

河川に広く分布する下痢症起因ウエルシュ菌の 拡散機構の解明と水質保全への提言

-公共地理データの病原体解析への活用-

大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課

余野木伸哉

下水道と下水処理施設の役割

街を清潔にする

役割 1



感染症の制御に大きな貢献

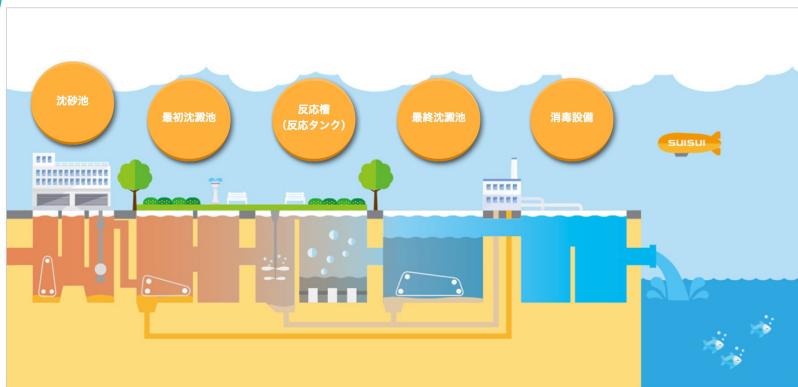
街を浸水から守る

役割 2



身近な環境を守る

役割 3

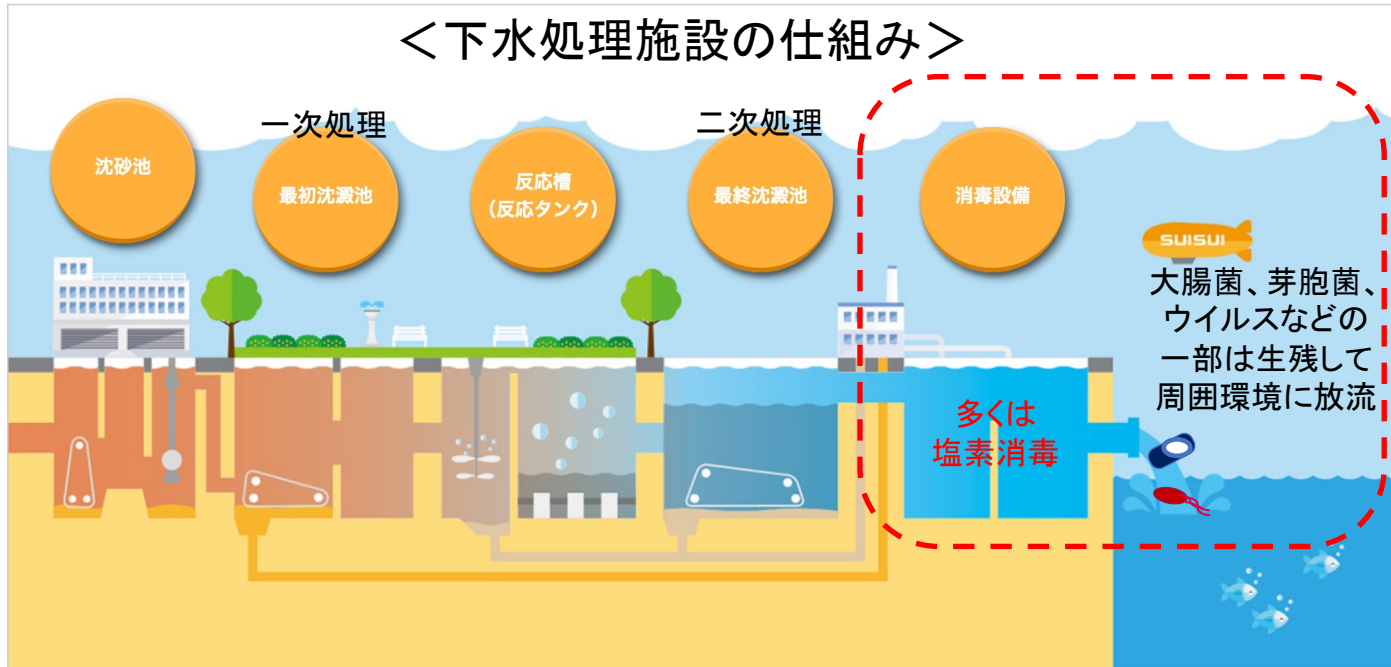


エネルギー・資源を創る

役割 4



都市下水システムの感染症に対する役割と課題



役割

- ・感染症の制御に大きな貢献
- ・下水を利用した(メタ)ゲノム解析
→感染症の流行予測やモニタリング

課題

- ・一部の病原体は生残
- 健康被害の原因となる可能性が指摘

近年

横浜市の調査(令和2年度)

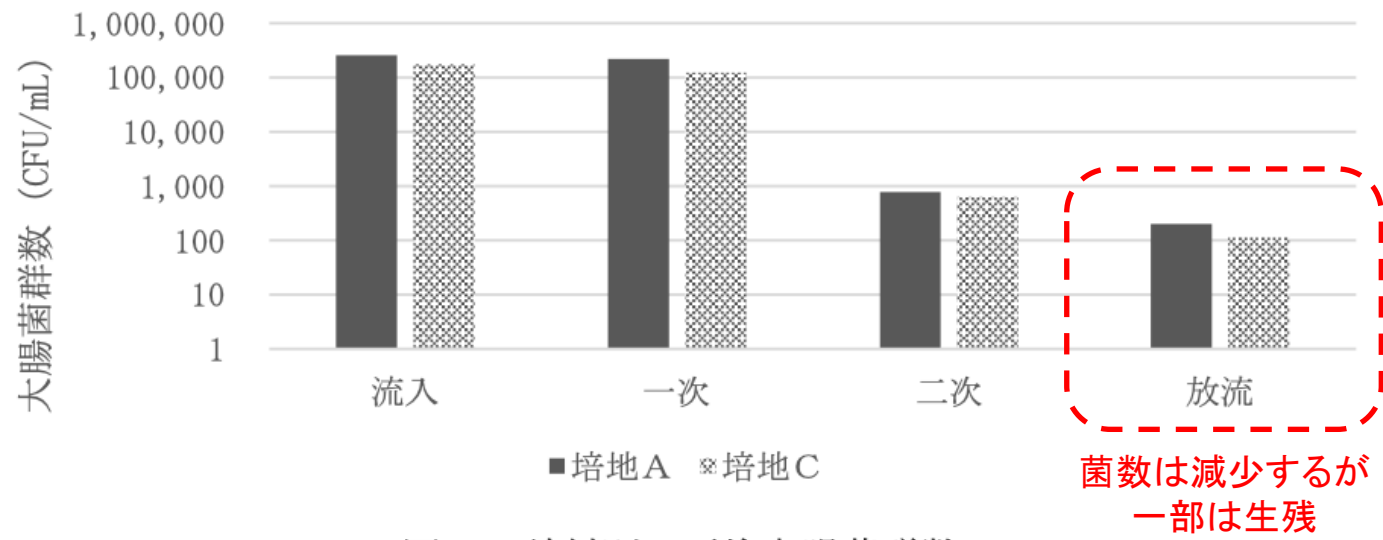


図3 試料別の平均大腸菌群数

国土技術政策総合研究所 下水道研究部 下水処理研究室の調査(平成29年度)

