

## 資料

1997年～1999年に発生した食中毒事例由来腸炎ビブリオ血清型  
O3:K6, O4:K68の細菌学的検討

竹田 義弘, 東久保 靖, 小川 博美

**Bacteriological Study on the *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, O4:K68  
Isolated from Outbreaks of Food Poisoning in 1997-1999**

YOSHIHIRO TAKEDA, YASUSHI TOKUBO and HIROMI OGAWA

(Received Oct.30, 2000)

近年、腸炎ビブリオ血清型O3:K6による食中毒が世界的に急増している。また、新しい血清型O4:K68による食中毒も発生している。当センターでもO3:K6が1997年6月、O4:K68が1998年8月にそれぞれ初めて分離されて以降、この2種類の血清型の分離率が著しく高くなっている。そこで今回、1997年～1999年の3年間に分離されたO3:K6とO4:K68について細菌学的検討を行った。その結果、供試したO3:K6とO4:K68はいずれも対照とした他の血清型(O4:K4, O4:K13)と生化学的性状は一致し、ウレアーゼ陰性の定型的性状を示す腸炎ビブリオであった。病原因子等の検査では神奈川現象陽性、TDH産生、*toxR*+, *tdh*+, *trh*-であった。また、薬剤感受性パターンには顕著な差は認められなかった。RAPD (AP-PCR)法とPFGE法によるDNA解析では、由来の異なる同一血清型間およびO3:K6とO4:K68との両血清型間ではそれぞれ遺伝子学的に近縁度が高く、同一クローンから派生したサブタイプの可能性が高いことが示唆された。

キーワード：腸炎ビブリオ, O3:K6, O4:K68, RAPD(AP-PCR)法, PFGE法

## 緒言

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は海洋性細菌で、海水や河口付近の環境および魚介類に広く分布している。わが国ではここ数年、サルモネラによる食中毒が増加しているが、生食用魚介類を喫食する食習慣等から、腸炎ビブリオによる食中毒も依然多く、特に夏期の代表的な食中毒原因菌となっている[1]。本菌には病原性菌と非病原性菌があり、主要な病原因子として2種類の溶血毒素が知られている。神奈川現象(我妻培地上で見られる溶血反応[2])を起す耐熱性溶血毒(Thermostable Direct Hemolysin: TDH)と耐熱性溶血毒類似毒(TDH Related Hemolysin: TRH)で、それぞれの毒素産生能は*tdh*遺伝子および*trh*遺伝子にクローニングされている。これら病原因子は、患者由来株からは高率に検出されるが、魚介類や環境由来株からは殆ど検出されない[2, 3]。また、わが国の集団発生事例から分離された腸炎ビブリオの血清型は、1995年頃まではO4:K8が高頻度に分離され、腸炎ビブリオ食中毒における最も重要な血清型であった[4, 5]。しかし、1996年以降これまであまり報告例のなかった血清型O3:K6に

よる食中毒が急増している[6]。このO3:K6は、1996年の初め頃にはすでにインド、バングラデシュ、東南アジア諸国において流行の兆しを見せていた[7]。また、米国でも1998年にO3:K6による生カキおよびハマグリによる集団食中毒が発生し[8]、世界的な流行となっている。一方、1998年にはこれまでの抗原構造表では知られていなかった新しい血清型O4:K68による食中毒事例が報告されている[9, 10]。本血清型は1997年以前には報告例のない血清型で、O3:K6と共に今後の動向が注目されている。広島県においても1989年～1999年の11年間に、当センターで分離された食中毒事例由来腸炎ビブリオの神奈川現象陽性株、またはTDH産生株における血清型別推移をみると、O3:K6が1997年6月、O4:K68が1998年8月にそれぞれ初めて分離されて以降、この2種類の血清型の分離率が著しく高くなっている(Table 1)。今回、著者らは1997年～1999年の3年間に、腸炎ビブリオ食中毒事例から分離されたO3:K6およびO4:K68について生化学的性状試験、TDH産生試験、薬剤感受性試験、PCR法による腸炎ビブリオ種特異性遺伝子(*toxR*) [11]と毒素遺伝子(*tdh*, *trh*)の検索およびRandom amplified polymorphic DNA (RAPD (AP-PCR))法と

Table 1. 食中毒事例由来腸炎ビブリオ血清型O3:K6, O4:K68の年次別推移 (広島県)

