

耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオのパルスフィールド電気泳動による解析

窪田 勉*

目的 腸炎ビブリオ食中毒の起因となる耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオ（以下産生株と略）の感染源を調査する。

方法 1998年に静岡県でアサリの漬け水（以下漬け水と略）から分離された血清型と同じ年に発生した食中毒患者から分離された血清型との一致率を調査した。また、主として食中毒患者から03：K6型と04：K68型が検出され、さらに漬け水からも03：K6型と04：K68型の産生株が検出されたので、これら菌株を用い菌DNAを制限酵素（*Sfi*I）による切断パターンをパルスフィールド電気泳動法（以下PFGEと略）で比較した。

結果 1. PCR法（Polymerase chain reaction）によって漬け水225件中23件から耐熱性溶血毒遺伝子（以下*tdh*遺伝子と略）を検出し、23件中5件から10株の陽性株を検出した。その血清型は03：K6型（4株）、03：K37型（2株）、04：K8型（1株）、04：K9型（2株）および04：K68型（1株）であった。

2. 漬け水から分離した5種類の血清型は同じ年に発生した集団食中毒事例において血清型を確認できた17例中17例（100%）、分離株でも100株中94株（94%）が漬け水由来と同一血清型であった。

3. 漬け水および患者から分離された03：K6型と04：K68型を使用して菌株間のDNAの異同をPFGEによって比較すると、供試した28株中26株は由来別でも、さらに血清型別でも泳動像は類似していた。

結論 腸炎ビブリオ食中毒の起因となる陽性株は環境から由来するものと推定した。さらに03：K6型および04：K68型が類似した泳動像を示したことについては同じPFGE型に属しているものと考察した。

Key words：腸炎ビブリオ，食中毒防止，パルスフィールド電気泳動法，PCR法，耐熱性溶血毒遺伝子

I 緒 言

腸炎ビブリオ食中毒（以下食中毒と略）は毎年、夏期を中心に発生し、冬期の発生は海外旅行者を除けばほとんどみられない。産生株の感染源、感染経路については陸上に近い海域で越冬し夏期の魚介類汚染¹⁾、患者または健康保菌者に由来する産生株の食品汚染^{2,3)}、さらに環境および患者の両方による食品汚染⁴⁾等が考えられている。

著者はこの問題に対し、静岡県で漬け水から分

離した産生株の血清型が同じ年に発生した食中毒事例の45%、食中毒患者からの分離株でも38%で一致し、さらに漬け水由来株の血清型が食中毒患者から分離される血清型菌よりも先行して分離されたこと、等から産生株は環境由来である可能性を示唆した⁵⁾。1998年は前回の調査項目を実施するとともに、主として保健所で食中毒患者から分離され、当所に同定依頼株数の多かった03：K6型と04：K68型と漬け水からも03：K6型と04：K68型の産生株が検出されたので、これら由来別の菌株間での異同をPFGEで調査したので報告する。

* 静岡県環境衛生科学研究所
連絡先：〒420-8637 静岡県北安東 4-27-2
静岡県環境衛生科学研究所 窪田 勉

II 研究方法

1. *tdh* 遺伝子および産生株の検出

1998年5月～8月の期間、毎週、漬け水15件、合計225件を *tdh* 遺伝子の検出に供試した。検体採取、最確数 (most probable number, MPN と略) および血清型別等は前報⁵⁾に準じて実施したが、PCR法は下記に示した部分を変更して行った。

1) DNAの抽出はMPNで使用した漬け水の10倍増菌液の3本からそれぞれ20 μ lずつ、合計60 μ lを140 μ lのTE (pH 8.0, 和光製)に浮遊させ、沸騰水中で10分間加熱処理後、12,000 rpm 10分間、冷却遠心した。

