

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22406003

 研究課題名（和文） **バングラデシュのダッカ近郊の淡水域における病原性腸炎ビブリオの生態学的研究**

 研究課題名（英文） **Ecological studies on *Vibrio parahaemolyticus* in fresh water area at suburb of Dhaka, Bangladesh.**

研究代表者

大友 良光 (OTOMO YOSHIMITSU)

弘前大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：90374826

研究成果の概要（和文）：海洋性細菌の腸炎ビブリオについて、バングラデシュのダッカ近郊の河川淡水域の 58 検体並びに淡水域の対照地として汽水域であるベンガル湾に近いエビ養殖田の 53 検体について菌分離を実施した。その結果、淡水域の浮草の根 1 検体、汽水域の 6 検体から病原性菌が分離された。淡水域では季節にかかわらず腸炎ビブリオと淡水性の *V. mimicus* や *V. cholerae*、海洋性の *V. alginolyticus*、*V. fluvialis* の共存も確認され、淡水域における病原性腸炎ビブリオの一層の生態解明の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Halophilic bacterium of *Vibrio parahaemolyticus* was tried to isolate from 32 samples of fresh-water area where were in the suburbs of Dhaka and 53 samples of brackish-water area, or shrimp culture fields near the the Bay of Bengal, Bangladesh. T results showed that pathogenic *V. parahaemolyticus* was isolated from one of waterweed-root in fresh-water area, and 6 samples from brackish-water area. Furthermore, it showed greatly important for the ecology of pathogenic *V. parahaemolyticus* that fresh-water bacterium of *V. mimicus* or *V. cholerae*, and brackish-water bacterium of *V. alginolyticus* or *V. fluvialis* was isolated sometimes from the same samples isolated *V. parahaemolyticus*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：腸炎ビブリオ、淡水域、生態

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸炎ビブリオは夏季における食中毒起因菌の一つで、ヒトはその病原性菌株に汚

染された海産魚介類を喫食して発熱、下痢などを起こす。その病原性の本体は耐熱性溶血毒（TDH）と耐熱性溶血類似毒（TR

H) である。感染者の糞便から分離される菌株はほとんど病原性を有するが、海水や魚介類由来の分離菌株は無毒株が主で病原性菌株はほとんど分離されない。この理由として、検体中の腸炎ビブリオ数に対する毒性菌株数の割合が極端に少ないためと言われているが、その明確な理由は、本菌の発見後60年経過した現在も全く不明である。1995年以来、TDHを単独に産生する血清型O3:K6やO4:K68など特異な遺伝子群を有する新クローンと称される病原菌株による感染者が世界的に増加し、各国ではアウトブレイクの度に自国内の感染源調査が行われているがTDH陽性菌の検出割合は高率とは言えない。Vuddhakulらはタイの汽水域で漁獲された魚介類114検体中アカガイ 1 検体からO3:K6菌株を分離し(Appl. Environ. Microbiol., 2000)、Decepanjaliらはインド洋沿岸のカキの10.2% (5/49) からO3:K6菌株を分離している(Appl. Microbiol., 2005)。

(2) 申請者らは日本の海産魚介類等から低頻度だがO3:K6菌株を3.3% (11/329) 分離し (Appl. Environ. Microbiol., 2003)、環境検体中の調査に河川底泥が有効であると確信した(第38回腸炎ビブリオシンポジウム、2004年)。2007~2008年に外部研究費(平成19, 18年度学術国際振興基金助成事業)を得てバングラデシュ人民共和国のダッカ大学微生物学部の協力を得てベンガル湾に流入する河川河口(汽水)と約200Km上流の内陸部ダッカ市内の河川(淡水)底泥を調査し、一部病原性菌を分離するとともにダッカ市内の河川底泥から多数の菌株を分離し、「腸炎ビブリオは淡水域での生存は不可能」という定説を覆した(第41回腸炎ビブリオシンポジウム, 2007年; Food Safety & Hygiene, 152-162, 2008; the 4th Bangladesh-Japan Joint I

nternational Conference on Microbiology, Food Safety and Hygiene, 2009)。

(3) 腸炎ビブリオが淡水河川から分離されたため、申請者らは発育必須成分の塩化ナトリウムを除いた培地での腸炎ビブリオの発育を検討した結果、タンパク質リッチな環境であれば腸炎ビブリオは生息できることを証明した (Food Safety & Hygiene, 152-162, 2008.)。そこで申請者は河口域での新クローンなどの病原性菌が極端に少ない理由について下記の仮説を立てた。非病原性の腸炎ビブリオは本来、有機物・ミネラルの豊富な河口汽水域 (J. Hgj. Lond. 95:299-307, 1985) の底泥等に常在し、時に魚類やプランクトンの死骸などで増殖するが、病原性腸炎ビブリオは下水道が整備されていない人口密集地の感染者の下痢便とともに河川に流入し多くは淡水に触れて急速に死滅するが、ある程度の菌数は川底の泥や魚、浮き草を汚染して生き残り当該地での生態を維持し、その一部が漂流し菌数を減らしながら非病原性腸炎ビブリオの主な生息環境である河口に漂着する。病原性腸炎ビブリオの新たな生態の提示である。