分離年度	分離株数*	血清型数	血清型 (株数)		
			O3:K6	O4:K68	その他
1989	74	14			74
1990	12	4			12
1991	35	6			35
1992	15	6			15
1993	9	1			9
1994	17	3			17
1995					
1996	6	1			6
1997	9	1	9		
1998	11	3	5	3	3
1999	25	7	12	3	10

\*TDH産生または神奈川現象陽性株数

Pulsedfield gel electrophoresis (PFGE) 法によるDNA解析によって細菌学的検討を行ったので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌株

供試菌株にはO3:K6 10株, O4:K68 3株と対照株としてO4:K13 1株, O4:K4 1株の計15株を使用した。Table 2にO3:K6とO4:K68の分離年月および由来を示した。このうち菌株No.1と11のO3:K6, O4:K68は、当センターで初めて分離された当該血清型株である。

Table 2. 供試菌株の血清型, 分離年月および分離材料

菌株No.	血清型O:K	分離年月日	分離材料
1	O3:K6	1997. 6	患者便
2	O3:K6	1997. 8	患者便
3	O3:K6	1998. 8	患者便
4	O3:K6	1998. 10	患者便
5	O3:K6	1998. 10	患者便
6	O3:K6	1999. 8	患者便
7	O3:K6	1999. 8	患者便
8	O3:K6	1999. 8	食品*
9	O3:K6	1999. 8	患者便
10	O3:K6	1999. 8	患者便
11	O4:K68	1998. 8	患者便
12	O4:K68	1999. 8	患者便
13	O4:K68	1999. 8	食品*
14	O4:K13	対照株	
15	O4:K4	対照株	

\*輸入貝柱 (タイラギ)

#### 2. 血清型別試験

腸炎ビブリオ診断用免疫血清 (デンカ生研) を用いて、スライド凝集反応によりO抗原およびK抗原の型別を行った。

#### 3. 生化学的性状試験

オキシダーゼ, 3%食塩加 (TSI, LIM, VP), クエン酸塩利用能 (シモンズ), ウレアーゼ (クリステンゼン), アミノ酸分解 (リジン, アルギニン, オルニチン), 糖分解 (グルコース, マンニト, サッカロース, ラクトース, ゼルシトール, サリシン, イノシトール, ラムノース), 食塩 (0%, 3%, 7%, 10%) 加ペプトン水による発育, インドール反応および運動性試験は常法に従って実施した。

#### 4. 神奈川現象試験

5%ヒト洗浄血球加変法我妻培地 (自家調製) に接種して37℃, 24時間培養後, 判定した[12]。明瞭な溶血環を生じたものを陽性とした。

#### 5. TDH産生試験

- 1) 粗毒素液の作成: 5%食塩加2%ペプトン水で35℃, 18時間振とう培養後, 12,000rpm, 5分間遠心処理した上清を粗毒素液とした[13]。
- 2) TDHの検出: 逆受身ラテックス凝集反応による腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒検出用キットKAP-RPLA「生研」(デンカ生研) を用いて, 粗毒素液の凝集価を測定した。
- 3) TDHの耐熱性試験: 粗毒素液を100℃, 10分間加熱後, KAP-RPLA「生研」で凝集価を測定した。128倍以上の凝集価が認められたものを耐熱性陽性とした。

6. PCR法による*toxR*, *tdh*および*trh*の検出

*toxR*の検出にはKim[11]らのプライマー (5'-AGC CCG CTT TCT TCA GAC TC-3', 5'-AAC GAG TCT TCT GCA TGG TG-3') を使用した。PCR反応条件は熱変性94℃, 1分, アニーリング65℃, 1分, 伸長反応72℃, 1分で35回繰り返した。*tdh*の検出にはVPD1/2 (宝酒造), *trh* (*trh1*, *trh2*) の検出にはVPS1/2 (宝酒造) とVPR1/2 (宝酒造) のプライマーをそれぞれ使用した。PCR反応条件は使用説明書に従った。サーマルサイクラーはASTECC-PC700 (アステック社) を使用した。

7. 薬剤感受性試験

NCCLS法に準拠してセンシディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いて実施した[14]。薬剤にはゲンタマイシン(GM), ノルフロキサシン(NFLX), クロラムフェニコール(CP), ナリジクス酸(NA), ジプロフロキサシン(CPFX), オフロキサシン(OFLX), セフメタゾール(CMZ), セフィキシム(CFIX), ホスホマイシン(FOM), ピペラシリン(PIPC), テトラサイクリン(TC) およびエリスロマイシン (EM) の12種類を使用した。

