

分子生物学的手法を用いた腸炎ビブリオ食中毒の
疫学的解析に関する研究

2006.07

尾畑 浩 魅

分子生物学的手法を用いた腸炎ビブリオ食中毒の
疫学的解析に関する研究

東京都健康安全研究センター

微生物部 食品微生物研究科

尾畑 浩魅

Epidemiological study of *Vibrio parahaemolyticus* food-borne
outbreaks using molecular biological methods

Hiromi Obata

Division of Food Microbiology,
Department of Microbiology,
Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

目次

要旨	1
英文要旨	6
I 東京都における腸炎ビブリオ食中毒の発生動向：1989～2000年	12
1. 序文	12
2. 対象と方法	12
1) 検査期間	12
2) 腸炎ビブリオの検査方法	13
3) 血清型別試験	13
4) 東京都内の気温の調査	13
3. 成績	13
1) 腸炎ビブリオ食中毒発生動向	13
2) 月別発生状況	13
3) 原因食品	13
4) 発生要因	13
5) 血清型の推移	14
4. 考察	14
5. 文献	16
II 腸炎ビブリオ食中毒事例におけるPCR法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離	17
1. 緒言	17
2. 材料と方法	18
1) 検査対象	18
2) 検査方法	18
3) PCR法による <i>toxR</i> 遺伝子および <i>tdh</i> 遺伝子の検出	18
4) TDH産生性の確認	19
5) パルスフィールド電気泳動(PFGE)法によるDNA解析	19
3. 結果	19
1) 東京都における腸炎ビブリオ食中毒発生状況と原因菌の血清型	19
2) 食品からの腸炎ビブリオおよびTDH産生性腸炎ビブリオの分離	19
3) 食品からTDH産生菌検出のための検討集落数	19
4) 食品からTDH産生性腸炎ビブリオが検出された食中毒事例の細菌学的疫学解析	20
4. 考察	22
5. 文献	23
謝辞	25

分子生物学的手法を用いた腸炎ビブリオ食中毒の疫学的解析に関する研究

腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)は、好塩性の細菌で、海水、なかでも沿岸海域や汽水域に生息しており、魚介類を生食する習慣のあるわが国においては代表的な食中毒起因菌の一つである。本菌による集団食中毒は、毎年上位を占めていたが、1996年以降さらに著しく増加した。その原因については明確ではない。

一方、腸炎ビブリオの病原因子としては耐熱性溶血毒(Thermostable direct hemolysin ; TDH, または神奈川溶血毒)と耐熱性溶血毒類似毒(TDH-related hemolysin ; TRH) が知られている。腸炎ビブリオ食中毒の発生時に、患者ふん便から分離される菌は、TDH(稀に TRH)産生株であるのに対し、食品や環境から分離される腸炎ビブリオは溶血毒非産生株のみである。原因食品を喫食後に発症した患者由来の TDH 産生株と同じ TDH 産生株が食品や環境から分離されない原因については、本菌の病原因子が解明された 1970 年代以降の課題であった。

最近、細菌検査に遺伝子増幅法である PCR(Polymerase chain reaction)法や、パルスフィールドゲル電気泳動(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)法が広く応用され、分子疫学的解析が可能となってきた。

今回は、腸炎ビブリオ食中毒の増加の原因を明らかにする目的で、発生状況及び原因菌について疫学的解析を行うとともに、食品から TDH 産生株を検出するための方法について検討を行ったところ、以下の結果を得た。

1) 東京都内で1989～2004年の16年間に発生した腸炎ビブリオ食中毒の発生状況について調査したところ、腸炎ビブリオ食中毒事例として 872 事例(行政的には有症苦情事例等として処理された事例を含む)が認められた。その発生年次別では、1989年が 55 事例、1990年が 75 事例であったが、その後減少し、1993年が 24 事例とこの期間では最も少なかった。

た。それ以降増加傾向を示し、1998年が最も多く107事例であったが、それ以降は2001年が33事例、2002年が49事例、2003年が29事例、2004年が51事例と増減を繰り返している傾向が明らかになった。

