

新たな腸炎ビブリオ試験方法として、作業部会案を提案することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 現行法の問題点の整理

現行法の中で、検査対象菌、検査に要する日数、増菌培養法等の 14 項目についての問題点を整理した。

### 2. 検査法の比較検討

日本の「食品衛生検査指針」、米国 FDA の「Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004)」、スイスの International Organization for Standardization が提供している「International Standard (ISO) 8914, 1990」を、比較検討するべき世界的な方法と考え、具体的な検査法の比較検討を行った。

### 3. 培養法の検討

分離培地、選択増菌培地、確認培地について、培養時間、培養温度、培地に添加する食塩濃度について検討した。

### 4. 腸炎ビブリオの迅速同定法としての PCR 法の検討

腸炎ビブリオを特異的に検出する PCR 法に用いるプライマーは、市販されていない。研究的に報告されているプライマーには、*toxR* (Kim *et al.*, JCM 37, 1173-1177, 1999) や LDH (石橋ら, 大阪府立公衛研所報, 食品衛生編 23, 67-71, 1992) があるが、非特

異反応等の問題点も指摘されている。そこで、腸炎ビブリオと *V. alginolyticus* の *toxR* 遺伝子をシークエンスして配列を決定し、腸炎ビブリオを特異的に検出するプライマーを作製す、その特異性や検出検出感度を検討する。

## C. 研究結果

### 1. 試験法作成のための基本方針

現行法の問題点を整理して、試験法作成のための基本方針をまとめた (表 1)。

### 2. 国内・国外の腸炎ビブリオ試験法の比較検討

日本の「食品衛生検査指針」、米国 FDA の「Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004)」、スイスの International Organization for Standardization が提供している「International Standard (ISO) 8914, 1990」について比較検討し、記載されている分離培養法を表 2 に、同定試験法を表 3 にまとめた。

### 3. 培養法の検討

#### 1) 分離培地の検討

腸炎ビブリオの分離培地として、主に TCBS 寒天が使用されている。しかし近年、糖分解を指標としない新しい酵素基質培地が開発され市販されているのでその有効性について検討した結果、①培養時間が長くなっても集落の色調があまり変化しないため、腸炎ビブリオ集落が分かりやすい ②

他のビブリオ属菌と集落の色調が全く異なるので見つけやすい という利点があることが確認された(表4, 表5, 表6, 図1)。そこで分離培地としては, 現行の TCBS 寒天培地の他に, 酵素基質培地も選択できる事が適当であると結論した。

## 2) 培養温度

培養温度は, サルモネラや黄色ブドウ球菌の培養温度と統一するために, 現行の 37℃から, 35±1℃に変更することとした。この温度変更は, 腸炎ビブリオの発育に影響を及ぼさないことを確認した。

## 3) 培養時間

現在の告示法では, 「一夜培養」となっており, 培養時間が非常に曖昧な表記となっている。ビブリオ属菌の発育速度は, 他の腸管系病原菌と比較しても速いため, 培養時間が長いと腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌が多く発育してしまうため, 目的菌の釣菌が非常に困難になる。また, TCBS 寒天上の集落は, 培養時間が長くなるに伴い糖分解が進み, 集落の色調が変化してしまう。これらのことから培養時間は, 他の腸管系病原菌の培養時間よりやや短い 16~18 時間が妥当であるとした。

## 4) リジン脱炭酸試験の培養時間

告示法ではリジン単味試験で 1~4 日となっている。しかし, 実際の検査の場で, リジン単味試験が行われる

ことはほとんどなく, 大部分の施設で LIM 培地が使用されている。また, 腸炎ビブリオ検査において, LIM 培地を使用しても問題は全くないことから, 本試験は, LIM 培地で行い, 培養時間は, 18~24 時間と変更することにした。

## 5) 耐塩性試験

現行の告示法では, 食塩濃度 0, 3, 8, 10%で発育を確認することになっているが, 意義の大きい 0, 8%の 2 種類の濃度に変更した。

基礎培地は Nutrient Broth 以外にも, ペプトン水またはトリプトン水 (pH7.2) を使用しても差し支えないとした。これらの培地については, 腸炎ビブリオ標準菌株を用いて 0%で発育しないこと, 8%で発育することを確認した。

## 6) 増菌培地

病原性株(溶血毒産生株)の検出には, 2次, 3次増菌培養をした方が良いという報告がある。しかし, 本研究において, 「一般食品検査法では, 病原株・非病原株を問わず, 腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)を対象とし, 必要以上に検査日数を要する検査は行わない」という方向性を示している。

一方, 現行法では増菌培地として「アルカリペプトン水」を用いることになっている。本試験法では, 腸炎ビブリオを対象とすることから, 腸炎ビブリオが発育するのに最も適した塩分を加え, 「2%食塩加アルカリペプトン水(1%食塩濃度も可)」で増菌す

