

表 1. 事例の詳細

事例番号	1	2	3
原因物質	サルモネラ (血清型 : Enteritidis)	サルモネラ (血清型 : Cerro)	サルモネラ (血清型 : Enteritidis)
発生年月	2004年8月	2004年9月	2004年12月
患者数 (人)	4	157	114
摂食者数 (人)	4	1,577	303
原因食品名	シュークリーム	学校給食パン (ハンバーガー用)	鶏砂ずり刺身
原因食品中の 菌数	39,000 cfu/g	24 MPN/g	200 MPN/g
原因食品の 推定摂取量	約 90 g (シュークリーム 1個)	65 g	不明
病因物質の 推定摂取量	3,510,000 cfu	1,560 MPN	不明
検査までの検 体の保管状況	冷蔵庫内にて 48時間	-20℃にて72時間	0℃にて8時間

(次項につづく)

表 1. 事例の詳細 (続き)

事例番号	4	5	6
原因物質	腸管出血性大腸菌 (O157:H7, VT1&VT2 産生性)	腸管出血性大腸菌 (O157:H7, VT2 産生性)	腸炎ビブリオ (O3:K6, tdh 陽性)
発生年月	2004年2月	2004年10月	2004年8月
患者数 (人)	3	1 (保菌者: 2)	36
摂食者数 (人)	6	5	50
原因食品名	輸入冷凍ハンバーグ	国産牛肉	タイラギ貝の貝柱
原因食品中の 菌数	1.45 MPN/g	23 MPN/g	240 MPN/g
原因食品の 推定摂取量	100 g 及び 200 g	不明	50 g
病原物質の 推定摂取量	<108 ~ 216 MPN (実際の加熱調理法 に従い検証し算出)	不明	12,000 MPN
検査までの検 体の保管状況	-15℃以下	冷凍庫内にて 約9日	-18℃にて24時間

# 分 担 研 究 報 告 書

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

工藤由起子

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究要旨

ビブリオ・バルニフィカスは、ビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こすことが知られており、日本では毎年感染者が報告されている。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要が求められている。そこで、本研究では以下の3つの課題について検討を行った。

- (1) ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態
- (2) 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量PCR法の応用
- (3) 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオー水鳥糞便の検索

研究協力者

山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所	宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
八柳 潤	秋田県衛生科学研究所	荒平 雄二	熊本県保健環境科学研究所
三輪 憲永	静岡県環境衛生科学研究所	徳永 晴樹	熊本県保健環境科学研究所
小沼 博隆	東海大学海洋学部	甲木 和子	熊本県保健環境科学研究所
高橋 肇	国立医薬品食品衛生研究所・ 東海大学海洋学部	瀬川 優子	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) はビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こす。日本では毎年感染者が報告されており、1998年から2003年の5年間には患者数94人、このうち死者68人

が報告されている。感染の原因は汚染海水や生物に接触することや汚染食品の摂取によるものといわれている。しかし、患者検体からは既存の検出方法によって十分に分離がおこなわれているが、海水や生物または食品等からの分離については競合するほかの海洋細菌によって困難

な場合が多い。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要がある。増菌及び分離方法を含む培養方法および定量 PCR 法等の遺伝子検出方法について検討を行った。さらに環境中のビブリオの汚染について水鳥を対象に検索を行った。

## B. 研究方法

### 1. ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

既知の方法を参考にし実検体において検出方法の検討を行った。国内の6地域の産地の明らかな鮮魚介類を対象とし、小魚、中型の魚についてはエラなどの一部、アサリ、カキなどの貝類、カニ、エビなどの小型の甲殻類を供試した。検体25gにアルカリペプトン水(APW)225mlを加え、MPN法(3本法)にて菌数を測定した。培養条件は37°C18時間とした。また、MPN使用後の液も培養した。培養液をクロモアガービブリオに1白金耳を画線し37°C18時間培養した。水色を呈する*V. vulnificus*と疑われるコロニーを釣菌し単離した。オキシダーゼ試験、LIM培地試験、VP半流動培地試験、0, 3および8%塩分での発育性試験によって同定した。さらに、PCR法によって*V. vulnificus*cytotoxin-hemolysin gene、*toxR* geneの保有を確認した。また、MPNの培養液についてPCR法にて*V. vulnificus*の遺伝子を検出した。