2) 食中毒の月別における発生状況では、8月の発生が最も多く393件(45.1%)であった。また、7～9月の3か月間において発生が全体の89%を占めていることが明らかになった。さらにその前後の月をあわせた6～10月の5ヶ月間に全体の99%の事例が発生していた。しかし、今回の調査で、通常では腸炎ビブリオ食中毒の発生が認められない11～2月にも6事例が発生していることが明らかになった。次に7～9月の東京の平均気温と本菌食中毒発生状況を比較検討した結果、1994年までは腸炎ビブリオ食中毒事例数と気温との間にほぼ相関性が認められた。しかしそれ以降は、発生事例数の著しい増加から、気温との相関は認められなかったが、その増加の要因として血清型O3:K6菌による食中毒の増加と一致していることが明らかとなった。

3) 1989～1998年の10年間に発生した216事例の本菌食中毒の原因食品について調査したところ、最も多かったものは会食料理で25%、次に寿司類17%、刺身類8%、魚介類の調理品5%の順であった。なお、会食料理は主に飲食店や寿司屋などで刺身や寿司などの魚介類を喫食したものであった。

4) 1995～1997年の3年間に発生した39事例についてその発生要因を詳細に調べた結果、原材料間の相互汚染や調理器具を介した二次汚染が34.8%と最も多く、次に室温で解凍するなど不適當な温度保存(28.8%)、長時間の保存(18.2%)、原材料の汚染(10.6%)などの順であった。事例別の発生要因では、単独の要因による発生事例は少なく、2つ以上の複数の要因が重なった場合に発生していることが明らかになった。さらに、食中毒の原因としては、原材料汚染に加え、二次汚染や低温管理の不備による菌の増殖が原因である事を明らかにした。

5) 本菌食中毒から分離された菌株について、血清型別を行ったところ、O4:K8やO3:K6などの血清型が高頻度に認められたが、数年毎に異なる

血清型の流行が認められた。その年別における菌株の中で最も多く検出された血清型は、1989年では O4:K4、1990年および1991年では O4:K8、1992年では O1:K56、1993～1995年では再び O4:K8 であった。しかし、1996年以降はそれ以前にほとんど認められなかった O3:K6 が急増の傾向を示し、なかでも2000年には本血清型菌が最も多くを占め、65事例中57事例(87.7%)であった。この傾向は、2005年に至っても継続しており、最近の本菌食中毒菌の血清型は O3:K6 が大半を占めていることが明らかとなった。

6) 1998年には食中毒の原因菌として既知の血清型ではなく、新たな血清型 O4:K68 が関与していることを明らかにした。この血清型菌は従来から知られている抗原表にはない OK 不一致の新しいタイプの菌であった。

7) 食品から TDH 産生菌を効率よく分離する方法として、食品の増菌培養液を対象に TDH 産生に関与する *tdh* 遺伝子を PCR 法を用いてスクリーニングし、さらに性質の異なる 2 種類の分離培地（最近開発された酵素基質培地と従来から繁用されている TCBS 寒天）を用い、画線-ストリップ法等を組み合わせることにより、TDH 産生菌を効率的に分離できる方法を開発した。

8) 2000～2004年の5年間に発生した腸炎ビブリオ食中毒 227 事例の内 67 事例の食品検体(残品, 参考品, 同一品および検食)を対象に、著者らが開発した上述の方法を用いて TDH 産生菌の分離を試みた。その結果、TDH 産生性の腸炎ビブリオが分離された食品は 11 事例(16.4%)に由来する 23 検体から認められた。それらの食品の内訳は青柳, 寿司および生はまぐりなどの生鮮魚介類, その他に煮物, ナムル, 玉子焼きなどの加熱調理後に二次汚染したと推定される食品もあった。

9) TDH 産生菌を分離するために検討した 1 検体あたりの集落数は 10 集落以下が 12 件, 11～100 集落が 6 件, 101～200 集落が 5 件であった。食品中の TDH 産生菌の検出頻度は、食品によってかなり差異が認められ、腸炎ビブリオ菌数と TDH 産生菌数には相関性が無いことが明らかとなった。

