

3 2 *Vibrio parahaemolyticus* の感染源及び感染経路調査 河口泥、沿岸海水、ホタテガイ、都市部河川泥、輸入エビ

田中 孝幸 坂田 直美 播磨 晋太郎

【要旨】

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: VP) は細菌性食中毒の主要な原因菌の一つである。病原性の本体は耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) とその類似毒 (TDH-related hemolysin: TRH) とされる。TDH 産生菌株 (TDH⁺VP) は患者便から容易に分離されるが、原因と思われる環境材料からの分離は極めて困難であり、感染源の追及に支障を来している。今回は腸炎ビブリオの感染源及び感染経路調査とヒトの腸管由来 Caco2 細胞を用いた TDH⁺VP の選択的検出・分離法を検討した。実験の結果、海水温の上昇する時期に菌が分離されたが、TDH⁺VP は分離されなかった。また Caco2 細胞を用いた TDH⁺VP の選択的検出法については今回実験に用いた TDH⁺VP 菌株のみが Caco2 細胞に付着しているのが確認された。

【イントロダクション】

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: VP) は、1950 年 10 月、大阪で発生した "シラス干し" による患者 272 名、死者 20 名の大規模食中毒の原因菌として、初めて分離された日本における細菌性食中毒の主要な原因菌の一つである。VP による食中毒の原因食品はほとんどが魚介類であり、わが国では 8 月を発生のパークとして、7~9 月に多発しているが、1998 年をパークに翌年からは減少してきている。VP の病原性の本体は耐熱性溶血毒 (Thermostable direct hemolysin: TDH) とその類似毒 (TDH-related hemolysin: TRH) とされ¹⁾、近年は TDH 産生菌株 (TDH⁺VP) で血清型 O3: K6 が多くを占めている^{2,3,4)}。この TDH⁺VP は患者便から容易に分離されるが、原因と思われる環境材料からの分離は極めて困難であり、感染源の追及に支障を来している。VP の発育には NaCl の存在が必須であるため、その分布は主に海域⁵⁾、河川の汽水域⁶⁾とされている。しかしながら、これらの地域からの病原性菌の分離例は少なくその生態には不明な点が多い。そこで本研究では、2005 年 4 月から 11 月にかけて、過去に本菌の集団食中毒があった地域の河口泥、沿岸海水、ホタテガイ、並びに都市部河川泥や輸入エビにおける VP の汚染調査を行い、VP の感染源及び経路の究明を行った。また追加試験として腸管由来固定化 Caco2 細胞を用いた選択的検出・分離法の可能性を検討した。

【方法】

1. 検体

2005年4月から11月まで毎月1回、干潮時に青森県のむつ湾に流入する野辺地川の河口泥を100g、河口から約100m沖合いから海水100ml、養殖した1Kgのホタテガイを採取した。河口泥と海水は滅菌ポリ瓶に、ホタテガイは滅菌ポリ袋に採取した。またこれらの検体検査日に都市部河川泥として弘前市内の土淵川の泥とを採取、市内のスーパーで輸入エビを購入し検体とした。

2. 使用培地

検体の一次増菌用培地としてアルカリ性ペプトン水(APW、ニッスイ社)、二次増菌用培地として食塩加ポリミキシンブイヨン (SPB、ニッスイ社)を使用した。分離用培地としてTCBS寒天培地(TCBS、ニッスイ社)培地を使用し、鑑別用としてTSI寒天培地 (TSI、ニッスイ社)、LIM寒天培地 lysin indol motility medium(LIM 栄研化学社)を使用した。

細胞附着試験用として1%NaClを加えたハートインフュージョンブイヨン(1%NaCl加HIブイヨン ニッスイ)、ハートインフュージョン培地(1%NaCl加HI培地、ニッスイ社)を使用した。

3. 固定化 Caco-2 細胞

附着試験用のCaco-2細胞を培養フラスコから5mlのPBSで細胞を洗浄し、Trypsin-EDTA 1mlを加え7分間インキュベートした。さらにTrypsin-EDTA 0.5mlを加えインキュベートした。次に5mlのD-MEM (SIGMA)でフラスコの壁を洗い、細胞を回収した。細胞浮遊液を50mlファルコンチューブに移し、1000rpm、3分間遠心分離した。次に上清を捨て新しいD-MEM (SIGMA) 1.3mlを加えた。次に改良ノイバウエル型血球計算版に細胞懸濁液を約26 μ を添加し、細胞を計数した。次に5 \times 10⁴/mlに細胞浮遊液を希釈し、その希釈液1mlを24マルチウェルプレート分注し、中に置いた円形カバーガラス上で培養した。4日間CO₂インキュベーターで培養してからメタノールで固定した。

