

## 特別講演

# 感染症と環境－VNC菌の果たす役割

神 谷 茂

杏林大学医学部感染症学

## Infectious Diseases and Environment – Role of Viable but Non-Culturable (VNC) Bacteria

Shigeru KAMIYA

Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine

Occurrence of infectious diseases is closely associated with environmental factors. Influence of environmental factors such as temperature, salinity, sunlight, pH, iron, algal growth and chitin on cholera and *V. cholerae* dynamics is reported. *Campylobacter* infection displayed a seasonal pattern, and increased campylobacter rates were found to be correlated with temperature.

VNC is an abbreviation of “viable but non-culturable”, and VNC microorganisms have been detected in more than 40 kinds of bacterial species. VNC form of *Salmonella* was reported to be more pathogenic to immune-deficient mice than non-VNC form of *Salmonella*. It was also reported that VNC form of *Helicobacter pylori* is able to adhere to gastric epithelial cells and stimulate secretion of IL-8 from the epithelial cells. In not only analysis of pathogenesis but diagnosis of bacterial infections, studies on VNC will be very important.

### はじめに

感染の定義，感染症の種類，変貌する感染症についての基礎的事項をまとめるとともに，感染症と環境との関連性についてコレラとカンピロバクター腸炎を取り上げる。また“生きてはいるけれど培養できない”細菌であるVNC (viable but non-culturable) 菌の環境との関連およびその病原性発現における役割を論じる。

### 感染の定義

感染 (infection) とは微生物が生体宿主に侵入して定着，増殖し，なんらかの傷害を与え，結果

的に宿主に免疫応答を惹起させることと定義される。この定義の背景には，宿主と微生物という2生物間の共存状態，つまり共生 (symbiosis) の考えが存在している。Theobald Smith (1934年) は感染とは“2つの異質な生物，すなわち宿主と微生物との間に成立する生態学的反応 (ecological reaction) である”と解釈したが，この考えは現在にも適用できるものである。

### 変貌する感染症

コレラ，赤痢，結核，ジフテリアなどの感染症は，各々病原性の強い起因菌によって引き起こさ

れる正統（古典的）感染症 orthodox（classical）infectionと呼ぶことができる。これらの正統感染症は近年の衛生条件の改善，医学，医療の発展，とりわけ抗菌薬を中心とした治療法の発展やワクチンの開発・普及によりわが国では激減している。

高度な医療技術の下，各種の基礎疾患によりあるいは治療行為により感染に対する抵抗力が低下した宿主，すなわち易感染性宿主compromised hostが増加している。これらの宿主において強毒病原性細菌は勿論のこと，健康人にはなんの症状を引き起こさない弱毒病原性細菌（平素無害菌）の感染により，重篤な臨床症状が惹起される場合がある。このような易感染性宿主における平素無害菌による感染形態を日和見感染opportunistic infectionと呼ぶ。我が国では近年，緑膿菌，大腸菌，ブドウ球菌，真菌などによる日和見感染症が増加し院内感染症の主体をなしている。

近年の交通手段の発達により海外から帰国または入国する人，もしくは輸入される動物や食品を介して国内に持ち込まれた感染症，すなわち輸入感染症imported infectious diseaseが増加している。また，都市部の住民がアウトドアライフを志向したり，ペットを愛好する人が増加している。これらを背景に，自然の状態ではヒトと脊椎動物の間で双方に伝播のおこる感染症である人獣（畜）共通感染症zoonosisの発生が近年増加している。

### 新興感染症と再興感染症

新興感染症emerging infectious diseaseは「今までに知られておらず新しく同定された病原体による感染症で，局地的あるいは国際的にも公衆衛生上大きな問題を惹起する感染症」である（Table 1）。また，再興感染症re-emerging infectious diseaseは「もはや公衆衛生上問題とならないほどに減少してきた感染症であるが，近年再び流行しはじめ患者数が増加してきたもの」と定義される（Table 2）。

新興感染症・再興感染症が出現した理由は複雑

であり，世界的な人の動きの活発化，病原微生物の遺伝学的変異，宿主生体防衛能の低下，貧困および難民の出現，地球温暖化，環境破壊などが指摘されている<sup>1)</sup>。

