatus</i>		9	8	11	5
<i>Cx. malayi</i>			23		
<i>Lt. fuscans</i>	5		3		
<i>Cx. rubithoracis</i>		5	6		
<i>Cx. sinensis</i>		3			
<i>Tr. bambusa</i>		2			
<i>Culex</i> sp	2				
<i>Ur. novobscura</i>	1	1			1
<i>Cx. cinctellus</i>					50
<i>Ae. riversi</i>				13	7
<i>Or. anopheloides</i>				5	2
<i>An. yaeyamaensis</i>				6	
<i>Ve. iriomoptensis</i>				6	
<i>Ae. vexans nipponii</i>				3	2
<i>An. sinensis</i>				1	
<i>Ur yaeyamana</i>				1	
<i>An lesteri</i>					1
<i>Cx. fuscocephala</i>					1
<i>Aedes</i> sp				1	
<i>Uranotaenia</i> sp					1
Total collected	1380	6631	5362	4391	3108
Total number of species	15	17	15	19	19

表2 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地で採集された蚊の
鳥マラリア原虫の感染率

Species	No. examined	No. pool	positives	%	MIR/1000
<i>Cx. sitiens</i>	952	96	8	8.3	8.4
<i>Cx. murrelli</i>	839	86	7	8.1	8.3
<i>Ae. albopictus</i>	442	47	0	0	0
<i>Ma. uniformis</i>	368	41	1	2.4	2.7
<i>Ar. subalbatus</i>	354	39	1	2.6	2.8
<i>Cq. crassipes</i>	342	36	2	5.6	5.8
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	314	33	8	24.22	25.5
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	221	24	1	4.2	4.5
<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	137	17	6	35.3	43.8
<i>Cx. malayi</i>	23	3	0	0	0
<i>Ur. novobscura</i>	2	2	0	0	0
<i>Cx. rubithoracis</i>	11	2	0	0	0
<i>Lt. fuscans</i>	5	2	1	50.0	200
<i>Cx. nigropunctatus</i>	8	2	0	0	0
<i>Tr. bambusa</i>	1	1	0	0	0
<i>Cx. pseudovishnui</i>	4	1	0	0	0
Total	4023	432	35	8.1	8.7

表3 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地における2011年～2013年の調査で採集された蚊からの
鳥マラリア原虫の検出結果

<i>Plasmodium</i> lineage	2011		2012		2013		Total
	May	Sep	May	Oct	May	Oct	
<i>P. tacyi</i>		1	1	1		8	11
<i>Plasmodium rouxi</i> ○		2	5		1		8
<i>Plasmodium elongatum</i>	1		2		2		5
<i>Plasmodium juxtannucleare</i> ○						3	3
Yilan02	3						3
<i>Plasmodium gallinaceum</i>					2		2
Yilan01		1					1
Yilan03			1				1
Yilan04				1			1
<i>Plasmodium lutzi</i>					1		1
Total	4	4	9	2	6	11	36

Yilan01=GQ141560 と DQ241525 と 97% 一致

Yilan02=GWR06 と 99%一致

Yilan03=EF380158 と 98%一致

Yilan04=DONANA02 と 99%一致

表 4 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地の蚊から検出された鳥マラリア原虫と蚊の種類の関係：2011年～2013年のまとめ

<i>Plasmodium</i> lineage	Mosquitoes	2011		2012		2013		Total
		May	Sep	May	Oct	May	Oct	
GRW6- <i>P. elongatum</i>	<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>	1		2		2		5
<i>P. gallinaceum</i>	<i>Cq. crassipes</i>					2		2
<i>P. juxtannucleare</i>	<i>Culex sitiens</i>						2	2
	<i>Lt. fuscus</i>						1	1
<i>P. lutzi</i>	<i>Cx. murrelli</i>					1		1
<i>P. rouxi</i>	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>			3				3
	<i>Cx. murrelli</i>		1	2		1		4
	<i>Lt. fuscus</i>		1					1
<i>P. tacy7</i>	<i>Ar. subalbatus</i>						1	1
	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>			1			1	2
	<i>Cx. murrelli</i>						1	1
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>				1			1
	<i>Cx. sitiens</i>						4	4
	<i>Cx. sasai/kyotoensis</i>						1	1
Yilan01	<i>Cx. sitiens</i>		1					1
Yilan02	<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	3						3
Yilan03	<i>Cx. murrelli</i>			1				1
Yilan04	<i>Ma. uniformis</i>				1			1
Total		4	4	9	2	6	11	36