### 2. 海水からのビブリオ・バルニフ

ィカス検出のための定量PCR法の応用

確立した*V. vulnificus*定量PCR法(詳細は分担研究報告書を参考)について様々なカルチャーコレクションと魚介類や海水から分離した野生株を含む*V. vulnificus*54株について特異的な増幅を確認した。本定量PCR法の反応液は全量50μlで行った。本定量PCR法の検出感度と増幅効率を確認するために4株のDNAを精製し、終濃度が50ng~50fg/PCR tubeになるように段階希釈し、リアルタイムPCRで解析した。それぞれの株のPCR効率は検量線の傾きにより算出した。また、本定量PCR法による*V. vulnificus*数の定量のために、菌株の培養液を希釈し本定量PCRおよび培地での生菌数測定を行った。実検体は国内6ヶ所でポリエチレンまたはポリプロピレンに採取後、発泡スチロールの箱で保存、室温で送付された海水を使用した。海水10サンプルから1mlずつ採り、MagExtractorでDNA抽出した。抽出したDNAをTaqManを使用した。さらに、海水中の*V. vulnificus*数をMPN法によって測定した。

### 3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ-水鳥糞便の検索

2002年1~4月、10~12月及び2003年9~11月に、熊本県宇土郡不知火町の防波堤及び海岸線の岩礁や干潟に飛来した水鳥の新鮮糞便367検体を採取して検査材料とした。雑食性で魚類や貝類、甲殻類、ゴカイ等を餌とするウミネコ、セグロカモメ群

及びユリカモメ群と、主に植物質が主食のヒドリガモ群、マガモ群及びコガモ群に分けた。また、糞便採取時に周辺海水を採取して検査材料とした。採取した糞便約 0.5g を採取現場で直接アルカリ性ペプトン水 10ml に接種して持ち帰り培養後、クロモアガー・ビブリオ寒天培地に塗抹し分離した。海水試料は、アルカリ性ペプトン水での MPN 法 (3 本法) にて定量した。分離培養にはクロモアガー・ビブリオ寒天培地を用いた。

### C. 結果

#### 1. ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検査法の検討と汚染実態

これまでに報告されている検出方法について吟味した結果、本研究での検討方法としては、ビブリオ属菌によく使われている APW を増菌培地として用いることにし、増菌温度を 35 及び 25℃ に設定し比較した。また、分離選択培地については腸炎ビブリオで近年多く用いられている酵素基質培地を採用した。自然汚染検体における方法の比較の結果、供試した 56 検体のうち、いずれの方法でも検出できなかった 7 検体は除き 49 検体について検出結果を取りまとめることができた。増菌培養温度において 25℃ と 35℃ を比較すると、分離培養法では 65% 以上、PCR 法では 75% 以上の検体において、35℃ は 25℃ と同等もしくはより優れていた。さらに、分離培養法と PCR 法の検出率の比較をする

と、25℃ 増菌では約 90%、35℃ 増菌では約 88% の検体において、PCR 法は分離培養法と同等もしくはより優れていた。

さらに、一部検体 (10 検体) において定量 PCR 法を検討した。その結果、10 検体中 2 検体においては、ほぼ MPN 培養液を PCR 法にて検出した値と合致した。しかし、他は 10 から 1,000 倍近く定量 PCR 法の方が高い値を示した。また、分離培養法では、MPN 培養液を PCR 法にて検出した値よりもさらに低い値であった。

PCR 法での検出率を 6 地域で比較すると、東北では低かったが関東以南では検出限界以下であることは少なく多くの検体から検出された。

#### 2. 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量 PCR 法の応用

本定量 PCR の特異性は供試した 54 株において確かめられた。本定量 PCR による検出限界の確定と定量のための検量線を作成した結果、相関係数 (0.995 ~ 0.999) が高く検出限界は 50 fg/50 µl PCR 反応液だった。生菌数で換算し検量線を得たところ、 $10^1 \sim 10^7$  cells/ml の生菌数において相関係数  $r^2=0.9912$  を示した。実検体での本定量 PCR と MPN 法による海水中の *V. vulnificus* 数の定量の結果、海水 10 サンプルのうち 5 サンプルは *V. vulnificus* 菌数は 9 MPN/ml 以下であり、定量 PCR では検出できなかった。No. 6 と No. 8 のサンプルは定量 PCR と MPN 法において菌数に大きな差はなかった。No.

