

第2回

TRCフォーラム
招待講演

腸管感染症起炎菌の遺伝子検査 特に腸炎ビブリオ検査へのTRC法の適用

京都大学 東南アジア研究センター教授

西渕光昭 先生



TOSOH

東ソー株式会社

西淵光昭 (にしづみつあき)

京都大学 東南アジア研究センター教授

経歴

- 昭和58年6月 オレゴン州立大学大学院にてPh.D. (専攻：微生物学)
昭和58年2月 メリーランド大学医学部ワクチン開発センター研究員
昭和61年4月 大阪大学 微生物病研究所 助手
昭和63年1月 京都大学 医学部 講師
昭和63年11月 京都大学 医学部・医学研究科 助教授
平成8年4月 京都大学 東南アジア研究センター 教授

所属学会等

- American Society for Microbiology 会員
The Society of Sigma Xi 会員
The New York Academy of Science 会員
日本細菌学会会員、同評議員
日本感染症学会会員
日本医学協力研究会コレラ専門部会研究員
日本熱帯医学会会員
日本防菌防黴学会会員

第2回 TRCフォーラム

日 時：2002年8月30日

場 所：東京ステーションホテル 藤の間

主 催：東ソー株式会社 科学計測事業部

最初に、腸管感染症のイントロダクション、次に腸炎ビブリオの検査・特に遺伝子検査について、最後にTRC (transcription reverse transcription concerted reaction) 法の適用についてお話しします。

腸管感染症について

腸管感染症と言う言葉は馴染みが薄いと思いますので、まず一般的に言われます食中毒についてお話しします。食中毒とは飲食物によっておこる急性の胃腸障害などの健康被害であり、細菌やウイルスなど病原性微生物を主要な原因物質とする感染症です。代表的な食中毒原因細菌として15種類をあげることができます。

食中毒：飲食物とともに摂取される病原微生物、有害物質が原因で起る急性の胃腸炎症状を主とする健康被害

病原微生物	細菌	菌糸型：サルモネラ、腸炎ビブリオなど 芽生型：黄色ブドウ球菌、ボツリヌス菌など
ウイルス	約81%	ウイルス：小型球形ウイルスなど 細菌：寄生虫、クリプトスポリジウムなど
自然毒	約10%	植物性自然毒：キノコ類、ソラニンなど 動物性自然毒：フグ毒、シガテラ毒、貝毒など
化学物質	約1%	農薬、鉛、ヒ素、メタノールなど

平成13年の食中毒件数と患者数を示しています。日本では細菌に関して三大食中毒原因菌が知られています。サルモネラは肉や鶏卵を介して感染します。黄色ブドウ球菌は、人の皮膚に存在し、おにぎりなどを介して感染します。また、平成12年の雪印食中毒事件が有名で患者が14,000人を超え、この年、患者数ではトップになりました。腸炎ビブリオは海産物に付着して夏場を中心に発生します。

夏場に発生する食中毒の多くが細菌性であるのに対し、冬場の食中毒ではいわゆる小型球形ウイルスが中心となることが特徴です。

病因物質別発生状況(平成13年)

項目	事件数	患者数	死者数
細菌	1,920	21,812	4
ウイルス	1,459	18,700	0
化学物質	301	4,049	0
自然毒	92	1,039	0
ボツリヌス菌	0	0	0
腸炎ビブリオ	303	3,705	0
腸管出血性大腸菌(EHEC)	24	370	0
その他の病原性細菌	159	2,233	0
ウイルス	22	1,630	0
セリウス菌	3	444	0
エルシニア・エンテロコロリチカ	4	4	0
カンヒロバクター・ジエニコロリ	420	1,830	0
ナグビブリオ	1	1	0
コレラ菌	1	7	0
赤痢菌	3	10	0
チフス菌	0	0	0
パラチフス菌	0	0	0
その他の細菌	18	18	0
ウイルス	210	3,371	0
小型球形ウイルス	205	3,350	0
その他のウイルス	5	21	0
化学物質	8	112	0
自然毒	83	327	4
植物性自然毒	49	231	1
動物性自然毒	40	21	2
その他	1	1	0
不明	91	240	0