### コレラと環境因子

コレラの記載は既に紀元前5世紀にインドのサンスクリット文献にある。大量の水様性下痢，腹痛，脱水などの症状が記載されている。1817年より第1次大流行（パンデミー）が起こり，第7次大流行（1961年から）は現在まで続いている。コレラ菌の生態には気温，塩度，日光，pH，鉄イオン，藻類の増殖，キチンなどの種々の因子と関連することが知られている<sup>2)</sup>。10℃における菌の生残には河口付近の塩濃度に相当する2.5%が適していることが報告されている<sup>3)</sup>。菌液の日光照射はコレラ毒素遺伝子をコードする溶原化CTXφファージの誘導を促進するし，培地液への鉄イオ

Table 1 主な新興感染症

<b>1. 細菌感染症</b>	
1977年	レジオネラ・ニューモフィラ（レジオネラ肺炎）
1977年	カンピロバクター・ジェジュニ（カンピロバクター腸炎）
1992年	O157:H7腸管出血性大腸菌（出血性大腸炎）
1983年	ヘリコバクター・ピロリ（胃炎，消化性潰瘍，胃癌？）
1992年	O139新型コレラ菌（コレラ）
1992年	バルトネラ・ヘンセラ（猫ひっかき病）
<b>2. ウイルス感染症</b>	
1973年	ロタウイルス（小児下痢症）
1980年	HTLV-1（ヒト成人T細胞白血病）
1983年	HIV（エイズ）
1989年	C型肝炎ウイルス（C型肝炎）
2003年	SARSコロナウイルス（SARS：重症急性肺症候群）
<b>3. 寄生虫感染症</b>	
1976年	クリプトスポリジウム・パルバム（クリプトスポリジウム下痢症）
1986年	サイクロスポラ・カヤタネンシス（サイクロスポラ下痢症）

Table 2 主な再興感染症

<b>1. 細菌感染症</b>	
・劇症型A群レンサ球菌感染症	・ペスト
・ジフテリア	・結核
・百日咳	・コレラ
<b>2. ウイルス感染症</b>	
・狂犬病	・デング熱/デング出血熱
・ハンタウイルス肺症候群	・黄熱病
<b>3. 寄生虫感染症</b>	
・マラリア	・住血吸虫症
・リーシュマニア症	・トキソプラズマ症

ンの添加はコレラ毒素産生を亢進する。また、コレラ菌はカニやエビの甲殻に含まれている多糖であるキチンに結合するとともに、キチン存在下でその増殖が亢進する (Fig. 1) <sup>4)</sup>。

エルニーニョ現象は熱帯太平洋の中部から東部、ペルー沖にかけての海面水温が数年に1度大規模に上昇する現象である。近年では本現象は太平洋全域にわたり、半年以上続く大規模な気候変動と認識されることとなった。本現象と1991-92年にかけてのペルーでの100年ぶりのコレラ発生が関連するものと考えられるし、バングラデシュにおけるコレラ患者数とベンガル湾の海水温の上昇とはリンクすることが報告された。

### カンピロバクター腸炎と環境因子

Louisらはイングランドおよびウェールズにおけるカンピロバクター腸炎の疫学調査を行い、本感染症と関連する環境因子を考察した<sup>5)</sup>。20のブロックのうち、本感染症の発生の最も高かったのはウェールズおよびイングランド南東部であった(97-111人/10万人)のに対し、最も低率であっ

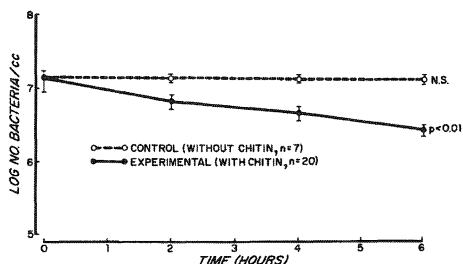


Fig. 1 *V. cholerae*のキチン質への吸着 (文献4より引用)

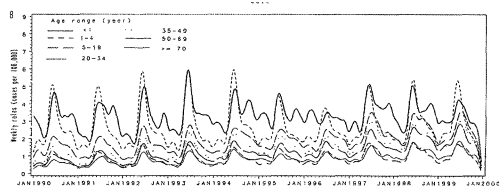


Fig. 2 カンピロバクター感染症の季節的発生 (文献5より引用)

たのはロンドン北部およびセント (35-54人/10万人)であった。カンピロバクター腸炎は季節的発生パターンを呈し、その発生率は気温と関連することが認められた (Fig. 2)。本症の予防には食材の衛生管理のみならず、環境因子に関する対応が重要であることが明らかにされた。