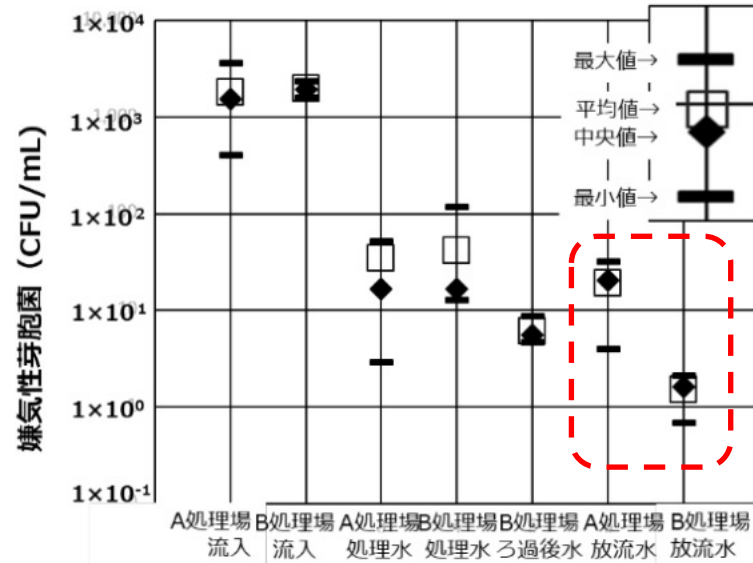


図7 各工程の嫌気性芽胞菌濃度

出典: 国土技術政策総合研究所HP

<http://www.nilim.go.jp/lab/bcg/siryoutnn/tnn1056pdf/ks105609.pdf>

国内外の多くの下水処理施設や学術論文で
大腸菌、芽胞菌、ウイルスは完全に除去されないことが確認・報告

MICROBIAL GENOMICS

RESEARCH ARTICLE

Moradigaravand et al., *Microbial Genomics* 2018;4

DOI 10.1099/mgen.0.000162



Genomic survey of *Clostridium difficile* reservoirs in the East of England implicates environmental contamination of wastewater treatment plants by clinical lineages

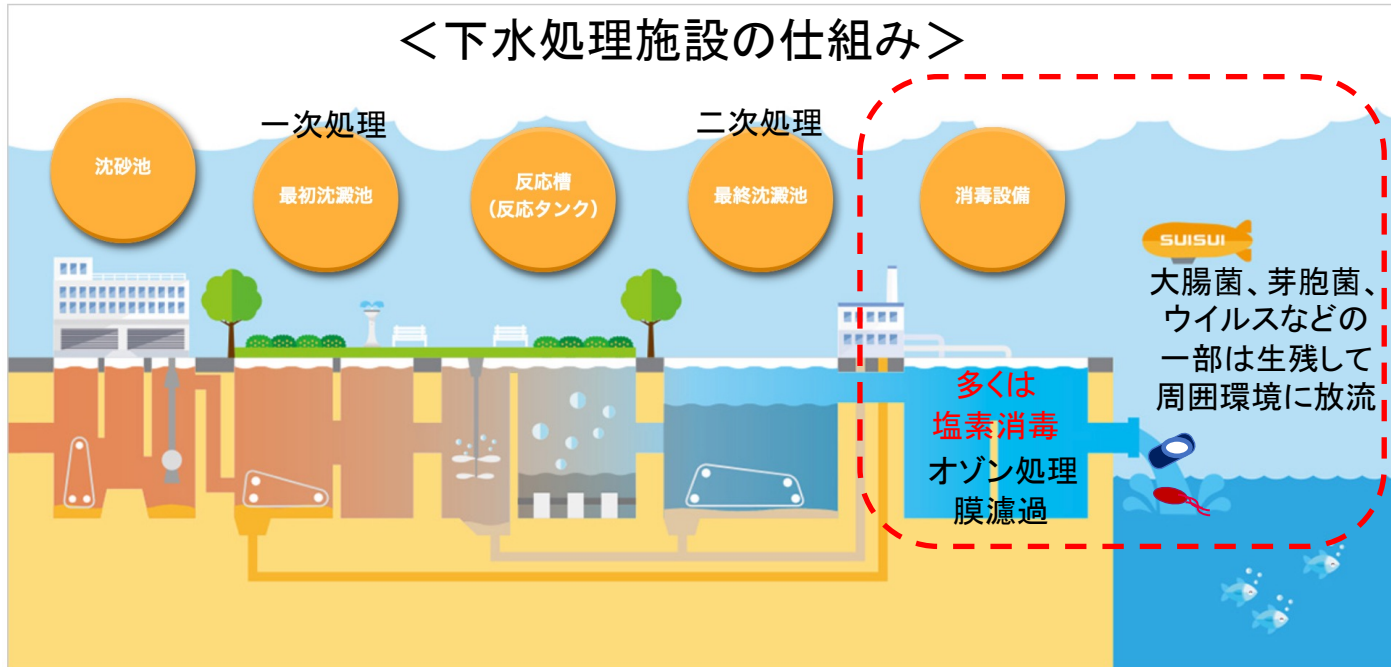
Danesh Moradigaravand,^{1*} Theodore Gouliouris,² Catherine Ludden,³ Sandra Reuter,⁴ Dorota Jamroz,¹ Beth Blane,² Plamena Naydenova,² Kim Judge,¹ Sani H. Aliyu,² Nazreen F. Hadjirin,² Mark A. Holmes,² Estée Török,² Nicholas M. Brown,² Julian Parkhill¹ and Sharon Peacock²

