

地球温暖化にともない拡大が危惧される水環境のコレラ菌汚染に関する インドと日本における比較調査研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 三好 伸一

地球温暖化や水質汚濁の進行は水生病原微生物による水環境汚染を拡大し、水媒介性感染症流行のリスクを高めると考えられている。さて激しい水様性下痢を主症状とするコレラは、地球規模での対策が必要とされる水媒介性感染症の代表例であり、その起因菌であるコレラ菌（ビブリオ・コレレ [*Vibrio cholerae*] のうち、血清型が 01 もしくは 0139 のグループ）は熱帯～亜熱帯地域の水環境に広く生息している。しかし水環境に排泄されたコレラ菌は、暫くすると増殖不可能な休眠型細胞になると考えられている。私達は、ヒトの培養腸管細胞から精製したカタラーゼが休眠型コレラ菌を増殖型へと復帰させること、カタラーゼと同じ活性を有するピルビン酸と可溶性デンプンの混合物も同様の復帰作用を示すことを明らかにした。これらの研究成果により、従来からの検出法である培養法を一部改良することで休眠型細胞の検出が可能となり、コレラ菌による水環境汚染について、より定量的に調査することが可能となった。本研究では、コレラ菌が常在するため、コレラ流行が毎年繰り返されるインド（コルカタ市近郊）、およびコレラ菌が常在していない我が国（岡山県南部地域）において、休眠型細胞を含むコレラ菌による環境水（湖沼や河川地域の水）の汚染状況を調査した。また、水温や水環境汚染の一般的な指標項目（水温、pH、溶存酸素、化学的酸素要求量、アンモニア性窒素、リン酸態リン、大腸菌群数など）との関連性についても解析を行った。

インド東部のコルカタ市近郊で生活水として利用されている池（2カ所）から試料として水を採取し、汎用性の選択分離培地である TCBS 寒天培地、あるいは 0.1%ピルビン酸と 0.1%可溶性デンプンを添加した TCBS 寒天培地に塗抹した。そして、37℃で 16 時間培養したのち、ビブリオ・コレレと思われるコロニー（集落）を釣菌した。次に、100℃で 10 分間加熱して DNA を抽出し、特異的な遺伝子を標的とする PCR を行い、ビブリオ・コレレであることを確認した。さらにコレラ毒素の遺伝子 *ctxA* を標的とする PCR を行い、コレラ菌であるか否かを確認した。その結果、ビブリオ・コレレは全ての試料から検出されたが、コレラ菌は 1 つの試料のみから検出された。また、ピルビン酸と可溶性デンプン混合物の添加効果は観察されなかった。したがって、インドでは環境水がコレラ菌により汚染されているが、汚染しているコレラ菌の密度は、休眠型細胞を含めても、あまり高くはないと思われる。さらに試料中のビブリオ・コレレあるいはコレラ菌の密度は、水温や水環境汚染の一般的な指標項目の測定値とは相関していなかった。本研究では、対照として、コレラ菌が常在していない岡山県の環境水（池 1カ所、河口 1カ所）についても、ビブリオ・コレレによる汚染の状況を調査した。その結果、水環境汚染の一般的な指標項目の測定値が明らかに低いにも係らず、インドとほぼ同じ菌密度で試料がビブリオ・コレレで汚染されていた。

以上のことより、水温の上昇や水質汚濁の進行が、コレラ菌による水環境汚染の拡大の原因となる可能性は否定できないが、水環境汚染の拡大には複数の環境要因が相互に関連しているものと考えられる。したがって、地球温暖化の水媒介性感染症流行へのリスクについては、多方面から総合的に解析し評価する必要があると思われる。また休眠型コレラ菌の感染源としてのリスクについては、ピルビン酸と可溶性デンプンの混合物が休眠型から培養型へと復帰させる効果に関する定量的な解析を行い、その結果に基づいての評価が必要である。

地球温暖化にともない拡大が危惧される水環境のコレラ菌汚染に関する インドと日本における比較調査研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 三好 伸一