ることが妥当であると考えた。

#### 7) 確認培地の食塩濃度の検討

腸炎ビブリオの確認培地として使用する TSI 寒天, LIM 培地, VP 半流動寒天培地の食塩濃度について 5 施設でそれぞれ検討した結果, 供試した腸炎ビブリオ 330 株の成績は, 全株共, 食塩濃度 1%, 2% でいずれも同一であった。発育は 2% の方がやや旺盛であったが, 成績に差異は認められなかった (表 7)。

以上の成績から, 上記確認培地の食塩濃度は 2% (1% も可) に変更した。

### 2. 腸炎ビブリオの迅速同定法としての PCR 法の検討

#### 1) プライマーの設計

腸炎ビブリオ, *V. alginolyticus*, および *V. cholerae* の *toxR* 遺伝子塩基配列解析により,

シーケンス名: Vp-toxRnf

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。その解析に用いたデータを図 2 に示した。PCR 反応は, ホットスタートとして, 94°C, 30s・63°C, 30s・72°C, 30s を 30 サイクル, 最終伸長を 72°C, 7 分間とした。PCR 増幅産物は 230bp である。

#### 2) 各種プライマーの特異性の検討

3 種類のプライマー *toxRn*, *toxR*, LDH の特異性について, それぞれ 5 施設 (A, B, C, D, E) で検討した成績を

表 8, 表 9, 表 10, 表 11, 表 12, 表 13 に示した。

本研究班で開発したプライマー *toxRn* の特異性の検討の成績をまとめると, 腸炎ビブリオ菌株 621 株のうち 619 株 (99.7%) が陽性を示した。検出出来なかった菌株は, いずれも環境由来株であった。一方, その他のビブリオ属菌 473 株では 9 株 (1.9%) が陽性となる非特異反応が確認された (表 14)。非特異反応の認められた菌株は, *V. alginolyticus* 4 株, 同定できなかった環境由来の *vibrio* 属菌等 5 株であった。これらの菌株は, プライマー *toxR* でも同様の反応が認められた。

#### 3) 各種プライマーの検出感度

3 種類のプライマー *toxRn*, *toxR*, LDH について, 確実に検出できる感度を検討した結果, *toxRn* は腸炎ビブリオ菌数  $10^4$  cfu/ml であった。一方, *toxR* および LDH は  $10^2$  cfu/ml であった (表 15)。

### D. 考察

前年度までに本研究で策定した「腸炎ビブリオ検査の基本方針」をもとに, 現在示されている告示法の改良を行い, 標準法の作業部会案を提案した (資料)。その際, 腸炎ビブリオ試験法も, サルモネラ作業部会や黄色ブドウ球菌作業部会が提案する試験法と調和を図ることが必要であるため, 特に, 培養温度等について統一を図った。

次に, 腸炎ビブリオの迅速同定法と

して、開発したプライマー *toxRn* を用いた PCR 法について検討を行った。*toxRn* は腸炎ビブリオを特異的に検出したが、621 株のうち 2 株を検出できなかった。その株はいずれも環境由来株であった。その他のビブリオ属菌 473 株のうち 9 株が陽性となったが、そのうち 4 株は *V. alginolyticus* であった。*V. alginolyticus* は腸炎ビブリオと塩基配列の相同性が非常に高いと報告されており、株によっては稀に *toxR* 遺伝子内に設計したプライマーによって非特異的に検出されてしまうことが示唆された。既に報告されて研究的に広く使用されている腸炎ビブリオ検出用プライマー *toxR* および LDH においても希に *V. alginolyticus* をはじめとするビブリオ属菌を非特異的に検出してしまう可能性があり、同様の成績であった。

検出感度を *toxR*, LDH と比較検討した結果、*toxRn* の感度はやや劣る傾向にあったが、いずれのプライマーも  $10^4$  cfu/ml 程度まで検出することができたので、菌の同定には、全く問題のないことが判明した。また、増菌培養液からのスクリーニング試験にも導入可能な感度と考えられる。

#### E. 結論

本研究で明確にした「腸炎ビブリオ検査の基本方針」をふまえ、食品を対象とした腸炎ビブリオ試験方法として、作業部会案を提案した。

更に、検査時間を短縮するために、腸炎ビブリオの迅速同定に PCR 法を応

用することを検討した。PCR 法の感度には問題ないが、特異性についてはもう少し検討が必要であるが、採用可能であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

夏期には腸炎ビブリオ食中毒が多く発生するため、本菌の検査法を確立することは、食中毒予防のためにも重要である。

#### G. 研究発表

〈発表論文〉

小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木 浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖: 東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオ検出と分離菌株の諸性状, 日食微誌, 22:138-147, 2005.

尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌の分離, 日本感染症学雑誌, 80, 383-390, 2005.

尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌の分離, 日本感染症学雑誌, 80:383-390, 2006.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法の作成基本方針

No.	検討項目	検討内容	検討結果
1	対象菌(菌種)	1. 腸炎ビブリオのみ 2. コレラ菌、およびその類縁菌も含める 3. コレラ菌、およびその類縁菌は、別項目とする	・定量検査(MPN法)は、腸炎ビブリオのみ ・輸入食品では、コレラ、エロモナス等の検査も含まれるので考慮する。
2	対象菌(病原性の有無)	1. 腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方) 2. 溶血毒(TDH, TRH)産生菌のみ	汚染状況を調べるので、 1. 腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)
3	定性法 & 定量法	1. 両方法を併記 2. 個別に記載	1. 両方法を併記
4	検査日数	1. 現行:3日~5日 2. 迅速法を考える	1. 標準法としての培養法、 2. 迅速法の両方を作成する。
5	検体採取量	1. 25g (日本の成分規格検査, ISO) 2. 10g 3. 50g (FDA)	1. 25g (日本の成分規格検査, ISO) を採用?、サルモネラ部会、黄色ブドウ球菌部会の方向性と確認する。 ・最初の乳剤作成時に現行の10倍乳剤が良いのか、もう少し濃厚液(例:3倍乳剤)の方が良いのではないかと? → 検討事項
6	スクリーニング法に遺伝子検査法を導入するか否か	1. PCR法 2. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP法) 3. Transcription-Reverse Transcription Concerted Method (TRC法) 4. Realtime-PCR法 5. 他	1. PCR法 が一般的 ・増菌培養液を対象としたPCR法の導入について(MPNの試験管から、PCR法と分離法を行い比較する)→検討事項
7	増菌培地	・アルカリペプトン水 ・食塩ポリミキシンブイオン	・アルカリペプトン水が適当(輸入食品では、コレラ、エロモナス等の検査も含まれる)
8	増菌培養法	1. 1次増菌 2. 2次増菌 3. 3次増菌	迅速性から 1. 1次増菌 のみで良い
9	分離培地	・TCBS寒天 ・酵素基質培地	・TCBS寒天 ・酵素基質培地:現在のところ、市販品はクロモアガーのみ、 クロモアガーは非常に有効
10	濃縮法の導入	免疫磁気ビーズ法	必要なし
11	定量法	1. 菌の分離が必要 2. 遺伝子の検出のみ	1. 菌の分離が必要 ・MPNの試験管から、PCR法を行い、100/g以下と判定する方法について、迅速法として検討する→検討事項
12	PCR法の導入	1. 菌の同定 2. 増菌培地	1. 菌の同定 にPCRを導入可能? →プライマー(腸炎ビブリオに特異的なもの) →検討事項
13	検査対象食品	1. そのまま食べる食品 2. 加工して食べる食品 (例:加熱して食べる食品, Ready-to-eat 食品)	規格・基準のある食品 1. 生食用魚介類 2. ゆでだこ、煮がに 3. 冷凍食品
14	迅速診断法	位置づけ 行政処分の証拠となるか?	

表2 腸炎ビブリオの検査法：分離培養法の比較

材料	食品衛生検査指針				BAM(FDA)				ISO8914
	生食用魚介類	ゆでだこ	海水や食品	魚介類	貝類	調理済食品	HGMF法	食品	
検体の採取と試料の調製	MPN算出 検体 25g, PBS (3% NaCl) 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	菌検出 検体 25g, APW 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	TDH陽性菌検出 海水 1000mlをろ過し たフィルタ－ または検体 25g, APW 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	MPN算出 検体 50g, ストマッ キング処理90秒, PBS 450ml, ストマッキング処理 1分	MPN算出 ストマッキング処理 90秒, PBS 等容 量, 20gにPBS 80ml	MPN算出 検体 50g, ストマッキング処理 90秒, PBS 450ml, ストマッキング処理 1分	MPN算出 PTSで検体の10% 乳剤, ストマッキン グ処理1分, 1mlを HGMFでろ過	菌検出 ストマッキング処理済 み検体 25g, SPBと APWまたはGST 225ml	
希釈	- 乳剤 1ml + APW 10ml, 乳剤 1ml + PBS 9ml → 1ml または0.1ml + APW 10ml (*)	-	10% 乳剤をAPWで 10, 100, 1000倍	10% 乳剤をAPWで 10, 100, 1000倍	10% 乳剤をAPWで 10, 100, 1000倍	10% 乳剤を 2x APWで2倍, APWで10, 100, 1000倍	-	-	
増菌	37°C, 一夜	37°C, 一夜	37°C, 18時間	35±2°C, 一夜	35±2°C, 一夜	35±2°C, 一夜	TSAMS, 35±2°C, 4時間	35または37°C, 7～8時間	
二次増菌	-	-	PCR(tdh)-の時上 層 1ml + SPB 10ml, 37°C, 18時間	-	-	-	-	-	
三次増菌	-	-	上層 0.5ml + SPB 10ml, 37°C, 6時間	-	-	-	-	-	
免疫磁気ビーズ	-	+	-	-	-	-	-	-	
分離培地と培養法	1白金耳, TCBS, 37°C (**), 一夜	1白金耳, TCBS (**), 37°C (**), 一夜	1白金耳, TCBS, 37°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	VPSA, 42°C, 18～20時間	1白金耳, TCBS, 18時 間, TSAT, 20～24時間, 35または37°C	