7 は T 定量 PCR の方が MPN 法の 2 倍以上の菌数だった。No. 9 と No. 10 は定量 PCR の菌数は MPN 法の半分だった。

### 3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ—水鳥糞便の検索

雑食性水鳥 345 検体中 *V. vulnificus* が検出されたのは 84 検体 (24.3%)、*V. parahaemolyticus* は 240 検体 (69.6%) であった。一方、植物質が主食の水鳥 22 検体では *V. vulnificus* 0 検体 (0%)、*V. parahaemolyticus* は 2 検体 (9.1%) であった。

水鳥の種類別検出結果を表 3 に示す。ウミネコ及びセグロカモメ群 245 検体中 *V. vulnificus* が検出されたのは 83 検体 (33.9%)、*V. parahaemolyticus* は 181 検体 (73.9%)、ユリカモメ群 100 検体中 *V. vulnificus* 1 検体 (1.0%)、*V. parahaemolyticus* 58 検体 (58.0%) であった。植物質が主食の水鳥群ではマガモ 9 検体中 2 検体から *V. parahaemolyticus* が検出されたのみであった。周辺海水では、*V. vulnificus* は 1~3 月と 11~12 月に不検出の時期があったが、*V. parahaemolyticus* は 1 月の一回を除いて調査した全ての月で陽性であった。また、*V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* 共に 9~10 月には高い MPN 値を示した。

#### D. 考察

1. ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検査法の検討と汚染実態

優れていると思われる方法についての実検体における検討を行った結果、増菌については、これまでどおりに APW を使用し培養温度 35°C が妥当であった。しかし、25°C の方が 35°C よりも優れていた検体も少なからずあることから、さらに検討が必要と考えられた。例えば 35°C と 25°C の中間である 30°C 培養の検討が必要と考えられた。

また、分離培養法よりも PCR 法の方が検出率が高かった。しかし、PCR 法よりも分離培養法が優れていた検体もあった。これについては PCR の阻害があったことが考えられる。検体の成分などが酵素反応を抑制することが一般に知られているため、PCR 法だけで検出することは間違った結果を生じる可能性もあり、分離培養法の併用が望ましいと思われた。また、遺伝子検出では死菌も検出してしまうため、分離培養法よりも高い値になることが考えられる。定量 PCR は迅速であるが、さらに精度についての検討を行う必要が有ると思われた。

患者の発生率と魚介類の汚染率に関連が有ることが予想されたが、患者の発生が少ない地域においても汚染率が高かった。このため、患者の発生には食生活等の生活習慣など他の要因が影響していることが考えられた。

今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。優れた方法を用いて *V. vulnificus* の感染について検討することが解明に結びつくものと思われる。

## 2. 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量 PCR 法の応用

これまでの、定量方法に比べ迅速に結果の得られるリアルタイム PCR 法が *V. vulnificus* についても有用であることが示された。添加実験では相関性の非常に高い検量線が得られ、検出感度も高かった。実検体海水においては、若干 MPN 法と異なる結果もあった。海水検体中の微細な浮遊物などに菌が付着し均一な検体で無かったことなどが原因と考えられる。さらに、正確な検出のためには検体の取り扱いや調整方法など工夫が必要である。また、本研究では海水でしか検討していないので、今後魚介類などについて検討が必要であると考えられる。

