

定質量範囲 m/z 2,000-20,000) した。得られたピークリストをもとに single link agglomerative clustering algorithm を用いて dendrogram を作成した (流れについて図 1 に記載)。

なお、以上の解析には、(株) 島津製作所分析計測事業部応用技術部京都アプリケーション開発センターの島圭介氏のご協力をいただいた。

5. PFGE 解析

Parsons, M.B. らの方法 (*Foodborne Pathog. Dis.* 2007, 4(3):285-292) を使用した。各菌株を 2%NaCl 加 TSA 培地 (Difco 社) に画線し、37°C 下で 18 時間培養した。生じたコロニーを釣菌し、200 μ l の滅菌蒸留水に溶かし、1%Seakem gold200 μ l と混合してプラグキャストに流し入れ固めた。固化したプラグを Protainase K 溶液 5ml 内に入れ、55°C で 2 時間振とうした。55°C に温めた滅菌蒸留水にて 2 回、TE buffer にて 4 回プラグを洗浄し、プラグを適当な大きさに切断した上で酵素バッファー 200 μ l に入れ、室温下で 15 分おいた。その後酵素バッファーを 40U の制限酵素 *Sfi*I 溶液 (東洋紡社) に溶かし、50°C にて 4 時間反応させた。酵素処理したプラグは PFGE 用のアガロースゲルに埋め込み 14°C の泳動バッファーにて泳動した。泳動条件は 6V/cm を 10-35 秒で 18 時間とした。泳動後ゲルをエチジウムブロマイドにて染色し、UV 下にて泳動像を撮影した。系統解析は Bionumerics 6.5 (Bionumerics) を用いて Jaccard 法により距離行列を作成して近隣結合法にて系統樹を推定した。

6. ストレス抵抗性の評価

(1) ストレス暴露試験

ストレスとして、酸・低浸透圧・凍結・熱ストレスを設定した。96 穴プレートを使用し、アルカリペプトン水 200 μ l にて 37°C 下で 18 時間増菌させたものをそれぞれ 3 μ l ずつ取り出し、HCl にて pH4.0 に調整したリン酸緩衝液、滅菌蒸留水、2%NaCl 加 PBS(-)、それぞれ 297 μ l とあわせた。前者二つのプレートはそれぞれ 25°C 下に、残るプレートは -20°C と 47°C 下に静置した。

暴露時間は酸ストレスでは 8 時間、浸透圧ストレスでは 9 時間、熱ストレスでは 30 分と設定した。凍結ストレスは 24 時間ごとに -20°C から 25°C 下に 2 時間おき、十分溶けたことを確認して、もう一度冷凍という操作を繰り返した。これを 4 回繰り返し、0°C を通過する時点が 4 回あるというストレスを与えている。

ストレス暴露後、3 μ l ずつ菌液を取り出し、297 μ l のアルカリペプトン水にて増菌させた。増菌したか否かで数値を設定し、3 回行った平均値を比較した。この方法により抵抗性の度合いを示す結果は 0 ~ 1 の間におさまり、1 に近い程抵抗性が高いことを意味する。

(2) 統計学的解析

ストレス暴露後の抵抗性の評価にあたっては、採取された水温の差、*tdh* あるいは *trh* の保有状況、病原性保有株について由来の違いについてそれぞれ (1) で得られた結果の差の有意差検定 (Student の t 検定) を行った。

7. ストレス耐性遺伝子の存否の評価

遺伝子の存否の評価にあたっては腸炎ビブリオ23株を抽出した。ストレス関連遺伝子としてストレス耐性や病原性との関連が考えられる *oppA*、*oppB*、*escC*、*y**scOp*、*envZ*、*murQ*、*fadB*、*cspA*、*cadA*、*mglc*についてNIBCの遺伝子情報検索システム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) を使用して検索し、それぞれの存否を比較した。プライマー設計にあたってはPrimer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を使用した。菌株は収集場所の異なる環境由来株10株を設定し、それぞれについて遺伝子の存否を確認した。それぞれの遺伝子の塩基配列や想定された機能については、表3に記載している。

PCR 反応にあたっては、試薬として Ex Taq (タカラ社) を用いた。反応試薬 45 μ l に Template DNA 5 μ l を加え計 50 μ l の反応とした。PCR 条件は *oppA* については熱変性 94°C 0.15 分、アニーリング 59°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。その他の遺伝子については熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、伸長 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。得られた PCR 産物は電気泳動を行い、産物 (*oppA*: 800bp、*oppB*: 169bp、*escC*: 226bp、*yscO*: 174bp、*envZ*: 191bp、*murQ*: 210bp、*fadB*: 223bp、*cspA*: 120bp、*cadA*: 900bp、*mglc*: 195bp) の確認を行った。アニーリング温度は各プライマーの塩基配列に合わせて適宜変更して行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. MALD-TOF/MS解析

ピーク的一致率をサンプル間の距離として表示させた。各サンプル n=2 でデータを取得し、デンドログラムを作成した。測定により得られたサンプルのピークリストの質量情報をもとにクラスター分析を行ったところ、ビブリオ・アルギノリティカス (機関番号 5) と腸炎ビブリオ (機関番号 5 以外) は明確に別々のクラスターが形成された (図 2)。しかし、腸炎ビブリオの株毎のクラスターは形成されなかった。

検出されるピークとして機関番号 3 のグラフを挙げた (図 3)。このピークは菌株ごとに出されるものである。機関番号 3 と 5 で比較すると、多くは一致しており (図 4、5、6) 互いに近縁の種であることが考えられるが、*m/z*10000-15000 においては一部のピークが種特異的に検出されている (図 5)。このピークの違いが図 2 において腸炎ビブリオとビブリオ・アルギノリティカスを分ける結果となったと考えられる。

腸炎ビブリオの株間ではほとんどの検出ピークが一致しており互いに識別することは困難であったが、機関番号 15 の *m/z*9566 のように、中には株レベルで特異的なピークも検出された (図 7)。

個別の菌株ごとにピークを並べて比較したグラフを図 8-13 に載せている。

2. PFGE解析

作成した系統樹を図14に記載した。系統樹は大きく8群に分かれ、多彩な菌が日本各地に分布していることが明らかとなった。これらの群について地域やストレス耐性、採取温度との関連は認められなかったものの、病原性との関連が指摘されている遺伝子 *tdh* の保有株の割合について見ると、割合が0%となり保有していない株だけで構成された群も存在した一方で、67%と高い値を示した群も認められた(表4)。またこれら *tdh* 株の多くは患者由来であった。

3. ストレス抵抗性の評価

水温15℃以下(冬季)において採取された菌株45株と水温20℃以上(夏季)において採取された菌株18株のストレス抵抗性について比較した結果を図15に示した。水温15℃以下で採取された株は酸・低浸透圧ストレスに対して有意に高い抵抗性を示した($p<0.05$)。一方で凍結・熱ストレスに対しては抵抗性に有意な差は認められなかった。

続いて病原性との関連性が指摘されている遺伝子である *tdh* あるいは *trh* を有する菌株39株といずれも保有しない菌株103株のストレス抵抗性について比較した(図16)。*tdh* あるいは *trh* を有する株は酸ストレスに対して高い抵抗性を示す一方、低浸透圧・凍結ストレスに対しては低い抵抗性を示した($p<0.05$)。一方で熱ストレスに対する抵抗性では有意な差は認められなかった。

tdh あるいは *trh* を有する株について由来による抵抗性の違いが認められるかを比較するために、環境食品由来(14

株)か患者由来(25株)かで比較した。

tdh あるいは *trh* 保有株については患者由来の株が環境由来株と比較して酸に対して高い抵抗性が認められた($p<0.05$)。一方で低浸透圧・凍結・熱ストレスに対する抵抗性では有意な差は認められなかった。