### VNCの定義

VNCとは“viable but non-culturable”の略語であり、生きているが(代謝活性はあるが)、通常の方法で培養できない細菌のことである<sup>6)</sup>。従来、顕微鏡的に観察される菌数と人工培地により培養される菌数とは大きな差があることが知られていた。海洋細菌では全菌数の1/10<sup>3</sup>~1/10<sup>4</sup>しか培養されないことが知られている。1982年、米国メリーランド大学のColwellらにより初めてVNCの概念が提唱された<sup>7)</sup>。一般にグラム陰性桿菌がVNC状態に変化することが知られ、*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Aeromonas*, *Legionella*など現在までに40種を越える菌種のVNC化が報告されている。多くの桿状形態の細菌においてそのVNC化に伴い球状形態に変化することが知られている。グラム陰性桿菌の他にグラム陽性桿菌の*Listeria*やグラム陽性球菌の*Micrococcus*や*Enterococcus*のVNC化も報告されている。

VNC細菌には2つの異なる系が存在するものと考えられている<sup>8)</sup>。第1にいかなる方法を用いてもコロニー形成が不可能な未知な細菌が存在する。海洋中には高度に密集した増殖形態を示さない、すなわちコロニー形成を行なえない細菌の存在が知られている。第2には通常の生理条件下ではコロニー形成可能な培養できる細菌であるが、種々のストレス(飢餓、温度変化、浸透圧変化など)を受けることにより、細菌の生理活性機能が変化し分裂増殖能を喪失した細菌となる現象が知られている。

## VNCの検出

VNCの検出には形態観察の他、VNC細菌の蛋白合成能、呼吸活性、酵素活性、RNA量等を指標にした種々の方法がある (Table 3). Direct viable countはDNA合成阻害剤ナリジクス酸と栄養源を添加し、蛋白合成により細胞肥大を来たした菌体を生きた細菌として計測する。DNA/RNA識別染色法は酸性条件下でアクリジンオレンジによりRNA量の多い菌体を検出する方法である。また、FISH法 (fluorescent in situ by bridization) は蛍光色素を標識したDNAプローブを用いて、菌体のrRNAを染色することにより、rRNA量の多い菌体を検出する方法である。

VNC細菌が培養できない原因の一つとして細菌の常在する環境条件と培養に用いる培地とに大きな差異が存在する点が挙げられる。VNC細菌の回復には従来とは異なる培地の考案が必要となる。一方、培養不可能なVNC菌を適切な処理により培養可能な菌へと回復させることが報告されている。*Vibrio cholerae*や*Helicobacter pylori*では45℃、30-60秒の熱ショックを加えた後、アンモニウム塩もしくはピルビン酸塩を含む培地に接種することによりVNC菌の回復が可能である。一方、*Legionella pneumophila*では本菌の自然宿主である赤痢アメーバと混合培養することにより、VNC菌の回復が可能となる。

## VNC菌の果たす役割

コッホの4原則 (①病原菌の検出②病原菌の分

離培養③動物への感染による疾病の誘導④感染動物からの病原菌の再分離) は感染起因菌を特定するための大原則とされてきたが、VNCの概念はこの原則と相反するものと言える。しかし、感染症患者から起因菌が分離されないことは臨床上市しばしば経験されるし、*V. cholerae*や*L. pneumophila*が環境中試料よりVNCの回復法により多数検出される。これらの事実はVNC菌が病原細菌感染症の発症に関連している可能性を推定させる。

*Salmonella* OranienburgのVNC菌はモルヒネ投与によりマクロファージ機能の低下したマウスに対して、通常の (VNCでない) *Salmonella* Oranienburgよりも強い病原致死性を有することが報告されている<sup>9)</sup>。また、*H. pylori*のVNCであるcoccoid formは胃上皮細胞への付着が可能であり (Fig. 3), 付着後に上皮細胞から炎症惹起に重要な役割を演じるインターロイキン8 (IL-8) の産生を誘導することが明らかにされている<sup>10)</sup>。胃内の*H. pylori*はらせん状形態を示すが、下部腸管に移行し、嫌気状態ではVNC化することが知られている。本菌感染者の糞便中には大量のVNC状態の*H. pylori*が存在し、このVNC菌を検出する糞便内抗原検査法は非侵襲性の*H. pylori*診断法として有用である。*H. pylori*の感染経路は十分解明されていないが、糞便由来の本菌VNCが一種のsurvival formとして環境中に存在して、水および食品に汚染し経口的にヒトに感染・伝播

