

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 大 仲 賢 二 (神奈川県) |
| 学位の種類 | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 乙第19号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年2月12日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3条第3項該当 |
| 学位論文題名 | 海水、海泥、カキ及び海産魚類から分離した <i>Vibrio vulnificus</i> 並びにヒト臨床例由来の <i>V. vulnificus</i> の疫学的検討 |
| 論文審査委員 | (主査) 福 山 正 文 (副査) 松 田 基 夫 (副査) 山 本 静 雄 |

論 文 内 容 の 要 旨

Vibrio vulnificus (*V. vulnificus*) は、海水や汽水を主な生息域とする低濃度好塩性のグラム陰性桿菌である。本菌のヒトへの感染例は、1970年に Roland がヒトの下肢創傷部の皮膚滲出液から本菌分離について報告したのが最初である (Roland, F. P.: New Engl. J. Med., 282:1306, 1970)。本菌は、健康なヒトには感染しないが、肝疾患患者や免疫力の低下したヒトに感染して重篤な感染症を引き起こすことから、近年注目されている。本菌感染症は、臨床症状の違いによって、経口感染型、創傷感染型及び胃腸型の3タイプに分類されている。とくに経口感染型では、発症すると高い割合で敗血症を起し、重篤化して死亡率も高い。本菌の疫学的調査に血清学的手法や分子生物学的手法が用いられているが、詳細な報告はみられない。それ故に、本菌の感染源や感染経路については不明な点が多いのが実状である。また、薬剤感受性については、臨床治療に用いられている各種抗菌剤に対する系統的な検討は行われておらず、その耐性度も明らかにされていないのが実状である。

そこで著者は、本菌の基礎的研究の一環として、自然環境下における本菌の分布状況と汚染菌量の調査を行い、本菌が海水、海泥、カキ及び海産魚類の5.4～54.8%に分布していることを明らかにした(大仲ら: 感染症誌、76、528、2002; Oonaka *et al.*: Jpn. J. Food Microbiol., 25、89、2008)。

本研究の概要は次のとおりである。

最初に、海水、海泥、カキ及び海産魚類から分離した株(環境由来株)とヒト臨床由来株について Shimada らの方法 (Shimada *et al.*: Jpn. J. Med. Sci. Biol., 37, 241, 1984) に準拠して血清型別を行い、薬剤感受性を検討した。次に、本菌の感染源や感染経路を明らかにする目的で、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 法で解析を行った。

I. 環境由来及びヒト臨床由来の *V.vulnificus* 分離株の血清型別と薬剤感受性

本研究には、環境由来の917株及び病院から分与されたヒト臨床由来の62株の *V.vulnificus*、合計979株を用いた。前者の917株は、千葉県、東京都、徳島県の海水、海泥、カキ（1998年10月～2000年11月に採取、分離した）及び全国9カ所の海産魚類（2003年5月～2004年9月に採取、分離した）、後者のヒト臨床由来株は、全国11カ所及び海外で分離された株を用いた。Shimadaらの作成した *V.vulnificus* の血清型（O1～O18：O17、O18は欠番）を用いて血清型別を行ったところ、587株（60.0%）が13血清型に型別されたが、残りの392株（40.0%）については型別不能であった。その型別不能株について、新たにO19～O23の5つの血清型を追加作成して血清型別を行ったところ、122株がこれらの血清型に型別することができた。そして、その結果型別不能株は最終的に270株（27.6%）に減少した。

環境由来の917株では655株（71.4%）が18血清型に型別され、それらの中ではO7が371株（40.5%）と最も多く、続いてO4が58株（6.3%）、O22が45株（4.9%）、O19が37株（4.0%）であった。しかし、残り262株（28.6%）は型別不能であった。一方、ヒト臨床由来の62株では54株（87.1%）が8血清型に型別され、それらの中ではO4が27株（43.5%）と最も多く、続いてO7が8株（12.9%）、O6が7株（11.3%）、O1が5株（8.1%）で、残り8株（12.9%）は型別不能であった。この様に、血清型別に関する解析の結果、両方の由来株には共通してO7とO4が多く認められることから、両血清型と起病性との間には関連性があることが示唆される。

