

海産魚介類における腸炎ビブリオの汚染状況と耐熱性溶血毒遺伝子検出用プライマーの検討

丸山智子・川瀬雅雄・紫竹美和子・大野祥子・
不二崎順二・寺尾通徳

Keywords ; 腸炎ビブリオ ; 耐熱性溶血毒 (*tdh*) 遺伝子 ; アジ ; 海水 .

1 はじめに

腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*以下*V. p.*) は、沿岸海水や海産魚介類に広く分布し、とくに沿岸海水では海水温度の上昇する夏季に高率に検出される¹⁾。

*V. p.*による食中毒は、汚染された魚介類を喫食、あるいは二次的に汚染された食品を介して起こるが²⁾、発生時期も8月にピークを示す夏季多発傾向であり、冬季にはほとんどその発生はみられない^{1) 4)}。

また、かつては細菌性食中毒の原因菌として常に首位の座にいたが、1992年～1993年にかけ激変し、発生件数及び患者数ともに一時サルモネラを下回った³⁾。しかし、1994年頃から再び増加傾向を示し、1997年発生件数でサルモネラを上回り、1998年には発生件数および患者数ともに再び首位となった⁴⁾。

新潟県においても、1996年8月ゆでベニズワイガニによる患者数691人を出す大型の*V. p.*食中毒を経験し、行政として夏季に重点をおいた食中毒予防対策を徹底的に講じているところであるが、1998年に県内で発生した病因物質の判明した細菌性食中毒21事例中、16事例(76%)が*V. p.*によるものであり、全国の発生動向⁴⁾と同様であった。

新潟県では、*V. p.*食中毒予防対策事業の一環として、1991年から毎年夏季に県内で水揚げされる魚介類の*V. p.*を実施し、結果を随時、本庁経由で保健所や食品衛生関係者などに「腸炎ビブリオ情報」として提供している。

しかし、県内産魚介類の*V. p.*汚染と海水の*V. p.*汚染の関連などは十分に検討されていない状況にある。

このため、県内産のアジと海水の*V. p.*汚染状況の把握と、*V. p.*菌の病原因子の1つとされる耐熱性溶血毒(thermostable direct hemolysin以下*tdh*)遺伝子をPCR法を用いて増菌培養液からの迅速な検出を試みた。また、PCR法を用いるプライマーを検討するため、市販品(TaKaRa)のほかに、2種類のプライマーを設計し、これら3種類のプライマーの有用性についても調査をしたので報告する。

2 方 法

2.1 検体

1999年6月第3週から10月第3週までの間、週1回合計18回にわたり、県内のT漁港に水揚げされたアジを買い上げ、毎回10匹をランダムに選び1匹1検体とした。また、T漁港付近の海水を採取し、調査期間中それぞれ180検体、18検体の合計198検体並びに、1999年に県内で発生した*V. p.*による食中毒6事例から分離された21菌株を供試した。

2.2 気温および海水温

*V. p.*汚染状況との関係を調べるため、調査日の気温および海水採取時の海水の温度を測定した。

2.3 試料の調製

アジ1匹(1検体)を無菌的に細断しながら滅菌ストマック袋にとり、等量の滅菌生理食塩水を加え、1分間ストマックしたものを試料原液とした。

海水は、10 Lを孔径0.45 μmのメンブランフィルターで吸引濾過したのち、フィルターを滅菌ストマック袋にとり、滅菌生理食塩水10mlを加え、1分間ストマックしたものを試料原液とした。

2.4 *V. p.*の分離方法

直接分離培養法として、2.3で調製した試料原液および10段階希釈液をそれぞれTCBS寒天培地(栄研)2枚に0.1mlずつ塗抹し、35 18hr培養した。菌数測定は、発育した疑わしい白糖非分解のコロニー数を計測し、そのうちの1～10コロニーについて生化学的性状⁵⁾を確認し、*V. p.*と同定された数を係数換算して1g当たり又は1L当たりの菌数とした。

また、直接分離培養法の検出限界を考慮して、増菌培養も併用することとした。試料原液10mlに食塩ポリミキシンブイオン(栄研、以下SPB)90mlを加え、35 18hr増菌培養した後、TCBS寒天培地2枚に10 μlずつ塗抹し、35 18hr培養した。発育した白糖非分解コロニーについて、同様に生化学的性状を確認し、*V. p.*を同定した。