4. ストレス耐性遺伝子の存否

今回設定した23株においては *envZ*、*yscO*、*murQ*、*fadB*、*cspA*、*cadA*はいずれの株も保有した。一方で *oppA*、*oppB*、*escC*、*mgIc*は保有に株間の差異が認められた(表5)。しかし株間の保有の差異は、採取場所や各種ストレス抵抗性の強弱との関連が認められなかった。

D. 考察

1. MALD-TOF/MS解析

MALD-TOF/MS解析は腸炎ビブリオにおいてDieckmann, R.らの報告(*J. Applied Microbiol.* 109:199-211)がある。本法においては、腸炎ビブリオの株を特異的に同定することができたものの、同種株間の違いを判別する識別能はないことが明らかとなった。今回用いた方法では、ビブリオ・アルギノリティカス(機関番号5)と腸炎ビブリオ(機関番号5以外)は明確に別々のクラスターが形成されたものの、腸炎ビブリオの株毎のクラスターは形成されなかった。Dieckmann, R.らの報告(*J. Applied Microbiol.* 109:199-211)に記載の“Species-specific biomarker peaks”に記載されている以外にも、ビブリオ・アルギノリティカスと腸炎ビブリオそれぞれに特異的と思しきビ

ークをいくつか確認できた。これらのピークの由来についてはリボソーム蛋白や分子シャペロンなど、これまで文献で報告があった系統のタンパク質である可能性が高いと考えられた。今回は検出された全てのピークを用いてデンドログラムを作成したが、安定して検出され且つ特異性の高いピークのみを選び出してクラスター解析を行うなどすれば、もう少し識別能を上げることが出来ると考えられた。

本分析手法においては分析が菌体中の限局されたタンパク質等に限られてしまうため、現段階では種の同定に不適であるが、より広範囲のタンパクとして表面タンパク質などを一括して対象とすることによりタイピングの可能性があると示唆された。

2. PFGE解析

PFGE解析は非常に識別能が高く、系統樹は8群に分かれ、多彩な菌が日本各地に分布していることが明らかとなった。これらの群について地域やストレス耐性、採取温度との関連は認められなかったものの、それぞれの群間で *tdh* 保有株の割合にばらつきが認められた。類縁度による地理的分布やストレス抵抗性との関連については、バンドパターンが極めて多様となることを反映し、PFGE解析結果との間に一定の関連が認められなかった。地理的分布の特徴や特徴の違いを生み出す環境要因を探るにあたっては今回のような多様な群に分かれてしまうのではなく、ある程度まとまった群に分かれることが理想だと考えられるため、PFGE

とは別の手法としてMLVAを今後試す予定である。

3. ストレス抵抗性の評価

ストレス抵抗性の評価にあたっては、ストレス暴露後増菌液に混和し、増菌するか否かで評価を行っている。そのため、ストレス暴露時に完全に死滅した菌株は増菌が見られないため、本研究手法はストレス抵抗性の評価として有用であると考えられる。

本研究において、特に酸ストレス抵抗性について差が出た結果となり、環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株（特に患者由来株）が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示された。この結果を踏まえると、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカースとして検討できる方向性が示された。

4. ストレス耐性遺伝子の存否

ストレス耐性遺伝子と考えられる *oppA*、*oppB*、*escC*、*mglc*は保有に株間の差異が認められたものの、採取場所やストレス抵抗性の強弱との関連は認められなかった。ストレスに弱い株であっても、ストレス耐性遺伝子を保有している株もあり、ストレス抵抗性メカニズムにおいては、様々な遺伝子が複合的に関連している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究の結果、多様な菌株を使用してMALDI-TOF/MS解析ならびにPFGE解析を行うことの有用性について明らかになっ

た。MALDI-TOF/MS 解析においては腸炎ビブリオの種内の区別はできないことが明らかとなった。PFGE解析においては、バンドパターンは極めて多様となったことから考えるに、類縁度の比較にあたっては他のアプローチをとることが求められる。

ストレス抵抗性については、ストレス関連遺伝子 (*oppAB*、*EnvZ*、*EscC*、*YscO*、*murQ*、*fadB*) の保有の解析では地理的分布やストレス抵抗性との関連は認められなかったものの、酸・低浸透圧・凍結・熱に対するストレス抵抗性を調べた結果では環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株（特に患者由来株）が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示され、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスク

となる株のマーカ―として検討できる方向性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Akio Hasegawa, Yukiko Hara-Kudo, Kikuyo Ogata, Yoshiko Sugita-Konishi, Susumu Kumagai. The analytical study of the diverse strains of *Vibrio parahaemolyticus* by the tolerances to multiple stresses. IUMS 2011 Sapporo, 2011.9. (Submitted)

表1-1 使用した腸炎ビブリオの詳細

機関番号	採取場所・産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	<i>tsh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
41	北海道	海水	2010.8		-	-
42	北海道	巻貝	2010.8		-	-
44	北海道	イワガキ	2010.8		-	-
47	北海道	ムラサキイガイ	2010.8		-	-
71	北海道	海水	2010.11		-	-
73	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
74	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
75	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
76	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
77	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
78	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
79	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
80	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		-	-
81	北海道	海水	2010.11		-	-
83	北海道	巻貝	2010.11		-	-
84	北海道	巻貝	2010.11		-	-
85	北海道	海水	2010.11		-	-
61	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		-	-
62	宮城	ハマグリ	2010.9		-	-
63	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		-	-
191	宮城	ムラサキイガイ	2010.12		-	-
194	宮城	海水	2010.12		-	-
195	宮城	海水	2010.12		-	-
15	秋田	ボイルホタテ	1997	O3:K6	+	-
221	東北 (詳細不明)	イワガキ	2001	O3:K6	+	-
222	東北 (詳細不明)	イワガキ	2001	O3:K6	+	-
223	東北 (詳細不明)	イワガキ	2001	O3:K6	+	-
226	東北 (詳細不明)	海水	1998	O3:K6	+	-
3	新潟	海水	2010.6		-	-
9	新潟	まな板	1997	O3:K6	-	-
21	新潟	食中毒患者	1998	O4:K12	+	-
22	新潟	食中毒患者	1998	O4:K68	+	-
177	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		-	-
311	新潟	海水	2010.12		-	-
314	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		-	-
224	中部・近畿(詳細不明)	ホッキガイ	2001	O3:K6	+	-
225	中部・近畿(詳細不明)	アサリ	2000	O3:K6	+	-

表1-2 使用した腸炎ビブリオの詳細

機関番号	採取場所・産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
321	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
322	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
323	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
324	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
325	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
326	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
327	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
333	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
337	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
338	東京	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
339	東京	ムラサキイガイ	2011.2		+	-
51	神奈川	ムラサキイガイ	2010.8		-	-
52	神奈川	巻貝	2010.8		-	-
53	神奈川	巻貝	2010.8		-	-
31	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		-	-
32	静岡	海水	2010.7		-	-
33	静岡	海水	2010.7		-	-
34	静岡	海水	2010.7		-	-
35	静岡	海水	2010.7		-	-
36	静岡	イワガキ	2010.7		-	-
37	静岡	海水	2010.7		-	-
38	静岡	海水	2010.7		-	-
341	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
342	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
343	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
345	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
346	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		-	-
151	香川	海水	2010.12		-	-
152	香川	海水	2010.12		-	-
155	香川	海水	2010.12		-	-
156	香川	海水	2010.12		-	-
157	香川	海水	2010.12		-	-
159	香川	海水	2010.12		-	-
231	大分	海水	2006.6	O4:K12	+	+
232	大分	海水	2006.6	O11:KUT	-	+
233	大分	海水	2006.6	O11:KUT	-	+
234	大分	海水	2006.6	O8:K30	-	+
241	大分	食中毒患者	2010	O3:K29	+	-
242	大分	食中毒患者	2009	O1:KUT	+	+
243	大分	食中毒患者	2009	O6:K18	+	+
244	大分	食中毒患者	2009	O1:K56	-	+
245	大分	食中毒患者	2008.6	O10:KUT	-	+
246	大分	食中毒患者	2007	O1:K38	+	-
251	大分	食中毒患者	1989.9		+	-
252	大分	食中毒患者	1991.5		+	-
253	大分	食中毒患者	1993.9		+	+
254	大分	食中毒患者	1995.7		+	-
255	大分	食中毒患者	1995.8		+	-
256	大分	食中毒患者	2004.8		+	-
257	大分	食中毒患者	2004.9		-	+
258	大分	食中毒患者	2004.9		+	-