Yilan01=GQ141560 と DQ241525 と 97% 一致

Yilan02=GWR06 と 99%一致

Yilan03=EF380158 と 98%一致

Yilan04=DONANA02 と 99%一致

アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行調査と病原性解析

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し、台湾 CDC と共同でアジアにおける *B. holmesii* の流行状況を調査した。百日咳疑い患者（日本 920 名、台湾 495 名）を対象に遺伝子検査を実施した結果、*B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名（0.3%）であった。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名（10.1%）、台湾が 90 名（18.2%）であり、日本の検査陽性率は台湾より低い値を示した。また、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質について解析を行った。その結果、高分子タンパク質は定着因子 BipA (*Bordetella* intermediated phase protein A) と同定され、血液由来株では 1 塩基欠または負の転写調節により発現が抑制されていることが判明した。日本では調査を実施した 2012-13 年は百日咳の非流行期にあったことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。

研究協力者

鱒坂裕美, 大塚菜緒 (国立感染症研究所・細菌第二部)

藤戸亜紀, 鍋島民, 松本道明 (高知県衛生研究所)

岡田賢司 (国立病院機構福岡病院)

吉野修司, 河野喜美子 (宮崎県衛生環境研究所)

Shu-Man Yao, Chuen-Sheue Chiang (Taiwan CDC)

渡邊峰雄 (北里大学大学院・感染制御科学府)

A. 研究目的

Bordetella holmesii は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫系に基礎疾患を持つ患者に感染し、敗血症・心内膜炎などの起因菌となる。近年では基礎疾患を持たない青年・成人に感染し、百日咳と同様な呼吸器症状を引き起こすことが報告されている。これまで *B. holmesii* の症例報告は主に米国に限られていたが、わが国でも 2009 年に初の成人感染例が確認された。2010~11 年には百日咳地域流行で 6 名の感染者が認められ、2011 年には気管支炎を発症した幼児の *B. holmesii* 感染症例も確認された。これらの感染症例は *B. holmesii* がすでにアジア地域に広がっていることを示唆するが、本菌の病原体サーベイランスが実施されていないためその実態は明らかとなっ

ていない。

B. holmesii 感染者の呼吸器症状は百日咳菌と等しいことから、両菌を臨床症状から区別することは不可能である。そこで、本研究事業では *B. holmesii* に特異的な遺伝子検査法 (LAMP 法) を開発し、台湾 CDC と共同して遺伝子検査を用いた病原体サーベイランスを行った。さらに、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、本菌の呼吸器と血液由来株のタンパク発現を比較解析した。

B. 研究方法

B. holmesii-LAMP: Primer Explorer V4 ソフトウェアを用いて *B. holmesii* の *recA* 遺伝子 (216~425 bp, GenBank, AF399661) に対し 5 種類の LAMP プライマーを設計した。LAMP 反応は Loopamp DNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い、25 μ l の反応系に 12.5 μ l の reaction mixture, 1 μ l の *Bst* DNA polymerase, 40 pmol の BH-FIP と BH-BIP プライマー, 5 pmol の BH-F3 と BH-B3 プライマー, 20 pmol の BH-LB プライマーを添加した。DNA 検体 (4 μ l) は 95°C で 5 分間加熱し、急冷後添加した。増幅反応は 67°C で 1 時間行い、吸光度 650 nm の増加を濁度計 LA-320C (栄研化学) により測定した。