Abstract

There is growing evidence that patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhoea often acquire their infecting strain before hospital admission. Wastewater is known to be a potential source of surface water that is contaminated with *C. difficile* spores. Here, we describe a study that used genome sequencing to compare *C. difficile* isolated from multiple wastewater treatment plants across the East of England and from patients with clinical disease at a major hospital in the same region. We confirmed that *C. difficile* from 65 patients were highly diverse and that most cases were not linked to other active cases in the hospital. In total, 186 *C. difficile* isolates were isolated from effluent water obtained from 18 municipal treatment plants at the point of release into the environment. Whole genome comparisons of clinical and environmental isolates demonstrated highly related populations, and confirmed extensive release of toxigenic *C. difficile* into surface waters. An analysis based on multilocus sequence types (STs) identified 19 distinct STs in the clinical collection and 38 STs in the wastewater collection, with 13 of 44 STs common to both clinical and wastewater collections. Furthermore, we identified five pairs of highly similar isolates (≤ 2 SNPs different in the core genome) in clinical and wastewater collections. Strategies to control community acquisition should consider the need for bacterial control of treated wastewater.

全ゲノム解析によって一部のCD感染症患者は病院入院前から菌を保菌し、これらの菌が下水処理場に由来する菌と関連することを提示した

都市下水システムの感染症に対する役割と課題



役割

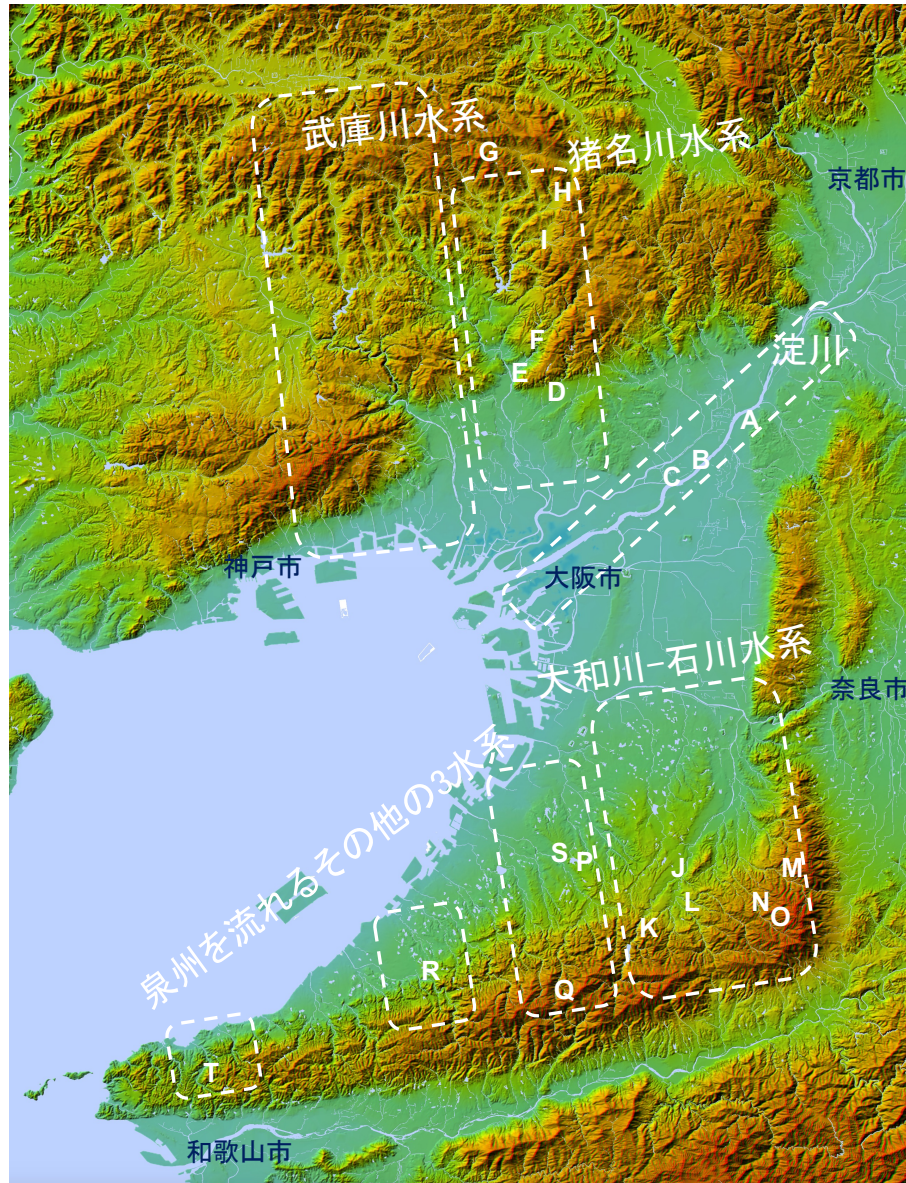
- ・感染症の制御に大きな貢献
- ・下水を利用したメタゲノム解析
- 感染症の流行予測やモニタリング

課題

- ・一部の病原体は生残
- **健康被害の原因となる可能性が指摘**
- * 一方で、これらの詳細は不明なことが多い
- 大阪府内の環境水の嫌気性芽胞菌について調査

近年

大阪府の河川水を用いた芽胞菌の調査



＜サンプリング＞

大阪府内 20ヶ所のから河川、湖沼から採水

サンプリング期間: 2019年6月-2021年3月

サンプル数: 表流水 51サンプル



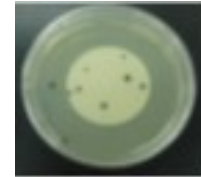
各200mL

- ・嫌気性芽胞菌数を測定
- ・嫌気性芽胞菌を分離・菌種同定

大阪府の河川水を用いた芽胞菌の試験法

1. 嫌気性芽胞菌数(A)を計測

- ・減圧濾過濃縮, サンプル 200mL
- ・上水試験方法の
ハンドフォード改良寒天培地法



2. 菌種同定

30集落/サンプル を最大数として菌種を同定

- ・MALDI-TOF/MS
- ・16S rRNA遺伝子の塩基配列

大阪府の河川水中の嫌気性芽胞菌数

検出された嫌気芽胞菌数の平均

採水地	平均嫌気性芽胞菌数	採水地	平均嫌気性芽胞菌数
A	140.3	K	0.0
B	178.7	L	3.5
C	128.7	M	2.0
D	9.2	N	9.0
E	18.0	O	1.5
F	12.0	P	3.7
G	2.0	Q	0.0
H	11.0	R	2.3
I	1.0	S	7.3
J	21.0	T	0.5