8. RAPD (AP-PCR) 法

PCR反応のプライマーにはAP40, AP42, AP43[15]およびPrimer 2[16]を使用した。鋳型DNAは菌体から核酸抽出剤セバジーン (三光純薬) で抽出したものをを使用した。PCR反応条件は, RAPD法の増幅プログラム1 (熱変性94℃, 5分, アニーリング36℃, 5分, 伸長反応72℃, 5分で4回繰り返した後, 更に熱変性94℃, 1分, アニーリング36℃, 1分, 伸長反応72℃, 2分で30回繰り返す。) で実施した[15]。

9. PFGE法

菌株のDNA包埋および制限酵素による消化は, 国立感染症研究所の方法[17]に準拠し, 制限酵素には*Not I* (宝酒造) を使用した。PFGEにはCHEF MAPPER (BIO-RAD) を使用した。泳動条件は1%アガロースゲル, 0.5×TBEバッファー, 液温14℃, 電圧6.0V/cm, 角度120°, バルスタイムInitial swichtime 0.47秒, Final swichtime 54.17秒, Linearで20時間18分とした。

結果および考察

1. 生化学的性状, 神奈川現象

供試菌株の生化学的性状はすべて一致し, O3:K6とO4:K68はウレアーゼ陰性の定型的性状を示す腸炎ブリオであった。また, 神奈川現象試験はすべて陽性を示した (Table 3)。

Table 3. 供試菌株の生化学的性状

生化学的性状試験*	血清型	
	O3:K6 (10株)	O4:K68 (3株)
オキシダーゼ	+	+
3%食塩加TSI	-/+	-/+
3%食塩加VP	-	-
クエン酸 (シモンズ)	+	+
ウレアーゼ (クリステンゼン)	-	-
アミノ酸		
リジン	+	+
アルギニン	-	-
オルニチン	+	+
糖分解		
グルコース/ (ガス)	+/-	+/-
マンニット	+	+
サッカロース	-	-
ラクトース	-	-
ズルシトール	-	-
サリシン	-	-
イノシトール	-	-
ラムノース	-	-
食塩加ペプトン水による発育		
0%NaCl	-	-
3%NaCl	+	+
7%NaCl	+	+
10%NaCl	-	-
インドール反応	+	+
運動性	+	+
神奈川現象 (溶血性)	+	+

\*対照株(O4:K13, O4:K4)も同一性状を示した。

2. TDHの産生性

TDHは供試菌株すべての培養粗毒素液から検出された (Table 4)。その凝集価は, O3:K6で512倍~2,048倍以上, O4:K68ではすべて2,048倍以上を示した。対照株のO4:K13, O4:K4ではそれぞれ2,048倍以上, 1,024倍を示し, 供試菌株はいずれも高いTDHの産生性が認められた。また, 加熱後の凝集価もすべて128倍以上あり, 耐熱性が確認された。

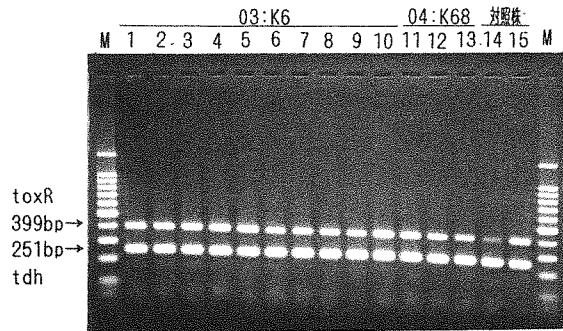
3. *toxR*, *tdh*および*trh*の保有状況

PCR法で検出された遺伝子のアガロースゲル泳動像をFig.1に示した。供試菌株はすべて*toxR*(増幅DNA 399bp)と毒素遺伝子のうち*tdh*(251bp)を保有していたが, *trh*は*trh1*, *trh2*とも全株保有していなかった。これまでに報告されているO3:K6の神奈川現象, または毒素遺伝子の保有性をみると, 1996年以前の分離株では神奈川現象陰性, *tdh*-, *trh*+タイプが多く認められたが[18-20], それ以降は, 分離株の殆どが*tdh*+, *trh*-タイプに大き

Table 4. TDH産生試験

菌株No.	TDH産生	凝集価*	凝集価* (加熱後)
1	+	1,024	>128
2	+	1,024	>128
3	+	1,024	>128
4	+	>2,048	>128
5	+	1,024	>128
6	+	1,024	>128
7	+	>2,048	>128
8	+	512	>128
9	+	>2,048	>128
10	+	1,024	>128
11	+	>2,048	>128
12	+	>2,048	>128
13	+	>2,048	>128
14	+	>2,048	>128
15	+	1,024	>128