1. はじめに

人口の増加と都市への集中、地球温暖化や大気環境汚染など、急激に変化する社会・環境要因の健康に及ぼす影響が懸念されている。健康に影響を及ぼし得る環境要因には、物理的要因（原発事故により注目されている放射線、オゾン層の破壊により増加が危惧される紫外線など）、化学的要因（地球温暖化に関与する二酸化炭素、オゾン層破壊に寄与するフロン類、難分解性の有害な有機塩素系化合物など）、および生物学的要因（病原微生物など）が含まれる。中でも地球温暖化や水質汚濁などは、生物学的要因である水生病原微生物による水環境汚染を拡大し、水媒介性感染症（water-borne infectious diseases）流行のリスクを高めると考えられている。

米のとぎ汁様と形容される激しい水様性下痢を主症状とするコレラは、地球規模での対策が必要とされる水媒介性感染症の代表例である。その起因菌であるコレラ菌（*Vibrio cholerae* 01/0139, つまり血清型が 01 もしくは 0139 のビブリオ・コレレ [*Vibrio cholerae*]) は水環境に広く生息すると考えられている。しかし、たとえ流行期であったとしても、水や魚介類などからコレラ菌が分離されることは極めてまれである。この矛盾の最大の原因として、水環境中に排泄されたコレラ菌が、しばらくは増殖可能であるが、やがて増殖不可能な休眠型となるため、培養法を基本とする従来の検査法では検出されないと理解されている。

私達は JICA 事業（平成 10～19 年度）ならびに文部科学省事業（平成 19～25 年度）に参画し、コレラ流行地域であるインド東部、西ベンガル州コルカタ市のインド国立コレラおよび腸管感染症研究所（NICED）内に設置した岡山大学インド感染症共同研究センターを拠点として、NICED のインド人研究者らとともにコレラ菌に関する研究を行っている。そして、この国際共同研究の中で、ヒトの培養腸管細胞から精製したカタラーゼ（過酸化水素の分解酵素）が休眠型コレラ菌を増殖型へと復帰させることを見出した。さらにカタラーゼと同じ活性を有するピルビン酸（0.1%）と可溶性デンプン（0.1%）の混合物も同様の復帰作用を示すことを明らかにした。これらの成果により、従来の培養法を一部改良することで休眠型細胞の検出が可能となり、コレラ菌による水環境汚染をより定量的に調査することが可能となった。

本研究では、コレラ菌が常在しているため、コレラ流行が毎年繰り返されるインド（コルカタ市近郊）、およびコレラ菌が常在していない我が国（岡山県南部地域）において、休眠型を含むコレラ菌による環境水（湖沼や海域の水）の汚染状況を調査した。そして環境水について、休眠型コレラ菌のリザーバーやコレラの感染源としてのリスク評価を行った。さらには、水温や水環境汚染の一般的な指標項目の測定値との関連性についても解析し、水環境要因の変化がコレラなどの水媒介性感染症のリスクに及ぼす影響も考察した。

2. インドでの水環境汚染調査

2-1. 試料（池の水）の採取

インド東部に位置するコルカタ市では、毎年 4～10 月にコレラが流行する。そこで、この流行期の環境水が、どの程度コレラ菌によって汚染されているのかを調査した。

コルカタ市近郊の 2 カ所の池（採水地点 A および B）から、毎週 1 回、ハイロート採水器を用いて試料（250 mL）を採取した。なお試料を採取した地点 A（Mohisbathan 地区）および地点 B（Duttabad 地区）の池の水は、ともに低所得層の人々が洗濯や水浴び、食器の洗浄な

ど、日常生活において広く利用している（図1）。



図1. 試料を採取したコルカタ市近郊の池（地点Aおよび地点B）

2-2. 採取試料の理化学的性状および生物学的性状

採取した試料について、水温とpHを現地で測定するとともに、簡易水質分析キット（共立理化学研究所）を用いて、溶存酸素（DO）、化学的酸素要求量（COD）、アンモニア性窒素、リン酸態リン、全硬度、および過酸化水素（ H_2O_2 ）を測定した。

