

- Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. IUMS 2011. Sapporo, Hokkaido, Japan. 2011.9.
- 4) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishi Y., Goto K., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. 45th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting, United State-Japan cooperative program on Development & Utilization of Natural Resource. Tokyo, Japan. 2012.3.
 - 5) 渡辺麻衣子、小沼ルミ、瓦田研介、小西良子、鎌田洋一. 遺伝子塩基配列を指標とした食品由来 *Fusarium* 属分離株の同定. 第 32 回日本食品微生物学会学術総会、東京、(2011. 10)
 - 6) 八木田健司、村上裕子、馬ザルコシステイスが病因物質とされる食中毒とその馬肉汚染、第 81 回日本寄生虫学会大会、シンポジウム「新寄生虫」病学、兵庫 (2012.3)
 - 7) 長尾清香、李謙一、小西良子、工藤由起子. 志賀毒素産生性大腸菌が保有する病原因子と血清群との関連性の解析. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会、福岡 (2012. 10)
 - 8) 福島敬介、河野智美、梅原成子、青木佳代、坂口初美、向井晃一、石川和彦、林 賢一. 滋賀県内で処理された食鳥肉の食中毒菌汚染の実態について. 第 43 回滋賀県公衆衛生学会、大津市 (2013. 2)
 - 9) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishi, Y. and Kamata, Y. Application of phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species to the prediction about the potential mycotoxin-productivity. MycoRed 2012. Ottawa. 2012.6.
 - 10) 渡辺麻衣子、米澤隆弘、小西良子、鎌田洋一. *Fusarium* 属菌のマイコトキシン産生能を推定する一分子系統解析の有用性. 日本マイコトキシン学会第 71 回学術講演会、那覇 (2012.7)
 - 11) 渡辺麻衣子、北山真弓、吉成知也、橋本ルイコ、川上浩、高橋治男、小西良子、鎌田洋一. 食品由来 *Aspergillus niger* のフモニシン類産生性スクリーニング手法についての検討. 日本食品微生物学会第 33 回学術総会、福岡 (2012.10)
 - 12) 渡辺麻衣子、大波純一、足立淳、小西良子、鎌田洋一. *Fusarium proliferatum* ゲノム中の転移因子探索のためのドラフトゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会、長浜 (2013.3)

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究

腸炎ビブリオのストレス抵抗性の解析およびタイピング法の比較研究

分担研究者 熊谷進（東京大学大学院農学生命科学研究科）

協力研究者 長谷川朗生（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は、特に夏季において海産食品を汚染し問題となる食中毒菌である。わが国においては、海産食品を生食で食する習慣が存在し曝露リスクも高いと考えられることから、リスク評価を元にした対策が必要となっている。しかし本菌に関する疫学研究は少なく、広範囲にわたる菌株を対象とした研究は行われてこなかった。本研究では、国内および海外各地での海水・魚介類中から腸炎ビブリオの菌株を採取し、由来や分離時期、分離時の海水温の違い等によりストレス抵抗性やその機構がどの程度異なるのかを明らかにすべく、酸・低浸透圧・凍結・熱に対するストレス抵抗性を調べた。また、ストレス抵抗性との関連が考えられた遺伝子 (*oppAB*, *EscC*, *YscO*, *EnvZ*, *murQ*, *fadB*, *cspA*, *cadA*, *mglc*) を設定し、その保有状況を調べた。

続いて、今後主流となると考えられるタイピング法であるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-TOF/MS) 解析およびバイオフィェノタイプマイクロアレイ解析について、ビブリオ・アルギノリティカスもあわせて比較対象としてその有用性を検索した。

ストレス抵抗性に関しては、株の由来ごとにストレス抵抗性の強弱の傾向が分かれ、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認められた。しかしこうした株について耐性関連遺伝子の保有状況との関連は認められず、ストレス抵抗性メカニズムが複合的に働いている可能性が示唆された。

タイピング法に関しては、PFGE解析においては非常に多様なバンドパターンを示し大きく8クラスターに分かれたものの、ビブリオ・アルギノリティカスの独立したクラスターは確認できなかった。また、類縁度による地理的分布やストレス抵抗性との比較についてもバンドパターンの多様性の影響によって、PFGE解析単体では比較ができないことが明らかとなった。しかし、各クラスター間では *tdh* および *trh* 保有株の割合にばらつきが認められ、遺伝子の保有状況によってクラスター分類がなされる可能性が示された。株を選別して実施したMALDI-TOF/MS解析においては、腸炎ビブリオとビブリオ・アルギノリティカスの区別ができ、血清型の同定に有用と考えられるピークが確認された。

バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析においては、酸ストレス抵抗性メカニズムに関わると考えられるアミノ酸を明らかにした。結果、酸抵抗性メカニズムに関連すると考えられるアミノ酸が複数見つかかり、これらへの反応の違いによって環境由来株と臨床由来株で異なるクラスターが形成される傾向が認められた。このことから由来の違いによって酸抵抗性メカニズムが異なる可能性が示唆された。

