

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。世界各地での大規模流行を引き起こし、我が国の「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症法）で三類感染症とされているのは毒素産生型の *V. cholerae* でありこれをコレラ菌とよぶ。世界ではコレラは死亡者数が 2.1 から 14 万人で増加傾向にある極めて重要な下痢性感染症のひとつである。一方、近年我が国ではコレラは年間 10 件以下の報告にとどまっており、そのほとんどが渡航先での感染によるものである。

一方、毒素非産生型の *V. cholerae* はナグビブリオとよばれ、食中毒の原因となる。我が国では 2013 年に輸入ニシ貝を原因食材とする、患者数 396 名の大規模集団食中毒の発生が報告された。このように *V. cholerae* による感染症は起因菌の毒素産生性にかかわらず輸入感染症に位置づけられている。そのため日本の水圏環境中における *V. cholerae* の動態に関する研究は極めて少なく、1990 年代以降の報告はほとんどない。これまでの LaMer 共同研究から松山市河川および沿岸域には毒素非産生型の *V. cholerae* が年間を通じて存在することが明らかになった。近年、他の細菌と同様、*V. cholerae* の薬剤耐性化が指摘されており、これを正しく評価するためには抗菌薬に暴露されていない *V. cholerae* の薬剤耐性遺伝子保有状況を知ることが必要不可欠である。長期にわたり本菌による感染症の発生がほとんどない我が国の水圏環境は、このような選択圧のない自然環境中の *V. cholerae* の耐性遺伝子保有状況を知るのに極めて適している。

そこで本研究では、松山市河川および沿岸域から分離された *V. cholerae* の保有する薬剤耐性遺伝子を明らかにするとともに、検出された薬剤耐性遺伝子が宿主の耐性化に実際に寄与していることを明らかにした。また遺伝的系統関係と薬剤耐性遺伝子保有のプロファイルを照らし合わせ、環境中で *V. cholerae* 間で遺伝子伝達が生じている可能性を明らかにした。

【方法】

1. **全ゲノムデータ配列からの薬剤耐性遺伝子の抽出** 既に取得済みであった、松山市河川および沿岸域から分離された *V. cholera* 49 株の全塩基配列それぞれを、薬剤耐性遺伝子データベース CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) に照らし合わせて網羅的に検出した。
2. **PCR 法による薬剤耐性遺伝子の確認** 上記で検出された耐性遺伝子について、配列情報をもとに検出用プライマーを設計し PCR 法による検出および得られた増幅産物のシーケンスを行い、実際に遺伝子がコードされていることを再度確認した。
3. **薬剤感受性試験** 検出された耐性遺伝子情報をもとに対象とする抗菌薬 12 種類を決定し、これらに対する *V. cholerae* の最少発育阻止濃度を微量液体希釈法により測定した。方法はアメリカの Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI) が提唱する方法に準拠した。

【結果と考察】

松山由来 *V. cholerae* 49 株のゲノム情報について薬剤耐性遺伝子データベース探索を行った結果、 β ラクタム系抗菌薬耐性遺伝子 *varG*、*bla*_{CARB-7}、テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet*(59)、サルファ剤耐性遺伝子 *sul2*、クロラムフェニコール耐性遺伝子 *catB9*、キノロン耐性遺伝子 *qnrVC4*, *qnrVC7* の 7 つの耐性遺伝子が検出された。保有率は高い順に *varG* が 88%、*catB9* 62%、*qnrVC4*, または *qnrVC7* が 24%、*sul2* が 18%、*tet*(59) 6%、*bla*_{CARB-7} が 4% であった (表 1)。

これらの耐性遺伝子が実際に宿主の耐性化に関与しているかを明らかにするために、12 種類の抗菌薬について MIC 値を測定し、耐性遺伝子保有との関係をみた結果、アンピシリン、テトラサイクリン、トリメトプリム・サルファメトキサゾール (TMP-SMX) 合剤およびシプロフロキサシンの 4 種類では耐性遺伝子保有群の方が非保有群に比べて高い MIC 値を示し、これらの耐性遺伝子は宿主の耐性化に関与していることが示唆された (図 1)。また特にアンピシリン、テトラサイクリンに対する MIC 値は高く臨床での基準値において耐性と判断されるレベルであった。一方、メロペネムおよびクロラムフェニコールに関しては耐性遺伝子保有率は高かったものの、保有の有無と MIC 値に関連は見られず、これらの遺伝子が宿主の耐性化に関与している可能性は低いと考えられた。以上の結果から自然環境中に生息する *V.*