## 3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ—水鳥糞便の検索

調査期間中、周辺海水が定性試験で陰性であった場合も全て *V. parahaemolyticus* が水鳥糞便から検出されたのに比べ、*V. vulnificus* は 9~11 月に限られていたことから、*V. parahaemolyticus* に比べて水鳥の消化管を通過しにくい傾向が示唆された。雑食性の水鳥群の食性は、防波堤に残る不消化物である程度知ることができる。すなわち、干潮時に干潟等で魚介類を捕食した水鳥は、潮が満ちてくるとウミネコ、セグロカモメ群及びユリカモメ群に分かれて防波堤で休息するが、その際に球状にし

た不消化物を吐き戻す習性がみられた。これらの不消化物を解きほぐすと甲殻類や魚類の残骸であることが分かる。また、カニやシャコ等の食べ残しも多数あり、これらの食物を介して *V. vulnificus* や *V. parahaemolyticus* を摂取し、排泄していることが推察された。また、植物質が主食のマガモ、ユリカモメ、コガモでは、マガモ 2 検体からのみ *V. parahaemolyticus* が検出された。このことから、海草や海藻に付着する菌量は魚介類に比べて少ないことが推測された。

## E. 結論

効果的な分離方法を確立するために、既存方法の中から優れていると思われる方法を基礎とし、温度や遺伝子検出を組み合わせて検討した。APW を使用し 35°C 増菌が妥当であった。また、分離培地には酵素基質培地の使用が良いと思われた。遺伝子検出法の方が分離培養法よりも検出率が高かった。定量 PCR 法も有用と思われたが、さらに精度についての検討を行う必要が有る。今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。国内 6 県の海域についての検体を供試したが、東北では検出率が低く、関東以南では検出率が高かった。また、環境での汚染実態として水鳥に着目して調査した結果、冬季でも水鳥が保有していることが明らかになり、今後の継続調査が望まれた。



2005.

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., and Hara-Kudo, Y. Development of a Quantitative Real-Time PCR Method for Estimation of the Total Number of *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Foods. J. Food Prot. 68: 1083-1088, 2005.

Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO<sub>2</sub> oxidation. Chemosphere. In press.

Takahashi, H., Hara-Kudo, H., Miyasaka, J., Kumagai, S. and Konuma, H. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. Method, 61: 77-85,

高橋肇、宮坂次郎、工藤由起子、熊谷進、小沼博隆. *ToxR* 遺伝子を標的とした Real-Time PCR 法による *Vibrio vulnificus* の定量法. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島

工藤由起子. 海産物における腸炎ビブリオ汚染と制御. 日本食品微生物学会学術セミナー. 平成 16 年 11 月. 静岡.

2. 学会発表

工藤由起子、山田加奈子、松寄洋輔、吉川邦衛、林谷秀樹、熊谷進. 腸炎ビブリオの挙動解析に有用な指標菌の検索. 日本食品衛生学会第 87 回学術講演会. 平成 16 年 5 月、東京.

高橋肇、岩出義人、小沼博隆、工藤由起子. Real-Time PCR 法を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の定量法の確立. 第 24 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 光触媒を用いたノリ加工廃水の浄化・再生に関する研究. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

研究要旨

ビブリオ・バルニフィカスの既存方法の中から優れていると思われる方法を基礎とし、温度や遺伝子検出を組み合わせることで検討した。増菌については、これまでどおりに APW を使用し培養温度 35℃が妥当であった。また、分離培地には酵素基質培地の使用が良いと思われた。遺伝子検出法の方が分離培養法よりも検出率が高かった。定量 PCR 法も有用と思われたが、さらに精度についての検討を行う必要が有る。今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。国内 6 県の海域についての検体を供試したが、東北では検出率が低く、関東以南では検出率が高かった。

研究協力者

宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター	三輪 憲永	静岡県環境衛生科学研究所
八柳 潤	秋田県衛生科学研究所	小沼 博隆	東海大学海洋学部
高橋 肇	国立医薬品食品衛生研究所・東海大学海洋学部	瀬川 優子	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカスはビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こす。日本では毎年患者が発生し、1998年から2003年の5