2. 研究の目的

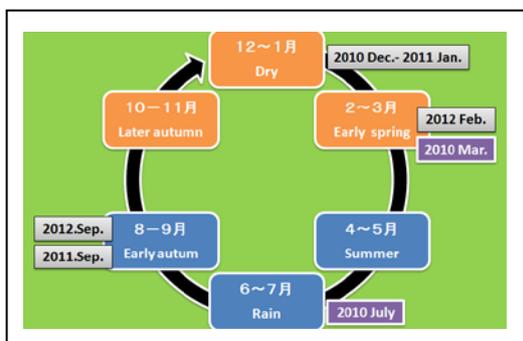
1995年インドの下痢症患者から分離された海洋細菌である腸炎ビブリオの新クローンは隣国バングラデシュを経て世界に伝播している。各国ではアウトブレイクの度に自国の海産魚介類や沿岸環境で感染源調査が行われているが分離例は皆無に近い。申請者は2008年に人口密集都市ダッカの淡水河川の底泥から多数の腸炎ビブリオを分離し本菌の生存が不可能とされていた淡水域で病原性腸炎ビブリオが生息する可能性を世界で初めて示唆した。本研究はダッカの淡水環境での腸炎ビブリオと病原性新クローンの生態を明らか

にし当該国の輸出エビ等の汚染防止とヒトの感染防止に資する。

3. 研究の方法

(1) 現地との協力体制

これまで共同研究を進めてきたダッカ大学微生物部のアーサン教授に引き続き協力研究者として参加していただき、現地の実験室が使用可能であることは了解済みである。試薬や検体採取用具は日本から申請者が持参する。実施期間は3年間とし各年の雨季の7月頃と乾季の2月頃にそれぞれ2週間、著者がダッカに滞在し検体採取と菌分離調査を行う。分離菌の同定、血清型別、そして詳細な遺伝子解析は培養菌液の一部を日本に持ち帰って実施する。初年度はダッカ市内の国立病院などでの年間患者発生動向調査や魚介類の輸出量調査も併せて実施し、最終年度はデータを用いてバングラデシュ国の患者発生予防と輸出魚介類の安全性確保についても考察し関係業界に提示する。



(2) 研究方針

著者が2007年から実施した民間外部研究費による調査経験により、現地での計画の遂行には、①天候がめまぐるしく変化するため検体採取には十分な日数を確保、②高温（30℃以上）・高湿（90%以上）のため肉体疲労が増すので実験は効率的に実施、③市内は連日頻繁に停電となるため培養時間の延長なども考慮、④検体を日本に搬入して実施等を考慮することが重要で

ある。本調査はこれらをすべて含めた計画を立案しており、特別の事態が起きない限りは当初計画どおりの実施が可能である。

(3) 検体

ダッカ周囲の淡水域並びに、その対象としてベンガルデルタの汽水域のエビ養殖場から検体を採取した。

① 淡水域からの検体採取

2010年3月23日（気温37.3℃）、2010年7月16日（気温34.2℃、水温31.7℃）、2010年12月29日（気温25.8℃、水温22.4℃）、2011年9月16日（気温27.8℃、水温29.9℃）、2012年2月11日（気温27.1℃、水温23.6℃）、そして2012年9月25日（気温27.1℃、水温23.6℃）に検体を採取した。

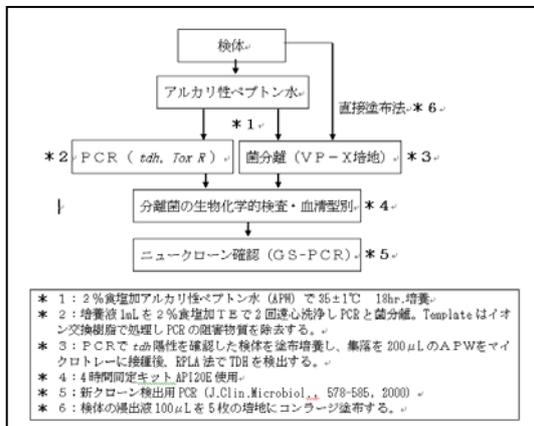
以上の日程で、ダッカ周辺のTurag川下流と上流の浮き草と底堆積泥それぞれ2検体と1検体（浮き草4、底堆積泥2の合計6検体）を毎回採取し、Buriganga川の底堆積泥2検体、Megna川の浮き草3検体あるいは水と底堆積泥各2検体、Padma川の底堆積泥1検体、そしてKhulnaからSatkhiraへ向かう沿道の沼の浮き草と底堆積泥それぞれ1検体を、降水量等の環境用件を考慮して適宜採取した。