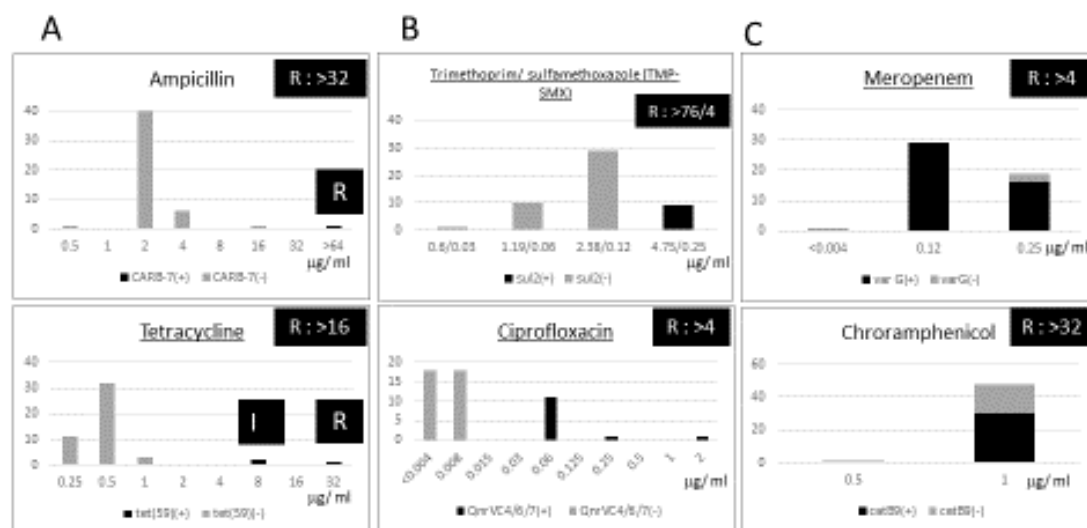
cholerae の中には薬剤耐性遺伝子をもつものが存在し、環境中での耐性遺伝子のリザーバーとなっていることが明らかになった。さらにテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(59)*をはじめとするいくつかの耐性遺伝子は宿主の耐性化に寄与していることが示唆された。

またテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(59)*保有株は、全ゲノムを用いて作製した松山由来 *V. cholerae* 系統樹内で Genotype 3 に属していたが本系統内には同時に非保有株も存在し（図 2）、環境中における *tet(59)*の伝播が強く示唆された。今後両者のゲノムを比較することでこれらの耐性遺伝子が利用している可動性因子（mobile genetic elements）を明らかにする予定である。

また宿主のフェノタイプに影響していると考えられる耐性遺伝子 *tet(59)*、*sul2*、*QnrVC4*、*QnrVC7* を保有する株は系統樹の一部に偏っており、遺伝子伝播の頻度が他より高い系統が存在することが示唆された。さらにこの 4 つの耐性遺伝子はテトラサイクリン、TMP-SMX 合剤、シプロフロキサシンといずれもアメリカ CDC（疾病対策センター）が、重症化したコレラの治療に推奨している抗菌薬（<https://www.cdc.gov/cholera/treatment/antibiotic-treatment.html>）に対する耐性遺伝子であり、保有株の MIC 値からこれらの耐性遺伝子は実際に宿主の耐性に寄与していると考えられた。このように、もともと自然環境中には治療薬に対する耐性遺伝子を保有する *V. cholerae* が存在しているという事実は、臨床現場における極めて慎重な抗菌薬使用の必要性を強く示唆するものである。

表 1 松山河川、沿岸由来 *V. cholerae* 49 株の薬剤耐性遺伝子保有率(株数)