2) 熱変性は94°C 36秒、アニーリングは59°C 36秒、伸長反応は72°C 36秒、サイクル数は33回。

3) 前報⁵⁾では産生株の検出に我妻培地を用いたが、今回は我妻培地の代わりにPCR法で産生株の検出を実施した。すなわち、漬け水から *tdh* 遺伝子が検出されると、同じ検体で菌量測定の際に画線塗抹培養したTCBS培地上の青色のコロニーを7株～20株ずつプールし *tdh* 遺伝子の検出を行った。次に、プール検体から *tdh* 遺伝子が検出されると、プールしたTCBS培地上のコロニーを1株ずつ前処理してPCRを実施し産生株の検出を行った。

2. PFGE に使用した菌株

漬け水から検出された産生株の血清型は03:K37型, 04:K68型, 04:K8型, 03:K6型および04:K9型であったが、保健所で食中毒事例から分離され、しかも当所に同定依頼株数の多かったのは04:K68型と03:K6型であったので、PFGEには03:K6型と04:K68型を使用した。

使用した産生株03:K6型は表1の検体番号7の漬け水から8月10日に分離された2株と表2の8月中に発生した食中毒の事例2から2株、事例4から1株、事例5から1株、事例6から2株、事例8から2株、事例9から2株、事例14から2株、事例15から2株の合計14株を使用した。さらに04:K68型は表1の検体番号12の漬け水から6月16日に分離された1株と表2の8月中に発生した食中毒の事例7から1株、事例9から2株、事例11から2株、事例12から3株、事例13から3株の合計11株を供試した。なお、供試した総計28株の選定は無作為に抽出した。

表1 アサリの漬け水から分離された耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの血清型 (1998年)

| 検体番号 | 採取月日 | 供試プール数 | 供試株数 | <i>tdh</i> 遺伝子 | | 検出株の血清型 |
|------|-------|--------|------|----------------|-----|------------|
| | | | | 陽性 | 陰性 | |
| 8 | 6月8日 | 8 | 79 | 2 | 77 | O3:K37(2株) |
| 12 | 6月16日 | 3 | 24 | 1 | 23 | O4:K68(1株) |
| 2 | 7月7日 | 8 | 77 | 1 | 76 | O4:K8(1株) |
| 7 | 8月10日 | 11 | 150 | 4 | 146 | O3:K6(4株) |
| 9 | 8月10日 | 7 | 109 | 2 | 107 | O4:K9(2株) |

3. PFGE

PFGEはWong et al⁶⁾の方法に準じ、制限酵素 (*Sfi* I) を使用して菌DNAを切断後、1%アガロースゲル、0.5×TBEバッファー、電圧6 V/cm、パルスタイム5-50秒、温度7°Cの条件で24時間泳動した。

III 成績

1. 漬け水および食中毒患者から検出された産生株の血清型

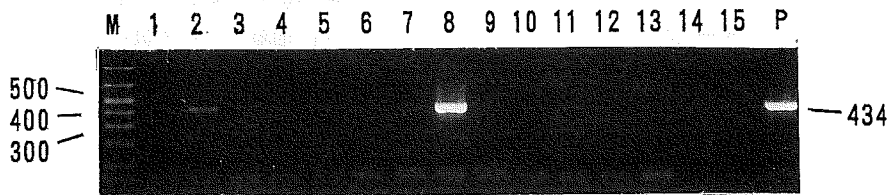
漬け水225件中23件から *tdh* 遺伝子を検出した。*tdh* 遺伝子を検出した漬け水23件のTCBS培地上の青色のコロニー1,409株を117件にプールし、プール検体を対象としてPCRを実施したところ5プールから10株の産生株が検出された。産生株は漬け水の希釈倍率10⁻¹で4件(9株)、10⁻²では1件(1株)から検出され、その血清型は03:K37型(2株)、04:K68型(1株)、04:K8型(1株)、03:K6型(4株)、および04:K9型(2株)であった(表1)。

