

Vibrio Mimicusの耐熱性溶血毒素 (Vm-rTDH) 産生性と病原性との関連について

内村眞佐子, 小岩井健司, 鶴岡 佳久

Relationship Between Thermostable Direct Hemolysin-Like Toxin (Vm-rTDH) Production and Pathogenicity of *Vibrio mimicus*

Masako UCHIMURA, Keuji KOIWAI, and Yoshihisa TSURUOKA

Summary

A total of 17 isolates of *Vibrio mimicus* from patients, 29 from environment and 2 from food was examined for toxigenicity. Sixteen strains (94%) of clinical isolates and 1 strain (50%) from food produced Vm-rTDH, whereas any of the environmental isolates did not. These Vm-rTDH produced strains possessed Vm-rTDH gene. A food from which *V. mimicus* with Vm-rTDH production was isolated, was the one causing food poisoning. Only one environmental strain produced CT-like toxin, and ST-like toxin was not detected from any strains used.

はじめに

*Vibrio mimicus*は、1981年にDavisら¹⁾によって新たに発見された菌で、広く海水、河口付近の環境及び魚介類に分布している^{2,3)}。本菌はヒト下痢症の原因菌で、その症状は嘔吐や腹痛を伴い、血便を呈する例も見られる⁴⁾。*V. mimicus*による下痢症は、魚介類の喫食と関連が深い⁴⁾。

これまでに本菌の一部株は、コレラ毒素と類似の易熱性腸管毒素 (CT-like toxin)⁵⁾及び大腸菌耐熱性毒素に類似した耐熱性毒素 (Vm-ST)⁶⁾を産生することが知られている。これらの腸管毒素産生性は、菌の小腸上皮細胞への粘着性^{7,8)}と共に、*V. mimicus*による下痢症発現に関連すると考えられる。しかし、CT-like toxinやVm-ST産生株の検出頻度が、臨床分離株及び環境由来株共に10%以下であること^{1,9)}から、これらの毒素産生性とは別の病原因子の存在が推定されている。

最近、*V. mimicus*が腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒 (TDH) と類似した性状の溶血毒 (Vm-rTDH) を産生し¹⁰⁾、Vm-rTDH産生に関与する遺伝子は、腸炎ビブリオTDH遺伝子と共通性を持つこと¹¹⁾が明らかにされた。著者らは、*V. mimicus*の病原性に関与する因子を明らかにするために、下痢患者、食品、生鮮魚介類および海水由来株の腸管毒素産生能を調べると共に、PCR法を用いて毒素遺伝子の有無について臨床と環境由来株の比較を行ったので報告する。

3. 材料と方法

3.1 菌株及び培地

使用した*V. mimicus* 48株の内訳をTable 1に示す。下痢患者由来17株の内訳は、国内で発生した集団食中毒事例のうち4事例由来4株、海外旅行者下痢症患者由来8株、国内の散发患者由

来3株、タイ国の散发患者由来2株である。食品由来株の内訳は、*V. mimicus*による食中毒の原因食品由来株1株および市販ゆでガニ由来株1株である。環境由来29株の内訳は、国内の河川水由来2株、タイ国海水由来13株、国内の生鮮魚介類由来5株およびタイ国の生鮮魚介類由来9株である。毒素検出用の検体は、菌を0.5%NaCl加BHI Broth¹²⁾ (Difco社) 中で37℃20時間振盪培養し、3000回転で30分間遠心後上清を濾過 (ポアサイズ0.22μ) して調整した。

Table 1 Bacterial strains

Strain origin	No. tested	Origin(No. of strains)
Environment		
Water	15	Chiba (2)
		Thailand (13)
Marine fish	14	Toyama (5)
		Thailand (9)
Purchased sea food	2	Causative food of food poisoning (1)
		Crab (1)
Human diarrhea	17	Food poisoning case (4)
		Imported case (8)
		Sporadic case (5)

3.2 毒素活性測定

ST-like toxinの測定は、3-5日齢のマウスを用いた乳飲マウス胃内接種法¹³⁾で行った。CT-like toxinの測定は、抗CT-IgGを感作したポリスチレンビーズを用いたELISA法¹⁴⁾ (BTテスト「ニッスイ」CT), 日本製薬株式会社)で行った。Vm-rTDHの測定は、抗TDH-IgGを感作したポリスチレンビーズを用いたELISA法¹⁵⁾ (BTテスト「ニッスイ」TDH), 日本製薬株式会社) および抗TDH-IgGを感作したラテックス粒子を用いた逆受身ラテックス凝集法 (KAP-RPLA「生研」, デンカ生研株式会社) でおこなった。Vm-rTDHの耐熱試験性は、培養濾液を100℃15分加熱後行った。