\*: 乳剤 10ml + APW 90ml → 10ml, 1ml + APW 10ml, 0.1ml + APW 10ml    \*\*: 35°C以上37°C未満    \*\*\*: CHROMagar Vibrio  
 PBS: phosphate-buffered saline    APW: Alkaline saline peptone water    TCBS: Thiosulfate citrate bile sucrose agar  
 PTS: Peptone tween-salt diluent    HGMF: Hydrophobic grid membrane filtration    TSAMS: Tryptic soy agar magnesium sulfate  
 VPSA: V. parahemolyticus sucrose agar    SPB: Salt polymyxin B broth    GST: Saline glucose culture medium with SDS  
 TSAT: Triphenyltetrazolium chloride soya tryptone agar

表3 腸炎ビブリオの検査法：同定試験法の比較

	食品衛生検査指針	BAM(FDA)	ISO8914
コロニー分離			Nutrient agar, 35または37°C, 18~24時間
糖分解試験	TSI, 35~37°C, 18~24時間		TSI, 35または37°C, 24時間
耐塩性試験	Nutrient BrothまたはLab-Lemco Broth (*) +NaCl 0, 3, 8, 10%, 35~37°C, 18時間	TIN0とTIN3, 35±2°C, 18~24時間	
VP試験	VP半流動培地, 35~37°C, 18~24時間		
リシン脱炭酸試験	メラーまたはLIM, 35~37°C, 1~4日間		Saline medium, 35または37°C, 24時間
アルギニン加水分解試験		AGS, 35±2°C, 18~24時間	
グラム染色と顕微鏡観察		TSBまたはTSA斜面, 35±2°C, 一夜	3%食塩水懸濁液
運動性試験		運動性試験培地, 35±2°C, 一夜	APW, 35または37°C, 1~6時間
同定キット		API20E	
オキシダーゼ試験			オキシダーゼ濾紙
好気、嫌氣的発育試験			Saline meat-yeast agar, 35または37°C, 24時間
インドール試験			Tryptone/tryptophane medium, 35または37°C, 24時間
βガラクトシダーゼ試験			Saline 0.25ml + toluene 1drop, 37°C, 2,3分

\*: ペプトン水またはトリプトン水(1%濃度)

TIN0, TIN3: 1% tryptone, 1% or 3% NaCl, AGS: arginine glucose slunt

表4 クロモアガービブリオ寒天培地上の腸炎ビブリオ様集落の同定

食品	検査地域	供試食品数	赤紫集落(+) 食品数	供試集落数	腸炎ビブリオ同定集落数	(%)
魚介類	秋田	14	11	53	53	(100)
	東京	51	24	55	52	(95.5)
	静岡	40	26	95	94	(98.9)
	大分	4	4	26	24	(92.3)
海水	富山	20	20	56	55	(98.2)
	大分	6	6	76	63	(82.9)
		135	91	361	341	(94.5)

表5 クロモアガービブリオ寒天培地上の赤紫集落の同定

食品	検査地域	供試食品数	赤紫集落(+) 食品数	供試集落数	腸炎ビブリオ同定集落数	(%)
魚介類	東京	51	24	63	52	(82.5)
海水	富山	20	20	95	55	(57.9)
合計		71	44	158	107	(67.7)

表6 X-VP寒天培地上の青色集落の同定

食品	供試食品数	青色集落(+) 食品数	供試集落数	腸炎ビブリオ同定集落数	(%)
あさり	26	24	104	101	(97.1)



表7 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8 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9 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10 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	toxRn	toxR
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11 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	
			toxRn	toxR
<i>V. cholerae</i> O1(エルトル)	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12 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. pomeroyi</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13 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14 プライマー *toxRn* の特異性(まとめ)

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

表15 プライマー *toxRn*, *toxR*, LDH の感度比較

プライマー	菌 数 (cfu/ml)				
	$8.2 \times 10^6$	$8.2 \times 10^5$	$8.2 \times 10^4$	$8.2 \times 10^3$	$8.2 \times 10^2$
<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