一方、1998年に静岡県で発生した食中毒事例は34件であったが、そのうち、腸炎ビブリオによる食中毒は18件、食中毒と判断できなかった有症苦情例が2件、合計20件の発生が認められた。これら20件のうち、保健所から依頼され当所で血清型を確認できたのは15件(事例2, 4～9, 11～18)、静岡県以外で血清型を確認したために菌株を入手することができなかった2件(事例10と20)、残りの3件(事例1, 3と19)は腸炎ビブリオを病院で検出したため菌株を入手することができなかった事例である。17件の食中毒事例から100株の産生株が検出されたが、その内訳は01:K56型(3株)、03:K6型(57株)、03:K7型(1株)、03:K29型(1株)、04:K8型(18株)、04:K9

表2 集団食中毒患者から分離された耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの血清型 (1998年)

| 事例 | 発生日 | 発生地 | 血清型 | 事例 | 発生日 | 発生地 | 血清型 |
|----|-------|------|--|----|-------|------|--|
| 1 | 7月12日 | 修善寺町 | — | 11 | 8月26日 | 大東町 | *O4: K68(3株) |
| 2 | 8月2日 | 相良町 | *O3: K 6(5株) *O4: K 9(1株) | 12 | 8月27日 | 鶴山寺町 | *O4: K68(8株) |
| 3 | 8月6日 | 東伊豆町 | — | 13 | 8月29日 | 三ヶ日町 | *O4: K68(3株) |
| 4 | 8月8日 | 静岡市 | *O3: K 6(12株) | 14 | 8月29日 | 浜北市 | *O3: K 6(2株) |
| 5 | 8月9日 | 熱海市 | *O3: K 6(1株) O1: K56(1株) | 15 | 8月30日 | 御前崎町 | *O3: K 6(6株) O3: K 7(1株) O3: K29(1株) |
| 6 | 8月9日 | 富士宮市 | *O3: K 6(16株) | 16 | 9月9日 | 川津町 | O4: K55(1株) O1: K56(2株) |
| 7 | 8月21日 | 戸田村 | *O4: K68(1株) | 17 | 9月28日 | 焼津市 | *O3: K 6(3株) |
| 8 | 8月22日 | 熱海市 | *O3: K 6(3株) | 18 | 9月29日 | 富士宮市 | *O4: K 8(12株) |
| 9 | 8月23日 | 沼津市 | *O3: K 6(7株) *O4: K 8(1株) *O4: K68(2株) | 19 | 9月30日 | 富士宮市 | *O4: K 8(5株) |
| 10 | 8月23日 | 修善寺町 | *O3: K 6(2株) | 20 | 10月2日 | 沼津市 | — |

—は血清型別せず, () は分離株数, 事例7と11は有症苦情, *は漬け水由来と同一血清型

図1 6月8日に採取したアサリの漬け水15検体のMPN増菌液からのPCR法による*tdh*遺伝子の検出

型(1株), O4: K55型(1株)およびO4: K68型(18株)であった(表2)。

以上の成績から, 漬け水から検出された5種類の血清型は県下で発生した食中毒事例で血清型を確認できた17例中17例(100%), 分離株でも100株中94株(94%)が漬け水由来株と同一血清型であった。

