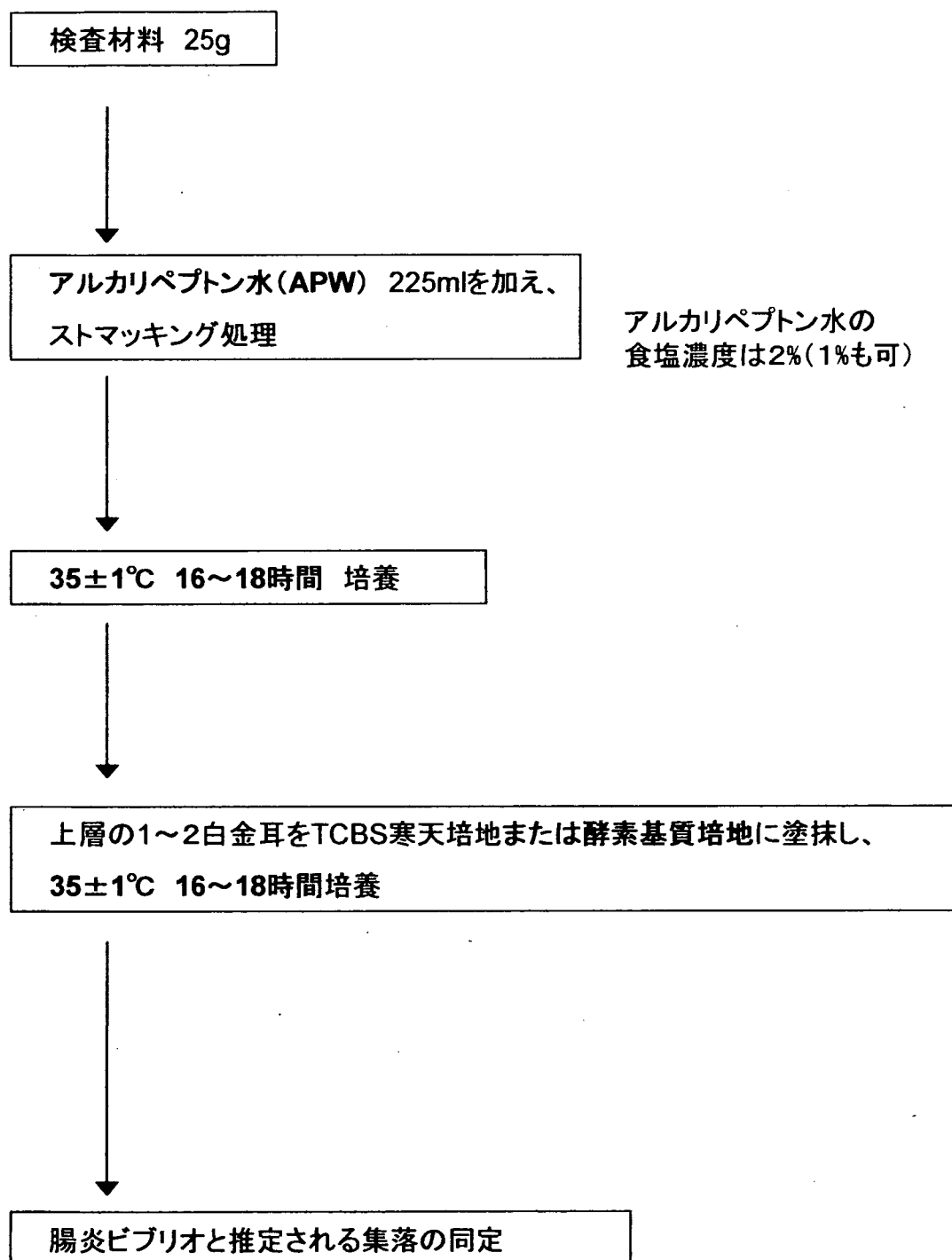


表1 腸炎ビブリオの性状

T S I寒天				L I M培地			発 育		V P	オキシダーゼ
斜面	高層	硫化水素	ガス	リジン	インドール	運動性	O %	S %		
赤	黄	-	-	+	+	+	-	+	-	+

資料2

腸炎ビブリオ検査方法・定性法



資料 3

B. 腸炎ビブリオ試験法・定量法(作業部会案:ステージ 2)

1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8, NaCl 1%も可) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理し、検体の 10 倍希釈液を作成し試料とする。次に検体の 10 倍希釈液 1ml を APW 9ml の入った試験管に入れ、検体の 100 倍希釈液を作成する。