検査体制：百日咳様患者の鼻腔スワブを検査材料とした。遺伝子検査は *B. holmesii*-LAMP またはリアルタイム PCR により実施し、TaqMan プローブは既報 (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010) のものを一部改変して使用した。福岡県の患者検体は国立感染症研究所・細菌第二部、高知県の検体は高知県衛生研究所、台湾の検体は台湾 CDC において検査を行った。百日咳菌の遺伝子検査は LAMP 法またはリアルタイム PCR 法により行った。なお、高知県衛生研究所では百日咳強化サーベイランス事業の一環として遺伝子検査が実施された。

解析菌株：*B. holmesii* 患者の呼吸器から分離された 2 株 (BH2, BH6) と呼吸器以外から分離された 2 株 (BH7, BH ATCC51541) を供試した。BH7 株は心外膜炎患者の心嚢液 (Nei et al., J Clin Microbiol, 2012), BH ATCC51541 株は敗血症患者の血液から分離された菌株であり、両株を血液由来株とした。菌株は BG 培地で培養し、菌体の全タンパク質を 10-20% SDS-PAGE に供試した。

細菌学的解析：血液由来株に特異的に認められた高分子タンパク質は質量分析により同定した。タンパク質の発現はイムノブロット法により解析し、一次抗体には BH2 株の全菌体に対するマウス抗血清 (抗 wBH2) およびマウス BipA 抗血清 (R1, R3) を用いた。*bipA* 遺伝子のシーケンス解析は非翻訳領域を含めた 4.8 kb について実施し、*bipA* mRNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は百日咳診断を目的に国立感染症研究所・細菌第二部に搬入されたものを供試した。患者検体は医療機関において連結可能匿名化され、患者個人が特定出来ないよう配慮した。

C. 結果

B. holmesii-LAMP：*B. holmesii* 臨床分離株の DNA を用いて LAMP 検出系の感度を検討したところ、検出限界は 50 fg DNA/tube と判断された。次に *Bordetella* 族細菌 6 菌種 21 株を用いて本法の特異性を評価したところ、*B. holmesii* 以外の *Bordetella* 族細菌は 1 ng/tube という高濃度でも検出されず、本法は *B. holmesii* に高い感度と特異性を示した。

患者 DNA 検体を用いて本法の臨床感度を評価したところ、既報のリアルタイム PCR 法で陽性となった 6 患者検体はすべて陽性と判定された。同様にリアルタイム PCR 法で陰性となった 82 検体はすべて陰性と判定され、その一致度は 100% を示した。

病原体サーベイランス：百日咳様患者 (日本 920 名、台湾 495 名) について遺伝子検査を実施した結果、*B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名 (0.3%) であった (表 1)。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名 (10.1%)、台湾が 90 名 (18.2%) であり、日本の陽性率は台湾より低い値を示した。

病原性解析：*B. holmesii* の呼吸器由来株と血液由来株を比較した結果、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 (2 本の蛋白バンド) を認めた (図 1)。この高分子タンパク質は抗 wBH2 抗体に強く交差するとともに、抗 BipA 抗体にも強く交差した。この蛋白質を質量分析に供試したところ、2 本の蛋白バンドともに *Bordetella intermediated protein A* (BipA) と同定された。なお、血液由来の BH7 株では低分子の位置に 2 本のバンドが確認され、この低分子タンパク質を truncated BipA と命名した。

血液由来株において BipA 発現が認められなかった原因を考察するため、*bipA* 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果、truncated BipA が認められた BH7 株では *bipA* 遺伝子に 1 塩基欠失 (c.1961delG) が確認された。この遺伝子欠失は終止コドンを新たに形成し、不完全長の truncated BipA を産生することが示された。なお、血液由来株 BH ATCC51541 に遺伝子変異が確認されなかったことから、*bipA* 転写量について検討を加えた。その結果、BH ATCC51541 では *bipA* mRNA がほとんど検出されず、負の転写調節を受けていることが判明した。