以上より、ストレス抵抗性試験により、環境中において低水温下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ースとして検討できる方向性が示された。PFGE解析やMALDI-TOF/MS解析、バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析を用いたクラスター分類は株を詳細に分離することが可能であり、類縁度の比較および由来の探索には複数のアプローチを組み合わせることが重要であると考えられた。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は、汽水域を中心に沿岸海水中に生息し、特に夏季に海産食品において問題となる食中毒細菌である。平成24年におけるわが国の患者数は124人と、平成23年におけるわが国の患者数（78人）よりも一定の増加が認められた。国内での発生状況自体は近年減少傾向にあるものの、世界的に見ると東南アジアを中心として発生が依然多く認められており、リスク評価を元にした対策が世界的に求められている。これまで明らかとなった本菌の特徴として下記の二点が挙げられる。

①病原性関連遺伝子である *tdh* 遺伝子陽性株は食中毒患者由来株では95%以上を占めるが、環境由来株では1%に満たない

②冬季において食中毒発生がなく、環境中からも極めて低い確率でしか分離できなくなる

このような特徴は、環境からいかにして感染への経路へと至るのかの解明において大きな妨げとなっている。本菌に関する疫学研究はまだ少なく、特にわが国においては広く菌株を分離収集し、それらを用いた分子疫学的解析の試みは行われてこなかった。本研究は、国内および海外各地での海

菌株の由来や分離時期、分離時の海水温の違い等によりストレス抵抗性やその機構がどの程度異なるのかを明らかにすることを目的としている。続いてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）解析やマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-TOF/MS）、バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析などの分子疫学的手法を用いてそれぞれの特徴を探り、ストレス抵抗性の評価と組み合わせることで、健康被害の指標となる病原性マーカの検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

1. 菌株の収集

環境食品由来および臨床由来の腸炎ビブリオの菌株として計200株およびビブリオ・アルギノリチカス1株を使用した。環境中からの収集にあたっては2010年6月から2011年9月までの間に環境中からの採取として海水および土着の貝であるムラサキイガイやイワガキなど種々の魚介類を設定した。収集場所として、北海道、宮城、新潟、東京、神奈川、静岡、香川、福岡、鹿児島を、さらに海外においてもタイ、マレーシアを設定した。さらに大分県環境センターより大分とインドネシ

アの株を、福岡県衛生研究所より福岡の株を譲受して研究に用いた（表1）。

2. 環境由来株の検出方法

(1) 増菌方法

ストマッカー袋に入れた検体の重量を測定し、9倍量のアルカリペプトン水（日水製薬）を加え、37°C下で18時間培養した。培養液10~20 μ lをクロモアガー・ビブリオ培地（クロモアガー社）に画線し、37°C下で18時間培養した。*tdh*および*trh*検出のPCRの結果が陽性の場合には多数のコロニーが釣菌できるよう希釈列を塗布した。

(2) 確定試験

確定にあたってはクロモアガー・ビブリオ培地を使用した。培地上のコロニーを観察し、腸炎ビブリオと思われる藤色のコロニーを釣菌し、*toxR*遺伝子を標的としたPCR法を行い確定した。ビブリオ・アルギノリティカスについてはクロモアガー・ビブリオ培地上の白色のコロニーを釣菌し、*VA*遺伝子を標的としたPCR法を行った上で3%NaCl加TSI培地（ISL社）にて斜面/高層が黄/黄に変色することで確定した。

3. 菌株の特徴の検索

(1) DNA抽出方法

増菌液1mlを10,000 \times gで10分間遠心し、上清を除き沈殿に滅菌蒸留水を加えて菌液を洗浄した。その後100°Cにて10分加熱し、10,000 \times gで10分間遠心して得られた上清をTemplate DNAとした。

(2) *toxR*、*VA*、*tdh*、*trh*遺伝子を標的としたPCR法

(1) で得られたTemplate DNAを用いて下記の方法に従いPCRを行った。

*toxR*についてはTakahashiらの方法（*J. Microbiol. Methods*, 2005, 61:77-85）を使用した。反応試薬20 μ lにTemplate DNA 5 μ lを加え計25 μ l

の反応とした。PCR条件は熱変性94°C1分、アニーリング63°C1.5分、伸長72°C1.5分を1サイクルとして20サイクル行った。得られたPCR産物は2%アガロースゲル（Nusieve 3:1 agarose: Cambrex Bio Science Rockland）にて電気泳動を行い、産物（386bp）の確認を行った。

*VA*についてはDi Pinto, A.らの方法（*J. Food Prot.* 2005, 68(1):150-153）を使用した。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条件は熱変性94°C0.5分、アニーリング7°C0.5分、伸長72°C1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（737bp）の確認を行った。

*tdh*についてはTadaらの方法（*Molecular Cellular Prob.* 1992, 6:477-487）を使用した。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条件は熱変性94°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1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（251bp）の確認を行った。

*trh*については西渕らの方法（*日本臨床*, 1992, 50:348-352）を使用した。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条件は熱変性94°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1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（250bp）の確認を行った。

4. ストレス抵抗性の評価

(1) ストレス曝露試験

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。

曝露時間は酸、浸透圧ストレスでは8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。

ストレス曝露後、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回試験し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

ストレス曝露後の抵抗性の評価にあたっては、分離された海域の海水温の差、*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。

また、ストレス抵抗性が由来や採取場所によってどの程度異なってくるかを探る目的でクラスター解析を行った。クラスター解析を行うにあたっては、統計解析ソフトウェアR (R project) の*hlust*関数を使用した。

5. 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*、*yscOp*、*envZ*、*murQ*、*fadB*、*cspA*、*cadA*、*mg1c*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/primer3p>

lus.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2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°C0.15分、アニーリング59°C1分、伸長72°C1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°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1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、*mg1c*: 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。