4. 検査法

1) 定性試験

海水は10ml、その他の検体は10gを90mlのAPWに接種培養し、その1mlを9mlのSPBに接種して二次増菌培養を行い、この培養液についてPCRでTDH産生菌の存在を見ると共に、TCBS寒天培地で分離培養を行った。なお、腸炎ビブリオの培養条件は全て37 \pm 1で24 \pm 2時間培養とし、TDH陽性対照菌株として、青森県野辺地川の河口底泥由来のTDH陽性菌(血清型03:K6、2000,8.16分離)を使用した。

2) 定量試験

各検体のAPW希釈段階について3本の試験管を用いる最確法(MPN: Most probable number)⁷⁾を実施した。まず、9mlのAPW入り試験管各3本それぞれに0.01gの検体を接種し、以後順次0.001gと1/10量ずつ接種して培養後、各培養液1mlを9mlのSPB培地に接種して二次増菌培養し、TCBS寒天培地で分離培養を行った。VPと疑われる集落については5集落を限度にTSI寒天培地とLIM寒天培地に接種して鑑別培養を行った。同定試験は定法により耐塩性試験(0、8%NaCl加ペプトン水)と血清型別は市販の腸炎ビブリオ診断用免疫血清(デンカ生研社)を用い、TDH⁺VPの確認は市販の逆受身凝集反応による腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒検出キット(デンカ生研社)を用いて実施した。

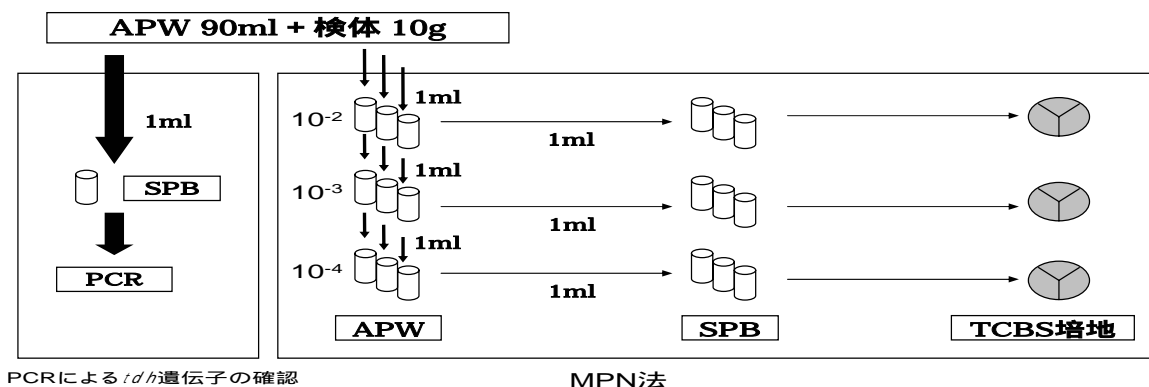


図 1 検査法

3) PCR

二次増菌培養液 100 μ を TE buffer 900 μ に分注し、10000rpm で 3 分間遠心した後上清を捨て、これに TE buffer を 100 μ 加えて均等化し 100 μ で 5 分間煮沸し、その遠心上清を template とした。PCR の反応混合液は滅菌蒸留水 18.375 μ 、reaction buffer (10 \times) 2.5 μ 、dNTPs (2.5mM ea.) 1.0 μ 、TDH(R), TDH(L) プライマー¹⁾ (各 10pg タカラ社) 0.25 μ 、Taq DNA polymerase (5U/ μ) 0.125 μ に template 2.5 μ を加えた。PCR の反応条件は以下のとおりである。denature 94 2 分間 (初期のみ)、denature 94 1 分間、annealing 55 1 分間、extension 72 1 分間を 35 cycle、farther extension は 72 10 分間行った。(PCR 装置: TaKaRa PCR Thermal Cycler MP. TaKaRa BIOMEDICALS 社)。アガロースゲルを 1 \times TBE に濃度が 2% になるように加温溶解し (アガロース 1600 和光社) エチジウムブロマイドを添加した。電気泳動には Mupid-21 ミニゲル泳動槽 (コスモ・バイオ株式会社) を用いて 100V 30 分間遮光して泳動し、写真撮影 (AI-C Epi-Light UVEA1100) を行った。