D. 考察

過去に米国とカナダで実施された大規模調査では百日咳様患者の 0.1~0.3% に *B. holmesii* が検出され、本菌が百日咳の起因菌となることが示された。また、フランスの調査では百日咳と診断された青年患者の 20% に *B. holmesii* 遺伝子が検出されている。これらの病原体サーベイランスは近年 *B. holmesii* 感染が世界的に広がる

とともに、百日咳菌と *B. holmesii* の鑑別の必要性を指摘する。本研究で開発した *B. holmesii*-LAMP は操作が簡便であることから、*B. holmesii* の病原体サーベイランスに有用な手段となると期待された。

本研究事業では百日咳様患者（日本 920 名、台湾 495 名）を対象に遺伝子検査を実施し、台湾で 1 名の *B. holmesii* 陽性者を確認したが、日本では陽性者を確認できなかった。台湾における感染者は小学生であり、本菌の感染者が乳幼児よりも 10 歳代に多いという報告に一致した。日本では 2012 年の百日咳菌の検査陽性率は 13.1% (64/487) であったが、2013 年には 6.7% (29/433) と減少した。わが国では 2008~10 年に大規模な百日咳流行が発生し、調査開始の 2012 年以降は百日咳の非流行年であったと考えられる。米国では *B. holmesii* の菌血症患者は 2010~11 年の百日咳流行時に増加したことから (Tartof et al., Clin Infect Dis, 2014), *B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。百日咳菌の流行周期は約 4 年であることから、*B. holmesii* については今後も継続的な病原体サーベイランスが必要である。

米国では百日咳流行時に *B. holmesii* による菌血症患者が増加したが、本菌の血流感染と呼吸器感染の関係は不明である。本研究では呼吸器由来株と血液由来株を比較し、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 BipA を同定した。菌体の表層タンパク質である BipA は高い抗原性を持つこと、さらに気管支敗血症菌の BipA は BcfA (*Bordetella* colonization factor A) と共同して菌の定着に働くことが知られている。そのため、BipA が呼吸器感染症例の増加に関与する可能性は高く、今後 BipA に焦点を当てた研究が必要となる。また、百日咳流行時に *B. holmesii* が流行する可能性は否定出来ないため、BipA の高い抗原性を利用したワクチン開発も重要な検討課題となる。

E. 結論

百日咳類縁菌 *B. holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し、台湾 CDC と共同で病原体サーベイランスを実施した。本菌が百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆されるとともに、近年の呼吸器症例の増加に定着因子 BipA の関与が指摘された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R, Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, Kamachi K. Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection. J Infect Chemter, 2013; 19: 534-7.
2. Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay. Microbiol Immunol, 2012; 56:486-9.
3. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012; 7(2): e31985.
4. Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, 2012; 18: 272-5.

2. 学会発表

1. *Bordetella holmesii* に対する無細胞ワクチンの開発。山口哲矢, 鈴木英里, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰雄. 第 87 回日本細菌学会総会, 平成 26 年 3 月, 東京.
2. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.
3. 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, 蒲地一成. *Bordetella holmesii* に対する新規ワクチンの開発. 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月, 幕張
4. 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, 蒲地一成. 国内で分離された *Bordetella holmesii* に対する DPT ワクチンの効果. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会, 平成 24 年 11 月, 横浜
5. 蒲地一成. 百日咳の実験室診断, 困難な青年・成人

患者の診断. 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成 23 年 10 月, 山形.

