

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30年 2月 28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 講師

氏名 野中 里佐

e-mail nonaka@dokkyomed.ac.jp

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

日本沿岸における *V. cholerae* 現存数および松山優占ゲノタイプの系統解析

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	講師	研究計画立案・とりまとめ <i>V. cholerae</i> 定量・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
大林由美子	愛媛大学	助教	<i>V. cholerae</i> 計測
杉本侑大	愛媛大学	博士課程 1年生	<i>V. cholerae</i> 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* は毒素産生の有無によって二種類に大別される。毒素産生型のみがコレラ菌とよばれ世界各地での大規模流行の原因となっている。毒素非産生型はナグビブリオと総称され、食中毒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。コレラによる年間死亡者数は 2.1 から 14 万人で増加傾向にあり、極めて重要な下痢性感染症のひとつである。一方、我が国ではコレラは渡航や海外産食品を原因とする輸入感染症に位置づけられる。データが存在する 1999 年以降の年間報告数は 90 件以下であり、さらに 2012 年以降は 10 件以下にとどまっている。そのため日本における水圏環境中における *V. cholera* の動態に関する報告は極めて少なく、特に 2000 年代の状況は不明である。応募者らの昨年度の LaMer 共同研究の結果、松山市河川および沿岸域には 5 月から 11 月に毒素非産生型 *V. cholera* が分離され、年間を通じて複数のサンプリングサイトから分離される 4 つの遺伝子型（ゲノタイプ）が存在することが明らかになった。

本研究ではコレラ菌の環境中における現存数を調査するとともに、松山分離株中の優占タイプを決定し、そのゲノム情報から松山株の遺伝的多様性を明らかにするとともにゲノムデータ利用可能な *V. cholerae* との比較を行い、松山優占タイプの系統的特徴を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) サンプリング：松山市重信川河口（サイト 1、5、6 および 9）で 8 月、11 月にサンプリングを行った。10 倍濃度のアルカリペプトン水に現場で採取した水を直ちに加え、実験室に持ち帰り 37°C、17-18 時間培養した。

2) コレラ菌の分離および定量：採取した水サンプルの 10 倍希釈列を作成し（1%アルカリペプトン水使用）37°C、17-18 時間培養することで *Vibrio* 属細菌を選択増菌した後、それぞれの培養液からの *V. cholera* 特異的 *toxR* 遺伝子の検出を行った（MPN-PCR 法）。各サンプル 3 連で行い、陽性率から菌数を求めた。陽性を呈したサンプルについては、*Vibrio* 属細菌の選択培地である TCBS 寒天培地を用いて *V. cholerae* を分離した。

3) 遺伝的多様性および薬剤耐性遺伝子プロファイル解析：昨年度松山市近郊

河川および沿岸域から分離した 49 株のパルスフィールドゲル電気泳動解析結果から、松山市沿岸で繰り返し分離されるゲノタイプ代表 7 株を選び HiSeq を用いた全ゲノム配列決定を行った。kSNP 3.0 (Gardner *et al.*, 2015)を用いて既知の *V. cholerae* ゲノムを対象に系統解析を行った。得られた結果は iTOL (Letunic *et al.*, 2016)により可視化した。さらに種々の病原性に関与する遺伝子、薬剤耐性遺伝子および遺伝子伝達因子の有無からプロファイルを明らかにした。

【研究成果】

2017 年 8 月および 11 月に松山市沿岸および河川 4 地点 (図 1) で採水を行い *V. cholerae* の定量・検出を試みた結果、平均水温が 27.9°C 以上であった 8 月は 4 地点全てから *V. cholerae* が検出され、その数は $1.5 \times 10^2 - 1.1 \times 10^4$ MPN/liter であった。一方、11 月は平均水温が 18.6°C であり、その数は $0 - 1.5 \times 10^2$ MPN/liter であった (図 2)。高水温記である 8 月は 11 月に比べ 1 リットル中の *V. cholerae* 数は約 100 倍多く、夏季に本菌の分離頻度が高い理由であると考えられる。なおこれらの結果はフランス沿岸を調査した文献値と類似していた。

一方、昨年度の結果から、本調査地域から分離された *V. cholerae* は全て毒素非産生型で食中毒原因菌となるナグビブリオ (non-O1/non-O139 タイプ) であること、および異なる分離時期および地点から繰り返し分離される 4 つのゲノタイプが存在することが明らかになった。本研究ではこの 4 つのゲノタイプに着目し、ゲノタイプ 1-4 を示す 7 株の全ゲノム配列をデータベースに登録されている *V. cholerae* との系統解析を行った。その結果、4 つのゲノタイプは 2 つの系統から形成されており、1 つ目の系統はゲノタイプ 1 のみを含み、南米、バングラデシュ、オーストラリアと様々な地域由来の 7 株と共通クラスターを形成することが明らかになった。本ゲノタイプは 4 つのタイプの中でももっとも頻繁にまた、分離頻度の低下する低水温記にも分離される優占タイプであることが示唆されており、多様な地域由来の株が含まれることを併せて考えると環境適応能力の高いクラスターである可能性が考えられた。一方、他方の系統はゲノタイプ 2, 3, 4 を含み、バングラデシュ由来 1 株のみと共通クラスターを形成したことから、アジア地域で進化した系統である可能性が考えられた。

