

食品及び環境からの TDH, TRH 産生腸炎ビブリオの分離及び分離株の解析

佐々木寿子, 加藤美和子, 白幡 祐子, 寺澤 宏司, 不二崎順二

Isolation and Analysis on TDH, TRH Producing *Vibrio parahaemolyticus* from Foodstuff and Environmental specimensHisako Sasaki, Miwako Kato, Yuko Shirahata
Hiroshi Terasawa and Junji Fujisaki

Keywords: 腸炎ビブリオ, TDH, TRH, 海水, アジ

1 はじめに

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*; V.p) は世界各地の沿岸海域に広く分布し、水温が 15℃ 以上になると海水から検出されるようになる¹⁾。

近年の日本における V.p 食中毒は 1994 年頃から増加し、1998 年には細菌性食中毒で事件数及び患者数共に最多となり、その後減少傾向にあるが、依然として上位に位置している²⁾。県内では、1996 年にゆでベニズワイガニによる 700 人を超える患者を出す大型食中毒が発生しており、地形的にも南北に長い海岸を有し、海産物の利用度も高いため、今後も注意をしていかなければならない食中毒である。

V.p の病原因子には、100℃ 15 分間の加熱に耐える耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin; TDH) 及び生物学的、免疫学的に TDH と類似した易熱性の耐熱性溶血毒類似毒 (TDH-related hemolysin; TRH) がある。食中毒患者から分離される V.p のほとんどが TDH 又は TRH を産生するのに対し、食中毒関連食品や海産魚介類、海水等からこれらの因子を産生する V.p を分離することは極めて困難といわれている³⁾。

そこで、TDH 又は TRH を産生する V.p の効率的な増菌法を検討し、PCR 法や免疫磁気ビーズ法等を用いて食品及び環境からの菌分離を実施した。分離株について、遺伝子型、毒素型、毒素産生性、血清型、及び TDH 産生株については世界的大流行を起こしている新クローン特異遺伝子を確認し解析した結果、不明な点が多い食中毒と環境との因果関係について若干の知見を得たので報告する。

2 検査方法

2.1 検体

2002 年及び 2003 年の 6 月から 10 月までの間、毎週約 10 匹計 255 匹の近海産アジ、T 及び M 漁港近海の沿岸海水 (以下 T 海水, M 海水) 計 75 (2003 年は 6 月から 11

月までの間) 及び 2003 年 10 月及び 11 月に採取した T 及び M 漁港近海の沿岸海泥 (以下 T 海泥, M 海泥) 計 8、夏場に県内 10 カ所で採取した岩カキ 23 個並びに 2002 年、2003 年に当所に搬入された 4 事例の食中毒関連食品を検体とした。

2.2 試料の調製

アジは 1 匹、岩カキはむき身 1 個全量を細切し、等量の 3% NaCl 加リン酸緩衝液 (以下 PBS) を加え、1 分間ストマッキングしたものを試料原液とした。海水は 10L を孔径 0.45 µm のメンブランフィルターで吸引濾過し、フィルターを PBS 10ml 中で同様に処理した。海泥はできるだけ均一に混ぜ試料とした。食中毒関連食品は細切した後、等量の生理食塩水を加え、同様に処理したものを試料原液とした。

2.3 増菌方法

2.3.1 増菌方法の検討

検体搬入が夕方になる場合が多いため、時間的制約を考慮し、効率的な分離法を検討した。また、食品や環境中の V.p は損傷したり、生きているが培養できない状態で生存していることがあるため⁴⁾、これらの菌の存在を念頭に検討した。1 次増菌は非選択性の 2% NaCl 加トリプトソイブイオン (以下 TSB) を使用し、35℃ で 6 時間増菌後、他菌の増殖を抑制するため 4℃ に保存し、翌朝、2 次増菌として食塩ポリミキシンブイオン (以下 SPB) に継代し、35℃ 6 時間培養した。夕方、3 次増菌として SPB に継代し、35℃ 18 時間培養し、これを増菌法 1 とした。この方法と、4℃ 保存をせずに、翌朝まで 35℃ で 18 時間 1 次増菌し、以下同様に継代する増菌法 2 との両方法で、TDH 及び TRH 遺伝子の検出感度を比較した。

2.3.2 接種試験

患者由来 TDH 産生 V.p (O 3 : K 6) 1 個以下と、海水由来 *Vibrio alginolyticus* (V.a) 約 10⁶ 個及び患者由来 *Vibrio vulnificus* (V.v) 約 10⁵ 個とを TSB 90ml に添加した模擬試料 A と、海水由来 TRH 産生 V.p (O10 : KUT)