2. *tdh* 遺伝子のアガロース泳動像

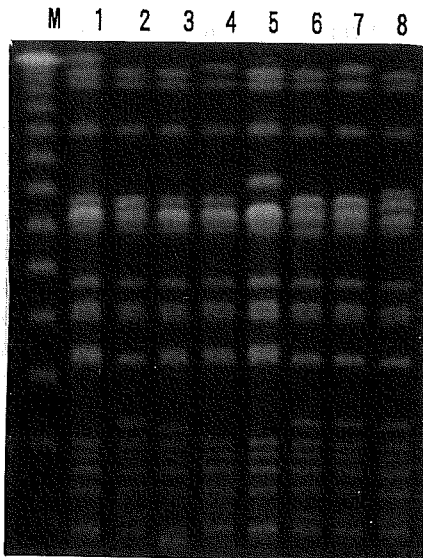
図1は6月8日に採取したアサリの漬け水15件の増菌液(希釈倍率 10^{-1})から*tdh*遺伝子を検出した時のアガロース電気泳動像を示した。レーンPは陽性コントロールであるが, レーン2(産生株不検出)と8(O3: K37型菌を検出)に腸炎ビブリオの特異的バンドがみられた。なお, 特異的バンドの濃淡(DNA量)と産生株の検出との関係を*tdh*遺伝子を検出した23例でみるとレーン8の泳動像で産生株が5件中3件, レーン2の泳動像で8件中2件, レーン2より薄い泳動像を示し

た10件からはまったく産生株を検出することはできなかった。

3. O3: K6型菌およびO4: K68型菌のPFGE型分布

O3: K6型菌は漬け水由来の2株と患者由来の14株を, さらにO4: K68型菌は漬け水由来の1株と患者由来の11株, 合計28株を使用してPFGEを実施した。漬け水由来のO3: K6型菌とO4: K68型菌との泳動像の比較, さらに漬け水由来株と患者由来株との泳動像の比較でも同一集団(表2の事例2)で供試したO3: K6型の2株を除いたすべての血清型が類似した泳動像を示した。図2は代表的な事例から菌株を1株ずつ選定してPFGEを実施した時の泳動像を示したが, レーンMはマーカー, レーン1は漬け水由来O3: K6型菌, レーン2は漬け水由来O4: K68型菌, レーン3~4(表2の事例4と15)は患者由来O3: K6型菌, レーン5はやや異なる泳動像を示した患者由

図2 漬け水および食中毒患者から分離された03 : K6型菌と04 : K68型菌の PFGE 型 (1998年)



来03 : K6型菌 (表2の事例2), レーン6~8 (表2の事例7, 9と12) は患者由来04 : K68型菌である。

IV 考 察

腸炎ビブリオは海水から由来し, 毎年夏期になると多発する細菌性食中毒の代表的な原因菌である。本菌の特徴は患者から産生株が容易に検出されるのに対し, 海水, 魚介類などの自然界由来株からの検出は極めてまれなことにある³⁾。そこで著者は1990年から漬け水を対象として産生株の故郷を究明するための疫学調査を実施してきたが, 前回, 産生株は沿岸海域の海水から由来する可能性が強いことを報告した⁵⁾。

本調査では漬け水中に存在する産生株を検出する方法として, 最初にPCRでスクリーニングし *tdh* 遺伝子を検出してきた。前回の報告でMPNの増菌液1,000 μ lを15,000 rpm 5分間遠心, 沈査を100 μ lの蒸留水に懸濁し沸騰水中で7分間過熱処理後, 遠心してDNAを抽出した。しかし, この方法でPCRを実施すると海水ビブリオの増加する7~8月の漬け水でしばしばアガロース泳動像にエキストラバンドがみられた。そこで, 今回報告のように前処理方法と熱変性の時間を変更してPCRを実施したところエキストラバンドがほ

ぼ消失した。このことから漬け水からの *tdh* 遺伝子の検出は容易になったが, しかし, *tdh* 遺伝子が検出されたすべての漬け水の増菌検体から産生株を検出することはできなかった。すなわち, 産生株の検出は特異的バンドの濃淡 (DNA量) に関係しており, 本報告の図1のレーン2と同じか, 濃い特異的バンドから産生株が検出される傾向がみられ, レーン2より薄いバンドからはまったく検出されなかった。したがって, 今後はレーン2と同じか, 濃い特異的バンドを示した漬け水を対象として産生株の検出を実施したいと思っている。