6. 大塚菜緒, 吉野修司, 豊泉 (鯉坂) 裕美, 大平文人, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発. 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成 23 年 10 月, 山形.
7. 大塚菜緒, 吉野修司, 河野喜美子, 豊泉 (鯉坂) 裕美, 柴山恵吾, 蒲地一成. LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発. 第 94 回日

本細菌学会関東支部総会, 平成 23 年 10 月, 東京.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 :
 1. 百日咳の血清診断法 (特願 2013-77138, 平成 25 年 4 月出願)
 2. LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット. 特許第 4806749 号.
 2. 実用新案登録 : なし
 3. その他 : なし

表 1. 百日咳様患者における *Bordetella holmesii* と百日咳菌の検出状況

	調査年	検体数	<i>B. holmesii</i> 陽性数 (%)	百日咳菌陽性数 (%)
日本	2012-13	920	0	93 (10.1%)
台湾	2011-12	495	1 (0.3%)	90 (18.2%)

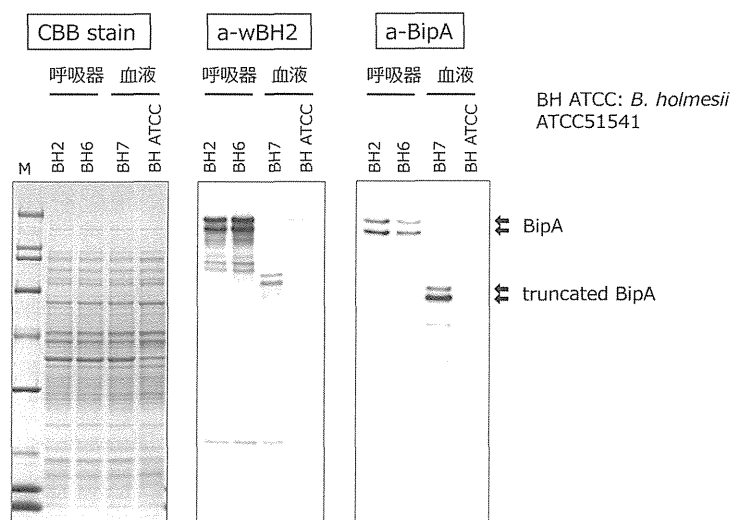


図 1. *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に発現する高分子タンパク質
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) から全タンパク質を抽出し, SDS-PAGE (10-20% gradient) により分離した. 呼吸器由来株に認められる 2 種類の高分子タンパク質は BipA, 血液由来の BH7 株に認められる低分子タンパク質は不完全長の truncated BipA を示した

プロジェクト3：インド

平成 23～25 年度 総合分担研究報告書

分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

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
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

1990年代以降アジア地域で分離される *Vibrio cholerae* O1 は、全て El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 であったが、2000 年代中頃から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も分離されており、両者が現在の流行株であると考えられる。共に溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、それらの出現機序は明らかとなっていない。そこで本研究では *V. cholerae* O1 の流行株変遷について基盤情報を得るため、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 に着目し、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供されたゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの遺伝子配列の比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis による分子疫学解析を行った。さらには El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

Genetic variation and pathogenicity of *Vibrio cholerae* O1

Masatomo Morita, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

Novel variant of *Vibrio cholerae* has been emerging by continuing to mutate and it is thought that all pandemic strains of cholera is originated from Bay of Bengal. Therefore, a molecular epidemiological analysis of Indian *V. cholerae* isolates would provide important information, which allowing us to trace the evolutionary process of epidemic *V. cholerae*. Here, we performed sequence of CTX prophage and multilocus variable number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* strains from National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India to characterize the pandemic strain of cholera. Additionally, we validated the availability of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *Vibrio cholerae* to distinguish between past pandemic strains and current pandemic strains.

