

海水・海泥からの耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの検出

研究協力者 杉山寛治，増田教子，川村朝子，郷田淑明，秋山真人
(静岡県環境衛生科学研究所)

研究要旨 腸炎ビブリオ病原株の環境における分布を知る目的で、PCR (遺伝子増幅) 法、免疫磁気ビーズ法と神奈川現象培地の3者を組み合わせた検査法を用い、静岡県下の漁港海水、海泥などからの耐熱性溶血毒(TDH)産生・神奈川現象陽性の病原株の検出を試みた。その結果、従来検出が困難であった海水と海泥各々1検体からTDH産生腸炎ビブリオ血清型O3:K6を検出することができた。これらの菌株と1999年に県下で発生した腸炎ビブリオ食中毒事例の患者分離株(O3:K6)の染色体DNAの制限酵素切断パターンをパルスフィールドゲル電気泳動法で比較したところ、両由来株の一部は同一パターンを示した。腸炎ビブリオO3:K6に汚染された海水が同時期に発生した食中毒と疫学的に結び付く可能性が示唆された。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは夏季の沿岸海水や海産魚介類に分布し、病原株と非病原株に区別される。食中毒患者から分離される病原株は耐熱性溶血毒(TDH)や、これに類似する溶血毒(TRH)を産生するが、海水や海泥などの環境材料からそれらの病原株を検出することは従来困難であるといわれていた。そこで、特にTDH産生腸炎ビブリオを海水等から効率良く分離するために、PCR (遺伝子増幅)法、免疫磁気ビーズ法と神奈川現象培地の3者を組み合わせた検査法を検討した。

B. 材料および方法

1999年7月から11月のあいだに、静岡県下の漁港や汽水湖の深さ1mから採取した海水(1L)29検体、海泥(25g)25検体について、PCR法、免疫磁気ビーズ法(10月以降の検体について実施)と神奈川現象培地を組み合わせた検査法で、TDH

産生腸炎ビブリオの検出を行った。

免疫磁気ビーズはDynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (DYNAL社)のビーズに腸炎ビブリオ型別用K型血清(デンカ生研)を感作させ使用した。また、アルカリペプトン水を用いた最確数(MPN)増菌培養法で腸炎ビブリオの菌数と*tdh*遺伝子保有菌のMPN値の測定を行った。

海水、海泥から分離された腸炎ビブリオ株(血清型O3:K6)については、染色体DNAのパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による制限酵素(*Sfi*I, *Not*I処理)切断パターンを、1999年に発生した腸炎ビブリオ食中毒4事例の患者分離株(血清型O3:K6)と比較した。

C. 研究結果

海水、海泥からのTDH産生腸炎ビブリオの検出方法で、今回検討して最も優れていると思われる方法を図1に示した。海水は1Lをメンブランフ

フィルターで濾過しフィルターを、海泥は25 gをアルカリペプトン水で18時間培養後、増菌液中の *tdh* 遺伝子の有無をPCR法で検査する。同時にアルカリペプトン水増菌液の一部をポリミキシノンに接種し6時間の2次増菌を行う。

PCRで *tdh* 陽性となった検体については、腸炎ビブリオK型抗血清を感作させた免疫磁気ビーズで処理した後、TCBS平板に塗抹培養する。発育した緑色集落を神奈川現象培地（我妻培地）に接種し、溶血の有無を調べる。明瞭な溶血のみられた株は、RPLA法によってTDH産生性を確認する。

PCR法による海水からの *tdh* 遺伝子の検出結果の一部を図2に示した。漁港海水5検体中4検体(Lane 2～5)で434 bpの *tdh* 遺伝子の増幅断片が確認された。

1999年7月から11月の間に採水した県内の漁港等の海水29検体中15検体（52%）、海泥25検体中3検体（12%）からPCR法で *tdh* 遺伝子が検出された（表1）。そのうち、同じ海域の漁港の海水と海泥各々1検体からTDH産生・神奈川現象陽性の腸炎ビブリオO3:K6が検出された。その血清型は1999年に静岡県で発生した食中毒事例で患者から最も多く検出された型と一致していた。

漁港海水の一定点におけるMPN法によってもとめた腸炎ビブリオ総菌数との *tdh* 保有菌数の推移を、表2に示した。PCR（MPN）法によって海水中の *tdh* 保有腸炎ビブリオ菌数がもとめられた検体は、2検体あり、多いもので海水100 mL中93個であった。一方、培養法で求めた非病原株、病原株を含めた腸炎ビブリオ総菌数は最も多いもので海水100 mL中 10^4 個台であった。腸炎ビブリオ総菌数にしめる *tdh* 保有菌数の割合は100分の1から1,000分の1以下であると思われた。

今回、10月以降に採取した海水14検体、海泥11検体のうち、PCR陽性であった海水7検体、海泥2検体については、特定の腸炎ビブリオK型抗血清を感作させた免疫磁気ビーズ法を応用した。この方法では特定K抗原保有株を免疫磁気ビーズ

に選択的に結合させ、その結合体を磁場に数回さらす過程で、洗浄により他の菌などを除き、結果的に目的菌を濃縮することが可能である。

表3に、免疫磁気ビーズ使用の有無および増菌培養法の違いによる、目的とするK抗原保有株の分離率を示した。ビーズ処理した検体の一部では目的K抗原保有株を分離することができた。一方、免疫磁気ビーズで処理しない検体からはいずれも目的とするK抗原保有株を分離することはできなかった。増菌培養法（アルカリペプトン水単独増菌法とアルカリペプトン水、ポリミキシノンの2段階増菌法）の違いにより、目的とするK抗原保有株の分離率を比較したところ、アルカリペプトン水→ポリミキシノンの2段階増菌法を用いた検体からの分離率がアルカリペプトン水単独増菌法のものより高かった。特にY漁港海水のアルカリペプトン水→ポリミキシノンの2段階増菌培地をK6抗体感作ビーズで処理した検体では、分離12株中11株（92%）がK6抗原を保有していた。そのうち神奈川現象陽性のTDH産生株は5株であった。

免疫磁気ビーズ法では特定のK抗原保有株を選択的に分離することができたが、表3に示したH湖水、湖泥の場合のように、K68抗原をもつもののTDH陰性である非病原株を選択的に分離したケースがあった。しかし、このような場合も、ビーズ処理後の分離株を神奈川現象培地に接種することで、神奈川現象陽性のTDH産生株のみを確実にスクリーニングすることが可能であった。

海水、海泥から分離された血清型O3:K6と、同じ血清型の食中毒患者分離株の制限酵素切断パターンのパルスフィールドゲル電気泳動像を図3に示した。Lane 1の海水株はLane 4の患者由来株と一致し、Lane 2の海泥株はLane 3、5の患者由来株と一致していた。

