

海水中の腸炎ビブリオ TDH,TRH および ToxR 遺伝子の検出

山口仁孝

Detection of the Thermostable Direct Hemolysin Gene(TDH), Thermostable Direct Hemolysin-Related Hemolysin Gene(TRH) and ToxR Gene of *Vibrio parahaemolyticus* in the seawater

Yoshitaka YAMAGUCHI

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, TDH, TRH, ToxR, seawater
 キーワード: 腸炎ビブリオ, TDH, TRH, ToxR, 海水

はじめに

近年、腸炎ビブリオの新型クローン 03:K6 や 04:K68 による食中毒事件が全国的に急増し、平成 11 年度の腸炎ビブリオ食中毒患者数は細菌性食中毒患者全体の約半数に達し、県内においてもいけす鮮魚が原因と思われる食中毒事件等が相次いでいる。

海水域に分布する腸炎ビブリオの reservoir や環境中での消長については長年にわたり調査されている^{1, 2, 3)}が、環境中の腸炎ビブリオの中で病原性腸炎ビブリオの分離率は 7~8% と非常に低い⁴⁾ため、汚染実態調査や食中毒事件における原因究明については困難な状況となっている。

そこで今回、海水中の病原性腸炎ビブリオのスクリーニング検査として、PCR 法を用いて耐熱性溶血毒素遺伝子 (TDH)、耐熱性溶血毒素類似毒素遺伝子 (TRH) および病原性発現調節遺伝子 (ToxR)⁵⁾の検出を試みたので報告する。

材料と方法

1. 調査期間

6月~9月。

腸炎ビブリオの増殖が盛んになる水温域(20℃以上)。

2. 検査材料

(1) 増菌培地およびプライマーの比較試験

調査に先立って、食中毒および環境由来の腸炎ビブリオ 9 株および他の *Vibrio* 属 5 株の保存菌株を用いて、増菌培地による PCR 抑制試験と各プライマーの特異性を調査した。

(2) 海水調査

表 1 に示す角力灘、大村湾、有明海、橘湾の定点

調査 9 地点の海水および市場使用水・いけす水各 1L (合計 73 検体)。定点調査地点については各 3 回調査した。

表 1 定点調査地点

| 海域 | 採材地点 | 海域 | 採材地点 |
|-----|------|-----|------|
| 角力灘 | K 港 | 大村湾 | 中央中 |
| 有明海 | M 港 | 大村湾 | 中央南 |
| 有明海 | K 港 | 大村湾 | 久山沖 |
| 橘湾 | U 港 | 大村湾 | 郡川沖 |
| 大村湾 | T 港 | | |

3. 検査方法

(1) 増菌培地およびプライマーの比較試験

各 1 コロニーを 2%NaCl 加 TSB および食塩ポリミキシンブイオンにて 37℃18 時間増菌した菌液について、各遺伝子の検出を試みた (表 2)。

TemplateDNA は 2%NaCl 加 TSB または食塩ポリミキシンブイオンに 18 時間培養した培養液 1ml を 5,000r.p.m で 5 分間遠心した後上清を除き、残渣を 1ml の滅菌蒸留水に懸濁し、100℃5 分間加熱した後、10,000r.p.m で 1 分間遠心した上清を用いた。

PCR 産物は 0.5μg/ml の Ethidium Bromide を含む 1%アガロースに電気泳動後、360nm 紫外線照射によりバンドの有無を確認した。

(2) 海水調査

採材時に水温・pH 測定を行ったのち、図 1 に示すフローに従い約 1L の海水を口径 0.45μm のフィルターにて吸引ろ過を行い、そのフィルターを食塩ポリミキシンブイオンに無菌的に投入し 37℃で 18 時間培養した。培養液 1ml から (1) と同様に TemplateDNA を熱抽出し、PCR 法による毒素遺伝子のスクリーニン

グ検査を実施した後、陽性検体についてはブイオンから5枚のTCBS寒天に画線塗抹し、それぞれ20コロニーを釣菌して我妻培地 (TDH 陽性)、ウア-ゼ寒天 (TRH 陽性) へ接種し菌分離を試みた。

