

食水系感染症病原体の検査法 - 3

腸炎ビブリオ

く どう ゆ き こ
工 藤 由起子
Yukiko KUDOU

I. 病原体

1. 病原体

昭和25年に大阪でシラスを原因食品とする大規模食中毒が発生し、この時に腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) が発見された。腸炎ビブリオは *Vibrio* 属菌の一つで好塩性の海洋細菌であり、食塩を3%程度含む培地で増殖が良い。また、グラム陰性の短桿菌で波状の長い単毛を持ち、顕微鏡下で特徴的な動きを観察できる。腸管病原因子として耐熱性溶血毒素 (TDH) および TDH-関連溶血毒 (TRH) が知られており、これらの一方または両方を保有する株が病原性株とみなされている。

2. 疫学

腸炎ビブリオは、沿岸海水中に広く生息し河川が流れ込む海域においてもよく分離される。一般に、水温が20℃以上の海水において腸炎ビブリオの生育が著しく活発になるため、夏季に腸炎ビブリオ食中毒が集中する。病原性を有する菌に汚染されている魚介類は一部であるが、夏季の検体では腸炎ビブリオが検出されることが多い。特に、海泥に生息する貝類での汚染が多いため、貝類の生食や流通・調理段階での生食用鮮魚介類や加熱済加工品などへの二次汚染の結果、食中毒を起こす場合がある。また、発症を引き起こす病原性腸炎ビブリオの摂取菌数は100以上とされていることから、常温での流通などによって食品中で増殖が起こることも感染を引き起こす重要な要因である。腸炎ビブリオ食中毒は、日本の特徴的な食中毒であり時代によって主要な血清型が変わっているが、1996年頃

から血清型03:K6による食中毒が多くみられるようになった¹⁾。この血清型は単クローン株が東南アジアから世界に広がったと考えられている²⁾。日本では1998年に腸炎ビブリオ食中毒患者が12,000人を超える異常な事態となったため、同年より食品衛生調査会にて対策の検討が始まり、2001年に食品衛生法の鮮魚介類に関する規格基準が改正された(詳細は「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」(厚生労働省医薬局食品保健部長通知平成13年6月7日食発第170号)参照)。腸炎ビブリオを項目として含む成分規格の設定や低温管理の徹底等が効を奏したためか、急速に患者数が減少し2006年の患者数は1,238人であった。しかし、2007年9月にはイカの塩辛製品を原因食品(推定)とする患者数約600人の大型食中毒が発生し、また、TDH陽性腸炎ビブリオは国内の鮮魚介類から例年検出されているため、引き続き食品の取り扱いに注意する必要がある。

3. 臨床症状

腸炎ビブリオに汚染された食品を摂食した後、およそ6～24時間の潜伏期間をおいて下痢、腹痛、悪心、嘔吐、発熱などの急性胃腸炎症状を発症する。下痢便の性状は水様性のものが大半であるが、なかには粘血便を伴うこともある。腹痛、嘔吐、悪心を高率に伴うが、あまり高い発熱がみられない点が特徴的である。稀にチアノーゼなどの重篤な症状を示すこともあるが、多くの場合2～5日間で回復し予後は良好である。

II. 検査法

1. 培養法

海水等の環境検体や魚介類等の食品検体からの検出に際しては増菌培養が必須となるが、菌体が比較的栄養の少ない状況から人工培養条件下に移される場合を考えると、選択性が弱い培地の方が適当と思われる。現在は選択性が低いアルカリペプトン水での増菌が広く用いられている。

分離培地としては、近年に開発された酵素基質培地（クロモアガービブリオ（関東化学）、X-VP 寒天培地（日水製薬）や ES ビブリオ寒天培地（栄研化学））が従来の TCBS 培地に加えて有用である。酵素基質培地では、競合する細菌の集落に腸炎ビブリオ集落の色調が影響されないため鑑別が容易であり（写真1）、2～3日の保存においても生育集落の色調が変化しない利点もある³⁾。特に、環境や食品検体では酵素基質培地の能力が発揮できるものとする。逆に、患者便等の臨床検体からの分離には腸内細菌の抑制能力の高い TCBS 培地が優れる。