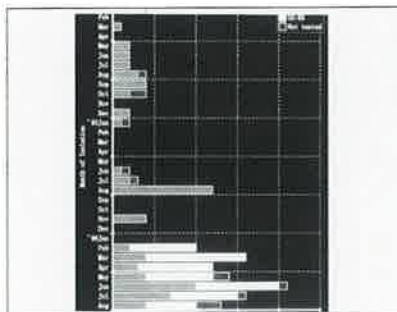
(厚生労働省、食中毒統計より)

腸炎ビブリオのパンデミック

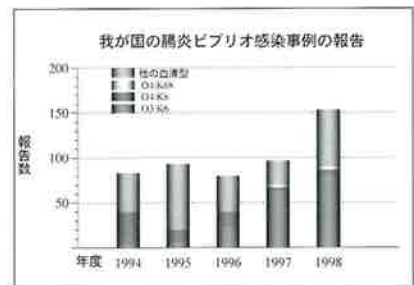
数年前から厚生労働省が腸炎ビブリオ対策に力を入れています。それは、我々が世界的大流行を起こした新型腸炎ビブリオの発生を報告したことがきっかけとなっています。その発端はインドのカルカッタにある国立コレラ及び腸管感染症研究所との共同研究によるものでした。1)



ここでは腸炎ビブリオの患者は毎夏、散発的に発生していました。しかし1996年2月から患者数が急増し、その原因を調べて欲しいとの依頼がありました。その分離菌を調べたところ、O3:K6血清型に属する新型の菌による感染症が増加して、それが原因であることが判明しました。



このような腸炎ビブリオ感染症の増加はカルカッタだけではなく、他の国でも同じ様な現象が起きています。日本でも96年から増加傾向で、特定のグループに属する新しい菌が原因です。これらについて調査をしたところ、新しいグループに属する菌はインドだけでなく、バングラデシュ、タイ、ラオス、台湾、中国、日本、韓国、98年にはアメリカにまで広がり、問題となりました。



国際的共同研究を組織して、その菌を徹底的に調べたところ、まさに新しく出現したクローンで世界的に大流行する腸炎ビブリオでした。パンデミック (大流行) という言葉も適用されるようになりました。2)

Pandemic Spread of an O3:K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* and Emergence of Related Strains Evidenced by Arbitrarily Primed PCR and *toxRS* Sequence Analyses

LIHIO MATSUO¹, HISAO OKUDA, AKAHIDE ICHIHASHI, MASAKAZU ISHIGAKI, PALANIO GABRIEL, THANDANARAYAN R. RAMANUJAMURTHI, HIN CHIN NG, ANGEE DEBPAUL, YUNG HONG WU, JOHN ROBERT WOOD, MITSU MASUBUCHI²

¹Center for Seafood Safety, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 5-1-8, Aomori, Hokkaido, Japan; ²Department of Public Health, Mahachulalongkornrajavidyalaya University, Faculty of Medicine, Rajabhat Pattani, Pattani, Thailand; ³Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mahachulalongkornrajavidyalaya University, Rajabhat Pattani, Pattani, Thailand; ⁴Department of Food and Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ²⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ³⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁴⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁵⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁶⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁷⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁸⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹¹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹²Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹³Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁴Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁵Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁶Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁷Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁸Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ⁹⁹Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand; ¹⁰⁰Department of Food Microbiology, Faculty of Food Science and Technology, University of Technology, Bangkok, Thailand.

腸炎ビブリオの病原性

腸炎ビブリオは、今から52年前に当時阪大の藤野教授が大阪府岸和田市で発生したシラス食中毒事件を調査された時、初めて分離されました。この菌は海の中に生息し、日本や温帯地方で水温が15℃以上になる夏場に海水中に現れ、プランクトンに付着して増殖し、海産物を汚染します。熱帯地方では1年中出現しています。

腸炎ビブリオ

発見
◆ 藤野直三郎教授が1956年に「シラス食中毒事件」の調査で発見

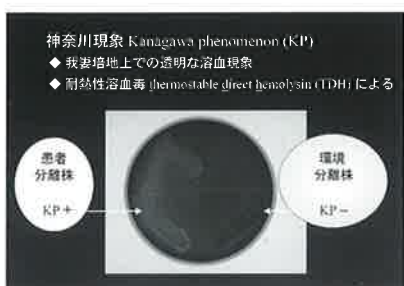
生態
◆ 海水・汽水環境中に広く分布 (水温15℃以上)

