

東北地方で発生した腸炎ビブリオ O3:K6 の PFGE 解析

Pulse-Field Gel Electrophoresis Analysis of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Strains Isolated from Tohoku region of Japan.

有田 富和 宮崎 麻由 高橋 恵美
後藤 郁男 加藤 浩之 那須 務
小林 妙子 渡邊 節 沖村 容子
谷津 壽郎 御代田 恭子

Tomikazu ARITA, Mayu MIYAZAKI, Emi TAKAHASHI
Ikuo GOTO, Hiroyuki KATO, Tsutomu NASU
Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE, Yoko OKIMURA
Juro YATSU, Yasuko MIYOTA

2006年度から2008年度までの3年間に東北地方で分離された腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)血清型 O3:K6 株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法等による解析を実施した。その結果合計9種類のパターンが得られたが各パターンは類似しており、地域的な偏りなどは確認されなかった。シーケンス解析などの結果、これらの株は全てパンデミック株であった。また、血清型不明株1株について同様に解析をおこなったところ、この株もパンデミック株であることが確認された。この株の血清型を再確認したところ、O1:K36型であった。PFGEの代替法としてランダム増幅多型DNA(RAPD)法を検討したが、良好な結果は得られなかった。

キーワード: 腸炎ビブリオ; パルスフィールドゲル電気泳動; 血清型; O3:K6; O1:K36; RAPD

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; PFGE; serotype; O3:K6; O1:K36; RAPD

1 はじめに

1996年以降に発生した腸炎ビブリオ食中毒は、腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)血清型 O3:K6 によるものが多くを占めるようになった。これらの株は遺伝的に極めて類似しており、単一菌に由来するクローンと考えられ、また遺伝子レベルで他の血清型の株(1995年以前に分離された O3:K6 株を含む)とは明確に異なっていた。この株はその後欧米を含む全世界に拡散し、パンデミック株と呼ばれ、公衆衛生上大きな問題となっている。今回東北地方における腸炎ビブリオパンデミック株の浸淫状況を網羅的に解析するため、東北各県で分離された O3:K6 株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による解析を実施し、さらに、一部の株については毒素遺伝子領域の塩基配列による型別を試みたので報告する。また、簡便な DNA タイピング手法であるランダム増幅多型 DNA (RAPD)法の導入についても検討したのであわせて報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象

2006年度から2008年度にかけて当センターを含む東北地方の各衛生研究所及び宮城県医師会健康センターで分離された O3:K6 計 70 株及び比較対照として血清型の

異なる株 2 株と血清型不明株 1 株を用いた。

2.2 方法

2.2.1 PFGE 法

PFGE 法は定法に従い実施した。泳動は CHEF MAPPER (BioRad) でおこない、FingerprintingII (BioRad) で解析した。制限酵素は *NotI* 及び *SfiI* を用いた。

2.2.2 Group Specific-PCR 及び毒素遺伝子の PCR

パンデミック株を特異的に検出する Group Specific-PCR (GS-PCR) 法、及び毒素遺伝子領域の増幅のための PCR に用いた鋳型 DNA の調整は、Isoplant (日本ジーン) を使用した。パンデミック株特異的 GS-PCR 及び毒素遺伝子 (*toxRS*) 領域の PCR は Matsumoto らの方法¹⁾を用いた。それぞれの PCR 反応には GS-VP.1 (5'-TAATGAGGTAGAACA-3') 及び GS-VP.2 (5'-ACGTAACGGGCCTACA-3') のプライマーセット並びに *toxRS.1* (5'-TATCTCCCATGCGCAAACGTA-3') 及び *toxRS.2* (ACAGTACCGTAGAACCGTGAT-3') のプライマーセットを用いた。

2.2.3 塩基配列解析

toxRS 領域の PCR 産物を ABI310 でダイレクトシーケンスを実施して塩基配列を決定した。シーケンス反応は *toxRS* 領域の増幅に用いたプライマーを使用した。BioLine ソフトウェアで Genbank の配列データと比較した。

2.2.4 血清型別

血清型別は血清型別用免疫血清（デンカ生研）を用いて実施した。

2.2.5 RAPD 法による解析

RAPD 法による解析には、AKopyanz らのプライマー²⁾10 種 (1247 5'-AAGAGCCCGT-3' 1254

5'-CCGCAGCCAA-3'1281

5'-AACGCGCAAC-3'1283

5'-GCGATCCCA-3'1290

5'-GTGGATGCGA-3'D14307

5'-GGTTGGGTGAGAATTGCACG-3'D11344

5'-AGTGAATTCGCGGTGAGATGCCA-3'D8635

5'-GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC-3'D9355

5'-CCGATCCGTGATGCGGTGCG-3'D14126

5'-NNNAACAGCTATGACCATG-3') 及び Bilung らのプライマー³⁾3 種 (Gen15003

5'-CTTGAGTGGA-3'Gen15004

5'-TCCTCAAGAC-3'Gen15008

5'-GAGATGACGA-3') を用いた。反応は各文献の条件で実施した。

3 結果及び考察

PFGE の結果, 各菌株は特徴的なバンドの有無から A, B2 つのグループに大別された (図 1)。

全ての菌株は 9 種類のパターンに帰属されたが (図 2), 多くのバンドがほぼ全ての株で共通であり, 全体として相互に極めて類似していることから, 全ての株がパンデ