病原性関連遺伝子の有無について解析した結果、7 株全てが *rtxA*, *hap*, *hylA*, および *zot* 遺伝子を有していることが明らかになった。*rtxA*, *hap*, *hylA* は環境分離株にも広く分布することが報告されている。一方、06-10 株において *ctx island* の構成因子である *rstA* および *zot* 遺伝子に挟まれた未知遺伝子配列の挿入が見出された。本領域は El Tor 型病原株では毒素遺伝子が組み込まれている領域であることから (*rtxA---rstA-rstR-ctxB/A-zot*)、本株では別のフェージ等の挿入が生じたことが推察されるが、blast による類似遺伝子の探索では高い相同性を有する

ものがなかった。新規ファージ挿入の可能性が示唆される。

コレラの病原性に関わる **gene island** として知られる **VPI**、**VSP** はいずれの株からも見いだされず（表 1）、毒素産生遺伝子も有さないことと併せて考えると松山市沿岸部に分布する *V. cholerae* の病原性は比較的低いことが示唆された。さらに微生物間の相互作用に關与する **secretion system** に関しては 3 型および 6 型 **secretion system** を構成する一部の遺伝子が検出された。現在完全なコンポーネントを形成するのに必要な全ての遺伝子群を有するか否かについて解析を進めている。薬剤耐性遺伝子に関してはゲノタイプ 1, 2, 4 はクロラムフェニコール耐性遺伝子 *catB9* を、一方ゲノタイプ 3 はそれぞれキノロン、サルファ剤耐性遺伝子である *QnrVC4* および *sul2* を保有していることが明らかになった（表 1）。一方、*prf* 遺伝子内に特異的に挿入され薬剤耐性遺伝子の伝達に關与しているとされている可動性因子 **integrative conjugative elements** はいずれの株においても見られなかった。

【今後の課題】

今回の結果から、これまでの報告同様松山市沿岸部でも水温の高い時期には *V. cholerae* 数が上昇していることが明らかになった。また繰り返し分離されるゲノタイプは 2 つの系統に分けられ、特に紺頻度で分離され優占タイプと考えられるゲノタイプ 1 は南米、アジアおよびオーストラリア由来株と共通クラスターを形成し、高い環境適応能力を持つことが示唆される。今後の課題は、本年度に分離された株についてゲノタイプ 1-4 の検出状況を調べ、これらのタイプが一年以上環境に存在することを確認するとともに、代表 7 株について **type 6 secretion system** のフルコンポーネントを有することを確認するなど、さらなる解析を進める。また、優先しない群のゲノムと比較解析することにより、長期間広範囲に生息することに寄与している遺伝子（群）を明らかにし、コレラ発生のコントロールを行う上での基礎的知見を得る。

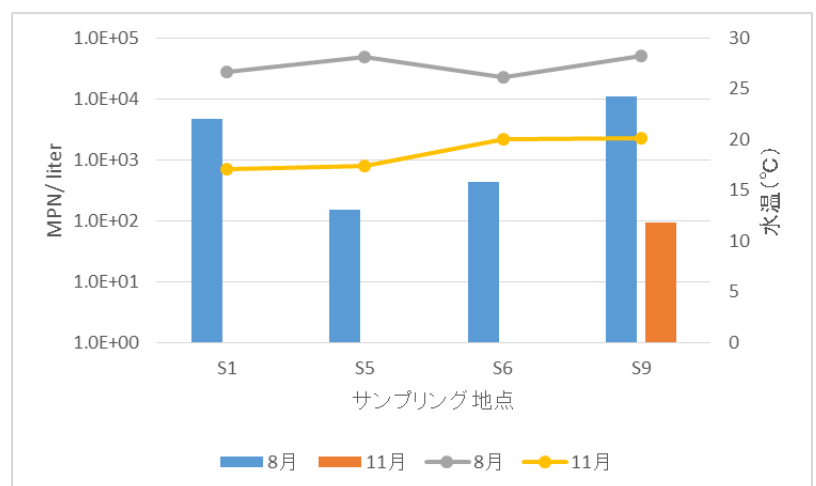
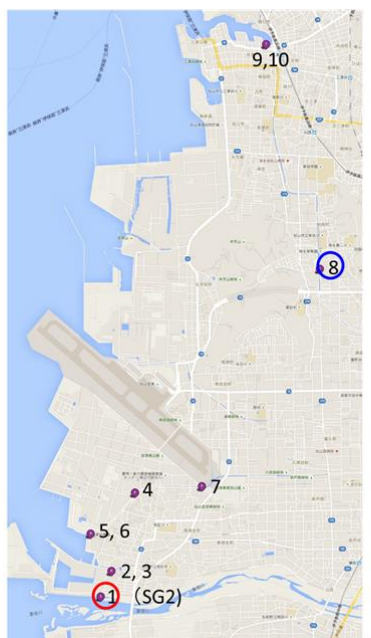