食品衛生法の食品、添加物等の規格基準のための、腸炎ビブリオの定性および定量の試験法が通知され（詳細は「腸炎ビブリオの試験方法について」（厚生労働省医薬局食品保健部基準課長通知平成13年6月29日食基発第22号）参照）、増菌培地にはアル

カリペプトン水、分離培地には TCBS 培地または酵素基質培地が使用されている（図1）。

2. 遺伝子検出法

近年、臨床や食品等の検査分野で積極的に遺伝子検査が導入されている。今後さらに遺伝子検査手技の一般化が進むものと思われ、コストも下がることが期待される。遺伝子検出法が迅速性の面で培養法より優れることは周知されているが、加えて腸炎ビブリオと性質の似た海洋細菌から本菌を培養法で選択または鑑別し難い傾向にあるため、他の細菌に阻害されないことも遺伝子検出法の利点としてあげられる。しかし、遺伝子検出の感度の確保については十分な注意が必要である。検体の増菌培養液からの検出の際には、培養液中に含まれるさまざまな物質が遺伝子の増幅反応を阻害することもあるので、適切な DNA 抽出の方法を使用する。検出する標的遺伝子として、病原性腸炎ビブリオ検出の目的では *tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子、および総腸炎ビブリオ検出の目的では *toxR* 遺伝子等があげられる。

① DNA 抽出法

良好な感度を確保したい検査では、検体培養液をそのまま 100℃ 5 分間加熱する方法は増幅反応の阻害物質が反応液に持ち込まれるため行わない。効果的な抽出方法として、アルカリ熱抽出法や酵素抽出法に加えてシリカメンブレン法、グラスファイバー法などの精製ステップを含むキットについて例をあげる。