② 汽水域からの検体採取

ベンガルデルタのSatkhiraのエビ養殖田（汽水域）から2010年7月18日（食塩濃度1.0%、気温24.0℃、水温22.5℃）、2011年1月2日（食塩濃度1.0%、気温24.0℃、水温22.5℃）、2011年9月20日（食塩濃度0.1%、気温26.2℃、水温27.5℃）、そして2012年2月15日（食塩濃度0.5%、気温29.1℃、水温24.7℃）に検体を採取した。検体の種類はエビ養殖田の底堆積泥、活エビ、そしてエビ養殖田傍の小川の底堆積泥を基本的に各5検体とした。また、エビ養殖田傍の小川の食塩濃度はエビ養殖田よりも0.1%低い値であった。

③ 腸炎ビブリオ調査方法のフロー

検体採取と同時に重量の約1%になるように塩化ナトリウムを添加し、検体は採取後直ちに大学に搬入し下記のフローに従って検査を実施した。



④ 薬剤感受性試験

本研究で分離された腸炎ビブリオのうち *trh* 保有菌株、並びに年別、分離場所別に25菌株を選択し、eテストにより薬剤感受性試験を実施した。使用薬剤はABPC、PIPC、CCL、CTX、IPM、GM、MINO、CP、CL、LVFXの10薬剤とし、感受性測定用培地-N（日水）を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) 淡水域からの腸炎ビブリオ分離

① 全件体数からの分離率

総計58検体中17検体（29.3%）から腸炎ビブリオが分離された。浮草の根から30.0%（9/30；30検体中9検体）、河川の底堆積泥から23.1%（6/26）、河川水から100%（2/2）に分離された。2010年3月23日に浮草の根1 検体から *trh* I 保有の血清型 O₁₁:KUT型と O₈:KUT型の2 菌株が分離された。

② 乾季と雨季の分離率

腸炎ビブリオは乾季に18.8%（6/32）、雨季に42.3%（6/26）から分離された。

③ 年別の検出率

腸炎ビブリオは2010年の乾季と雨季にそれぞれ33.3%（3/9）と83.3%（5/6）、2011年では26.6%（4/15）と20.0%（2/10）、2012年では10.0%（1/10）と25.0%（2/8）から分離された。

④ 分離された腸炎ビブリオの血清型

多様であり年別、場所別、そして乾季・雨季別に何らかの関連性は全く認められなかった。

⑤ 他の *Vibrio* の検出

腸炎ビブリオ以外に発育に食塩が必須の *V. alginolyticus*、*V. fluvialis*、そして *V. furnisii*、並びに発育に食塩を必須としない *V. mimicus*、*V. cholerae* も検出された。2011年9月20日にKhulna近郊の淡水の浮き草の根から腸炎ビブリオ以外に *V. alginolyticus* と *V. cholerae* が同時に検出された（下の表に示す）。

河川名 地名	No. 種類	2010年 3月23日	2010. 7.16	2010. 12.29	2011. 9.16	2012. 2.11	2012. 9.25
Turag R.	1 浮き草根	Vp(zn+)	Vp	nd	Va, Vflu	Va, Vflu	Vflu, Vc
	2 浮き草根	Vp	Vp	nd	Vp, Vflu	Va, Vflu, Vfur	nd
	3 底泥	nd	Vp	nd	nd	Vflu, Vm	nd
	4 浮き草根	nd	Vp	nd	Vm	nd	Vm, Vc
	5 浮き草根	Vflu	Vp	nd	Vm	nd	Vflu, Vm, Vc
	6 底泥	Vp	Vp	nd	nd	nd	Vc
Buriganga R.	7 底泥	/	/	nd	Va	Va, Vflu, Vfur	Vp, Va, Vflu
	8 底泥	/	/	nd	Va	Vflu	Vp, Va
Khulna	9 浮き草根	/	/	Vp	Vp, Va, Vc	Vp, Vflu	/
	10 底泥	/	/	nd	Vflu	Vflu	/
Megna R.	11 浮き草根	nd	/	/	/	/	/
	12 浮き草根	nd	/	/	/	/	/
	13 浮き草根	nd	/	/	/	/	/
	14 水	/	/	Vp	/	/	/
	15 水	/	/	Vp	/	/	/
Padma R.	16 底泥	/	/	Vp	/	/	/
	17 底泥	/	/	nd	/	/	/
	18 底泥	/	/	nd	/	/	/