検体の 10 倍希釈液及び 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管にそれぞれ 1ml ずつ接種し、また、検体の 100 倍希釈液を APW 10ml の入った 3 本の試験管に 0.1ml ずつ接種する。

35±1℃、16~18 時間培養後、各試験管の上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または 酵素基質培地に塗抹し、35±1℃、16~18 時間培養する。培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定し、各段階に希釈した試験管の陽性本数を最確数表にあてはめて、1g あたりの最確数を求める。

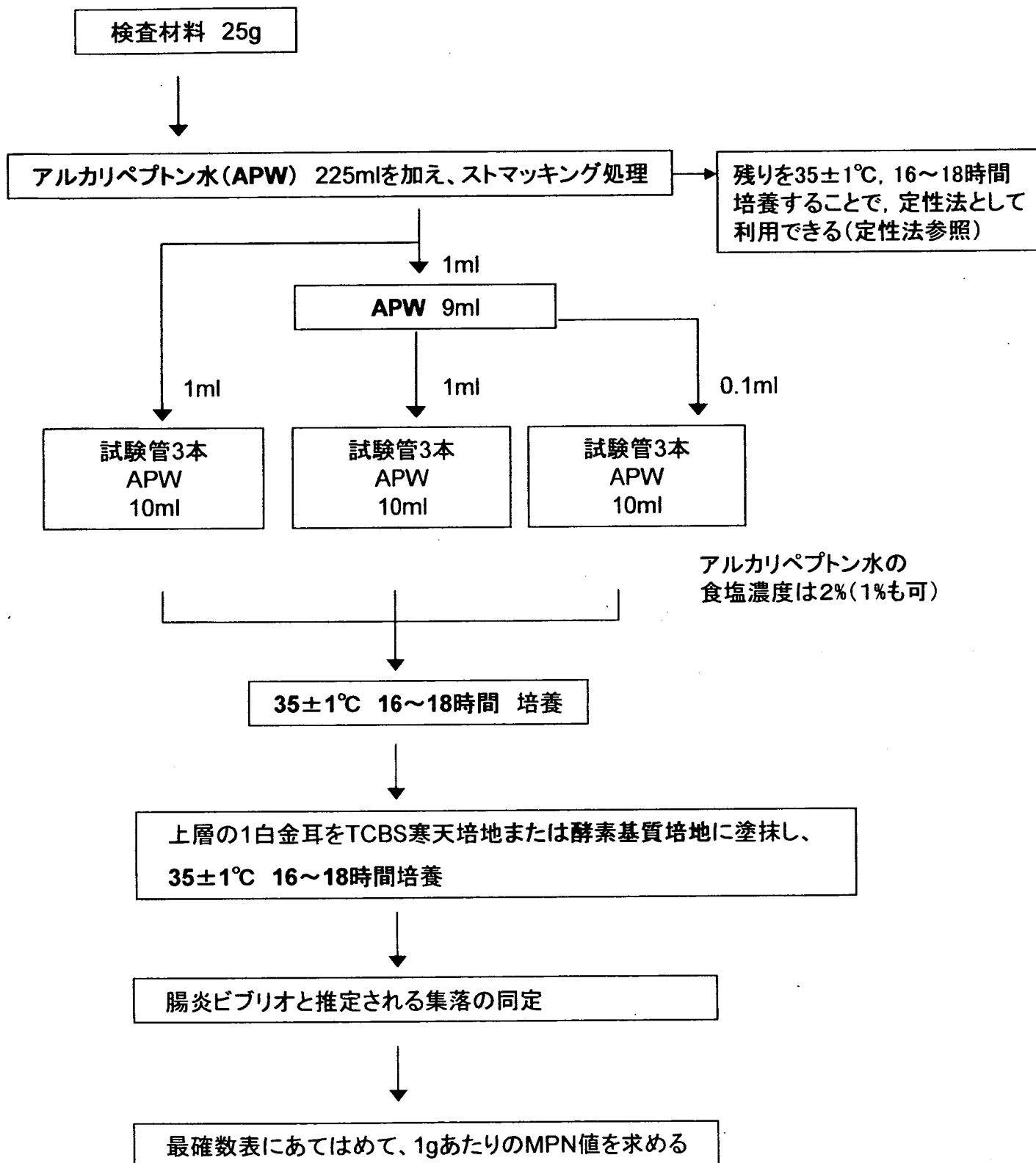
25g に APW 225ml を加えた 10 倍乳剤液は、そのまま培養して定性法として利用できる。