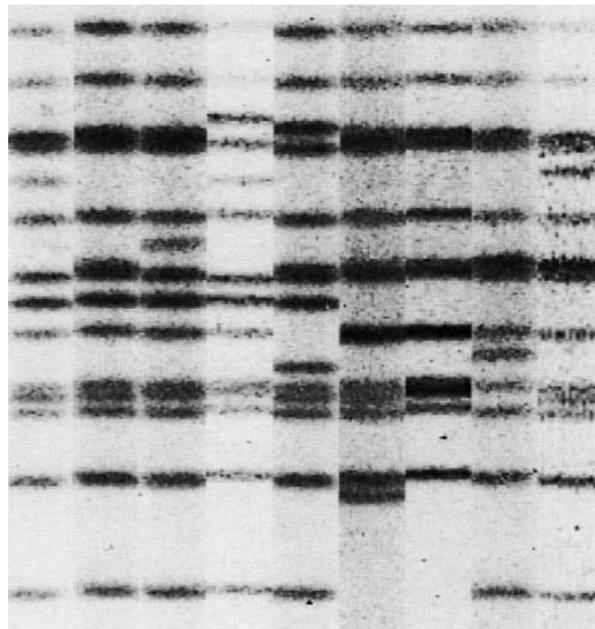


図 2 検出された 9 種の PFGE パターン

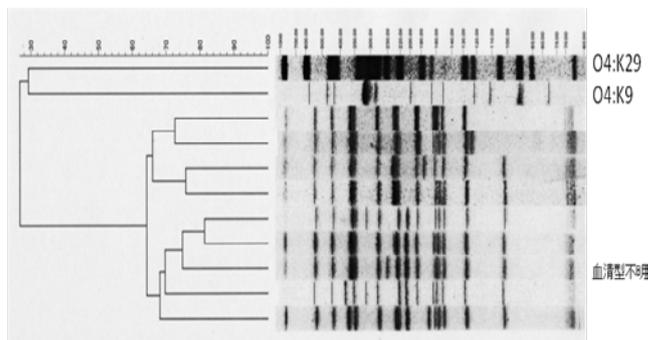


図 3 代表的パターンによる系統樹

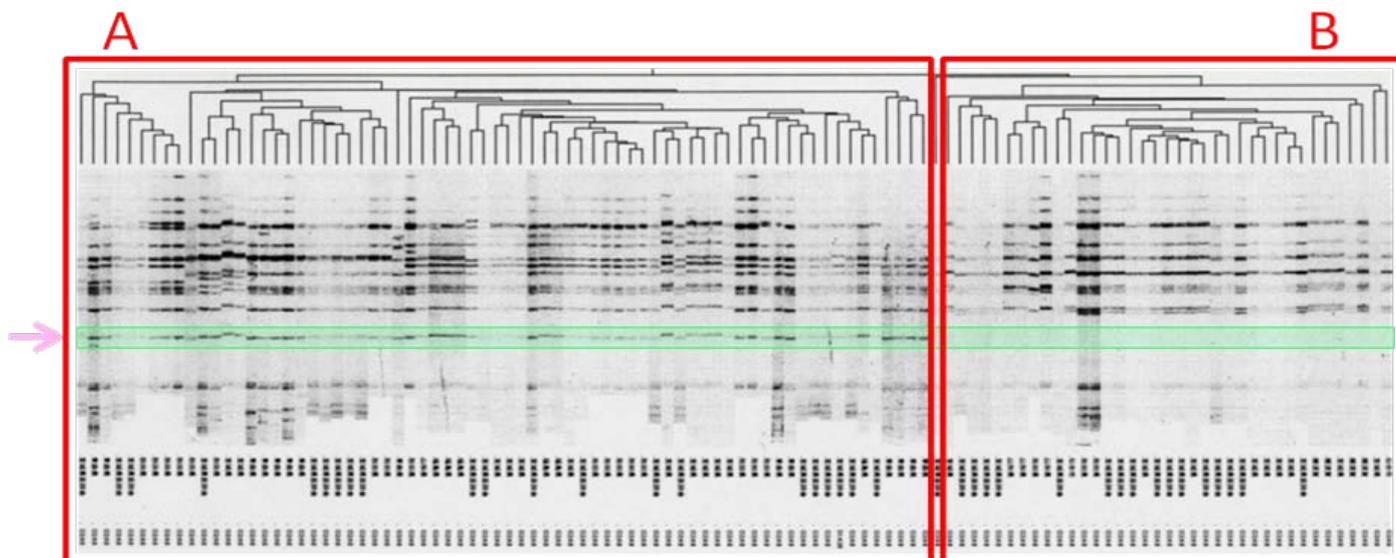


図 1 NotI 処理による PFGE パターン

ミック株であると考えられた。

興味深いことに、比較対照として用いた株のうち血清型不明の株1株もパンデミック株のパターンを示し、この株もパンデミック株である可能性が示唆された(図3)。

これらの株がパンデミック株そのものであることを確認するため、一部の株についてパンデミック株特異的検出法であるGS-PCRを実施した(図4)。その結果、全てのO3:K6株及び血清型不明株(図4赤字)でパンデミック株特有の増幅産物が得られた。