10) スクリーニング検査の PCR 法で *tdh* 遺伝子が陽性でありながら、最高 250 集落を釣菌して検討を行ったが、菌を分離することができない食品が 16 件もあった。その原因としては、①加熱により菌は生残しないが遺伝子のみが残っていた、②菌は生きているが培養できない VNC(Viable but nonculturable)状態になっていた、③さらに多くの集落について検討する必要があったことなどが考えられた。

11) 11 事例に由来する食品検体から検出された TDH 産生菌の血清型は O3:K6 (10 検体), O3:K5(6), O1:K25(4), O3:K29(2), O4:K8(1), O4:K11(1) で、全事例で患者由来株と同じ血清型の TDH 産生菌が分離された。中には 2 種類の TDH 産生菌 (血清型 O1:K25, O4:K11) が検出された食品 (煮物) もあった。さらに 1 食中毒事例では患者由来株と同一血清型の TDH 産生菌が 6 検体の食品から検出された。

12) 食品から TDH 産生性腸炎ビブリオが検出された 11 食中毒事例を対象に、分離された患者および食品由来の TDH 産生株について PFGE 法を用いて分子疫学的解析を行った。患者と食品由来株の PFGE パターンにおいて、11 事例中 7 事例は完全に一致、残りの 4 事例についてもほぼ一致 (1~数本異なる) しており、11 事例の食中毒事例において患者由来株と食品由来株が同一起源に由来することを明らかにした。

13) 血清型ごとの PFGE パターンの比較では、O3:K6 株と O1:K25 株の PFGE パターンは類似し、どちらも I 型に分類されたが、それ以外の血清型では O4:K8 株は II 型、O4:K11 株は III 型、O3:K29 株は IV 型、O3:K5 株は V 型と血清型毎に異なるパターンを示した。各血清型の中でさらに詳細に比較すると、O4:K11 株は患者由来株と食品由来株が同一パターンを示したが、それ以外の血清型株ではバンドの数が 1~数本異なるもの (サブタイプ: a~g) が認められることを明らかにした。

以上の様に 1989~2004 年の 16 年間における腸炎ビブリオ食中毒の発生動向の解析を行ったところ、原因菌の血清型が年々変化していることが明らかになった。また、1996 年以降、本菌食中毒事例数が著しく増加

した原因は明確ではないが、1995年に血清型 O3:K6 が突然出現し、その後本血清型が急増したことによるものであることを明らかにした。そして、それ以降も O3:K6 菌が大半を占める傾向が認められ、2005年に至っても続いていることを明らかにした。さらに1998年以降には新しい血清型 O4:K68 菌による食中毒が発生したことを明らかにした。次に、分子生物学的手法を応用した腸炎ビブリオ検査法を開発し、これまで検出できないと考えられていた食品からの TDH 産生菌の分離に成功し、TDH 産生菌の食品汚染状況を明らかにした。さらに PFGE 法を用いた解析により、11 事例の食中毒事例において患者由来株と食品由来株が同一起源であることを明らかにした。

Epidemiological study of *Vibrio parahaemolyticus* food-borne outbreaks using molecular biological methods

Vibrio parahaemolyticus is a hemophilic bacterium occurs in estuarine waters through the world and is easily isolated from coastal waters and various fish and shellfish. *V. parahaemolyticus* is a common food-borne disease bacterium in Japan where we often eat raw fish and shellfish. Food-borne outbreaks of *V. parahaemolyticus* occur very often in Japan. In addition, the number of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks has increased remarkably since 1996 when the situation of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks in Tokyo was demonstrated.

The producibility of thermostable direct hemolysin (TDH) or TDH-related hemolysin (TRH) is the most important pathogenic factor in *V. parahaemolyticus*. In particular, it must be emphasized that TDH(+) strains of *V. parahaemolyticus* are of prime importance in human disease. By contrast, TDH(+) strains constitute a very small percentage (typically <1%) of isolates found in aquatic environments and seafood. It was not clear after the 1970's when TDH was discovered as the most important pathogenic factor in human disease why the TDH(+) strain was not isolated from aquatic environments and seafood as well as patients.