2.5 PCR法による*tdh*遺伝子の検出

2.5.1 テンプレートDNAの作製

アジ及び海水由来菌のテンプレート用の菌液は、SPBで増菌した培養液1 mlを、12,000rpmで5分間遠心分離し、

沈渣を滅菌水で1回洗浄後, 100 μ lの滅菌水に懸濁して作成した。その後, 菌液を97 μ l, 10分間ボイリングし, 12,000rpmで5分間遠心分離した上清をテンプレートDNAとした。

食中毒事例分離株のテンプレートDNAは, 滅菌水100 μ lに懸濁して同様に処理して作成した。

2.5.2 *tdh*遺伝子検出用プライマー

市販の腸炎ピブリオ*tdh*遺伝子検出用Primer Set VPD-1, VPD-2 (TaKaRa) とGenBankのデータベースから得た塩基配列を参照して作製したVP-F1; 5'-CGTCATTCTGGCAAAGTTAT-3', VP-R1; 5'-TGATTTTACGAACACAGCAG-3', VP-F2; 5'-CCCGGTTCTGATGAGATATT-3'及びVP-R2; 5'-CTGATTTTACGAACACAGCA-3'の3種類のプライマーを用いた。

2.5.3 反応液の組成及び反応条件

PCR反応は全て40 μ l系で行い, 市販プライマーは, 添付使用書に従った。オリジナルプライマーの試薬組成は, H₂O 27.0 μ l, $\times 10$ reaction buffer 4.0 μ l, dNTP Mixture (2.5mM each) 3.2 μ l, プライマー0.8 μ l (100pmol/ μ l) 及びTaq DNA polymerase 0.2 μ l (5 U/ μ l) とし, テンプレートDNAを4.0 μ l加えた。

反応条件は, 市販プライマーと同様に熱変性は, 94 $^{\circ}$ C, 1 min, アニール55 $^{\circ}$ C, 1 min及び伸長72 $^{\circ}$ C, 1 minを1サイクルとして35サイクル行った。

PCR増幅産物は, エチジウムブロマイド加1.0%アガロースゲルで, 100V, 30min電気泳動し, トランスイルミネーターにて各増幅DNAサイズを確認した。

2.6 *tdh*遺伝子陽性検体からの菌の分離

2.5により*tdh*遺伝子が検出された検体について, SPB増菌培養液をTCBS寒天培地に塗抹し, 35 $^{\circ}$ C 18hr培養した。発育した全てのコロニーをそれぞれSPBに接種し, 35 $^{\circ}$ C 18hr培養後, 各200 μ lを5本ずつプールし, 再びPCR法に供試した。*tdh*遺伝子陽性になったプール検体は更に1本まで絞り, TCBS寒天培地に塗抹, コロニーを分離し, PCR法による*tdh*遺伝子及び逆受身ラテックス凝集反応(RPLA法, デンカ生研)により*tdh*を確認した。

2.7 血清型別

2.1の食中毒事例分離株及び2.6により分離された菌株について, 市販の腸炎ピブリオK型別及びO群別診断用免疫血清(デンカ生研)を用いるスライドガラス凝集反応により血清型別を行った。

3 結果及び考察

3.1 *V. p.*の検出状況

検体の*V. p.*菌数を表1に示した。

アジ180検体の菌数は, 最大菌数(Max)で $10^{4.9}$ cfu/g, 最小菌数(Min)で $10^{1.0}$ cfu/g以下であり, 調査1回当たりのMaxとMinにはかなりひらきがあり, 個体差があるように思われた。1回あたりの平均値をみると, 7~8月にかけてピーク($10^{4.1}$ ~ $10^{3.6}$ cfu/g)を示し, 9月まで漸次的に高値を示した(図1)。

海水18検体の菌数は, Max > $10^{3.3}$ cfu/L, Min < $10^{0.7}$ cfu/Lで7月にピークを示し, 8月は 10^2 レベル, 6月と9月後半以降は低値を示した。

