

3 調査研究

3・1 報 文

1) パルスフィールドゲル電気泳動法による *Vibrio vulnificus* の分子疫学解析

八尋 俊輔 宮坂 次郎* 原田 誠也

要 旨

熊本県内では、2001年以降 *Vibrio vulnificus* (以下、Vv) による感染症患者が毎年発生し、2007年までに25名の感染が確認されている。

本県では、Vv感染者が多発した2001年からVvの調査研究を開始し、県内の魚介類、海水、海泥、水鳥糞便等の環境調査や、Vv感染症発生時の、患者分離株の細菌学的検討と周辺環境調査を行ってきた。その結果、本県でのVvのO血清群別は、臨床株にO4A、O7が多く、環境株にはO1、O6が多いことなどが明らかとなった。

Vv感染症の感染源や感染経路を明らかにするためにパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE)をはじめとする分子疫学解析は重要であるが、Vvの臨床株と環境株について分子疫学解析を行った報告は少ない。今回我々は、PFGEを用いてVvの分子疫学解析を行い、PFGEがVvの疫学解析に有用であることを確認したが、臨床株と環境株の泳動パターンに明確な差異を見つけることはできなかった。

キーワード: *Vibrio vulnificus*, パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

はじめに

Vibrio vulnificus (以下、Vv) は海水などに生息する *Vibrio* 属のグラム陰性桿菌で、特に汽水域に多く生息していることが知られている。Vvによる感染症は肝硬変などの基礎疾患をもったヒトに多く発症し、その感染症像には敗血症型、創傷感染型があり、ともに高い致死率を示す。わが国でのVv感染症は、誌上調査を行った大石ら¹⁾の報告によれば、1978年に松尾ら²⁾によって初めて報告されて以来、1975~2005年までの間に185例の症例報告がなされている。熊本県では、Vv感染症は2001年に報告された9例³⁾をはじめ、年間数例の発生が見られる(表1)。

本県では1981年に道家ら⁴⁾による環境中のVvの分離を最初に、Vvの臨床株の調査と環境調査を実施してきた。特に患者が多発した2001年以降は毎年調査を続けている。それにより、Vvの環境中における菌数の季節消長や、臨床株と環境株の血清群、薬剤感受性等の詳細なデータを得た^{5~9)}。Vvの病原因子については溶血毒素(VVH)、プロテアーゼ、鉄獲得機構のSiderophore、夾膜等種々の報告がある¹⁰⁾が、臨床株と環境株の差異についての報告は少なく^{11, 12)}、それらに違いがあるかどうかはわかっていないのが現状である。本県の調査により、熊本県で分離された環境株と臨床株には血清

群に偏りがあることを報告したが、明確な違いではなかった。そのため、今回はパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE)を用いた分子疫学解析により、臨床株、環境株の差異について検証した。

表1 熊本県のVv感染症発生数

| 年 | 患者数 ^{注)} |
|------|-------------------|
| 2001 | 9 |
| 2002 | 1 |
| 2003 | 3 |
| 2004 | 2 |
| 2005 | 3 |
| 2006 | 5 |
| 2007 | 2 |
| 計 | 25 |

注) 患者数は菌株が分離され医療機関から熊本県保健環境科学研究所に菌株が送付された件数

対象と方法

1 検査材料

医療機関等から分与された臨床株27株と、当所で海水や魚介類などから分離した環境株のうち臨床株に多かった血清群O4A、O7と同じ血清群のもの27株

*現熊本県食肉衛生検査所

(O4A : 14 株, O7 : 13 株) を検査材料とした (表 2)。

表 2 検査材料

| 由来 | 血清群 | 株数 |
|-----|-----|----|
| 臨床株 | O1 | 2 |
| | O3 | 1 |
| | O4A | 14 |
| | O6 | 1 |
| | O7 | 9 |
| | 小計 | 27 |
| 環境株 | O4A | 14 |
| | O7 | 13 |
| | 小計 | 27 |
| 合計 | | 54 |