1個以下, V.a 約 10^6 個及び V.v 約 10^5 個を TSB90ml に添加した模擬試料 B について, それぞれ 1~3 次の各増菌液の TDH, TRH 遺伝子の検出感度を比較した. また, 海水由来 TDH 産生 V.p (O 4: K37), 海水由来病原因子陰性 V.p (O 5: K17), 海水由来 V.a 及び患者由来 V.v の各菌をアジに添加した 4 種の模擬試料 (模擬試料 C: O5: K17 約 10^6 個, 模擬試料 D: O4: K37 約 10^2 個, O5: K17 約 10^3 個を混合, 模擬試料 E: O4: K37 約 10^2 個, O5: K17 約 10^3 個, V.a 約 10^2 個, V.v 約 10^2 個を混合, 模擬試料 F: O 4: K37 約 10^2 個, O 5: K17 約 10^3 個, V.a 約 10^4 個, V.v 約 10^3 個を混合) 及び菌未添加試料 (陰性対照) を 1 次増菌液の TSB90ml に接種し, 2 次増菌液まで遺伝子検出を実施した.

2.4 増菌試験

2.2 で調製した試料原液 10ml (海水は 9ml, 海泥は 10g) を TSB 90ml に加え, 35°C 6 時間培養後 4°C に保存した. 翌朝, 菌が増殖する表層部 1ml を SPB10ml に植継ぎ, 35°C 6 時間培養した後, 同様に表層部 1ml を 4 本の SPB10ml に植継ぎ 35°C 18 時間培養した. 2, 3 次増菌液は TDH, TRH 産生菌検出のため PCR 法を実施すると共に, クロモアガービブリオ平板 (以下 CAV) に塗抹した. また, 食中毒関連食品は試料原液 1ml を TSB10ml に接種し, 以後同様に操作し, アジ及び岩カキについては 2 次増菌までとした.

2.5 分離試験

2.5.1 PCR 法による TDH, TRH 産生菌の検出

各増菌液 1ml を 7,000rpm で 5 分間遠心後, 上清を除去し, リン酸緩衝液 1ml を加え遠心して洗浄した. 沈渣に滅菌水 $100\mu\text{l}$ を加え混和後 100°C 10 分間加熱し, 12,000rpm 5 分間遠心した上清をテンプレート DNA とした. TDH 遺伝子検出用プライマーは当所で設計⁵⁾ した VP-F1: $5'$ -CGTCATTCTGGCAAAGTTAT- $3'$, VP-R1: $5'$ -TGATTTTACGAACACAGCAG- $3'$ を用いた. TRH 遺伝子検出用プライマーは西瀨ら⁶⁾ が報告した trh-1: $5'$ -GGCTCAAAATGGTTAAGCG- $3'$, trh-2: $5'$ -CATTTCCGCTCTCATATGC- $3'$ を用いた. これらは, 増幅サイズが 407bp と 250bp のため, Multiplex PCR 法で行った. PCR 反応は $25\mu\text{l}$ 系で実施し, プライマーは各 $0.25\mu\text{l}$ ($100\text{pmol}/\mu\text{l}$), テンプレート DNA は $2.5\mu\text{l}$, 反応液は TaKaRa 製を使用した. 増幅条件は, 熱変性 94°C 1 分間, アニーリング 55°C 1 分間, 伸長 72°C 1 分間を 35 サイクルで行った. 泳動ゲルは 2% Seakem ME agarose (TaKaRa 製) を使用し, 100V, 35 分間電気泳動した.

2.5.2 TDH, TRH 産生菌の分離

2.5.1 により, 遺伝子が陽性の増菌液を塗抹した CAV から V.p 様の藤色のコロニーを釣菌した. TDH 産生 V.p のスクリーニングは, 我妻寒天培地が用いられるが, 食品や環境等の分離株は溶血活性が弱い菌があり判定が難しい. このため, プロットした菌をグループ分けし, PCR 法で確認した. TRH 産生 V.p のスクリーニングは, ウレ

アーゼを指標にクリステンゼンの尿素培地を用いて 4 時間以内に赤変したコロニーを PCR 法で確認した. また, 2003 年に遺伝子が検出されたが菌分離ができなかった増菌液 (8/22 の M 海水及び 11/4 の M 海泥) は, 20% ジメチルスルホキシド (DMSO) 加 SPB を等量加え⁷⁾, -80°C に保存して後日再検出を行った. また, 血清型が判明している食中毒や海水等から以前検出された遺伝子産生 V.p の検出は, 対応する K 抗体を感作させた免疫磁気ビーズで集菌し菌分離を行った.