気温及び海水温との関係を見ると, 気温は調査開始から

表1 *V. p.*の検出状況

回	調査日	種別	n	菌数*			種別	n	菌数	気温()	海水温()
				Max	Min	Ave					
1	99/06/14	アジ	10	<1.0	<1.0	<1.0	海水	1	<0.7	26.8	21.7
2	99/06/21	アジ	10	1.3	<1.3	1.3	海水	1	0.7	24.0	22.4
3	99/06/28	アジ	10	2.3	<1.3	1.6	海水	1	<0.7	25.3	22.8
4	99/07/05	アジ	10	3.3	1.0	2.5	海水	1	1.0	25.9	23.0
5	99/07/12	アジ	10	2.6	<1.0	1.9	海水	1	>5.2	25.4	23.9
6	99/07/21	アジ	10	4.9	2.0	4.1	海水	1	3.3	25.6	24.9
7	99/07/26	アジ	10	3.7	<2.0	3.0	海水	1	2.6	35.2	29.8
8	99/08/02	アジ	10	4.8	2.0	4.0	海水	1	2.2	36.2	29.8
9	99/08/09	アジ	10	4.1	<1.0	3.2	海水	1	2.0	34.6	30.2
10	99/08/17	アジ	10	2.8	1.3	2.3	海水	1	2.4	35.3	31.0
11	99/08/23	アジ	10	4.2	2.0	3.6	海水	1	1.7	33.5	30.5
12	99/08/30	アジ	10	3.5	1.9	2.9	海水	1	2.4	31.9	28.9
13	99/09/07	アジ	10	3.9	1.0	3.2	海水	1	2.4	27.7	27.2
14	99/09/13	アジ	10	4.1	1.3	3.3	海水	1	2.7	33.3	29.5
15	99/09/20	アジ	10	3.6	<1.0	2.7	海水	1	1.7	28.2	26.3
16	99/09/27	アジ	10	4.1	<1.0	3.2	海水	1	1.0	28.0	25.7
17	99/10/04	アジ	10	2.2	<1.0	1.8	海水	1	0.7	24.3	24.6
18	99/10/12	アジ	10	2.4	1.4	2.0	海水	1	2.0	22.5	23.3

* : Log₁₀ [菌数 / g , 菌数 / L]

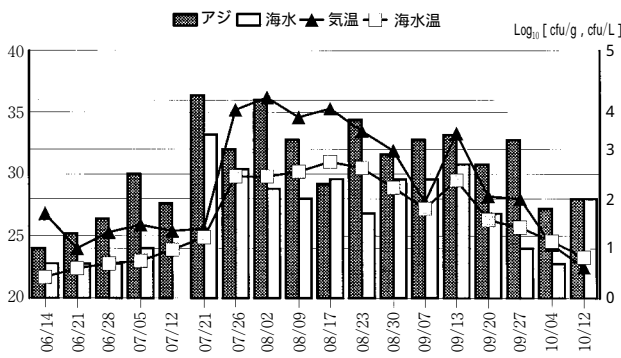


図1 V. p.菌数の推移

7月中旬まで25前後、以降8月まで30以上(ピーク8月2日36.2)、9月以降は徐々に下がり、調査終了の10月に入ると25以下に推移した。海水温も気温より低いものの、8月をピークとする気温と相関した値を示し、気温及び海水温の上昇とともにV. p.の菌数も増加した。

とくに海水におけるV. p.菌数の変化は、このような気温及び海水温の変化とほぼ相関を示したが、菌数のピークはアジよりも早い時期(7月12日)に見られた。

3.2 白糖分解菌の検出状況

バックグラウンドとしてTCBS寒天培地上に発育した白糖分解菌数を表2に示した。

アジは、Maxは $>10^{4.9}$ cfu/g、Minは $10^{2.2}$ cfu/gと、V. p.に

表2 白糖分解菌数の検出状況

回	調査日	種別	n	菌数			種別	n	菌数	気温()	海水温()
				Max	Min	Ave					
1	99/06/14	アジ	10	3.9	2.3	3.4	海水	1	1.7	26.8	21.7
2	99/06/21	アジ	10	3.4	2.2	2.9	海水	1	2.0	24.0	22.4
3	99/06/28	アジ	10	3.7	2.9	3.4	海水	1	2.6	25.3	22.8
4	99/07/05	アジ	10	4.3	2.9	3.8	海水	1	2.5	25.9	23.0
5	99/07/12	アジ	10	4.0	2.8	3.7	海水	1	>6.0	25.4	23.9
6	99/07/21	アジ	10	4.4	3.3	4.1	海水	1	4.8	25.6	24.9
7	99/07/26	アジ	10	4.3	2.8	3.8	海水	1	3.7	35.2	29.8
8	99/08/02	アジ	10	>5.1	3.6	4.5	海水	1	4.0	36.2	29.8
9	99/08/09	アジ	10	3.7	2.3	3.1	海水	1	3.2	34.6	30.2
10	99/08/17	アジ	10	4.4	3.1	3.8	海水	1	3.9	35.3	31.0
11	99/08/23	アジ	10	4.9	3.2	4.4	海水	1	3.3	33.5	30.5
12	99/08/30	アジ	10	4.3	3.5	4.1	海水	1	4.8	31.9	28.9
13	99/09/07	アジ	10	4.9	2.9	4.1	海水	1	4.2	27.7	27.2
14	99/09/13	アジ	10	4.1	2.8	3.6	海水	1	3.7	33.3	29.5
15	99/09/20	アジ	10	4.4	3.1	3.9	海水	1	4.3	28.2	26.3
16	99/09/27	アジ	10	4.8	2.6	4.0	海水	1	3.5	28.0	25.7
17	99/10/04	アジ	10	4.6	2.4	3.7	海水	1	3.9	24.3	24.6
18	99/10/12	アジ	10	4.8	3.9	4.5	海水	1	5.3	22.5	23.3

