

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29 年 2 月 25 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 獨協医科大学医学部微生物学講座

職 助教

氏名 野中 里佐

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

愛媛県松山市沿岸および重信川から分離された *Vibrio cholera* とその多様性

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 野中里佐	獨協医科大学	助教	研究計画立案・とりまとめ サンプリング、分離株からの毒素 遺伝子検出・ゲノタイプ解析
分担者 丸山史人	京都大学	准教授	全ゲノムの比較解析
小林剛	愛媛大学	講師	サンプリング
杉本侑大	愛媛大学	修士課程 2年生	菌分離・PCRによる種同定
拠点対応教員 鈴木聡	愛媛大学	教授	研究方針および結果について討議

3 研究内容

【研究目的】

ヒトが地球上で安定した活動を行っていくためには、安定した水資源の確保は最も重要な要素の一つである。途上国においては安定した水資源の確保は未だ困難な状況にあり、その原因のひとつに微生物汚染が挙げられる。水系感染症と呼ばれる水環境に生息する微生物に起因する感染症の代表にコレラがある。起因菌である *Vibrio cholera* はコレラ毒素産生性によって二種類に大別され、世界各地での大規模流行の原因となっているのは毒素産生型であり、そのほとんどが血清型 O1 もしくは O139 に分類されるものである。一方、non-O1/ non-O139 とよばれるグループはナグビブリオとよばれ食中毒の原因菌として知られる。

細菌感染症のコントロールには細菌固有の生態を明らかにすることが必要不可欠である。研究分担者らが行った先行研究からは周期的なコレラのアウトブレイクのあるベトナムやチリなどでは *V. cholera* が頻繁に環境から分離されることが明らかになっている。一方、現在日本国内におけるコレラの発生は年間数件で、そのほとんどは渡航者が海外で感染して帰国後発症する輸入感染症である。そのため我が国の環境中におけるコレラ菌の動態に関する研究報告は極めて限られている。本研究では、日本沿岸における *V. cholerae* の分布状況を明らかにし、および世界各地から分離した *V. cholerae* の比較ゲノムによる流行株予測プロジェクト「コレラ菌から地球規模での水の衛生微生物学的安全性を保証する」(基盤研究(B) 海外、研究代表者 丸山史人) に日本由来株を提供し、既にデータが得られている諸外国との比較を行い、アウトブレイクの有無との関連明らかにすることを目的とした。

【研究内容】

実験には鈴木研究室にあるバイオハザード対策用クリーンベンチを利用した。

1) サンプルング：松山市近郊の汽水域および沿岸 10 か所にて (図 1) 3 月、5-9 月および 11 月にサンプルングを行った。採取した水サンプルを現場で 10 倍濃度のアルカリペプトン水に加え最終濃度を 1% とし、室温で実験室に持ち帰った後 37°C、17-18 時間培養し *Vibrio* 属細菌を選択増菌した。

2) *V. cholerae* の分離：選択増菌した培養液の一部から total DNA 抽出を行い、これをテンプレートとして *toxR* 遺伝子をターゲットとした *V. cholerae* 特異的 PCR により *V. cholerae* の検出を行った。陽性を呈したサンプルの一部を *Vibrio* 属細菌の選択培地である TCBS 寒天培地上へ塗り広げ、ショ糖分解能を示したコロニーをターゲットに *toxR* 遺伝子の保有を再度確認後 16S rRNA 遺伝子配列決定により *V. cholerae* と確定した。

3) 分離した *V. cholerae* について、PCR 法により血清型 O1, O139 型チェックお

よび毒素遺伝子 *ctxA* の有無を確認した。またそれぞれの株から全 DNA を抽出し、HiSeq を用いた全ゲノム配列決定に供した。

【研究成果】

2016年3月、5月から9月および11月に松山市沿岸および河川10地点で採水を行い *V. cholerae* の検出を試みた結果、水温が20°C以上であった6月から9月は10地点中8地点以上から *V. cholerae* が分離された。一方、3月および11月は10地点の最高水温がそれぞれ18.5°Cおよび19.3°Cであり、いずれの月も1地点のみ（サイト1）が陽性であった（図2）。我が国のコレラ患者報告数について、国立感染症研究所の感染症発生動向調査年報をもとにデータが存在する1999年以降について集計した（図3）。その結果、愛媛県におけるコレラ患者は2005年に報告された1件を最後に現在まで0件であった。*V. cholerae* は松山市沿岸および河川水中の微生物群集を構成する種として常在していると考えられた。また調査対象とした10地点は合計7回のサンプリングにおける分離頻度によって、7割以上の高頻度分離地点、約5割の中頻度地点および一度のみ検出された低頻度分離地点に分類され、それぞれ1地点、8地点および1地点が該当した（図4）。採取した環境水の電気伝導度と分離頻度の関連はみられなかったが、*V. cholerae* の分離頻度は地点によって異なることが明らかになった。