年間には患者数94人、このうち死者68人が報告されている。感染の原因は汚染海水や生物に接触することや汚染食品の摂取によるものといわれている。しかし、患者検体からは既存の検出方法によ

って十分に分離がおこなわれているが、海水や生物または食品等からの分離については競合するほかの海洋細菌によって困難な場合が多い。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要がある。今年度は、増菌及び分離方法を含む培養方法を中心に検討した。また、遺伝子検出方法を併用して二重に確認を行った。さらに定量 PCR 法についても有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. これまでに報告されている方法についての整理

魚介類等からの論文等に示されているこれまでの検討結果を、本研究での検討方法の参考にした。

### 2. 実検体における検出方法の検討

#### 2-1. 供試検体

添加実験には生アサリむき身を用いた。また、自然汚染検体としては国内の6地域の産地の明らかな鮮魚介類を対象とし、小魚、中型の魚についてはエラなどの一部、アサリ、カキなどの貝類、カニ、エビなどの小型の甲殻類を用いた(表1)。

検体の一般生菌数の確認のために、検体の $10^{-5}$ までの10段階希釈液を作製し0.1 ml ずつ Tryptic soy agar (TSA) (DIFCO) にコンラージ塗抹して35°Cで培養し菌数を測定した。

接種実験用の検体における *V. vulnificus* 自然汚染の有無の確認のために、後述のアルカリペプトン水(APW) (日

水) 35°C培養後に培養液1白金耳をクロモアガービブリオに画線し35°C培養して疑われるコロニーの有無を確認した。

#### 2-2. 菌添加検体における検討

##### 2-2-1. 接種菌液

VV16 (アサリ由来) 株のカジトン培地保存から1白金線を APW10 ml に接種した。35°Cで7時間静置培養(菌数は $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml) し PBS で $10^{-6}$ まで10段階希釈した。 $10^{-6}$ 希釈菌液を0.1 ml ずつ TSA10 枚に塗抹し35°C18時間培養し菌数を測定した。

##### 2-2. 添加方法

検体 25g に $10^{-4}$ および $10^{-3}$ 希釈菌液0.1 ml を検体に接種する。これによって *V. vulnificus* 5,000 cfu/25g および 50,000 cfu/25g の検体を作製した。

増菌は(1)検体 25g を30°C3時間静置後に APW225ml を加え①25°C18時間および②35°C18時間培養、(2)検体 25g に APW 225ml 加え①25°C18時間および②35°C18時間培養した。その培養液をクロモアガービブリオに1エーゼ塗抹し①25°C18時間および②35°C18時間培養した。

疑わしいコロニー(水色)を釣菌しクロモアガービブリオに再塗抹しコロニー形態(肉眼および実体顕微鏡)で選別し性状を確認した。

##### 2-2-3. *V. vulnificus* の確定方法

*V. vulnificus* と疑われるコロニーを単離した後、オキシダーゼ試験、LIM 培地試験、VP 半流動培地試験、

0, 3 および 8% 塩分での発育性試験によって同定した。さらに、PCR 法によって *V. vulnificus* cytotoxin-hemolysin gene、*toxR* gene の保有を確認した。

#### 2-3. 自然汚染検体における検討

検体 25g に APW 225ml を加え、MPN 法 (3 本法) にて菌数を測定した。培養条件は 37°C 18 時間とした。また、MPN 使用後の液も培養した。培養液をクロモアガービブリオに 1 白金耳を画線し 37°C 18 時間培養した。水色を呈する *V. vulnificus* と疑われるコロニーを釣菌し単離した。

また、MPN の培養液について PCR 法にて別に示す *V. vulnificus* の遺伝子を検出した。

#### 2-4. 加熱検体における検討

*V. vulnificus* の菌株 (VV16) を APW 10ml にて 35°C、6 時間増菌培養 ( $10^8$  cfu/ml) した。その培養液を 2% NaCl 添加 PBS (日水) にて希釈し約  $5 \times 10^5$  cfu/ml および  $5 \times 10^4$  cfu/ml を作成し接種菌液とした。加熱済みのホタテをさらに沸騰水中で 3 分間加熱し、一般生菌を死滅させた。その検体 25g をストマッカー袋に取り、菌液を 0.1ml 接種した。225ml の APW を加え軽く袋の外側から手でもみほぐし、これを原液として APW を用いた MPN 法 (3 本法) によって培養を行った。35°C 18 時間培養後、一白金耳でとりクロモアガービブリオ (クロモアガー社) に画線後、18 時間培養した。青色の *V.*