表2 PCR 反応混合液組成, Primer および反応条件

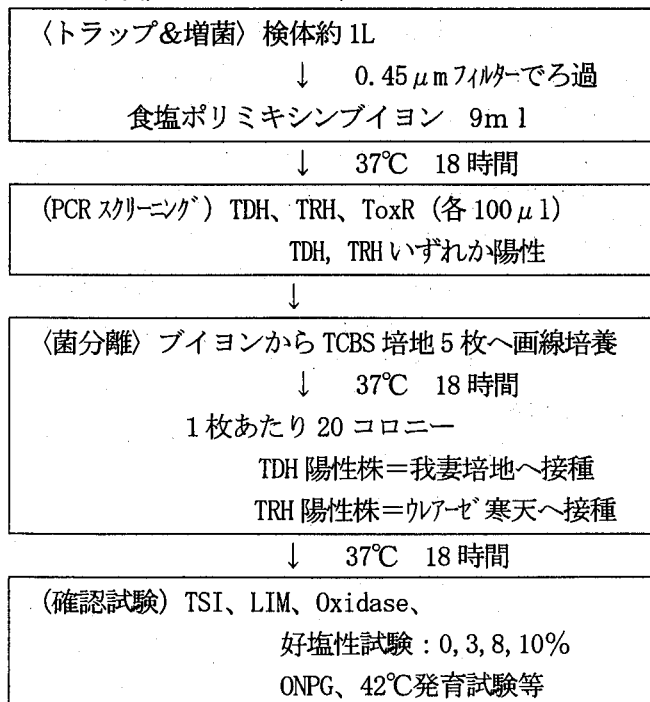
| | |
|---------------------------|----------|
| ×10EXTaq buffer | 5.0 μl |
| dNTP Mixture (2.5mM each) | 4.0 μl |
| DNA primer sense | 2.5 μl |
| DNA primer antisense | 2.5 μl |
| Takara ExTaq (5U/μl) | 0.25 μl |
| 滅菌蒸留水 | 25.75 μl |
| Template DNA | 10.0 μl |

| 標的遺伝子 | 塩基配列 | 増幅断片長 |
|--------------------|---------------------------------------|-------|
| TDH ⁵⁾ | TDH-3 5' - CCACTACCCTCTCATATGC - 3' | 251bp |
| | TDH-5 5' - GGTACTAAATGGCTGACATC - 3' | |
| TRH ⁶⁾ | TRH-SS 5' - GCCTTCAGTTTGCTATTGGC - 3' | 484bp |
| | R6 5' - CATTCCCGCTCTCATATGC - 3' | |
| ToxR ⁷⁾ | ToxR-1 5' - AGCCCGCTTTCTCAGACTC - 3' | 399bp |
| | ToxR-2 5' - AACGAGCTTCTGCATGGTG - 3' | |

<PCR 反応条件>

| | | |
|--------|---------------------------------|-----------|
| 熱変性 | 94°C 30sec |) 35cycle |
| アニーリング | 55°C 30sec (65°C 30sec ToxR) | |
| 伸長 | 72°C 30sec | |

図1 海水調査のフローチャート



調査結果

(1) 増菌培地およびプライマーの比較試験

保存菌株を用いた試験では2%NaCl 加 TSB および食塩ポリミキシンブイオン間に検出率の差は認められなかった。

TDHについてはRPLA法による毒素産性試験結果と一致した。TRHについては今回供試した菌株はすべて陰性であった。また、ToxRについては試験した全腸炎ビブリオの血清型と *V. alginolyticus* および *V. vulnificus* においても陽性を示した (表3)。

(2) 海水調査

・海水

調査を開始した6月5日の平均海水温はすでに腸炎ビブリオが増殖する20°Cを超え、ビブリオ汚染の指標となるToxR 遺伝子もすでに検出された。(2/4 検体—大村湾)

TDHについてはすべての海水で検出されなかった。TRHについては有明海の検体で陽性が1 検体認められたが、菌の分離はできなかった。ToxRについては大村湾中央中、南を除くすべての検体から検出された(表4)。

・市場水およびいけす水

平均海水温は17.0°C、平均pHは6.9であった。

TDHはすべての検体で陰性、TRHは県央地区および県南地区の3 検体で検出されたがいずれも菌分離はできなかった。ToxRは38 検体中31 検体で検出され、陽性群の平均pHは陰性群と比べ高い傾向にあったが、平均海水温については逆に高くなっていた(表5)。

考 察

各プライマーの有用性が確認されたことから、食中毒事件における原因食品・ふきとり検体などのスクリーニング検査に利用可能と思われた。特にToxRについては環境中の腸炎ビブリオ汚染のスクリーニング検査に有用と考えられた。

菌分離については、TRH 陽性が4 検体認められ、それぞれ約100 コロニーずつを尿素培地に釣菌したものの分離はできなかった。環境中の病原性腸炎ビブリオは全体の菌量に比べ少量で、しかも Non-culturable な状態で存在しているとも推測されるため、分離の過程でアルカリペプトン水やs TSB を用いた3次増菌法や免疫磁気ビーズ法を取り入れる必要があると思われた。

海水の調査では、ToxR の検出には平均水温・pH とも影響がないものと思われた。

定点調査では6月ではすでにToxR が検出され、ビブ

財属が増殖していた。また、大村湾中央部（中央中、中央南）では、温度・pHとも他地点と変わらないものの、TDH, TRH, ToxRともまったく検出されなかった。このことについては今後詳細な調査が必要と思われるが、原因の1つとして他の陽性地点と異なり、淡水の影響が少ないことが考えられた。