2 実験方法

PFGE は当初, 国立感染症研究所が示す腸管出血性大腸菌のプロトコール¹³⁾ に準じて実施したが, 泳動像がスメアになる株や, 小さなサイズのバンドが確認できない株が多かったため, CDC の PulseNet で示している *Vibrio cholerae* のプロトコール¹⁴⁾ を改変して実施した。その方法は以下のとおりである。-80℃で 15% スキンミルクに保存されていた供試菌を 1% NaCl 加 TSA (Difco) で 18 時間培養した後, PBS (-) (日水) に McFarland 5 程度になるよう菌液を調整した。その菌液 400 μ l に 20mg/ml Proteinase K (Invitrogen) を 20 μ l 添加し, 菌液と等量の 1% Seakem Gold Agarose (Camblex) と混和してプラグを作製した。そのプラグを 2ml の Cell Lysis Buffer (50mM Tris, 50mM EDTA, pH8.0 + 1% Sarcocyl, 0.1mg/ml Proteinase K) に入れ, 50℃で 18 時間反応させた。精製水で 2 回, TE buffer で 4 回プラグを洗浄後, 制限酵素で 18 時間切断した。制限酵素は *Sfi* I, *Not* I (ともに TaKaRa) の 2 種類を用い, 酵素量は 30U とした。泳動には 1% SeaKem Gold Agarose を用い, 泳動用バッファーは 0.5 \times TBE (TaKaRa) を用いた。また, 泳動像がスメアになるのを防ぐため, 泳動用バッファーにチオ尿素 (WAKO) を最終濃度 100 μ M になるよう添加した。電気泳動は電圧 6.0V/cm, チラー温度 12.0℃, パルスタイム 4 to 8sec, 10.5 時間, 8 to 50sec, 8.5 時間で行った。得られた泳動パターンは Advanced Quantifier ver.2.1 (Bioimage) でクラスター解析した。

結果

Sfi I 処理の解析結果を図 1 に, *Not* I 処理の結果を図 2 に示す。28.8bp~1135bp の解析で *Sfi* I 処理群では 19~27 本, *Not* I 処理群では 17~24 本のバンドが確認さ

れた。供試した全ての菌株で泳動パターンが判読でき, スメアになる株はなかった。

臨床株の 1 組で同じパターンを示す株が存在した (*Sfi* I, *Not* I 処理ともに 100%一致)。これは Vv 感染症が多発した 2001 年に分離された臨床株で, 発生場所, 発生年月日も近い。この 2 事例は同じ由来をもつ Vv によって感染した可能性が示唆された。

その他, 類似度が 90% を超えたものを表 3 に示す。

環境株と臨床株で同じパターンを示す株は見つからなかった。臨床株と同時期の発生場所に近い海域や魚介類から分離した株との比較でも高い類似度を示さなかった。

一方, 環境株同士で高い類似率を示す株があった。鏡地方の環境から高い類似度を示す株が 3 組見つかった。同時期に採取された海水と魚介類の組み合わせで高い類似度があったことから, 同時期には同じクローンが海水や魚介類に多数分布している可能性が高いことが示唆された。

考察

当初実施した腸管出血性大腸菌のプロトコールで PFGE がうまくいかなかったのは, 菌株の状態や Proteinase K の効果不足が原因と考えられた。そこで, 分離株の培養条件の変更や, CDC のプロトコールへの変更を実施したところ, 安定した結果を得ることができ, 全ての株で判読可能になった。プロトコール改変前の泳動像を図 3 に, 改変後の泳動像を図 4 に示す。同様の調査を行った大仲ら¹⁵⁾ は, 解析率は *Sfi* I で 97.9%, *Not* I で 74.3% と報告している。今回我々が供試した菌株は幸運なことに泳動像がスメアを示す株はなかったが, 株数を増やすことによりスメアとなる株が出てくることが予想された。このことから Vv の PFGE は菌株差やプロトコールにより結果に影響が出ることが示唆され, 十分な検討をもとに PFGE を実施する必要があると思われた。

泳動パターンは *Sfi* I 処理群, *Not* I 処理群ともにバンド数が多く, 同じ血清群でもかなり多様性を示したことから, PFGE は Vv 感染症の感染源や感染経路等の疫学調査のツールとして有効であると思われた。Wong ら¹⁶⁾ は PFGE を用いて Vv の環境株を地域別にクラスター形成させることができるのは, *Not* I よりも *Sfi* I のほうが優れていると報告している。今回我々の調査では, 菌株を分離した地域が八代海, 有明海に限定されているため, 地域的なクラスターを形成することはなかったが, 白糖を分解する Vv2 株が, *Sfi* I 処理では他の菌とは別のクラスターに分類された。しかし, *Not* I 処理