D. 考察

PCR法、免疫磁気ビーズ法と神奈川現象培地

の3者を組み合わせた検査法で、従来検出が困難であった海水と海泥各々1検体からTDH産生腸炎ビブリオ血清型O3:K6を検出することができた。これらの菌株と1999年に静岡県下で発生した腸炎ビブリオ食中毒事例の患者分離株(O3:K6)の染色体DNA制限酵素切断パターンをパルスフィールドゲル電気泳動法で比較したところ、両由来株の一部は同一パターンを示した。両由来株はすべてPFGEタイプSA-NA(山井ら、腸炎ビブリオのPFGE解析条件の標準化、厚生科学研究報告書)に属し、同一クローンから派生したものと考えられた。腸炎ビブリオO3:K6に汚染された海水が同時期に発生した食中毒と疫学的に結び付く可能性が示唆された。

腸炎ビブリオ血清型O3:K6を原因とする全国の食中毒事例のなかには、茹でた後に、いけす等の海水で冷やした海産魚介類を原因食品とする事例があり、腸炎ビブリオで汚染された海水が原因食品の汚染源となったことが推定されている。漁港海水はいけす用の海水として使用されたり、魚体の洗浄などにも使われていることから、私どもが明らかにしたような血清型O3:K6に汚染された海水が直接食中毒の発生に結び付く恐れも十分考えられる。今後は、汚染された漁港海水の使用中止などの対策が必要であろう。

F. 研究発表

海水・海泥からの耐熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの検出，地研全国協議会関東甲信静支部第12回細菌研究部会，川崎市，2000. 2月.

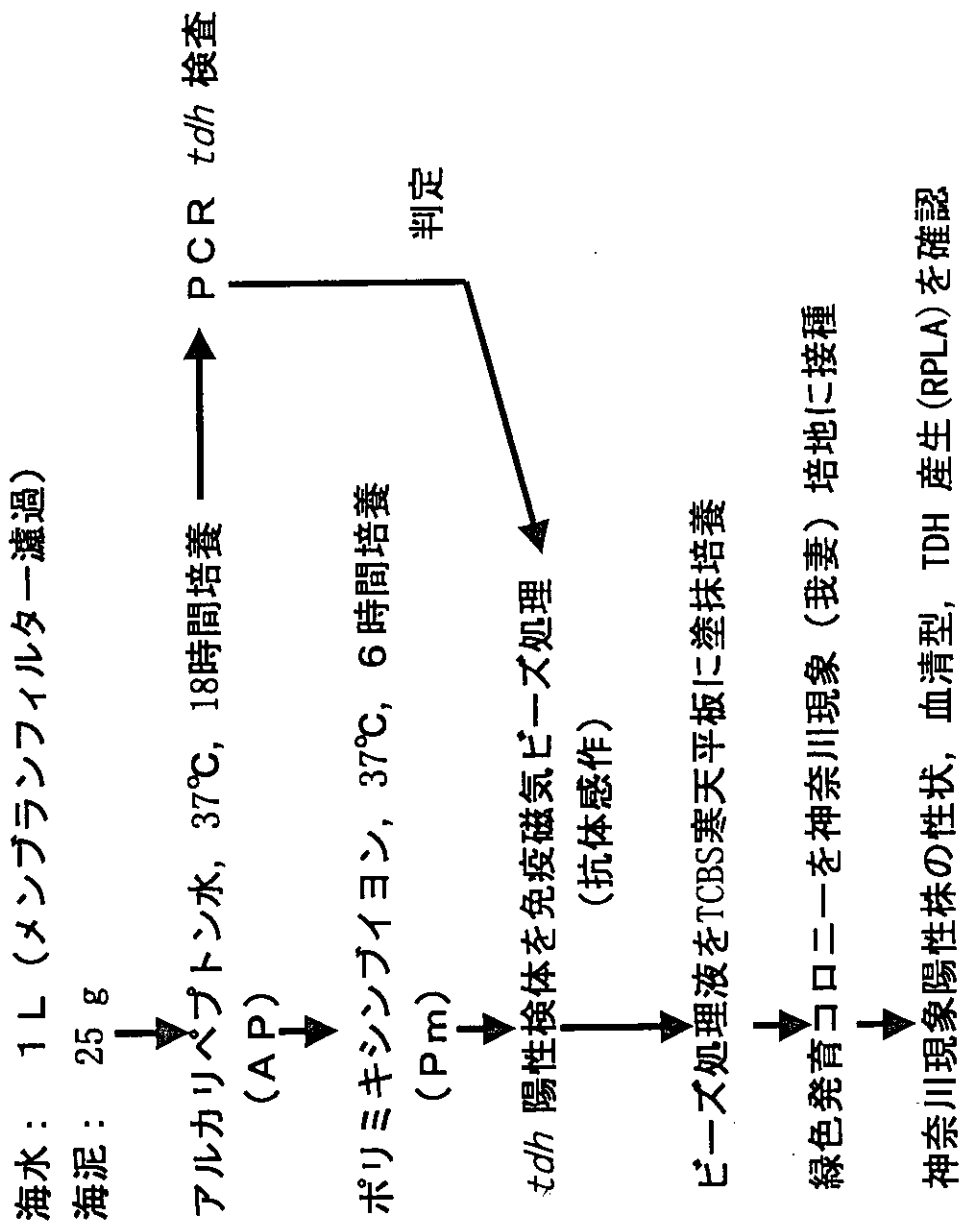
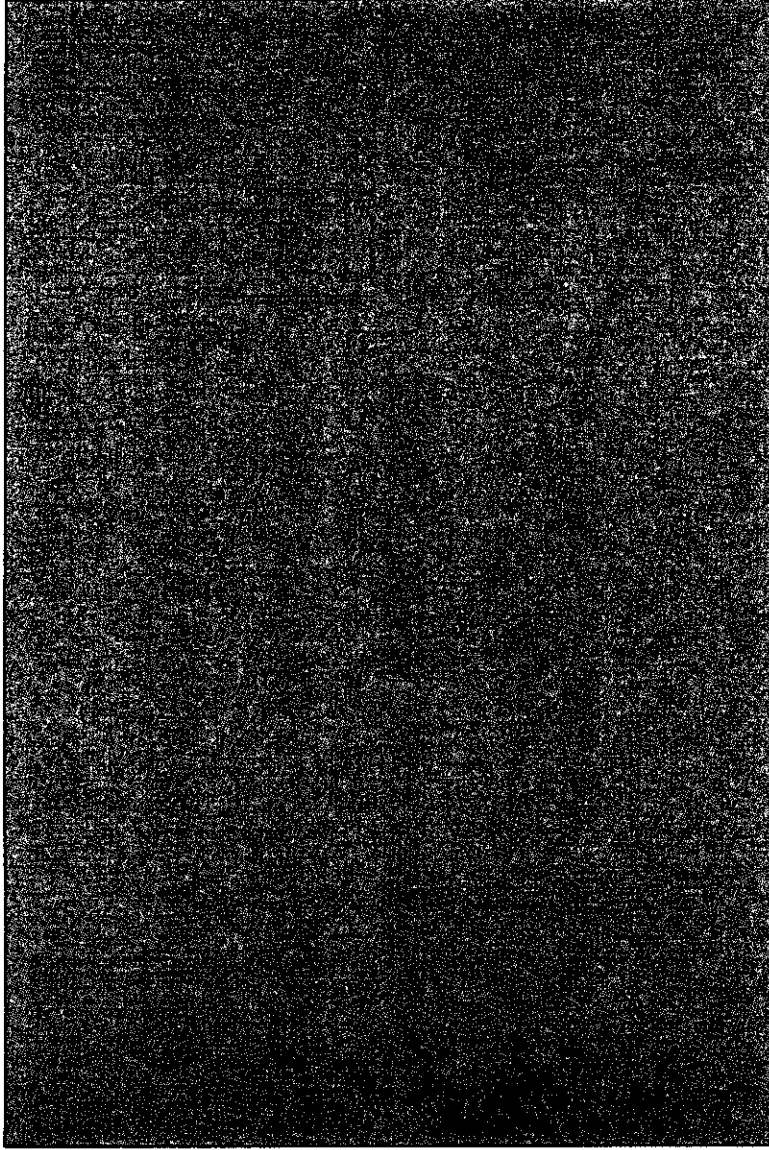