表1. 地点Aから採取した試料の理化学的性状

	4月	5月	6月	7月	8月	9月
水温（ $^{\circ}C$ ）	35.2	34.0	34.0	32.4	30.8	32.8
pH	9.07	9.17	8.37	8.20	7.54	7.85
DO（mg/L）	9.30	7.75	6.95	6.32	7.25	8.45
COD（mg/L）	27.5	20.0	20.0	14.4	14.0	13.3
アンモニア性窒素（mg/L）	0.93	0.50	0.88	1.90	1.13	0.55
リン酸態リン（mg/L）	0.88	0.55	0.50	0.60	0.15	0.20
全硬度（mg/L）	350	425	350	440	150	113
H_2O_2 （mg/L）	0	0.025	0	0	0	0

表2. 地点Bから採取した試料の理化学的性状

	6月	7月	8月	9月
水温（ $^{\circ}C$ ）	32.8	31.8	30.6	30.9
pH	8.58	8.00	7.13	7.56
DO（mg/L）	8.20	6.68	6.65	8.90
COD（mg/L）	20.0	20.0	18.3	18.3
アンモニア性窒素（mg/L）	1.00	3.80	2.75	1.00
リン酸態リン（mg/L）	0.10	0.74	0.50	0.50
全硬度（mg/L）	200	180	175	200
H_2O_2 （mg/L）	0	0	0	0

表1および表2に示したように、地点Aあるいは地点Bから採取した試料は、いずれもCODとアンモニア性窒素の値が高く、両地点とも、人為的な汚染により水質の汚濁が進んでいることが示された。しかし水質汚濁が進んでいるにも係らず、DOは比較的高い測定値を示し、

溶存している酸素量は十分であった。また水温については、いずれの試料もコレラ菌の増殖に適した 30℃以上であった。さらに硬度の測定値が 100 mg/L 以上と高く、採取した試料が硬水に該当する水であることも明らかとなった。

次に大腸菌群試験紙あるいは一般細菌試験紙（柴田科学）を用いて、試料中の大腸菌群数および一般細菌数を測定した（図 2）。地点 A あるいは地点 B から採取した試料は、その全てにおいて、大腸菌群数および一般細菌数が高く、両地点ともヒトや家畜のふん便などで汚染されていることが強く示唆された。

