

Title of dissertation			
Characterization of <i>Vibrio cholerae</i> O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017			
RONPAKU Fellow			
Name	Martin Bundi MWEBIA		
Position	Research Officer	ID No.	R11520
Department	Standards and Enforcement Department		
Institution	National Biosafety Authority	Nationality	Kenya
Japanese Advisor			
Name	Kouichi MORITA		
Position	Professor	Institution	Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

Body Text

主 論 文

Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible
for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017

1975 年から 2017 年までにケニアでコレラのアウトブレイクを引き起こしたコレラ菌株の性状分析に関する研究

Martin Bundi, Mohammad Monir Shah, Eric Odoyo, Cyrus Kathiiko, Ernest Wandera, Gabriel Miring'u, Sora Guyo, Daniel Langat, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose

Microbiology and Immunology, 2019, 63:350-358

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田公一教授)

緒 言

コレラの流行は有史以来、特にアフリカや東南アジアなどの地域で発生し、未だ収束はしていない。この約 10 年間でも世界的に流行するコレラ菌に遺伝学的変異が見られた。1961 年、新たな生物型としてインドネシアで出現したエルトルコレラの流行（第 7 次世界流行）の前後で分離されたコレラ菌株のゲノム解明はコレラ菌の進化の理解を深めているものの、本態は不明な点が多い。1971 年、エルトルコレラがアフリカ大陸へ侵入した後、ケニアにおいて発生したコレラの流行はいくつかの流行の波として記録されている。近年、生物

型判定が困難なハイブリッド型コレラ菌株(Nair et al.)が出現し、全世界的規模で従来のエルトールコレラと置き換わり、しかもこの新たな変異コレラ菌の病原性は次第に強くなっているといわれている。エルトールコレラはクラシックコレラとは異なる新たな生物型として定義されてきたが、コレラ菌の生物型を規定する生化学的性状に焦点を当て、1975年から2017年までにケニアで分離されたコレラ流行菌株の生化学的性状および分子生物学的性状の経時的な変遷を分析し、併せてコレラ菌の生物型別の意義についても考察した。

対象と方法

本研究は1975年から2017年までにケニアで発生したコレラ流行発生時に分離・保存されたコレラ菌株146株とアジアで分離されたコレラ菌株19株を含めて、生物型に焦点を当てた生化学的、分子生物学的分析を行った。生物型別試験は従来法に準拠し、羊赤血球を用いた溶血反応、ポリミキシンB感受性、Voges-Proskauer反応、ニワトリ赤血球凝集反応、ファージIV感受性などの5種の生化学試験について検討し、さらにこれまで報告された*ctxA*, *tcpA*, *toxR*, *rstC*, *rtxA*, *hlyA*, *ctxB*, *rstR*, *rsxC*などの菌種鑑別並びに生物型別の際に分析されてきた遺伝子について分子生物学的分析を行った。また分離年で選択した26株のコレラ菌株の系統樹解析については制限酵素 *NotI* を用いたパルスフィールド電気泳動試験を行い、BioNumerics software V7.6 (Applied Maths Inc., Belgium)を用いて分析した。

結 果

1984年までのケニア分離コレラ菌の血清型は小川型で、生物型は典型的なエルトールコレラ菌であった。クラシック型並びにエルトール型の性状を共に持つ新変異株は2007年に出現した。2015年から2017年の間には分離されるほぼ全ての株が新変異株に置き換わり、さらにこれらの株は生物型別試験の一つであるポリミキシンB感受性試験については感受性であった。更に保有するコレラ毒素Bサブユニット遺伝子はクラシック型およびエルトール型の遺伝子を共に保有することが明らかとなった。また全ての新変異株はファージIVに対しては耐性であり、且つエルトール型コレラ菌に特徴的な*rstR*, *RtxC*, *hlyA*, *tcpA* 遺伝子を保有していることが判明した。パルスフィールド電気泳動による分析では、14型の *pulsotypes* があることが判明し、クラスタリングは、ほぼ発生したコレラ流行が異なる生化学的並びに分子生物学的性状をもつ流行の波としてそれぞれの分離年に符合していた。

考 察

1975年から1984年までに分離されたコレラ菌株は典型的なクラシック型、エルトール型の性状を示した。したがって従来法のコレラ菌の5種の生化学試験による生物型別は可能であった。1984年までのケニア分離コレラ菌は典型的なエルトールコレラ菌であったが、2007年にクラシック型およびエルトール型のコレラ毒素Bサブユニットを保有するハイブリッド型の変異株であることが明らかとなり、2017年には全てのコレラ菌株はこの新変異株に置き換わった。この変異株はこれまでの菌株よりさらに病原性が強く、容易に集団の中で伝播することが推定された。またこの変異株はエルトール型コレラ菌に特徴的な*rstR*, *RtxC*, *hlyA*, *tcpA* 遺伝子保有していることから、分子生物学的には基本的に1961年からアジアから伝播してきたエルトール型コレラがバックボーンであることが推定された。しかし今日の変異株は生物型鑑別性状の一つであるファージIV感受性については依然として耐性であるものの、ポリミキシンB感受性に対しては、耐性から感受性に経年変化してきていることが判明した。以上のことからエルトールコレラ菌が出現した1961年当時から現在まで温存されている生化学的性状はファージIVに対する感受性のみであり、もはや生化学的性状検査による生物型別には限界があることが改めて示唆された。

Photos



コレラ菌を培養している実験の様子



公開審査会にて発表している様子