2. 同定

定性法に準ずる。

資料 4

腸炎ビブリオ検査方法・定量法



H19 厚労科研費腸炎ビブリオ報告書

腸炎ビブリオ 表 1-9 の別冊

製本版報告書の中に腸炎ビブリオの表 2-9 の挿入をおとしてしまいました。お詫びいたしますとともに、この別刷りを添付いたします。なお、表 1 については製本版に含まれていますが、再度この別刷りにも掲載いたしました。ご参照下さい。

主任研究者

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部

宮原美知子

表1 確認培地の食塩濃度の検討

施設	供試 菌株数	食塩濃度1%		食塩濃度2%		食塩濃度*による 判定結果の差異
		発育	判定	発育	判定	
A	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
B	100	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
C	80	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
D	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
E	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し

供試確認培地: TSI寒天、LIM培地、VP半流動寒天培地

* 1% および 2%

表2 プライマー *toxRn*, LDHの特異性の比較:A施設

菌種	供試 菌株数	陽性数	
		<i>toxRn</i>	LDH
<i>V. parahaemolyticus</i>			
Type Strain	1	1	1
食品	12	12	12
環境	35	35	35
ヒト	57	57	57
小計	105	105	105
<i>V. cholerae</i> non-O1			
	4	0	0
<i>V. mimicus</i> (Type Strain)			
	1	0	0
<i>V. fluvialis</i> (Type Strain)			
	1	0	0
<i>V. vulnificus</i>			
	4	0	0
<i>V. alginolyticus</i>			
	4	0	0
小計	14	0	0

結果

1. *toxRn* PCR とLDH PCRの結果は一致した。
2. *toxRn* PCRでは腸炎ビブリオ以外の供試株でも陽性バンドと一致する位置に薄いバンドがみられたが、反応系でのプライマー濃度が高すぎたことに起因するものと考えられた。
3. LDH PCRでは腸炎ビブリオ以外の株で判定を妨害するエキストラバンドはみられなかった。

表3 プライマー *toxRn*, *toxR*, LDH の特異性の比較: B施設

菌種	供試 菌株数	陽性数		
		<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>	LDH
<i>V. parahaemolyticus</i>	189	188	188	188
<i>V. cholerae</i> O1	3	0	0	0
<i>V. cholerae</i> O139	1	0	0	0
NAG	7	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	6	0	0	0
<i>V. fluvialis</i>	6	0	0	0
<i>V. vulnificus</i>	25	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	105	4	4	0

結果

1. いずれのプライマーでも腸炎ビブリオは陽性となった。
2. *V. alginolyticus* 105株のうち4株が *toxRn*, *toxR* 共に陽性となった。

表4 プライマー-*toxRn*, *toxR* の特異性の比較(腸炎ビブリオ):C施設

血清型	TDH 産生性	供試菌株:由来				陽性数	
		食品	環境	ヒト	計	<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>
O1:K1	-			1	1*	1	1
O1:K25	+			3	3	3	3
O2:K3	+			6	6	6	6
O2:K28	-		1		1	1	1
O3:K6	+	3	6	49	58	58	58
O3:K6	-	5	1		6	6	6
O3:K7	+			1	1	1	1
O3:K29	+			1	1	1	1
O3:K37	+			2	2	2	2
O3:K58	+			1	1	1	1
O4:K4	+			1	1	1	1
O4:K8	+			4	4	4	4
O4:K9	+	1		1	2	2	2
O4:K11	+			1	1	1	1
O4:K68	+			4	4	4	4
O5:K68	+			2	2	2	2
O8:K20	-		1		1	1	1
UT	-	3	2		5	5	5
合計		12	11	77	100	100	100

* ATCC 17802 (TRH産生株)