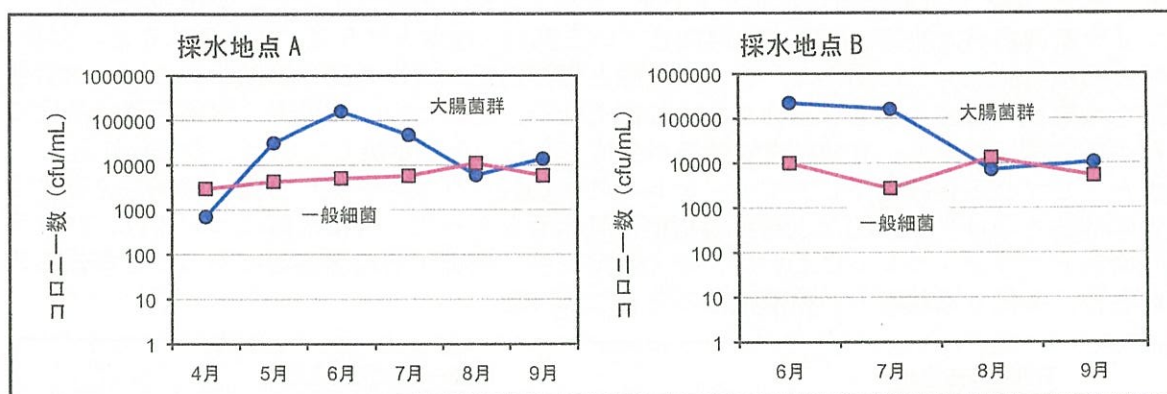


図 2. 地点 A および地点 B から採取した試料の生物学的性状

2-3. 採取試料のコレラ菌汚染

採取した試料を遠心分離（15,000 x g, 20℃, 5 分間）し、コレラ菌を含む微生物を 10 倍～40 倍濃縮した。この濃縮試料 0.1 mL をコレラ菌 (*V. cholerae* 01/0139) など、ビブリオ属細菌に特異的な選択培地である TCBS 寒天培地（栄研化学）、あるいは 0.1% ピルビン酸と 0.1% 可溶性デンプンを添加した TCBS 寒天培地（TCBS-PSS 寒天培地）に塗抹した。そして、37℃ で 16 時間培養したのち、ビブリオ・コレレ (*V. cholerae*) と思われる直径 2～3 mm の黄色のコロニー（集落）を釣菌した。次に、釣菌したコロニーをもう一つの選択培地である ES ビブリオ寒天培地（栄研化学）に接種し、37℃ で 16 時間培養した。そして、ビブリオ・コレレと思われる黄褐色～茶褐色のコロニーを釣菌し、100℃ で 10 分間加熱して DNA を抽出した。この DNA 標品について、ビブリオ・コレレの外膜蛋白質 OmpW の遺伝子 *ompW* を標的として PCR を行い、ビブリオ・コレレであることを確認した。その後、コレラ菌であることを確認するため、コレラ毒素の遺伝子 *ctxA* を標的として PCR を行った。

なお、上述の PCR は次の手順で行った。Quick Taq™ HS Dye Mix (Toyobo) 6.25 μL, プライマーセット（表 3）[*ompW* F および R (10 pmol/μL), もしくは *ctxA* F および R (10 pmol/μL)] 各 0.5 μL, DNA 標品 0.5 μL を十分に混合したのち、nuclease-free water (Ambion) 4.75 μL を加えた。この PCR 反応液について、96℃ で 7 分間加熱して DNA を変性させたのち、96℃ で 30 秒間、64℃ で 30 秒間、68℃ で 30 秒間の増幅反応を 30 サイクル繰り返した。そして、2% アガロースゲルを用いた電気泳動法により、標的遺伝子の断片（*ompW* の場合は 588 bp, *ctxA* の場合は 301 bp）の増幅を確認した。

表 3. PCR に使用したプライマー

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5' -3')	増幅産物
<i>ompW</i> F	<i>ompW</i>	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG	588 bp
<i>ompW</i> R		GAAC TTATAACCAACCCGCG	
<i>ctxA</i> F	<i>ctxA</i>	CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG	301 bp
<i>ctxA</i> R		TCTATCTCTGTAGCCCTATTACG	

通常の TCBS 寒天培地を用いた場合には、5,349 株のビブリオ属細菌が単離され、そのうちの 461 株 (8.6%) がビブリオ・コレレであった。しかしながら、コレラ菌は 2 株しか (ビブリオ・コレレの 0.43%) 単離されなかった。一方、TCBS-PSS 寒天培地を用いた場合には、1.3 倍以上の 7,213 株のビブリオ属細菌が単離された。しかしながら、ビブリオ・コレレの単離数 (475 株)、およびコレラ菌の単離数 (1 株) は、TCBS 寒天培地とほぼ同じであった。したがって、今回の調査結果は、インドの環境水中には休眠型のビブリオ・コレレやコレラ菌が、多くは存在していない可能性を示している。

ところで、図 3 および図 4 に示したように、プルビン酸と可溶性デンプンの添加の効果は、ビブリオ属細菌が比較的高い密度で存在している試料 (地点 A は 5 月, 地点 B は 6 月の試料) でのみ観察された。この結果は、プルビン酸と可溶性デンプンの混合物については、休眠型細菌を増殖型へと復帰させる能力があまり高くなく、そのため、休眠型の細胞が高い密度で存在する状況下でのみ、有効な復帰効果が発揮されることを示唆していると考えられる。

また、ビブリオ属細菌やビブリオ・コレレの単離数 (コロニー数) と強い相関性を有する生化学的あるいは生物学的な水質汚濁指標は見出せなかった。特に水温については、コレラ菌を含むビブリオ・コレレにおいて、その増殖を強く制御する環境要因であることが知られているが、やはり単離数との相関性はみられなかった。