6. PFGE解析

使用菌株として腸炎ビブリオ135株とビブリオ・アルギノリテイクス1株を選別した。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ターに流し入れ固めた。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*SfiI*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。

また機関番号207と226に関しては、解析におけるストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を確かめるべく5つの条件を設定して解析を行った(表3)。

1. 通常培養：培養に関しては上記の方法に則った。

2. 継代繰り返し：アルカリペプトン水にて37°C下で12時間培養し、継代という操作を18回にわたり行った。

3. 低温下2ヶ月培養：アルカリペプトン水にて2ヶ月にわたり12°C下で静置させた。

4. 薬耐性付与：ニューキノロン系抗生物質であるシプロフロキサシン耐性を付与させた株を使用した。耐性付与にあたっては、Okuda, J.らの方法(*Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(5):1156-1162)に拠った。これにより得られたシプロフロキサシンへの最小発育阻止濃度(MIC)が10 μ g/mlの株を使用している。

5. 貧栄養培養：Template作成の際に5倍希釈アルカリペプトン水による培養を行った。

7. MALDI-TOF/MS解析

供試菌株として腸炎ビブリオ20株およびビブリオ・アルギノリティカス1株を用いた(表4)。PFGEのクラスター分類の結果とMALDI-TOF/MS解析の結果を比較するべく、表中には株が分類されたPFGEクラスターを記載している。菌株をアルカリペプトン水にて振とうさせながら12時間培養し、10,000 \times gにて4°C下で10分遠心させた。滅菌蒸留水で洗浄させ、80%エタノールにつけて4°C下で1

時間おき、templateとした。

Dieckmann, R.らの方法(*J. Applied Microbiol.* 109:199-211)に依拠して分析を行った。AXIMA微生物同定システム(島津製作所)を使用し、マトリックスとして20mg/ml CHCAを使用した。測定条件としてレーザー光源：N2封入型レーザーm 検出イオン：正イオン、飛行モード：リニアモード、加速電圧：+20kVを設定した。

サンプル調製にあたっては、サンプルの入った容器にギ酸20 μ Lを加え攪拌した溶液を1.0 μ Lサンプルプレートに搭載し、自然乾燥させた。乾燥したギ酸抽出液の上にマトリックス溶液を1 μ L重層し、自然乾燥の後、分析に供した。なお、各サンプルにつき2ウェルサンプルを搭載し、それぞれについて二回マススペクトルデータの取得を行った(合計n=4)。

各サンプルのマススペクトルを取得するにあたっては大腸菌DH5 α のマススペクトルを用い外部標準法による質量較正を行った(測定質量範囲m/z2,000-20,000)。

分解能を向上させるため、以下1~4の手順による解析を行った。

1. 各株で共通して得られるピークを用いて内部標準法による質量較正を実施。

2. 株ごとに、検出頻度60%以上のピークを抽出したリストを作成。

3. 各株で共通して得られるピークを抽出したリスト(Exclusion list)を作成。

4. 1~2の作業から得られたピークリストから3.のExclusion listのピークを差し引いたものを用い、デンドログラムを作成した(single link agglomerative clustering algorithm)。

デンドログラムの解析に際しては、株ごとに検出頻度60%以上のピークを抽出したリストを使用し、相対強度1%以下のピークを除外した。また明らかに解析段階での誤差(タンパク発現プロファ

イルの違い、あるいは分析日の違い) と考えられるピークについては目視で判断し、出来るだけ除外した状態で解析を行った。

菌株特異的ピークの解析に際しては、AXIMA微生物同定システムのソフトに付属の機能を利用し、再現性良く検出されている特異的ピークをいくつか選び出した(>m/z 4000)。選び出したピークの推定は、TagIdent (ExPASy) もしくはHanzen, TH.らの報告 (*Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75 (21):6745-6756) を参考とした。

また機関番号207と226に関しては、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を確かめるべくPFGE解析と同様に5つの条件を設定して解析を行った(表3)。

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。

8. バイオフィノタイプマイクロアレイ解析

供試菌株として、腸炎ビブリオ48株を使用した(表5)。各菌株を2%NaCl加TSA培地(Difco)に画線し、37°C下で18時間培養した。形成されたコロニーを釣菌し、IF-10a GN Base inoculating fluid (Biolog) とDye Mix A (Biolog)を1:200の割合で混和した溶液10ml中に溶かし、よく混濁させた後、PM10プレート(96 pH response assays; Biolog)に各ウェル100 μ lずつ添加した。本プレートを37°C下で48時間静置し、細胞の呼吸による発色の度合いをOD595を測定することで確認した。測定データはそのままデータ解析に使用した。解析にあたっては、酸抵抗性メカニズムの菌株間の相違を検索するために、統計解析ソフトウェアR (R project) のheatmap.2関数を使用した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. ストレス抵抗性の評価

水温15°C以下(冬季)において採取された菌株45株と水温20°C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1に示した。水温15°C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2)。*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(図3)。*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。

クラスター解析では、大きく6つのクラスターに分かれた(図4)。この6つのクラスター間において、臨床由来株の割合が11%~43%と大きく分かれる結果となった(表6)。クラスター4と6に関しては臨床由来株の割合が14%、11%と低い値を示した上、両クラスターに分類される菌株の酸抵抗性の平均が 0.088 ± 0.02 、 0.067 ± 0.03 と他のクラスターに対して低い値を示すなど、環境食品由来株は酸抵抗性の低いクラスターに比較的多く分配される傾向が明らかとなった。クラスター間で