* : Log_{10} [菌数 / g, 菌数 / L]

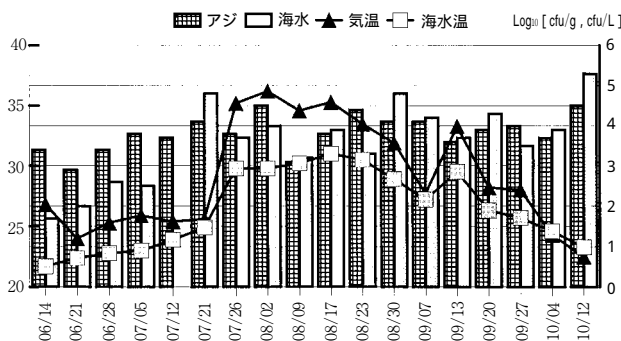


図2 白糖分解菌数の推移

比べて1~2オーダー高い値となった。調査1回あたりの平均値は $10^{2.9} \sim 10^{4.5}$ cfu/gと調査期間全体にかけて、比較的平均した値であった。

海水についても、Maxは $>10^{5.3}$ cfu/L、Minは $10^{1.7}$ cfu/Lとアジと同様にV. p.より1~2オーダー以上高い値であり、7月にピークを示したが調査終了の10月中旬まで平均した値であった(図2)。

以上の結果から、白糖分解菌数と気温及び海水温との明らかな関係は認められなかった。

3.3 tdn遺伝子の検出

アジ及び海水の増菌培養液からのtdn遺伝子検出状況を表3に示した。tdn遺伝子は、アジ180検体中1検体(0.6%)、海水18検体中5検体(27.8%)、合計198検体中6検体(3.0%)から検出された。月別では、7月及び8月に集中し、海水が7月5日(第4回)~8月9日(第9回)まで

表3 増菌培養液からのtdh遺伝子検出状況

月 回	n(10) 検出数	ア ジ			n(1) 検出数	海 水		
		プライマー				プライマー		
		TaKaRa	F1/R1	F2/R2		TaKaRa	F1/R1	F2/R2
6 1	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
2	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
3	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
7 4	0/10	-	-	-	1/1	+	+	+
5	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
6	0/10	-	-	-	1/1	+	+	+
7	0/10	-	-	-	1/1	+	+	+
8 8	0/10	-	-	-	1/1	+	+	+
9	0/10	-	-	-	1/1	+	+	+
10	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
11	1/10	+	+	+	0/1	-	-	-
12	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
9 13	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
14	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
15	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
16	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
10 17	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
18	0/10	-	-	-	0/1	-	-	-
計	1/180				5/18			
検出率	0.6%				27.8%			

表4 食中毒事例からのtdh遺伝子検出状況

事例	発生 月日	分 離 菌 株		
		血清型	患者/食品	tdh遺伝子*
1	7月30日	03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
2	8月13日	03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
3	8月29日	01: K56	患者	+
		03: K 6	患者	+
		03: K29	患者	+
4	9月1日	04: K11	患者	+
		01: KUT	患者	+
		01: KUT	患者	+
		01: KUT	患者	+
5	9月2日	03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
		03: K 6	患者	+
6	9月23日	03: K 6	従事者	+
		02: K28	食品	-
		04: K 9	患者	+
		04: K 9	患者	+

* 3種のプライマーで結果は一致した

の間、7月12日(第5回)を除く調査で、アジは8月23日(第11回)のみ検出された。

3.4 tdh遺伝子陽性検体からの菌の分離

増菌培養液からtdh遺伝子が検出された検体は、2.6の方法により、7月21日(第6回)調査分の海水からtdh遺伝子陽性V.p.を分離することができた。増菌培養液をTCBS寒天培地上に広げ、発育した全69コロニーについて精査した結果、3株のtdh遺伝子陽性菌株が分離でき、RPLA法によりtdhを確認したところ全て陽性となった。

同時に、生化学的性状から3株ともにV.p.と同定され、血清型別を行ったところ、04: K37となりO・K抗原組み合わせ不一致の血清型となった。

新血清型の提案(V.p.の新しいO・K抗原の組み合わせ)には、該当する菌株がKP(神奈川現象)陽性であることが必要条件(腸炎ピブリオ血清型別委員会)である⁶⁾としているが、今回の3株についてKPの確認は行っていない。

しかし、KPに関与するとされるtdhは遺伝子及び産生性ともに確認していることから、今後KP等詳細を精査する必要があるものと考えられる。

3.5 tdh遺伝子検出用プライマーの検討

アジ及び海水の増菌培養液と1999年に県内で発生したV.p.食中毒事例(表4)から保健所が分離した菌株を用いて、

3種類のプライマーを比較したところ、表3、4のとおり

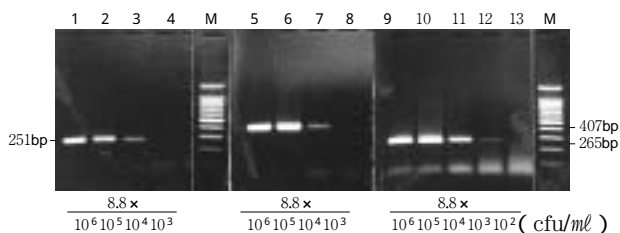


図3 各種のプライマーの菌数濃度におけるtdh遺伝子の検出限界

- 1 ~ 4 レーン: TaKaRaプライマー
- 5 ~ 8 レーン: F1/R1プライマー
- 9 ~ 13 レーン: F2/R2プライマー
- M: DNAマーカー(100bpラダー)

検出結果は全て一致し、それぞれ、TaKaRaでは、251bpが、VP-F1/R1では、407bp及びVP-F2/R2では、265bpの特異バンドが確認された。このことから、3.4で分離した菌株を用いて、それぞれのプライマーのtdh遺伝子の検出限界を調べた(図3)。市販プライマー及びVP-F1/R1プライマーでは、 8.8×10^4 cfu/ml、VP-F2/R2プライマーでは 8.8×10^3 cfu/mlとなり、作製した2種類のプライマーは市

販プライマーと同程度*tdh*遺伝子を増幅し、特に、検出限界実験の結果からVP-F2/R2プライマーは有用であると考えられた。

4 ま と め

- (1) 調査開始の6月から、アジ及び海水において*V. p.*が検出され、気温、海水温の上昇とともに菌量も増加し、調査終了の10月には再び減少する傾向にあった。
- (2) *tdh*遺伝子は、アジ1/180検体(0.6%)、海水5/18検体(27.8%)から検出され、7月及び8月に集中した。また、*tdh*遺伝子が検出された海水から、*tdh*陽性*V. p.*を分離することができ、血清型は04:K37(OK組み合わせ不一致)であった。
- (3) 3種類の*tdh*遺伝子検出用プライマーについて検討した。供試検体では、市販品とオリジナル両者とも遜色なく全て結果が一致し、検出限界からとくにVP-F2/R2プライマーは有用である。

このように、アジ及び海水から菌量は少ないものの、調査開始6月及び終了の10月に入っても*V. p.*が検出されることから、食中毒を予防するためには、夏場前後の時期も含めた注意が必要と思われた。

また、*V. p.*に対して白糖分解菌等による汚染が著しく、*V. p.*菌量が少ない場合、増菌培養を行っても分離培養法では検出されないことも考えられる。

一方、PCR法は迅速的で少量の菌でも検出可能であり、本調査のように増菌培養液から行えば、更に分離培養する時間が短縮できる。今回、*tdh*遺伝子が検出された培養液から*tdh*陽性*V. p.*が分離されたことから、この方法はスクリーニングとして充分活用できると思われた。

また、食中毒事例において食品由来株から*tdh*遺伝子が検出されることは少なく、PCR法を食品検査にも応用することで菌の分離が不可能であっても病原因子の検出が迅速にできると考えられる。

文 献

- 1) 坂崎利一編：食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版，p. 154 (1991)。
- 2) 善養寺浩，坂井千三，寺山 武，工藤泰雄，伊藤武：腸管系病原菌の検査法，医学書院，p. 125 (1985)。
- 3) 国立感染症研究所，厚生省保健医療局：病原微生物検出情報，17，151 (1996)。
- 4) 国立感染症研究所，厚生省保健医療局：病原微生物検出情報，20，159 (1999)。
- 5) 赤羽荘資他：微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版，(財)日本公衆衛生協会，D - 70 (1987)。
- 6) 諸角浩利他：神奈川県衛生研究所研究報告，24，17 (1994)。