かつて、細菌性食中毒で原因が不明なケースが半分くらいありましたが、そのほとんどが腸炎ビブリオが原因であることが分かりました。この菌は世界中の温帯、熱帯地域で感染症を起こす重要な菌であります。

腸炎ビブリオは病原性株と非病原性株に分かれます。病原性株に汚染された海産物を十分に加熱処理しないで、菌が生残したまま摂取する時に感染します。日本では生で海産物を食べる習慣がありますので特に大きな問題となります。



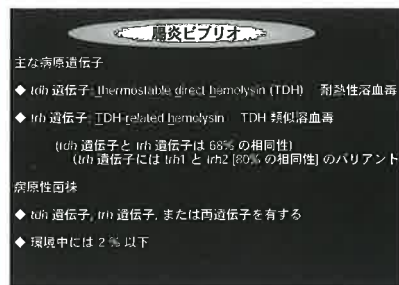
腸炎ビブリオの病原性の指標として神奈川現象が知られています。これは、かつて神奈川県衛生研究所が発見した現象ですが、患者分離菌株を吾妻培地上で培養したときに培地中の赤血球を分解して溶血反応をおこす現象です。しかし環境中から分離された腸炎ビブリオでは、その2%以下が溶血反応を起こすだけで、ほとんどが神奈川現象陰性です。この溶血反応は菌が産生する耐熱性溶血毒（英語の頭文字をとってTDHと呼んでいます）によるものです。すなわち、患者分離株はTDHを産生するためにこのような現象が観察されますが、環境中にはそのような株はごく1部しかないということです。このTDHが腸炎ビブリオの主たる病原因子といわれています。



1980年代に入り、TDHの兄弟分が発見されました。モルジブ旅行のツアーにおいて多くの下痢患者が発生し、そのときの渡航患者から分離された腸炎ビブリオから見つかりました。その分離株はTDHに似た溶血毒を作る株であることが分かり、TDH related hemolysin (TRH) と命名しました。

tdh 遺伝子と *trh* 遺伝子はDNA塩基配列で68%の相同性が認められました。また、*trh* 遺伝子には約80%の相同性を有するバリエントがあり、*trh1*、*trh2*として区別しています。

病原性株としては *tdh* 遺伝子のみ持つもの、*trh* 遺伝子のみ持つもの、両方の遺伝子を持っているものがあり、これらを病原性菌株と呼んでいます。環境分離株では、これらの病原性株の割合は2%以下であり、従って、病原性株とそれ以外を区別する必要があります。



これは環境分離株と患者分離株の病原遺伝子を検索した結果です。患者分離株のほとんどが、これらの遺伝子の片方または両方を持っていますが、環境分離株はそういう株が少ないです。

患者分離株の中で病原遺伝子が検出できないものがありますが、これは検査上のミスなどが考えられます。

患者分離株と環境分離株における *tdh* 遺伝子と *trh* 遺伝子の分布

遺伝子			菌株数と由来	
<i>tdh</i>	<i>trh1</i>	<i>trh2</i>	臨床	環境
+	-	-	112	0
+	+	-	32	0
+	-	+	2	0
-	+	-	17	0
-	-	+	35	5
-	-	-	26	66

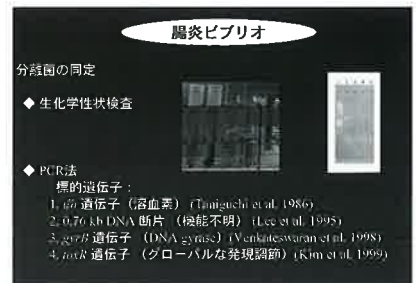
(Kishishita et al. 1992)

腸炎ビブリオの検査法

まず糞便などの患者サンプルから腸炎ビブリオを分離するためにはサンプルを選択鑑別培地上に接種して菌を発育させます。一般的にはTCBS寒天培地が用いられますが、最近ではより鑑別性に優れたクロモアガー培地が開発され使用されはじめています。