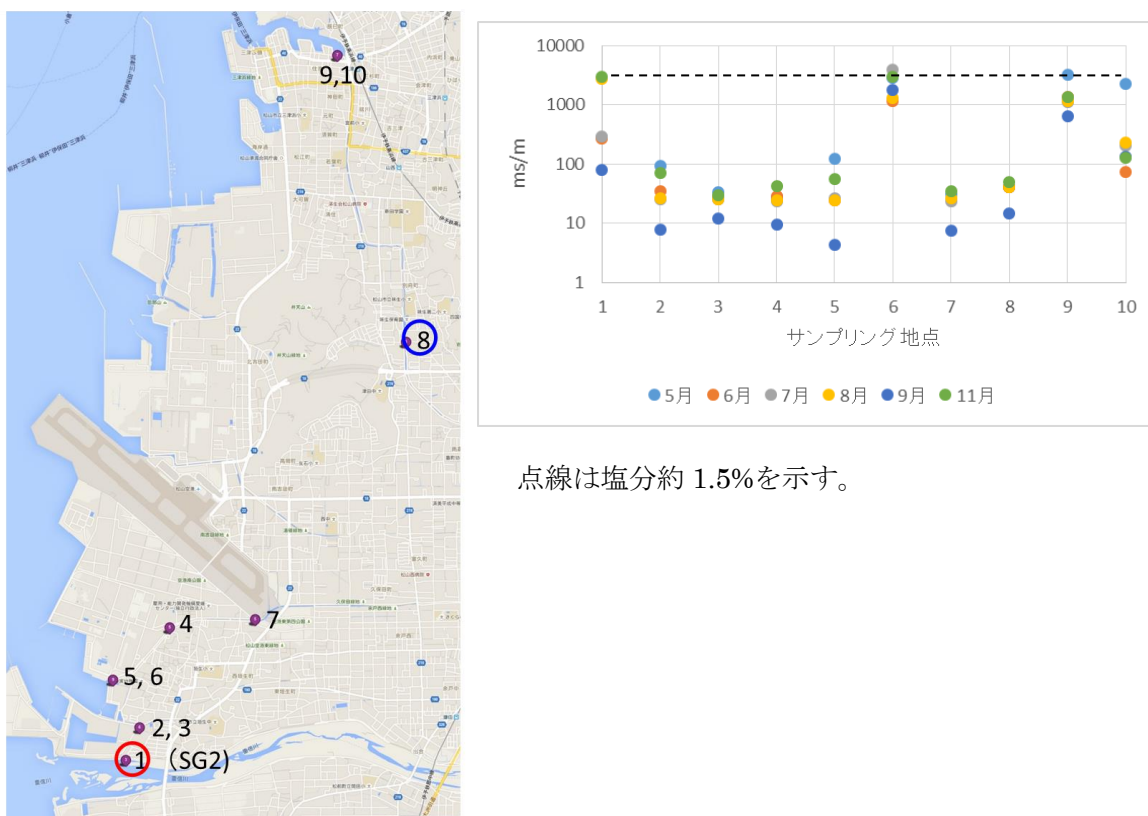
分離した38株はいずれも血清型O1, O139には該当せずまた毒素遺伝子 *ctxA* も保有していなかったことから、食中毒原因菌となる non-O1/ non-O139 タイプ（ナグビブリオ）であることが明らかになった。さらにパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE法）により、分離株のゲノタイピングを行いその多様性を解析した結果、分離時期および採水地点の異なるサンプルから繰り返し分離される3つのゲノタイプが存在することが明らかになった（図5）。このうちゲノタイプ1は低水温期を含む長期間にわたり広範囲から分離されることが明らかになった。今回分離した38株について現在全ゲノム配列を解析中であり、得られた結果は世界各地から分離した *V. cholerae* の比較ゲノムによる流行株予測プロジェクト「コレラ菌から地球規模での水の衛生微生物学的安全性を保证する」（基盤研究(B)海外、研究代表者 丸山史人）に提供する予定である。

【今後の課題】

松山市沿岸および重信側流域の10地点から得られた *V. cholerae* 株は毒素遺伝子 *ctxA* を保有しない non-O1/ non-O139 タイプであった。本タイプは食中毒原因菌であるため、今後本菌の環境中における年間の現存量の変化を把握する必要がある。当研究における予備的検討からフィルター上に採捕した細菌の全 DNA を用いた qPCR では *V. cholerae* は検出限界以下となることが予想され、

今後、培養法と PCR 法を組み合わせた MPM-PCR 法による定量を検討する必要がある。

今回の結果から、松山市沿岸および重信川流域の比較的限られた範囲内でも、*V. cholerae* の分離頻度はサンプリング地点によって大きく異なることが明らかになった。このようなホットスポット出現のメカニズムの解明は今後の課題であり、ヒト由来の *V. cholerae* の影響が無視できる非流行地は適していると考えられる。分離株の解析により、同一のゲノタイプを持つ株が年間を通じて松山市沿岸および重信河川に分布することが強く示唆された。現在、得られた全ての株について全ゲノム情報を決定中であり、今後得られた配列の比較解析結果から、環境中に長期間広い範囲に分布する *V. cholerae* 株の特徴を明らかにする予定である。