*vulnificus* と思われるコロニーについて上記の通り性状を確認した。

#### 2-5. *V. vulnificus* の遺伝子検出のための PCR 法

ヘモリジン遺伝子の検出は Hill ら (Appl. Environ. Microbiol., 57: 707-711, 1991) の方法を、ToxR 遺伝子については Takahashi ら (J. Microbiol. Method., 61: 77-85, 2005) の方法に従い検出を行った。

#### 2-6. *V. vulnificus* の遺伝子を利用した定量 PCR 法

Takahashi ら (J. Microbiol. Method., 61: 77-85, 2005) の方法に従い一部検体において検出を行った。

### C. 結果

#### 1. これまでに報告されている検出方法について

1987 年以降有用な報告が 11 報あり、それらを吟味した (表 1)。増菌培養法はコレラや腸炎ビブリオと同様の方法であるアルカリペプトン水 (APW) と APW にポリミキシンやセロビオースを加える方法が多く使われていた。しかし、決定的に優良とされる選択増菌培地は見当たらなかった。分離平板培地については、選択性の強い培地が報告されている。VVM や CPC (Cellobiose-polymyxin-colistin 寒天培地) を基礎とし、それらに Colistin methanesulfonate など加えるなど工夫をしている。しかし、選択性が強すぎる傾向があり、これについても決定的に優

良とされる方法は見当たらなかった。

このため、本研究での検討方法としては、ビブリオ属菌によく使われている APW を増菌培地として用いることにし、増菌温度を 35 及び 25℃に設定し比較した。また、分離選択培地については腸炎ビブリオで近年多く用いられている酵素基質培地を採用した。

## 2. 接種実験による比較

5 機関において接種実験を行った。接種菌数はアサリ 25 g について最低 527 から 91,000 cells を接種したが、接種菌の回収が効率よくできなかった。このため、実験の目的である 25℃と 35℃における増菌能力の比較はできなかった。この結果の理由については明確ではないが、接種菌株は APW で十分に増殖できることを考えると供試した食品中の一般細菌の増殖が接種菌よりも早く、接種菌が増殖できないのではないかと考えられた。次に、食品由来の一般細菌を死滅させた加熱検体で接種実験し、増菌温度の比較を行うことにした。

## 3. 加熱検体における検討

接種菌数が 15,120cfu/10g の場合、25℃増菌では MPN 値が 9,300cfu/10g、35℃増菌では 46,000cfu/10g であった。さらに接種菌数が 151,200cfu/10g の場合、25℃増菌では MPN 値が 150,000cfu/10g、35℃増菌では 240,000cfu/10g であった。接種菌数に近いのは 25℃培養であったが、35℃培養の方が MPN 値が高い値であった。また、繰り返し 35℃増菌について実験を

繰り返した結果、接種菌数が 2,800cfu/10g、3,684cfu/10g、28,000cfu/10g および 36,840cfu/10g の場合、MPN 値がそれぞれ 9,300cfu/10g、4,300cfu/10g、43,000cfu/10g および 24,000cfu/10g であった。若干 MPN 値が高い傾向はあるが、接種した菌は回収できた。このことから、非加熱検体での接種菌数の回収が困難であることは共存する一般細菌が接種した *V. vulnificus* の増殖を阻害したと考えられた。

