

氏名(本籍)	尾畑浩魅(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第11号
学位授与年月日	平成18年7月12日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 福山正文 (副査) 松田基夫 山本静雄

論文内容の要旨

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。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ヶ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当な温度保存(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年で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。

論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は、好塩性の細菌で、海水の中でも特に沿岸海域や汽水域に生息する食中毒起因菌であり、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。本菌は1950年に大阪で「シラス」を原因とする食中毒の起因菌として初めて分離された。それ以来、本菌は集団食中毒の起因菌として、毎年上位を占めている。さらに、1996年に血清型O3:K6による食中毒事例が多発し、それ以降に事例数も著しく増加している。しかし、その原因については明確にされていない。

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が大部分である。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。そこで、著者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。その概要は以下の通りである。

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おいて、腸炎ビブリオ食中毒事例が872事例認められた。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年には24事例と調査期間内では最も少なかった。それ以降増加傾向を示し、1998年に最も多く107事例であった。しかし、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を明らかにした。

2) 食中毒の月別における発生状況では、8月の発生が393件 (45.1%) と最も多かった。また、7～9月の3ヶ月間に発生した食中毒が全体の89%を占めていること、さらに6～10月の5ヶ月間では全体の99%の事例が発生していたことを明らかにした。今回の調査において、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を明らかにした。次に7～9月における東京の平均気温と本菌食中毒発生状況の比較では、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を認めているが、それ以降は、発生事例数の著しい増加から気温との相関を認め

ていない。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を明らかにした。

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を行い、会食料理が25%と最も多く、次に寿司類17%、刺身類8%、魚介類の調理品5%の順であったことを明らかにした。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事例の発生要因については、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当な温度保存(28.8%)、長時間の保存(18.2%)、原材料の汚染(10.6%)などであったことを明らかにした。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、複数の要因が重なった時に発生していることを明らかにした。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を用いて、血清型別を行ったところ、O4:K8やO3:K6などの血清型を高頻度に認めたが、数年毎に血清型の流行が異なっていることを明らかにした。その年別における菌株の中で最も多く型別された血清型は、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、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を明らかにした。

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ることを明らかにした。

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最近開発された酵素基質培地とTCBS寒天の2種類の分離培地を用い、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ところ、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検体から認めた。そ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、煮物、ナムルおよび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を明らかにした。

10) スクリーニング検査のPCR法で *tdh* 遺伝子が陽性を示した検体から、最高250集落を釣菌して検討を行ったが、TDH産生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加熱により菌は死滅したが遺伝子のみが残っていた、②菌は生存し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る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が10件、O3:K5が6件、O1:K25が4件、O3:K29が2件、O4:K8およびO4:K11が各1件で、全事例ともに患者由来株と同一血清型の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）も認められた。さらに1食中毒事例では患者由来株と同一血清型のTDH産生菌を6検体の食品から検出した。

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事例もほぼ一致（1～数本異なる）しており、11事例の食中毒事例から分離した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、いずれも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。

上述のように、著者は1989～2004年の16年間にかけて腸炎ビブリオ食中毒の発生動向の解析を行い、原因菌の血清型が年々変化していることを明らかにした。また、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を明らかにし、それ以降もO3:K6菌が大半を占め、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。

以上のように本研究は腸炎ビブリオ食中毒感染症に関する疫学的研究として、細菌学および公衆衛生学の発展に寄与するところ大であり、博士（学術）の学位授与に値するものと認める。