

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4779285号
(P4779285)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A

請求項の数 11 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2002-506236 (P2002-506236)	(73) 特許権者	501358161
(86) (22) 出願日	平成13年6月27日 (2001.6.27)		ランバック、アラン
(65) 公表番号	特表2004-512822 (P2004-512822A)		フランス国、75006パリ、ブルヴァー
(43) 公表日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		ル・ドゥ・モンパルナス、73
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/002033	(74) 代理人	100081352
(87) 国際公開番号	W02002/000922		弁理士 広瀬 章一
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)	(72) 発明者	ランバック、アラン
審査請求日	平成19年7月30日 (2007.7.30)		フランス国、75006パリ、ブルヴァー
(31) 優先権主張番号	00/08237		ル・ドゥ・モンパルナス、73
(32) 優先日	平成12年6月27日 (2000.6.27)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	審査官	福澤 洋光
前置審査			
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビブリオ細菌の検出および／または判別

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビブリオ培地中に β-グルコシダーゼの基質である少なくとも1種の色素産生剤およびβ-ガラクトシダーゼの基質である少なくとも1種の色素産生剤を含有することを特徴とする、ビブリオ・コレラエ(V. cholerae、コレラ菌)、ビブリオ・パラヘモリティカス(V. parahaemolyticus、腸炎ビブリオ菌) およびビブリオ・アルギノリティカス(V. alginolyticus)からなる群より選ばれたビブリオ属細菌の検出、および／またはビブリオ・コレラエ(V. cholerae、コレラ菌)、ビブリオ・パラヘモリティカス(V. parahaemolyticus、腸炎ビブリオ菌) およびビブリオ・アルギノリティカス(V. alginolyticus)からなる群より選ばれたビブリオ属細菌の少なくとも2種の細菌の間の判別のための培地。

【請求項 2】

5 g / l 以上の濃度のスクロースをさらに含有することを特徴とする、請求項 1 記載の培地。

【請求項 3】

前記色素産生剤が、加水分解により、インドキシル、ハロインドキシル（プロモインドキシル、クロロインドキシル、フルオロインドキシル、ヨードインドキシル、ジクロロインドキシル、クロロプロモインドキシル、トリクロロインドキシル）、メチルインドキシルまたはヒドロキシキノリン誘導体、特に下記誘導体：6-クロロインドキシル、5-プロモインドキシル、3-プロモインドキシル、6-フルオロインドキシル、5-ヨードインドキシル、4,6-ジクロロインドキシル、6,7-ジクロロインドキシル、5-プロモ-4

ークロロインドキシル、5-ブロモ-6-クロロインドキシル、4,6,7-トリクロロインドキシル、N-メチルインドキシルまたは8-ヒドロキシキノリンから選ばれた発色団を放出するものであることを特徴とする、請求項1または2に記載の培地。

【請求項4】

前記β-グルコシダーゼ基質がインドキシルグルコシドであることを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の培地。

【請求項5】

β-グルコシダーゼ基質が5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシル-β-グルコシドであることを特徴とする、請求項4に記載の培地。

【請求項6】

前記β-ガラクトシダーゼ基質がインドキシルガラクトシドであることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載の培地。

【請求項7】

β-ガラクトシダーゼ基質が5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-β-ガラクトシドであることを特徴とする、請求項6に記載の培地。

【請求項8】

ビブリオに対する選択因子をさらに含有することを特徴とする、請求項1～7のいずれかに記載の培地。

【請求項9】

下記成分を含有する（1リットル当たり）ことを特徴とする、請求項1～8のいずれかに記載の培地：

・寒天	15 g
・ペプトン	15 g
・酵母エキス	3 g
・NaCl	10 g
・5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシル-β-グルコシド	0.1 g
・5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-β-ガラクトシド	0.1 g
・スクロース	20 g
・グルコース	1 g
・ラクトース	0.1 g
・IPTG	0.04 g
・トリス塩基	5 g
・クエン酸ナトリウム	10 g
・チオ硫酸ナトリウム	10 g
・コール酸ナトリウム	3 g。