点線は塩分約 1.5%を示す。

図1 サンプリング地点（愛媛県松山市）および各地点で採取した環境水の電気伝導度

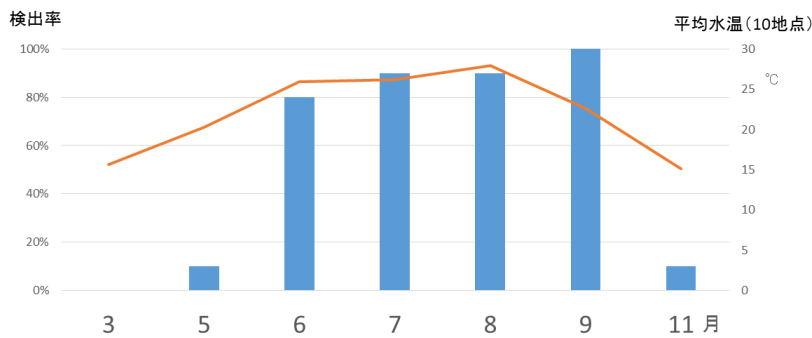


図2 松山市沿岸および重信川 10 地点の平均水温および *V. cholerae* 陽性率

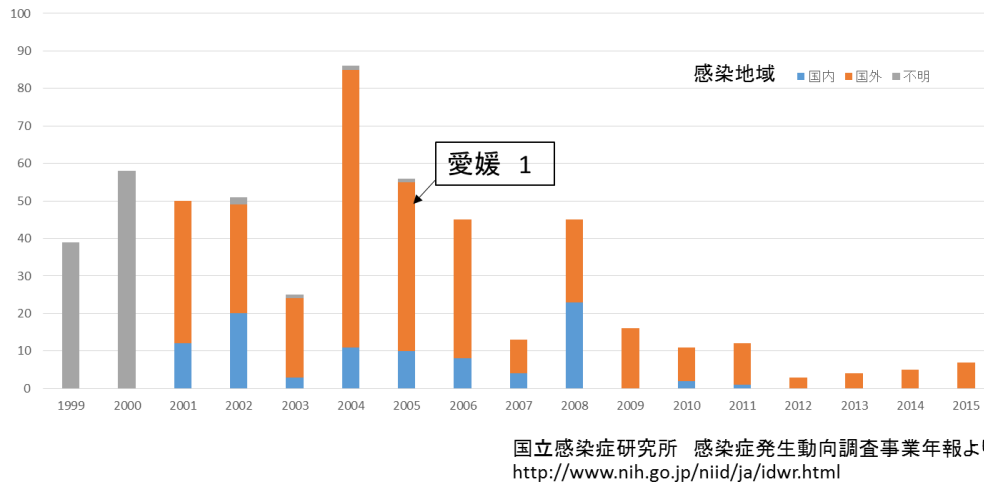


図3 日本におけるコレラ患者報告数 (1999年-2015年)

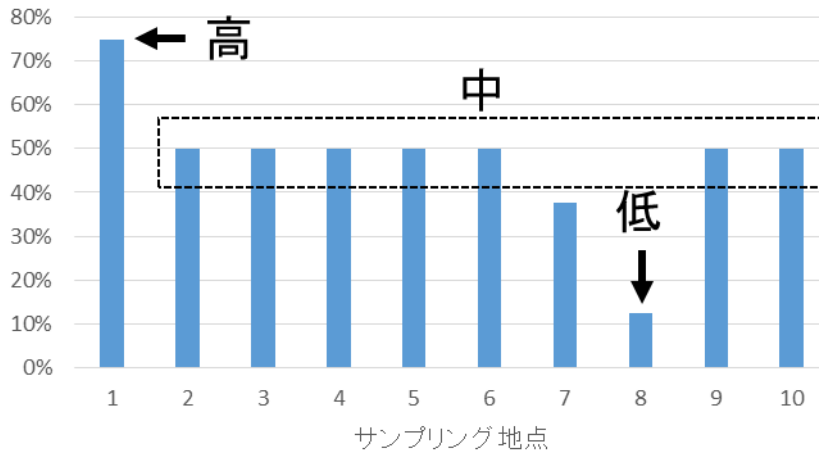


図4 7回のサンプリングにおける各サンプリング地点の陽性率

		サンプリング地点									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
月	5	ゲノタイプ1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	6	ゲノタイプ1	ゲノタイプ2	ゲノタイプ2	ゲノタイプ2	ゲノタイプ2	ゲノタイプ2	NS	NS	その他	その他
	7	ゲノタイプ1	その他	ゲノタイプ2	その他	その他	その他	その他	NS	ゲノタイプ2	その他
	8	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他	NS	ゲノタイプ2	ゲノタイプ2
	9	ゲノタイプ1	ND	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他	その他
11	ND	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

図5 各サンプルから分離された *V. cholerae* のゲノタイプ