

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

平成 26 年度 委託業務成果報告

「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」

担当責任者 荒川英二

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 本研究は、わが国をはじめアジア各国で発生する細菌性下痢症に対応するため、主として食水系由来腸管感染症を対象に O 血清型別ならびに病原因子の探索を行い、その発生と流行の傾向についての調査を主眼としている。本年度は中国 CDC (CCDC) の細菌部門とコンタクトを持ち、*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の病原因子の探索に関する共同作業を行った。

「*V. cholerae* non-01/nonm-0139 及び *V. fluvialis* の血清型別に関する研究 - 中国」

中国においてヒト及び環境水から分離されたナグビブリオ及び *V. fluvialis* を中国側カウンターパートの Dr. Biao Kan よりそれぞれ 30 株、10 株分与してもらい、生化学性状試験と簡易同定キット EB20 による菌種の同定、菌種特異的検出 PCR により各菌株の確認試験を行った。*V. cholerae* の病原因子の探索のため、*ctx*、*nag-st*、*hly*、T3SS、MARTX についてそれぞれの遺伝子検出 PCR を行った。また、*V. cholerae* の T3SS については、さらに、の型別を行った。

#### A. 研究目的

コレラ流行地においては、コレラ菌 *V. cholerae* O1, O139 以外に *V. cholerae* non-01/non-0139(以下、ナグビブリオ)による下痢症も発生しており、また、その選択分離培地である TCBS 寒天培地に *V. cholerae* と同様の黄色集落を形成する *V. fluvialis* もしばしば検出される。コレラ流行地以外においても、ナグビブリオによるコレラ様の下痢症の報告もあり、O 血清型別による発生の疫学解析が大いに有効であることが示されている。本研究はナグビブリオ及び *V. fluvialis* の血清型分布とその病原因子保有状況について、中国における状況調査を主たる目的とする。

#### B. 研究方法

#### C. 研究結果および考察

菌株リストは表 1 の通り。ナグビブリオは患者下痢便由来が 10 株、環境水由来が 20 株の計 30 株、*V. fluvialis* は患者下痢便由来が 9 株、魚由来株が 1 株であった。分離年はナグビブリオが 2007～2010 年、*V. fluvialis* が 1963～2010 年であった。

ナグビブリオに関しては、ヒトに対する病原因子の有無が下痢症との関連から重要な点である。表 1 に示すように、VUN3 は *ctx* 陽性で、コレラ毒素産生性であることが考えられる。また、ZJ201-1 は環境水からの分離菌であるが、*nag-st* 陽性であった。その他は、III 型分泌機構が VUN1 を除くすべての患者株で陽性であり、同様に MARTX も VUN1 を除くすべての患者株で陽性であった。環境水からの分離菌で III 型分泌機構(T3SS)や MARTX 陽性の株はヒトに対する病原株である可能性が高いことが推測される。

O 血清型はナグビブリオ、*V. fluvialis* 共に特定の血清型への偏りはなく、各事例に関連性は見られなかった。

近年、赤痢菌やエルシニア感染症において T3SS による病原因子の標的細胞への注入が詳細に解析されている。Vibrio 属菌においても T3SS 保有菌種が見つかり、特に腸炎ビブリオにおいて、耐熱性溶血毒とともに細胞毒性、腸管毒性に関連することが示唆されている。特に T3SS2 がヒトに対する病原性に強く関連すると考えられている。

ナグビブリオにもこの T3SS2 の類似遺伝子を保有する菌株があり、*ctx*、*nag-st* 非保有株の病原性に関連するものと考えられている。さらに T3SS2 には 型と 型とに分かれる遺伝子タイプがある。T3SS2 検出の PCR は以下の通り。

vspD-f aaa aca tca tta gtg aat atc g  
vspD-r tcc att tgt ttg gag ata tcg g  
(900bp)

vcsV2-f att att act att gta cag ttt  
vcsV2-r gtc gcc ttt aac aaa ttt cat  
(250bp)

95C	5min
95C	30sec
45C	30sec
72C	1min 30 cycle
72C	10min
4C	999min

型は *vspD*、*vcsV2* 共に陽性、 型は *vscV2* のみ陽性。

今回、両者の分布について解析を行ったところ、表 2 のような結果であった。表からもわかるように、臨床由来では 型が、環境由来では 型多い傾向があった。すなわち、T3SS2 がヒトに対する病原性に関連するものと推察された。この T3SS2 内には腸炎ビブリオの *trh*(耐熱性溶血毒類似溶血毒)に類似する配列を持つタンパク質がコードされており、腸管細胞に対する毒性に寄与することが考えられる。

T3SS2 陽性のナグビブリオは、2013 年に国内でもメキシコ産ニシ貝を原因とした集団食中毒事件でも検出されており、今後ナグビブリオ下痢症の病原因子探索の際には、重要な標的因子として解析を行う必要がある。

#### D. 結論

今回中国との共同研究において、中国での分離株を日本側に分与してもらうことが出来、

共同研究の基本となる材料の共有ができたことは、今後の共同研究を行う上でも非常に重要な点である。

ナグビブリオ下痢症の病原性株の探索に T3SS2 遺伝子を標的として行うことが有効と考えられ、これら情報の共有を行うことや技術の支援を行うことでこれからさらに発展が見込まれるものと期待される。

中国側からは *V. fluvialis* の血清型について、非常に興味を持って取り組みたいと申し入れがあり、今後さらに発展させていくことが両国ラボラトリーの共通認識である。

E. 健康危機情報  
特になし

F. 研究発表  
学会発表

佐々木麻里、成松浩志、緒方喜久代、荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌、大西真 ニシ貝を原因食品とするナグビブリオによる食中毒の事例解析、第 48 回腸炎ビブリオシンポジウム、2014 年、函館

表 2 中国分離株におけるナグビブリオの III 型分泌機構(T3SS2)保有状況

由来	T3SS2	T3SS2	なし	合計
患者便	4 (44%)	1 (11%)	4 (44%)	9
環境水	1 (6%)	2 (11%)	15 (83%)	18
合計	5 (19%)	3 (11%)	19 (70%)	27