表1-3 使用した腸炎ビブリオの詳細

機関番号	採取場所・産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
91	福岡	海水	2010.11		-	-
92	福岡	海水	2010.11		-	-
93	福岡	海水	2010.11		-	-
94	福岡	海水	2010.11		-	-
201	福岡	食中毒患者	2000.7	O4:K8	+	-
202	福岡	食中毒患者	2009.8	O3:K6	+	-
203	福岡	食中毒患者	1989.7	O1:K56	+	-
204	福岡	食中毒患者	1990.8	O2:K3	+	-
205	福岡	食中毒患者	1995.7	O4:K8	+	-
206	福岡	食中毒患者	1997.9	O3:K6	-	-
207	福岡	食中毒患者	1998.5	O3:K6	-	-
208	福岡	食中毒患者	1998.7	O3:K6	+	-
209	福岡	食中毒患者	1998.7	O3:K6	+	-
210	福岡	食中毒患者	1999.8	O1:K32	+	-
211	福岡	食中毒患者	1999.9	O3:K6	+	-
212	福岡	刺身(魚種不明)	1998.8	O3:K6	-	-
213	福岡	刺身(魚種不明)	1998.8	O3:K56	-	-
214	福岡	アカガイ	1998.8	O4:K34	-	-
215	福岡	ウニ	1998.6	O3:KUT	-	-
216	福岡	ウニ	1998.6	O3:K6	+	-
217	福岡	タイセイヨウサバ	1999.8	O2:K28	-	-
235	インドネシア	ブラックタイガー	2004.8	O1:K25	-	-
236	インドネシア	ブラックタイガー	2004.2	O1:K25	-	-
237	インドネシア	ブラックタイガー	2004.2	O1:K25	-	-
101	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
103	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
104	タイ	ハマグリ	2010.8		-	-
105	タイ	ハマグリ	2010.8		-	-
106	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
107	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
109	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
110	タイ	ザルガイ	2010.8		-	-
121	タイ	エビ	2010.7		-	-
122	タイ	ムラサキイガイ	2010.7		-	-
123	タイ	ザルガイ	2010.7		-	-
124	タイ	ザルガイ	2010.7		-	-
126	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		-	-
127	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		-	-
133	マレーシア	海水	2010.9		-	-
134	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
135	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
136	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
137	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
138	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
139	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
140	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
141	マレーシア	海水魚(魚種不明)	2010.9		-	-
142	マレーシア	アカガイ	2010.9		-	-
143	マレーシア	アカガイ	2010.9		-	-
144	マレーシア	アカガイ	2010.9		-	-
301	マレーシア	アカガイ	2010.9		-	+
302	マレーシア	海水	2010.9		-	-
303	マレーシア	海水	2010.9		-	-
304	マレーシア	海水	2010.9		-	-

表1-4 使用したビブリオ・アルギノリティカスの詳細

機関番号	採取場所	検体種	分離時期	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
5	新潟	ムラサキイガイ	2010.6	-	-

表2 MALDI-TOF/MS分析に使用した菌株の詳細

機関番号	菌種	採取場所・産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
3	<i>V.parahaemolyticus</i>	新潟	海水	2010.6		-	-
15	<i>V.parahaemolyticus</i>	秋田	ボイルホタテ	1997	O3:K6	+	-
21	<i>V.parahaemolyticus</i>	新潟	食中毒患者	1998	O4:K12	+	-
31	<i>V.parahaemolyticus</i>	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		-	-
32	<i>V.parahaemolyticus</i>	静岡	海水	2010.7		-	-
42	<i>V.parahaemolyticus</i>	北海道	巻貝	2010.8		-	-
51	<i>V.parahaemolyticus</i>	神奈川	ムラサキイガイ	2010.8		-	-
61	<i>V.parahaemolyticus</i>	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		-	-
122	<i>V.parahaemolyticus</i>	タイ	ムラサキイガイ	2010.7		-	-
5	<i>V.alginolyticus</i>	新潟	ムラサキイガイ	2010.6		-	-

表3 プライマーの詳細

遺伝子	想定された機能	長さ(bp)	塩基配列(5'-3')
<i>oppA</i> -F	病原性、酸抵抗性	800	CAAGAGTTCGTTTCGTGGTAAC
<i>oppA</i> -R			TTATTGAGCTTTGATGTAAG
<i>oppB</i> -F	病原性、酸抵抗性	169	GTTCTCGACAAGTGGGTGGT
<i>oppB</i> -R			GCAGTTCGTTTCGTGATCTGA
<i>escC</i> -F	病原性、酸抵抗性	226	GCCACCTTTTACCGAAACAA
<i>escC</i> -R			TGGCAATAAACGACCTGTCA
<i>yscO</i> -F	病原性、酸抵抗性	174	AACAGCAAACCGTGCTTCTT
<i>yscO</i> -R			TGGTTTTATGGGCTTGAAGG
<i>envZ</i> -F	浸透圧抵抗性	191	ATTATCGCAGGTGGTTGGTT
<i>envZ</i> -R			CGGTCTTCTTCGAGCTCTTG
<i>murQ</i> -F	酸抵抗性	210	CGACTTAAAAGCGCTTCACC
<i>murQ</i> -R			GAGCCAGTAACGACCTCTGC
<i>fadB</i> -F	病原性、酸抵抗性	223	GAAACCATCAACCGCGTAGT
<i>fadB</i> -R			TGCCGACTACATCAAGCAAG
<i>cspA</i> -F	低温抵抗性	120	TTCGTACACTTCAACGCTATCG
<i>cspA</i> -R			GAGGAGTAACTTCAGTCGCTTG
<i>cadA</i> -F	酸抵抗性	900	TTATCACGCCAACTGGATTGG
<i>cadA</i> -R			GCGTGTAGCTTCATGTACTGAGC
<i>mglc</i> -F	病原性、酸抵抗性	195	ACGTGCCTTTGACTCTGCTT
<i>mglc</i> -R			TTACGACCCAGCGATACTC

アニーリング温度は簡便式: °C = 4 × (G+C) + 2 × (A+T) + 35 - 2n から算出した

表4 PFGE解析で分かれたグループの詳細

グループ	<i>tdh</i> 保有株の割合(株数/総数)	患者由来
1	0%(0/12)	-
2	67%(12/18)	42%
3	15%(4/27)	50%
4	18%(3/17)	100%
5	38%(9/24)	89%
6	8%(1/13)	100%
7	50%(3/6)	100%
8	0(0/18)	-