いけす水 49 検体の調査では、ToxR 陽性が 41 検体、TRH 陽性が 3 検体認められたことから、今後、飲食店等におけるいけす水の衛生管理指導の強化が必要と思われた。

表3 増菌培地およびプライマーの比較試験結果

| 番号 | 菌種 | 血清型 | | TDH RPLA | TDH | | TRH | | ToxR | |
|----|--------------------------|-----|----|----------|---------------------|------------------|-------|----|-------|----|
| | | O | K | | s TSB ¹⁾ | PB ²⁾ | s TSB | PB | s TSB | PB |
| 1 | <i>p arahaemolyticus</i> | 2 | 28 | - | - | - | - | - | + | + |
| 2 | <i>p arahaemolyticus</i> | 3 | 31 | - | - | - | - | - | + | + |
| 3 | <i>p arahaemolyticus</i> | 4 | 42 | - | - | - | - | - | + | + |
| 4 | <i>p arahaemolyticus</i> | 5 | 15 | - | - | - | - | - | + | + |
| 5 | <i>p arahaemolyticus</i> | 5 | 30 | - | - | - | - | - | + | + |
| 6 | <i>p arahaemolyticus</i> | 2 | 3 | - | - | - | - | - | + | + |
| 7 | <i>p arahaemolyticus</i> | 4 | 68 | + | + | + | - | - | + | + |
| 8 | <i>p arahaemolyticus</i> | 4 | 55 | + | + | + | - | - | + | + |
| 9 | <i>p arahaemolyticus</i> | 3 | 6 | + | + | + | - | - | + | + |
| 10 | <i>alginolyticus</i> | | | | - | - | - | - | + | + |
| 11 | NAG | | | | - | - | - | - | - | - |
| 12 | <i>fluvialis</i> | | | | - | - | - | - | - | - |
| 13 | <i>furnissii</i> | | | | - | - | - | - | - | - |
| 14 | <i>vulnificus</i> | | | | - | - | - | - | + | + |
| 15 | <i>alginolyticus</i> | | | | - | - | - | - | + | + |
| 16 | NAG | | | | - | - | - | - | - | - |

1) 2%NaCl 加 TSB 2) 食塩ポリミキシンブイオン

表4 海水の調査結果 I (海水)

| | 6月 | 7月 | 8月 |
|---------|------|------|------|
| 平均水温 | 22.1 | 26.6 | 27.7 |
| 平均 pH | 8.3 | 8.2 | 8.3 |
| TDH 陽性 | 0 | 0 | 0 |
| TRH 陽性 | 0 | 1 | 0 |
| ToxR 陽性 | 2 | 8 | 7 |
| 有効検体数 | 4 | 11 | 9 |

| | ToxR (+) | ToxR (-) |
|-------|----------|----------|
| 平均水温 | 26.5 | 25.5 |
| 平均 pH | 8.2 | 8.2 |
| 有効検体数 | 11 | 7 |

表5 海水の調査結果 II (市場水・いけす水)

| | 7月 | 8月 | 9月 |
|---------|------|------|------|
| 平均水温 | 17.0 | 17.8 | 17.9 |
| 平均 pH | 7.1 | 7.0 | 6.7 |
| TDH 陽性 | 0 | 0 | 0 |
| TRH 陽性 | 1 | 2 | 0 |
| ToxR 陽性 | 13 | 22 | 6 |
| 有効検体数 | 15 | 25 | 9 |

| | ToxR (+) | ToxR (-) |
|-------|----------|----------|
| 平均水温 | 16.9 | 17.1 |
| 平均 pH | 7.0 | 6.7 |
| 有効検体数 | 31 | 7 |

参 考 文 献

1) 黒田正彦: Bait trap による腸炎ビブリオの分離, 長崎県衛生公害研究所報 15, 173~174(1975)

2) 黒田正彦: 県下沿岸における腸炎ビブリオの生態(1) 潮間帯の小型貝類からの分離について, 長崎県衛生公害研究所報 16, 181~187(1976)

- 3) 中村和人: 県下沿岸における腸炎ビブリオの生態(第2報) 地域差と季節変動, 長崎県衛生公害研究所報 17, 124~130, 1977
- 4) 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, 日本公衛誌第49巻第9号, 844~853(1996)
- 5) Tada, J. et. al., Mol. Cell. Probe. 6, 477-487, 1992
- 6) 宮島嘉道: 腸炎ビブリオ食中毒の発生予測・予防対策構築に関する研究, 平成11年度厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業研究報告書, 2000
- 7) Kim, Y. B. et. al., J. Clin. Microbiol. 37, 1173-1177, 1999
- 8) 西沢光昭: 環境中に分布する病原性ビブリオの由来—コレラ菌と腸炎ビブリオの発分子遺伝学的研究の成果が示唆するもの, 日本細菌学雑誌 51(3), 828~832(1996)