淀川からの検出数が多い

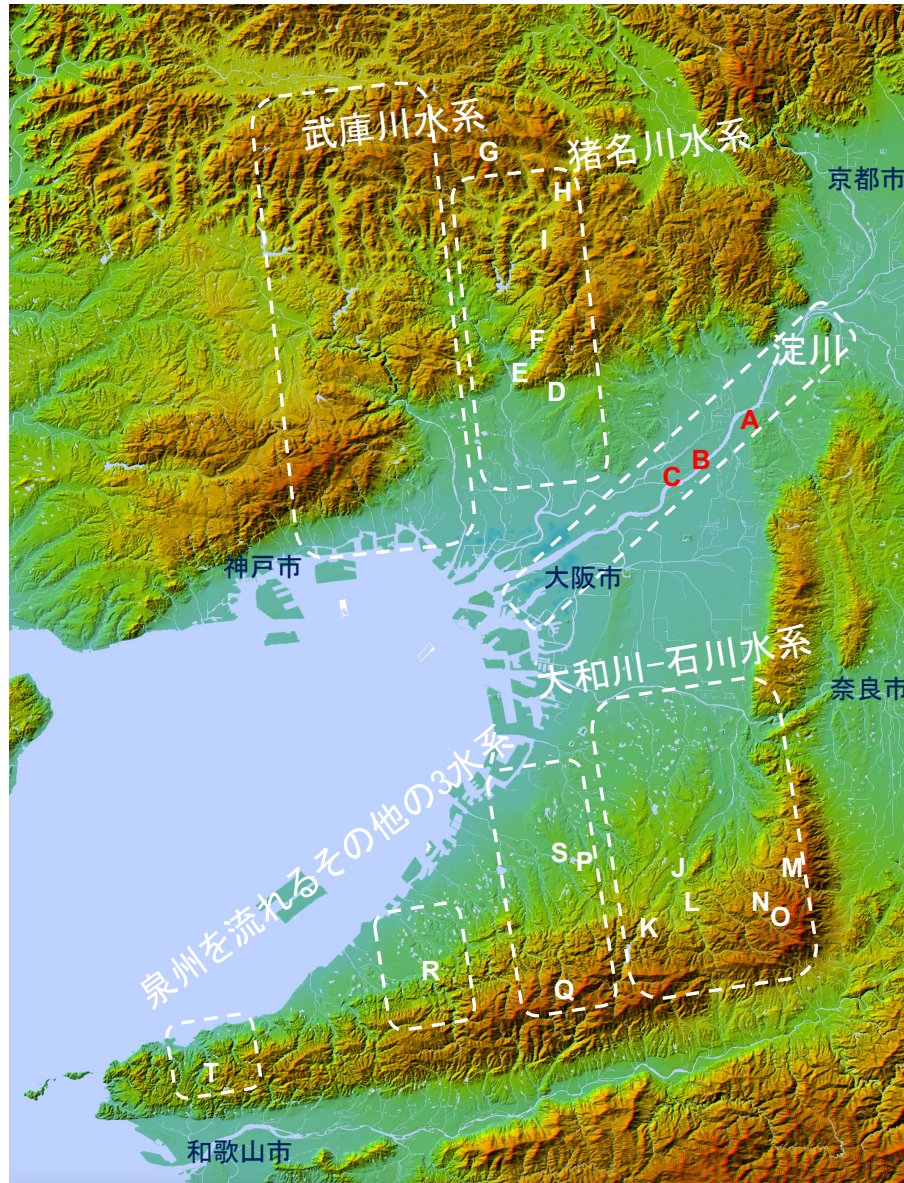
菌種の同定

検出された嫌気性芽胞菌 1597集落

菌種同定に供試した株 520株

ウエルシュ菌 498株 (95.8%)

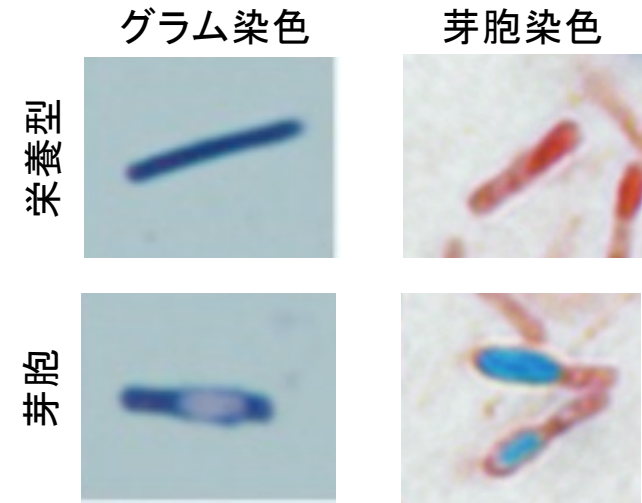
環境水から分離される嫌気性芽胞菌の
ほとんどはウエルシュ菌



地図：地理院地図Vectorにより作製

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)

- ・グラム陽性偏性嫌気性桿菌
- ・芽胞形成 (熱や環境に抵抗性あり)
- ・分布場所
 - ヒトや動物の腸管内の常在菌
 - 環境 (下水、河川、海、土・・・)、食品
- ・産生する外毒素 20種類以上
 - 産生する毒素の組み合わせによって多様な動物に多様な病態の病気を発生



ヒトの病気の代表例

腸炎・下痢 (食中毒) 関連毒素

- ・ *C. perfringens* enterotoxin (CPE)
- ・ Binary enterotoxin of *C. perfringens* (BEC)

Yonogi S et al. et al. Infect Immun. 2014 Jun 82(6):2390-9.