A. 研究目的

Vibrio cholerae は 200 以上の血清群に分類され、

自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす

原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在する。1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* O1 によるコレラの流行は世界中に広がり、現在の世界のコレラはすべて El Tor 型による。

しかしながら 1990 年代以降、アジア地域で分離されるほとんど全ての El Tor 型 *V. cholerae* O1 が、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (375 bp) の 115 番目と 203 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae* O1 (El Tor variant 型 *V. cholerae* O1) であることが明らかとなり、流行株の遷移が確認された。さらには、2010 年に起きたハイチにおけるコレラの流行を契機に上記 2 カ所の変異に加え、58 番目の塩基に変異のある El Tor 型 *V. cholerae* O1 (Haitian variant 型 *V. cholerae* O1) が発見された。その後の研究により Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 は 2000 年代に出現したことが明らかとなり、現在アジア地域においては El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 の両者が分離されている。

新規コレラ流行株は溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、その出現には、自然環境中におけるファージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播が関与していると考えられる。自然形質転換では大規模な遺伝子変換が起きる可能性を考慮すると、新規流行株の出現機序の解明には、CTX ファージだけでなく全ゲノムを対象とした大規模な系統解析が必要である。一方でコレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑みると、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases, NICED) に保存されている *V. cholerae* 分離株の分

子疫学情報を蓄積することで、流行株の変遷について基盤情報を得ることができる。

そこで本研究ではコレラ流行株の進化系統を明らかにすることを目的とし、NICED より提供された El Tor variant 型 *V. cholerae* ゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) による分子疫学解析を行った。また現行の流行株の検出、型別法の構築を目指し、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型 (SNPs) の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

B. 研究方法

1. CTX ファージの遺伝子配列の比較解析

El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX ファージについて全塩基配列を決定した。*V. cholerae* は染色体が 2 つあるため、それぞれのファージ挿入位置に対して特異的なプライマーを設計した。増幅遺伝子をシーケンスし、classical 型 CTX ファージ及び El Tor 型 CTX ファージと配列を比較した。

2. MLVA による分子疫学解析

インドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 のゲノム DNA を NICED より提供してもらい、実験に用いた。PCR により *ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅が確認された試料について、7 遺伝子座を用いた MLVA を行い、Bionumerics ソフトウェアによる分子疫学解析を行った。

3. 流行株疫学マーカーの開発

NICED より提供された *V. cholerae* O1 のゲノム DNA のうち、*ctxB* 遺伝子の配列から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された株について、15 ヶ所の SNPs の配列を決定した (表)。

C. 研究結果

1. CTX フェージの遺伝子配列の比較解析

El Tor 型 CTX フェージと classical 型 CTX フェージには 97 ヶ所の 1 塩基多型が存在し、生物型特異的な CTX フェージが溶原化している。今回供試した El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 では両方の染色体に CTX フェージが溶原化していた。chromosome 1 上の CTX フェージはコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) のみ classical 型であった。また chromosome 2 上の CTX フェージでは *ctxB* 遺伝子が classical 型であったのに加えて、フェージの溶原サイクルに関与する RS2 領域 (*rstR*, *rstA*, *rstB* 遺伝子) では El Tor 型と classical 型が入り組んだ状態であった (図 1)。

2. MLVA による分子疫学解析

NICED 由来 29 株のクラスター解析の結果から、供試菌株は単一の MLVA 型を示さず、遺伝的多様性は比較的高いことが明らかとなった (図 2)。また当研究所に保存されている日本国内で分離されたアジア各国からの輸入事例に由来する *V. cholerae* 菌株を含めたクラスター解析をおこなったところ、NICED より提供された菌株を含むインド関連の菌株は遺伝的に多様性があるものの、他のアジア各国に関連する菌株とは異なるクラスターを形成した (図 3)。

3. 流行株疫学マーカーの開発

ctxB 遺伝子の配列から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された 1 株について、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の SNPs の配列を決定したところ、全ての遺伝子座において、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と同一の配列であった (表)。