結果

1. 供試した腸炎ビブリオ100株は、いずれのプライマーでも特異的な増幅バンドの形成がみられた。

表5 プライマー *toxRn*, *toxR* の特異性の比較(腸炎ビブリオ以外):C施設

菌種	由来	供試 菌株数	陽性数	
			<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>
<i>V. cholerae</i> O1(エルトール)	ヒト	9	0	0
<i>V. cholerae</i> non-O1	ヒト	3	0	0
<i>V. mimicus</i>	環境	3	0	0
<i>V. vulnificus</i>	環境	34 *	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	食品	5	0	0
合計		54	0	0

* O1群:6株, O3群:3株, O4群:8株, O5群:4株,
O6群:7株, O7群:1株, 不明:5株

結果

1. 供試したその他のビブリオ属菌種54株は、いずれのプライマーでも増幅バンドの形成がなかった。

表6 プライマー *toxRn*, *toxR* の特異性の比較: D施設

菌種	供試 菌株数	陽性数	
		<i>toxRn</i>	<i>toxR</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>			
食品	8	8	8
環境	115	114	113
ヒト	21	21	21
小計	144	143	142
<i>V. alginolyticus</i>	1	0	0
<i>V. aestuarianus</i>	1	0	0
<i>V. campbellii</i>	2	0	0
<i>V. harveyi</i>	15	0	0
<i>V. natriegenes</i>	1	0	0
<i>V. nigripulchritudo</i>	1	0	0
<i>V. olivaceus</i>	1	0	0
<i>V. penaeicida</i>	3	0	0
<i>V. pomeroiyi</i>	1	0	0
<i>V. ponticus</i>	1	0	0
<i>V. rotiferianus</i>	9	0	0
<i>V. splendidus</i>	1	0	0
<i>V. vulnificus</i>	24	0	0
<i>Vibrio</i> sp.	34	4	4
ND (性状は明らかに <i>V. parahaemolyticus</i> でない)	10	0	0
bacterium	9	1	1
<i>Photococcus caeruleum</i>	4	0	0
<i>Photococcus leiognathi</i>	1	0	0
<i>Shewanella algae</i>	4	0	0
<i>Shewanella loihica</i>	1	0	0
小計	124	5	5

結果

1. *V. parahaemolyticus*については、*toxRn* PCRとLDH PCRの結果は一致した。
2. *V. parahaemolyticus*以外の一部の菌が、いずれのプライマーでも陽性となった。

表7 プライマー *toxRn*, LDH の特異性の比較: E施設

菌種	由来	供試 菌株数	陽性数	
			<i>toxRn</i>	LDH
<i>V. paraheamolyticus</i>	食品	16	16	16
	環境	48	48	48
	ヒト	19	19	19
小計		83	83	83
<i>V. cholerae</i> non O1	食品	5	0	0
	環境	24	0	0
<i>V. fluvialis/V. furnissii</i>	食品	5	0	0
	環境	19	0	0
<i>V. vulnificus</i>	食品	7	0	0
	環境	17	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	食品	14	0	3
	環境	13	0	0
<i>Aeromonas</i>	食品	1	0	0
	環境	2	0	0
その他	環境	21	0	0
小計		128	0	3

結果

1. *V. paraheamolyticus*については、*toxRn* PCR と LDH PCRの結果は一致した。
2. *V. alginolyticus*に LDH PCRで陽性バンドと一致する位置にバンドがみられた株が3株あった。

以上のことから、*ToxRn* PCRの方が特異性が高いと思われる。

表8 プライマー *toxRn* の特異性(まとめ)

	供試菌株数	性数 (%)
腸炎ビブリオ	621	619 (99.7)
その他ビブリオ属菌	473	9 (1.9)

表9 プライマー-*toxRn*, *toxR*, LDH の感度比較

プライマー	菌 数 (cfu/ml)				
	8.2×10^6	8.2×10^5	8.2×10^4	8.2×10^3	8.2×10^2
<i>toxRn</i>	2/2*	2/2	2/2	1/2	0/2
<i>toxR</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
LDH	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