次に, 今回の成績でも漬け水から検出した5種類の菌の血清型が同じ年に発生した食中毒事例の100%, 食中毒患者では94%で一致し, さらに, 漬け水および食中毒患者からの分離株をPFGEで比較してもほぼ類似した泳動像を示した。したがって, 前回および今回の調査結果から産生株は沿岸海域の海水に常在し, 夏期になると海水温の上昇と共に増殖した産生株が魚介類等に付着してヒト社会に侵入して食中毒を発生させるものと考えられた。

なお, 03 : K6型菌は04 : K68型菌と類似したPFGE泳動像を示したが, Wong et al⁶⁾は1993年~1994年に台湾で食中毒患者から分離した130株, 13種類の血清型菌を対象としてPFGE分析を実施したところ14のPFGE型に大別されたと述べ, さらに1つの血清型菌が2~4種類のPFGE型に区別された結果, 1つのPFGE型でも最大5種類の血清型菌が属していたと報告している。したがって, 今回, 調査した03 : K6型菌と04 : K68型菌は同じPFGE型に属している菌株のために類似した泳動像を示したものと推定した。

最後に, PFGEを実施していただいた浜松市保健環境研究所古田敏彦技師に深謝いたします。

(受付 '99. 2.26)
(採用 '99. 6.29)

文 献

- 1) 我妻正三郎, 丹治和子, 湯田和郎, 他. 生カキによる腸炎ビブリオ食中毒の発生とその汚染源の追及. メディヤサークル. 1971; 16: 168-171.
- 2) 児玉 威. 腸炎ビブリオと神奈川現象. 臨床栄養. 1964; 13: 10-14.

- 3) 加藤貞治, 小原 寧, 山井四郎, 保母京子. 腸炎ビブリオの病原性. メディアサークル. 1968; 13: 155-158.
- 4) 西尾隆昌, 貴田正義, 下内啓万. 健康成人の腸炎ビブリオ保菌率および保菌期間. 日伝会誌. 1969; 43: 51-58.
- 5) 窪田 勉. 腸炎ビブリオの生態学的研究. 静岡県における腸炎ビブリオ食中毒の発生予測について. 日本公衛誌. 1996; 43(9): 844-853.
- 6) Wong, H-C. Lu, K-T. Pan, T-M. et al. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis, J. Clin. Microbiology, 1996; 34(6): 1535-1539.

ANALYSIS OF THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN-PRODUCING *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Tsutomu KUBOTA*

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, Control of food poisoning, PFGE method, PCR method, Thermostable direct hemolysin gene

Objectives We investigated the source of thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* infection (positive strains) that causes *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning.

Methods We investigated the coincidence rate of serotypes isolated from samples of sea water used to store clams in 1998 in Shizuoka Prefecture, and those isolated from patients who developed symptoms of food poisoning in the same year. Furthermore, using isolated types 03:K6 and 04:K68, We treated the chromosomal DNA with a restriction endonuclease *Sfi* I and compared the digestion patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results (1) Of 225 samples of sea water used to store clams, the thermostable direct hemolysin gene was detected in 23 samples by the PCR method. Among these 23 samples, 10 positive strains were detected in five samples. The serotypes of these productive strains were 03:K6 (four isolates), 03:K37 (two isolates), 04:K8 (one isolate), 04:K9 (two isolates) and 04:K68 (one isolate).

(2) The five serotypes isolated from the sea water samples were consistent with those of 17 of 17 cases (100%) of which serotypes could be confirmed by this institute and 94 of 100 strains (94%) isolated in a large scale outbreak of food poisoning that occurred in the same year.

(3) Using types 03:K6 and 04:K68 isolated from sea water samples and patients, chromosomal DNA were compared among the isolates by PFGE. As a result, of 28 isolates examined, 26 isolates showed a similar electrophoretic migration pattern between the sources and serotypes.

Conclusion The etiologic strains for *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning appear to have been derived from the environment. Regarding the findings that types 03:K6 and 04:K68 showed a similar electrophoretic migration pattern, these types can be considered to belong to the same PFGE type.

* Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science