分離した菌の同定には、生化学的性状検査を行います。これに代わるものとして腸炎ビブリオのみに特異的な遺伝子を標的としたPCR法がいくつか報告されています。我々の研究室では *toxR* 遺伝子中の特異的な塩基置換を標的にしたPCR法を開発し、有効に活用しています。³⁾



環境サンプルからの腸炎ビブリオの分離は、患者サンプルに比較して困難です。理由は、環境中には腸炎ビブリオ類似菌が多く存在しており、腸炎ビブリオを選択することが困難であるため、さらに存在頻度の低い病原性株を選択するのが困難なためです。よって、選択鑑別培地を使用する前に増菌培養のステップが必要であり、アルカリペプトン水や食塩ポリミキシンブイオンが使用さ

検査所で、冷凍エビなど安価な海産物（船積み）は大阪港の検査所で調べました。その結果、分離株のほとんどは毒素遺伝子を保有していませんでした。ごく一部の*tdh*または*trh*遺伝子陽性株もGS-PCR陰性であり、結局、パンデミッククローンは確認できませんでした。従って今後より多くの*tdh*遺伝子陽性菌株を検出して検査をする必要があると考えられました。

輸入魚介類から分離した腸炎ビブリオ菌株の遺伝子解析結果

由来	菌株数	Vp _{stx2B}	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	GS-PCR
生鮮魚介類	691	+	-	-	-
	2	+	+	-	-
	12	+	-	+	-
冷凍魚介類	593	+	-	-	-
	5	+	-	+	-

次に、日本に入国する海外旅行者に関する報告を調査したところ、腸炎ビブリオ患者はタイから入国する人が圧倒的に多いということが明らかになりました。

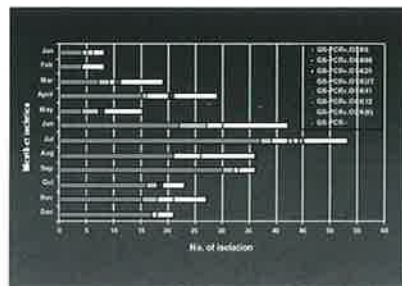
そこで、タイの環境を現地大学の2つのチームとの共同研究で調査しました。フィールドはタイ南部のハジャイと言う町です。西にはアンダマン海、東にはタイ湾を望む海岸に近く、このあたりは、観光客に人気のある地域でシーフードが人気の食材です。



現地の大学の付属病院の臨床検査室との共同研究では、臨床分離株を調査しました。1999年から1年間で、2つの市中病院で調べたところ、年間、323症例が確認されました。これは日本に比べて圧倒的に多い

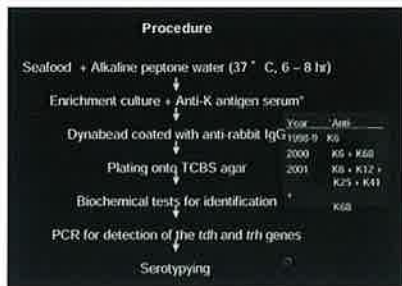
数です。その分離株の大部分が世界的に大流行を起こした株と血清型が同じでした。

さらに調査しますと、GS-PCR陽性のパンデミックを起こす株は全体の76%を占めました。その血清型はすでに世界的流行株として知られている3つの血清型が多くを占めたが、それ以外に新たに3つの血清型が発見されました。血清型が異なるバリエーションが出現し始めたことを示唆しています。⁴⁾



同じ大学の理学部との共同研究では、環境調査を行いました。

シーフードサンプルなど環境から腸炎ビブリオの病原性株を見つける事は簡単な事ではなく、増菌培養の後に免疫磁気ビーズ法による集菌操作を加えました。この免疫磁気ビーズ法では、菌の表面抗原（K抗原）に特異的な抗体をコーティングした磁気ビーズを用います。これを増菌培養液に入れ、K抗原を持っている菌を効率良くトラップします。⁵⁾