4) 固定化 Caco2 細胞を利用した TDH 産生菌検出

TDH⁺VP の検出・分離法は極めて困難とされているため、追加実験としてヒトの腸管由来固定化 Caco2 細胞を用いた選択的検出・分離法の可能性を検討した。すなわち、表 1 に示した VP 菌株を付着試験用に 1% NaCl 加 HI ブイヨンに接種し培養後、1% NaCl 加 HI 培地に塗抹し培養した。次に培養したコロニーを PBS 1ml で懸濁液を作製しバクテリアカウンターで菌数を測定し、菌数が 1 \times 10⁷/ml になるように希釈した。その菌液 1ml を固定化 Caco2 細胞にかけて室温で 2 時間静置した。次に菌液を取り除きメタノール 1ml を各ウェルに分注し 15 分間静置し固定した。次にメタノールを取り除き 20 倍希釈ギムザ染色液 1ml を各ウェルに分注し 30 分静置し染色した。

表 1 固定化 Caco2 細胞付着試験に使用した *Vibrio parahaemolyticus* 菌株

番号	血清型	由来	分離年月日	TDH
VP2	K12	赤川河口泥	2004.2	-
VP12	06:K18	野辺地川河口泥	2001.11.16	-
VP21	03:K6	赤川河口泥	2000.10.24	-
VP6	04:K68	野辺地川河口泥	2001.8.2	+
VP14	01:K25	ヒト	2000	+
VP22	03:K6	野辺地川河口泥	2000.8.16	+

【結果】

1. 検体からの月別 VP 分離状況

VP は輸入エビと都市河川の泥からは分離されなかった。野辺地川河口の底泥、海水、そしてホタテガイからは図 2 に示すように、8 月から 9 月にかけて海水温の上昇する時期に菌が分離された。野辺地川河口の底泥からは 7 月に 230MPN の菌が検出されはじめ、9 月に 4600MPN とピークとなり以後漸減した。海水からは 9 月に 930MPN、ホタテガイからは 8 月に 2,400MPN が検出された。TDH 産生菌はいずれの検体からも分離されなかった。分離菌の血清型は表 2 に示した。