* 陽性数/供試数

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）

「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」

平成 19 年度 分担研究報告書

「食品を対象とした腸炎ビブリオ検査方法に関する研究」

分担研究者 荒川 英二 国立感染症研究所

協力研究者・主任研究者

宮原 美知子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 現行の食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法は生鮮魚介類を中心に検討しているにもかかわらず結果の確定まで3・4日の日数を要している。食品成分規格の検査であるが、結果確定したときにはすでにその食品は消費されていることが想定されることから、この検査結果判定にかかる日数の短縮化が望まれている。そこで、最初のAPW（アルカリペプトン水）での増菌後のPCR判定を取り入れる方向で判定までの時間短縮化を検討した。現在まで腸炎ビブリオの検出に使われているプライマーは特異性に多少の難点があることから、腸炎ビブリオだけを検出するプライマーを設定し、検討を行った。特異性については、同じ研究班でビブリオの多株に対してこのプライマーを使つての検討が行われている。ここでは、接種実験に用いた結果中心に報告する。同じ培養法で最後まで挙動が一致し、また海産物に腸炎ビブリオと一緒に汚染が多いと考えられるアルギノリティカスを腸炎ビブリオを菌数比で4・400倍量接種しても食品接種実験において少数菌の腸炎ビブリオがPCRで検出可能であることが分かった。また、食品検体をAPWで10倍希釈培養を行った場合には、規制値のMPN 100> /g菌量接種した検体は約4時間の培養でPCRにより検出できることがわかった。

A. 研究目的

現行の食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法は生鮮魚介類を中心に検討しているにもかかわらず結果の確定まで3-4日の日数を要している。食品成分規格の検査であるが、結果確定したときにはすでにその食品は消費されていることが想定されることから、この検査結果判定にかかる日数の短縮化が望まれている。この短縮化を目的にPCR判定の検討を行った。

B. 研究方法

1. 配列解析によるプライマーの設定

遺伝子解析を行い、*toxR* 遺伝子の塩基配列解析を行って、腸炎ビブリオ特異的な部分を探索し、腸炎ビブリオ特異的な検出用プライマーを設定した。

2. 腸炎ビブリオとアルギノリティカスの混合接種による検出実験

腸炎ビブリオのMPN法での定量実験を元に接種実験を行った。スルメイカを食品検体とした。25gを1試料として、すべての試料にアルギノリティカス 3.6×10^4 個接種した。1群は2試料として検討を行った。また、腸炎ビブリオを0, 90, 900, 9,000 個接種して、APWを培養液として、MPN法での培養を行い、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 22 ± 2 時間培養した。PCRによる腸炎ビブリオ判定のために1ml APW 培養液(主に100倍希釈分)を採取し、遠心後に滅菌蒸留水で100 μl を加え、ボルテックス攪拌後、 96°C , 5min 加熱を行い、13,000 rpm で遠心し、上清をDNA溶液として、冷蔵保存するとともに、PCRでのサンプル溶液とした。APW 培養液はクロモアガービブリオに塗抹を行って、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 22 ± 2 時間培養後に腸炎ビブリオを検出した。

3. 培養時間の検討

イカを食品検体とした。1,040, 104, 10.4,

1.04 個/g 腸炎ビブリオ接種2試料、4群と非接種試料 1試料によって $35 \pm 1^\circ\text{C}$ での培養を行った。静置培養2時間後から、3-7時間後まで、PCRのDNA溶液を採取し、腸炎ビブリオのPCR判定を行った。

C. 結果

1. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* と *Vibrio cholerae* の *toxR* 遺伝子塩基配列解析により、シーケンス名: Vp-toxRn

配列: 5'-GCTTTCTTCAGACTCAAGCTCAA-3'

シーケンス名: Vp-toxRnr

配列: 5'-CGCAAATCGGTAGTAATAGTGC-3' をプライマーとして設定した。その解析に関しては資料1にデータを示した。また、PCRサイクルについては、ホットスタートでの 94°C , 30s, 63°C , 30s, 72°C , 30s のサイクルを30回行い、 72°C で7分間後にPCR終了し、 4°C にて保存とした。PCR増幅産物は230bpである。

2. 塗抹培養の結果とPCRでの検出結果は100%一致していた。非接種群は陰性の結果であった。

3. 1,040 個/g 腸炎ビブリオ接種の試料は3時間培養後から、104 個/g 腸炎ビブリオ接種試料では、4時間後から、10.4 個接種では、5時間後、1.04 個接種では6時間後には培養液から腸炎ビブリオをPCRで検出できた。また、24時間培養後に塗抹を行った結果は24時間後に分離寒天培地上で腸炎ビブリオのコロニーを検出することができた。

D. 考察

新しく設定したプライマーはアルギノリティカスの過大数接種によっても妨害を受けずに少数の腸炎ビブリオのPCRの結果を出すことが確認された。この結果はもちろん培養と塗抹に