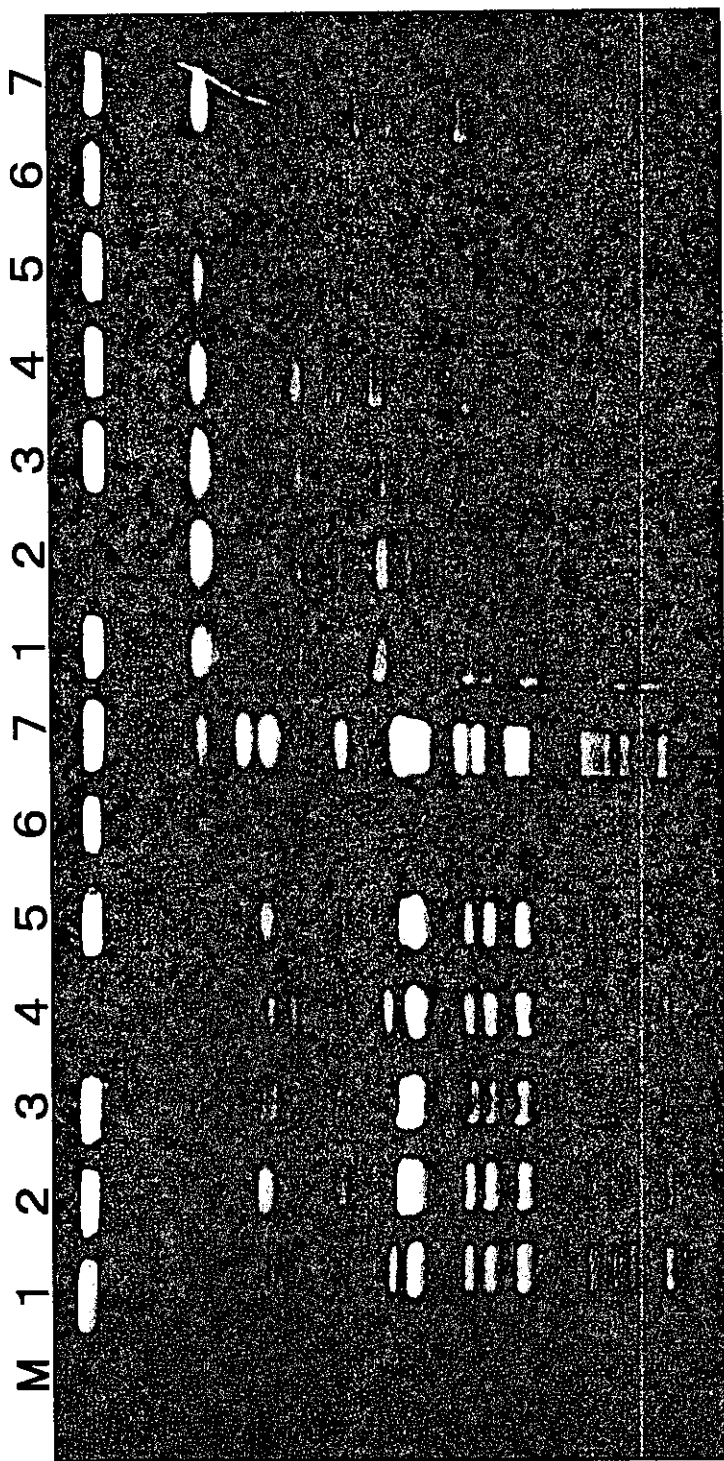
図1. 海水, 海泥からのTDH産生腸炎ビブリオの検出方法

M 1 2 3 4 5 P N



— 434

図2. PCR法による海水からの *tdh* 遺伝子検出
Lane 1~5: 漁港海水1Lを濾過したメンブランフィルターを
アルカリペプトン水で増菌培養したものを検体とした.
M: 分子量マーカー P: 陽性コントロール
N: 陰性コントロール
増幅産物のサイズ (大きさ) は右側に塩基対 (bp) で示した.



Sfi I 処理

1. 海水由来TDH+株
3. A食中毒事例患者由来株
5. C食中毒事例患者由来株
7. 海水由来TDH-株

Not I 処理

2. 海泥由来TDH+株
4. B食中毒事例患者由来株
6. D食中毒事例患者由来株

図3 海水、海泥、食中毒患者由来腸炎ビブリオ
O3:K6 のPFGE制限酵素切断パターン

表1. 海水, 海泥からの *tdh* 遺伝子および TDH産生菌の検出成績

検体 (量)	検体数	<i>tdh</i> 陽性数 (%)	TDH 産生菌検出数 (%)
海水 (1 L)	29	15 (52%)	1* (3%)
.....			
海泥 (25 g)	25	3 (12%)	1* (4%)

* Y 漁港の海水, 海泥1検体ずつから, 神奈川現象陽性・TDH 産生の腸炎ビブリオ3 : K6が検出された.

