短 報

腸炎ビブリオのウレアーゼ産生性と *trh* 保有性の相関性

関西空港検疫所

鈴木 則彦 上田 泰史 森 英人
 竹垣友香子 宮城 和文 野田 孝治
 広瀬 英昭 橋本 智 大隅 義裕

大阪府立公衆衛生研究所

石 橋 正 憲

大阪大学微生物病研究所

本 田 武 司

(平成7年2月13日受付)

(平成7年3月13日受理)

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, *trh* gene, urease

序 文

近年、ウレアーゼ (Ua) 産生性の腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の病原性が注目されるようになった¹⁾。我々は、Ua 産生性 *V. parahaemolyticus* について、酵素標識オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーション法 (ELONP 法) により TDH-related hemolysin 遺伝子 (*trh*) を検索し、その保有と Ua 産生性について強い関連性を示す成績をこれまでに報告した²⁾。しかし、Ua を産生するにもかかわらず ELONP 法において *trh* が確認されない菌株も少なからずあった。今回、digoxigenin-II dUTP を用いたランダムプライムシステムで作製した DIG 標識 *trh* 検出プローブを用いて *trh* を再検索した (DIG-ELISA 法) 結果、*trh* の保有と Ua 産生性が完全に一致する成績が得られたので報告する。

材料と方法

供試菌：1989年から1994年の6年間に大阪空港検疫所で分離された海外旅行者下痢症由来の Ua

産生性 *V. parahaemolyticus* 84株および Ua 非産生性 *V. parahaemolyticus* 74株を用いた。

trh の検出：*trh* の遺伝子配列³⁾をもとに作製した sense primer 5'-CTCTACTTTGCTTTCA-GT-3', antisense primer 5'-AATATTCTGGA-GTTTCAT-3'を用い、既知の *trh* 保有株 *V. parahaemolyticus* AQ4023より PCR 法で増幅した460 bp の *trh* 遺伝子断片をプローブとして DIG-ELISA 法による Colony hybridization を実施した。標識プローブの作製およびハイブリッドの検出には、DNA Labeling and Detection kit (BOEHRINGER MANNHEIM) を使用した。ELONP 法は、既報⁴⁾に準じ *trh* 検出用酵素標識オリゴヌクレオチドプローブ (TOYOBO) を用いて実施した。

成績および考察

ELONP 法および DIG-ELISA 法で *trh* を検索した結果を Table 1 に示す。Ua 産生性 *V. parahaemolyticus* では、ELONP 法で84株中51株 (60.7%) から、DIG-ELISA 法では84株全株から *trh* を検出した。Ua 非産生性 *V. parahaemolyticus* 74株を調べたが、ELONP 法および DIG-ELISA 法のいずれにおいても *trh* は検出されな

別刷請求先：(〒549) 関西空港ターミナルビル内郵便局私書箱308号
 関西空港検疫所検査課 鈴木 則彦

Table 1 Correlation between *trh* possession and urease production among clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus*

<i>trh</i> detection by indicated methods		Urease production	
		Positive (84 strains)	Negative (74 strains)
DIG-ELISA	<i>trh</i> (+)	84(100%)	0(0%)
	<i>trh</i> (-)	0(0%)	74(100%)
ELONP	<i>trh</i> (+)	51(60.7%)	0(0%)
	<i>trh</i> (-)	33(39.3%)	74(100%)

かった。

DIG-ELISA 法と ELONP 法における *trh* 検出率の差異は、*trh* の遺伝子配列には部分的な変異が多く見られる⁵⁾こと、さらに ELONP 法では用いたプローブの標的配列が24mer と短いことから、この部位におけるヌクレオチド変異が原因と考えられる。今回、Ua 産生性 *V. parahaemolyticus* の全株から *trh* が検出され、さらに Ua 非産生性株からは検出されなかったことは、本菌における Ua 産生性と *trh* 保有との強い相関性を示唆しており、Ua 産生性 *V. parahaemolyticus* の病原性を実証するものと思われる。従って、*trh* の検索は、煩雑な遺伝子診断に替えて簡便な Ua 産生試験が有効なスクリーニング法となろう。

trh 遺伝子は、thermostable direct hemolysine 遺伝子 (*tdh*) との塩基配列ならびにコードするアミノ酸情報の近縁性から、共通の祖先に由来するものと考えられている³⁾。しかし、今回 *tdh* 遺伝子のみを保有する *V. parahaemolyticus* では、Ua 産生が認められず、*trh* 遺伝子を保有する *V. parahaemolyticus* の全株で Ua 産生性が確認されたこ

とより、*tdh* と *trh* の両遺伝子の存否に関して菌株間に明らかな形質の差異が見いだされた。*trh* 遺伝子が派生する過程において Ua 産生性の形質をいかにして獲得したか興味深い、その機序については今後の研究課題である。

文 献

- 1) Kelly, M.T. & Dan Stro, E.M.: Urease positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. J. Clin. Microbiol., 27: 2820—2822, 1989.
- 2) 鈴木則彦, 上田泰史, 森 英人, 宮城和文, 野田孝治, 広瀬英昭, 大隅義裕, 石橋正憲, 余 明順, 山本耕一郎, 本田武司: 腸炎ビブリオにおける溶血毒遺伝子 (*tdh*, *trh*) の保有とウレアーゼ産生性および血清型との関連性について。感染症誌, 68: 1068—1074, 1994.
- 3) Nishibuchi, M., Taniguchi, T., Misawa, T., Khaeomane-iam, V., Honda, T. & Miwatani, T.: Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 57: 2691—2697, 1989.
- 4) 鈴木則彦, 宮城和文, 森 英人, 吉田昭夫, 野田孝治, 大村寛造, 高井慎也, 松本泰和, 楠井善久, 林 和, 余 明順, 山本耕一郎, 本田武司: 酵素標識 DNA プローブを用いた *Vibrio parahaemolyticus* の溶血毒 (TDH, TRH) 検出法と従来法との比較検討。臨床検査, 37: 927—930, 1993.
- 5) Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y. & Nishibuchi, M.: Sequence variation in the thermostable direct hemolysin related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environ. Microbiol., 58: 2449—2457, 1992.

Correlation between *trh* Possession and Urease Production of Clinical Isolates of *Vibrio parahaemolyticus*

Norihiko SUZUKI, Yasufumi UEDA, Hideto MORI, Yukako TAKEGAKI,
Kazufumi MIYAGI, Koji NODA, Hideaki HIROSE,
Satoru HASHIMOTO & Yoshihiro OOSUMI
Kansai Airport Quarantine Station
Masanori ISHIBASHI
Osaka Prefectural Institute of Public Health
Takeshi HONDA
Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University