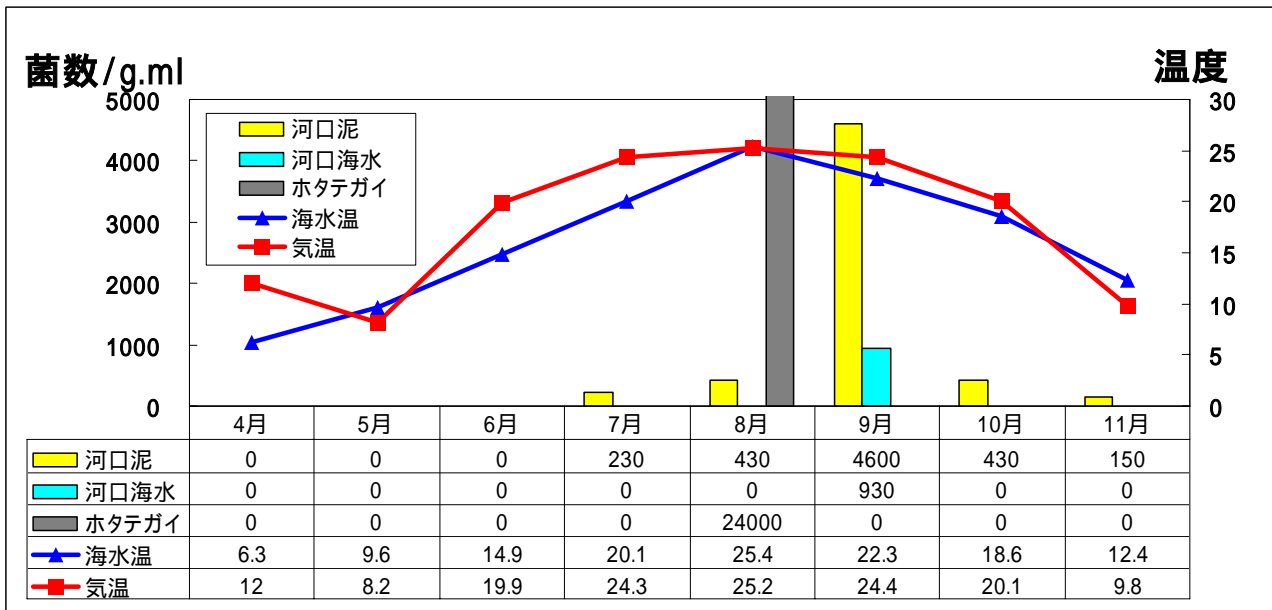


図 2 MPN 法による *Vibrio parahaemolyticus* の菌数測定

表 2 各検体から最も多く分離された *Vibrio parahaemolyticus* (TDH) の血清型

検体 No	分離日	由来	血清型
1	2005/7/25	野辺地泥	08:K22
2	2005/8/23	野辺地泥	08:K22
3	2005/8/23	野辺地川沿岸産ホタテ	011: 型別不能
4	2005/9/20	野辺地泥	05: 型別不能
5	2005/9/20	野辺地海水	011: 型別不能
6	2005/10/17	野辺地泥	OUT: 型別不能
7	2005/11/18	野辺地泥	011: 型別不能

2. Caco2 細胞を利用した TDH 産生菌検出

TDH⁺VP は 3 菌株とも Caco2 細胞の周辺部分に付着したが、TDH 非産生性の 3 菌株は付着しなかった。付着と非付着の様子を写真 1 に示した。

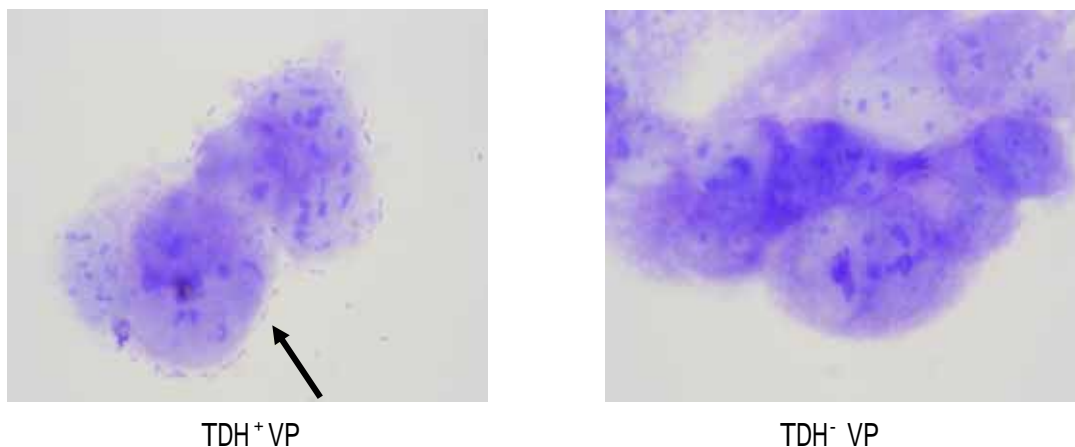


写真 1 細胞付着試験結果

【考察】

VP による食中毒発生に際しては患者からは容易に TDH⁺VP が分離されているが、疫学的に原因と思われる残置食品や保存食品、あるいは感染源からの TDH⁺VP 分離は極めて困難である。これは続発防止の観点からは大きな問題となっている。そこで以前 TDH⁺VP が分離された野辺地川河口泥の VP 汚染調査を行った。また同時に泥を採取したところの海水と沿岸で養殖されているホタテの調査も行った。海水温が低い時期にはどの検体からも MPN 法では VP は検出されなかったが、海水温の上昇とともに MPN 法で検出可能な菌数の VP が分離された。しかし、TDH⁺VP は検出されなかった。また県内の今年の県内の食中毒菌の分離状況を図 3 に示したが、腸炎ビブリオ患者は 81 人とサルモネラやカンピロバクターに比べれば少ないものであった。VP による食中毒患者と TDH ネガティブであるが河口泥の VP の菌数が同じような動向を示し、8 月にホタテガイから突然多量の VP が検出されたことから VP の感染経路として泥から海底海産物への汚染が予測される。以上のことより、VP の生態や TDH 産生機構などのさらなる検討と続発防止の観点から VP 汚染調査を続ける必要があると考えられる。

(人) 腸炎ビブリオ(週別患者数)