【請求項10】

ビブリオ・コレラエ(V. cholerae、コレラ菌)、ビブリオ・パラヘモリティカス(V. parahaemolyticus、腸炎ビブリオ菌)およびビブリオ・アルギノリティカス(V. alginolyticus)からなる群より選ばれたビブリオ属細菌の検出および／または判別のための請求項1～9のいずれかに記載の培地の使用。

【請求項11】

下記工程を含むことを特徴とする、検体中のビブリオ・コレラエ(V. cholerae、コレラ菌)、ビブリオ・パラヘモリティカス(V. parahaemolyticus、腸炎ビブリオ菌)およびビブリオ・アルギノリティカス(V. alginolyticus)からなる群より選ばれたビブリオ属細菌の検出および／または判別を行う方法：

a. 請求項1～9のいずれかに記載の培地に前記検体または該検体に由来する接種物を接種し、

b. 前記培地上で前記細菌の存在を検出する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、ビブリオ属細菌を目に見えるよう顕示させるための色素産生性培地に関する。

【0002】

ビブリオ属は、コレラ（ビブリオ・コレラエまたはコレラ菌、*V. cholerae*）や他のいくつかの臨床症状に関係する。特に、ビブリオ・パラヘモリティカス（*V. parahaemolyticus*、腸炎ビブリオ菌）は、汚染食物（一般に海産物、生であるか、少しだけ加熱した魚類、貝類、甲殻類または軟体動物類）を摂取した後に、特に日本で見られる或る種の急性胃腸炎の原因となる。

【0003】

コレラビブリオ菌の伝播は、一般に人から人へと（吐物、糞便、汗）、または汚染食物を介して起こる。さらに、ビブリオ菌類は、海岸の海水や河口水の微生物叢中に自然に見られる。それらの自然宿主には、軟体動物、甲殻類、魚類、棘皮動物類およびプランクトンが含まれる。

10

【0004】

ビブリオ感染症は公衆衛生の問題を提起するので、これらの細菌による食物汚染を検出する信頼性ある迅速な試験があることは重要である。

今日、検体中のビブリオ菌の存在を検出することができる、ある程度は選択的な培地が存在する。具体的にはTCBS寒天（チオ硫酸ナトリウム－クエン酸ナトリウム－ウシ胆汁－スクロース）（Diagnostics Pasteur, ref. 69456; Oxoid, ref. CM 333; Merck, ref. 10263）が使用されている。この培地上では、ビブリオ菌に比べて、大多数の腸内細菌および腸球菌（エンテロコッカス）はごくわずかしかな増殖しない。

20

【0005】

TTG寒天（タウロコール酸塩－亜テルル酸塩－ゼラチン）も使用されるが、調製が比較的面倒で、亜テルル酸カリウムの規則正しい調節と厳密な添加が必要である。

【0006】

TCBS培地の欠点の1つは、ビブリオ菌の各種の種の間での判別が一般に可能ではないことである。実際は、分析すべき検体中に存在するビブリオ菌の種を同定できることが得策であろう。特に、コレラ菌と腸炎ビブリオ菌とビブリオ・アルギノリティカスの存在の同定と、それらの判別が可能になると有利であろう。最後の種は、下痢を生ずる症状に関係することはごく稀であるが、温帯諸国では恐らく多様な臨床検体から最も頻繁に単離される菌である。

30

【0007】

従って、健康危険性の評価を改善するには、検体（食物検体、糞便等）中に存在する各種のビブリオ菌を、sucrose⁻細菌（腸炎ビブリオ菌など）に対してsucrose⁺細菌（ビブリオ・アルギノリティカスまたはコレラ菌など）を判別することしかできなかった従来の培地で得られるのより、より細かく判別することができることが得策である。