ストレス抵抗性の高低にそれぞれ特徴が認められたが、酸以外のストレス抵抗性について菌株の由来、ならびに採取場所、分離時期、分離時の海水温などとの一定の関連は認められなかった。

2. 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7)。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。

3. PFGE解析

作成した系統樹を図5に記載した。系統樹は大きく8群に分かれ、多彩な菌が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8)。またこれら*tdh*陽性株の多くは患者由来であった。ビブリオ・アルギノリティカスの独立したクラスターは確認できず、クラスター4に分類される結果となった。

ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を確かめる試験においては、作成した系統樹を図6に記載した。いずれの株も、解析前に貧栄養培地を使用した際に異なるクラスターに分類された。機関番号207、226いずれの株もストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響は認められず、それぞれ同一のクラスターに分類されることが明らかとなった。貧栄養培養を行った条件の泳動像を見ると、バンドが消失している箇所が認められる結果となった。

4. MALD-TOF/MS解析

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7)。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互いに近縁の種であることが考えられるが、一部のピークが種特異的に検出されている(図8、9)。

個別の腸炎ビブリオごとにピークを並べて比較し、株間でピークの検出に差が認められた範囲を抽出した。機関番号3、5、15、21、31、32、42、51、61、122の10株における比較では、機関番号15(03:K6)のみm/z9472にはピークが検出されず、その代わりにm/z9575にピークが検出された(図10)。これを再キャリブレーションした結果、m/z9472はm/z9466、m/z9575はm/z9569(30S ribosomal protein S17と考えられる)となったため、こちらの値を採用して比較した。Hanzen, TH.らの報告(*Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75(21):6745-6756)にあった血清型04:K12のマーカ候補とされるピークm/z10431(50S ribosomal protein L25)の近傍にはm/z10424(10426)のピーク(50S ribosomal protein L25ではなく30S ribosomal protein S19と考えられる)が検出された(図11)。このピークはサンプル21以外に15、31、32、5、61でも検出され、血清型特異的ではなかった。これはマトリックスとしてCHCAを使用した際には認められなかったピーク(図12)であるため、マトリックスとしてのシナピン酸の有用性が明らかとなった。なおこのピークも再キャリブレーションにより、m/z10414となったため、以下の株間の比較に際してはこちらの値を採用している。

機関番号202(03:K6)、216(03:K7)、221(03:K6)のみ、機関番号15と同様m/z9569(30S ribosomal protein S17と考えられる)にピークが検出された。それ以外の株は、機関番号9、206(ともに03:K6)を含め、m/z9466にピークが検出された

(図10)。この結果から、m/z9569は血清型特異的なピークであると結論づけることはできなかったものの、m/z9466→m/z9569と同じ分子量変化が起こっている株は、同じ先祖から分かれてきた可能性があると考えられた。また、04:K12の血清型を持つ機関番号231にのみm/z10542にピークが検出された(図13)。このピークは、マトリックスとしてDHBを使用した場合にHanzen, TH.らの報告にある血清型04:K12のマーカースとされるピークm/z10431と一致した(図14)。この結果より、マトリックスとしてシナピン酸下で出現するm/z10542、あるいはDHBの使用下で出現するm/z10431のピークが血清型04:K12のマーカースとして使用できる可能性が示唆された。

続いて、様々な条件を設定した腸炎ビブリオ2株を使用し、ピークの変化を確認し、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を評価した。各種ストレス下にあった各株のマスマスペクトルを目視で比較した結果、検出される主要なピークについて明らかなシフト(アミノ酸配列の変異)は特に確認されなかった。サンプル8(226_8)のみ、m/z9465とm/z9569両方にピークが検出され、それ以外のサンプルはどちらかにのみピークが検出されるという結果が認められた(図10)。これらのピークのうちm/z9569(30S ribosomal protein S17に変異が起こったと考えられる)は機関番号202(03:K6), 216(03:K7), 221(03:K6)において認められており、m/z9466(30S ribosomal protein S17と考えられる)は機関番号9, 206(ともに03:K6)において認められている。

これまで今回の解析に使用したサンプル全てをあわせてマスマスペクトルのクラスター分析を行った結果、PFGEクラスターとMALDI-TOF/MS解析の結果は一定程度対応する傾向が認められ、ビブリオ・アルギノリチカスは単体で一つのクラスターを形成した(図15)。腸炎ビブリオ株内で形成

されたクラスターと菌株の由来や、採取場所、分離時期、分離時の水温との関連は認められなかったものの、条件を変えて解析を行った機関番号207と226においては、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響は認められず、それぞれ同一のクラスターに分類されるという結果が認められた(図15、図16)。逆に、解析前に貧栄養培養を行ったサンプル5とサンプル10はそれらのクラスターとは別のクラスターに分類される結果となった。

5. バイオフィェノタイプマイクロアレイを用いた解析

バイオフィェノタイプマイクロアレイを37℃下で48時間おいたところ、β-ヒドロキシグルタミン、オミニチン、アルギニン、ジアミン-ピメリン酸、リシンが添加されたウェルで発色の度合いが株間で大きく異なり、OD595の値は0.073~2.7の値を示した。この値を基にしたヒートマップを作成したところ、3つのクラスターが形成された(図17)。さらにこのクラスター間での臨床由来株の占める割合を比較したところ、クラスター2において0%となり、環境食品由来株だけで形成されるクラスターが出現した(表9)。由来以外の採取場所、分離時期、分離時の海水温の違いにおいては各クラスターで特徴は認められなかった。