この方法を用いて海産物について1998年から2001年まで調査しました。はじめの年はいろいろな海産物を調べたところ、二枚貝に毒素遺伝子陽性のものが多く見つかったので、以降は貝を中心に調べ、赤貝、

はまぐり、カラス貝（ムール貝）などから菌が分離されました。

GS-PCR陽性の分離株が見つかっており、血清型は流行株と一致、また臨床株との血清型も一致していました。

tdh- or *trh*-positive strains of *V. parahaemolyticus* isolated from shellfish

Strain no.	Month/Year	Source*	Gene	Serovar	GS-PCR
			<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
PSU46	Dec-98	A	+	-	O3:K6
PSU47	Jan-99	A	+	+	O11:K25
PSU46	Aug-99	C	+	-	O3:K6
PSU228	Oct-00	B	+	-	O3:K6
PSU338	Apr-01	C	+	-	O3:K6
PSU339	Apr-01	B	+	-	O3:K6
PSU360	Apr-01	B	+	-	O3:K6
PSU434	May-01	B	+	-	O3:K6
PSU435	May-01	B	+	-	O3:K6
PSU434	Aug-01	B	+	-	O3:K6
PSU476	Aug-01	C	+	-	O13:K25
PSU478	Dec-01	C	+	-	O13:K25
PSU411	Dec-01	A	+	+	O13:KUT

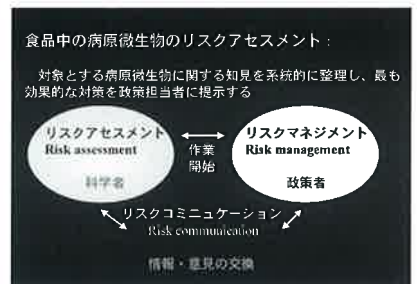
*A, *Anadara granosa*; B, *Perna striata*; C, *Meretrix senhaleis*

腸炎ビブリオを対象とした食品のリスクアセスメント

食品の微生物学的リスクアセスメントについて、世界的な動きがあります。本来は行政が行わなければならないのですが、科学者が管理法を提言しています。

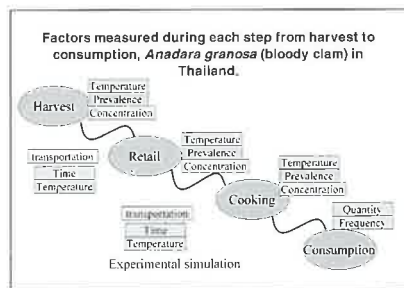
日本の海産物における腸炎ビブリオの規制は、かつては、病原性株、非病原性株に関わらず、1菌でも検出されれば不可という非現実的なものでした（夏場は必ず検出される）。その後、国際基準に合わせ、食品1gあたり100個となりましたが、いまだに病原性株/非病原性株の区別はされていません。そこで、この基準について改善の動きが出ています。

世界的な動きの方が先行してしまして、FAO（国連食料農業機構）やWHO（世界保健機構）の指導の下で、Codex委員会が食品中の病原微生物の管理の指針を検討しています。

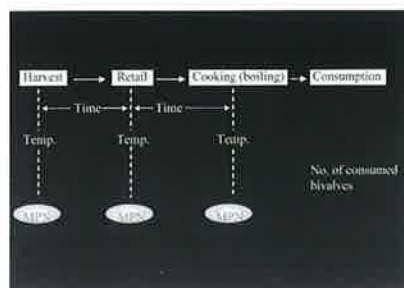


タイで行った研究が評価を得て、リスクアセスメントの依頼が我々にありました。食品中の病原性菌株の量、収穫した時点での量、マーケット中（流通中で増加）での量、調理後の量のデータが得られれば、摂取される病原性菌株の量をモデリングによって推測することが出来ます。これはモンテカルロモデルと言い、タイで実施したサンプリングによって得られたデータを用いて日本の解析チーム（春日文子、小坂健、山本昭夫、岩堀淳一郎、重松美加、豊福肇、山本茂貴）がモデルによる評価を実施しました。