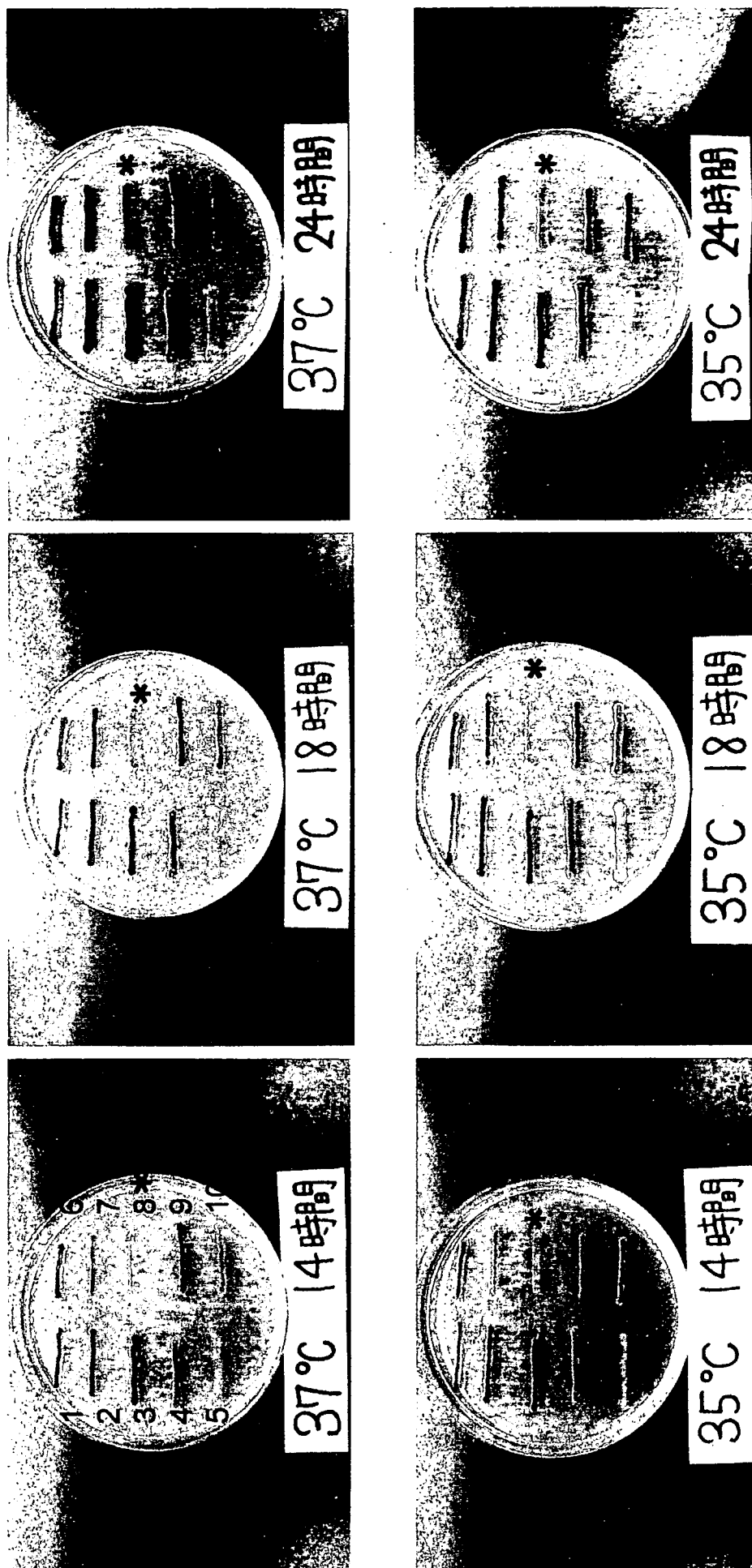


図1 クロモアガービブリオ寒天上の腸炎ビブリオ集落の  
経時的色調変化

No.1~7, No.9~10: 腸炎ビブリオ

No.5: やや白いがTCBS寒天上では腸炎ビブリオ様集落

No.8: 腸炎ビブリオではない(TCBS寒天上では腸炎ビブリオ様集落)



図2 *toxRS*領域の塩基配列比較

- *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* -

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]