3. 4 PCR反応

培養液の3 µlを100℃で5分間加熱し、試料とした。プライマーは、腸炎ビブリオTDH遺伝子検出用プライマー¹⁶⁾を用いた。PCR反応条件は、変性94℃、1分、アニーリング55℃、1分、伸長72℃、1分を1サイクルとし、35回増幅した。PCR産物を1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロミド染色により観察した。CT遺伝子検出は、市販プライマー(和光純薬株式会社)を用い常法に従って行った。

4. 結果

4. 1 V. mimicusの毒素産生性

ヒト下痢症、魚介食品及び環境から分離した*V. mimicus* 48株の培養上清を用いて、CT-like toxin, ST-like toxin Vm-rTDH産生性を調べた。結果をTable 2に示す。Vm-rTDH産生は、ヒト下痢症由来17株中16株(94.1%)に、また魚介食品由来2株中1株(50%)に認められた。Vm-rTDH産生

を示した株が分離された魚介食品は、*V. mimicus*による集団食中毒事例の原因食品であった。環境由来株では、水由来株、魚由来株のどちらにもVm-rTDH産生株は認められなかった。CT-like toxin産生株は、魚由来の1株のみに認められた。ST-like toxinの産生は、試験を行ったどの株にも認められなかった。Vm-rTDHは、100℃15分の加熱でも失活しなかった。

4. 2 PCR法による毒素産生遺伝子の確認

ヒト下痢症由来*V. mimicus*の多くがVm-rTDHを産生することが明らかになったので、次に腸炎ビブリオのTDH産生に關与する遺伝子を認識するプライマーを用いて、PCR法で*V. mimicus*株でのVm-rTDH産生遺伝子の有無を検討した。Fig. 1にPCR産物のアガロース電気泳動像を示す。Vm-rTDH産生が認められた散発患者由来株(Lane d), 海外旅行者由来株(Lane e), 食中毒患者由来株(Lane f), 及び食中毒原因魚介食品由来株(Lane g)は、いずれもヒト下痢症由来TDH産生性腸炎ビブリオ株(Lane b)と同じ251bpのDNAバンドが認められたが、Vm-rTDH非産生性魚由来株(Lane h)では、

Table 2 Toxin production of various *V. mimicus* strains

Strain origin	No. tested	No. (%) of strains found positive :			
		Vm-rTDH	CT-like toxin	ST-like toxin	Cytotoxin (Vero-cell)
Human diarrhea	17	16 (94.1)	0	0	14 (82.3)
Sea food	2	1 (50)	0	0	1 (50)
Environmental					
Water	15	0	0	0	12 (80)
Marine fish	14	0	1 (7.1)		12 (85.7)

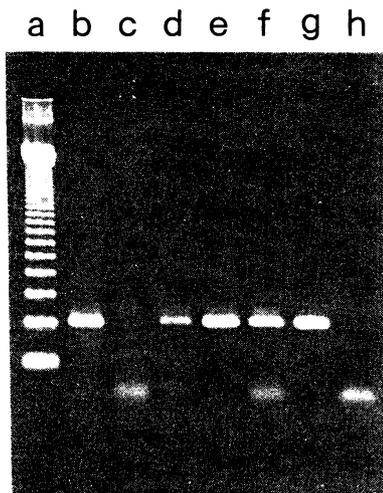


Fig. 1 Electrophoretic analysis of PCR amplified DNA from *V. mimicus* strains.

Lane a, 123-bp ladder (Bethesda Research Laboratories, Ins., Gaithersburg, Md.); lane b, TDH positive *V. parahaemolyticus*; lane c, TDH negative *V. parahaemolyticus*; lanes d, e, f and g, Vm-rTDH positive *V. mimicus* isolated from a patient of sporadic case, an overseas traveler, a patient of food poisoning and a food causing food poisoning, respectively; lane g, *V. mimicus* negative for Vm-rTDH.

TDH非産生性腸炎ビブリオ(Lane c)と同様DNAバンドは認められなかった。試験を行った48株についてのVm-rTDH遺伝子の有無をTable 3にまとめた。Vm-rTDH産生性を示した17株で251 bpのDNAバンドが認められ、反対にVm-rTDH非産生株のすべての株でDNAバンドは増幅されなかった。