次に採取した地域と血清型の異なる環境由来の191株とヒト臨床由来の57株の計248株について、20薬剤を用いて薬剤感受性試験を行い、各種薬剤に対する Minimum Inhibitory Concentration (MIC)₉₀ を検討した。環境由来株の MIC₉₀ は、Meropenem (MEPM) と Ciprofloxacin (CPFX) が各 0.05 µg/ml と最も抗菌力が高く、次に Doxycycline (DOXY) と Minocycline (MINO) が各 0.2 µg/ml、Tetracycline (TC) が 0.39 µg/ml、Chloramphenicol (CP) と Nalidixic acid (NA) が各 0.78 µg/ml、Cefotaxime (CTX) 及び Erythromycin (EM) が各 3.13 µg/ml、Gentamicin (GM) が 6.25 µg/ml、Ampicillin (ABPC)、Cefaloridine (CER)、Cefalotin (CET) 及び Cefoperazone (CPZ) が各 12.5 µg/ml、Piperacillin (PIPC)、Cefmetazole (CMZ)、Latamoxef (LMOX) 及び Amikacin (AMK) が各 25 µg/ml、Kanamycin (KM) が 50 µg/ml、Lincomycin (LCM) が 100 < µg/ml であった。環境由来株では、リンコマイシン系の LCM に対して耐性株が認められた。一方、ヒト臨床由来株の MIC₉₀ は CPFX が 0.05 µg/ml と最も抗菌力が高く、続いて MINO が 0.1 µg/ml、DOXY が 0.39 µg/ml、TC と NA が各 0.78 µg/ml、EM が 3.13 µg/ml、GM が 12.5 µg/ml、CER、CET、KM 及び AMK がいずれも 50 µg/ml であり、ABPC、PIPC、CPZ、CTX、CMZ、LMOX、MEPM 及び LCM のいずれもが 100 < µg/ml であった。ヒト臨床由来株では β-ラクタム系やリンコマイシン系に対して耐性株が多く認められた。

以上の様に、ヒト臨床由来株は環境由来株に比べて β-ラクタム系やアミノグリコシド系の薬剤に耐性傾向が高いことが明らかになった。

Ⅱ. 環境由来株及びヒト臨床由来株の分子疫学的検討

分子疫学的検討は環境由来の355株とヒト臨床由来の65株の計420株について、*Sfi* Iと*Not* Iを用いた無傷ゲノムDNA切断後のPFGEパターンで行った。その結果、*Not* Iでは312株(74.3%)で、*Sfi* Iでは411株(97.9%)でそれぞれPFGEパターンが得られ、*Sfi* Iの方がこれら*V.vulnificus*株の株間識別能において優れていることが明らかになった。また、DNAの切断パターンで、*Not* Iでは約20~600 kilo base pair (kbp)の間に15本から22本のバンドが、*Sfi* Iでは20~500 kbpの間に15本から22本のバンドがそれぞれ確認された。次に、切断が高い割合で認められた制限酵素*Sfi* Iで切断された411株(環境由来の349株、ヒト臨床由来の62株)のPFGE像の類似度が89%以上の場合を同一群としてUnweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean(UPGMA)法によるクラスター解析を行った。その結果、同一群に属する環境由来株とヒト臨床由来株は少なく、18組のみが同一群に位置することが明らかになった。また、一致した18組の中で4組(22.2%)は同一血清型であったが、他の14組(77.8%)は異なる血清型であった。さらに、*V.vulnificus*の採取場所別に解析したところ、採取場所が同一地点であった18組中10組(55.6%)で同一血清型が認められたが、他の8組(44.4%)では異なっていた。なお、同一血清型が認められた10組中1組(10.0%)の*V.vulnificus*は東日本地域の海水と西日本地域のカキからそれぞれ分離されたものであった。由来別では18組中15組(83.3%)が環境由来株、2組(11.1%)がヒト臨床由来株、1組(5.6%)が環境由来株とヒト臨床由来株の両方の由来であった。

以上の様に、*V.vulnificus*の血清型別に関する解析で、既知の血清型に新たに筆者が追加作成した血清型を加えて検討したところ、環境由来株では71.4%が、ヒト臨床由来株では87.1%がそれぞれ血清型別されることが明らかになった。また、両由来株は共通してO7やO4に型別される菌株が多く認められ、両血清型と起病性との間に関連性があることが示唆された。