よっても一致した結果が得られた。腸炎ビブリオの検査法は培養法もちろんアルギノリティカスの妨害を受けないことが確認された。

腸炎ビブリオのMPN法を使った判定は通常のやり方では、3-4日かかることから、この培養のやり方と同じ結果の推定に役立つ培養によるPCR判定が検査日数の短縮化に役立てると考えられる。今回検討した培養のやり方によっても、4時間で検出されるものは腸炎ビブリオが100個/gを超えることが想定されることから、ここで陰性であったものは、成分規格を超えないことが判定される。

今回は1種類の食品と1株の腸炎ビブリオを使つての検討であったが、さらに多くの検討を重ねることによって確かめられれば、実際の検査に応用し、4時間培養してPCRで腸炎ビブリオが検出されなければ、腸炎ビブリオ規格を通過と見なすような運用法も考えれば、検査の効率化につながる。

E. 結論

新しく設定されたプライマーを使つてのPCRによる腸炎ビブリオ検出は実際に特異性が高く検出効率がよいことが分かった。

また、培養法を応用して、PCRを使つての腸炎ビブリオ定量の推定も可能ではないかと提案したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、荒川英二：食品からの腸炎ビブリオ迅速検出法の検討

防菌防黴誌、投稿中(2008)

2. 学会発表

宮原美知子、荒川英二：腸炎ビブリオの食品からの迅速検出法の検討。

第41回腸炎ビブリオシンポジウム、2007年11月

Michiko Miyahara, Makoto Miyahara, Eiji

Arakawa : Detection of *Vibrio*

parahaemolyticus by PCR in food and effect of electron-beam irradiation on the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio* 2007, 2007年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