\*KAP-RPLA「生研」による測定



PCRの増殖物を混合して泳動したもの  
M: 100bp DNA Ladder  
Fig 1. PCR法で検出されたtoxR遺伝子とtdh遺伝子

く変化している[7, 21]. また, *trh*保有とウレアーゼ産生能には強い相関が有ることが報告されている[22]が, O3:K6のウレアーゼ産生能についても, 1996年以前の *tdh*<sup>-</sup>, *trh*<sup>+</sup>株がすべてウレアーゼ陽性の非定型的性状を示したのに対し, それ以降の *tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>株はすべてウレアーゼ陰性の定型的性状タイプに変わっている[7, 20, 21]. 今回供試したO3:K6もすべてウレアーゼ陰性の定型的性状タイプで, 現在の流行株が持っている病原因子の保有状況とも成績は一致していた. また, O4:K68もすべて *tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>, ウレアーゼ陰性の定型的性状タイプで, 尾畑ら[9]が東京都の食中毒事例から分離したO4:K68の性状と一致した.

#### 4. 薬剤感受性

薬剤感受性試験結果をTable 5に示した. 供試菌株は薬剤のうちノルフロキサシン(NFLX), クロラムフェニコール(CP)およびナリジクス酸(NA)に感受性(S)を示すものが多かった. 一方, セフィキシム(CFLX), ピペラシリン(PIPC)およびエリスロマイシン(EM)には多くが耐性(R)を示した. しかし, 菌株間の感受性パターンにはいずれも分離年月および由来の違いによる顕著な差は認められなかった.

#### 5. DNA解析

##### 1) RAPD (AP-PCR) 法

4種類のプライマーによるRAPDプロファイルを図2に示した. O3:K6とO4:K68はAP40, AP42およびAP43のプライマーを用いた結果では, 同じ血清型間およびO3:K6とO4:K68との両血清型間において同一のパターンを示した. Primer 2ではLane3, 4のO3:K6 2株に若干パターンの差がみられたが, その他の株はほぼ同

Table 5. 薬剤感受性パターン

薬剤名	菌 株 No.															感受性成績数*		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	S	I	R
GM	I	I	I	I	R	I	I	S	R	I	S	I	S	I	I	3	10	2
NFLX	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	14	1	
CP	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	13		2
NA	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	14	1	
CPF	I	I	I	I	I	I	I	I	R	I	I	I	I	I	I		14	1
OFLX	I	S	S	I	S	S	R	S	I	S	I	S	S	S	I	9	5	1
CMZ	S	I	S	I	I	S	S	S	I	I	I	S	I	I	S	7	8	
CFIX	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R		1	14
FOM	I	I	S	S	S	R	R	I	I	I	I	S	I	I	I	4	9	2
PIPC	R	R	R	R	I	I	R	S	R	R	R	R	I	R	R	1	3	11
TC	I	I	S	I	I	I	I	I	I	I	I	S	I	I	I	2	13	
EM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			15