薬剤感受性試験で、ヒト臨床由来株はβ-ラクタム系やアミノグリコシド系の薬剤に対して耐性傾向にあることが明らかになった。

分子疫学的検討では、*Not* Iでは76.9%、*Sfi* Iでは97.9%の切断率がそれぞれ示され、本菌のゲノムDNAの切断には*Sfi* Iが優れていることが明らかになった。さらに、*Sfi* IによってDNA切断した菌株のPFGEの泳動像をUPGMA法でクラスター解析を行ったところ、PFGE法が本菌の分子疫学的解析に応用可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Vibrio vulnificus (*V.vulnificus*) は、海水や汽水を主な生息域とする低濃度好塩性のグラム陰性桿菌である。本菌のヒトへの感染例は、1970年にRolandがヒトの下肢創傷部の皮膚滲出液から本菌を分離したのが最初である(Roland, F. P.: New Engl. J. Med., 282:1306, 1970)。本菌は、健康なヒトには感染を起こさないが、肝疾患患者や免疫力の低下したヒトに感染して重篤な感染症を引き起こすことから、

注目されている。本菌感染症は臨床症状の違いによって、経口感染型、創傷感染型及び胃腸型の3タイプに分類されている。とくに経口感染型では、発症すると高い割合で敗血症を惹起し、重篤化して死亡率も高い。本菌の疫学的調査に血清学的手法や分子遺伝学的手法が用いられているが、いずれにおいても詳細な報告は少なく、本菌の感染源や感染経路については不明な点が多い。また、臨床治療に用いている各種抗菌剤に対する系統的な薬剤感受性については検討されておらず、その耐性度の実態は明らかにされていないのが実状である。

そこで著者は、本菌の基礎的研究の一環として、自然環境下における本菌の分布状況と汚染菌量の調査を行い、本菌が海水、海泥、カキ及び海産魚類の5.4～54.8%に分布していることを明らかにした(大仲ら：感染症誌、76:528、2002; Oonaka *et al.*: Jpn. J. Food Microbiol., 25:89、2008)。

本研究の概要は以下のとおりである。

本研究では、海水、海泥、カキ及び海産魚類から分離した株(環境由来株)とヒト臨床由来株について Shimada らの方法(Shimada *et al.*: Jpn. J. Med. Sci. Biol. 37: 241, 1984)に準拠して血清型別を行い、薬剤感受性を検討した。次に、本菌の感染源や感染経路を明らかにする目的で、パルスフィールド・ゲル電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)法で解析を行った。

I. 環境由来及びヒト臨床由来の *V. vulnificus* 分離株の血清型別

血清型別には、環境から分離した917株及び病院から分与されたヒト臨床由来の62株の合計979株を用いた。前者の917株は、千葉県、東京都及び徳島県の海水、海泥、カキ(1998年10月～2000年11月に採取、分離した)並びに全国9カ所の海産魚類(2003年5月～2004年9月に採取、分離した)から、後者のヒト臨床由来株は、全国11カ所及び海外で分離された株をそれぞれ用いた。Shimada らの作成した *V. vulnificus* の血清型(O1～O18: O17、O18は欠番)を用いて血清型別を行い、587株(60.0%)が13血清型に型別されたが、残りの392株(40.0%)については型別不能であった。その型別不能株について、新たにO19～O23の5つの血清型を追加作成して血清型別を行ったところ、122株がこれらの血清型に型別された。その結果、型別不能株は最終的に270株(27.6%)に減少したことを明らかにした。

環境由来の917株では655株(71.4%)が18血清型に型別され、それらの中ではO7が371株(40.5%)と最も多く、続いてO4が58株(6.3%)、O22が45株(4.9%)、O19が37株(4.0%)であったが、残り262株(28.6%)は型別不能であった。一方、ヒト臨床由来の62株では54株(87.1%)が8血清型に型別され、それらの中ではO4が27株(43.5%)と最も多く、続いてO7が8株(12.9%)、O6が7株(11.3%)、O1が5株(8.1%)であったが、残り8株(12.9%)は型別不能であった。この様に、血清型別に関する解析の結果、両方の由来株には共通してO7とO4が多く認められ、両血清型と起病性との間には関連性があることが示唆された。