【0008】

本発明は、ビブリオ培地中にβ－グルコシダーゼ基質およびβ－ガラクトシダーゼ基質から選ばれた少なくとも1種の色素産生剤を含有することを特徴とする、ビブリオ属細菌の検出および／または判別用の新規な培地を提案する。

【0009】

上記酵素の一方の基質である色素産生剤は、その酵素による基質の加水分解によって放出される発色団を含んでいる。従って、細菌コロニーは放出された発色団に応じて着色する。

40

【0010】

この発色団は、好ましくは、インドキシル、ハロインドキシル（プロモインドキシル、クロロインドキシル、フルオロインドキシル、ヨードインドキシル、ジクロロインドキシル、クロロプロモインドキシル、トリクロロインドキシル）、メチルインドキシルまたはヒドロキシキノリン誘導体から選ばれる。この誘導体は、特に下記誘導体から選ばれる：6－クロロインドキシル、5－プロモインドキシル、3－プロモインドキシル、6－フルオロインドキシル、5－ヨードインドキシル、4,6－ジクロロインドキシル、6,7－ジクロロ

50

インドキシル、5-ブロモ-4-クロロインドキシル、5-ブロモ-6-クロロインドキシル、4,6,7-トリクロロインドキシル、N-メチルインドキシルまたは8-ヒドロキシキノリン。

【0011】

従って、好ましくは、 β -グルコシダーゼ基質はインドキシルグルコシドであり、および／または β -ガラクトシダーゼ基質はインドキシルガラクトシドである。

【0012】

培地中の各色素産生剤の濃度は約0.02~0.5 g/l の間である。好ましい濃度は0.1 g/l である。

腸炎ビブリオ菌は β -グルコシダーゼ特性について陰性であり（フランス、マルシ・レトワールのバイオメリウー<BioMerieux>社のRapid 20E 同定ギャラリー）、 β -ガラクトシダーゼ特性については陽性である（上述したバイオメリウー社のAPI 20 NE 同定ギャラリー）と説明されている。

【0013】

意外にも、本発明は、腸炎ビブリオ菌が固体培地上では上記2つの特性に関して逆の表現型を発揮しうることを示す。即ち、 β -グルコシダーゼの基質である色素産生剤を使用すると、固体培地上でコロニーを着色することができるのに対し、 β -ガラクトシダーゼの基質である色素産生剤を使用した場合には、コロニーが無色のままである。

【0014】

しかし、海洋起源の同じ検体中にしばしば一緒に見られる、ビブリオ・アルギノリティカスから腸炎ビブリオ菌を識別および判別することは、これら2種が多く共通の特性を有するため、困難である。即ち、この2種はいずれも β -グルコシダーゼ特性に関して陽性である。予想外にも、本発明に係る培地にスクロース（蔗糖）を特に高濃度で添加すると、腸炎ビブリオ菌では活性を残したまま、同時にビブリオ・アルギノリティカスの β -グルコシダーゼ活性を消失させることができる。従って、本発明に係る培地は、単に培地上に存在するコロニーの着色の有無によって、腸炎ビブリオ菌とビブリオ・アルギノリティカスとを容易に識別することができる。

【0015】

高濃度のスクロースとは、5 g/l 以上、好ましくは5 g/l ~35 g/lのスクロース濃度であると考えべきである。ある有効なスクロース濃度は20 g/lである。

本発明はまたコレラ菌を検出して、それを上述した他の2種のビブリオ菌に対して判別することも可能である。具体的には、コレラ菌は、 β -ガラクトシダーゼ活性を示すが、 β -グルコシダーゼ活性を示さない。そのため、 β -ガラクトシダーゼの基質である色素産生剤をビブリオ培地に添加すると、生成したコロニーの着色によって、コレラ菌を他の2種のビブリオ菌から識別することができる。

【0016】

従って、1工程で各種細菌の判別を行うのを可能にするには、 β -ガラクトシダーゼの基質である色素産生剤と β -グルコシダーゼの基質である色素産生剤の両方を含有する培地を使用することが有利である。