表2. 一海水定点におけるMPN法によってもとめた腸炎ビブリオ総菌数と *tdh* 保有菌数の推移

採水月日	海水温	腸炎ビブリオ総菌数 /100mL	<i>tdh</i> 保有菌数 /100mL
7月26日	23.5°C	2.1 × 10 ³	+
9月20日	25 °C	9.3 × 10 ⁴	9.3 × 10
9月27日	23 °C	1.5 × 10 ³	+
10月18日	23 °C	2.1 × 10 ²	9.1
11月9日	20 °C	4.6 × 10 ²	+
11月30日	18.5°C	4.3 × 10	+

*+: 海水1Lのメンブランフィルター-濾過培養で *tdh* 陽性になったもの。
MPN値は算出できず。

表 3. 免疫磁気ビーズ処理による海水、海泥からの目的K抗原保有株の分離率

検体名	培養法	免疫磁気ビーズ 感 作 抗 体	目的K抗原保有 株 の 分 離 率	分離株の性状 (株数)
Y 漁港海水	AP → Pm ^{*1}	K 6	11株 / 12株中	O 3:K6, TDH 陽性 (5株) O 3:K6, TDH 陰性 (6株)
〃	AP ^{*2}	K 6	1株 / 4株中	O 3:K6, TDH 陽性 (1株)
〃	AP → Pm	ビーズ未処理	0株 / 12株中	・
Y 漁港海泥	AP → Pm	K 6	5株 / 10株中	O 3:K6, TDH 陽性 (5株)
〃	AP	K 6	0株 / 12株中	・
〃	AP → Pm	ビーズ未処理	0株 / 12株中	・
H 湖水 (汽水)	AP → Pm	K 68	9株 / 12株中	O 11:K68, TDH 陰性 (9株)
〃	AP → Pm	ビーズ未処理	0株 / 12株中	・
H 湖泥	AP → Pm	K 68	11株 / 12株中	O 11:K68, TDH 陰性 (11株)
〃	AP → Pm	ビーズ未処理	0株 / 12株中	・

*1 アルカリペプトン水 (AP), 37°C, 18時間前培養後, ポリミキシンブイオン (Pm) に再接種, 37°C, 6時間培養したもの.

*2 アルカリペプトン水 (AP), 37°C, 18時間培養したもの.

研究協力者 研究報告書

富山湾漁港の海環境における腸炎ビブリオ菌数の測定と 耐熱性溶血毒産生株検出の試み

研究協力者 山川清孝（富山県衛生研究所）

研究要旨 富山湾の2漁港の海水・海泥中の腸炎ビブリオ菌数をMPN法で測定した。海水・海泥ともに、食塩ポリミキシムバイオンを用いた増菌法に比べ、アルカリペプトン水を用いた場合の方が高い菌数が得られた。MPN法の培養菌液、計44例について、PCR法で耐熱性溶血毒遺伝子の検出を行なったが、結果はすべて陰性であった。一方、海水1,000 mlからの増菌培養液、計7例中4例はPCR陽性であった。このPCR陽性培養菌液から、TCBS寒天への直接塗抹またはK6免疫磁気ビーズにより溶血毒産生株の分離を試みたが、いずれの菌液からも検出されなかった。

A. 研究目的

海環境中の腸炎ビブリオの検出法を確立するため、MPN菌数測定法の使用培地としてアルカリペプトン水と食塩ポリミキシムバイオンを用い、測定菌数の差異について検討した。また、耐熱性溶血毒（TDH）産生株の検出のため、PCR法、免疫磁気ビーズ法の有効性について検討した。

B. 研究方法

試料：1999年夏期を中心に富山湾の魚津、新湊2漁港において、岸壁近くの水深0 mおよび1 mの海水、直下の底泥（PBS懸濁液とし使用）を採取した。

菌数測定：アルカリペプトン水または食塩ポリミキシムバイオンを用いMPN3本法により37℃、18～24時間培養し、TCBS寒天により分離したコロニーを腸炎ビブリオと同定した後、菌数の算出をした。

TDH産生株の検出：上記のMPN法用の培養

菌液（1 ml および 10 ml 接種したもの各1本づつ）に対して、TDF-1、TDF-2プライマーを用いたPCR法により*tdh*遺伝子を検出した。また、海水1,000 mlをメンブランフィルター（0.45 μm）で濾過し、同フィルターをアルカリペプトン水100 mlで37℃、18～24時間培養したものに対しても同様のPCRを行なった。

PCR陽性の場合、培養菌液からTCBS寒天により腸炎ビブリオ菌株を分離し、各培養液当り20株以上、我妻培地上でTDH産生性を試験した。またK6免疫磁気ビーズ（デンカ生研製）処理後、同様にTDH産生株の有無を調べた。

C. 研究結果

アルカリペプトン水を用いたMPN法による腸炎ビブリオの測定菌数は、食塩ポリミキシムバイオンを用いた場合より、海水、海泥を問わず、ほとんどの測定時で高い値

を示した(図1)。この中で、アルカリペプトン水培養菌液32例(海水18例、海泥14例)、食塩ポリミキシンブイオン培養液12例(海水6例、海泥6例)についてPCRを行なったが、陽性例は見られなかった。海水1,000 mlのアルカリペプトン水培養液7例では、PCR陽性が4例、陰性が3例であった。PCR陽性例ではTDH産生株の分離を試みたが、いずれの培養液からもTDH産生株は分離されなかった。

MPN菌数(アルカリペプトン水培養)とPCRの結果の関係を見ると、海水・海泥ともに最高菌数 $2.4 \times 10^5/100$ ml(または100 g)を示した場合も、MPN培養液を用いる限りPCRは陰性であった。一方、海水1,000 ml培養菌液では、MPN菌数が $2.0 \times 10^3/100$ mlでPCR陽性の場合があり、 $1.1 \times 10^3/100$ mlでPCR陰性の場合もあった。

3つの時期のMPN培養菌液より分離したTDH非産生腸炎ビブリオの血清型について表1に示した。海泥では05:K17および05:K30は、魚津・新湊両漁港よりほぼ常時検出されたが、海水では05:K17は魚津漁港にのみ、05:K30は新湊漁港でのみ検出された。また、採取時期や試料が異なると、検出される血清型が大きく異なることもあった。

D. 考察

海水と海泥の菌叢は、腸炎ビブリオの各種血清型の構成のみならず、他の菌種についても異なる可能性があり、必ずしも同じ増菌培地が有効とは限らないが、海水と海泥のMPN法により求めた腸炎ビブリオ菌数は、共にアルカリペプトン水による増菌の方が高い値を示した。

海水のアルカリペプトン水を用いた培養菌液におけるPCRの結果は、1,000 ml培養の場合にのみPCR陽性例が認められたことから、培養する海水の量を十分多くとる必要があったと思われる。しかしながら本研究では、1,000 ml培養においても、TDH産生菌は容易に分離できるだけの菌量には至らなかった。また、MPN培養の場合においても1,000 ml培養の場合においても、腸炎ビブリオ菌数の多寡とPCRの結果との間に明確な相関関係は認められなかったことも考慮すると、腸炎ビブリオ菌数に占めるTDH産生菌の割合が試料ごとに異なることも考えられた。