VptoxRS.nuc	1	-----AAAATTTAATTATCCTACCCCCCT	24
VatoxRS.nuc	1	-----AAATTTAATTATCCTACCCGTCT	24
VctoxRS.nuc	1	ACTCATAAAAACACTGTTTTTTGATCGAGATTGGATTATTCTAAGTCTGCATTTTATCA	60
		. * . . . * . * . . . * . * . . . * . * . . . * . *	
VptoxRS.nuc	24	AAAAGCATCTAAAACGTCGCGTATCTCCCATGCGCAAACGTAATTTTGTGATATAAATCA	84
VatoxRS.nuc	24	AAAAGCATCTAAAATGTCGTCGCACTCCAAGCGCCCGTAATTTTGTGACATAAATCA	84
VctoxRS.nuc	60	AAGAAGATAAAAAACCAGTAAAGTCTGAGTGTGGGACAGGGAGATACTGGGACATTAG	120
		** . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . * . . *	
VptoxRS.nuc	84	CCATAATTACAACATCATCCATCTAAGAAGAACTAAATGACTAACATCGGCACCAAATTT	144
VatoxRS.nuc	84	CCATAATTACAACATCATCCATCTAAGAAGAACTAAATGACTAACATCGGCACCAAATTT	144
VctoxRS.nuc	120	ATGTTGCGGATTAGGACACAACCTCAAAGAGATATCGATGAGTCATATTGGTACTAAATTC	180
		. . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
VptoxRS.nuc	144	CTACTTGCTCAAAGGTTTACCTTTGATCCAAATAGTAATTCGCTCGCTGACCAACAAAGC	204
VatoxRS.nuc	144	CTACTTGCTCAAAGGTTTACCTTTGATCCAAATAGTAATTCGCTCGCTGACCAACAAAGC	204
VctoxRS.nuc	180	ATTCTTGCTGAAAAATTTACCTTTGATCCCTAAGCAATACTCTGATTGACAAAGAAGAT	240
		. * . * . * . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
VptoxRS.nuc	204	GGCAACGAAGTTGTACGATTAGGAAGCAACGAAAGCCGTATACTCCTGATGTTGGCGGAG	264
VatoxRS.nuc	204	GGCAACGACGTTGTACGATTAGGAAGCAACGAAAGCCGTATACTCCTGATGTTGGCAGAG	264
VctoxRS.nuc	240	AGTGAAGAGATCATTCGATTAGGCAGCAACGAAAGCCGAATTTTGGCTGCTGGCCCAA	300
		. * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
VptoxRS.nuc	264	AGACCAAACGAAGTTTAAACCCGTAACGAGCTTCACGAGTTTGTGTTGGCGTGAGCAAGGT	324
VatoxRS.nuc	264	AGACCAAACGAAGTTTAAACCCGTAACGAGCTTCACGAGTTTGTGTTGGCGTGAGCAAGGT	324
VctoxRS.nuc	300	CGTCCAAACGAGGTGATTTCTCGCAATGATTTGCATGACTTTGTTGGCGAGAGCAAGGT	360
		. * . * . * . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
VptoxRS.nuc	324	TTTGAGGTGGATGACTCAAGCCTGACTCAAGCGATTCTACTCTGCGTAAGATGTTGAAG	384
VatoxRS.nuc	324	TTTGAGGTGGATGACTCAAGCCTGACTCAAGCGATTCTACTCTGCGTAAGATGTTGAAG	384
VctoxRS.nuc	360	TTTGAAGTCGATGATCCAGCTTAACCAAGCCATTTGACTCTGCGCAAAATGCTCAA	420
		* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
VptoxRS.nuc	384	GATTCAACCAAATCTCCAGAGTTTGTAAAACCGTTCCAAAACGAGGCTATCAACTCATT	444
VatoxRS.nuc	384	GATTCAACCAAATCTCCAGAGTTTGTAAAACCGTACCTAAAACGTTGCTACCAACTCATT	444
VctoxRS.nuc	420	GATTCGACAAAGTCCCACAAATACGTCAAAACGTTCCGAAACGCGTTACCAATTGATC	480
		* . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
VptoxRS.nuc	444	TGFACTGTTGAACGCCTAAGCCCGCTTCTTCAGACTCAAGCTCAATTGAAGTTGAAGAG	504
VatoxRS.nuc	444	TGTTCAAGTGAACGCCTTGAAGCCCGCTTCTTCAGACTCAAGCTCAATTGAAGTTGAAGAG	504
VctoxRS.nuc	480	GCCCCAGTGAACGCCTTGAAGAAGAGATGGCTCGCGAAAGCGAAGCTGCTCATGACATC	540
		. . . * . * . * . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
VptoxRS.nuc	504	CCAGCTTCTGATAACAATGACGCCTCTGCTAATGAGGTAGAAACAATCGTAGAGCCGTCT	564
VatoxRS.nuc	504	GCTTCTGAACAAGAAGCGCCAGCAGTGGAGTTAGAAGCGAGCGATACACCACCAACAGAG	564
VctoxRS.nuc	540	TCTCAGCCAGAATCTGTCAATGAATACGCAGAGTCAAGCAGTGTGCCTTCATCAGCCACT	600
		* . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
VptoxRS.nuc	564	TTAGCGACGACTTCTGACGCAATCGTTGAACGAGAAGCGCCAGTAGTACCTGAAAAAGCA	624
VatoxRS.nuc	564	ATAGTGACCGATACTACTGCTGATCTTGAGCCTCAAGTAGAGCCGACTAAAACCTCAGCCG	624
VctoxRS.nuc	600	GTAGTGAACACACCGCAGCCAGCCAATGTTGTGACGAATAAATCGCTCCAAACTTGGGG	660
		* . * . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	
VptoxRS.nuc	624	CCTGTGGCTTCTGCTGTGAATCCTTGGATTCCACGCGTTATTTTATTTTGGCACTATTA	684
VatoxRS.nuc	624	AAGCCAGCATCTAACACGATTAACCTGGCTACCGCGTGCATTATCTTTTGTCTCTGCTG	684
VctoxRS.nuc	660	AATCGACTGCTTATTTCTGATAGCGGCTTACTTCCCTCGCAGTATTACTGCTCACTAAC	720
		. . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *	