D. 考察

1. 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、ストレス曝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、ストレス曝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―として検討できる方向性が示された。

2. 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*、*mgIc* 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。

3. 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とは別のタイピング手法を検討する必要があると考えられる。

また、解析前の条件を変更した株でも、同じ機関番号内では同一のクラスターに分類され、極めて安定的な解析手法である可能性が明らかとなった。腸炎ビブリオに関しては、2%NaClを添加して

いない市販のTSA培地組成（0.5%NaCl濃度）でも生育が可能であり、2%NaCl加TSA培地で形成されるコロニーと見た目の変わらないコロニーが形成される。しかし、本コロニーをPFGE解析に使用した際においては、同じ株であっても解析結果に誤差が生じることが明らかとなった。この結果から腸炎ビブリオと疑わしい株のタイピングに関しては、事前にクロモアガー培地などの酵素基質培地などの培地と組み合わせて腸炎ビブリオ用の準備を行うことが求められる。また、薬剤耐性に関しては、耐性菌であってもバンドパターンにほとんど違いがなく、同一のクラスターに分類されたことから、薬剤耐性獲得株であっても獲得前の株と比較して由来を明らかにできる可能性がある。今回はニューキノロン系抗生物質を使用した。今後は、最小発育濃度を高くした株についても同様なのか、あるいは他の種類の抗生物質に対しても同様なのかという点について究明が求められる。

4. 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、同種株間の違いを識別できる可能性が明らかとなった。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だけでなく、腸炎ビブリオの株毎のクラスターが細かく分かれた。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ピ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。

また、今回識別能を上昇させる工夫として下記のことを行っている。

1. コロニーを直接サンプルプレートに載せる方法から、ギ酸による抽出法へ変更した。

→サンプル搭載量のばらつきが小さくなり、検出ピーク数のばらつき小さくなった。

2. 質量較正を、各菌株で共通して検出されるピークを内部標準として行った。→質量誤差が小さくなり、ピークのシフトをより確実に捉えられるようになった。

3. デンドログラム作成の際、各株n=4のデータから、株ごとに検出頻度60%以上のピークを抽出したリストを使用した。

→再現性の上昇に役立つと考えられる。

4. 各株で共通して検出されるピーク (Exclusion list) を差し引いてデンドログラムを作成した。

5. マトリックスをCHCAからシナピン酸に変更した。

→上記2点の結果高質量領域 (m/z 10,000) のピークのS/Nが向上した。

特にマトリックスに関しては、シナピン酸下で出現する m/z 10542、あるいはDHBの使用下で出現する m/z 10431のピークが血清型04:K12のマーカーとして使用できる可能性が示唆されたことは、各菌株特異的ピークを血清型スクリーニングの指標として利用できる可能性を大いに高める結果となった。

一方留意すべき点として、解析結果の誤差がある。今回解析のロット間において明らかに解析段階での誤差 (タンパク発現プロファイルの違い、あるいは分析日の違い) と考えられるピークが出現し、クラスター解析に大きな影響を与える結果となった。この誤差については解析の際に目視で

判断し、出来るだけ除外した状態で解析を行ったが、誤差を排除できるようなプロトコルを確定させることも必要であると考えられた。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。

マススペクトルのクラスター分析を行った結果では、菌株の由来や採取場所、分離時期などと対応するクラスター分類は行えなかったものの、PFGEクラスターとの結果は対応する傾向が認められた。これは高い識別能を示すPFGE解析と同等の識別能を有する可能性を示唆する。PFGE解析が準備から解析までに長い時間を要することと比較すると、ごく短時間で結果を得られるMALDI-TOF/MS解析は有用であると考えられた。また、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響は認められなかったが、これはMALDI-TOF/MS解析で検出の対象となる成分が主にリボソームタンパク質で変異を受け難いためと推測される。

以上より、本解析法は同一種内の同定に関しては他のタイピング法と組み合わせるなど、より一層の研究が求められるものの、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を受けない、安定的な解析法である可能性が示唆された。

5. バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析

バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析においては、酸抵抗性メカニズムに関連すると考えられるアミノ酸への反応が、環境食品由来株と臨床由来株で異なることが明らかとなった。従来リシンとアルギニンに関しては、腸炎ビブリオにおいてリシン脱炭酸酵素の関与 (Tanaka, Y. 2008. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1283-1293) やシュードモナス属菌やバシラス属菌で認められるアルギニ

ンデイミナーゼを介した機構 (Cunin, R. 1986. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 50: 314) など、アミノ酸と酸抵抗性メカニズムとの関連が指摘されている。これまでの報告にない、 β -ヒドロキシ-グルタミン、オミニチン、ジアミン-ピメリン酸も酸抵抗性メカニズムに関わる新たなアミノ酸候補である可能性がある。今後はこれらのアミノ酸に関わる遺伝子の発現や、当該アミノ酸の発現と酸抵抗性の高低との関連を検索することが求められる。

E. 結論

本研究の結果、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、ストレス抵抗性試験により、環境中において低水温下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ーとして検討できる方向性が示された。

PFGE解析やMALDI-TOF/MS解析、バイオフェノタイプマイクロアレイ解析を用いたクラスター分類は株を詳細に分離することが可能であり、類縁度の比較および由来の探索には複数のアプローチを組み合わせることが重要であると考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Akio Hasegawa, Yukiko Hara-Kudo, Kikuyo Ogata, Shioko Saito, Yoshiko Sugita-Konishi, Susumu Kumagai. Differences in the stress tolerances of *Vibrio parahaemolyticus* strains due to their source and harboring of virulence genes. *J. Food Prot.* (Accepted).