表5 ストレス耐性関連遺伝子の保有割合

機関 番号	採取場所・ 産地	検体種・分離状況	分離時期	血清型	酸	低浸 透圧	凍結	熱	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>oppA</i>	<i>oppB</i>	<i>escC</i>	<i>mgc</i>
3	新潟	海水	2010.6		0.0	0.0	0.3	1.0	-	-	+	+	-	+
9	新潟	まな板	1997	O3:K6	0.7	0.3	1.0	1.0	-	-	±	-	-	-
15	秋田	ボイルホタテ	1997	O3:K6	0.7	0.7	1.0	0.0	-	-	+	-	+	-
21	新潟	食中毒患者	1998		1.0	0.7	0.7	0.0	+	-	+	+	+	-
22	新潟	食中毒患者	1998	O4:K68	1.0	0.0	0.7	0.0	+	-	±	-	+	-
31	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		0.0	0.3	0.7	1.0	-	-	-	-	-	-
32	静岡	海水	2010.7		0.0	0.2	1.0	1.0	-	-	-	+	-	-
37	静岡	海水	2010.7		1.0	0.0	0.3	1.0	-	-	-	-	-	-
38	静岡	海水	2010.7		0.0	1.0	0.7	1.0	-	-	-	-	-	-
42	北海道	巻貝	2010.8		0.3	0.0	0.7	0.7	-	-	+	+	+	-
44	北海道	イワガキ	2010.8		0.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	-	-
51	神奈川	ムラサキイガイ	2010.8		0.0	0.0	0.7	0.8	-	-	-	+	-	-
52	神奈川	巻貝	2010.8		0.3	0.0	0.3	0.3	-	-	+	+	-	-
53	神奈川	巻貝	2010.8		1.0	0.0	1.0	0.7	-	-	+	+	-	-
61	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		0.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	-	-
103	タイ	ザルガイ	2010.8		0.0	0.7	1.0	0.8	-	-	+	-	-	-
104	タイ	ハマグリ	2010.8		0.0	0.7	1.0	1.0	-	-	-	-	+	-
109	タイ	ザルガイ	2010.8		0.0	0.0	0.8	1.0	-	-	±	-	-	-
122	タイ	ムラサキイガイ	2010.7		1.0	0.0	0.7	1.0	-	-	+	+	+	-
123	タイ	ザルガイ	2010.7		0.3	0.0	0.0	1.0	-	-	+	+	-	-
124	タイ	ザルガイ	2010.7		0.0	0.3	1.0	1.0	-	-	+	+	+	-
126	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		0.0	0.0	1.0	1.0	-	-	+	+	-	-
127	タイ	タイセイヨウサバ	2010.7		0.0	0.7	0.7	0.7	-	-	+	+	-	-