本研究とは別に、上記2漁港を含め過去4年間にわたり、夏期の腸炎ビブリオ菌数の変動を調査しているが、本年は検出される菌数のレベルが全体に低く、TDH産生菌の検出にも困難があったようにも思われる。

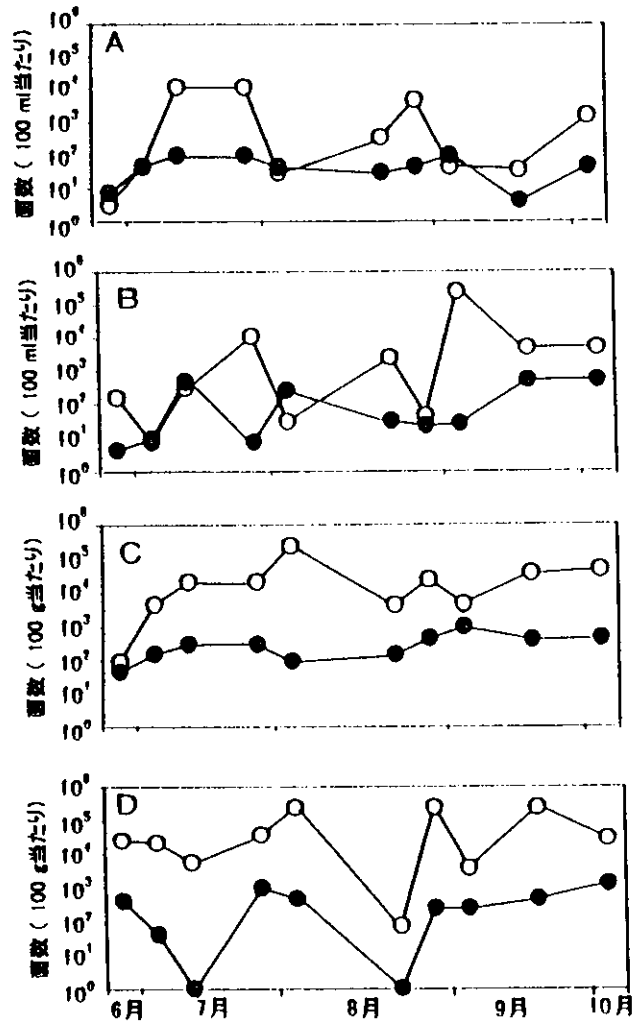


図1. 漁港海水、海泥における腸炎ビブリオ菌数の変化

- A. 魚津漁港(海水、水深0 m). B. 新湊漁港(海水、水深0 m). C. 魚津漁港(海泥).
 D. 新湊漁港(海泥).
 ○. 7%ガラクトース水培養によるMPN値.
 ●. 食塩ポリミキシンブイオン培養によるMPN値.

表1. MPN培養菌液より分離したTDH非産生腸炎ビブリオの血清型

材料	検出された血清型		
	7月6日	8月2日	8月30日
魚津漁港(海水)	O2:K30, O3:K5, O5:K17 O8:K22	O2:K28, O5:K15, O5:K17 O8:K41	O1:K32, O1:K58, O2:K3 O3:K20, O3:K7, O4:K12 O5:K15, O5:K17, O8:K22
魚津漁港(海泥)	O2:K28, O5:K17, O5:K30	O2:K28, O5:K17, O5:K30	O1:K32, O1:K58, O4:K8 O4:K9, O5:K15, O5:K17 O5:K30
新湊漁港(海水)	O2:K30, O5:K30	O4:K9, O5:K30, O6:K18 O11:K5	O4:K9
新湊漁港(海泥)	O5:K30	O1:K32, O4:K43, O5:K15 O5:K17, O5:K30, O8:K19 O10:K24	O1:K32, O2:K3, O5:K17 O5:K30, O10:K24

腸炎ビブリオ汚染実態調査

協力研究者 仲西 寿男 (神戸市環境保健研究所)

<研究要旨>

腸炎ビブリオ O3:K6 の生態調査として、沿岸海中における分布と耐熱性溶血毒 (TDH) 産生株の存在を調べた。スクリーニングに PCR 法を実施することによりその存在が確認できた。すなわち、神奈川現象陽性株 223 株のうち *tdh*(+) は 137 株 (62%)、しかし KAP-RPLA 法(+)は認められなかった。O3:K6 の分離を目的とした免疫磁気ビーズ法では、O3:K6 以外の多くの血清型も同時に検出された。神奈川現象と TRH との関係も含めその生態と疫学について、また免疫磁気ビーズ法の環境材料への応用について、さらに検討する必要がある。

<研究目的>

腸炎ビブリオによる食中毒の患者数は年々減少していたが、ここ 2、3 年前からは、急増を続けているサルモネラ食中毒をも超える勢いで増加している。その理由として、血清型 O3:K6 菌の生態との関係が取りざたされている。

そこで、沿岸海水域における腸炎ビブリオ O3:K6 の分布と、食中毒の下痢原性因子である耐熱性溶血毒 (TDH) 産生株の存在について調査した。

<研究方法>

神戸市東部沿岸域から定点として 5 か所を選び、それぞれの地点で 7 月 26 日から 9 月 13 日の間に 10 回にわたって、合計 50 検体をハイロート採水器を用いて採取した。採水場所の地図および採水日と天候を図 1、表 1 に示す。水温は期間中殆どが 27°C であった。

検査方法を図 2 に示す。

検体 1L のうち 10ml、1ml および 0.1ml を各 3 本ずつのアルカリペプトン水 (APW) にとり、残りを 0.45 μm ミリポアフィルターを用いてろ過し、このフィルターを細切して APW100ml 中に接種した。TDH 産生株のスクリーニングとして PCR 法を用いた。陽性の場合には TCBS で分離すると同時に、その陽性 APW について免疫磁気ビーズ法を行った。次に TSI 寒天培地で性状を確認し、斜面上の菌を我妻培地に画線培養し神奈川現象を観察した。溶血現象が (±) 以上認められたものについて PCR で *tdh* を確認し、血清型別を行った。なお、我妻培地における神奈川現象の不鮮明な菌株も検出されたので、KAP-RPLA 法 (デンカ生研) を追加し、確認テストを実施した。

<研究結果>

1. MPN 値は定点 2、3 および 4 で高く、採水日では 8 月に入り気温の高い日に高値となった (表 1、図 3、図 4)。
2. 我妻培地で神奈川現象が認められた 223 株のうち、*tdh*(+) のものが 137 株 (61.4%)、*tdh*(-) のものが 86 株 (38.6%) であった (図 5)。
3. 分離株には O3:K6 の他にも多くの血清型が含まれた。