<i>varG</i>	<i>catB9</i>	<i>q nrVC4</i> / <i>q nrVC7</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(59)</i>	<i>bla</i> <i>CARB-7</i>
88% (44)	62% (3)	24% (12)	18% (9)	6% (3)	4% (2)



R:耐性、I:中間

下線をひいた抗菌薬:アメリカCDCが*V. cholerae*感染症治療薬として推奨。

図2 *V. Cholerae*の耐性遺伝子の有無とMIC値の関係

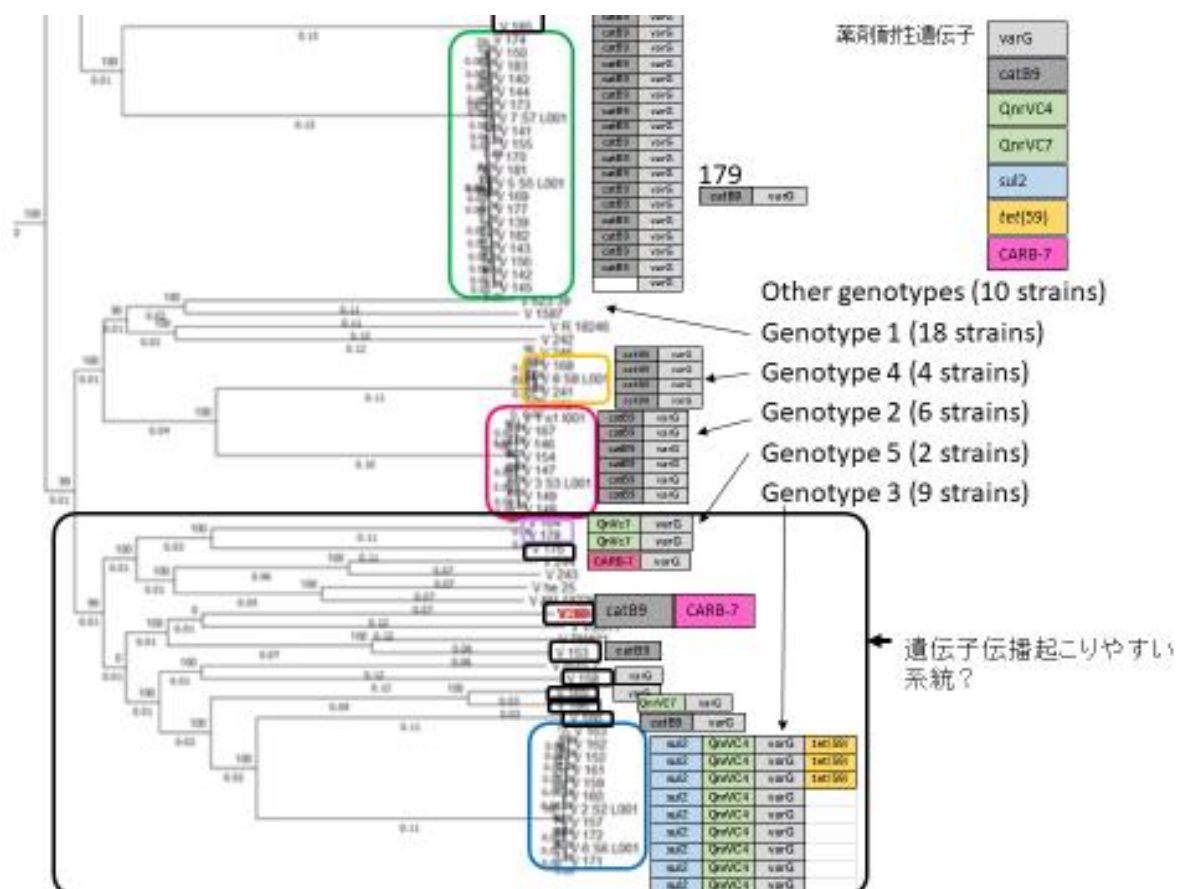


図3 松山河川、沿岸由来 *V. cholerae* の系統分類と薬剤耐性遺伝子保有状況