\*S:感受性 I:中間 R:耐性

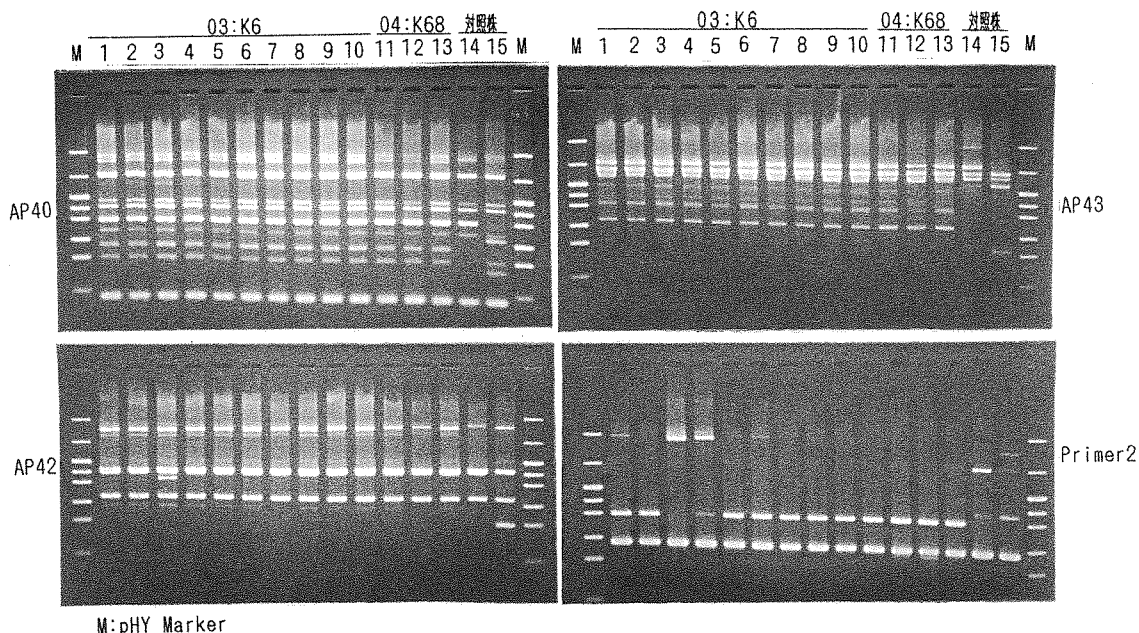


Fig 2. RAPD (AP-PCR) プロファイル

一のパターンが観察された。対照株はLane 14のO4: K13が、AP42のプライマーにおいてO3: K6およびO4: K68とパターンが類似していたが、その他のプライマーにおいてはいずれもパターンは異なった。Okudaら[21]も1996年にカルカッタの病院と関西空港検疫所で分離されたO3: K6のAP-PCRを検討し、そのプロファイルがほぼ同一であったことを報告している。今回、著者らの成績でも同様な結果を得たことから、供試した同じ血清型間およびO3: K6とO4: K68の両者はいずれも遺伝子学的に近縁度が高く、同一の起源から派生したことが示唆された。

2) PFGE法

*Not I* で消化したPFGEパターンをFig.3に示した。O3: K6とO4: K68のDNA断片はいずれも16本前後のバンドとして泳動された。対照株のO4: K13とO4: K4は12本前後のバンドとして泳動され、そのパターンはO3: K6およびO4: K68とは明瞭に異なっていた。O3: K6については観察されたパターンがいずれも非常に類似していたが、矢印(→)で示す分子量サイズの位置に、バンドを有するものと無いものが認められた。そこで、バンドの有るものをI型、無いものをII型として分類した。また、II型には細かいバンドの違いが認められたことから細分類した。Table 6にO3: K6の型別結果を示した。I型はLane 1の1997年6月に初めて分離された株のみで、その他の株はすべてII型に属した。II型は5種類のタイプに型別された。また、O4: K68のパターンもO3: K6と非常に類似し、O3: K6の型別分類ではすべてII型に属した。しかし、I型とII型のパターンの違いは1~2本程度のバンド差しかなく、O3: K6とO4: K68

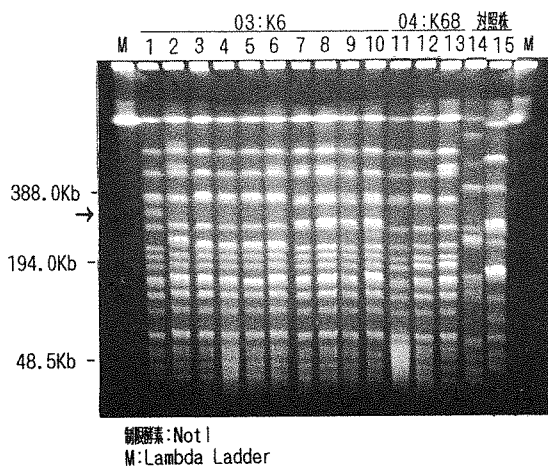


Fig 3. PFGEパターン

Table 6. O3: K6のPFGEパターン型別

Lane No.	PFGEパターン
1	I
2	IIa
3	IIb
4	IIb
5	IIb
6	IIc
7	IId
8	IId
9	IIe
10	IIe

はRAPDプロファイルによる解析結果と同様に、同じ血清型間および両血清型間においても遺伝学的に近縁度が高く、同一クローンから派生したサブタイプの可能性が高いことが示唆された。特に、今回供試した株のうち食品由来のO3:K6とO4:K68は、東アジア方面から輸入された貝柱（タイラギ）から分離されたもので、そのDNA構造は患者由来株と非常によく類似していた。このことは、荒川ら[23]がO3:K6のPFGE解析によって、わが国の流行株と東南アジアでの流行株とが同一クローンである可能性を指摘していることと併せ、近年、急増しているO3:K6およびO4:K68による食中毒の原因として、アジア方面から輸入された生鮮魚介類などが主要な感染源となっていることが示唆された。しかし、東北地方の沿岸海域海泥からも患者由来株とPFGEタイプが同一のO3:K6 (*tdh+*, *trh-*) が分離されている[24]ことから、国内沿岸域における同型菌の定着も考えられ、食中毒の防止対策および感染源、感染経路の解明には、広域的な環境や流通食品の疫学調査が必要と考えられた。