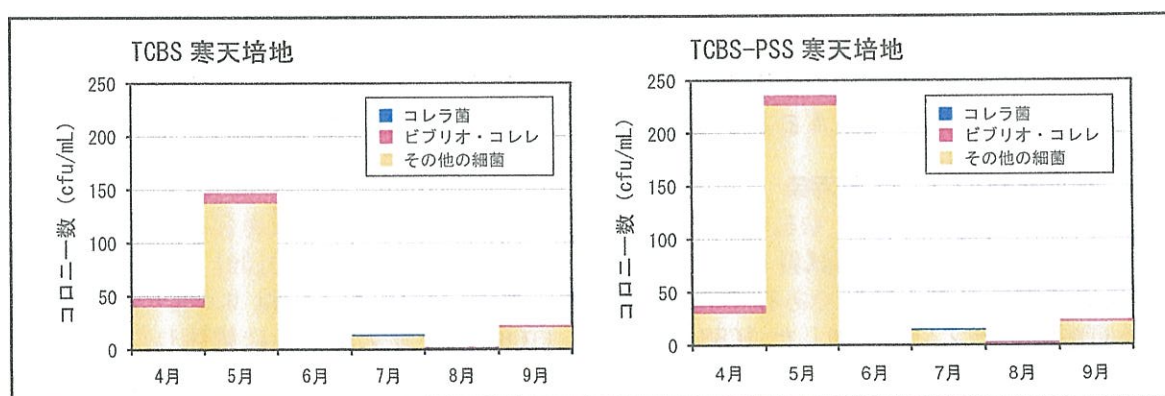


図 3. 地点 A から採取した試料からのコレラ菌やビブリオ・コレレなどの単離

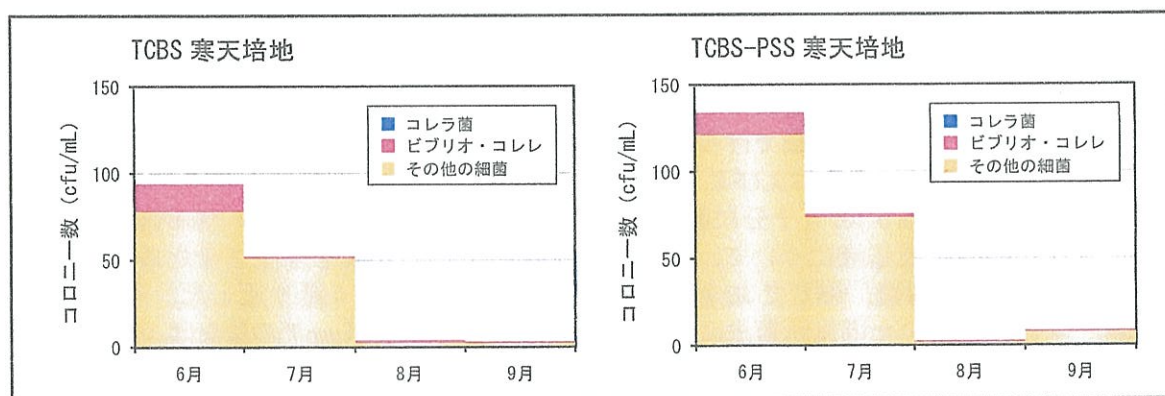


図 4. 地点 B から採取した試料からのコレラ菌やビブリオ・コレレなどの単離

3. 岡山での水環境汚染調査

3-1. 試料 (池および河口の水) の採取

わが国にはコレラ菌は常在していない。しかしながら、ビブリオ・コレレは常在しており、件数は少ないながらも食中毒や下痢症の発生が報告されている。そこで対照として、日本の環境水が、どの程度ビブリオ・コレレによって汚染されているのかを調査した。

岡山県南部の阿部池（採水地点 C）および旭川の河口（採水地点 D）から、毎月 1 回、ハイロート採水器を用いて試料（250 mL）を採取した。なお試料を採取した阿部池（地点 C）については、周囲に草木が茂り、水面の一部は水草で覆われていた（図 5）。一方の旭川の河口については、護岸工事が施され、周囲では工場や事業所が操業していた（図 5）。

