

新興型腸炎ビブリオの流行要因に関する研究

大倉正稔

Study on why the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* strains have been implicated in large epidemics

Masatoshi OKURA

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は沿岸付近の海水および魚介類体表に広く分布する細菌で、耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin; TDH) あるいは TDH 類縁溶血毒 (TDH related hemolysin; TRH) を産生する菌株に汚染された食品を介して食中毒を起こす。本菌は 11 の菌体 (O) 抗原および 65 の莢膜 (K) 抗原の組み合わせにより血清型別されているが、食中毒を起こす血清型は多様である。しかしながら、1996 年以降、アジアを中心に O3:K6 血清型株による事例が急増した。さらに興味深いことに、これらの菌株は様々な分子生物学的手法による解析の結果、同一のクローンから派生したと考えられ、このような現象がこれまでの腸炎ビブリオ食中毒でみられなかったことから、新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) と総称されている。新興型腸炎ビブリオによる事例は現在、アジアだけでなく米国や南米、ヨーロッパ、アフリカの国々まで拡大している。また、2000 年以降は、O3:K6 以外の血清型を示す新興型腸炎ビブリオ株が次々と臨床例から分離されている。一方、これまで新興型腸炎ビブリオとそれ以外の株間で毒素産生量や抗生物質感受性、様々な環境ストレスに対する感受性等が比較されてきたが、明確な差異は認められておらず、なぜこのように世界的な流行を起こしているのかは依然として解明されていない。

そこで、本研究では新興型腸炎ビブリオの世界的流行の要因について新たな知見を得るべく、まず新興型腸炎ビブリオに特異的な遺伝子を同定し、その遺伝子の機能から流行要因との関連性を明らかにすることを試みた。次に、特徴的な表現型として、「次々と異なる血清型株が出現している」ことに着目した。抗原性の変換は宿主の免疫系やファージによる感染を逃れうることから、流行の要因の 1 つとなる可能性がある。そこで、腸炎ビブリオでは明らかとなっていない O および

K 抗原の合成に関連する遺伝子領域を推定し、抗原変換の詳細を解明するべく、同領域の塩基配列の比較ならびに解析を行った。

第1章 新興型腸炎ビブリオに特異的な遺伝子(群)の検索

新興型腸炎ビブリオに特異的な遺伝子を同定するため、ゲノムサブトラクション法を行った。本法は断片化した 2 種のゲノム DNA (Tester DNA および Driver DNA) をハイブリダイゼーションし、相同性の高い領域を除去していくことで片方のゲノム (Tester DNA) に特異的な DNA 断片を検出する。本法により、1 株例外が認められたものの、供試した新興型腸炎ビブリオ 55 株中 54 株が保有し、非新興型株 98 株すべてが保有しない 1 つの DNA 断片を検出した。2003 年に決定された新興型腸炎ビブリオのゲノム情報より、この断片は新興型株で特異的な挿入が認められる約 16-kbp の DNA 配列上にあり、この配列の構成遺伝子としてファージに関連する遺伝子が複数含まれていることが明らかになった。また、この 16-kbp の DNA 配列がヒストン様 DNA 結合タンパク HU-*a* の ORF 内に挿入されており、その影響で HU-*a* の構成アミノ酸の C 末端に置換および付加が起っていた。以上のことから、ファージに由来すると考えられる 16-kbp の DNA 配列上の遺伝子、あるいはこの配列の挿入による HU-*a* の変異が腸炎ビブリオの流行要因に寄与している可能性が指摘された。

第2章 新興型腸炎ビブリオの表層抗原の変換に関連する遺伝子群の解析

腸炎ビブリオは Lipopolysaccharide (LPS) の O-side chain を持たず、core oligosaccharide (core OS) 領域が O 抗原として認識されていることがこれまでに明らかになってい

る。しかしながら、腸炎ビブリオの K 抗原の決定基および O:K 抗原の合成に関連する遺伝子群に関してはその詳細が明らかにされていない。そこで、In silico の解析を行ったところ、全ゲノム配列が決定されている新興型腸炎ビブリオ O3:K6 血清型 RIMD2210633 株は既知の *Vibrio cholerae* の様々な血清型株の core OS 合成関連遺伝子群だけでなく、O-side chain 合成関連遺伝子群と同一性を示す遺伝子領域を保有することが明らかになった。この 2 つの領域における PCR-RFLP 解析の結果、*V. cholerae* の core OS 相当領域は腸炎ビブリオの O 血清群ごとに、O-side chain 相当領域は O 血清ではなく K 血清群ごとに類似したパターンを示した。さらに RIMD2210633 株のゲノム情報によると、同領域の構成遺伝子の多くが、すでに他種で同定されている糖の合成や転移・修飾に関連する酵素遺伝子と同一性がみられた。以上のことから、この領域が血清型の相違に関連していると考え、O4:K68 血清型株の同領域の塩基配列を決定し、O3:K6 血清型株と比較した。その結果、約 50kbp の O3:K6 抗原関連遺伝子群が全く別の約 62kbp の遺伝子群と入れ替わっていることが明らかとなった。さらに、決定した O4:K68 血清型株の同領域遺伝子の保有分布を PCR により様々な血清型株について調べたところ、O4:K68 株の同領域は他の O4 および K68 血清群の株も保有していると考えられた。以上のことから、本研究で同定した O:K 抗原関連遺伝子群が 1 ステップ (O および K 同時) あるいは 2 ステップ (O と K が別々) の相同

組換えを介して、入れ替わることにより新たな血清型の新興型腸炎ビブリオ株が出現していることが示唆された。最後に、O3:K6 血清型と他の血清型の新興型腸炎ビブリオ株間の抗原関連遺伝子群の境界領域について解析した結果、本研究で使用した O3:K6 以外の血清型の新興型腸炎ビブリオ株は *V. cholerae* の *rjg* 遺伝子に相当する ORF の一部あるいは全てを欠失していることが分かった。*rjg* は *V. cholerae* において多様な DNA の組換えの際に足場となっている可能性が報告されており、この *rjg* に相当する ORF の欠失が新興型腸炎ビブリオの抗原変換に重要な役割を果たしている可能性が指摘された。

本研究において、新興型腸炎ビブリオに特異的な遺伝子配列を同定することができた。また、腸炎ビブリオの O:K 抗原関連遺伝子群を同定し、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオにおけるこの遺伝子群の入れ替えを確認することができた。今回、得られた新たな知見のみでは、新興型腸炎ビブリオの決定的な流行要因を明らかにすることはできなかったが、今後これらの知見を基にした新興型腸炎ビブリオの流行要因の解明が期待される。

神戸大学大学院自然科学研究科 農学博士
平成 20 年 3 月 25 日授与