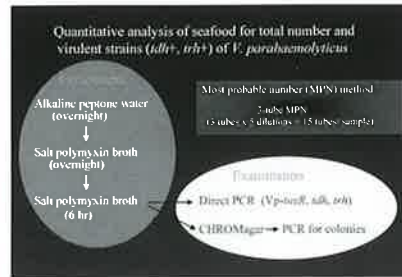
赤貝をターゲットとしました。タイ南部で収穫された赤貝は、選別された後、トラックに載せて室温30℃位の中を輸送され、夕方のマーケットで売られます。この時点で菌量はかなり増えています。そして、レストランや家庭で調理して食べられます。



各過程での全菌数と病原性菌数をMPN法（最確法）で定量します。輸送の時間、温度、菌増殖スピードなどを算出し、食する時の菌量を推測するデータとします。



食品中の全菌数、病原菌株の定量は煩雑で大変な作業です。MPN法では、1つのサンプルについて5段階希釈し、各々の希釈について3本の試験管で増菌をするため、計15本を3日間増菌します。これらの中的全菌数や病原性株の存在をPCRで調べました。また、菌を分離後、そのコロニーをPCRで確認して、差が無い事を確認しました。

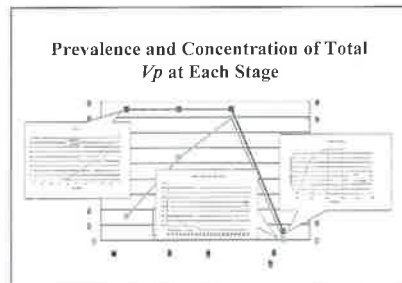


これがMPNの結果です。プールする貝の数が多くなると毒素遺伝子陽性株が検出されるようになります。それぞれのステージでこれだけを行うのに、PCRを1000テスト、約2週間かかります。これを12回繰り返し、使用できるデータを揃えました。

Results of the direct PCR method (examples)

Sample No.	Stage	Total weight of bivalves (g)	MPN of <i>V. parahaemolyticus</i> / 10 g of bivalves		
			Total	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
4-1	Harvest	10.5	460	<3	<3
	Retail	10.5	4,600	<3	<3
	Consumption	10.5	<3	<3	<3
5-2	Harvest	21	950	<3	<3
	Retail	21	15,000	<3	<3
	Consumption	21	<3	<3	<3
10-2	Harvest	42	46,000	<3	<3
	Retail	42	4,500	<3	<3
	Consumption	42	<3	<3	<3

期間は2月から5月まで行い、データを出し、日本で解析チームが数理解析を行いました。このデータは検出頻度、菌数の増減を表しています。



結果の一部ですが、98%の人は病原性株を口にする可能性はなく、残りの2%の人に可能性が有ります。しかも、1回に最大56個位の病原性菌が口に入る推定となります。感染の可能性については、1年間で10万人に1人ということになります。しかし実際の感染率は、この結果よりはるかに高いのでアンダー・エスティメーションということになります。ただし、食品調理中の過程でクロスコンタミネーションにより汚染が起きていることも推測されます。

これをWHOで発表したところ大きな反響が有りました。

Risk Characterization

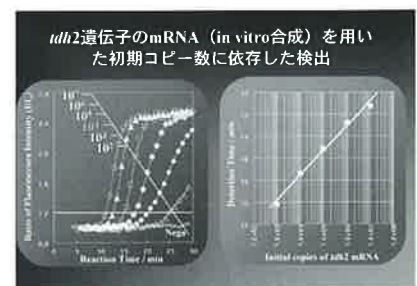
The mean probability of illness per year due to clam consumption

9.18E-10 per person

maximum probability: 9.34E-6,

TRC法の適用

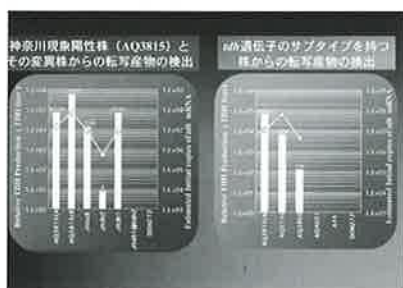
TRC法⁶の対象は*tdh*遺伝子と*trh*遺伝子のmRNAです。東ソーで開発したシステムを我々の研究室で評価しました。まず、標準mRNAの各種濃度を測定して定量性を確認し、使用できることを確認しました。*tdh*遺伝子は1~5までバリエーションありますが、そのうち発現量の高い*tdh2*のmRNAを最初の実験に用いました。