図 2 松山市沿岸部 5 地点の *V. cholerae* 菌数

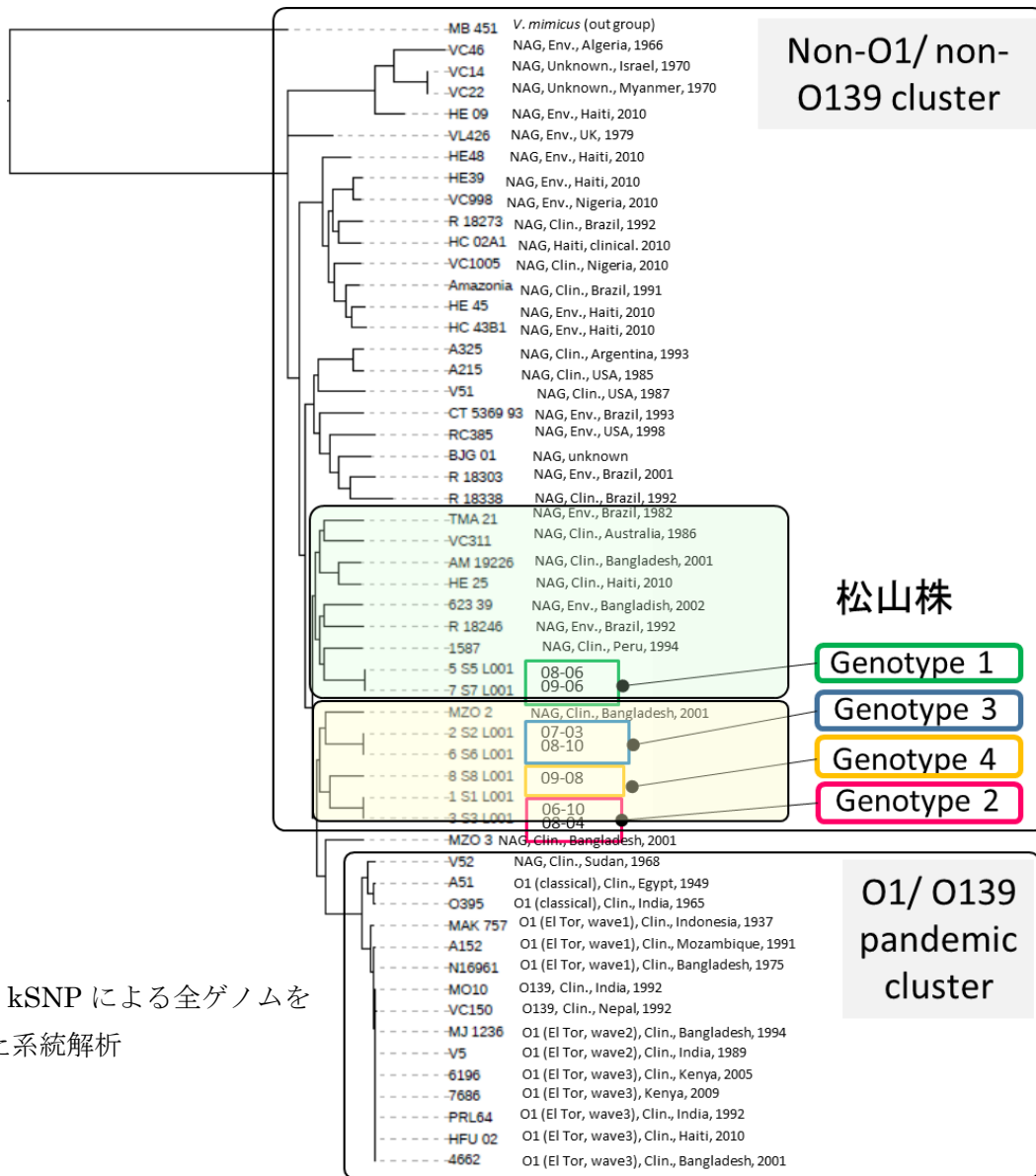


図 3 kSNP による全ゲノムを用いた系統解析

表 1 代表 7 株の病原性関連遺伝子および薬剤耐性遺伝子プロファイル

	Genes	Genotype						
		1	2	3	4			
		08-06	09-06	06-10	08-04	07-03	08-10	09-08
Genes relating to cholera pathogenesis	<i>ctxA</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>ctxB</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>tcpA</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>tcpI</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>tcpH</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>rtxA</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>ace</i>	—	—	—	—	—	—	—
	<i>zot</i>	+	+	+	+	+	+	+
other toxins	<i>nanH</i>	—	—	—	—	—	—	+
	<i>hap</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>hlyAet</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>stn</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T6SS	<i>vasH</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>vasA</i>	+	+	+	+	+	+	+
T3SS	<i>vscN</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>vspD</i>	—	—	—	—	—	—	+
	<i>vscC</i>	—	—	—	—	—	—	—
Antibiotics resistance genes	<i>catB9</i>	+	+	+	+	—	—	+
	<i>QnrVC4</i>	—	—	—	—	+	+	—
	<i>sul2</i>	—	—	—	—	+	+	—