envZ, *yscO*, *murQ*, *fadB*, *cspA*, *cadA*はいずれの株も保有したため表には記載していない

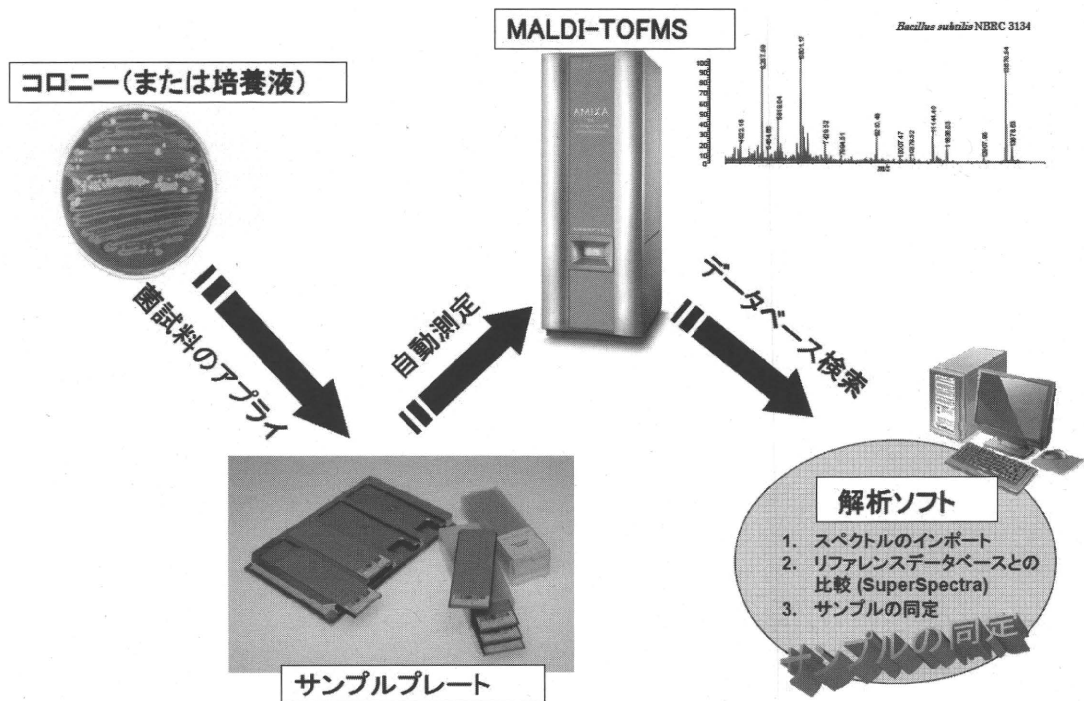


図1 AXIMA微生物同定システムのワークフロー

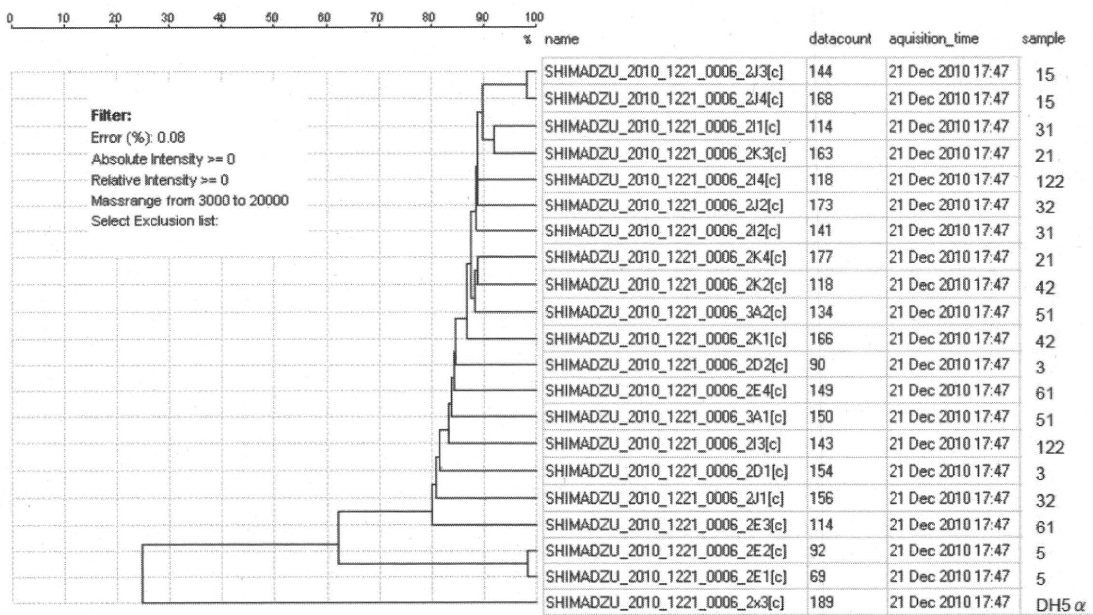


図2 クラスタ分析の結果

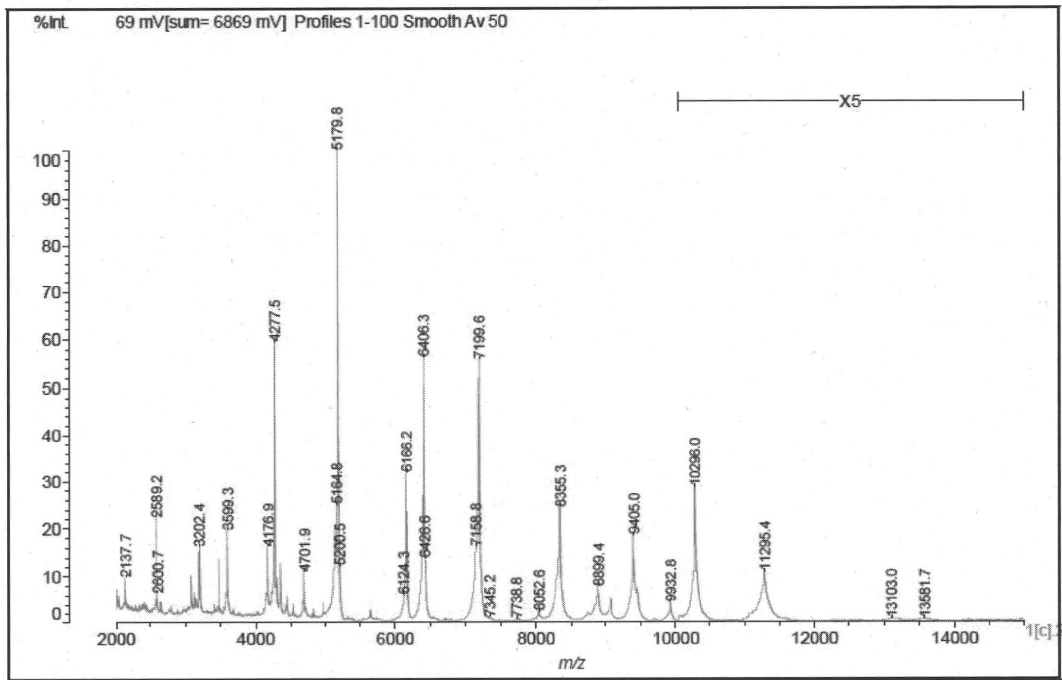


図3 腸炎ビブリオ（機関番号3）のマススペクトル例

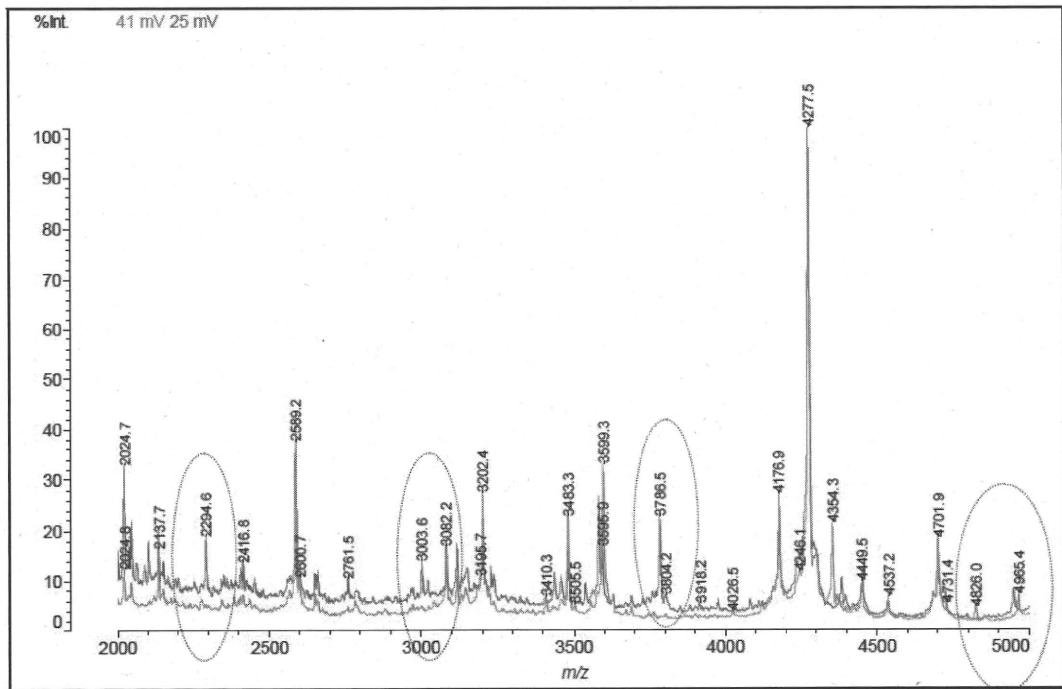


図4 ビブリオ・アルギノリティカス（機関番号5：黒色）と腸炎ビブリオ（機関番号3：灰色）の比較 (m/z2000-5000)

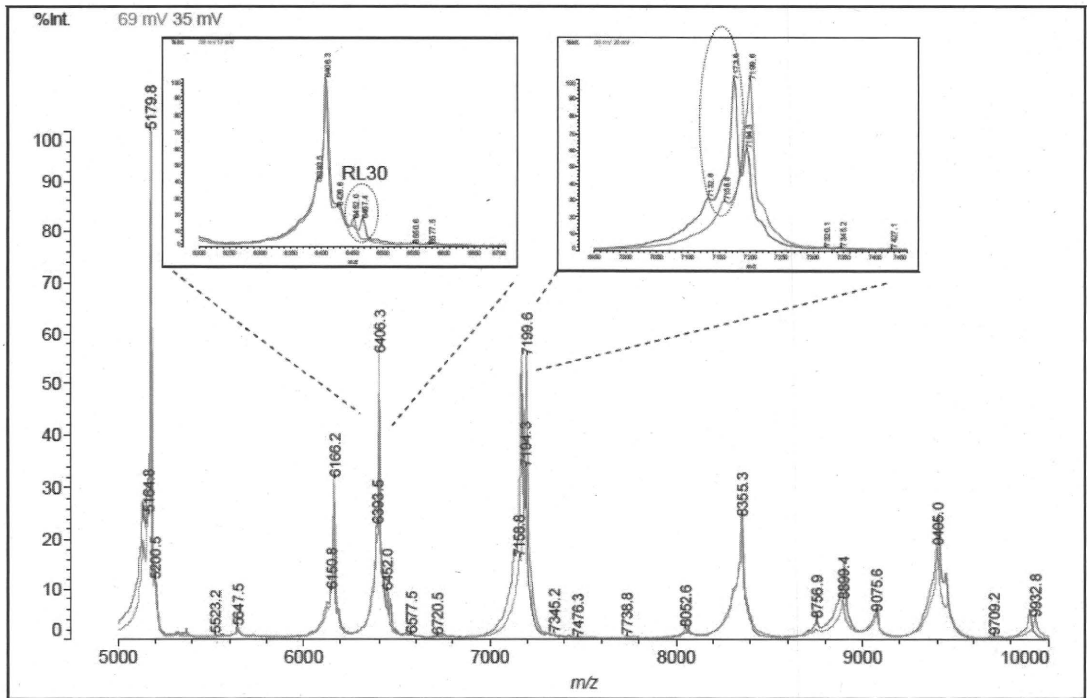


図5 ビブリオ・アルギノリティカス（機関番号5：黒色）と腸炎ビブリオ（機関番号3：灰色）の比較 (m/z 5000-10000)