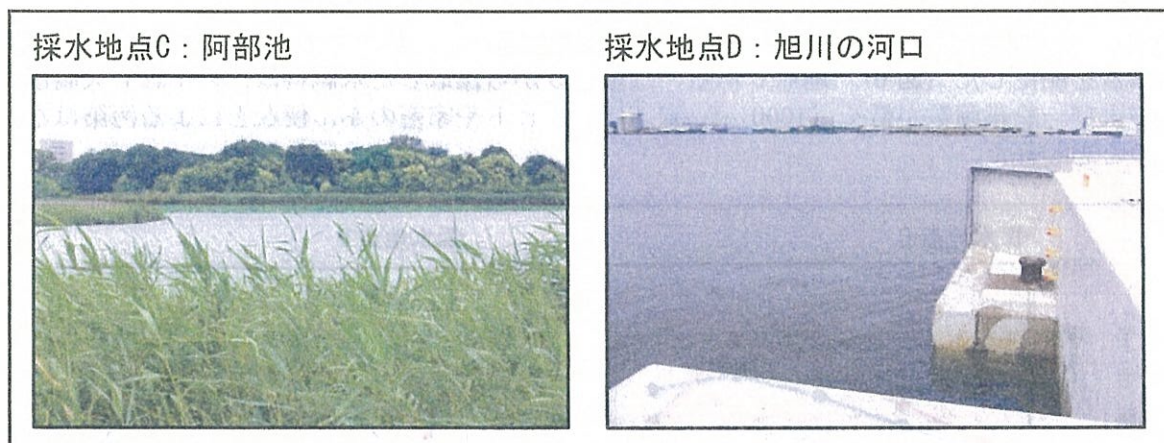


図 5. 試料を採取した岡山県南部の阿部池（地点 C）および旭川の河口（地点 D）

3-2. 採取試料の理化学的性状および生物学的性状

採取した試料について、水温と pH を現地で測定するとともに、簡易水質分析キットを用いて、溶存酸素（DO）、化学的酸素要求量（COD）、アンモニア性窒素、リン酸態リン、全硬度、および過酸化水素（ H_2O_2 ）を測定した。

表 4. 地点 C から採取した試料の理化学的性状

	4月	5月	6月	7月	9月
水温（ $^{\circ}C$ ）	15.7	25.4	27.1	31.5	24.5
pH	-	7.23	7.83	7.31	8.18
DO（mg/mL）	9.90	7.80	10.4	7.90	9.40
COD（mg/mL）	7.75	9.00	8.00	9.50	9.00
アンモニア性窒素（mg/mL）	0.20	0.20	0.10	0.33	0.20
リン酸態リン（mg/mL）	0.10	0.15	0.01	0.40	0.00
全硬度（mg/mL）	57.5	60.0	75.0	35.0	30.0
H_2O_2 （mg/mL）	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00

表 5. 地点 D から採取した試料の理化学的性状

	4月	5月	6月	7月	9月
水温（ $^{\circ}C$ ）	14.0	21.1	24.3	28.3	25.3
pH	-	8.31	8.19	8.30	8.11
DO（mg/mL）	11.9	8.80	9.80	10.3	9.00
COD（mg/mL）	7.25	6.00	6.00	8.50	6.00
アンモニア性窒素（mg/mL）	0.20	0.20	0.15	0.20	0.20
リン酸態リン（mg/mL）	0.10	0.10	0.15	0.15	0.00
全硬度（mg/mL）	103	170	125	135	200
H_2O_2 （mg/mL）	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00

表 4 および表 5 に示したように、地点 C あるいは地点 D から採取した試料は、いずれも COD やアンモニア性窒素などの汚染指標の測定値が低く、両地点とも水質の汚染や汚濁は生じていないことが示された。また水温については、いずれの試料もコレラ菌やビブリオ・コレレなどが増殖可能な 15℃以上であった。さらに、地点 C から採取した試料については、硬度の測定値が 100 mg/L 以下であり、軟水に該当することが明らかとなった。

次に、大腸菌群試験紙あるいは一般細菌試験紙を用いて、試料中の大腸菌群数および一般細菌数を測定した（図 6）。地点 C あるいは地点 D から採取した水試料は、いずれも大腸菌群数および一般細菌数が低く（1000 cfu/mL 以下）、ヒトや家畜のふん便などによる汚染はないものと思われた。