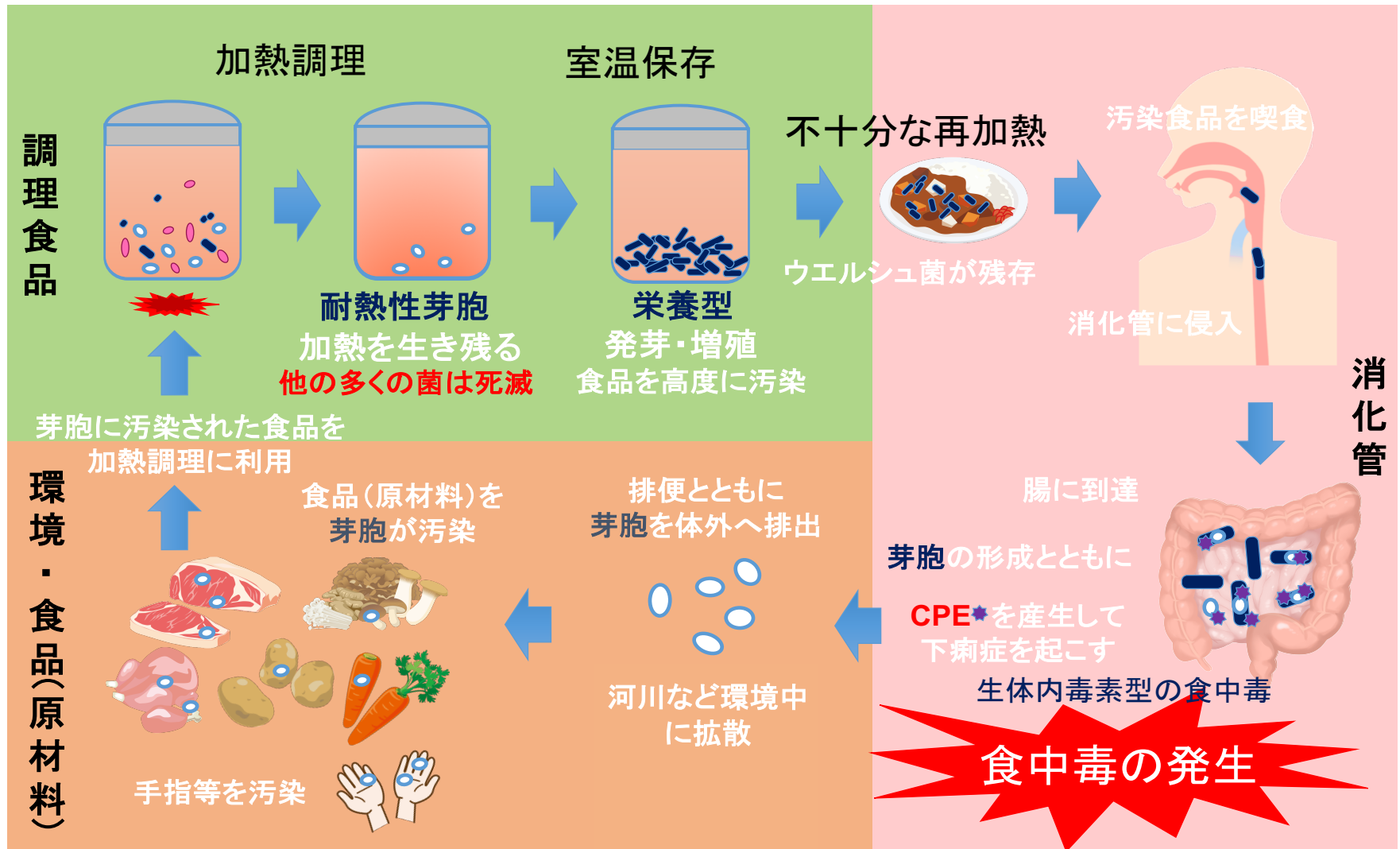
激しい血管内溶血を伴う敗血症

近年国内からの報告が増加傾向

* 基礎疾患のある患者での報告が多いが健常者での報告もある

大阪府内の症例: Masahide Sakaue et al. BMC Infect Dis. 2019 Aug 15;19(1):719.

ウエルシュ菌による食中毒の発生(循環)様式



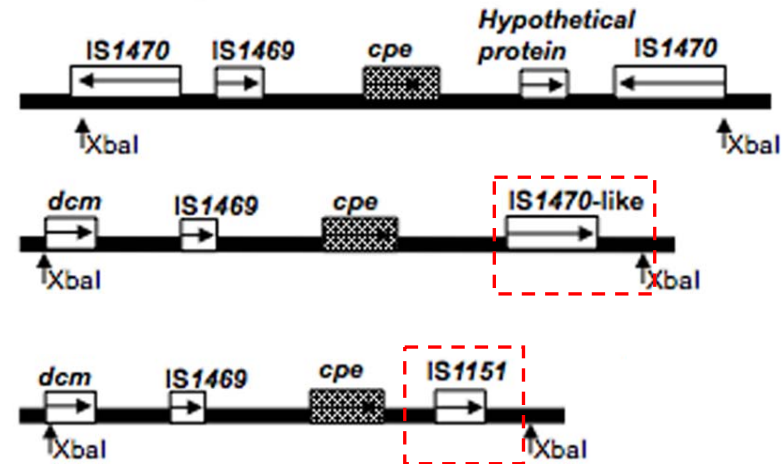
ウエルシュ菌 ○ : 芽胞
 ● : 栄養型

ウエルシュ菌以外の菌 ○ : 芽胞
 ● : 栄養型

CPE遺伝子型と下痢症との関連

cpe 遺伝子型		病気との関連
染色体型		食中毒(近年の報告 約70%)
プラスミド型	IS 1470-like型	抗生物質関連性下痢症 散発性下痢症
	IS1151型	集団下痢症(高齢者施設など) (食中毒; 近年の報告 約30%)

<CPE遺伝子周辺領域の構造>

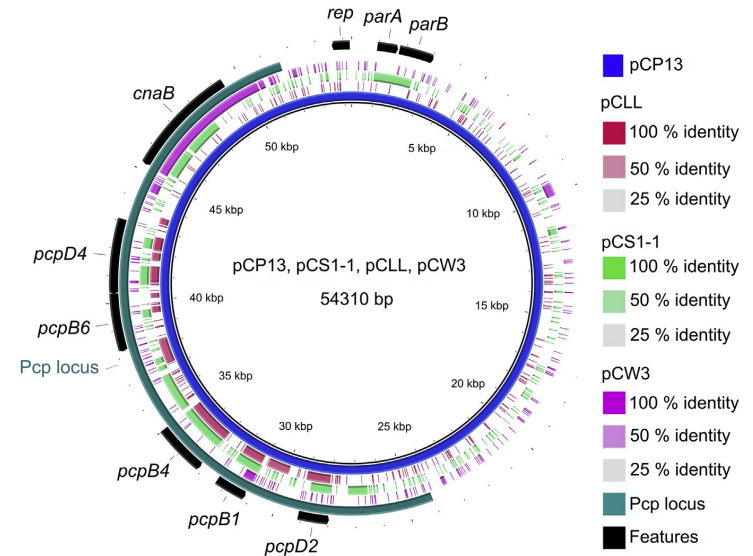
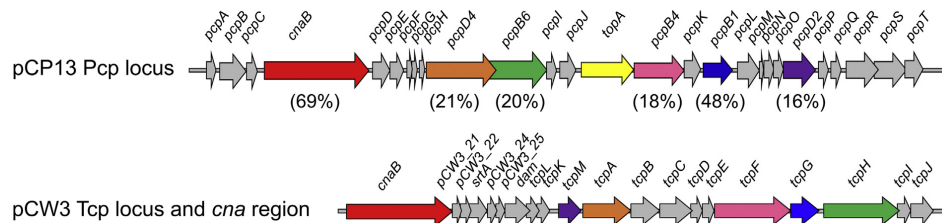