Recently, the PCR (polymerase chain reaction) method, a gene amplification method, and PFGE (pulsed field gel electrophoresis) have been applied in molecular epidemiology.

In this study, the occurrence and cause of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks in Tokyo were analyzed epidemiologically and bacteriologically to clarify the cause of increased outbreaks, the

isolation method of TDH(+) strains from foods was studied, and the following results were obtained.

1) There were 872 food-borne outbreaks due to *V. parahaemolyticus* in Tokyo between 1989 and 2004. The number of outbreaks per year was 55 in 1989, 75 in 1990, with a gradual decrease to 24 outbreaks in 1993, which was the lowest number during these 16 years. Subsequently, an increasing tendency is shown, and the number of outbreaks increased dramatically year by year until 1998 (107 outbreaks). They then decreased to 33 in 2001, 49 in 2002, 29 in 2003, and 51 in 2004. Increasing and decreasing trends were shown year after year.

2) The monthly incidence of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks peaked in August (393 outbreaks, 45.1%). Moreover, it accounted for 89% of all outbreaks during the 3 months from July to September. In addition, 99% of outbreaks occurred during the 5 months from June to October. However, these were 6 outbreaks in this investigation in the winter season between January and February when *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks are not usually reported.

A correlation was almost confirmed before 1994 between the number of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks from July-September and environmental temperature; however, there were no such correlation depending on a remarkable increase in the number of outbreaks due to serotype O3:K6 after 1995.

3) As a result of investigating 216 outbreaks between 1989 and 1998, the vehicle food was mixed dishes (25%), sushi (17%), raw fish (sashimi, 8%), cooked fish (5%). The mixed dishes which included

raw fish, sushi and so on, were eaten at restaurants or sushi restaurants.

4) The risk factors of 39 food-borne outbreaks from 1995 through 1997 were cross contamination (34.8%) between food staff and cooking utensils, failure to control the temperature of food (28.8%), keeping food at room temperature for a long time (18.2%), contaminations of food staff (10.6%). More than 2 types of failure of those risk factors were described in many outbreaks. This suggested that the most important risk factors were not only the contamination of food staff but also cross contamination and failure to control the temperature of food.

5) The most prevalent serotype of *V. parahaemolyticus* also changed from 1989 through 2005. The most prevalent was O4:K4 in 1989, O4:K8 during 1990 and 1991, O1:K56 in 1992, and O4:K8 from 1993 through 1995. Serotype O3:K6 became the most prevalent in 1996, and this trend has continued. In 2000, 57 (87.7%) of 65 outbreaks were due to serotype O3:K6 and this continued until 2005, when half of all causal organisms in food-borne outbreaks were serotype O3:K6. Thus, the trends of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks during the 12 years to 2005 in Tokyo showed various characteristics and dramatic changes in causal organisms.

6) In addition, it was clarified that a new serotype, O4:K68 was also a causal organisms in 1998.

7) A new effective method for isolating TDH(+) *V. parahaemolyticus* from food samples was developed, involving of several steps. The first was screening using PCR to detect the *tdh* gene. The 2nd step was the isolation of *V. parahaemolyticus* using 2 kinds of isolation agar plates such as enzymatic chromogenic substrate media (CHROMagar

Vibrio, OXOID) and traditional media (TCBS). The 3rd step was to detect *V. parahaemolyticus* using the new detection method, 'the stroke-stripping method'.

8) *V. parahaemolyticus* was isolated from food samples related to 67 of 227 *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks in the 5 years from 2000 to 2004, in Tokyo. In these outbreaks, TDH(+) strains were also isolated using our newly developed method.