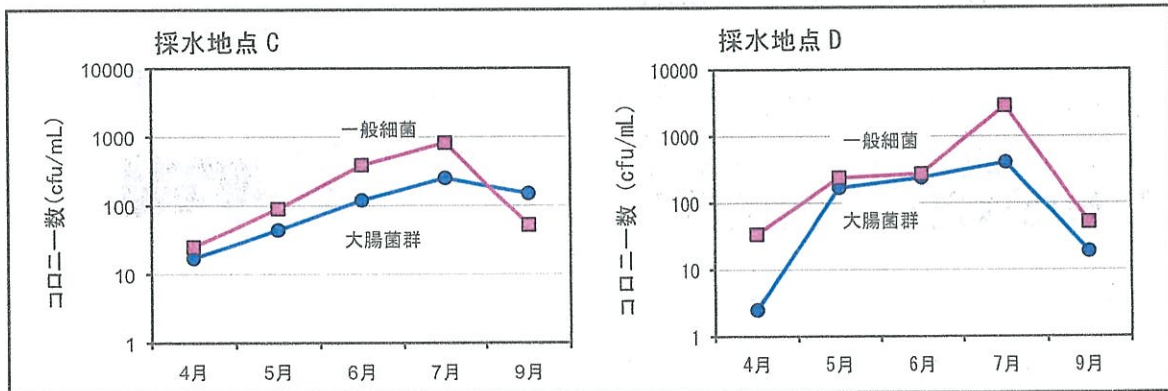


図 6. 地点 C および地点 D から採取した試料の生物学的性状

3-3. 採取試料のコレラ菌汚染

採取した試料 0.1 mL を TCBS 寒天培地あるいは TCBS-PSS 寒天培地に直接塗抹した。そして、37℃で 16 時間培養したのち、ビブリオ・コレレと思われる直径 2~3 mm の黄色のコロニーを釣菌した。そして、100℃で 10 分間加熱して DNA を抽出し、前述の方法に従って、特異的な遺伝子を標的とした PCR を行い、ビブリオ・コレレであることを確認した。さらに、コレラ毒素の遺伝子 *ctxA* を標的とした PCR を行い、コレラ菌であるか否かを確認した。

まず地点 C（阿部池，塩濃度 0%）から採取した試料については、ビブリオ属細菌が 1 株も単離されなかった。一方、地点 D（旭川の河口，塩濃度 1.2%）から採取した試料については、TCBS 寒天培地を用いた場合には、106 株のビブリオ属細菌が単離され、そのうちの 11 株（10.4%）がビブリオ・コレレであった。TCBS-PSS 寒天培地を用いた場合にも、ほぼ同数の 99 株のビブリオ属細菌が単離され、そのうちの 3 株（3.0%）がビブリオ・コレレであった。つまり、ピルビン酸と可溶性デンプンの添加の効果はみられなかった。ところで、予想したとおり、コレラ菌は 1 株も単離されなかった。