Jihong Li et al., PLoS One 2010;5

CPE遺伝子型のほとんどは
染色体型と2つのプラスミド型に分類できる

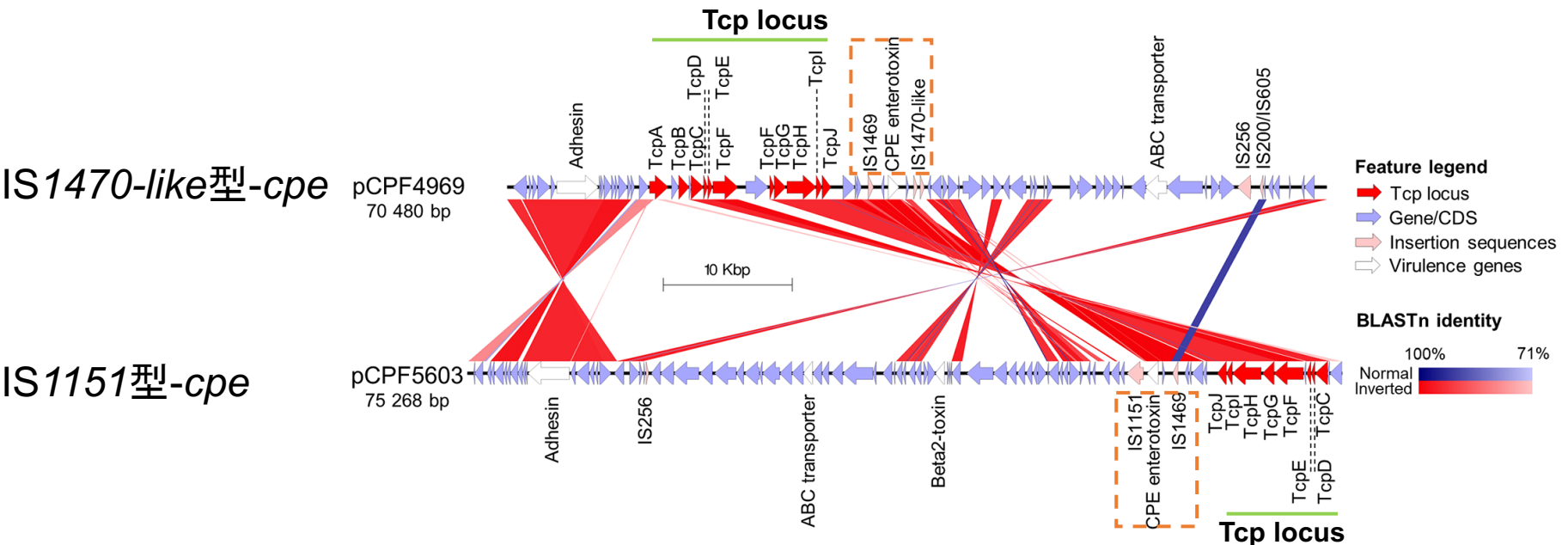
ウェルシュ菌の接合伝達性プラスミド

plasmid name (kb)	species	strain	conjugative ability	conjugation locus	Transfer frequency (transconjugants/donor cells)
pCW3 (47)	<i>Clostridium perfringens</i>	CW92	接合伝達性 +	Tcp locus	$\sim 10^{-1}$ 同様なプラスミドが CPE遺伝子をコード
pCP13 (54)	<i>Clostridium perfringens</i>	13	- \rightarrow + (2019)	Pcp locus	$\sim 10^{-1}$ 同様なプラスミドが BEC遺伝子をコード
pIP404	<i>Clostridium perfringens</i>	SM101, BP6K-N5	-	-	-
pCS1-1	<i>Paeniclostridium (Clostridium) sordellii</i>	ATCC9714	+	cst locus	$10^{-5} \sim 10^{-7}$
pCLL	<i>Clostridium botulinum</i>	Eklund 17B	+	unnamed	$10^{-5} \sim 10^{-7}$



CPE遺伝子をコードするプラスミド

plasmid name (kb)	species	strain	conjugative ability	conjugation locus	Transfer frequency (transconjugants/donor cells)
pCW3 (47)	<i>C. perfringens</i>	CW92	+	Tcp locus	$\sim 10^{-1}$
pCP13 (54)	<i>C. perfringens</i>	13	- \rightarrow + (2019)	Pcp locus	$\sim 10^{-1}$



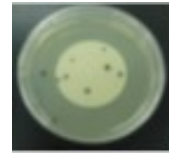
Kiu et al., *Microbial Genomics* 2019;5

プラスミド型のCPE遺伝子はいずれも pCW3-like plasmidにコードされている

大阪府の河川水を用いた芽胞菌の試験法

1. 嫌気性芽胞菌数(A)を計測

- ・減圧濾過濃縮, サンプル 200mL
- ・ハンドフオード改良寒天培地法



* 上水試験方法のハンドフオード改良寒天培地法

2. 菌種同定とウエルシュ菌数(B)の計測

30集落/サンプルを最大数として菌種を同定

- ・MALDI-TOF/MS
- ・16S rRNA遺伝子の塩基配列

$$B = A \times \frac{\text{同定ウエルシュ菌数}}{\text{同定作業を実施した集落数}}$$

3. CPE遺伝子の検出とCPE遺伝子型の決定

以下のマルチプレックスPCR法で実施

- ・CPE遺伝子の検出 Yonogi S et al. J Microbiol Methods. 2016;127
- ・CPE遺伝子型の決定 Miyamoto K et al. J Clin Microbiol. 2004;42(4)

4. 分子疫学的解析 Multi locus sequencing typing (MLST)

Deguchi A et al. PLoS One. 2009 ;19;4(5):e5598.