As a result, TDH(+) strains of the same serotype as patients were isolated from 23 food samples related to 11 outbreaks (16.4%). The foods from which TDH(+) strains were isolated were fresh seafood such as shellfish (Aoyagi, clams), sushi, and cooked foods such as boiled vegetables, boiled carrots and the boiled bean sprouts (Namuru), omelet, etc. The cooked foods were suspected to have been cross-contaminated with *V. parahaemolyticus*.

9) The isolation rate of the TDH(+) strain from the enrichment broth cultures differed with samples. In 12 food samples, TDH(+) strains were isolated easily by examining less than 10 colonies. The examination of 11-100 colonies was needed to isolate the TDH(+) strain in 6 samples, and 101-200 colonies in 5 samples. No correlation was seen between the number of *V. parahaemolyticus* and the isolation rate of TDH(+) strains in food samples.

10) In several samples, TDH(+) strains were isolated easily by examining only 3 colonies, but no TDH(+) strains were isolated in spite of the examination of 250 colonies. As many as 16 foods were *tdh(+)*-positive in the PCR screening test although the TDH(+) strain could not be isolated in spite of examining 250 colonies. In those cases, various reasons were considered, (1) after boiling to prepare the template for PCR, the organisms had already died and only the

DNA gene remained, (2) organisms were VNC (viable but not culturable), (3) more than 250 colonies should be examined.

11) The serotypes of *V. parahaemolyticus* isolated from food samples related to 11 outbreaks were O3:K6 (10 samples), O3:K5 (6 samples), O1:K25 (4 samples), O3:K29 (2 samples), O4:K8 (1 sample), and O4:K11 (1 sample). The same serotypes of organisms were isolated both from food samples and patients in each food-borne outbreak. Moreover, two kinds of serotypes (O1:K25 and O4:K11) were detected in a food sample (boiled vegetable). The same serotype of TDH(+) organisms was isolated both from 6 food samples and patients in a food-borne outbreak.

12) TDH(+) strains isolated from food and patients in 11 food-borne outbreaks were also analyzed by molecular epidemiology using the PFGE method. Among 7 outbreaks, the PFGE patterns of those isolates from food and patients were not distinguishable, and in 4 outbreaks, only a few bands were different, but were very similar. These results showed that those TDH(+) organisms from patients and food had the same origin in each food-borne outbreak.

13) When PFGE patterns of each serotype were compared, both PFGE patterns of O3:K6 and O1:K25 were similar, and were classified into type I, O4:K8 were type II, O4:K11 were type III, O3:K29 were type IV, O3:K5 were type V. Some subtypes (a-g) were also observed.

In conclusion, when the generation trend of *V. parahaemolyticus* food-borne outbreaks in Tokyo from 1989 through 2004 was analyzed, it was clarified that the serotypes of the causal organisms changed every year.

Moreover, the remarkably increased number of *V. parahaemolyticus*

outbreaks after 1996 was clarified by the sudden appearance of serotype O3:K6 in 1995, the subsequent rapid increase of this serotype, and its persistence, with its tendency to dominate continuing until 2005. In addition, many food-borne outbreaks after 1998 were confirmed as a new serotype, O4:K68.

Next, a new method to isolate *V. parahaemolyticus* from food samples using a molecular biology technique was developed, and succeeded in isolating TDH(+) strains from food that had been thought very difficult up to now. Using this method, the food contamination situation of TDH(+) organisms was clarified. In addition, it was clarified that the patient organism and the food organism had the same origin in 11 food-borne outbreaks by analysis using the PFGE method.

謝 辞

本研究を行うにあたり、御懇篤な御指導、御高配を賜りました麻布大学大学院環境保健学研究科 福山正文教授に深甚なる謝意を表します。また、御懇切な御高閲を賜りました松田基夫教授および山本静雄教授に深謝致します。さらに御懇切な御教示を賜りました古畑勝則助教授に深謝致します。

また、本研究に貴重な御指導と御助言を賜りました東京都健康安全研究センター微生物部 諸角 聖博士（現 財団法人 東京都予防医学協会）、山田澄夫博士、甲斐明美博士、矢野一好博士ならびに関係各位に深甚なる謝意を表します。