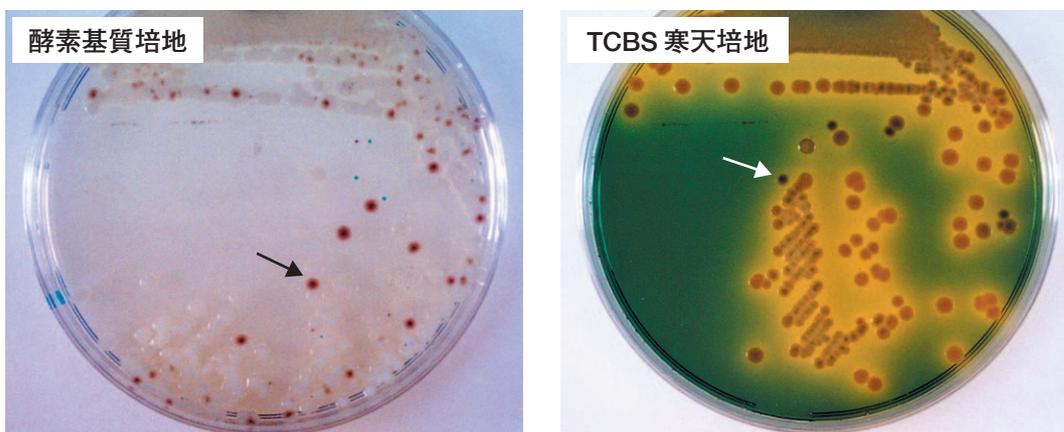


写真1 腸炎ビブリオを接種したアサリ培養液を画線した酵素基質培地および TCBS 寒天培地

酵素基質培地（クロモアガービブリオ）では腸炎ビブリオの典型的コロニー（藤色）が明瞭に観察できるが、TCBS 培地では典型的コロニー（緑色）が少数である。

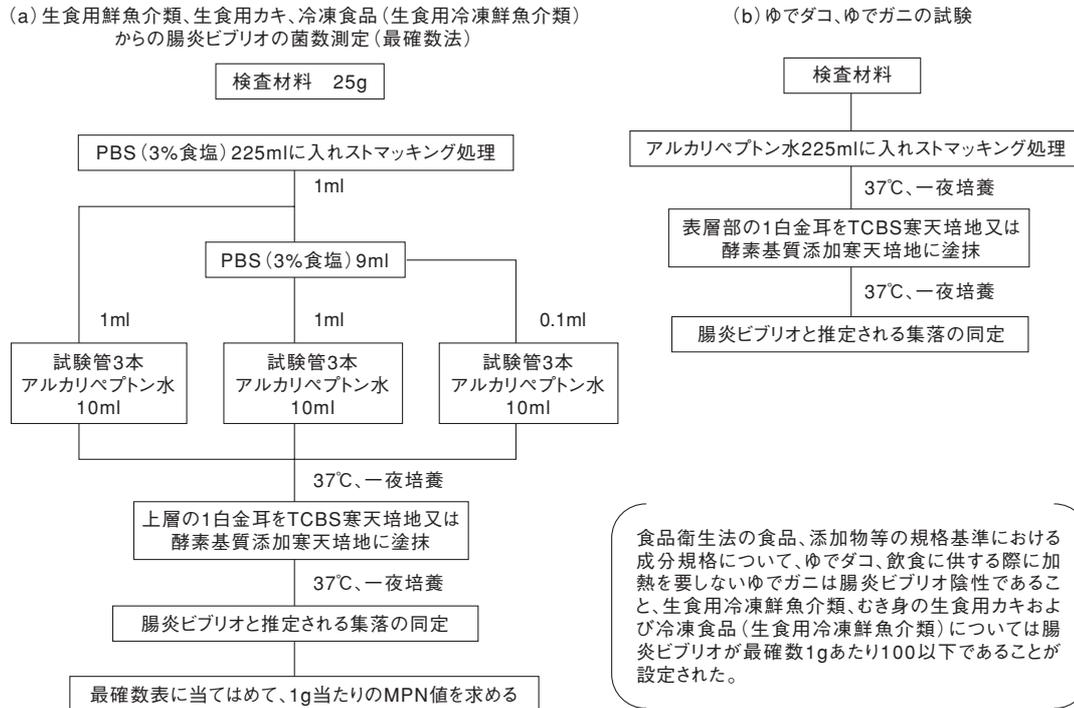


図1 食品衛生法の食品、添加物等の規格基準における腸炎ビブリオの試験方法

• アルカリ熱抽出法

検体液 0.1ml を 10,000Xg、10 分間遠心し、上清を取り除いた沈渣に滅菌した 50mM NaOH 0.1ml を添加して 100℃ で 10 分間加熱処理する。その処理液 50μl を滅菌した 1M Tris-HCl (pH 7.0) 8μl で中和し遠心上清 (10,000Xg、10 分間) を鋳型 DNA とする。当日使用する場合は冷蔵で良いが、翌日以降の場合は冷凍で保存する。また、各社キットに付属するアルカリ抽出試薬もある。

- PrepMan Ultra Sample Preparation Regent (アプライド・バイオシステムズジャパン)
- DNeasy Tissue Kit (キアゲン)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス)

② PCR 法

最も多くの検査室で導入されている手法は、PCR 産物を電気泳動法などによって検出する従来からの PCR 法である。各自合成のプライマーまたは市販品のキットが使用されている。

• *tdh* 遺伝子

プライマー： 5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'
および 5'-CCACTACCACTCTCATAT GC-3'⁴⁾

PCR 条件： 94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 1 分を 35 回、PCR 産物： 251bp.

• *trh* 遺伝子

プライマー： 5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'
および 5'-CATTTCGCTCTCATATGC-3'⁴⁾

PCR 条件： 94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 1 分を 35 回、PCR 産物： 250bp.

• *toxR* 遺伝子

プライマー： 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'
および 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'⁴⁾

PCR 条件： 94℃ 1 分、63℃ 1.5 分、72℃ 1.5 分を 20 回、PCR 産物： 368bp.