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.

Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Stress tolerance of environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio* 2011. Santiago, Spain, 2011.11.

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	分離時の 水温	tdh 定性PCR	trh 定性PCR
41	北海道	海水	2010.8		24	-	-
42	北海道	ヤドカリ	2010.8		22	-	-
44	北海道	イワガキ	2010.8		21	-	-
47	北海道	ムラサキイガイ	2010.8		22	-	-
71	北海道	海水	2010.11		13	-	-
73	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
74	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
75	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
76	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
77	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
78	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
79	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
80	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
81	北海道	海水	2010.11		13	-	-
83	北海道	ヤドカリ	2010.11		13	-	-
84	北海道	ヤドカリ	2010.11		13	-	-
85	北海道	海水	2010.11		13	-	-
451	青森	食中毒患者	2009.8	03:K7		+	-
452	青森	食中毒患者	2009.8	03:K7		+	-
453	青森	食中毒患者	2010.8	01:K56		+	-
454	青森	食中毒患者	2010.8	01:K56		+	-
455	青森	食中毒患者	2010.9	03:K29		+	-
456	青森	食中毒患者	2010.9	01:K56		+	-
457	青森	食中毒患者	2010.9	06:K47		+	-
458	青森	食中毒患者	2010.9	04:K8		+	-
459	青森	食中毒患者	2011.8	Out:K15		+	+
460	青森	食中毒患者	2011.8	Out:K15		+	+
461	青森	食中毒患者	2011.8	05:K15		+	+
462	青森	食中毒患者	2011.8	05:K15		+	+
463	青森	食中毒患者	2011.8	04:K68		+	-
15	秋田	ボイルホタテ	1997	03:K6		+	-
401	秋田	食中毒患者	2004.8	03:K6		+	-
402	秋田	食中毒患者	2005.8	03:K6		+	-
403	秋田	食中毒患者	2005.8	03:K6		+	-
404	秋田	食中毒患者	2005.8	03:K6		+	-
405	秋田	食中毒患者	2005.8	03:K6		+	-
406	秋田	食中毒患者	2007.8	03:K6		+	-
407	秋田	食中毒患者	2007.9	03:K6		+	-
408	秋田	食中毒患者	2008.9	03:K6		+	-
409	秋田	食中毒患者	2007.9	01:K25		+	-
410	秋田	食中毒患者	2005.8	04:K68		+	-
411	秋田	食中毒患者	2005.6	01:Kut		+	+
412	秋田	食中毒患者	2005.6	01:Kut		+	-
413	秋田	食中毒患者	2008.9	01:Kut		+	-
414	秋田	食中毒患者	2006.8	03:K46		+	-
415	秋田	食中毒患者	2005.8	03:K7		+	-
416	秋田	食中毒患者	2004.9	04:K8		+	-
417	秋田	食中毒患者	2007.8	04:K8		+	-
418	秋田	食中毒患者	2005.9	05:K15		+	-
419	秋田	食中毒患者	2004.8	05:Kut		+	-

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	分離時の 水温	tdh 定性PCR	trh 定性PCR
420	秋田	食中毒患者	2006.8	08:Kut		+	-
421	秋田	食中毒患者	2004.8	09:K44		+	-
422	秋田	食中毒患者	2005.8	Out:Kut		+	-
61	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		29	-	-
62	宮城	二枚貝(種類不明)	2010.9		27	-	-
63	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		27	-	-
191	宮城	ムラサキイガイ	2010.12		9	-	-
194	宮城	海水	2010.12		8	-	-
195	宮城	海水	2010.12		9	-	-
221	東北	イワガキ	2001	03:K6		+	-
222	東北	イワガキ	2001	03:K6		+	-
223	東北	イワガキ	2001	03:K6		+	-
226	東北	海水	1998	03:K6		+	-
3	新潟	海水	2010.6			-	-
9	新潟	まな板	1997	03:K6		-	-
21	新潟	食中毒患者	1998	04:K12		+	-
22	新潟	食中毒患者	1998	04:K68		+	-
177	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		13	-	-
311	新潟	海水	2010.12		13	-	-
314	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		13.5	-	-
361	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
362	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
363	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
364	新潟	海水	2011.8		27	-	-
365	新潟	海水	2011.8		27	-	-
366	新潟	海水	2011.8		27	-	-
367	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
368	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
369	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
370	新潟	海水	2011.8		27	-	-
371	新潟	海水	2011.8		27	-	-
372	新潟	海水	2011.8		27	-	-
373	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
374	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
375	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
376	新潟	海水	2011.8		28	-	-
377	新潟	海水	2011.8		28	-	-
378	新潟	海水	2011.8		28	-	-
379	新潟	海水	2011.8		28	-	-
380	新潟	海水	2011.8		28	-	-
224	中部・近畿	ホッキガイ	2001	03:K6		+	-
225	中部・近畿	アサリ	2000	03:K6		+	-
321	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
322	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
323	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
324	東京	ムラサキイガイ	2011.2		7	-	-
325	東京	ムラサキイガイ	2011.2		7	-	-
326	東京	ムラサキイガイ	2011.2		7	-	-
327	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
333	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-