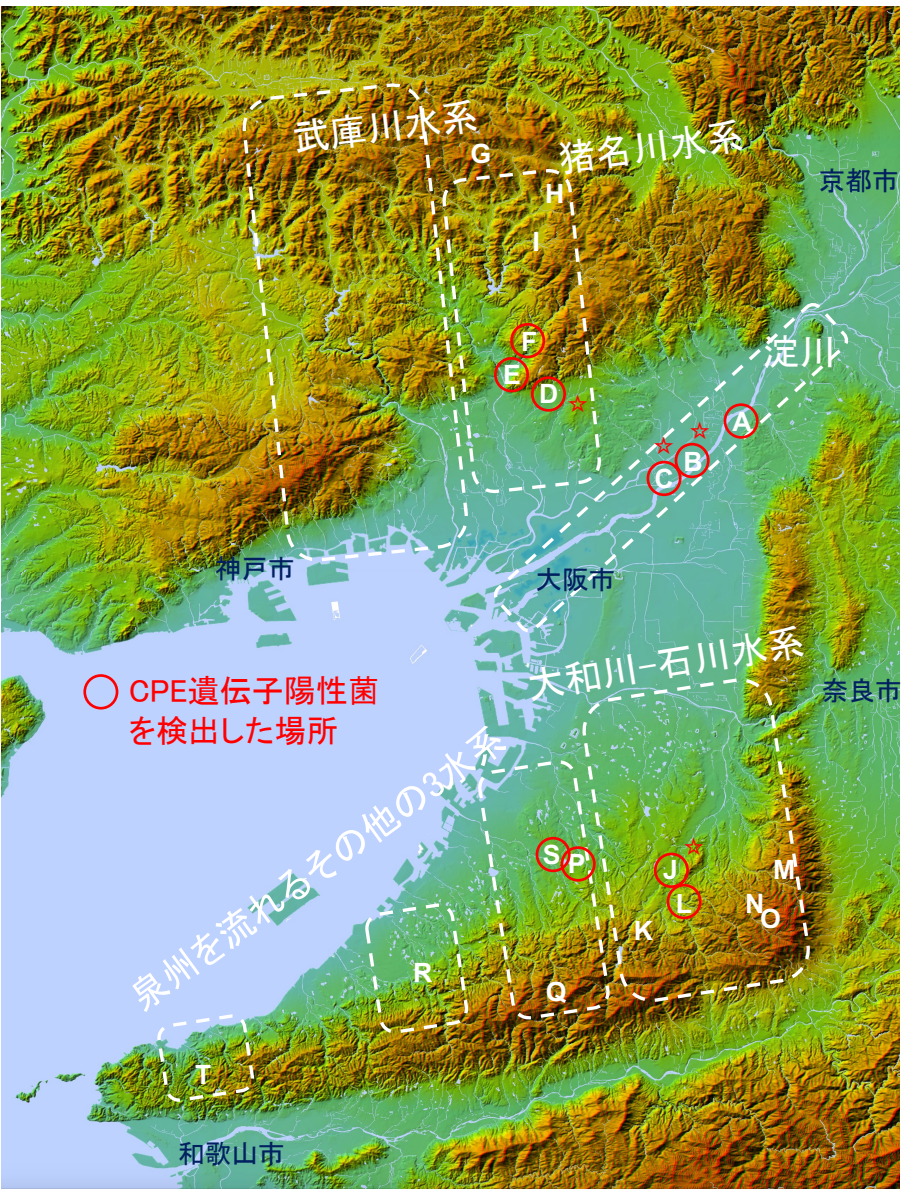
Xiao Y et al. Appl Environ Microbiol. 2012 ;78(19):7060-8

食中毒原因菌やその他の国内分離株との比較

5. 分子疫学的解析 全ゲノム解析

プラスミドの同定と世界の分離株との比較

大阪府の河川水中のCPE陽性菌とその分布



CPE陽性菌数とその遺伝子型

採水地	平均芽胞数 /200mL	ウエルシュ菌数	CPE陽性菌数	IS1151型の菌数 (それ以外)
A	140.3	88	10	10
B	178.7	90	12	11 (IS1470-like) [☆]
C	128.7	90	13	11 (3つ以外の型) [☆]
D	9.2	43	5	4 (3つ以外の型) [☆]
E	18.0	17	1	1
F	12.0	8	2	2
G	2.0	1	0	-
H	11.0	9	0	-
I	1.0	0	0	-
J	21.0	39	14	13 (IS1470-like) [☆]
K	0.0	0	0	-
L	3.5	7	2	2
M	2.0	2	0	-
N	9.0	15	0	-
O	1.5	1	0	-
P	3.7	10	3	3
Q	0.0	0	0	-
R	2.3	5	0	-
S	7.3	72	6	6
T	0.5	1	0	-
合計		498	68 (13.7%)	64 (94.1%)