## 文 献

- [1] 平成9年全国食中毒事件録(1998):厚生省生活衛生局食品保健課編。
- [2] 我妻正三郎(1968):腸炎ビブリオの溶血試験用培地について。メディアサークル, 13(4), 159-162.
- [3] 三輪谷俊夫, 大橋成監修(1990):腸炎ビブリオ第Ⅲ集。東京, 近代出版。
- [4] 腸炎ビブリオ1987~1993(1994):病原微生物検出情報, 15(8), 171~172.
- [5] 腸炎ビブリオ1994~1995(1996):病原微生物検出情報, 17(7), 151-152.
- [6] 腸炎ビブリオ1996~1998(1999):病原微生物検出情報, 20(7), 159-160.
- [7] 奥田潤, 西淵光昭 他(1998):インド, バングラデシュ, および東南アジア諸国に流行の兆しをみせている腸炎ビブリオO3:K6の新クローン。臨床と微生物, 25(2), 252.
- [8] 生カキおよびハマグリによる腸炎ビブリオ食中毒の集団発生, 1998年-米国・コネチカット, ニュージャージー, ニューヨーク州(1999):病原微生物検出情報, 20(3), 66.
- [9] 尾畑浩魅, 甲斐明美 他(1999):東京都内で発生した食中毒から検出された腸炎ビブリオO4:K68について。病原微生物検出情報, 20(7), 167.
- [10] 三重県健康福祉部薬務食品課長(2000):腸炎ビブリオ血清型O4:K68による食中毒の発生状況調査結果について, 薬食第36-165号。
- [11] Kim, B.Y., J. Okuda, et al. (1999): Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. J.Clin.Microbiol., 37(4), 1173-1177.
- [12] 栄研マニュアル(1977):東京, 栄研化学株式会社。
- [13] 太田建爾(1975):腸炎ビブリオ腸管病原毒素の産生条件の検討と毒素の熱安定性1. 産生毒素の定量的測定法と毒素の産生条件について。感染症誌, 49(12), 825-832.
- [14] 小栗豊子(1993):ディスク法(拡散法) 3, NCCLSディスク標準法。臨床検査, 37(8), 842-846.
- [15] 牧野莊一(1995):RAPD-DNAフィンガープリンティング法その原理と細菌学への応用。モダンメディア, 41(5), 186-194.
- [16] Okuda, J., M. Ishibashi, et al. (1997): Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the united states, J.Clin.Microbiol, 35(8), 1965-1971.
- [17] 国立感染症研究所細菌部(1997):腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術研修会テキスト。
- [18] 本田俊一, 後藤邦夫 他(1987):モルジブ旅行者から分離された神奈川現象陰性株O3:K6によると思われる腸炎ビブリオ感染症。感染症誌, 61(9), 1070-1078.
- [19] 池田嘉子, 椿本亮 他(1997):下痢患者の検便検査より*trh*遺伝子保有腸炎ビブリオO3:K6を検出した事例について。福岡市保環研報, 22, 119-121.
- [20] 尾畑浩魅, 甲斐明美 他(1998):腸炎ビブリオ血清型O3:K6の出現推移と溶血毒産生性。臨床と微生物, 25(2), 252.
- [21] Okuda, J., M. Ishibashi, et al. (1997): Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in calcutta, India, and isolation of strains from the same clone group from southeast asian travelers arriving in japan. J.Clin.Microbiol, 35(12), 3150-3155.
- [22] 鈴木則彦, 上田泰史 他(1995):腸炎ビブリオのウレアーゼ産生性と*trh*保有性の相関性。感染症誌, 69(6), 757-758.
- [23] 荒川英二, 島田俊雄 他(1999):近年増加している腸炎ビブリオのPFGEによる疫学解析。病原微生物検出情報, 20(7), 161-162.
- [24] 宮島嘉道(2000):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報告書。平成11年厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業。