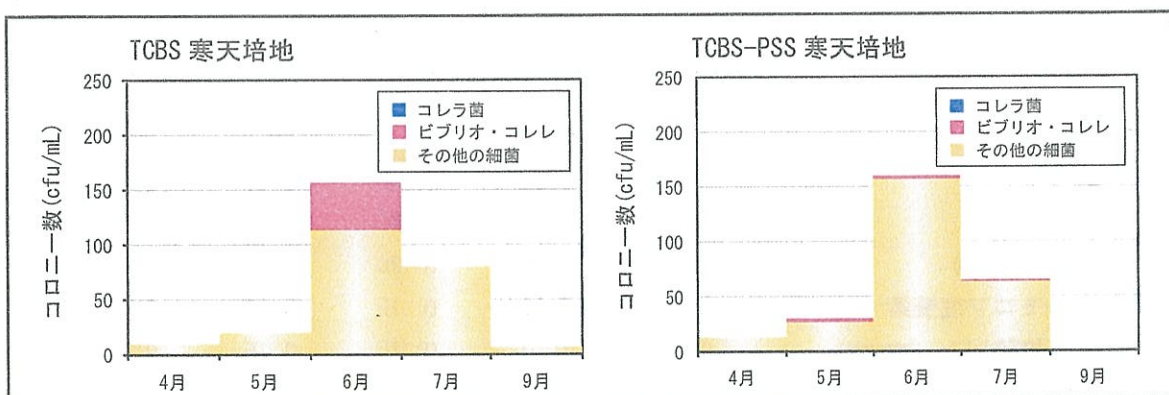


図 7. 地点 D から採取した試料からのコレラ菌やビブリオ・コレレなどの単離

図7に示したように、地点Dから採取した試料中のビブリオ属細菌やビブリオ・コレレの密度は、6月の試料が最も高い値を示した。しかしながら、生化学的あるいは生物学的な水質汚濁指標項目の測定値は、他の試料の測定値と比較して、大きくは異なっていなかった。また水温に関しても、7月および9月に採取した試料とほぼ同じであった。なお地点Dから採取した試料中のビブリオ・コレレの密度は、インドにおいて採取した試料とほぼ同じであった。

4. おわりに

地球温暖化や水質汚濁の進行は水生病原微生物による水環境汚染を拡大し、水媒介性感染症流行のリスクを高めると考えられている。さて激しい水様性下痢を主症状とするコレラは、地球規模での対策が必要とされる水媒介性感染症の代表例であり、その起因菌であるコレラ菌は熱帯～亜熱帯地域の水環境に広く生息している。しかし水環境に排泄されたコレラ菌は、暫くすると増殖不可能な休眠型細胞になると考えられている。私達は、ヒトの培養腸管細胞から精製したカタラーゼが休眠型コレラ菌を増殖型へと復帰させること、カタラーゼと同じ活性を有するピルビン酸と可溶性デンプンの混合物も同様の復帰作用を示すことを明らかにした。これらの研究成果により、従来からの検出法である培養法を一部改良することで休眠型細胞の検出が可能となり、コレラ菌による水環境汚染について、より定量的に調査することが可能となった。本研究では、コレラ菌が常在するため、コレラ流行が毎年繰り返されるインド、およびコレラ菌が常在していない我が国において、休眠型細胞を含むコレラ菌による環境水汚染の状況を調査した。また、水温や水環境汚染の一般的指標項目との関連性についても解析を行った。

インド東部のコルカタ市近郊で生活水として利用されている池の水を試料として採取し、コレラ菌の汚染状況を調査したところ、ビブリオ・コレレは全ての試料から検出されたが、コレラ菌は1つの試料のみから検出された。また、ピルビン酸と可溶性デンプン混合物の添加効果は観察されなかった。これらの結果は、インドではコレラ菌により環境水が汚染されているが、汚染しているコレラ菌の密度は、休眠型細胞を含めても、あまり高くはないことを強く示唆している。さらに試料中のビブリオ・コレレあるいはコレラ菌の密度は、水温や水環境汚染の一般的指標項目の測定値とは相関していなかった。本研究では、対照として、コレラ菌が常在していない岡山県内の環境水についても、ビブリオ・コレレによる汚染の状況を調査した。その結果、水環境汚染の一般的指標項目の測定値が低いにも係らず、インドの環境水とほぼ同じ菌密度で汚染されていることが示された。

以上のことより、水温の上昇や水質汚濁の進行が、コレラ菌による水環境汚染の拡大の原因となる可能性は否定できないが、水環境汚染の拡大には複数の環境要因が相互に関連しているものと考えられる。したがって、地球温暖化の水媒介性感染症流行へのリスクについては、多方面から総合的に解析し評価する必要があると思われる。また休眠型コレラ菌の感染源としてのリスクについては、ピルビン酸と可溶性デンプン混合物の休眠型から培養型へと復帰させる効果に関する定量的な解析を行い、その結果に基づいての評価が必要である。

謝 辞

本研究の遂行に対して、多大なるご支援を賜りました公益信託エスベック地球環境研究・技術基金に深く感謝いたします。また、インドでの調査研究を担当して頂きました岡山大学インド感染症共同研究センター水野環助教に深謝いたします。