VptoxRS.nuc	684	<u>CTACCGATTTCGCTACTGCTGTTTACAACCACCGGGAATCTCAGTTCGGTCAGATTGGT</u>	744
VatoxRS.nuc	684	CTTCCTGTTTTCGCTATTGTTATTTCACGAACCTGCGGAATCCCAATTCGGTCAGATTGGT	744
VctoxRS.nuc	720	CCGAGCCAAACCAGCTTTAAACCCCTAACGGTTGTCGATGGCGTAGCCGTCATATGCCG * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	780
VptoxRS.nuc	744	GAGTATCAGAACGTACCAGTGTACACCTGTAATCACC CGCAAATCAACA ACTGGTTG	804
VatoxRS.nuc	744	GAGTATCAAAGTGTACCGGTGTACACCTGTAATCACCCTCAAATCAACA ACTGGTTG	804
VctoxRS.nuc	780	AAT-----AACCACCCTGATCTTCAACTGGCTA * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	810
VptoxRS.nuc	804	CCTTCTATTGAGCAGTGCATTGAACGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTCGTTACCA	864
VatoxRS.nuc	804	CCTTCAATAGAGCAATGCATTGAGCGCTACGTGAAGCACCATGCAGAAGACTCGTTGCCA	864
VctoxRS.nuc	810	CCGTCAATCGAACTGTGCGTTAAAAAATACAATGAAAAGCATACTGGTGGGCTCAAGCCG * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	870
VptoxRS.nuc	864	GTGGAAGTAATTGCCACTGGCGGACAAAATAACCAGCTGATTTGAACTACATT CATGAC	924
VatoxRS.nuc	864	GTTGAAAGTATTGCCACTGGTGGACAAAATAACCAGCTGATTTGAACTACATT CATGAC	924
VctoxRS.nuc	870	ATAGAAGTCATTGCCACAGGTGGACAAAATAACCAGTTAACGCTGAATTACATT CACAGC . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	930
VptoxRS.nuc	924	AGCAACCACTCGTATGAGAACGTGACATTCGCTATTTTCGCAGGTCAAATGATCCAACA	984
VatoxRS.nuc	924	AGTAACCACTCTTACGAGAACGTAAACATTCGCTATTTTCGCAGGTCAAACGATCCAACA	984
VctoxRS.nuc	930	CCTGAAGTTTCAGGGGAAAACATAACCTTACGCATCGTTGCTAACCCTAACGATGCCATC . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	990
VptoxRS.nuc	984	GACATCTGCAAATAA-AGGAGGCCAGCATGAAGATTAAGTAGCATCTGCGGTTTTGGCC	1043
VatoxRS.nuc	984	GACATCTGCAAATAA-AGGAGGCCAATATGAAGATTAAGTAGCATCTGCGGTTTTGGCC	1043
VctoxRS.nuc	990	AAAGTGTGTGAGTAGGATCTTGCTATGCAAATAGACACATCGCCATGGGTATTCTCTG . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1050
VptoxRS.nuc	1043	GTATCTATCCTTTTCAGTGGTGGTTGTACTGGGGCAGTGACCTTAAAGTTGAGCAAGTG	1103
VatoxRS.nuc	1043	GTATCCGTTCTTTTCAGTAGTGGTTGTATTGGGGAAGTGACCTAAAAGTTGAGCAGCTC	1103
VctoxRS.nuc	1050	CTCTCTCTGCTGCTCAGTAGCTGGTTATATTGGGGAGTGACTTCAAGCTTGAAGCAAGTG . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1110
VptoxRS.nuc	1103	CTTACATCAAATGAATGGCAGTCAACCATGGTGACTGTGATTACTGATAACTTGCCAGAC	1163
VatoxRS.nuc	1103	CTCACAGCAAACGAATGGCAGTCAACCATGGTGACAGTATTACAGACAGCTTGCCCTGAC	1163
VctoxRS.nuc	1110	TTAACCTCTCGAATGGCAGTCCAAAATGGTCTCTCTGATTAAGACCAACAGCAACCCG . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1170
VptoxRS.nuc	1163	GATACTGTAGGCCCGTTACGTGCTGTAATGTGGAGTCGAACGTTAAGTACCTACCGAAT	1223
VatoxRS.nuc	1163	GATACTGTGGGCCACTACGCCGAGTTAATGTTGAATCAAACGTGAAATATCTCCCTAAT	1223
VctoxRS.nuc	1170	CCGGCTATGGGGCCACTCAGTCGGGTAGACGCTCACTTCCAATGTGAAATATCTGCCTAAT . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1230
VptoxRS.nuc	1223	GGCGATTACATTCGCGTGGCAAACATCAAACCTGTTGCGACAAGGCTCGACGGCTGAATCG	1283
VatoxRS.nuc	1223	GGTGACTATATTCGCGTAGCAAATATCAAACCTATTCGCTCAAGGCTCAACCGCAGAATCA	1283
VctoxRS.nuc	1230	GGCACTTATTTACGGGTTTCAATCGTAAAGCTATTTCCGATGACAATAGTGCAGAAAGC * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1290
VptoxRS.nuc	1283	ACAATTAATATTTAGAGAAAGGTCGCTGGGAAGTGAGTATAACTATCTGCTGTTTCT	1343
VatoxRS.nuc	1283	ACGATAAATATCTCGGAAAAAGGCCGCTGGGAAGTAAAGTGACAATAATTTGTTGGTCTCG	1343
VctoxRS.nuc	1290	GTCATTAATATCTCCGAATTTGGTGAATGGGATATCAGCGATAATTACCTTTTGGTTACG . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1350
VptoxRS.nuc	1343	CCTTCTGAGTTCAAAGATATTTCTTCTTCAATCCAAGGATTTTCTGAAGCGCAACTA	1403
VatoxRS.nuc	1343	CCTTCGGAGTTTAAAGATATTTCTTCTTCAATCAAAGACTTTTCCGAAGCACAGCTA	1403
VctoxRS.nuc	1350	CCAGTCGAGTTTAAAGATATTTCTGCAAACCAAAGCAAAGACTTTACTGACGAGCAATTG * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1410
VptoxRS.nuc	1403	CGCTAATTAACCTCAAATCTTAAAGTAGATGCTGAACAAGCCGCCGAATTGACGTGGTT	1463
VatoxRS.nuc	1403	CGTTTGATTAACCTCAAATCTTAAAGTAGATGCGGAGCAAAGTCGTCGATTGACGTCGCTG	1463
VctoxRS.nuc	1410	CAGCTGATTACTCAAATCTTAAAGTAGATGCACAACAAGTCGTCGAGTCGACATTGTT . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . .	1470