<考察>

スクリーニング PCR において *tdh*(+) となったもののうち、最終の確認 PCR においても *tdh* が検出されたのは約半数の 55.3% であった。TCBS の使用枚数を増やし、釣菌する集落数を増やせば、さらに多くの *tdh*(+) 株を見つけることが出来たかも知れない。

また、海水由来株の我妻培地による神奈川現象の判定では、ヒト由来陽性株に比べて不鮮明なものが多かった。このため、KAP-RPLA 法を常法どおり実施したが、RPLA 凝集は認められなかった。これは、溶血性因子として、TDH 以外に溶血に関与するといわれている TRH の存在が推測される。

(共同研究者 木股 裕子、黒川 学)

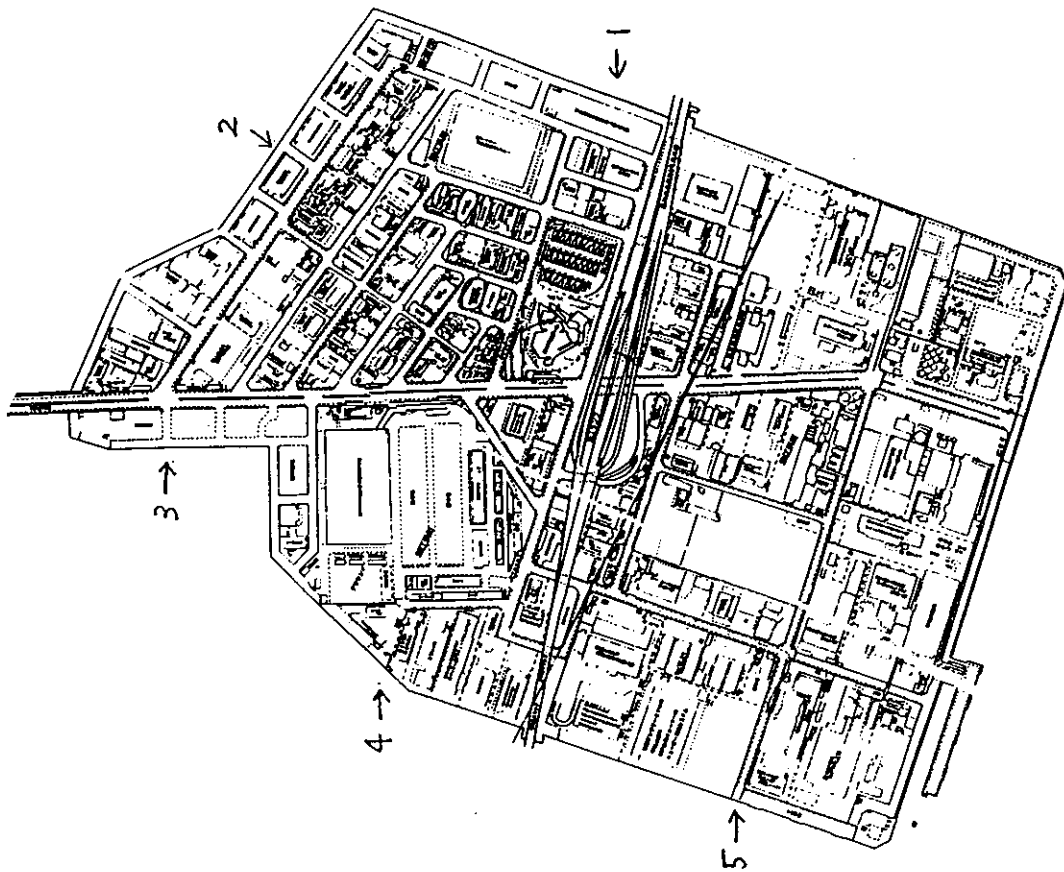
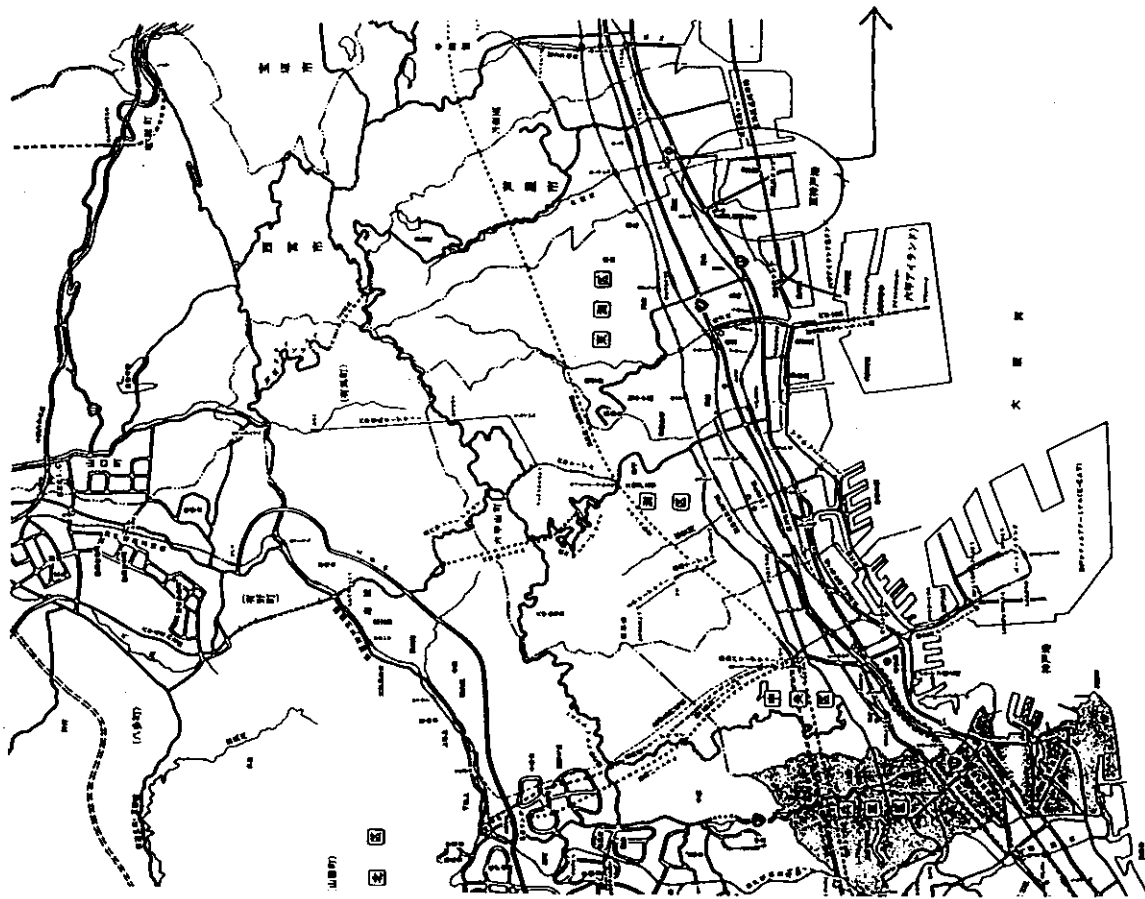