II. 環境由来及びヒト臨床由来の *V.vulnificus* 分離株の薬剤感受性

分離した地域と血清型の異なる環境由来の191株とヒト臨床由来の57株の計248株について、20薬剤を用いて薬剤感受性試験を行い、各種薬剤に対する Minimum Inhibitory Concentration (MIC) を検討した。環境由来株の MIC₉₀ は、Meropenem (MEPM) と Ciprofloxacin (CPFX) が各 0.05 µg/ml と最も高い抗菌力を示し、続いて Doxycycline (DOXY) と Minocycline (MINO) が各 0.2 µg/ml、Tetracycline (TC) が 0.39 µg/ml、Chloramphenicol (CP) と Nalidixic acid (NA) が各 0.78 µg/ml、Cefotaxime (CTX)、Latamoxef (LMOX) 及び Erythromycin (EM) が各 3.13 µg/ml、Gentamicin (GM) が 6.25 mg/ml、Ampicillin (ABPC)、Cefaloridine (CER)、Cefalotin (CET) 及び Cefoperazone (CPZ) が各 12.5 µg/ml、Piperacillin (PIPC)、Cefmetazole (CMZ)、Latamoxef (LMOX) 及び Amikacin (AMK) が各 25 µg/ml、Kanamycin (KM) が 50 µg/ml、Lincomycin (LCM) が 100 < µg/ml であった。環境由来株では、リンコマイシン系の LCM に対して耐性株が認められた。他方、ヒト臨床由来株の MIC₉₀ は、CPFX が 0.05 µg/ml と最も高い抗菌力を示し、続いて MINO が 0.1 µg/ml、DOXY が 0.39 µg/ml、TC と NA が各 0.78 µg/ml、EM が 3.13 µg/ml、GM が 12.5 µg/ml、CER、CET、KM 及び AMK がいずれも 50 µg/ml であり、ABPC、PIPC、CPZ、CTX、CMZ、LMOX、MEPM 及び LCM のいずれもが 100 < µg/ml であった。ヒト臨床由来株では β-ラクタム系やリンコマイシン系に対して耐性株が多いことを確認した。

以上の様に、ヒト臨床由来株は環境由来株に比べて β-ラクタム系やアミノグリコシド系の薬剤に耐性傾向が高いことを明らかにした。

III. 環境由来株及びヒト臨床由来株の分子疫学的検討

分子疫学的検討は環境由来の355株とヒト臨床由来の65株の計420株について、*Sfi* I と *Not* I を用いた無傷ゲノム DNA 切断後の PFGE パターンで行った。その結果、*Sfi* I では411株 (97.9%) で、*Not* I では312株 (74.3%) でそれぞれ PFGE パターンが得られ、*Sfi* I の方がこれら *V.vulnificus* 株の株間識別能において優れていることを明らかにした。また、DNA の切断パターンにおいて、*Not* I では約 20 ~ 600 kilo base pair (kbp) の間に15本から22本のバンドを、*Sfi* I では20 ~ 500 kbp の間に15本から22本のバンドをそれぞれ確認した。次に、切断が高い割合で認められた制限酵素 *Sfi* I で切断された411株 (環境由来の349株、ヒト臨床由来の62株) の PFGE 像の類似度が89% 以上の場合を同一群として Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) 法によるクラスター解析を行った。その結果、同一群に属する環境由来株とヒト臨床由来株は少なく、18組のみが同一群に位置することを明らかにした。また、一致した18組の中で4組 (22.2%) は同一血清型であったが、他の14組 (77.8%) は異なる血清型であった。さらに、*V.vulnificus* の分離場所別に解析したところ、分離場所が同一地点であった18組中10組 (55.6%) で同一血清型を認めたが、他の8組 (44.4%) では血清型が異なっていた。なお、同一血清型を認めた10組中1組 (10.0%) の *V.vulnificus* は東日本地域の海水と西日本地域のカキからそれぞれ分離されたものであった。由来別では18組中15組 (83.3%) が環境由来株、2組 (11.1%) がヒト臨床由来株、1組 (5.6%) が環境由来株とヒト臨床由来株の両方の由来で

あった。

以上の様に、*V. vulnificus*の血清型別に関する解析において、既知の血清型に新たに著者が追加作成した血清型を加えて検討した結果、環境由来株では71.4%が、ヒト臨床由来株では87.1%がそれぞれ血清型別されることを明らかにした。また、両由来株は共通してO7やO4に型別される菌株が多く認められ、両血清型と起病性との間に関連性があることが示唆された。

薬剤感受性試験では、ヒト臨床由来株は β -ラクタム系やアミノグリコシド系の薬剤に対して耐性傾向にあることを明らかにした。

分子疫学的検討では、*Sfi* I 97.9%、*Not* I 76.9%にそれぞれPFGEパターンを認め、本菌のゲノムDNAの切断には*Sfi* Iが優れていることを明らかにした。さらに、*Sfi* IによってDNA切断した菌株のPFGEの泳動像をUPGMA法でクラスター解析を行い、PFGE法が本菌の分子疫学的解析に応用可能であることを示唆する結果を得た。

以上のように、本研究は*V. vulnificus*の疫学的研究を行ったものであり、細菌学、公衆衛生学及び臨床検査学の進展に寄与するところ大であり、博士（学術）の学位授与に値する研究成果であると審査員一同が認めた。