D. 考察

V. cholerae は自然環境中において溶原性フェージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播に

より、病原性に関わる因子や環境中での生存に有利な因子のやりとりをしている。その過程において、新たなコレラ流行株が出現したことが考えられる。流行株の一株ではあるが、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX フェージの遺伝子構成がキメラ型であった。これはフェージの感染、溶原化では説明できない状態であり、キメラ型 CTX フェージの生成にも、自然形質転換の寄与が考えられる。この過程においては CTX フェージの構造遺伝子だけでなく、ゲノム DNA の大規模な組換えも起きている可能性が高い。つまりコレラ流行株の成り立ちについて知見を得るためには、ゲノム情報を元にした分子疫学解析が肝要である。今回は流行株として、インドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* を用いて、MLVA を実施した。しかしアジア地域におけるコレラの現状を把握し、流行株の変遷を明らかにするためには、以前の流行株である El Tor 型 *V. cholerae* O1、及び現在の流行株の一つである Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も同様に解析し、コレラ流行株の分子疫学情報を蓄積、データベース化する必要がある。そのためにも今後も継続して NICED から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の基盤情報の共有化を図りたい。

一方、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の SNPs の配列は Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と共通であったが、過去の流行株とは異なっていた。これらの SNPs を対象とした mismatch amplification mutation assay を構築し、流行地域におけるコレラ流行株の現状を把握し、新規コレラ流行株の発生監視に努めたい。

F. 健康危機情報

特に該当なし。

G. 研究発表

Morita, M., Yamamoto, Y., Arakawa, E., Alam, M.,

Ohnishi, M., Izumiya, H., Watanabe, H. Transfer of genes for type III secretion system in *Vibrio cholerae* via natural transformation. 46th U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Kolkata, India, Dec. 2011.

Morita, M., Yamamoto, S., Hiyoshi, H., Kodama, T., Okura, M., Arakawa, E., Alam, M., Ohnishi, M., Izumiya, H. and Watanabe, H. Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 57: 334-339.

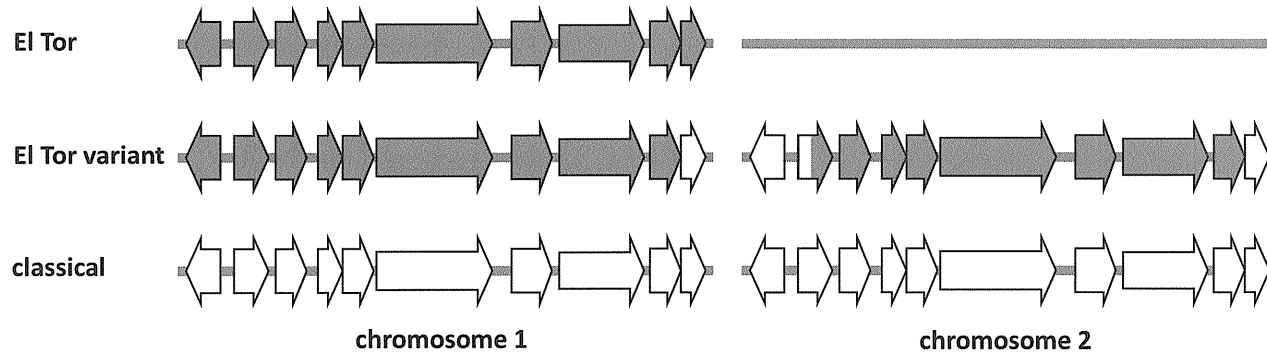
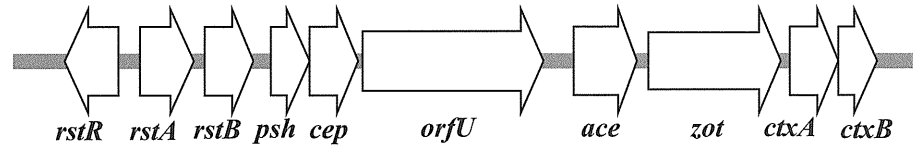


図1 CTX ファージの構造。El Tor variant 型 *V. cholerae* に溶原化している CTX ファージは El Tor 型と classical 型のキメラ型ファージであった。