

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790552

研究課題名（和文） 腸炎ビブリオ病原性菌株の定量法の開発とフィールドでの魚介類検査への応用

研究課題名（英文） Development of quantitative detection method for virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus* and application for seafood in field

研究代表者

中口 義次（NAKAGUCHI YOSHITSUGU）

京都大学・東南アジア研究所・助教

研究者番号：70378967

研究成果の概要（和文）：熱帯域に属す東南アジアは世界的な魚介類の供給拠点にもなっている。魚介類の安全性を担保するためには、魚介類を汚染している腸炎ビブリオの病原性菌株を定量的に検出する系が必要である。腸炎ビブリオ汚染の魚介類検査に、TRC法を採用し、定量的な検出系の構築を実施した。構築した定量的な検出系を東南アジアのタイのフィールドで実践し、フィールド特有の問題点を明らかにし、改善点を検討した。

研究成果の概要（英文）：Southeast Asian countries supply seafood to many countries. To achieve safety of seafood, the system of quantitative detection method is needed for quantitative detection of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. TRC method was applied for risk assessment of seafood contaminated by virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. This system was practiced at the field of Thailand.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：腸炎ビブリオ、腸管感染症、下痢症、東南アジア、魚介類、食品衛生

1. 研究開始当初の背景

食品の安心・安全を考えるうえで、食中毒は重要な問題である。我が国では、衛生環境の改善に伴い、食中毒および下痢症は激減したが、発展途上国では、依然として大きな問題である。我が国で発見された腸炎ビブリオ感染症は、腸炎ビブリオの病原性菌株により汚染された魚介類を食べることにより起こる下痢症である。この感染症は、世界規模の感染症で、海に面した魚介類を食べる国々で

発生している。発展途上国での経済成長および世界的な健康意識の高まりから魚介類が注目され、世界的に魚介類の消費が伸びている。東南アジアは、その熱帯性の気候の特徴から食料生産性が高く、魚介類の生産に関しても同様である。そして、東南アジアは、世界的な食料の供給拠点ともなっており、この地域における食品の安全性は、世界的な安全性にも繋がり、重要性が高い。このような背景をふまえ、魚介類を汚染し、食中毒を引き

起こす腸炎ビブリオの病原性菌株に関しての魚介類汚染を迅速に検出することは、人々の健康を守るうえで重要なことである。そして、魚介類汚染の定量的なデータを示すことは、食品のリスクアセスメントの観点からも必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、簡便・迅速・高感度かつ一定温度で転写産物である mRNA の検出が可能な拡散増幅法である TRC (Transcription-reverse transcription concerted) 法を適用した魚介類中の腸炎ビブリオの病原性菌株の定量的な検出系の確立に取り組んだ。そして、技術的な問題点を解決して実用可能な方法を確認し、特に、魚介類中の腸炎ビブリオの病原性菌株の定量データを必要とする東南アジア (世界各地への魚介類の供給拠点であり、科学的根拠に基づくリスクアセスメントが要求されている) のタイで本法を実践し、腸炎ビブリオの病原性菌株による魚介類汚染の実態を正確に把握することを目的とした。

3. 研究の方法

食品を汚染している病原細菌の検出時における問題点の解決に取り組み、迅速・簡便・高感度な TRC 法を利用して魚介類を汚染している腸炎ビブリオの病原性菌株の生菌を標的とした定量的検出系を構築する。さらに、東南アジアのタイに焦点をあて、そこで構築したシステムを実践し、腸炎ビブリオの病原性菌株による魚介類汚染の実態を正確に把握する。

具体的な研究の内容と方法は、

(1) 腸炎ビブリオの病原性遺伝子の転写産物 (mRNA) を標的とした定量的検出系の構築を実施する。

(2) タイのフィールドでの魚介類検査に適した対象地域を選別する。

(3) 構築した定量的検出系を使用し、タイのフィールドにおける腸炎ビブリオの病原性菌株による魚介類汚染の実態調査を実施する。

4. 研究成果

(1) 最終的に東南アジアのタイにおいて、フィールドでの定量的検出系の使用を前提として、実験室内で、TRC 法を用いた腸炎ビブリオの病原性菌株の魚介類からの定量的な検出系の構築を実施した。本法を用いた検出感度では、*tdh* 遺伝子転写産物の検出系で、 10^2 から 10^3 のコピー数が存在すれば、良好な検出結果が得られることがわかった。このコ

ピー数は、生菌あたりの転写産物の量が 10 コピー程度とすると、病原性菌株の菌数が 100 以下で検出することが可能であるということになる。しかし、使用する試薬の液体の量や転写産物の精製時に使用するカラムなどで、転写産物の回収効率が低下することがわかったため、遠心操作などで、菌体を濃縮して、使用する試薬の全体量を減らすことで、検出効率の改善がみられた。

(2) 世界中への魚介類の供給拠点である東南アジアのタイにおいて、魚介類の腸炎ビブリオの病原性菌株による汚染の定量的なリスクを明らかにするために、構築した定量的検出系を実践するための対象地域の選定を行った。熱帯地域に属するタイは、年中気温が高く、雨量も多い。タイ国内のどの地域でも。雨季と乾季で、河川の流量や養殖域の状態に違いはみられるが、一年中、魚介類、特に二枚貝類 (腸炎ビブリオの汚染頻度が高い) は漁獲され、その地域およびタイ国内で食べられている。検査対象のサンプルについては、海水中で腸炎ビブリオなどの微生物の濃縮効果が知られている二枚貝類とし、現地での人の身近で食されているサンプルを使用することにした。対象とする調査地は、二枚貝類の養殖が盛んで海、特にタイ湾に面したタイ南部のフィールドを対象地域とした。