染色体型の菌は分離されなかった

高い割合でCPE遺伝子陽性菌が検出され
そのほとんどはIS1151型の菌

地図: 地理院地図Vectorにより作成

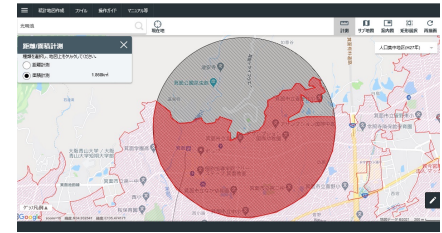
採水場所の分類

採水場所の分類

1. 周辺人口

半径1km内の人口を政府統計の総合窓口(e-Stat) 地図で見る統計(統計GIS)を用いて集計

〈採水地Dの集計〉



2. 上流域での大規模下水処理施設放流口の有無

大規模下水処理施設 (Is-WWTP): 処理人口1万人以上として分類

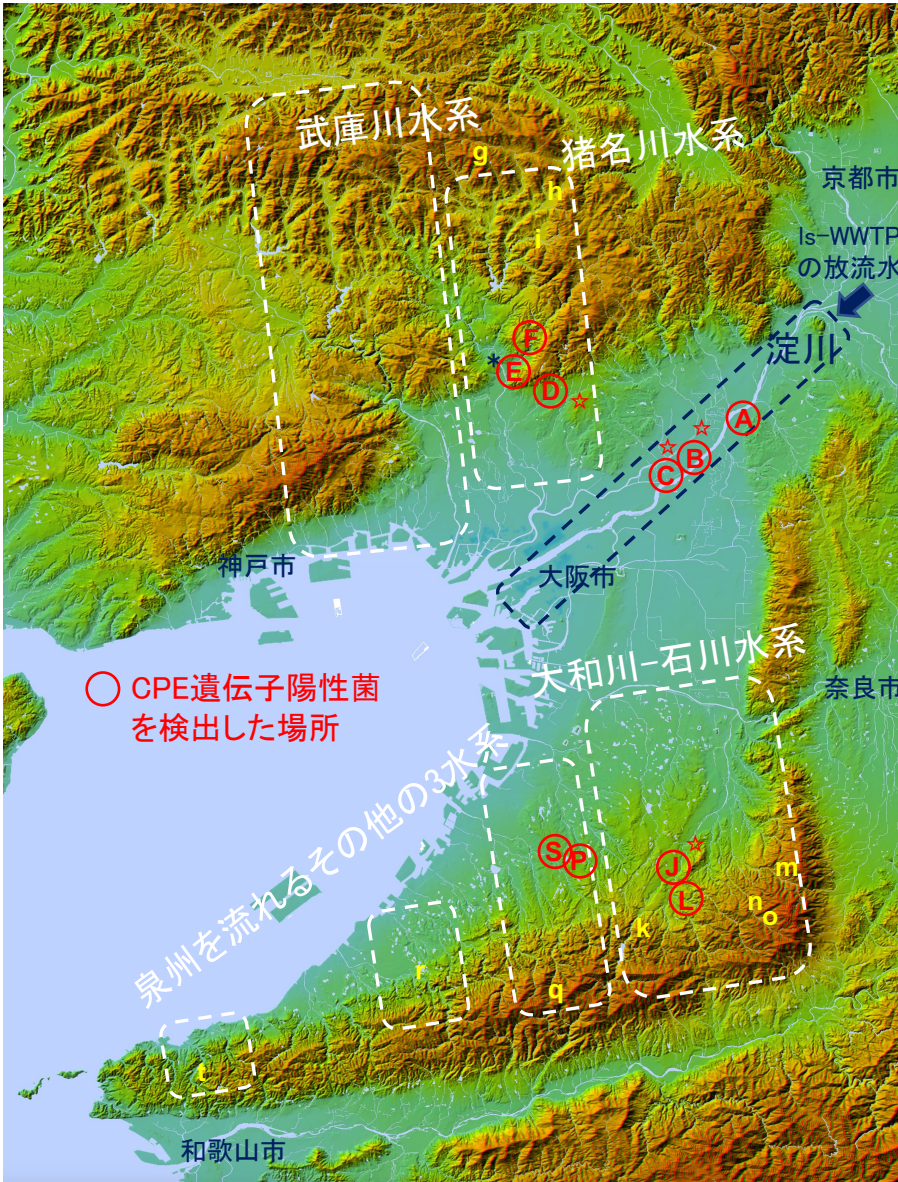
↓ **3地域**に分類

地域分類		周辺人口 (半径1km内)	IsWWTPs の有無	地図での 表示	サンプル 合計数
都市・郊外地域	Urban with IsWWTPs	9,000人以上	+	3ヶ所 (淀川)	9
	Urban w/o IsWWTPs	9,000人以上	-*	7ヶ所 (地図赤色)	24
農村・山間地域		2,000人以下	-	10ヶ所 (地図黄色)	18

* 採水地Eは上流に小規模な下水処理施設あり(計画処理人口3160人)

**CPE遺伝子陽性菌は都市・郊外地域に偏在
(都市内で保持・循環)**

統計学的にも有意であることを確認



地図: 地理院地図Vectorにより作成

過去15年間に遭遇した食中毒事例

No.	発生年月	Hobbs型別	ET	ET遺伝子の所在
1	2008年6月	NT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
2	2008年6月	NT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
3	2008年10月	NT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
4	2009年8月	UT	BEC	pCP13-like plasmid
5	2010年1月	UT	BEC	pCP13-like plasmid
6	2010年6月	UT	CPE	chromosome
7	2010年12月	UT	CPE	chromosome
8	2012年12月	UT	CPE	chromosome
9	2013年7月	UT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
10	2014年5月	12	CPE	chromosome
11	2014年5月	3, 13	CPE	chromosome
12	2016年6月	4	CPE	chromosome
13	2016年10月	UT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
14	2017年5月	UT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
15	2017年5月	3	CPE	chromosome
16	2018年5月	UT	CPE	chromosome
17	2019年8月	UT	CPE	chromosome
18	2020年1月	UT	CPE	chromosome
19	2021年5月	UT	CPE	chromosome
20	2021年5月	UT	CPE	chromosome
21	2021年10月	UT	CPE	plasmid (IS1151型-cpe)
22	2022年4月	NT	CPE	chromosome

過去10年間では
28.6% (4/14)

プラスミド型のCPEによる事例は全てIS1151型-cpeをコードしていた

Population clustering by Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) 解析

MLST (8 locus 5,274 bp)

188株 (大阪府の水由来66株と食中毒由来37株を含む)
このうち177株は日本で分離された株

Clade	CPE遺伝子型
● 1	IS1151型
● 2	IS1151型 / IS1470-like型
● 3	
● 4	IS1470-like型
● 5	染色体型
● 6	IS1470-like型 / 3つの型以外の型

最も大きなグループ

最も大きなグループに含まれた株

- 食中毒事例株
大阪府 (2016, 21), 富山県 (2001)
- ヒト糞便由来
北海道 (2017, 20), 山梨県 (2014-19)
- 環境水 大阪府の4流域 (2019-20)
- 下水流入出水 山梨県 (2016-19)
- アサリ(食品) 愛知県, 熊本県 (2019)

Deguchi A et al. PLoS One. 2009;19 富山県など
Matsuda A et al. Toxins. 2019;11 北海道
Yanagimoto et al., Pathogens 2020;9 山梨県、愛知県など
Meiji Soe Aung et al. Anaerobe. 2021 北海道

環境水中のIS1151型の菌は食中毒の原因となり、同様の菌は日本の広い地域に存在

まとめと今後の課題

- ・日本の都市河川水に広く分布するIS1151型のウエルシュ菌が食中毒や敗血症の原因となる(可能性)

- 食中毒について、染色体型の菌とIS1151型の菌の食中毒事件発生数と環境での分布数とのパラドックスあり

- 都市における循環・保持機構

- 菌側の要因: 日本では接合伝達性プラスミド(pCPF5603)が関与

- 環境要因: 下水処理施設←この他の都市要因が存在

- ・その他の病原体(薬剤耐性菌、ウエルシュ菌以外の嫌気性芽胞菌、ウイルスなど)が同様に都市における偏在や保持・循環する可能性