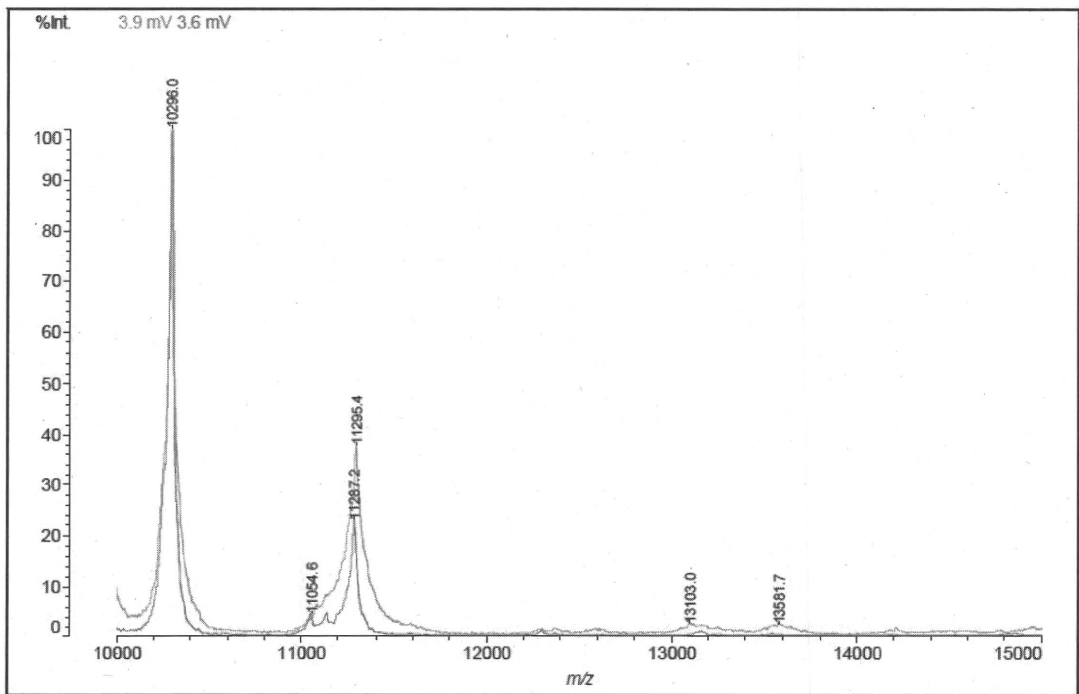


図6 ビブリオ・アルギノリティカス（機関番号5：黒色）と腸炎ビブリオ（機関番号3：灰色）の比較 (m/z 10000-15000)

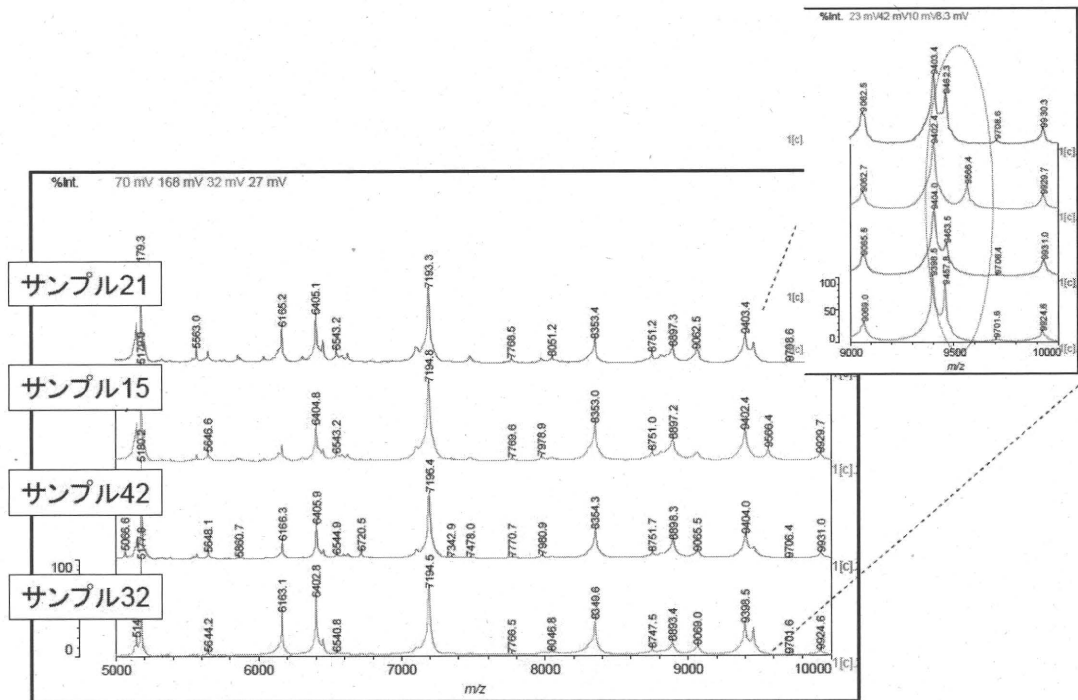


図7 腸炎ビブリオの株間比較 (機関番号32、42、15、21)

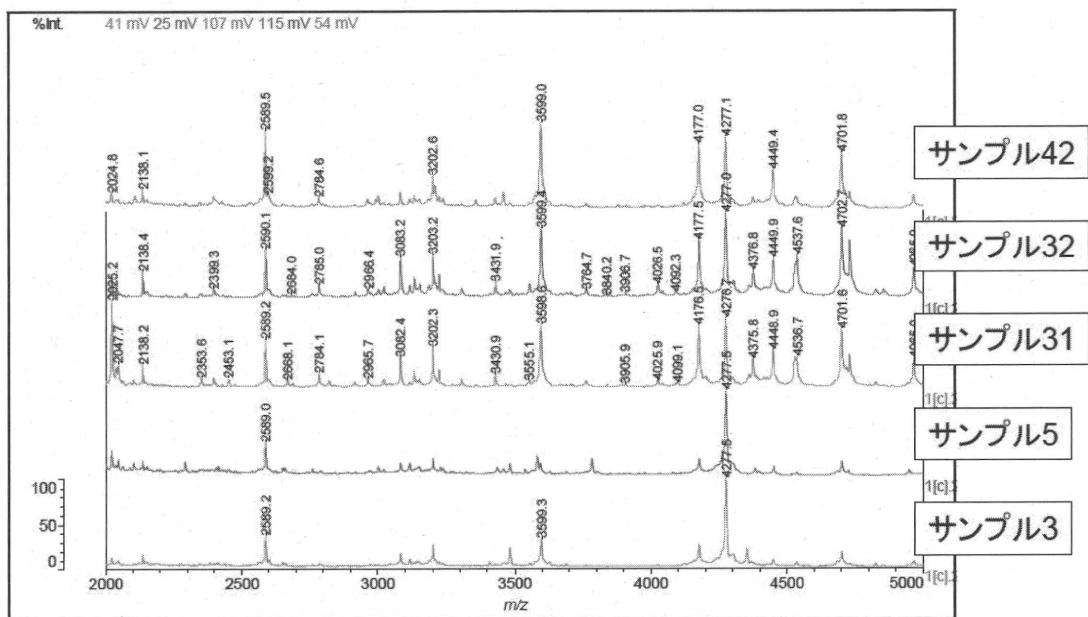


図8 機関番号3、5、31、32、42のマススペクトル (m/z 2000-5000)