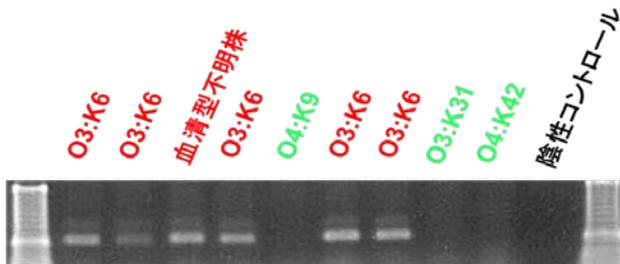


図4 GS-PCR法の結果

さらに、これらの株の毒素遺伝子 *toxRS* 領域の塩基配列を決定してパンデミック株及び非パンデミック株の塩基配列データと比較解析した結果、全てパンデミッククローンに共通の遺伝子変異をもっており、これらの株がパンデミッククローンであることが確認された(図5)。

	1196	1214	1244
旧型株	GATACCGTAGG	CGTCGAGTGAA	TACCTGCCGAA
パンデミック	GATAC <u>T</u> GTAGG	CGTCG <u>T</u> GTGAA	TACCT <u>A</u> CCGAA
O3:K6	GATAC <u>T</u> GTAGG	CGTCG <u>T</u> GTGAA	TACCT <u>A</u> CCGAA
O3:K6	GATAC <u>T</u> GTAGG	CGTCG <u>T</u> GTGAA	TACCT <u>A</u> CCGAA
O3:K6	GATAC <u>T</u> GTAGG	CGTCG <u>T</u> GTGAA	TACCT <u>A</u> CCGAA
血清型不明	GATAC <u>T</u> GTAGG	CGTCG <u>T</u> GTGAA	TACCT <u>A</u> CCGAA

図5 遺伝子配列解析の結果

なお、各菌株のPFGEパターンに地域的・時間的な偏りは認められず、出現から十数年経過した現在でも遺伝的類似度が依然として高く、PFGE法でパンデミック株同士の比較をおこなうことは現時点では困難であると考えられた。

興味深いことに比較対象として解析に加えた血清型不明の腸炎ビブリオ株もPFGEパターン及び塩基配列からパンデミッククローンであることが判明した。この株

について改めて複数回の血清型別試験を実施して再確認したところ血清型O1:K36であることが判明した。

近年ではパンデミッククローンの内部から血清型が変異した株(O1:KUT, O4K68, O1:K25など)が派生してきており、この株もそうした中で出現したものと考えられる。

また、非パンデミック型の腸炎ビブリオにおいてもパンデミック株の毒素遺伝子を取り込んだ「新たなパンデミック候補株」が出現し始めており、今後は多様な血清型・PFGEパターンの腸炎ビブリオ食中毒が出現して来ることが予想される。このような事態に対処するため、腸炎ビブリオのPFGE法によるデータの蓄積がますます重要になるものと考えられた。

PFGE法の最大の欠点は、検査に時間がかかることである。そこで、迅速なDNAタイピング手法であるRAPD法の導入を試みた。その結果、残念ながら解像度の点でPFGE法には及ばず、また、クラスター解析の結果もPFGE法とは必ずしも一致しなかった。そのため、RAPD法を腸炎ビブリオの標準的な解析手法として使用するには、特に解像度の向上についてさらに多くの検体を用いた検討が必要であると思われた。

4 まとめ

東北地方で発生した腸炎ビブリオO3:K6株のPFGE等による解析を実施した。その結果、それらは全てパンデミック株であり、PFGEパターンは相互に類似していたものの、9種類に分類することが可能であった。また、パンデミッククローンでありながら血清型がO1:K36に変異した株を新たに見いだした。これらのことから、今後は、徐々にパンデミッククローンの遺伝的多様性が拡大するとともに、非O3:K6型のパンデミッククローンの出現が増加すると考えられた。

5 参考文献

- 1) Matsumoto C., Okuda J., Ishibashi M., Iwanaga M., Garg P., Rammamurthy T., Wong H-C., Depaola A., Kim Y.B., Albert M.J., Nishibuchi M., J. Clin. Microbiol., **38**:578-585(2000)
- 2) Akopyanz N., Bukanov O.N., Westblom T.U., Kresovich S., Berg D.E., **20**, 5137-5142(1992)
- 3) Bilung L.M., Radu S., Bahaman A.R., Rahim R.A., Napis S., Kqueen C.Y., Murugaiah C., Hadi Y.A., Robin T., Nishibuchi M., *Anadara granosa*, American J. Immunol., **1**, 31-36(2005)