Table 3 VNCの検出

1)形態観察
2)蛋白合成能(Direct Viable Assay)
3)呼吸活性
4)酵素活性
5)RNA量測定
6)FISH (fluorescent in situ hybridization) 法
7)PCR法

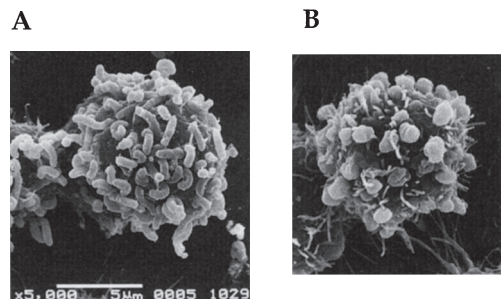


Fig. 3 *H. pylori*のらせん状菌 (A) およびVNC菌 (coccoid form) (B) の胃上皮細胞への付着性

することが推定されている。これらの事実より、細菌感染症の病態解析および診断に際して、今後VNCの存在を十分認識していくことが重要であると思われる。

### 終わりに

感染症と環境は互いに密接にリンクする。感染症起因病原体は環境因子により生物学的な影響を受ける。また、宿主自身も環境因子の影響により感染・発症の病態が左右される。AD1000年から現在までの地表温度の推移が解析された<sup>11)</sup>。1000年近く地表温度に大きな変化はなかったが、1975年から2000年までのわずか25年間で地表温度は0.4℃も上昇した (Fig. 4)。この上昇率で推移した場合、2100年の地表温度は2-3℃上昇することが推測される。温度上昇と感染症発生は密接な関連を有するため、感染症と環境に関する研究は世界的規模で重要な課題であり、今後の研究の進展が期待される。

### 参考文献

- 1) 神谷 茂：新興・再興感染症，全日本病院出版会，1998
- 2) Lipp EK, Huq A, Colwell RR：Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol Rev* 15：757-770, 2002
- 3) Singleton FL, Attwell RW, Jangi S, Colwell RR：Effect of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl Environ Microbiol* 44：1047-1058, 1982
- 4) Nalin DR, Daya V, Reid A, Levine MM, Cisneros L：Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect Immun* 25：768-770, 1979
- 5) Louis VR, Gillespie IA, O'Brien SJ, Russek-Cohen E, Pearson AD, Colwell RR: Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. *Appl Environ Microbiol* 71：85-91, 2005
- 6) 神谷 茂：VNC, 医学のあゆみ200：1070-1071, 2002
- 7) Roszak DB, Colwell RR: Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51：365-379, 1987
- 8) 山本啓之, 木暮一啓：Viable but non-culturable (VNC) の概念による細菌感染症へのアプローチ, 日細誌54：631-638, 1999
- 9) Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Makino S：Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice. *J Infect Dis* 186：1526-1529, 2002
- 10) Osaki T, Yamaguchi H, Taguchi H, Fukuda M, Kawakami H, Hirano H, Kamiya S: Interleukin-8 induction and adhesion of the coccoid form of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 51：295-299, 2002
- 11) McMichael AJ：Environmental and social influences on emerging infectious diseases：past, present and future. *Phil Trans R Soc Lond B* 359：1049-1058, 2004

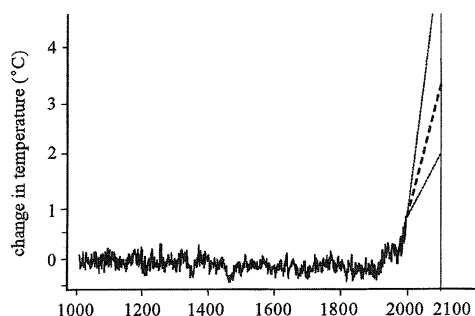


Fig. 4 AD1000年から現在に至るまでの地表温度の推移 (文献11より引用)

連絡先：神谷 茂

〒181-8611

東京都三鷹市新川 6-20-2

杏林大学医学部感染症学講座

TEL 0422-47-5511 (内線3462)

FAX 0422-44-7325

E-mail skamiya@Kyorin-u.ac.jp