同様にCT-like toxin産生株では、CT遺伝子が認められたが、CT-like toxin非産生株ではCT遺伝子は認められなかった。

4. 3 V. mimicusの血清型とVm-rTDH産生性

Table 4に、*V. mimicus* 26株のO血清型を株の由来別に示す。ヒト下痢症由来でVm-rTDHを産生する16株のうち、14株(87.5%)が041に型別された。020および034に型別された株はいずれも海外旅行者由来株である。ヒト由来でVm-rTDH非産生の1株は、海外旅行者由来株で041に型別された。食品由来株のうち、Vm-rTDHを産生し041に型別された株は、同じ血清型のVm-rTDH産生*V. mimicus*による集団食中毒事件の原因食品由来である。環境由来株8株はいずれもVm-rTDH陰性株であり、041を含む5種類の血清型に型別された。0116に型別された株は、CT-like toxinを産生した。

4. 4 Vm-rTDHの測定法の比較

Vm-rTDH産生性の有無は、ELISA法を用いて測定したが、より簡便な測定法であるRPLA法で測定を試みたとき、Vm-rTDH遺伝子を保有しない2株が1~8倍の凝集価を示した。そこで、ELISA法とRPLA法による毒素産生量測定結

Table 3 Detection of toxin genes by PCR

Toxin production	No. tested	No. of strains found positive :	
		TDH-gene	CT-gene
Vm-rTDH			
+	17	17	
-	31	0	
CT-like toxin			
+	1		1
-	47		0

Table 4 O antigen typing and TDH production in *V.mimicus*

Strain origin and toxin production	No. of strains	No. of strains with O antigen type :							
		20	34	36	38	41	115	116	UT
Human diarrhea									
TDH (+)	16	1	1			14			
(-)	1					1			
Purchased sea food									
TDH (+)	1					1			
(-)	1								1
Environment									
TDH (-)	8			2	1	2	2	1	
Total	27	1	1	2	1	18	2	1	1

果の比較を行った。Table 5にこの2株を含む*V. mimicus* 5株と腸炎ビブリオの測定値を示す。RPLA法では、ヒト由来株(Vm1, Vm130, Vm139)のVm-rTDH産生量は、それぞれ20倍、20倍、80倍で、100℃30分加熱後では、10倍以下、10倍、80倍であった。環境由来株(Vm5, Vm6)では、それぞれ1倍、8倍であった。一方、ELISA法では、ヒト由来株の450nmにおける吸収度が約2.00を示し、環境由来株は0.01以下であった。

Table 5 Comparison of Vm-rTDH activity of *V.mimicus*

Strain No.	RPLA titer(*) (1:)	ELISA(*) (O.D.450)	TDH gene
Vm 1	20-40(<10)	1.998(1.868)	+
Vm 130	20(10)	2.019(ND)	+
Vm 139	80(80)	1.817(ND)	+
Vm 5	1(ND)	0.003(ND)	-
Vm 6	8(ND)	0.008(ND)	-
Vp 78-2	160(80)	3.289(2.851)	+

(*) : heatig at 100℃ for 10 min

5. 考 察

腸炎ビブリオには下痢起因菌と非病原菌があり、下痢起因菌はTDH産生によって引き起こされる、いわゆる神奈川現象で特徴づけられる^{17,18)}。*V. mimicus*の下痢原因因子については、これまでCT-like toxin, ST-like toxin産生について検討されていたが、ヒト由来株、環境由来株のいずれにおいてもこれらの毒素を産生する株は10%以下であることから、他にもより重要な病原因子が関与しているであろうと考えられていた^{9,19)}。本報で著者らは、ヒト下痢症由来*V. mimicus*の多くはVm-rTDHを産生するが、環境由来株ではVm-rTDH産生株がみられないことを

明らかにした。この結果は、*V. mimicus*にも腸炎ビブリオと同様病原株と非病原株があり、Vm-rTDHは*V. mimicus*の重要な病原因子であることを示すものである。Vm-rTDH産生菌の血清型は、041が大部分を占めた。しかし今回調査を行った限り、環境由来株では041に型別された株でもVm-rTDH非産生性を示すことから、分離菌の病原性を知るためには毒素産生性等の病原因子検索が必須である。

Vm-rTDHは、腸炎ビブリオTDHと同様の赤血球溶血活性を示し、免疫学的性状が腸炎ビブリオTDHと類似している¹⁰⁾。また、Vm-rTDHをコードする遺伝子はTDHをコードする遺伝子と部分的に一致する¹¹⁾。今回、TDH遺伝子を検出する目的で開発されたPCR法用のDNAプライマーは、Vm-rTDH遺伝子の検出にも有用であることが、多くの株で示された。また、Vm-rTDHの検査法には、現在TDH検出用に市販されているKAP-RPLA「生研」(デンカ生研株式会社)及びBTテスト「ニッスイ」TDH(日本製薬株式会社)を用いることができる。この2法にはそれぞれ特徴がある。つまり、RPLA法は手軽に行えるが検出感度が1~2ng/mlで、今回測定を行ったVm-rTDH陰性株のうち2株(7%)で非特異的反応がみられた。一方ELISA法は、操作が複雑で反応時間が5時間以上必要であるが検出感度が100pg/mlと高く、著者らが測定した限りでは非特異反応は認められなかった。*V. mimicus*は食中毒原因菌であることから、食品衛生監視のためあるいは食中毒事件に関連して、環境や食品からの本菌の分離調査が行われている。分離菌株の病原性検査は、これらの測定法の特徴を考慮に入れて行う必要がある。

謝 辞

菌株を分与していただいた富山県衛生研究所、児玉博英先生、

刑部陽宅先生, 静岡衛研環境保健センター, 塩沢寛治先生, 川崎市衛生研究所, 小川正二先生に深謝いたします。また, 菌株の血清型別をさせていただいた予防衛生研究所島田俊雄先生に深謝します。

6. 文 献

- 1) Davis, B. R., G. R. Fanning, J. M. Madden, A. G. Steigerwalt, H. B. Bradford, Jr, H. L. Smith, Jr, and D. J. Brenner (1981): Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J Clin. Microbiol. 14: 631-639
- 2) 児玉博英, 林美千代, 刑部陽宅 (1991): 海産魚介のNon-01 *Vibrio cholerae*および*Vibrio mimicus*による汚染とこれらの菌による食中毒事例に関する考察. 感染症学雑誌, 65: 193-199.
- 3) Chowdhury, M. A. R., H. Yamanaka, S. Miyoshi, K. M. S. Aziz., and S. Shinoda (1989): Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2073-2078
- 4) Shandera, W. X., J. M. Johnston, B. D. Davis, and P. A. Blake (1983): Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. Ann. Intern. Med. 99: 169-171.
- 5) Spira, W. M. and P. J. Fedorka-Cray (1984): Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin. Infect. Immun. 45: 679-684.
- 6) Arita, M., T. Honda, T. Miwatani, T. Takeda, T. Takao, and Y. Shimonishi (1991): Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. FEMS Microbiol. Lett. 79: 105-110.
- 7) Spira, W. M., P. J. Fedorka-Cray, and P. Petteborn (1983): Colonization of the rabbit small intestine by clinical and environmental isolates of non-01 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Infect. Immun. 41: 1175-1183.
- 8) Uchimura, M., and T. Yamamoto (1992): Production of hemagglutinins and pili by *Vibrio mimicus* and its adherence to human and rabbit small intestines in vitro. FEMS Microbiol. Lett. 91: 73-78.
- 9) Choudhury, M. A. R., K. M. S. Aziz, B. A. Kay, and Z. Rahim (1987): Toxin production by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. J. Clin. Microbiol., 25: 2200-2203
- 10) Honda, T., and T. miwatani (1988): Multi-toxicity of *Vibrio cholerae* non-01. In Advances in research on cholera and related diarrheas. Ohtomo N, Sack RB, eds., vol. 6. Tokyo: KTK Scientific Publishers. pp23-32
- 11) Nishibuchi, M., V. Khaeomane-iam, T. Honda, J. B. Kaper, and T. Miwatani (1990): Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-01, *V. mimicus*, and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 67: 251-256.
- 12) Nishibuchi, M., and R. J. Seidler (1983) Medium dependent production of extracellular enterotoxins by non-01 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 228-231.
- 13) Dean, A. G., Y. Ching, R. G. Williams, and L. B. Harden (1972): Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. H. Infect. Dis. 125: 407-411.
- 14) Uesaka, Y., Y. Otsuka, M. Kashida, Y. Oku, K. Horigome, G. B. Nair, S. C. Pal, S. Yamasaki, and Y. Takeda (1992): Detection of cholera toxin by a highly sensitive beads-enzyme linked immunosorbent assay. Microbiol. Immunol. 36: 43-53.
- 15) Oku, Y., Y. Uesaka, T. Hirayama, and Y. Takeda (1988): Development of a highly sensitive beads-ELISA to detect bacterial protein toxins. ELISA to detect bacterial protein toxins. Microbiol. Immunol. 32: 807-816.
- 16) Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda (1992): Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. Mol. Cell Prob. 6: 477-487.
- 17) Sakazaki, R., K. Tamura, T. Kato, Y. Obara, S. Yamai, and K. Hobo (1968): Studies of the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. Japan. J. Med. Sci. Biol. 21: 325-331.
- 18) Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa, and S. Tamai (1969): In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. J. Bacteriol. 100: 1147-1149.
- 19) 刑部陽宅, 磯部順子, 児玉博英, 佐藤茂秋, 島田俊雄 (1992) *Vibrio mimicus*の腸管起病性と腸管毒素産生性. 感染症学雑誌. 66: 115-119.