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	分離時の 水温	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
337	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
338	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
339	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	+	-
51	神奈川	ムラサキイガイ	2010.8		30	-	-
52	神奈川	ヤドカリ	2010.8		30	-	-
53	神奈川	ヤドカリ	2010.8		30	-	-
31	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		28	-	-
32	静岡	海水	2010.7		29	-	-
33	静岡	海水	2010.7		30	-	-
34	静岡	海水	2010.7		31	-	-
35	静岡	海水	2010.7		27	-	-
36	静岡	イワガキ	2010.7		26	-	-
37	静岡	海水	2010.7		27	-	-
38	静岡	海水	2010.7		27	-	-
341	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		12	-	-
342	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		12	-	-
343	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		11	-	-
345	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		11	-	-
346	静岡	ムラサキイガイ	2011.2		11	-	-
151	香川	海水	2010.12		14	-	-
155	香川	海水	2010.12		12	-	-
156	香川	海水	2010.12		13.5	-	-
157	香川	海水	2010.12		13.5	-	-
159	香川	海水	2010.12		15	-	-
91	福岡	海水	2010.11		15	-	-
92	福岡	海水	2010.11		15	-	-
93	福岡	海泥	2010.11		15	-	-
94	福岡	海泥	2010.11		15	-	-
201	福岡	食中毒患者	2000.7	04:K8		+	-
202	福岡	食中毒患者	2009.8	03:K6		+	-
203	福岡	食中毒患者	1989.7	01:K56		+	-
204	福岡	食中毒患者	1990.8	02:K3		+	-
205	福岡	食中毒患者	1995.7	04:K8		+	-
206	福岡	食中毒患者	1997.9	03:K6		-	-
207	福岡	食中毒患者	1998.5	03:K6		-	-
208	福岡	食中毒患者	1998.7	03:K6		+	-
209	福岡	食中毒患者	1998.7	03:K6		+	-
210	福岡	食中毒患者	1999.8	01:K32		+	-
211	福岡	食中毒患者	1999.9	03:K6		+	-
212	福岡	刺身(魚種不明)	1998.8	03:K6		-	-
213	福岡	刺身(魚種不明)	1998.8	03:K56		-	-
214	福岡	アカガイ	1998.8	04:K34		-	-
215	福岡	ウニ	1998.6	03:KUT		-	-
216	福岡	ウニ	1998.6	03:K6		+	-
217	福岡	タイセイヨウサバ	1999.8	02:K28		-	-
231	大分	海水	2006.6	04:K12		+	+
232	大分	海水	2006.6	011:KUT		-	+
233	大分	海水	2006.6	011:KUT		-	+
234	大分	海水	2006.6	08:K30		-	+
241	大分	食中毒患者	2010	03:K29		+	-

表1-4 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	分離時の 水温	tdh 定性PCR	trh 定性PCR
242	大分	食中毒患者	2009	01:KUT		+	+
243	大分	食中毒患者	2009	06:K18		+	+
244	大分	食中毒患者	2009	01:K56		-	+
245	大分	食中毒患者	2008.6	010:KUT		-	+
246	大分	食中毒患者	2007	01:K38		+	-
251	大分	食中毒患者	1989.9	01:K56		+	-
252	大分	食中毒患者	1991.5	08:KUT		+	-
253	大分	食中毒患者	1993.9	01:K41		+	+
254	大分	食中毒患者	1995.7	01:K56		+	-
255	大分	食中毒患者	1995.8	04:K8		+	-
256	大分	食中毒患者	2004.8	01:K25		+	-
257	大分	食中毒患者	2004.9	01:K1		-	+
258	大分	食中毒患者	2004.9	03:K7		+	-
351	鹿児島	ムラサキイガイ	2011.7		28	-	-
352	鹿児島	ムラサキイガイ	2011.7		29	-	-
353	鹿児島	ムラサキイガイ	2011.7		29	-	-
235	インドネシア	ブラックタイガー	2004.8	01:K25		-	-
236	インドネシア	ブラックタイガー	2004.2	01:K25		-	-
237	インドネシア	ブラックタイガー	2004.2	01: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	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
135	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
136	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
137	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
138	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
139	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
140	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
141	マレーシア	海産魚(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1-5 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	tdh 定性PCR	trh 定性PCR
5	新潟	ムラサキイガイ	2010.6	-	-

表2 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			TTATTGAGCTTTGATGTAAAG
<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			TTACGACCCCAGCGATACTC

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3 PFGE解析、MALDI-TOF/MS解析の有用性評価試験に使用した菌株の詳細

サンプル番号	機関番号	採取場所	検体種・分離状況	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR	分離時期	血清型	PFGEクラスター	設定条件
207_1	207	福岡	食中毒患者	-	-	1998.5	03:K6	1	通常培養
207_2									継代繰り返し
207_3									低温下2カ月培養
207_4									薬剤耐性付与
207_5									貧栄養培養
226_6	226	東北	海水	+	-	1998	03:K6	8	通常培養
226_7									継代繰り返し
226_8									低温下2カ月培養
226_9									薬剤耐性付与
226_10									貧栄養培養

表4 MALDI-TOF/MS解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	PFGE クラスター	分離時期	血清型	分離時の 水温	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
42	<i>V. parahaemolyticus</i>	北海道	ヤドカリ	4	2010.8		22	-	-
15	<i>V. parahaemolyticus</i>	秋田	ボイルホタテ	3	1997	03:K6		+	-
61	<i>V. parahaemolyticus</i>	宮城	ムラサキイガイ	3	2010.9		29	-	-
221	<i>V. parahaemolyticus</i>	東北	イワガキ	2	2001	03:K6		+	-
226	<i>V. parahaemolyticus</i>	東北	海水	2	1998	03:K6		+	-
3	<i>V. parahaemolyticus</i>	新潟	海水	3	2010.6			-	-
5	<i>V. alginolyticus</i>	新潟	ムラサキイガイ	-	2010.6			-	-
9	<i>V. parahaemolyticus</i>	新潟	まな板	6	1997	03:K6		-	-
21	<i>V. parahaemolyticus</i>	新潟	食中毒患者	4	1998	04:K12		+	-
337	<i>V. parahaemolyticus</i>	東京	ムラサキイガイ	7	2011.2		10	-	-
339	<i>V. parahaemolyticus</i>	東京	ムラサキイガイ	3	2011.2		10	+	-
51	<i>V. parahaemolyticus</i>	神奈川	ムラサキイガイ	4	2010.8		30	-	-
31	<i>V. parahaemolyticus</i>	静岡	ムラサキイガイ	5	2010.7		28	-	-
32	<i>V. parahaemolyticus</i>	静岡	海水	3	2010.7		29	-	-
202	<i>V. parahaemolyticus</i>	福岡	食中毒患者	2	2009.8	03:K6		+	-
206	<i>V. parahaemolyticus</i>	福岡	食中毒患者	7	1997.9	03:K6		-	-
207	<i>V. parahaemolyticus</i>	福岡	食中毒患者	1	1998.5	03:K6		-	-
216	<i>V. parahaemolyticus</i>	福岡	ウニ	2	1998.6	03:K6		+	-
231	<i>V. parahaemolyticus</i>	大分	海水	5	2006.6	04:K12		+	+
244	<i>V. parahaemolyticus</i>	大分	食中毒患者	5	2009	01:K56		-	+
122	<i>V. parahaemolyticus</i>	タイ	ムラサキイガイ	4	2010.7			-	-

表5 バイオフィェノタイプアレイ解析に使用した菌株の詳細

機関 番号	採取場所 ・産地	検体種・ 分離状況	分離時期	血清型	分離時の 水温	<i>tdh</i> 定性PCR	<i>trh</i> 定性PCR
41	北海道	海水	2010.8		24	-	-
44	北海道	イワガキ	2010.8		21	-	-
76	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
77	北海道	ムラサキイガイ	2010.11		13	-	-
15	秋田	ボイルホタテ	1997	03:K6		+	-
61	宮城	ムラサキイガイ	2010.9		29	-	-
62	宮城	二枚貝(種類不明)	2010.9		27	-	-
195	宮城	海水	2010.12		9	-	-
221	東北	イワガキ	2001	03:K6		+	-
226	東北	海水	1998	03:K6		+	-
3	新潟	海水	2010.6			-	-
9	新潟	まな板	1997	03:K6		-	-
21	新潟	食中毒患者	1998	04:K12		+	-
177	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		13	-	-
314	新潟	ムラサキイガイ	2010.12		13.5	-	-
362	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
363	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
369	新潟	ムラサキイガイ	2011.8		27	-	-
372	新潟	海水	2011.8		27	-	-
224	中部・近畿	ホッキガイ	2001	03:K6		+	-
326	東京	ムラサキイガイ	2011.2		7	-	-
337	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	-	-
339	東京	ムラサキイガイ	2011.2		10	+	-
53	神奈川	ヤドカリ	2010.8		30	-	-
31	静岡	ムラサキイガイ	2010.7		28	-	-
33	静岡	海水	2010.7		30	-	-
38	静岡	海水	2010.7		27	-	-
155	香川	海水	2010.12		12	-	-
91	福岡	海水	2010.11		15	-	-
93	福岡	海泥	2010.11		15	-	-
203	福岡	食中毒患者	1989.7	01:K56		+	-
204	福岡	食中毒患者	1990.8	02:K3		+	-
206	福岡	食中毒患者	1997.9	03:K6		-	-
208	福岡	食中毒患者	1998.7	03:K6		+	-
212	福岡	刺身(魚種不明)	1998.8	03:K6		-	-
216	福岡	ウニ	1998.6	03:K6		+	-
231	大分	海水	2006.6	04:K12		+	+
233	大分	海水	2006.6	011:KUT		-	+
243	大分	食中毒患者	2009	06:K18		+	+
244	大分	食中毒患者	2009	01:K56		-	+
251	大分	食中毒患者	1989.9	01:K56		+	-
253	大分	食中毒患者	1993.9	01:K41		+	+
257	大分	食中毒患者	2004.9	01:K1		-	+
235	インドネシア	ブラックタイガー	2004.8	01:K25		-	-
104	タイ	ハマグリ	2010.8			-	-
121	タイ	エビ	2010.7			-	-
135	マレーシア	海産魚(魚種不明)	2010.9			-	-
301	マレーシア	アカガイ	2010.9			-	+