図1. 採水場所 (5定点)

縮尺 1:80,000

表1.採水日と天候

採水日	7月26日	8月2日	8月9日	8月17日	8月23日
天候	晴れ	晴れ	晴れ	晴れ	曇り
平均気温	29.5	29.1	30.3	28.4	27.9
	8月25日	9月1日	9月6日	9月8日	9月13日
	晴れ	曇り	晴れ	曇り	曇り
	25.4	27.2	26.7	28.4	28.4

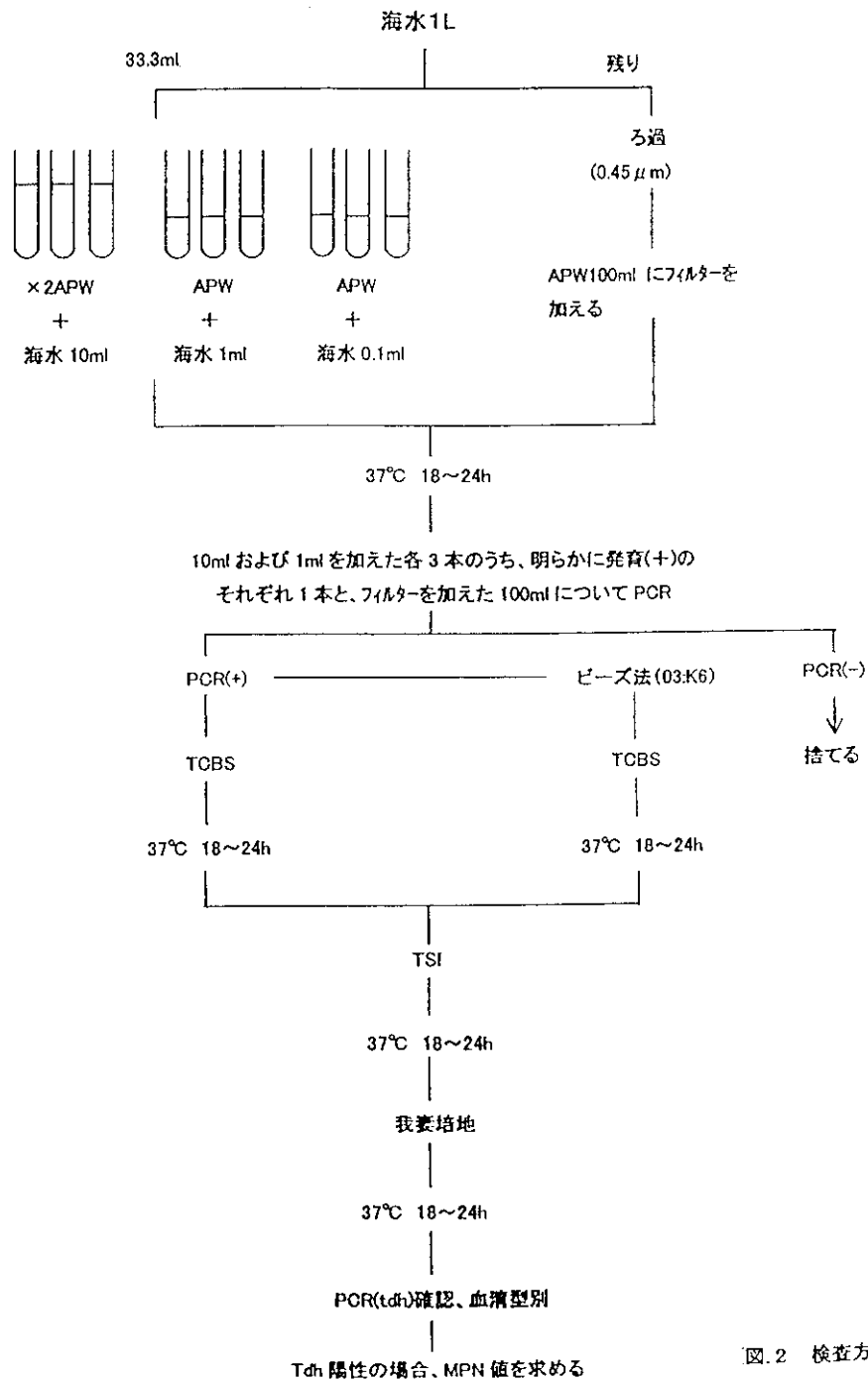


図.2 検査方法

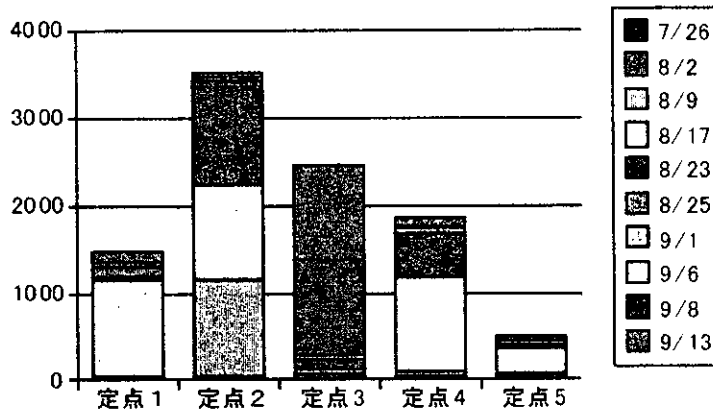


図3. 腸炎ビブリオ陽性試験管数より求めたMPN値(定点)

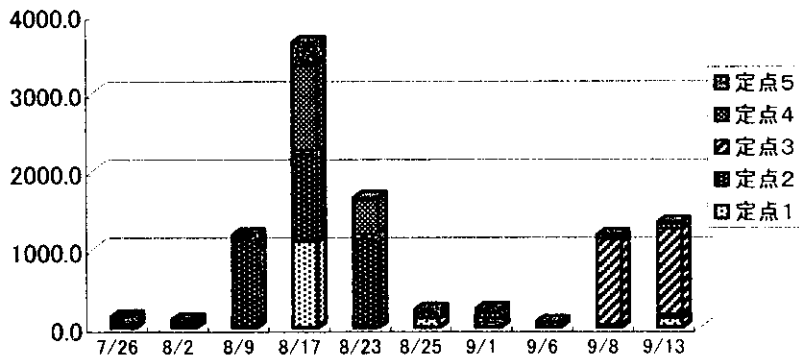


図4. 腸炎ビブリオ陽性試験管数より求めたMPN値(採水日)