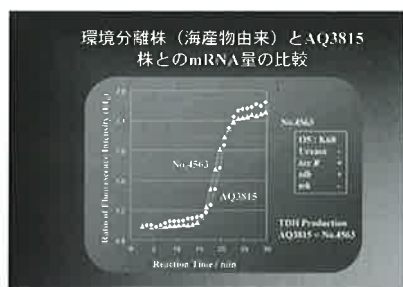
次に、菌株を用いた定量性の確認試験には神奈川現象陽性株で多くの

毒素を出す菌株、また遺伝子操作で作成した毒素発現量の低い株、*tdh*のバリエーションで発現量の低い株を用いました。またコントロールとして*trh*遺伝子を持つAT4株について検討しました。DOH272株は*tdh*遺伝子陰性*trh*遺伝子陰性のコントロールです。

ここで、バーで示したのがRPLA法による検査結果をもとに推定した相対的毒素産生量、折れ線グラフがTRCで測定したmRNA量です。毒素産生量とmRNA量間で良好な相関が認められ、定量性能の高さが伺われます。



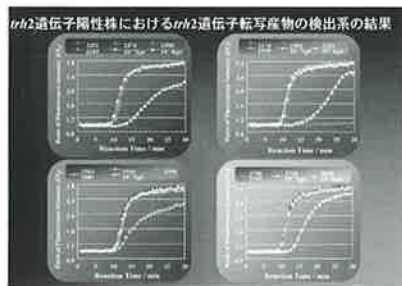
*tdh*陽性の患者分離株 (AQ3815株)、環境 (海産物) 分離株 (No. 4563株) から抽出したRNAをTRCで測定したところ、臨床分離株でも環境分離株でも問題無く使える事が分かりました。



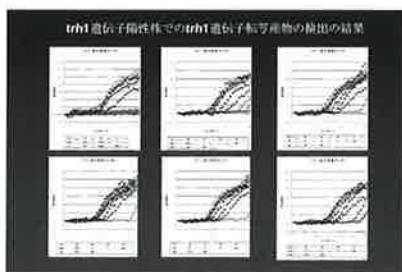
次に*trh*についてですが、最初に開発された*trh2*検出系の評価を行いました。*tdh*と*trh*の両方を保有する標準菌株、*trh1*保有のワイルドタイプの株、*trh2*保有のワイルドタイプの株で比較しました。

*trh2*遺伝子を持っている株はすべて問題なく反応しています。*trh1* (陰性標準) を持っている株 (2203株) は全く反応していません。このように、*trh2*に対する特異性が確認されました。

さらに、陰性標準である*trh1*保有株を増やして測定し、クロス反応が無い事を確認しました。



次に*trh1*検出系の評価も同様に実施し、*trh1*だけを検出できるという特異性を確認しました。



今後は、これらのTRC法を用いて、世界中の環境株、臨床株を用いて特異性を調べ、問題なく使用出来る事を確認したいと思っています。

文献

- Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H.-C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. 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.
- Kim, Y. B., C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.
- Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130:1-12.
- Vuddhakul, V., A. Chowdhury, V. Laohaprertthisan, P. Pungrasamee, N. Patararunrong, P. Thianmontri, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2000. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains belonging to a pandemic O3:K6 clone from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2685-2689.
- Ishiguro, T., J. Saito, R. Horie, T. Hayashi, T. Ishizuka, S. Tsuchiya, K. Yasukawa, T. Kido, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and K. Ueda. 2002. Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel. *Anal. Biochem.* 314:77-86.



TOSOH

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5181 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
大阪支店 科学計測G ☎(06) 6344-3857 〒530-0004 大阪市北区堂島浜1-2-6
名古屋支店 科学計測G ☎(052) 211-5730 〒460-0003 名古屋市中区錦1-17-13
福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1
<http://www.tosoh.co.jp>