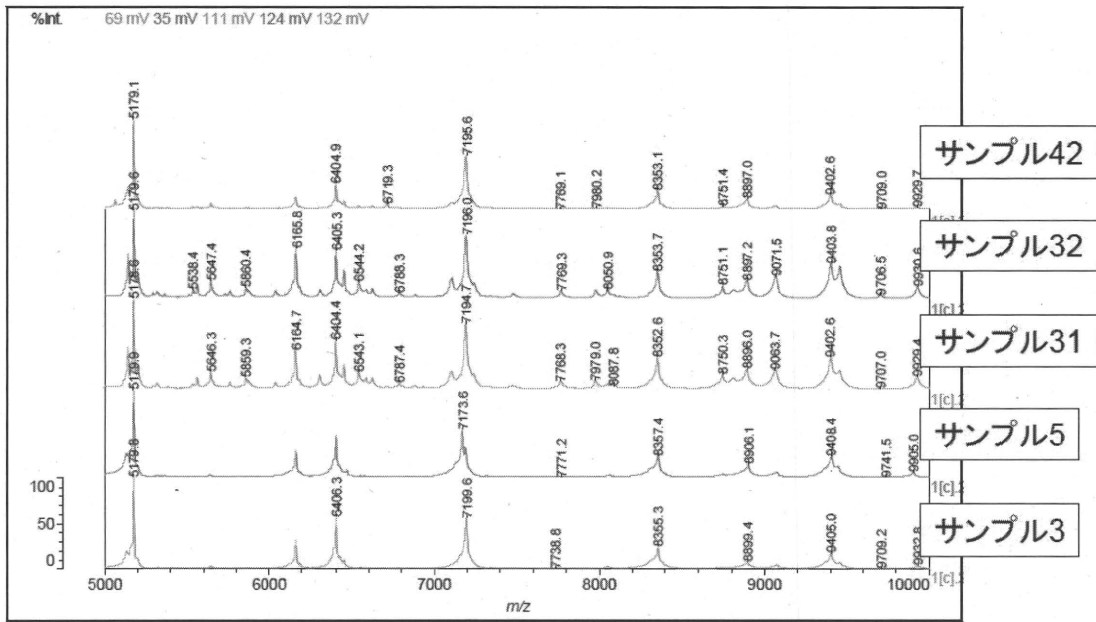


図9 機関番号3、5、31、32、42のマススペクトル (m/z 5000-10000)

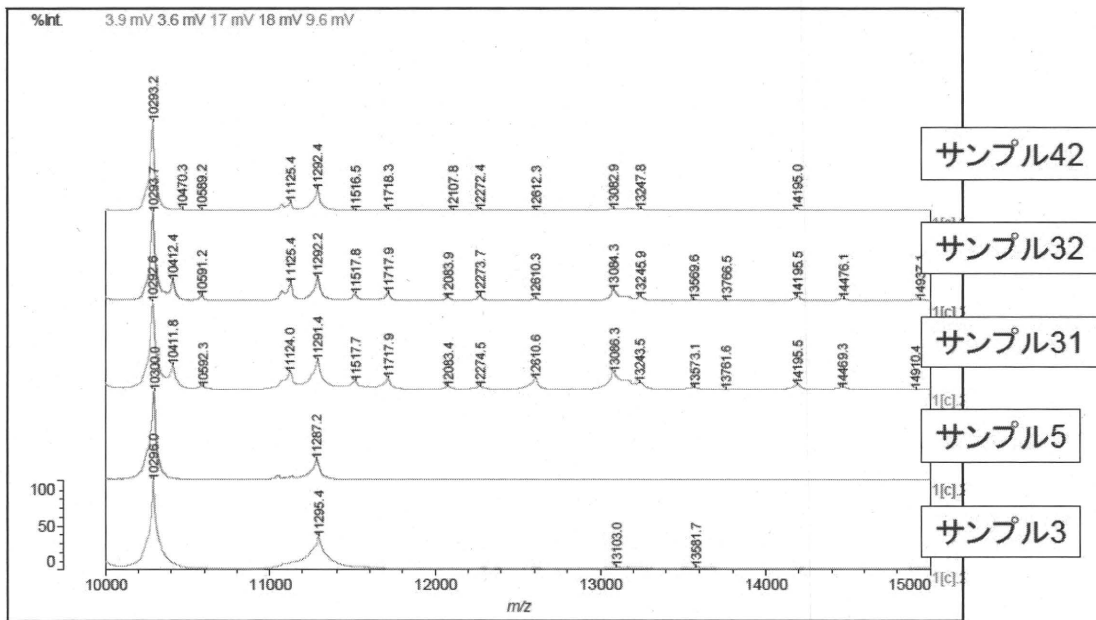


図10 機関番号3、5、31、32、42のマススペクトル (m/z 10000-15000)

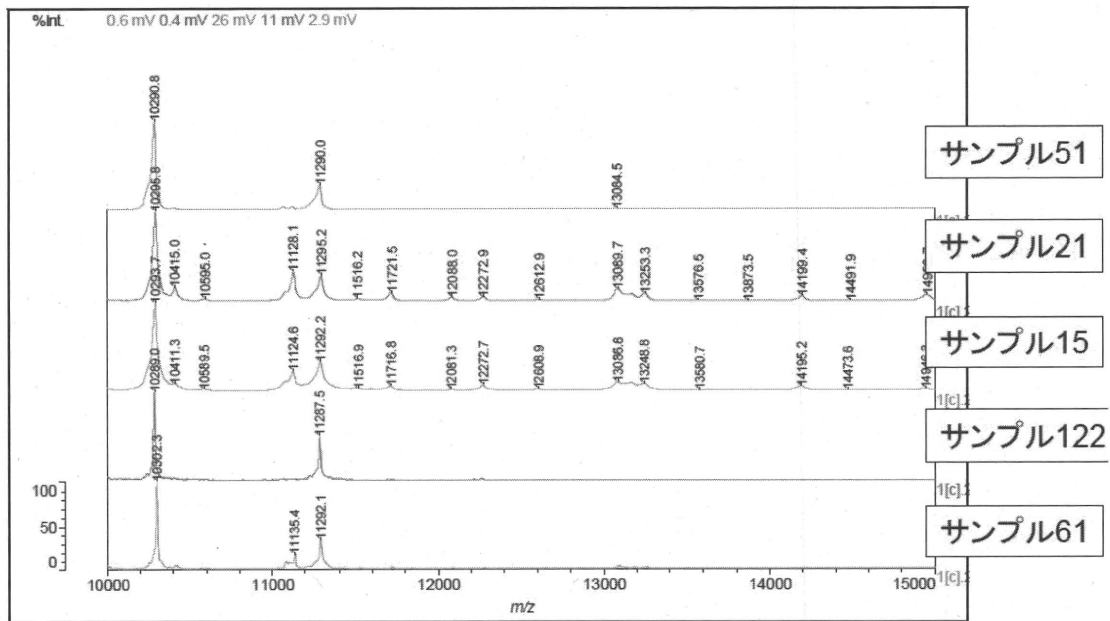


図13 機関番号61、122、15、21、51のマススペクトル (m/z 10000-15000)