VatoxRS.nuc	684	CTTCTGTTCGCTATTGTTATTACGAACCCCTGCGGAATCCCAATCCGTCAGATTGGT	744
VctoxRS.nuc	720	CCGAGCAAACACAGCTTTAAACCCCTAACGGTTGTCGATGGCGTAGCCGTCATATGCCG	780
		*. * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	744	GAGTATCAGAACGTACCAGTGATGACACCTGTAATCACC CGCAAATCAACAACCTGGTTG	804
VatoxRS.nuc	744	GAGTATCAAAGTGACCGGTGATGACACCTGTAATCACCCTCAAATCAACAACCTGGTTG	804
VctoxRS.nuc	780	AAT-----AACCACCTGATCTTTCAAACCTGGCTA	810
		*. * * * * * *	
VptoxRS.nuc	804	CCTTCTATTGAGCAGTGCATTGAACGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTCGTTACCA	864
VatoxRS.nuc	804	CCTTCAATAGAGCAATGCATTGAGCGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTCGTTGCCA	864
VctoxRS.nuc	810	CCGTCAATCGAACTGTGCGTTAAAAAATACAATGAAAAGCATACTGGTGGGCTCAAGCCG	870
		*. * * * * * *	
VptoxRS.nuc	864	GTGGAAGTAATTGCCACTGGCGGACAAAATAACCAGCTGATTTGAACTACATTCATGAC	924
VatoxRS.nuc	864	GTTGAAGTGATTGCCACTGGTGGACAAAATAACCAGCTGATTTGAACTACATTCATGAC	924
VctoxRS.nuc	870	ATAGAAGTCATTGCCACAGGTGGACAAAATAACCAGTTAACGCTGAATFACATTCACAGC	930
		* * * * * * *	
VptoxRS.nuc	924	AGCAACCCTCGTATGAGAACGTGACATTGCGTATTTTCGAGGTCAAATGATCCAACA	984
VatoxRS.nuc	924	AGTAACCCTCTTACGAGAACGTAAACCTGCGTATTTTCGAGGTCAAACGATCCAACA	984
VctoxRS.nuc	930	CCTGAAGTTTCAGGGGAAAACATAACCTTACGCATCGTTGCTAACCCCTAACGATGCCATC	990
	 * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	984	GACATCTGCAAATAA-AGGAGGCCAGCATGAAGATTAAGTAGCATCTGCGGTTTGGCC	1043
VatoxRS.nuc	984	GACATCTGCAAATAA-AGGAGGCCAATATGAAGATTAAGTAGCATCTGCGGTTTGGCC	1043
VctoxRS.nuc	990	AAAGTGTGTGAGTAGGATCTTGCTATGCAAAATAGACACATCGCCATGGGTATFCTTCTG	1050
		* * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1043	GTATCTATCCTTTTTCAGTGGTTGGTTGTACTGGGGCAGTGACCTTAAAGTTGAGCAAGTG	1103
VatoxRS.nuc	1043	GTATCCGTTCTTTTTCAGTAGTTGGTTGTATTTGGGGAAGTGACCTTAAAGTTGAGCAGCTC	1103
VctoxRS.nuc	1050	CTCTCTCTGCTGCTCAGTAGCTGGTTATATTTGGGGAGTGACTTCAAGCTTGAGCAAGTG	1110
		* * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1103	CTTACATCAAATGAATGGCAGTCAACCATGGTGACTGTGATTACTGATAACTTGCCAGAC	1163
VatoxRS.nuc	1103	CTCACAGCAAACGAATGGCAGTCCGCATGGTGACAGTCATTACAGACAGCTTGCCCTGAC	1163
VctoxRS.nuc	1110	TTAACCTCTCGAGAATGGCAGTCCAAAATGGTCTCTCTGATTAAGACCAACAGCAACCCGC	1170
		* * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1163	GATACTGTAGGCCCTTACGTCGTGTAATGTGGAGTCGAACGTTAAGTACCTACCGAAT	1223
VatoxRS.nuc	1163	GATACTGTCCGCCACTACGCCGAGTTAATGTTGAATCAAACGTTAAATATCTCCCTAAT	1223
VctoxRS.nuc	1170	CCGGCTATGGGGCCACTCAGTCGGGTAGACGTCACCTTCCAATGTGAAATATCTCCCTAAT	1230
	 * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1223	GGCGATTACATTCGCGTGGCAAACATCAAATGTTTCGCACAAGGCTCGACGGCTGAATCG	1283
VatoxRS.nuc	1223	GGTGACTATATTCGCGTAGCAAATATCAAATATTCGCTCAAGGCTCAACCGCAGAATCA	1283
VctoxRS.nuc	1230	GGCATTATTTACGGGTTTCAATCGTAAAGCTATTTCCGATGACAATAGTGCAGAAAGC	1290
		* * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1283	ACAATTAATATTTTCAGAGAAAGGTCGCTGGGAAGTGAGTGATAACTATCTGCTTGTTCCT	1343
VatoxRS.nuc	1283	ACGATAAATATCTCGGAAAAGCCGCTGGGAAGTAAGTGACAACACTATTTGTTGGTCTCG	1343
VctoxRS.nuc	1290	GTCATTAATATCTCCGAATTTGGTGAATGGGATATCAGCGATAATTACCTTTTGGTTACG	1350
		. . * . . * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1343	CCTTCTGAGTTCAAAGATATTTCTTCTCTCAATCCAAGGATTTTCTGAAGCGCAACTA	1403
VatoxRS.nuc	1343	CCTTCGGAGTTTAAAGATATTTCTTCTCTCAATCAAAGACTTTTCCGAAGCAGACGTA	1403
VctoxRS.nuc	1350	CCAGTCGAGTTTAAAGATATTTCTGTAACCAAAGCAAAGACTTTACTGACGAGCAATTG	1410
		* * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1403	CGCTTAATTAATCAAATCTTTAAGCTAGATGCTGAACAAAGCCGCCAATTGACGTGGTT	1463
VatoxRS.nuc	1403	CGTTTGATTACTCAAATTTTTAAGCTAGATGCGGAGCAAAGTCCGTCGATTTGACGTCGTT	1463
VctoxRS.nuc	1410	CAGCTGATTACTCAACTGTCAAGATGGATGCACAACAAAGTCCGTCGAGTCGACATTTGTT	1470
		* . . . * * * * * * *	
VptoxRS.nuc	1463	AATGAGAAGACTCTGTATTAAGCTAGCTTAATCAGGTTCTACGGTACTGTTTAGAAAC	1523
VatoxRS.nuc	1463	AACGAAAAAACAATTTGCTACTAGCTTGAACCAAGGTTCTTCGTCGACTGTTTAAAAAC	1523
VctoxRS.nuc	1470	AACGAAAGAACCATTCTTTTACAGCTTAAAGTCATGGTTCTACCGTACTGTTTACAGTAAT	1530