市販品：

- 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒遺伝子検出用 Primer Set VPD-1&2 (タカラバイオ)
- 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (*trh* 1&2) 検出用 Primer set VPR-1&2 (タカラバイオ)
- 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子 (*trh* 1) 検出用 Primer set VPS-1&2 (タカラバイオ)

③リアルタイム PCR 法

近年、電気泳動法による PCR 産物の検出の必要

食水系感染症病原体の検査法-3

がなく検出感度も電気泳動法より優れるリアルタイムPCR法が普及している。機種による差はあるが、一般に従来のPCR法より反応時間が短い。腸炎ビブリオを対象にした検出系の報告はまだ少ないが、高い特異性が期待できるプローブを含む系であるTaqManプローブ法の一例を示す。今後、試験研究機関での利用が進むことによって優れた系が選定・確立されていくものと思われる。

• *tdh* 遺伝子

プライマー：5'-GTA RAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3'および5'-CTA CAG AAT YAT AGG AAT GTT GAA G-3'⁶⁾

プローブ：5'-Cy5-ATT TTA CGA ACA CAG CAG AAT GA-Iowa Black-RQ-3'

• *trh* 遺伝子

プライマー：5'-CCA TCM ATA CCT TTT CCT TCT CC-3'および5'-ACY GTC ATA TAG GCG CTT AAC-3'⁶⁾

プローブ：5'-TET-TAT TTG TYG TTA GAA ATA CAA CAA T-BHQ1-3'

(Y=C or T ; M=A or C ; R=G or A. Cy5, carbocyanine fluorescent dye ; Iowa Black-RQ, Iowa Black quencher dye ; TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein fluorescent dye)

PCR条件：95℃ 2分後、95℃ 20秒、56℃ 20秒、72℃ 30秒を45回

文献6)ではCepheid SmartCycler IIを使用しているが、使用機種にあわせてCy5、Iowa Black-RQ、TETを変更すれば他の機種にも応用が可能である。

市販品：

• 腸炎ビブリオ *trh* mRNA 検出試薬 TRCRtest *trh*-m (東ソー株式会社)

• 腸炎ビブリオ *tdh* mRNA 検出試薬 TRCRtest *tdh*-m (東ソー株式会社)

ただし、これらの使用には専用のリアルタイム蛍光モニターが必要である。

④ Loop-mediated isothermal amplification

(LAMP) 法

LAMP法は近年開発された遺伝子検出法である

が、6つの領域を含む4種類のプライマーを設定することにより標的遺伝子配列を特異的に増幅できる。一定温度で対象遺伝子を増幅し、その副産物であるピロリン酸マグネシウムによる濁度で判定するものである。病原体などの有害微生物を主として、ウイルスや細菌の検出に応用されている。腸炎ビブリオに関連する系の確立について、誌上報告はまだないが、複数の研究グループが学会等で発表している。使用には専用のリアルタイム濁度測定装置が便利であるが、Fluorecent Detection Reagent (栄研化学)を添加すれば遺伝子増幅に伴う蛍光増強をリアルタイムPCR機器でも測定できる。

3. 簡易・迅速診断法

免疫クロマトグラフィーや免疫磁気ビーズの市販品はない。耐熱性溶血毒検出用キットは逆受身ラテックス凝集反応を利用したキットが知られている(KAP-RPLA「生研」、デンカ生研)。菌株の液体培養の遠心上清や平板培地上に生育した単独コロニーまたは集合コロニーの浮遊液をポリミキシン処理したものを検体として毒素産生を確認するのに利用されている。通常、逆受身ラテックス凝集反応には一夜を要するが、遠心機を利用した短時間での判定も可能である。まず、通常通りに検体と試薬を混和し、反応プレートを37℃で1時間振とうする。それをスイングバケットを使って遠心(1,200rpm、15分)し60～70度に傾けて5～10分置くことにより沈殿が流れるものを陰性、流れないものを陽性と判定できる。

文 献

- 1) 感染症情報センター, 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報, **20** : 159-160, 1999.
- 2) Matsumoto, et al., J. Clin. Microbiol. **38** : 578-85, 2000.
- 3) Hara-Kudo, et al. Appl. Environ. Microbiol. **67** : 5819-5823, 2001.
- 4) Tada, et al., Mol. Cell. Probes, **6** : 477-487, 1992.
- 5) Kim, et al., J Clin Microbiol. **37** : 1173-1177, 1999.
- 6) Ward, et al., Appl. Environ. Microbiol. **72** : 2031-2042, 2006.