表3 90%以上の類似度を示した菌株の組み合わせ

| 組 | 菌株名 | 血清群 | 由来 | 分離年月 | 検体由来地 | 類似度 (%) | |
|---|-------|-----|-------|---------|-------|---------|-------|
| | | | | | | Sfi I | Not I |
| 1 | C-4 | O4A | ヒト | 2001/7 | 八代郡 | 100 | 100 |
| | C-5 | O4A | ヒト | 2001/7 | 八代市 | | |
| 2 | C-B | O7 | ヒト | 1993/8 | 不明 | 93 | 90 |
| | C-D | O7 | ヒト | 1997 | 不明 | | |
| 3 | E-15 | O4A | アナジャコ | 2001/7 | 熊本市 | 92 | 77 |
| | E-199 | O4A | 海水 | 2002/7 | 熊本市 | | |
| 4 | E-120 | O4A | コチ | 2001/10 | 八代市 | 95 | 91 |
| | E-241 | O4A | 海水 | 2002/8 | 八代市 | | |
| 5 | E-241 | O4A | 海水 | 2002/8 | 八代市 | 100 | 79 |
| | E-253 | O4A | クマエビ | 2002/9 | 八代市 | | |
| 6 | E-291 | O7 | ウミニナ | 2003/6 | 八代市 | 96 | 95 |
| | E-292 | O7 | カキ | 2003/6 | 八代市 | | |

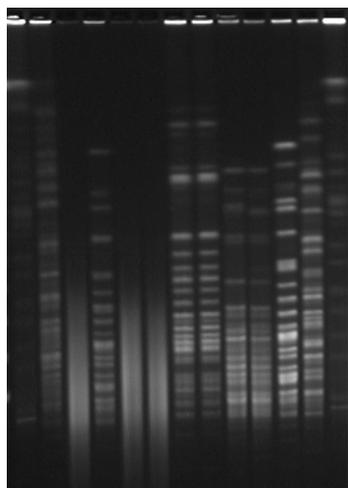


図3 変更前の泳動像

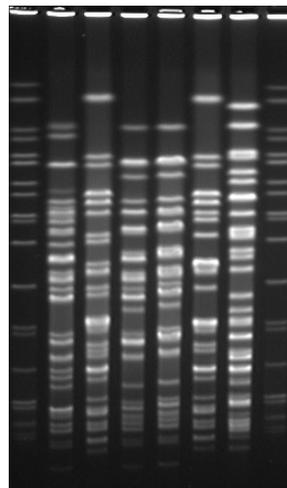


図4 変更後の泳動像

ではそのような傾向はみられなかった。また、90%以上の類似度を示す株の組み合わせは Sfi I 処理群に多く見られた。

臨床株間で同じ泳動パターンを示す株が見つかったことは非常に興味深い。この2株は発生時期、発生場所ともに近く、同じクローンによる感染と推定される。また、これらの感染が起きた同時期の環境調査で、これらと同じ泳動パターンをもつVvは分離されていないことから、このクローンがこの時期に異常に増殖されていたとは考えにくい。このことから、この菌株が、強毒株である可能性があり、他の環境株等と比較することにより、Vvの病原因子の研究に有益となると考えられる。

今回の調査では環境株と臨床株で同じパターンを示

す株は見つからなかった。以前我々は、Vv感染症の原因と思われる食材から多数のVvを分離し、その分離株と臨床株をPFGEで比較した。その原因食材には様々な血清群やPFGEパターンをもつ多種のVvが存在したが、臨床株と同一のパターンを示す株を見つけることができなかった。そのため、Vv感染症は環境や食材中に同じクローンが多数増殖したことにより発症するのではなく、海水や食材中存在する多種類のVvのうちの一つが敗血症を引き起こす可能性が高いと報告した¹⁷⁾が、今回の調査もそれを裏付ける結果となった。

臨床株、環境株のバンドパターンに特徴的な違いはなく、PFGEでの識別は難しいと思われた。現在、臨床株、環境株の差異を示す報告が増えてきているが、確実な方法は無いようである。今後も同様の調査を実施

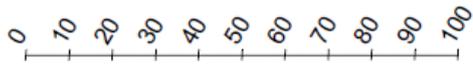
し、臨床株のデータを積み上げる必要がある。

ま と め

近年、PFGEに限らず、SBT、MLVA、AFLP等有用な分子疫学解析方法が示されている。今回、我々はPFGEを用い、V_vの分離株の分子疫学解析を実施した。その結果、感染源等の調査に、PFGEは有効であることが示されたが、臨床株と環境株の違いを見つけることはできなかった。しかし、同じクローンによる感染と思われる事例が存在したことは、強毒株が存在する可能性を示唆している。今後も臨床株のPFGEを続けてデータを集積していくことにより、強毒株の存在を示すことができる可能性があると思われた。

参 考 文 献

- 1) 大石浩隆, 浦由紀子, 三溝慎次, 中嶋幹夫: 感染症誌, 80, 680-689 (2006).
- 2) Matsuo T, Kohno S, Ikeda T, Saruwatari K, Ninomiya H: Acta. Pathol. Jpn., 28, 937-948 (1978).
- 3) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 31, 31-36(2001).
- 4) 道家直, 戸泉慧, 梅田哲也, 東逸男, 藪内栄子: 熊本県衛生公害研究所報, 11, 20 (1981).
- 5) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 32, 31-36(2002).
- 6) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 32, 42-44(2002).
- 7) 宮坂次郎, 八尋俊輔, 荒平雄二, 徳永晴樹, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 33, 51-54(2003).
- 8) 宮坂次郎, 八尋俊輔, 荒平雄二, 濱洲大輔, 甲木和子, 徳永晴樹: 熊本県保健環境科学研究所報, 34, 37-43(2004).
- 9) 八尋俊輔, 宮坂次郎, 中島龍一, 甲木孝人: 熊本県保健環境科学研究所報, 36, 38-39(2006).
- 10) Shinoda S: YAKUGAKU ZASSHI, 125, 531-547(2005).
- 11) Nilsson WB, Paranjyep RN, DePaola A, Strom MS.: J Clin Microbiol., 41, 442-446(2003).
- 12) Chatzidaki-Livanis M, Hubbard MA, Gordon K, Harwood VJ, Wright AC.: Appl. Environ. Microbiol., 72, 6136-6141(2006).
- 13) 渡辺治男: 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 平成15年度総括・分担研究報告書 (2004) .
- 14) Center for Disease Control and Prevention: PulseNet[online] <http://www.cdc.gov/pulsenet/>
- 15) 大仲賢二, 古畑勝則, 原元宣, 福山正文: 感染症誌, 81, 45-50 (2007).
- 16) Wong HC, Chen SY, Chen MY, Oliver JD, Hor LI, Tsai WC.: Appl. Environ. Microbiol., 70, 5153-5158(2004).
- 17) 宮坂次郎, 八尋俊輔, 中島龍一: 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業 細菌性食中毒の予防に関する研究 平成18年度総括・分担研究報告書, 125-129 (2007) .



由来 血清群 分離年月 菌株番号

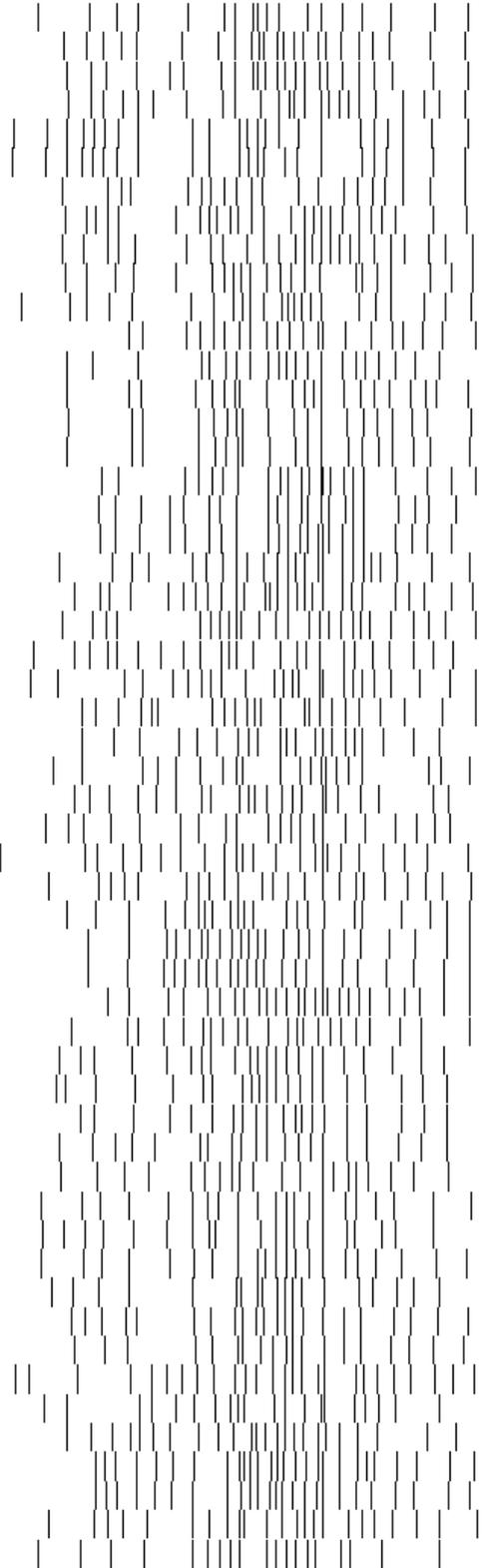
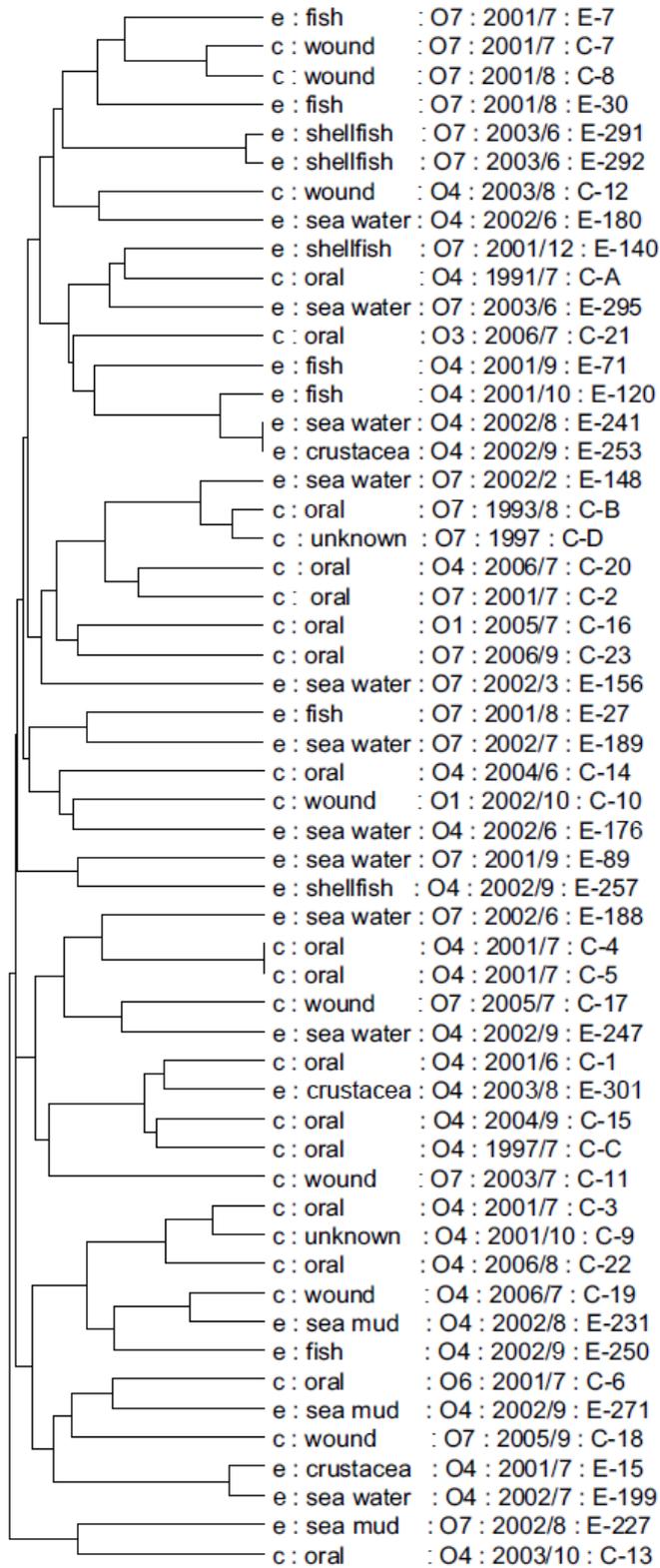
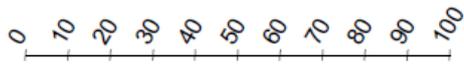


図1 Sfi I 処理群の系統樹解析



由来 血清群 分離年月 菌株番号

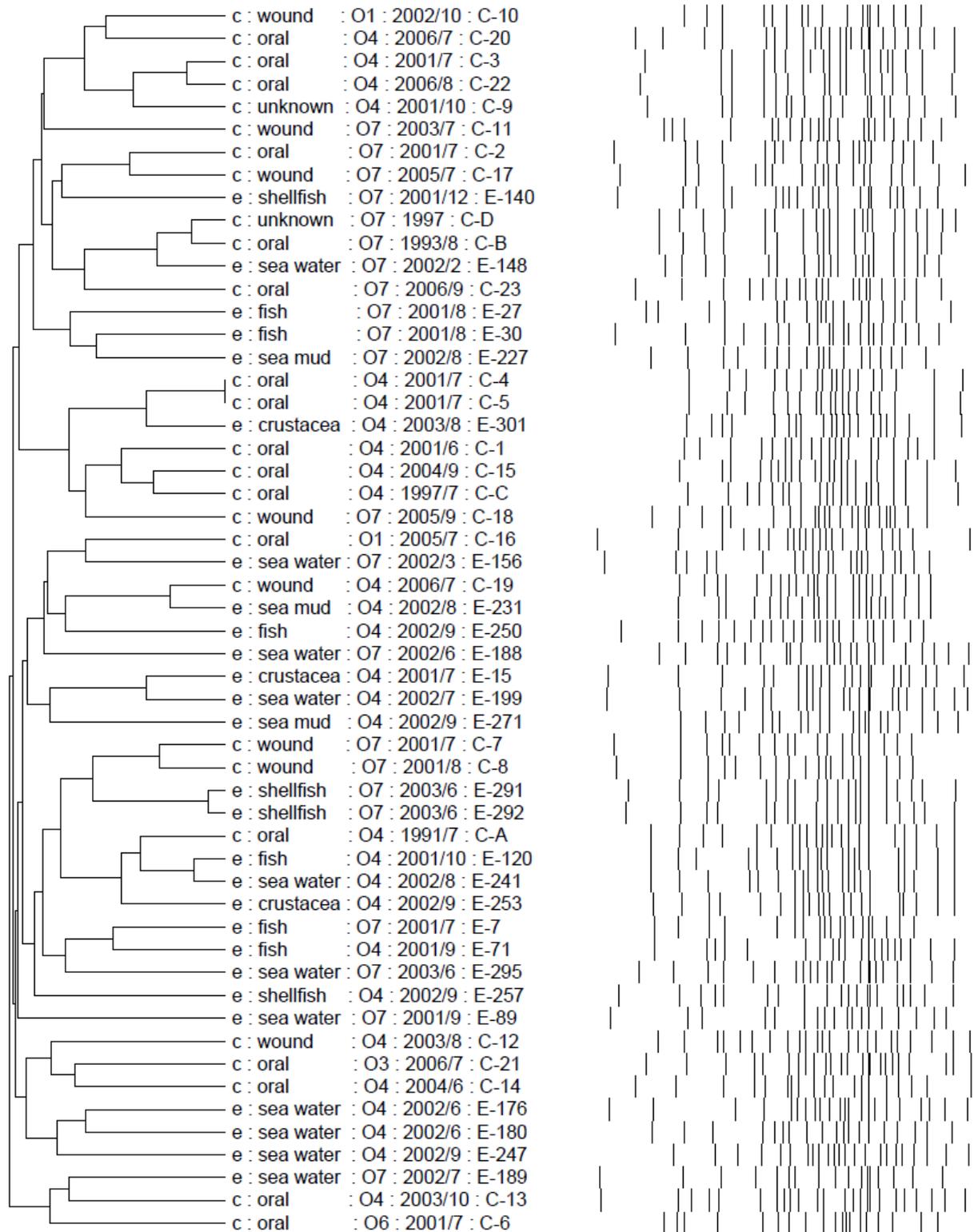


図2 Not I 処理群の系統樹解析