(3) 東南アジアのタイ、ベトナム、インドネシア、マレーシアで、魚介類の汚染調査を実施したところ、病原性菌株による汚染が確認された。タイ南部で、開発した TRC 法を実施したところ、本法では、転写産物である RNA を試料としているため、現地での実施の方法や試料の保管など、設備的な面での問題点が深刻であった。現状では、東南アジアのフィールドでの実施において、多くの問題点があるといわざるを得ない。しかし設備などの研究環境を改善したうえで、実施可能であるということが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Noorlis, A., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Tuan Zainazor, T. C., Ponniah, J., Tunung, R., Tang, J. Y. H., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. and Son, R. "Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater hypermarket level" International Food Research Journal 18:673-679. 2011. 査読有り。

(2) Sukhumungoon, P., Nakaguchi, Y., Ingviya, N., Pradutkanchana, J., Iwade, Y., Seto, K., Son, R., Nishibuchi, M. and Uddhakul, V. "Investigation of *stx*₂⁺ *eae*⁺ *Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand" International Food Research Journal. 18:381-386. 2010. 査読有り.

(3) Tunung, R., S. P. Margaret, P. Jeyaletchumi, L. C. Chai, T. C. Tuan Zainazor, F. M. Ghazali, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, and R. Son. "Prevalence and Quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Salad Vegetables at Retail Level" Journal of Microbiological Biotechnology. 20:391-396. 2010. 査読有り.

(4) Yamazaki, W., Kumeda, Y., Misawa, N., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. Applied Environmental Microbiology. 76(3):820-828. 2010. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

(1) 中口義次、Nguyen Binh Minh、Cuong Ngo Tuan、Tran Hoang Huy、Nguyen Hoai Thu、Le Thanh Huong、勢戸和子、大久保和洋、岩出義人、西渕光昭。「ベトナム北部ハノイ市における腸炎ビブリオ感染症調査」。第44回腸炎ビブリオシンポジウム。2010年11月25-26日。秋田県秋田市。

(2) 瀬尾晃司、権平文夫、勢戸和子、山崎渉、岩出義人、杉山純一、中口義次、西渕光昭。「腸炎ビブリオのK抗原をコードするDNA領域の比較解析」。第44回腸炎ビブリオシンポジウム。2010年11月25-26日。秋田県秋田市。

(3) 中口義次、Nguyen Binh Minh、Cuong Ngo Tuan、Tran Hoang Huy、Nguyen Hoai Thu、Le Thanh Huong、勢戸和子、大久保和洋、岩出義人、西渕光昭。「ベトナム・ハノイにおける腸炎ビブリオ感染症に関する調査」。第51回日本熱帯医学会大会。2010年12月3-4日。宮城県仙台市。

(4) Koji Seo, Fumio Gondaira, Junichi Sugiyama, Pharanai Sukhumungoon, Varaporn Uddhakul, Wataru Yamazaki, Kazuko Seto, Yoshito Iwade, Rika Shimizu, Natsuko Tanaka, Yoshitsugu Nakaguchi, Mitsuaki Nishibuchi "O:K serotype of *Vibrio parahaemolyticus*: a very important epidemiological marker" 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Oth

er Bacterial Enteric Infections Panel Meeting, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 6-8, 2010 Kyoto (Japan)

(5) Abdul Aziz Djamal, Harry Fajri Zisoni, Yoshitsugu Nakaguchi, Kazuko Seto and Mitsuaki Nishibuchi "The First Reported *Vibrio parahaemolyticus* Diarrheal Case from Batam, Indonesia" and Some additional Related Epidemiological Characteristics 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Panel Meeting, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 6-8, 2010. Kyoto (Japan).

(6) Yoshitsugu Nakaguchi, Nguyen Binh Minh, Cuong Ngo Tuan, Tran Hoang Huy, Nguyen Hoai Thu, Le Thanh Huong, Kazuko Seto, Kazuhiro Okubo, Yoshito Iwade, Mitsuaki Nishibuchi "Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* Infection in Hanoi, Vietnam" 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Panel Meeting, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. December 6-8, 2010. Kyoto (Japan).

(7) Yoshitsugu Nakaguchi (Keynote speech) "Molecular biology study on gene expression, transcription and mRNA of virulent genes in *Vibrio parahaemolyticus*" The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. August 19 2009. Padang (Indonesia).

(8) Yuherman, Yoshitsugu Nakaguchi, et al. "Antibiotic Resistance Pattern, Plasmid Profiling, and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seawater in Padang, West Sumatera" The 2nd International Seminar and Workshop on Advance Molecular Biology. August 19 2009. Padang (Indonesia).

(9) 山崎渉、久米田裕子、中口義次、西渕光昭「LAMP法による腸炎ビブリオ *tdh*, *trh1*, *trh2* の簡易迅速検出法の開発」第43回腸炎ビブリオシンポジウム。平成21年11月27日。岡山県岡山市。

[図書] (計 1 件)

(1) 中口義次 (他 20 名、あいうえお順)。食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書。社団法人畜産技術協会。全 376 ページ。2011。

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中口 義次 (NAKAGUCHI YOSHITSUGU)

京都大学・東南アジア研究所・助教

研究者番号：70378967

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：