【0017】

実際、培地にスクロースを添加してもコレラ菌の β -ガラクトシダーゼ特性の消失は起こらない。コレラ菌と同じ sucrose⁺ 特性を示すビブリオ・アルギノリティカスでは阻害が見られることから、この結果はますます予想外である。

【0018】

このように、 β -ガラクトシダーゼの基質である色素産生剤と β -グルコシダーゼの基質である色素産生剤の両方を含有する培地を使用すると、腸炎ビブリオ菌（5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシルー β -グルコシドを使用した場合、藤紫色）、コレラ菌（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシルー β -ガラクトシドを使用した場合、青色）、およびビブリオ・アルギノリティカス（無色）を判別することができる。従って、本発明に係るこのような培地は、3種類の異なるビブリオ菌の菌株を検出および判別することが

10

20

30

40

50

できるのに対し、従来技術の培地は2つのカテゴリー間の判別 (sucrose⁺ と sucrose⁻) しか可能ではない。

【0019】

本発明はまた、下記工程を含むことを特徴とする、検体中のビブリオ属細菌の検出および／または判別を行う方法にも関する：

- a. 本発明に係る培地に前記検体または該検体由来する接種物を接種し、
- b. 前記培地上でビブリオ属細菌の存在を検出し、
- c. 場合により、前記培地上に存在するコレラ菌、腸炎ビブリオ菌およびビブリオ・アルギノリティカスを判別する。

【0020】

これらの培地を使用する前に、当業者に公知の方法を用いて栄養富化工程を行うのが一般的である。具体的には、1 g %のNaClを含有するアルカリ性ペプトン水 (pH 8.6) または3 g %のNaClを含有するアルカリ性ペプトン水を使用しうる。

【0021】

当業者に周知の多様なビブリオの選択因子も本発明の培地に添加しうる。例えば、アルカリ性pH、チオ硫酸塩、クエン酸塩、胆汁、胆汁塩、マグネシウム、カルシウム、ティーポル(teepol)、SDS、ポリキシミン、コリスチン、亜テルル酸塩等の存在により、本発明に係る培地の特性の改善や満足できる方法でのビブリオ菌の単離が可能になる。

【0022】

【実施例】

実施例1

本発明で使用するための好ましい培地は下記成分を含有する (1リットル当たり)：

・寒天	15 g
・ペプトン	15 g
・酵母エキス	3 g
・NaCl	10 g
・5-ブロモ-6-クロロ-3-インドキシル-β-グルコシド	0.1 g
・5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-β-ガラクトシド	0.1 g
・スクロース	20 g
・グルコース	1 g
・ラクトース	0.1 g
・IPTG	0.04 g
・トリス塩基 (Trizma base)	5 g
・クエン酸ナトリウム	10 g
・チオ硫酸ナトリウム	10 g
・コール酸ナトリウム	3 g。

【0023】

実施例2

各種培地上での細菌の平板培養により下記の結果が得られた。

【0024】

【表1】

	TCBS	BTB- ティーポル	本発明の培地 (実施例1)
コレラ菌	黄色	黄色	青色
ビブリオ・アルギノリティカス	黄色	黄色	無色
腸炎ビブリオ菌	緑色	青緑色	藤紫色

【0025】

このように、本発明に係る培地の使用により、従来技術の培地とは対照的に、3種のビブリオ菌を判別することが可能となる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第95/004157 (WO, A1)
国際公開第97/039103 (WO, A1)
特開平11-178567 (JP, A)
特開昭56-048897 (JP, A)
Journal of Clinical Microbiology, 1985年, Vol.22, No.6, p.1011-1013
Acta Microbiologica Polonica, 1991年, Vol.40, No.1/2, p.71-76
Indian Journal of Marine Sciences, 1993年, Vol.22, p.300-302

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q1/00-1/68
C12P1/00-41/00
C12N1/00-15/90
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus(JDreamII)
PubMed