/; 検体採取なし、nd: 菌分離無し
Vp: 腸炎ビブリオ, **Va:** *V. alginolyticus*,
Vflu: *V. fluvialis*, **Vfur:** *V. furnisii*,
Vm: *V. mimicus*, **Vc:** *V. cholerae*

(2) 汽水域からの腸炎ビブリオ検出

① 全件対数からの検出率

総計53検体中45検体（84.9%）から腸炎ビブリオが分離され、エビ養殖田の底堆積泥、活エビ、そしてエビ養殖田傍の小川の底堆積泥田傍から、それぞれ99.3%（14/1

5)、83.3% (15/18)、80.0% (16/20) と高率に分離された。そのうち *trh* 1 保有菌株が2011年1月のエビ養殖田の底泥1検体から2菌株(血清型O11:KUT、OUT:KUT)、エビ1検体から1菌株 (OUT:KUT)、そしてエビ養殖田に隣接する小川の底堆積泥3検体から4菌株 (O10:KUTが2菌株、O11:KUTが1菌株、OUT:KUTが1菌株)、並びに2012年2月15日にエビ養殖田の底堆積泥1 検体から1菌株 (OUT:KUT) が分離された。

② 乾季と雨季の検出率

腸炎ビブリオは乾季に72.4% (21/29)、雨季に100% (24/24) が分離された。

③ 年別の検出率

2011年1月の検出率が42.9% (6/14) であった以外は100%と高率であった。

④ 他の *Vibrio* の検出

腸炎ビブリオ以外に、発育に食塩を要求する *V. alginolyticus*、*V. fluvialis*、そして *V. vulnificus*などが検出された(下の表に示す)。

河川名 地名	No.	2010年 7月18日	2011. 1.2	2011. 9.20	2012. 2.15
エビ養殖田傍 の小川の底堆 積泥	1	Vp	Vp(<i>trh</i> +)	nd	Vp
	2	Vp	Vp(<i>trh</i> +)	nd	Vp, Vflu
	3	Vp	Vp(2 <i>trh</i> +)	nd	Vp, Vflu
	4	Vp	Vp	nd	Vp, Vflu
	5	Vp	nd	nd	Vp
エビ養殖場の 活エビ	6	Vp	Vp	Vp, Va	Vp
	7	Vp, Vvul	Vp(<i>trh</i> +)	Vp, Va	Vp
	8	Vp	nd	Vp, Va	Vp
	9	Vp, Vvul	/	Vp, Va	Vp
エビ養殖田の 底堆積泥	10	Vp	nd	/	Vp, Vflu
	11	Vp	Vp	Vp, Va	Vp
	12	Vp	nd	Vp, Va	Vp
	13	Vp	nd	Vp, Va	Vp
	14	Vp	nd	Vp, Va, Vflu	Vp
15	Vp	nd	Vp, Va	Vp	

/: 検体採取なし、nd: 菌分離無し
Vp: 腸炎ビブリオ、**Va**: *V. alginolyticus*,
Vflu: *V. fluvialis*, **Vvul**: *V. vulnificus*

(3) 薬剤感受性試験

供試した25菌株は、他研究でのこれまでのデータとほぼ同様の成績をしめた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Yoshimitsu Otomo, Farzana Hossain, Fazle Rabbi, Yuki Yakuwa, Chowdhury Rafiqul Ahsan, Pre-enrichment of estuarine and fresh water environmental samples with sodium chloride yields in better recovery of *Vibrio parahaemolyticus*, *Advances in Microbiology*, 査読有、3, 2013, 21-25. DOI:10.4236/aim.2013.31003

[学会発表] (計4件)

- ① 大友良光、Chowdhury Rafiqul Ahsan: バングラデシュの淡水域における腸炎ビブリオの生態 (Part 2). 第46回 腸炎ビブリオシンポジウム、2012.11.14-16、大分市。
- ② Y. Otomo, M. Yamasaki, N. Kado and C. R. Ahsan: Factors required for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in media without sodium chloride. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011 Congress), Sapporo, (Japan), 2011.
- ③ 大友良光: 今こそ、腸炎ビブリオの生態の解明を! . 第44回腸炎ビブリオシンポジウム、2010.11.25-26、秋田市。
- ④ 大友良光、Ahsan CR : バングラデシュの淡水域における腸炎ビブリオの生態. 第44回腸炎ビブリオシンポジウム、2010.11.25-26、秋田市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大友 良光 (OTOMO YOSHIMITSU)
 弘前大学・大学院保健学研究科・准教授
 研究者番号: 90374826

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: