

表3 魚介類別のV.v陽性率

魚介類種	陽性率	魚介類種	陽性率
コチ	5/8 (62.5%)	スズキ	1/3
アナジャコ	5/8 (62.5%)	ボラ	0/2
アサリ貝	6/12 (50.0%)	ネズミゴチ	1/1
カサゴ	1/7 (12.5%)	コノシロ	1/4
マルアジ	1/10 (10.0%)	アミ	0/1
クロダイ	2/2	ホソモエビ	0/1
メバル	0/1	マハゼ	0/1
キス	2/3	アカエビ	0/1
タイラギ貝	0/1	シラウオ	0/1
クマエビ	2/3		

表4 海水の環境とV.v, V.p

採水日	気温	水温	pH	塩分濃度 (‰)	天候	採水時刻 (満潮時)	V.v (MPN/100ml)	V.p (MPN/100ml)
2001/7/23	30.0	30.5	8.09	21.8	晴	8:59	150	230
8/6	31.0	30.0	7.80	16.4	晴	9:06	1,500	2,300
9/18	28.0	27.5	8.32	28.4	晴	9:15	430	4,300
10/18	24.1	23.5	8.14	19.4	雨	9:10	230	430
11/14	19.5	17.0	8.19	26.7	晴	9:15	<3(+)	430
11/29	11.0	15.5	8.20	28.1	晴	9:10	<3(+)	9
12/19	11.0	11.5	8.25	27.0	晴	10:49	<3	<3(+)
2002/1/28	7.0	10.5	8.24	26.5	曇	8:58	<3	<3(+)
2/25	12.1	12.1	8.35	29.4	晴	9:15	<3(+)	<3(+)
3/11	15.5	14.7	8.33	26.9	晴	9:24	<3(+)	43
4/1	22.0	17.5	8.18	25.4	晴	11:15	<3(+)	4
5/9	20.5	21.8	8.42	19.5	曇	9:15	43	2,300
5/14	20.2	20.2	8.38	16.7	雨	22:00	28	1,500
6/10	27.5	26.0	8.03	28.4	曇	9:30	<3(+)	2,300
6/28	23.5	24.0	7.95	28.8	曇	10:15	16	430
7/24	29.3	30.8	8.06	24.8	晴	9:22	93	230,000
8/14	31.5	30.7	8.04	28.6	晴	9:10	930	1,500
8/22	24.6	26.4	7.95	31.8	晴	9:10	150	4,300
9/24	19.9	25.0	8.05	30.9	晴	9:55	230	1,500
10/21	21.2	22.5	8.07	28.6	晴	9:05	430	230
11/6	14.0	14.0	8.06	29.5	晴	9:35	<3(+)	23
11/26	11.9	13.0	7.97	22.9	雨	13:44	<3	<3(+)
12/18	12.5	13.0	8.18	30.5	曇	9:30	<3	<3(+)
2003/1/20	8.5	8.5	8.01	22.7	曇	10:35	<3	<3
2/12	12.1	12.1	8.21	30.2	晴	16:08	<3	<3(+)

* (+)は定性試験で陽性

表5 汽水湖の環境とV.v, V.p

採水日	気温	水温	pH	塩分濃度 (%)	天候	採水時刻 (満潮時)	V.v (MPN/100ml)	V.p (MPN/100ml)
2002/6/10	27.5	26.6	8.85	2.6	曇	9:30	150	4
6/28	23.5	24.5	8.47	3.4	曇	10:20	<3	<3
7/24	29.3	31.9	9.08	2.0	晴	9:22	9	<3
8/14	31.5	31.7	9.12	2.0	晴	9:10	4,300	<3
8/22	24.6	25.8	8.85	3.9	晴	9:10	4,300	7
9/24	19.9	23.4	8.74	4.8	晴	9:55	4,300	23
10/21	21.2	21.5	8.78	6.0	晴	9:05	23,000	93
11/6	14.0	12.5	7.97	2.5	晴	9:35	7	7
11/26	11.9	12.0	8.49	1.6	曇	13:44	<3(+)	<3(+)
12/18	12.5	11.0	7.94	3.0	曇	9:30	<3(+)	<3(+)
2003/1/20	8.5	9.0	8.32	2.6	曇	10:35	<3	<3(+)
2/12	12.1	13.0	8.52	4.3	晴	16:08	<3	<3

* (+)は定性試験で陽性

表6 分離したV.vのO血清型別

O血清型	魚介類	海水	合計	%
O1	39	9	48	25.8
O2	0	0	0	0
O3	3	1	4	2.1
O4A	10	2	12	6.5
O5	2	6	8	4.3
O6	11	4	15	8.1
O7	17	6	23	12.4
O3・O6	4	0	4	2.1
O5・O7	1	0	1	0.5
UT	53	18	71	38.2
合計	140	46	186	

表7 5月～10月における魚介類の
V.v, V.p

魚介類	V.v	V.p
アサリ貝	430	230
	7	1,500
	<3	9
	4	4
	<3	<3
	23	430
マルアジ	<3	390
	<3	23
	<3	210
9,300(県外産)		4
	<3	150
カサゴ	30	<3
	<3	<3
	<3	<3
アナジャコ	29,000	>1,400,000
	93,000	93,000
	15	23
	4	430
	7	43
	<3	930
コチ	150	75,000
	150,000	>1,400,000
*1	<3	<3
*2	4300	1,100,000
	460,000	2,300
	<3	390
	23,000	230,000
クロダイ	21	>1,400,000
	1,500	43,000
メバル	<3	9
キス	<3	3
	23	930
	23	750
クマエビ	<3	7
	93	9,300
	4	4,300
ボラ	<3	43,000
スズキ	4	230
ネズミゴチ	<3	93
コノシロ	9	23

研究報告書：田村和満（国立感染症研究所）、小川正之（川崎市衛生研究所）

1. 既存の *V. vulnificus* 選択分離培地の比較評価および新しい分離培地の開発

<研究の目的および概要>

従来より *V. vulnificus* の選択分離培地として mCPC agar^{1), 2)}, SPS agar³⁾ 等の選択分離培地の開発報告がある。また、昨年ある培地メーカーからも選択分離培地の試作品が開発されている。したがって、それら選択培地を自作または購入し、*V. vulnificus* の臨床および環境分離株を用い、それらの培地の比較評価を行った。その結果、どの培地でもある臨床分離株で発育抑制が認められ、*V. vulnificus* の選択分離培地としては不十分な成績であった。したがって、改めて全ての菌株が発育する選択分離培地（仮称 CB agar）の開発をおこなった。開発した培地については二ヶ所の研究室の分離菌株での基礎的評価をおこない、次年度からの調査研究に使用できる成績が得られた。

<研究成績>

1) 供試菌株の決定

以前の予備実験から、従来よりの選択分離培地では、①供試菌株特に重篤な症状をおこした臨床分離株のあるものはこれらの選択分離培地では発育抑制があること。②ある選択分離培地では類似菌の色調鑑別の出来ないものがあることが判明していたため、改めて各種検体よりの分離株および類似菌を選出し用いた（表1参照）

2) 既存選択分離培地の評価実験

従来より *V. vulnificus* の選択分離培地として mCPC agar および SPS agar の報告があり、また昨年腸炎ビブリオの選択分離培地を改良した CHROM agar Vibrio V-007、酵素基質含有ビブリオ寒天培地（日水）⁴⁾ が開発市販されている。したがって、これら mCPC agar、SPS agar、CHROM agar Vibrio V-007 および酵素基質含有ビブリオ寒天培地の4種類の評価を1)の供試菌株合計47株を用い行った。

評価実験は再現性成績を取るため、国立感染症研究所および川崎市衛生研究所の二ヶ所で、同一の菌株および同一培地を用いて行った。その成績は二ヶ所ともほぼ同一の成績が得られた。成績の評価は集落の菌数、サイズおよび色調で判定した。また、供試菌株の塗抹方法は半定量測定法で行った。菌数およびサイズの対照培地としてトリプトソーヤ寒天培地（日水）を用いた。その概要成績は表2のとおりである。成績から解るように比較評価した4種類の培地はその発育度および色調で不十分な成績しか得られなかった。

3) 新しい *V. vulnificus* の選択分離培地の開発

比較評価の結果を踏まえ、選択分離培地の開発は(1) *V. vulnificus* の選択分離培地の開発(2) 経済的に現場で使える製品価格になるような培地組成を主願に研究を行った。

① *V. vulnificus* の発育要求の検討

基本的な組成の検討=ペプトン、肉エキス、酵母エキスの組み合わせおよびその含有量について全ての供試菌株から十分な成績は得られるような条件の検討をした。

② 海水ビブリオとしての特殊なミネラル要求の有無

Sodium Citrate, Sodium chlorid, Dipotassium phosphate, Manganese chlorid, Magnesium Sulfate, Ferrous Sulfate, Tween 80 等の発育要求因子としての必要性およびその含有量について。

③ *V. vulnificus* と類似菌との集落鑑別のための炭水化物および指示薬の含有量および色調の検討

炭水化物= Dextrose, Cellbiose, Saccharose, Lactose

指示薬= Cresol Red, Phenol Red, Thymol Blue, Brom Thymol Blue

④ *V. vulnificus* と類似菌との発育抑制剤の検討

Bile Salts, Bile Salte No.3, Sodium Desoxycholate, Sodium Cholate, Polymyxin B, Colistin

その結果、*V. vulnificus* 選択分離培地の組成は表3のように決定した。また培地名は仮称 Cellobiose-Bile salts Agar (CB 培地)とした。

⑤ CB 培地の評価

本培地の評価には表1の供試菌株37株を用いた。評価法は表2の半定量法および表4の定量法の二種類の方法で行った。その結果、供試した臨床および環境分離の *V. vulnificus* の発育度および集落の色調とも明瞭な成績が得られた。それに対し類似菌は *V. vulnificus* とは肉眼的に鑑別できる所見が得られた(表5を参照)。

<考察および今後の研究展開>

開発培地は供試菌株では良好の成績が得られたので、平成15年度の魚介類の実態調査に組み込み本格的な評価を予定しているが、本培地は発育不良の *V. vulnificus* も発育するような組成に開発したため、また表7でわかるようにビブリオ属菌の同定は鑑別性状が少ないために生化学的同定のみでは必ずしも鑑別が容易ではない。したがって多種の菌の混入が考えられる実検体では、選択増菌培地の併用がより *V. vulnificus* の分離率の向上につながると思われる。したがって次の研究課題として、選択増菌培地の研究開発を行うことにした。

引用文献

- 1) Massad, G. and Oliver, J.D. *Appl. Env. Microbiol.* 1987. 53, 2262-2264
- 2) Bryant, R. G., Jarvis, J. and Janda, J. M. *Abstr. 20 Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.* 1987. Page 277
- 3) Kitaura, T., Doke, S., Azuma, I. *et al.* *FEMS Microbiology Lett.* 1983. 17, 205-209
- 4) 寺村哉、水落慎吾ら. 第29回年次大会日本防菌防黴学会. 2002. 5月

表 1. 供試菌株リスト (1)

一連 no	strain no	菌 種	名
B1		<i>V. vulnificus</i>	O1 血清型別用菌株
B2			O2
B3			O3
B4			O4a
B5			O5
B6			O6
B7			O7
B8			O8
B9			O9
B10			O10
B11			O11
B12			O12
B13			O13
B14			O14
b15			O15
B16			O16
B17	523-01	<i>V. vulnificus</i>	熊本県保健環境科学研究所
B18	524-01		
B19	525-01		
B20	526-01		
B21	527-01		
B22	257-02	<i>V. vulnificus</i>	O3 宮城県保健環境センター
B23	258-02		O4
B24	259-02		O1
B25	261-02		O8
B26	266-02		O6
B27	SVV00002	<i>V. vulnificus</i>	O1 島根県保健環境科学研究所
B28	SVV00003		O1
B29	SVV00061		O6
B30	SVV00206		O7
B31	SVV00207		O5

表 1 . 供試菌株リスト (2)

一連 no	strain no	菌 種 名	
B32	4	<i>V. parahaemolyticus</i>	O3:K6
B33	5		O4:K8
B34	6		O4:K68
B35		<i>V. cholerae</i>	O1 ATCC 14035
B36	8	NAG <i>Vibrio</i>	O206
B37		<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33809
B38		<i>V. mimicus</i>	ATCC 33653
B39		<i>V. hollisae</i>	ATCC 33564
B40		<i>V. furnissii</i>	ATCC 35016
B41		<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966
B42		<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047
B43		<i>E. coli</i>	ATCC 25922
B44		<i>P. vulgaris</i>	ATCC 6380
B45		<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 13311
B46		<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
B47		<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990
B48		<i>V. fluvialis</i> リファレンス株	

表2. 既存の選択分離培地およびCB培地の評価
(半定量法による成績)

菌株No	TSA			CB			日水			クロモアガー			mCPC			SPS		
	発 育 度	サ イ ズ	色 調	発 育 度	サ イ ズ	色 調	発 育 度	サ イ ズ	色 調	発 育 度	サ イ ズ	色 調	発 育 度	サ イ ズ	色 調	発 育 度	サ イ ズ	色 調
1	+++	2	-	++	2	Y	-	-	-	-	-	-	+	2	-	-	-	-
2	+++	2	-	+++	2	Y	-	+	B	++	1	Y	++	1	B	-	-	-
3	+++	2	-	+++	2	Y	-	-	-	-	-	-	++	1.5	B	-	-	-
4	+++	2	-	+++	3	Y	-	+	B	++	1.5	-	++	1.5	B	-	-	-
5	+++	1.5	-	+++	2	Y	-	+	3	B	+	2	Y	+	1.5	B	-	-
6	+++	2	-	+++	2	Y	-	+	3	B	+	2	Y	+	1.5	B	-	-
7	+++	2	-	+++	2	Y	-	++	2	B	-	-	++	2	B	-	-	-
8	+	1	-	+++	1.5	Y	-	+	1	B	-	-	+	1.5	B	-	-	-
9	+++	2	-	+++	2	Y	-	-	-	+++	3	Y	++	2	B	-	-	-
11	+++	2	(+)	+++	3	Y	(+)	(+)	0.5	C	+++	3	Y	++	2	B	-	-
12	+++	2	(+)	+++	2	Y	(+)	++	1	B	++	2	Y	+++	3	B	-	-
13	+++	3	(+)	+++	3	Y	(+)	-	-	++	2	Y	+++	3	B	-	-	-
14	+++	3	(+)	+++	3	Y	(+)	-	-	+++	2	Y	++	1.5	B	-	-	-
15	+++	2	(+)	+++	3	Y	(+)	(+)	-	+	0.5	Y	++	1.5	B	-	-	-
16	++	2	-	++	2	Y	-	++	2	B	+	2	Y	++	2	B	-	-
17	+++	3	+	+++	3	Y	+	++	2	B	+++	2	Y	+++	3	B	-	-
18	+++	3	(P)	+++	3	Y	+	++	2	B	+++	2	Y	++	3	B	-	-
19	+++	3	(P)	+++	3	Y	+	++	2	B	+++	2	Y	++	3	B	-	-
20	+++	2	+	+++	2	Y	+	++	2	B	+++	2	Y	++	2	B	-	-
21	+++	2	-	+++	2	Y	-	++	2	B	+++	2	Y	++	2	B	-	-
22	+++	3	+	+++	2	Y	+	++	2	B	+++	2	Y	++	2	B	-	-
24	+++	2	(+)	+++	2	Y	(+)	+	2	B	+++	2	Y	++	2	B	-	-
25	+++	2	-	+++	2	Y	-	++	1	B	+	1	Y	++	2	B	-	-
26	+++	3	+	+++	3	Y	+	++	2	B	++	2	Y	++	2	B	-	-
27	++	2	+	++	3	Y	+	++	1.5	B	++	3	Y	++	2	B	-	-
28	++	2	+	++	3	Y	+	++	2	B	++	3	Y	++	2	B	-	-
29	++	1.5	-	++	2	Y	-	+	-	++	2	Y	++	2	B	-	-	-
30	++	1.5	+	++	2	Y	+	++	2	C	++	1.5	Y	++	2	B	-	-
31	++	3	++	+++	1.5	Y	++	+++	3	B	++	2	Y	++	2	B	-	-
32	++	2	C	+++	3	C	++	+++	3	P	++	2	C	++	2	C	-	-
33	+++	2	C	+++	3	C	+++	++	3	P	+	2	B	++	2	C	-	-
34	+++	2	C	+++	3	C	++	++	3	P	++	2	Y	+++	3	C	-	-
35	+++	1.5	C	+++	1.5	C	-	-	-	-	-	-	+	1	Y	-	-	-
36	+++	2	C	+++	3	C	++	++	3	P	++	-	C	++	2	Y	-	-
37	+++	2	Y	+++	3	Y	-	++	3	C	-	-	+++	2	Y	-	-	-
38	+++	2	C	+++	2	C	+	++	2	B	-	-	++	1.5	C	-	-	-
39	++	1	C	+++	3	C	-	++	2	C	-	-	-	-	-	-	-	-
40	++	1	C	+++	2	C	-	++	2	C	-	-	++	1.5	Y	-	-	-
41	+++	2	C	+++	2	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Y = 黄色、B = 青、C = 無色、P = ピンク

TSA = トリプトソーヤ寒天培地 (日水)

CB = Cellobiose-Bile salts agar (感研感研組成)

日水 = 酵素基質含有ビブリオ寒天培地

クロモアガ CHROM agar Vibrio V-007

mCPC = Modified Cellobiose-Polymyxin B-Colistin agar

SPS = Sodium Dodecyl Sulphate-Polymyxin B-Sucrose agar

() = 発育度または色調の不明瞭なもの

表 3. 仮称 **Cellobiose Bile salte Agar**
(CB 培地) の組成

<u>Formula</u>	<u>grams/litre</u>
Bact peptone	10 g
Meat extract	5 g
Yast extract	5 g
NaCl	10 g
Mgcl ₂ · 6H ₂ O	4 g
KCl	4 g
Cellobiose	10 g
Bile salts	5 g
Cresol red	40 mg
Agar	15 g
Water	1,000 ml

pH 7.8

表 4. CB 培地の定量培養法による評価 (1)

菌株No	使用培地	発 育 度					サ イ ズ	色 調
		-3	-4	-5	-6	-7		
1	CB	+++	++	++			2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 11		2	
2	CB	+++	+++	++	+ 3		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 4		2	
3	CB	+++	+++	++	+ 2		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 15	+ 1	2	
4	CB	+++	+++	++	+ 11		3	Y
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 2	3	
5	CB	+++	+++	++	++ 12		2	Y
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 6	2	
6	CB	++	+ 9	+ 1			2	Y
	TSA	+++	++	++ 11			2	
7	CB	+++	++	+ 5			2	Y
	TSA	+++	++	+ 8	+ 1		2	
8	CB	+++	++	++	+ 4		2	Y
	TSA	+++	+++	++	++ 11		1	
9	CB	+++	+++	++	+ 10		2	Y
	TSA	+++	+++	++	++ 11		2	
11	CB	+++	+++	++	++ 11		4	Y
	TSA	+++	+++	+++	++ 11	+ 2	3	
12	CB	+++	+++	++	++	+ 3	3	Y
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 3	3	
13	CB	+++	++	++ 11			4	Y
	TSA	+++	++	++	+ 2		3	
14	CB	+++	+++	++			3	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 2		3	
15	CB	+++	+++	+++	++	+ 4	3	Y
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 5	3	
16	CB	+++	++				1.5	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 5		2	
17	CB	+++	+++	++	+ 5		3	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 1		3	
18	CB	+++	++	++	+ 19		3	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 10		3	
19	CB	not V.v						
	TSA	not V.v						
20	CB	+++	+++	++	+ 9		3	Y
	TSA	+++	+++	++	++ 12		3	
21	CB	+++	+++	++	+ 5			Y
	TSA	+++	++	++	+ 8	+ 2	3	

表 4. CB 培地の定量培養法による評価 (2)

菌株No	使用培地	発 育 度					サ イ ズ	色 調
		- 3	- 4	- 5	- 6	- 7		
22	CB	+++	++	++	+ 8		2	Y
	TSA	+++	++	++	+ 8	+ 1	3	
24	CB	+++	+++	++	+ 3		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 6		2	
25	CB	+++	+++	++	+ 9		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 8		2	
26	CB	+++	+++	++	+ 1		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 2		3	
27	CB	+++	+++	++			2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 1		2	
28	CB	+++	+++	++	+ 4		3	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 7		2	
29	CB	+++	+++	++	+ 5		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 2		2	
30	CB	+++	+++	++	+ 5		2	Y
	TSA	+++	+++	++	++ 13	+ 1	2	
31	CB	+++	++	++	+ 1		2	Y
	TSA	+++	+++	++	+ 3		3	
32	CB	+++	+++	+++	++		3	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 3	2	
33	CB	+++	+++	+++	++	+ 1	3	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 4	3	
34	CB	+++	+++	+++	++	+ 4	3	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 5	3	
35	CB	+++	+++	++	+ 1		1.5	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 3	1	
36	CB	+++	+++	+++	++	+++	2	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 3	2	
37	CB	++	+++	+++	++	+ 3	3	Y
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 9	2	
38	CB	+++	+++	+++	++	+ 5	3	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 6	2	
39	CB	+++	+++	++	++		2	C
	TSA	+++	+++	++	++	+ 7	1.5	
40	CB	+++	+++	+++	++			
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 5	1.5	
41	CB	+++	+++	+++	++	+ 6	2	C
	TSA	+++	+++	+++	++	+ 7	1.5	
42	CB	+++	++	+ 2	++		2	C
	TSA	+++	+++	++	++	+ 2	2	
43	CB	+++	+++	+++	++	+ 2	2	C
	TSA	+++	+++	+++	++	++	2	

表 4. CB 培地の定量培養法による評価 (3)

菌株No	使用培地	発 育 度					サ イ ズ	色 調
		-3	-4	-5	-6	-7		
44	CB	+++	+++	+++	++	++	2	C
	TSA	+++	+++	+++	++	++		
45	CB	+++	+++	+++	++	++	2	
	TSA	+++	+++	+++	++	++		
46	CB	+++	+++	++	++	12	2	
	TSA	+++	+++	++	+	10		
47	CB	+++	+++	++	+	4	1.5	
	TSA	+++	+++	++	+	5		

発育度：

+++ = 単独コロニーの形成なし

++ = 単独コロニーが11個以上

+ = 単独コロニーが1-10個まで

数字 = コロニー数

色調：

Y = 黄色

C = 無色

コロニーサイズ：mm

培地名：

CB = Cellobiose-Bile salts agar (感研組成)

TSA = トリプトソーヤ寒天培地 (日水)

表5. 定量培養における *V. vulnificus*, の発育および色調所見

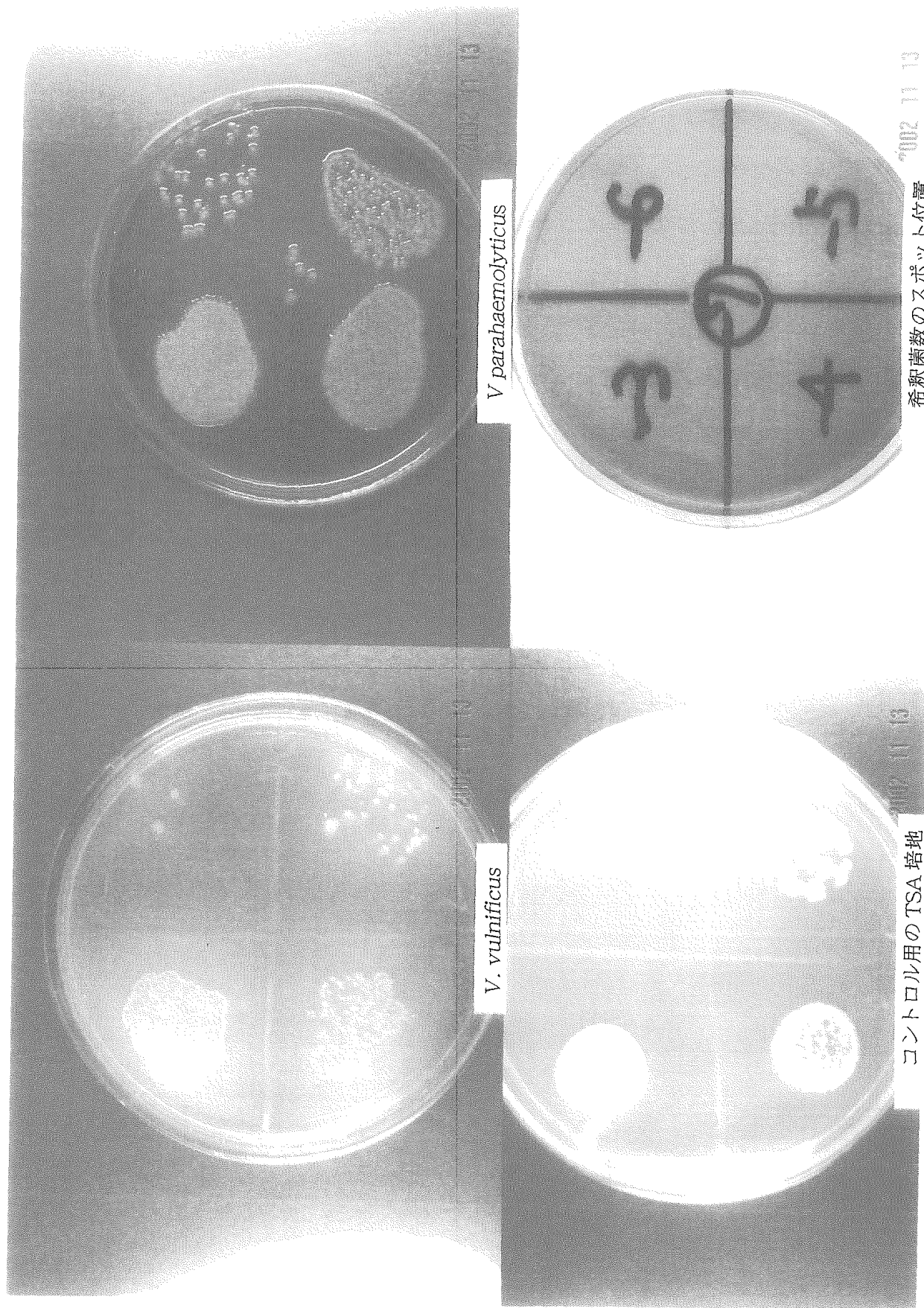


表6. 各種ビブリオ属の生化学性状

Test	Test reaction ^b												
	V. cholerae	V. mimicus	V. parahaemolyticus	V. alginolyticus	V. vulnificus	V. damsela	V. fluvialis	V. furnissi	V. hollisiae	V. meischnikovii	V. cincinnatiensis	V. carchariae	
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Indole	+	+	+	+/ -	+	-	-	-	+	-	-	+	
Voges-Proskauer	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+/ -	
Citrate, Simmons	+	+	-	-	+/ -	-	-	-	-	+	+/ -	-	
ONPG ^c	+	+	-	-	+/ -	-	-	-	-	+	+/ -	-	
Urea hydrolysis	-	-	+/ -	+	+/ -	-	+/ -	-	-	+/ -	-	-	
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	-	+/ -	-	-	+/ -	-	-	
Motility	+	+	+	+	+	+/ -	+/ -	+/ -	+	+	+	+	
Polymyxin B inhibition	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
Arginine, Moeller	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+/ -	-	-	
Lysine, Moeller	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+/ -	-	+	
Ornithine, Moeller	+	+	+	+/ -	+/ -	-	-	-	-	-	-	-	
Acid production from:													
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/ -	
L-Arabinose	-	-	+/ -	-	-	-	+	+	+	-	+	-	
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	+/ -	+/ -	-	-	-	-	
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/ -	
Lactose	-	-	-	-	+/ -	-	-	-	-	-	+/ -	-	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
D-Mannitol	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+/ -	
Salicin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
Sucrose	+	-	-	+	+/ -	-	+	+	-	+	+	+/ -	

^a Adapted from reference 22.

^b +, >90% positive; +/ -, variable; >50% positive; -, <50% positive; -, <10% positive.

^c ONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

研究報告書：小川正之、岡田京子、小嶋由香（川崎市衛生研究所）
田村和満（国立感染症研究所）

2. *Vibrio vulnificus*の選択増菌培地の検討

<研究の目的及び概要>

Vibrio vulnificus は海水ビブリオに属し、*V. cholerae* 01、NAG *Vibrio*、*V. parahaemolyticus* などのいわゆる食中毒菌のような下痢原性ビブリオではないが、海水や汽水域水・沿岸底質などの環境や沿岸海域に生息する魚介類などの食品中に生存し、肝硬変や肝ガンなどの肝疾患や糖尿病などの全身性の基礎疾患を持つ易感染性宿主が *V. vulnificus* に汚染された食品を喫食し、罹患すると極めて致命率の高い重篤な敗血症を発症する。

わが国では、海水・汽水域水・沿岸底質などの環境由来検査材料、また魚介類などの食品由来検査材料からの海水ビブリオの増菌培地としてはアルカリペプトン水、食塩ポリミキシン培地が一般に使用され、これらの増菌培地は *V. cholerae* 01 や *V. parahaemolyticus* などの食中毒原因菌である下痢原性ビブリオだけでなく *V. vulnificus* の増菌培地としても推奨され¹⁾、選択分離培地であるTCBS寒天培地と組み合わせて *V. vulnificus* の検出に使用されている。一方、アメリカでは環境や魚介類などの食品から *V. vulnificus* の検出にはアルカリペプトン水で一次増菌後、選択分離培地としてはTCBS培地の代わりに変法セロビオース・ポリミキシンB・コリスチン (mCPC) 寒天培地を用いることがFDAにより推奨されている²⁾。mCPC培地の特徴は0.5%肉エキス加アルカリペプトン水に1%セロビオース、呈色指示薬、1.5%寒天を加えた単純組成に、発育阻止物質としてコリスチンとポリミキシンBの混合物を加えたものである。また近年、HOIら³⁾ はmCPC培地を基本組成としてポリミキシンBを除去したセロビオース・コリスチン (CC) 寒天培地を作成し、海水や底質から *V. vulnificus* の分離率を向上させたことを報告している。

今回、私達は、海水・汽水域水、沿岸底質などの環境や魚介類などの食品における *V. vulnificus* の検出のための選択増菌培地の基礎的検討を実施した。すなわち、田村らの開発した選択分離培地であるCellobiose-Bile salts Agar (CB培地) がmCPC培地などの従来の選択分離培地に比較して環境や生鮮魚介類または臨床由来の *V. vulnificus* の発育支持能が優れていること。また、環境や生鮮魚介類に生存する *V. vulnificus* は損傷菌になっている可能性が高いこと。*V. vulnificus* がセロビオースを分解しコリスチンに対して最小発育阻止濃度 (MIC) が高濃度であることなどを考慮し、選択増菌培地を検討した。

その結果、アルカリペプトン水で一次増菌後、セロビオース・コリスチン加ペプトン (CCP) ブロスで短時間、二次選択増菌し、次いでCB培地を用いて分離培養する二段階増菌法を用いることで *V. vulnificus* の検出率を上昇させる

成績が得られ、次年度からの調査研究に使用できるものと考えられた。

<研究成績>

1) 供試菌株の決定

今回の実験では田村らがCB培地の開発に用いた環境・生鮮魚介類・臨床由来*V. vulnificus*の分離株およびビブリオ属類似菌と同一の株を用いた(表1参照)。

2) 供試菌株のMICの測定成績

2%NaCl加ミュラーヒントン(MH)ブロスに1%セロビオースを加えた基礎培地に、50mg/mlコリスチンと50mg/mlポリミキシンBを用い、それぞれの2倍段階希釈系列100 μ lにアルカリペプトン水で37 $^{\circ}$ C、20時間、培養した各供試菌を5 μ l接種し、37 $^{\circ}$ C、18-24時間培養後、供試菌の発育を確認することによる微量液体希釈法にて各供試菌のMICを測定した。使用したコリスチンは30,000単位=1 μ g、ポリミキシンBは1単位=0.129 μ gで換算した濃度(mg/ml)で表示してある。供試菌39株(B1~B41)のMIC分布は表2のとおりで、*V. vulnificus*のコリスチンに対するMICは平均0.96mg/mlであり、その他ビブリオでは*V. cholerae* 01が0.63mg/ml、*V. parahaemolyticus*が0.53mg/mlで、その他のビブリオ属類似菌は感受性であった。ポリミキシンBについても成績は示していないが、全く同様な成績であった。また、MH培地とセンシディスクを用いたKirby-Bauer法によるスクリーニングテストにおいても、*V. vulnificus*はポリミキシンBで一部に感受性の成績も認められるが、コリスチンではB1~B31は全てが耐性であり、微量液体希釈法との間で良い相関を示していた(表2-2)。この成績からコリスチンを高濃度に加えることにより大部分の*Vibrio*の発育を抑制することが判った。

3) コリスチンおよびポリミキシンBの添加濃度と供試菌の発育態度

コリスチン(ポリミキシンE)とポリミキシンBは2)の実験成績から*V. vulnificus*に対しては高濃度のMICであることが判明したので、つづいて、アルカリペプトン水(pH8.4)を基礎培地として1%セロビオースを加え、それぞれに400 μ g/ml、200 μ g/ml、100 μ g/mlのコリスチンを含有するセロビオース加コリスチンペプトン(CCP)ブロスを自作した。表1の39株の供試菌(B1~B41)をアルカリペプトン水3mlで37 $^{\circ}$ C、16時間前培養した50 μ lをそれぞれのCCPブロス10mlに接種し、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽で培養し6、8、24時間後の増殖態度を検討した。また、CB培地から寒天を除去したCBブロスを自作し、CBブロスにもそれぞれにコリスチン200 μ g/ml、ポリミキシンB 200 μ g/ml、コリスチンとポリミキシンBを200 μ g/mlずつ、同じく100 μ

g/mlずつを含有するブロスを作成し、CCPブロスと同様に各供試菌の発育態度も同時に検討した。その結果は表3に示すとおりで、8時間培養後の成績を示してある。6時間培養後の成績については、*V. vulnificus*の供試菌B3、B29では400、200、100 μ g/ml全ての濃度のCCPブイオンで弱い発育を示し、また、B4では400 μ g/ml、B15では200 μ g/mlと400 μ g/ml、B25では400 μ g/mlの濃度のCCPブイオンで増殖は認められなかった。8時間経過後では供試した *V. vulnificus* は、1%に添加したセロビオースを利用し、それぞれの血清型に関係なく全て旺盛な発育が認められ、また同様に本実験では夾雑菌である *V. cholerae* O1、*V. parahaemolyticus*、NAG *Vibrio*、*V. mimicus*などの下痢原性ビブリオの増殖も認められた。また、CBブロスでは8時間培養後でもCCPブロスでの結果と同様な増殖が認められたが、*V. vulnificus* 以外の下痢原性ビブリオ属菌も同時に増殖していた。一方、これらのブロスが一次増菌培養に使用されることを想定し、TSI寒天培地斜面上に発育した各供試菌株を室温で1週間保存して陳旧培養菌とした。それぞれの濃度のCCPブロスに陳旧培養菌を直接接種し、37°Cで6、8、24時間培養したところ、対照としたコリスチン無添加CCPブロスでは6時間の培養で全ての供試菌は十分に増殖したが、CCPブロスでは供試菌の増殖に24時間以上の培養時間が必要であり、損傷菌の状態ではCCPブロスの添加抗生物質であるコリスチンの選択性が強く、非選択性のアルカリペプトン水で一次増菌培養し、損傷菌を回復し、活性化することの必要性を支持する成績であった。これらの成績から供試した全ての *V. vulnificus* と、*V. parahaemolyticus*、NAG *Vibrio*、*V. mimicus* はコリスチンを200 μ g/ml含有するCCPブロスに発育が認められたがその他の海水ビブリオやビブリオ類似菌の発育は抑制された。また発育に要する時間も5~8時間で十分であるが、CCPブロスを使用するについては、コリスチンによる選択性が強いのでアルカリペプトン水で種々の菌を活性化させる一次増菌培養が必須である成績であった。環境および食品材料からの *V. vulnificus* の検出法とCCPブロスの組成を図1に示した。

<考察および今後の研究課題>

海水、汽水域水、底質などの環境中や生鮮魚介類などには海水ビブリオはじめ *V. cholerae* O1、*V. parahaemolyticus* などの下痢原性ビブリオや *V. vulnificus* など様々な海水ビブリオ属菌が生息している。それらの下痢原性ビブリオや *V. vulnificus* などは低栄養状態で生息し、損傷菌となっていることが考えられることから分離培養にはアルカリペプトン水が用いられてきた。しかし、現行方法¹⁾で推奨されているアルカリペプトン水では選択性が乏しく、多くの海水ビブリオなどが増殖され今回、目的とする *V. vulnificus* の分離培養を困難にしている。わが国では生鮮魚介類などの食品からのビブリオ属菌の増菌培地として食塩ポリミキシンブイオンが推奨されており、このブイオンに添加されてい