2.6 分離株の解析

2001 年 (当所の保存株) 及び 2002 年, 2003 年に当所で分離した TDH, TRH 産生株及び保健所が分離した食中毒患者株は, パルスフィールド電気泳動法 (PFGE), Group-specific PCR 法 (GS-PCR), PCR 法, 逆受身ラテックス凝集反応 (KAP-RPLA) 等の各検査により検討した.

2.6.1 PFGE 法

1% NaCl 加 TSB で 37°C 一晩培養した増菌液 $200\mu\text{l}$ を分取し, 12,000rpm 5 分間遠心した上清を除去後, 滅菌水 $200\mu\text{l}$ を加え保温した. そこに保温した 1% Seakem Gold agarose (TaKaRa 製)⁸⁾ を等量加え, サンプルプラグキャスターへ注入しプラグを作製した. プラグはプロテナーゼ K 溶液 1ml (PK 1mg, N-lauroylsarcosine 10mg in 0.5M EDTA PH8.0) で 50°C 2 時間菌体処理した後, 泳動用の大きさにカットし, 4mM Pefabloc SC 溶液 (4mM Pefabloc SC in TE) $500\mu\text{l}$ で 50°C 30 分間失活処理した. この操作を繰り返した後, TE 1ml に替えて氷上で 30 分間振とうした後, 酵素バッファー (BSA $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む) $200\mu\text{l}$ に替え, 氷上で 30 分間平衡化し, Not I $100\mu\text{l}$ (30U) で 37°C 3 時間制限酵素処理した^{8) 9)}. 泳動用バッファー ($50\mu\text{M}$ チオ尿素加 $0.5 \times \text{TBE}$)¹⁰⁾ $400\mu\text{l}$ に替え, プラグを前処理した DNA サイズマーカー (Lambda ladder, Bio-Rad 製) と共にコム面に置き, 1% Seakem Gold agarose 100ml を流した. CHEF DR II (Bio Rad 製) を使用し, 泳動条件は $6.0\text{V}/\text{cm}$, 14°C , スイッチタイムは 4~8 秒 12 時間, 8~50 秒 10 時間¹¹⁾ とした.

2.6.2 GS-PCR

滅菌水 $100\mu\text{l}$ 中に菌を浮遊させ, 100°C 10 分間加熱後, 12,000rpm 5 分間遠心した上清をテンプレート DNA とした. プライマーは松本ら¹²⁾ が報告した GS-VP.1: $5'$ -TAATGAGGTAGAAACA- $3'$, GS-VP.2: $5'$ -ACGTAACGGGCTACA- $3'$ を使用した. PCR 反応は $25\mu\text{l}$ 系で実施し, プライマーは各 $0.5\mu\text{l}$ ($100\text{pmol}/\mu\text{l}$), テンプレート DNA は $2.5\mu\text{l}$, 反応液は TaKaRa 製を使用した. 増幅条件は, 熱変性 96°C 5 分間を 1 サイクル, 熱変性 96°C 1 分間, アニーリング 45°C 2 分間, 伸長 72°C 3 分間を 35 サイクル, 最終伸長 72°C 7 分間を 1 サイクル¹²⁾ 行った. 泳動条件は PCR 法に準じた.

3 結果及び考察

3.1 増菌方法の検討結果

模擬試料 A 及び B の接種試験の結果を Fig. 1 に示した。模擬試料 A は増菌法 1 及び 2 共に 1, 2 次増菌では遺伝子が検出されなかったが, 3 次増菌では検出され, 増菌方法による検出感度の差は認められなかった。模擬試料 B は増菌法 1 では 1 次増菌は遺伝子が検出されなかったが, 増菌法 2 では遺伝子が検出された。2, 3 次増菌では両方法共に遺伝子が確認され, 1 次増菌を 18 時間行う増菌法 2 の方が検出感度が良かった。しかし, 各増菌液を塗抹した

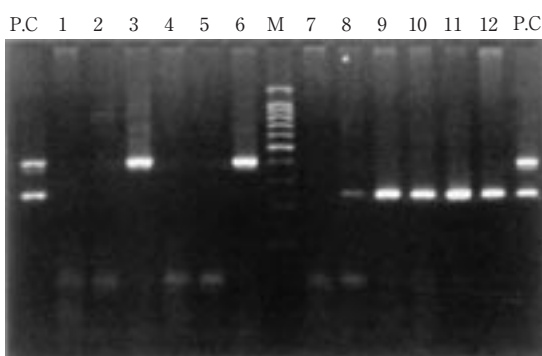


Fig. 1 Comparison in two growth methods (1).

lane 1 to 3 : PCR products from growth method 1
lane 4 to 6 : PCR products from growth method 2
(P.C : positive control, M : 100bp ladder DNA size marker, 1 - 3, 4 - 6 show each result at their 1st to 3rd step of growth in surrogate specimen A.)

lane 7 to 9 : PCR products from growth method 1
lane 10 to 12 : PCR products from growth method 2
(7 - 9, 10 - 12 show each result at their 1st to 3rd step of growth in surrogate specimen B.)

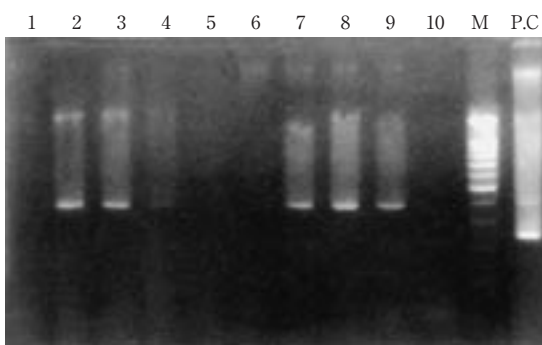


Fig. 2 Comparison in two growth methods (2).

lane 1 to 5 : PCR products from TSB 1st growth medium

lane 6 to 10 : PCR products from SPB 2nd growth medium

(P.C : positive control, M : 100bp ladder DNA size marker, 1 - 5, 6 - 10 show each surrogate specimen C - F, and negative control in order.)

CAV による V.p の分離状況は, 増菌法 1 は増菌法 2 に比べ V.p 以外の菌の生育が抑制され, 他菌の集落の影響を受けず分離が容易であった。

アジに接種した模擬試料の結果を Fig. 2 に示した。TDH 産生 V.p を 10^2 個添加した模擬試料 D 及び E は 1, 2 次増菌共に遺伝子が検出されたが, 同量の V.p に他のビブリオ属を多量に添加した模擬試料 F は 1 次増菌では遺伝子が検出されず, 2 次増菌で遺伝子が検出された。

以上の結果から, 1 次増菌で非選択性の TSB を使用し, 2 及び 3 次増菌は選択性の SPB を使用する増菌法は, 菌数が最小発症菌量といわれる 10^3 個¹³⁾ 以下の場合においても 2, 3 次増菌で遺伝子が検出でき, 1 次増菌の 4℃ 保存後は検出感度が下がるが, 2 次増菌では 18 時間培養と大差が無く, 分離培地上における他菌による妨害も少ないことがわかった。

3.2 環境等からの TDH, TRH 遺伝子の検出状況

2002 年～2003 年における検出状況を Table 1 に示した。2002 年は海水 35 検体中 7 検体から TDH, 9 検体から TRH を, アジ 130 検体中 4 検体から TRH の各遺伝子を検出した。2003 年は海水 40 検体中 3 検体から TDH, 1 検体から TRH, 1 検体から TDH・TRH を, 海泥 8 検体中 4 検体から TDH, 1 検体から TRH を, アジ 125 検体中 7 検体から TRH の各遺伝子を検出した。また, 岩カキからは検出されなかった。

3.3 環境等からの TDH, TRH 産生 V.p の分離状況

Table 1 に示したように 2002 年は TDH 産生株が海水から 3 株, TRH 産生株が海水から 5 株, アジから 4 株分離された。2003 年は TDH 産生株が海水から 3 株, 海泥から 4 株, TRH 産生株が海水から 1 株, 海泥から 1 株, アジから 6 株分離された。また, TDH・TRH 産生株が海水から 2 株分離された。

3.4 食中毒関連食品からの検出結果

Table 2 に 2002 年及び 2003 年の食中毒関連食品からの分離菌株の解析結果を示した。2002 年は 1 事例の食品 (No.68) が搬入され, TSB で 1 次増菌し, SPB で 2 次増菌した増菌液から Fig. 3 で示したように患者と同じ TDH 産生 V.p が分離された。また, 2003 年は 3 事例の食品が搬入され, 1 事例 (No.58) から患者と同じ TDH 産生 V.p が分離された。この検体は食品残量が極少量だったため, 食品を包んでいたラップごと試料調製をした。この 2 次増菌液は, 既に患者分離株が O 3 : K 6 と判明していたため, K 6 抗体感作磁気ビーズで集菌後 CAV に塗抹し, そこから鈎菌した 50 コロニーを 5 グループに分けて PCR 法で検索した。その結果, 全グループから TDH 遺伝子が検出され, その中の 1 グループを検索した結果 TDH 産生 V.p が分離された。この分離株は Fig. 3 の PFGE 解析結果から食中毒患者分離株と同一の遺伝子型を示し, 原因食品であることが確認された。

3.5 分離株の解析結果

Table 2 に 2001 年～2003 年の食中毒及び環境からの分

Table 1 Detection of TDH, TRH gene in environmental specimens

Year	Date	Specimen	Agent	Passage time	Serovar	Notes
	7 / 22	sea water M	TRH	3	-	ND (collect with K34, 61)
	7 / 29	sea water T	TDH	3	-	ND (collect with K37)
	8 / 5	sea water T	TDH	3	-	ND (collect with K37)
		sea water M	TRH	3	-	ND (collect with K34, 61)
	8 / 12	sea water T	TDH	2	-	ND
	8 / 19	sea water M	TRH	2	-	ND
2002	8 / 26	saurel 102	TRH	2	O10 : KUT	
		saurel 104	TRH	2	O10 : KUT	
		saurel 105	TRH	2	O10 : KUT	
		saurel 107	TRH	2	O10 : KUT	
	9 / 2	sea water M	TDH	2	O 1 : KUT	
		sea water T	TDH	2		ND
			TRH	2		ND
	9 / 9	sea water M	TRH	2	O10 : KUT	
	9 / 17	sea water M	TRH	2	O10 : KUT	collect with K34, 61
			TRH	2	O 1 : KUT	collect with K34, 61
	9 / 24	sea water M	TRH	2	O10 : KUT	
	9 / 30	sea water M	TRH	2	O10 : KUT	
	10 / 8	sea water T	TDH	2	O 4 : K37	collect with K37, 66
			TRH	2		ND
	10 / 22	sea water T	TDH	2	O 1 : KUT	
	7 / 22	saurel 46	TRH	2	O10 : KUT	
			TRH	2	O10 : KUT	
TRH			2		ND	
8 / 4	saurel 69	TRH	2	O10 : KUT		
	sea water T	TDH	2	O 3 : K 6	isolated with TDH (-)	
8 / 11	sea water T	TDH	3	O 1 : KUT		
8 / 22	sea water M	TRH	3	OUT : KUT	confirmation for DMSO storage	
		TDH · TRH	3	O10 : KUT	〃	
		TDH · TRH	3	O10 : K52	〃	
8 / 24	saurel 96	TRH	2	O10 : KUT		
	saurel 98	TRH	2	O10 : KUT		
8 / 31	saurel 109	TRH	2	O10 : KUT		
10 / 20	sea mud T	TDH	2	O 4 : K37		
11 / 4	sea water T	TDH	2	O 4 : K37		
	sea mud T	TDH	1	O 4 : K37		
	sea mud M	TRH	2	O10 : K52	confirmation for DMSO storage	
11 / 10	sea mud T	TDH	3	O 4 : K37		
11 / 18	sea mud T	TDH	2	O 4 : K37		

Table 2 Results of isolation (2001 - 2003)

Serover	Year	Date	No	Specimen	GS-PCR	RPLA	PFGE pattern	Notes	
[I] O 4 : K37 TDH +	2001	8 / 20	1	sea water T	-	+	Ia		
	2002	10 / 8	2	sea water T	-	+	Ia		
	2003	10 / 20	3	sea mud T	-	+	Ia		
		11 / 4	4	sea water T	-	+	Ia		
			5	sea mud T	-	+	Ia		
		11 / 10	6	sea mud T	-	+	Ia		
		11 / 18	7	sea mud T	-	+	Ia		
[II] O10 : KUT TRH +	2001	8 / 20	8	sea water T			IIa		
	2002	8 / 26	9	saurel			IIb		
		9 / 9	10	sea water M			IIb'	(one band differ from IIb)	
		9 / 17	11	sea water M			IIb'	∕	
		9 / 24	12	sea water M			IIb'	∕	
	2003	9 / 30	13	sea water M			IIb'	∕	
		7 / 22	14	saurel			IIc		
			15	saurel			IIc		
		8 / 4	16	saurel			IIc		
		8 / 24	17	saurel			IIc		
			18	saurel			IIc		
		8 / 31	19	saurel			IIc		
		8 / 22	20	sea water M			IIc		
			21	sea water M	-	+	IIe	tdh, trh (+)	
			22	sea water M	-	+	IIe	O10 : K52 tdh, trh (+)	
		11 / 4	23	sea mud M			IIc	O10 : K52	
	[III] O1 : KUT TDH +	2002	9 / 2	24	sea water M	-	+	IIIa	
			10 / 22	25	sea water T	-	+	-	
		2003	8 / 4	26	sea water T	+	+	IIIb	O1 : K25
			8 / 11	27	sea water T	+	+	IIIc	
	[IV] O3 : K6 TDH +	2001	7 / 28	28	stool *	+	+	IVa'	(one band differ from IVa)
			8 / 14	29	stool *	+	+	IVd	
				30	stool *	+	+	IVd	
31				stool *	+	+	IVd		
32				stool *	+	+	IVb'	(two band differ from IVb)	
8 / 31			33	stool *	+	+	IVa'	(one band differ from IVa)	
			34	stool *	+	+	IVa'	∕	
			35	stool *	+	+	IVa'	∕	
			36	stool *	+	+	IVa'	∕	
			37	stool *	+	+	IVa'	∕	
			38	stool *	+	+	IVa'	∕	
			39	stool *	+	+	IVa'	∕	
			40	stool *	+	+	IVa'	∕	
2002			8 / 25	41	stool *	+	+	IVc	(three band differ from IVa)
			7 / 13	42	stool *	+	+	IVa'	(two band differ from IVa)
			8 / 10	43	stool *	+	+	IVa'	(one band differ from IVa)
		7 / 27	44	stool *	+	+	IVa		
		8 / 16	45	stool *	+	+	IVb	(two band differ from IVa)	
		8 / 4	46	sea water T	+	+	IVb	(two band differ from IVa)	
		2003	6 / 15	47	stool *	+	+	IVa	
				48	stool *	+	+	IVa	
			49	stool *	+	+	IVa		
			50	stool *	+	+	IVa		
			51	stool *	+	+	IVa		
7 / 24			52	stool *	+	+	IVa'	(one band differ from IVa)	
			53	stool *	+	+	IVa'	∕	
			54	stool *	+	+	IVa'	∕	
			55	stool *	+	+	IVa'	∕	
8 / 24	56		stool *	+	+	IVa			
	57		stool *	+	+	IVa			
	58		food stuff *	+	+	IVa'	sea urchin (one band differ from IVa)		
[V] Other TDH +	2001	7 / 26	59	stool *	+	+	IVa'	O4 : K68 (one band differ from IVa)	
			60	stool *	+	+	IVa'	∕	
			61	stool *	+	+	IVa'	∕	
			62	stool *	+	+	IVa'	∕	
	2002	7 / 25	63	stool *	+	+	IVa'	∕	
			64	stool *	-	+	Va	O3 : K29	
			65	stool *	-	+	Va	∕	
			66	stool *	-	+	Va	∕	
			67	stool *	-	+	Va	∕	
			68	food stuff *	-	+	Va	∕ octopus	
		8 / 7	69	stool *	-	+	Vb	O1 : K56	
			70	stool *	-	+	Vb	∕	
		71	stool *	-	+	Vb	∕		
	2003	7 / 24	72	stool *	-	+	-	O4 : K8	
		7 / 24	73	stool *	+	+	IVa'	O4 : K68 (one band differ from IVa)	
			74	stool *	+	+	IVa'	∕	
			75	stool *	+	+	IVa'	∕	
			76	stool *	+	+	IVa'	∕	
			77	stool *	+	+	IVa'	∕	
			78	stool *	+	+	IVa'	∕	

* Obtained from food poisoning cases

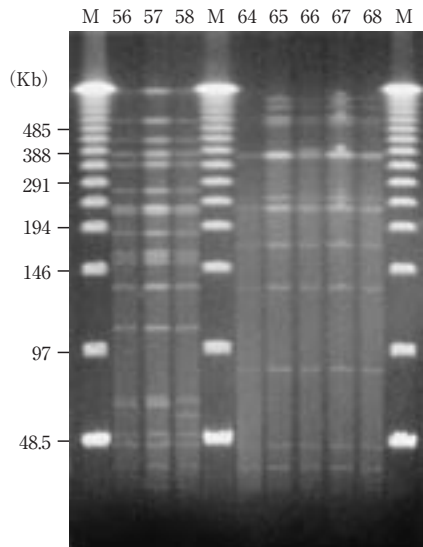


Fig. 3 Patterns of PFGE by *NotI* in isolates from patients (56 - 57, 64 - 67) and causative foods (58, 68) in 2 outbreak cases. (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

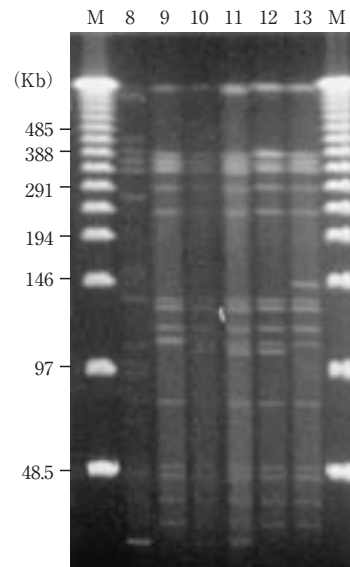


Fig. 5 Patterns of PFGE by *NotI* in sea water and saurel isolates (O10 : KUT, TRH +) . (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

離菌株の解析結果を示した。2001年及び2002年にT海水(No. 1, 2), 2003年にT海水(No. 4)及びT海泥(No. 3, 5, 6, 7)から分離されたTDH産生V.p(O4:K37)はFig. 4に示したPFGEの解析結果から遺伝子型が全て同一だった。このように、同一の遺伝子型のTDH産生V.p(O4:K37)が海水から3年間にわたり分離され、更に海泥からも複数回分離されたことは、T漁港近海の沿岸海域に同一クローンが生息していることが示唆された。また、2002年にアジ(No. 9)とM海水(No.10~13)から分離されたTRH産生V.p(O10:KUT)はFig. 5に示したように遺伝子型に極めて高い類似性が見られた。一

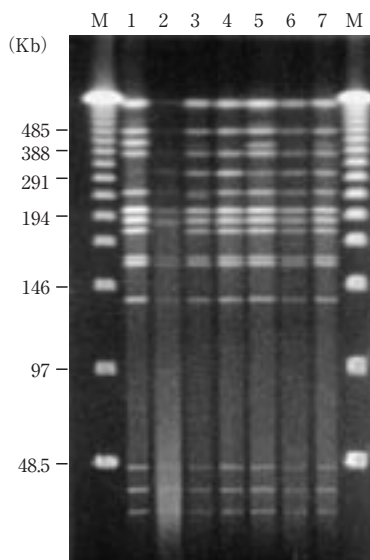


Fig. 4 Patterns of PFGE by *NotI* in sea water and mud isolates (O4 : K37, TDH +) from T area. (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

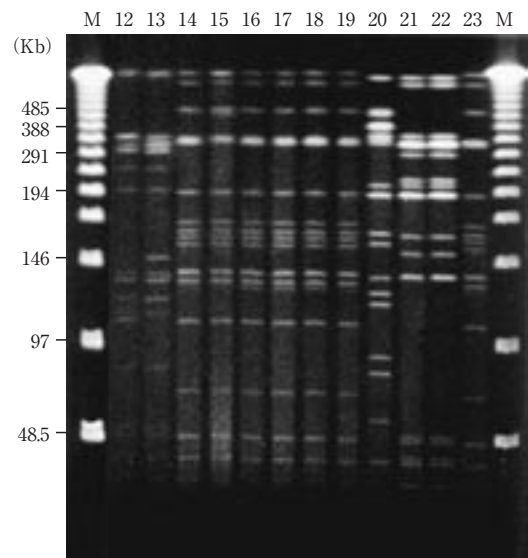


Fig. 6 Patterns of PFGE by *NotI* in sea water, mud and saurel isolates (O10 : KUT , O10 : K52, TRH +) . (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

方、2003年にM海泥(No.23)から分離されたTRH産生V.p(O10:K52)はFig. 6に示したようにアジ(No.14~19)分離株(O10:KUT)と遺伝子型が同一だったが、M海水(No.20~22)分離株(O10:KUT, O10:K52)とは異なった遺伝子型であった。Fig. 5及びFig. 6のPFGE解析結果から、M海水から2002年及び2003年に連続して分離されたTRH産生V.p(O10:KUT)は年別に遺伝子型が違い、同じ血清型でも複数のクローンが存在していることがわかった。また、2001年~2003年に分離されたTDH産生V.p(O3:K6)はGS-PCRの結果から、全て新クローンであることがわかった。その中で、2003年に

海水 (No.46) から分離された株は Fig. 7 の PFGE 解析結果から 2002 年の食中毒患者株 (No.45) と遺伝子型が同一で、他の食中毒患者株とも類似した遺伝子型を示した。また、2001 年と 2003 年に分離された食中毒患者株の O4 : K68 も新クローンで Fig. 8 の PFGE 解析結果から O3 : K6 株と遺伝子型が類似していた。

このように、環境から病原因子産生菌が反復して検出され、同じ遺伝子型の菌が海産魚類及び食中毒患者から検出されたことは、環境の汚染と人への感染が密接に関与し、環境汚染が人への感染源になる可能性を示唆する。今回検出された海水や海泥に生息していると思われる TDH 産生 *V.p* の病原性の強弱についてはこれからの課題であるが、

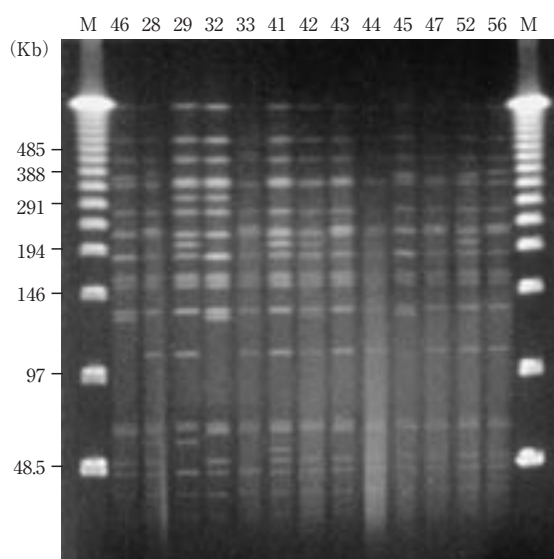


Fig. 7 Patterns of PFGE by *NotI* in sea water and food poisoning isolates (O 3 : K 6) . (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

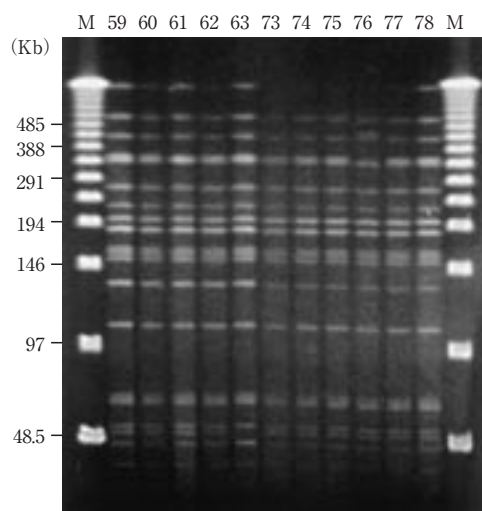


Fig. 8 Patterns of PFGE by *NotI* in isolates from patients (59 - 63, 73 - 78) in 2 outbreak cases. (M : DNA size marker ; Lambda ladder)

県内においても新クローンが高度に侵淫しており、今後新たなクローンが流行を起こす可能性も考えられ、これらの消長に注目すると共に、継続して監視していく必要があると思われる。

4 ま と め

- (1) 食品及び環境からの TDH, TRH 産生 *V.p* の分離を目的に増菌方法を検討した。その結果、1 次増菌で非選択性の TSB で 35℃ 6 時間培養後 4℃ 保存し、2 次、3 次増菌で選択性の SPB で各々 6 時間及び 18 時間培養する方法は最小発症菌量 (10³ 個) 以下まで検出可能なため、食中毒関連食品の病原因子産生菌の検索に対応でき、分離培地 (CAV) 上の菌生育状況も他菌の影響が少なく分離が容易であった。
- (2) T 海水 (海泥) において、同じ遺伝子型の TDH 産生 *V.p* (O 4 : K37) が毎年分離されることから、T 漁港近海の沿岸海域には本菌が生息しているものと推測された。
- (3) M 海水 (海泥) から 2002 年及び 2003 年に連続して分離された TRH 産生 *V.p* (O10 : KUT) は年別に遺伝子型が違い、定着しているとは結論付けられなかった。
- (4) 2002 年に M 海水から、2003 年に M 海泥から分離された TRH 産生 *V.p* は同じ年のアジから分離された株と遺伝子型が同一なものがあり、相互の明らかな関与が示唆された。
- (5) 2003 年に T 海水から分離された TDH 産生 *V.p* (O 3 : K 6) は、世界的に大流行している新クローンで、県内の食中毒患者分離株等と遺伝子型の高い類似性がみられた。

文 献

- 1) 坂崎利一編：新訂食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規，p.158 (2000)。
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**20**, 159 (1999)。
- 3) 島田俊雄：臨床検査，**47**, 476 (2003)。
- 4) 島田俊雄：食品衛生研究，**51**, 9 (2001)。
- 5) 丸山智子他：新潟県保健環境科学研究所年報，**15**, 79 (2000)。
- 6) 西淵光昭他：日本臨床微生物学雑誌特別号，**50**, 350 (1992)。
- 7) T. Tomoyasu : Appl. Environ. Microbiol, **58**, 2679, (1992)。
- 8) 厚生科学研究パルスネット精度管理資料 (2003)。
- 9) 国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会資料，p.17 (1997)。
- 10) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，**23**, 68 (2002)。
- 11) 刑部陽宅他：日本食品微生物学雑誌，**17**, 6 (2000)。
- 12) C. Matsumoto et al.: J. Clin. Microbiol, **38**, 578 (2000)。
- 13) 島田俊雄：臨床検査，**47**, 477 (2003)。