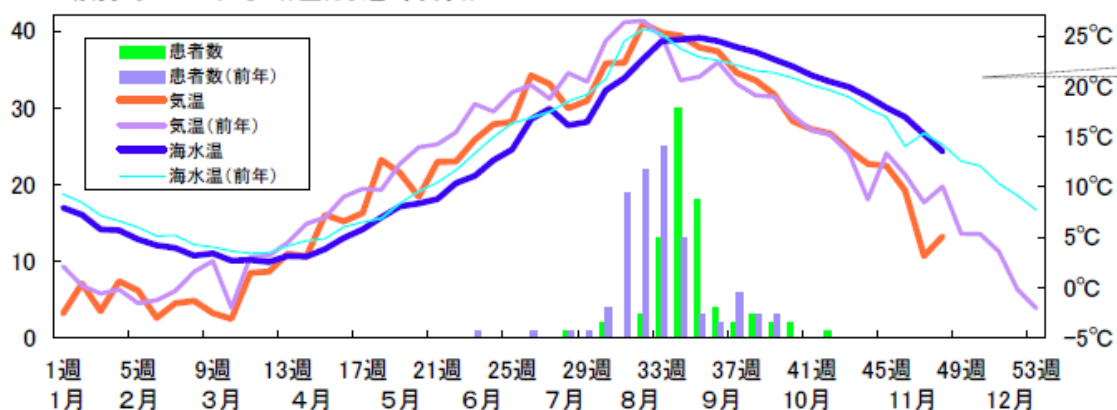


図 3 青森県内の医療機関での *Vibrio parahaemolyticus* 患者と環境要因 (青森県環境保健センター)

海水温と VP の生態の関係については Viable But Nonculturable(VNC)について研究がされている^{8,9,10)}。これは VP が低温や栄養不良状態のときには培養不可能な状態で生存している状態で、他の *Vibrio* でも知られている。環境がいい状態で培養されている VP の菌体の形は桿菌であるが、低温やその他のストレスがかかった条件下では菌体の球菌を示すことがわかっている。VP はこのように菌体を変化させる機能をもっているため、VP 患者の残置食品や環境からの検出が困難になっているのではないかと考えられるが、VNC についてはさらなる検討が必要である。

Caco2 細胞を用いた TDH⁺VP の選択的検出法については 14 日培養した細胞よりも 4 日培養後固定した細胞を用いた場合に TDH⁺VP のみが付着するのが確認された。今回の実験で用いた菌株については同様の付着試験を試みた結果、良い再現性が得られた。しかし使用した菌株数が少ない点と細胞と細菌の付着に関するファクターについてまだ未知の部分が多いためさらなる検討が必要である。今後の課題としては、細胞と細菌の付着に関するファクターについてを含め、細胞の培養日数による菌の付着性の差、固定する前の細胞の状態(生細胞率)、菌株数を増やした場合に TDH⁺VP のみが付着する結果が得られるか、胆汁酸により鞭毛抗原を強化した場合などがあげられる。

【文献】

- 1) Tada, J., Ohashi, T., et al: Detection of the thermostable direct hemolysin gene(tdh) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene(trh) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes,6:477-487,1992.
- 2) 大友良光、八柳潤：近年日本での腸炎ビブリオ分離株の推移や株の特徴 特に東北一帯での研究成果を中心に、日食微誌、20:161-164,2003.
- 3) Matumoto C, Okuda J et al: Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. J. Clin. Microbiol.,38:578-585,2000.
- 4) Bag PK, Nandy S et al: Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. J.Clin. Microbiol.,37:2354-2357.1999.
- 5) 野恒三郎：*Pasteurella parahaemolyticus* から *Vibrio parahaemolyticus* へ。腸炎ビブリオ。藤野恒三郎・福見秀雄編,p13-38, 一成堂,東京,1963.
- 6) Kumazawa NH, Kato E: Survival of Kanagawa-positive strains of *vibrio parahaemolyticus* in a brackish-water area. J. Hyg. Camb.,95:299-307,1985.
- 7) Oblinger, J.L., Koburger J.: Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. J. Milk Food Technol., 38: 540-545,
- 8) JIANG, X., CHAI, T.J.: Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells, Apl. Environ. Microbiol., (4), 1300-1305, 1996.
- 9) Lynch, T: *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production, Infect. and Immunity, 73, 1275-1283, 2005.

- 10) Hsieh, Y.C : Study of capsular polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*, *Infect. and Immunity.*, (6), 3329-3336, 2003
- 11) Hara-Kudo Y, Nishina T et al : An improved detection method for *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, *Environ. Microbiol.* 67:5819-5823, 2001.

【謝辞】

検体を採取、送付して下さったマルイチ横浜品質管理部主任 高田氏、Caco-2 細胞を提供して下さった弘前大学農学生命科学部 戸羽先生に心より感謝いたします。