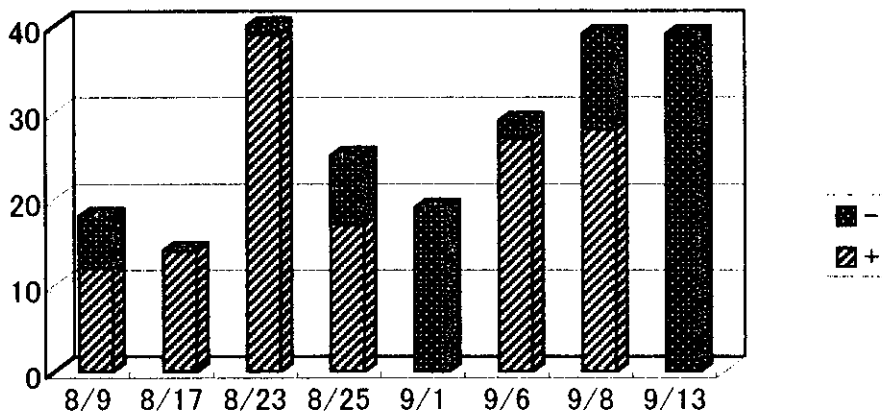


図5. 神奈川現象陽性株におけるtdh遺伝子の検出

研究協力者 研究報告書

腸炎ビブリオの検出法の検討 (海水)

研究協力者 小沼博隆 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨 海水の水より腸炎ビブリオ(特にヒトに臨床症状を起こす毒素を産生するもの)の検出を検討した。特に、PCRでの検出法について検討を行った。腸炎ビブリオ検出のためにはToxRそして主な毒素として知られているTdhの産生遺伝子を検出することにより、腸炎ビブリオの毒素産生株を検出する系を構築した。

A. 研究目的

最近、腸炎ビブリオ食中毒の発生件数が再増加してきた。原因の追求と予防対策のため、腸炎ビブリオの検査法の検討と海の腸炎ビブリオ汚染実態等を検討することになった。特に迅速検査法としてのPCRを中心として検討することになった。

extension 72°C 1 min 30 sec.
20 cycles

B. 研究方法

PCRのプライマーについては、主な毒素と考えられている耐熱性溶血毒(Tdh)産生遺伝子を検出するもの、また、腸炎ビブリオの検出として、ToxR産生する遺伝子を検出するものを中心に検討を行った。

耐熱性溶血毒産生遺伝子(*tdh*)を検出
TaKaRa (VPD-1/2)による*tdh*の検出

251 bp
denature 94°C 1 min,
annealing 55°C 1 min,
extension 72°C 1 min
35 cycles

腸炎ビブリオの確認 (*toxR*)

J. Clin. Microbiol., 37,1173-1177

368 bp
denature 94°C 1 min,
annealing 63°C 1 min 30 sec.,

PCR サンプルの調整法

培養液 1 ml を遠心 5000 rpm, 5 min 沈
さ

100 μl 滅菌蒸留水で vortex

96°C, 5 min 加熱後、13000 rpm, 10 min
上清

腸炎ビブリオの確認

1% bacto-tryptone (Difco) 0, 3, 6, 8,
10%食塩

保存用培地 (島田先生から)

酵母エキス 3 g、casitone (Difco) 10 g,
NaCl 10 g, 蒸留水 1000 ml 水酸化ナ
トリウムで pH 調整 pH 7.0

Bacto-agar (Difco) 4 g

そのほかに、*tdh*と*toxR*一挙検出のため、
PCRの検出系を考案した。

予備実験としてあさり剥き身と塩抜きアサ
リを購入して培養液に関して検討した。食
塩ポリミキシンを培養液とした。

本実験としては、千葉のK地区の海水と砂
さらに、関西の海水について実験を行った。
海水は1 Lを採取して、フィルター上で濃

縮し、フィルターを100MLアルカリペプトン水で24時間36°C培養し、その培養液をTCBS寒天平板に培養して、緑色のコロニーを腸炎ビブリオと判定した。さらに確認のために、TSI斜面培地と1% bacto-tryptoneに0 or 7%食塩添加により併用して腸炎ビブリオの判定を行った。さらにTdh産生株の検策をPCRで行った。我妻培地での結果は(BML)に依頼した。海泥については、10倍量の培養液を加えて、懸濁させ、培養を行った。

C. 研究結果

あさりによる予備実験ではあさりから腸炎ビブリオが検出された。塩抜きあさりの塩水からは腸炎ビブリオは検出されなかった。

Table 1に千葉の海水での実験結果を示した。アルカリペプトン水での培養によって、ポリミキシンでの培養より多くの腸炎ビブリオを検出できることが分かった。アルカリペプトンで培養した濃縮海水のPCRにより明瞭な*tdh*バンドが検出されたが、コロニーとしてのTdh産生株を得ることはできなかった。

Table 2に関西地区の海水についての結果を示した。我妻培地で溶血毒産生が一部に検出されたが、PCRでは検出できなかった。コロニーとしてTdh産生腸炎ビブリオ株を海から検出することはできなかった。

*tdh*と*toxR*検出用プライマーをひとつの反応チューブに添加してのPCR反応によって、両者の検出が可能であることが分かった。このことから、PCR用のDNA溶液による一回のPCRによって、腸炎ビブリオかどうか、さらに、Tdh産生があるかどうか

迅速に検出できることが分かった。

D. 考察

PCRや我妻培地上にTdh産生株が存在すると思われる培養液や菌株は存在するが、分離コロニーとして、我妻培地上で+であり、PCRでも陽性バンドを示す菌かぶは検出されなかった。ただ、あさりの実験から、アルカリペプトン水での培養により、多くの腸炎ビブリオ菌株を得る可能性が多くなるように思われたことから、最初にアルカリペプトン水での培養に続いてポリミキシンでの培養がTCBSでの分別培養を容易にすると思われた。

Table 1

TCBS検出率	アルカリペプトン						ポリミキシン			
	海水		濃縮海水(PCR-TDH, TOXR)		海泥		海泥			
	0.1 ml	1 ml	10 ml	0.1 ml	1 ml	10 ml	0.1 ml	1 ml	10 ml	
千葉県K地区(市場そば)	0/3	2/3	2/3	1/1	(+), (+)	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3
同地区(遊泳可の砂場)	0/3	2/3	3/3	1/1	(+), (+)	0/3	1/3	2/3	0/3	0/3

Table 2

材料	形態	我妻培地	トリプトン水		腸ビ判定	PCR	
			0%NaCl	7%NaCl		toxR	tdh
海水1 800m	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水2 2500m	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水2 2500m	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水3 5km	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水4 2000m	カジトン	—	—	+	+	+	—
海水4 2000m	カジトン	+	—	+	+	+	—
海水4 2000m	カジトン	+	—	+	+	+	—
海水4 2000m	カジトン	+	—	+	+	+	—