

平成 24 年度 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

コレラ流行地における *Vibrio cholerae* の変遷について基盤情報を得るため、multilocus variable number tandem repeat analysis による分子疫学解析を行った。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供試菌株は全て El Tor variant 型 *V. cholerae* であったが、MLVA によるクラスター解析では比較的高い遺伝的多様性を示した。しかしながら、他のアジア各国由来の菌株との比較ではインド由来株でクラスターを形成し、コレラ流行株に地域性があることが示唆された。

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* 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* 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* (El Tor variant 型 *V. cholerae*) 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*

(Haitian variant 型 *V. cholerae*) が発見された。その後の研究により Haitian variant 型 *V. cholerae* 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* と Haitian variant 型 *V. cholerae* の両者が分離されている。

このように世界流行の最中において *V. cholerae* O1 は変異を繰り返しており、今後も新たなコレラ流行株の出現が予想される。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) で保存されている *V. cholerae* の分子疫学解析は重要である。そこで本研究課題では NICED より提供された *V. cholerae* のゲノム DNA を用いて、ゲノム情報を元にした分子疫学解析手法を確立するとともに、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た。

B. 研究方法

1994 年から 2004 年にインドで分離された 42 株の *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 multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を行い、Bionumerics ソフトウェアによる分子疫学解析を行った。また、シーケンスにより *ctxB* の遺伝子型を決定した。

C. 研究結果

提供を受けた 42 株のゲノム DNA にうち、*ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅が確認されたものは 29 株であった。*ctxB* 遺伝子型別の結果、全ての菌株が El Tor variant 型 *V. cholerae* であり、El Tor 型 *V. cholerae* 及び Haitian variant 型 *V. cholerae* は無かった。29 株のクラスター解析の結果を図 1 に示す。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かった。

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結果を図 2 に示す。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。

D. 考察

V. cholerae は自然環境中において溶原性ファ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。今回は流行株として、1994 年から 2004 年にインドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* を用いた。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*、近年出現したと考えられている Haitian variant 型 *V.*

cholerae も同様に解析し、コレラ流行株の分子疫学情報を蓄積し、データベース化する必要がある。

本研究課題では NICED との国際的な共同研究を行い、中長期的な連携体制を築くことを目指している。今後も継続して NICED から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の分子疫学情報を共有することで、ラボラトリーネットワークを強化し、アジア地域における新規コレラ流行株の監視体制を整えたい。

E. 健康危機情報

特に無し。

F. 研究発表

特に無し。

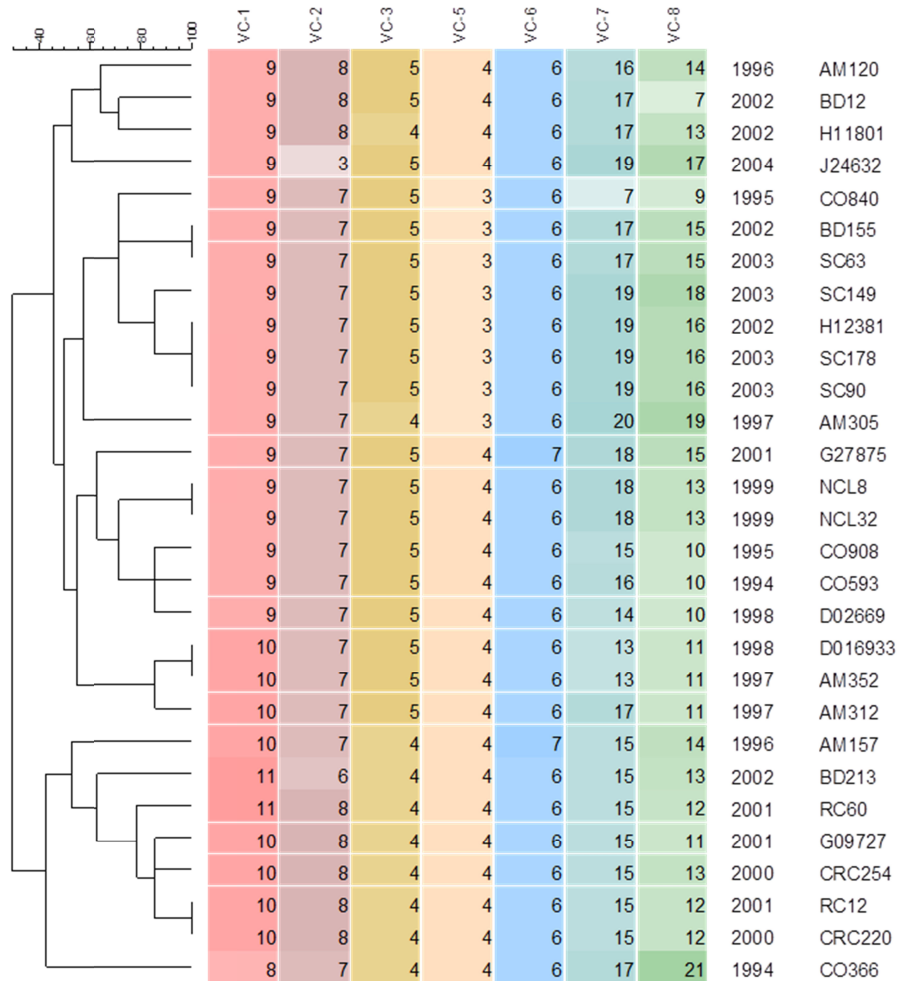


図1 Niced より提供された *V. cholerae* 29 菌株の MLVA クラスター解析。各遺伝子座 (VC-1、VC-2、VC-3、VC-5、VC-6、VC-7) のリピート数、分離年及び菌株名を示す。

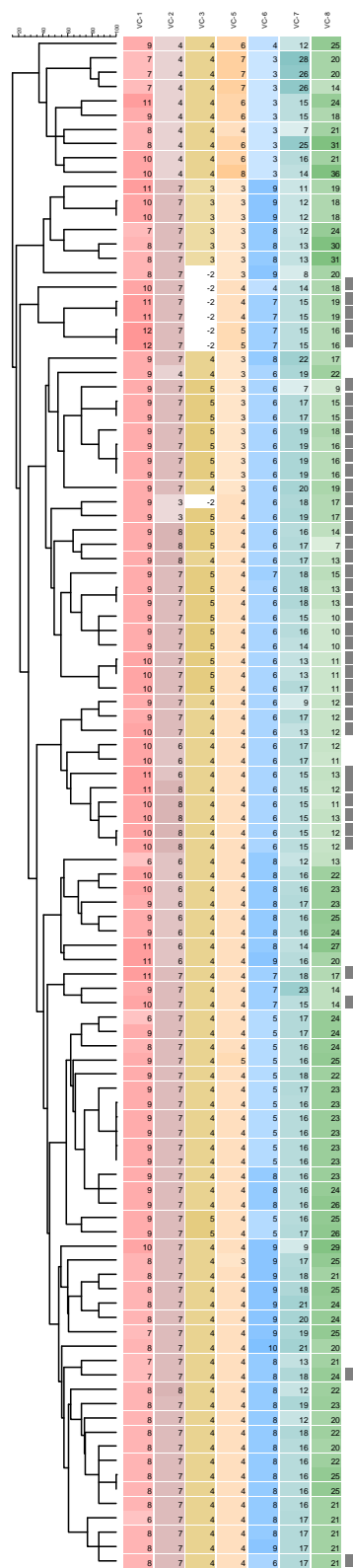


図2 アジア地域由来 *V.cholerae* の MLVA クラスタ解析。NICED より提供された菌株を含むインド由来の菌株を四角で示す。