VptoxRS.nuc	1463	AATGAGAAGACTCTGCTATTAAGTACCTAAATCACGGTCTACGGTACTGTTAGAAAC	1523
VatoxRS.nuc	1463	AACGAAAAACACTATTGCTCACTAGCTTGAACCACGGTCTTCGGTACTGTTAAAAAC	1523
VctoxRS.nuc	1470	AACGAAAGAACCATTCTCTTTACCAGCTTAAGTCATGGTCTACCGTACTGTTAGTAAT	1530
		**..**..**..*..*..*..**..**..*..**..**..**..**..**..**..**..**..**..**..**..**..**..	
VptoxRS.nuc	1523	TGAATTTTATTAG-TGATAAGGGGGCAAGATGCCCCCTTAATTTTTTCTCATGGATTGGT	1582
VatoxRS.nuc	1523	TAATTTTGATTGGATGATAAGGGGGCAAGACGCCCCCTTTGTTTTG-CCTATGGATTGGC	1582
VctoxRS.nuc	1530	TCTTAACCTGACTGAGCGTAGAATAGGACATAACAAGGACGTCACGATGAACAAAGCCCA	1590
		* .....	
VptoxRS.nuc	1582	TAGA-----	1586
VatoxRS.nuc	1582	TAGATACCCTTACCCTTTTTTTTCGGTTCCTAATCGCCAACACGCTGGCTTCACTTTCTG	1642
VctoxRS.nuc	1590	AATCGA-----	1596
		..*..	
VptoxRS.nuc	1586	----	1586
VatoxRS.nuc	1642	GTGG	1646
VctoxRS.nuc	1596	----	1596

## 資料 1

### A. 腸炎ビブリオ試験法・定性法(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た試料を、35±1℃、16~18 時間培養後、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。出現した培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定する。

なお、市販のアルカリペプトン水に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

#### 2. 同定

腸炎ビブリオと推定される集落については普通寒天斜面、TSI 寒天、LIM 培地に接種し、35±1℃で 18~24 時間培養後、TSI 寒天および LIM 培地の性状が表 1 に一致した場合は、更に耐塩性試験、VP 試験およびオキシダーゼ試験を行う。表 1 に示した性状と一致したものを腸炎ビブリオと同定する。

##### ① 普通寒天斜面培地

普通寒天斜面培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、35±1℃で 18~24 時間培養する。

##### 普通寒天斜面培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	5g	塩化ナトリウム	20g
ペプトン	10g	寒天	15g
		pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の普通寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

##### ② TSI 寒天による試験

TSI 寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、35±1℃で 18~24 時間培養後、斜面部の黄変により乳糖及び白糖の分解性を、高層部の黄変によりブドウ糖の分解性を、高層部の黒変により硫化水素の産生性を、高層部の気泡又は亀裂によりガス産生性を確認する。