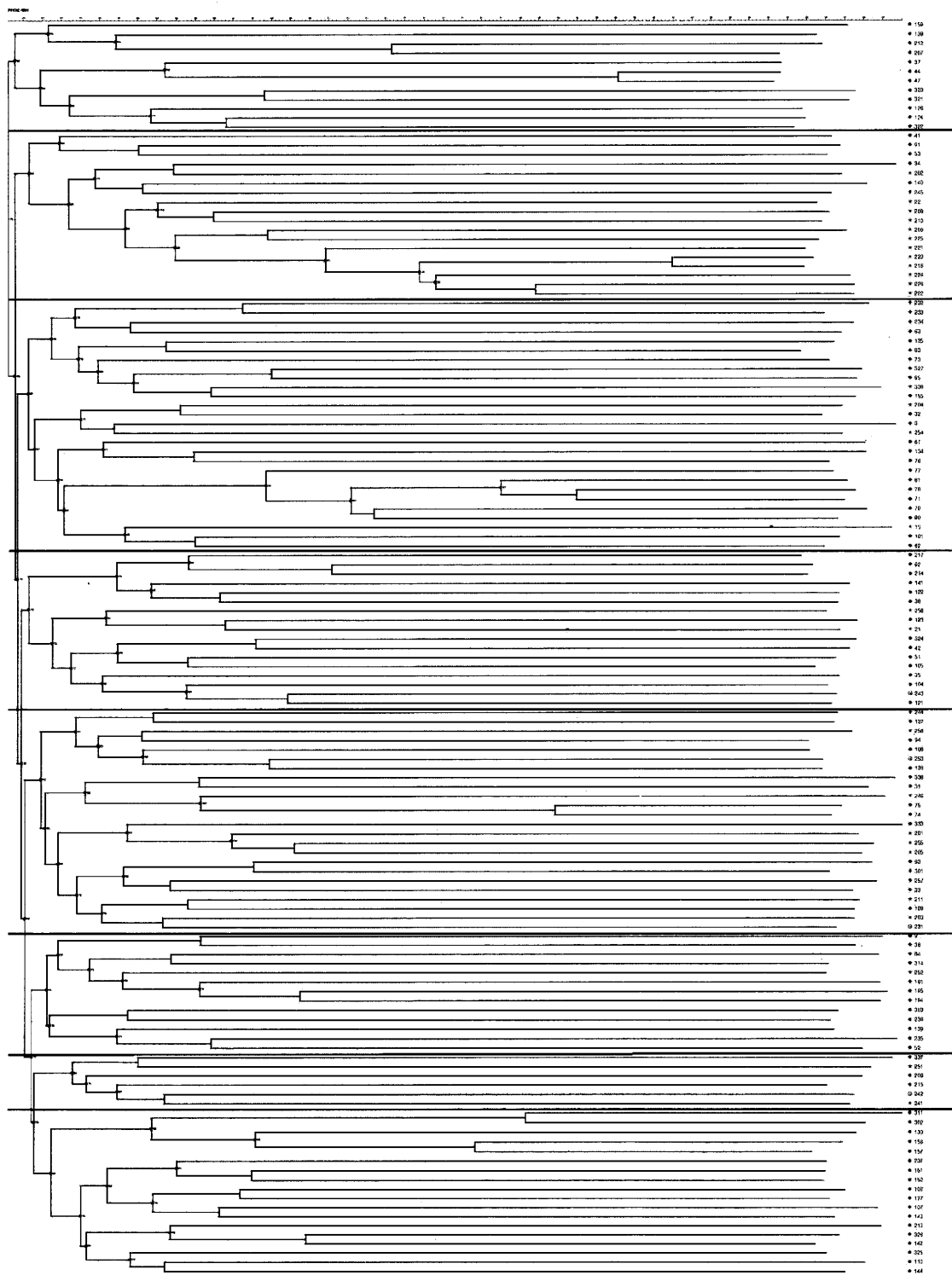


図14 PFGE解析の結果 (系統図の上よりグループ番号1~8に設定)

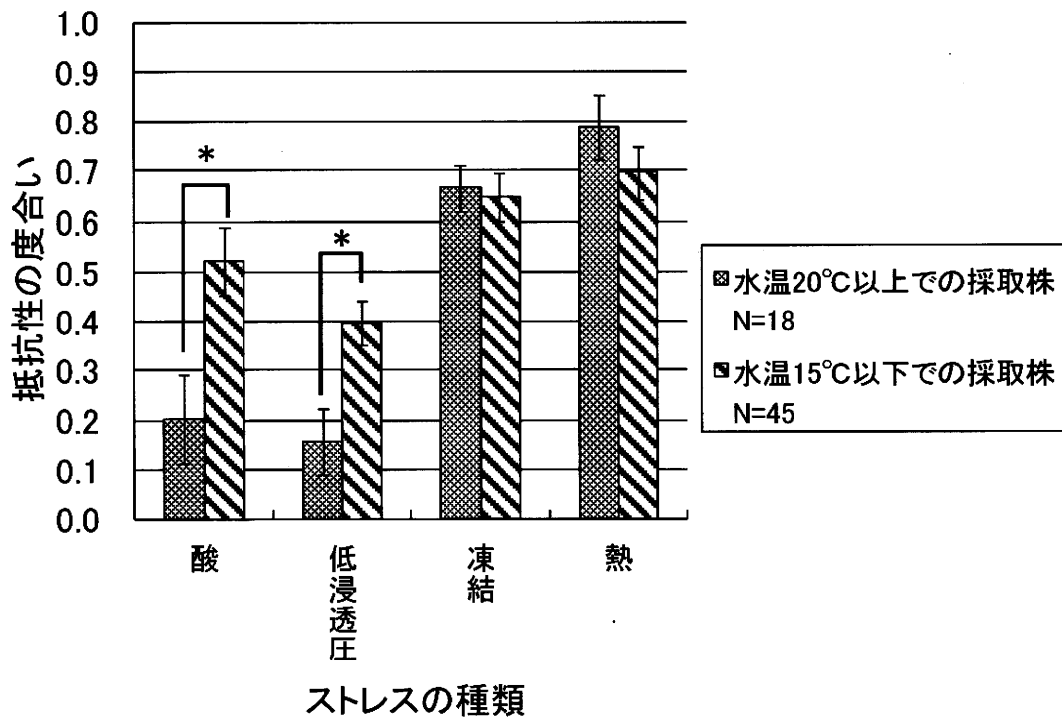


図15 採取水温の違いによるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)

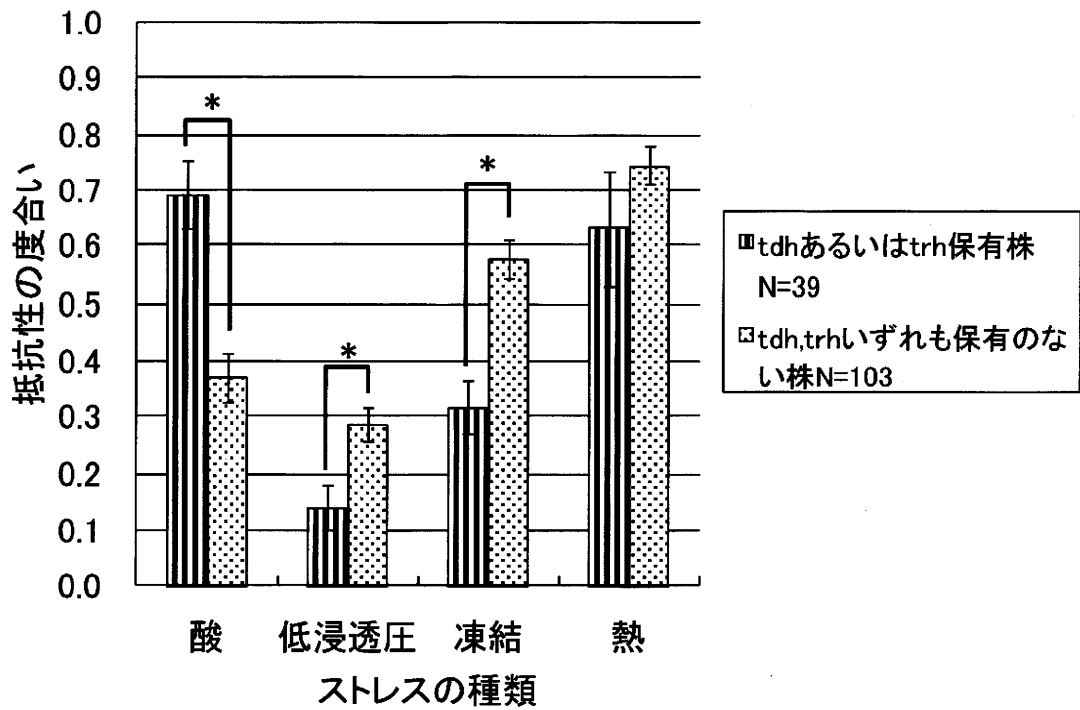


図16 病原性関連遺伝子の保有によるストレス抵抗性の比較 (* $p < 0.05$)