## 4. 自然汚染検体における比較

供試した 56 検体のうち、いずれの方法でも検出できなかった 7 検体は除き 49 検体について検出結果を取りまとめた (表 2)。増菌培養温度において 25℃と 35℃を比較すると分離培養法での検出結果では、46.9%の検体において 35℃が 25℃よりも優れていた (表 3)。逆に、25℃が 35℃よりも優れていた検体は 34.7%であった。PCR 法での検出結果では、55.1%の検体において 35℃が 25℃よりも優れていた。逆に、25℃が 35℃よりも優れていた検体は 24.0%であった。いずれの場合も、5 倍以上の菌数の違いが認められた検体が半数以上を占めていた。また、両方法において、35℃と 25℃が同等である検体が約 20%認められた。総合すると分離培養法では 65%以上、PCR 法では 75%以上の検体において、35℃は 25℃と同等もしくはより優れていた。さらに、分離培養法と PCR 法の検出率の比較をすると、

25℃増菌培養では63.3%の検体においてPCR法が分離培養法より優れており、このうち約80%の検体では5倍以上の菌数の違いが認められた。(表4)。逆に、分離培養法がPCR法より優れていた検体は10.2%であった。35℃培養では、61.2%の検体においてPCR法が分離培養法より優れており、このうち約83%の検体では5倍以上の菌数の違いが認められた。逆に、分離培養法がPCR法より優れていた検体は12.3%であった。このようにPCR法が分離培養法より優れていた。また、両方法において、分離培養法とPCR法が同等である検体が26.5%認められた。総合すると25℃増菌では約90%、35℃増菌では約88%の検体において、PCR法は分離培養法と同等もしくはより優れていた。

さらに、一部検体(10検体)において定量PCR法を検討した。その結果、10検体中2検体においては、ほぼMPN培養液をPCR法にて検出した値と合致した(表5)。しかし、他は10から1,000倍近く定量PCR法の方が高い値を示した。また、分離培養法では、MPN培養液をPCR法にて検出した値よりもさらに低い値であった。

PCR法での検出率を6地域で比較すると、東北では低かったが関東以南では検出限界以下であることは少なく多くの検体から検出された(表6)。

#### D. 考察

ビブリオ属菌の検出は困難な場合が多

い。これは、共存する海洋細菌の種類が多く、それらの性状が似ていることが考えられる。コレラや腸炎ビブリオについても優れた選択増菌方法の開発が困難であり現在段階では使用されている抗生物質や選択剤は限られている。ビブリオ・バルニフィカスについても同様であり、多少でも効果的な増菌方法を見出すことが妥当なものと考えられた。また、選択分離培地についても同様であり、もはや伝統的な糖分解性状依存する方法では難しいと思われる。このため、今年度は酵素基質培地のみを絞り検討を行った。

以上の観点から、優れていると思われる方法についての優れていると思われる方法についての実検体における検討を行った。その結果、増菌については、これまでどおりにAPWを使用し培養温度35℃が妥当であった。しかし、25℃の方が35℃よりも優れていた検体も少なからずあることから、さらに検討が必要と考えられた。例えば35℃と25℃の間である30℃培養の検討が必要と考えられた。

また、分離培養法よりもPCR法の方が検出率が高かった。しかし、PCR法よりも分離培養法が優れていた検体もあった。これについてはPCRの阻害があったことが考えられる。検体の成分などが酵素反応を抑制することが一般に知られているため、PCR法だけで検出することは間違った結果を生じる可能性もあり、分離培養法の併用が望ましいと思われた。また、遺伝子検出では死菌も検出してしまいうため、分離培養法よりも高い値になることが考えられる。定量PCRは迅速で

あるが、さらに精度についての検討を行う必要が有ると思われた。

患者の発生率と魚介類の汚染率に関連が有ることが予想されたが、患者の発生が少ない地域においても汚染率が高かった。このため、患者の発生には食生活等の生活習慣など他の要因が影響していることが考えられた。

今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。優れた方法を用いて *V. vulnificus* の感染について検討することが解明に結びつくものと思われる。

#### E. 結論

ビブリオ・バルニフィカスの既存方法の中から優れていると思われる方法を基礎とし、温度や遺伝子検出を組み合わせることで検討した。増菌については、これまでどおりに APW を使用し培養温度 35℃ が妥当であった。また、分離培地には酵素基質培地の使用が良いと思われた。遺伝子検出法の方が分離培養法よりも検出率が高かった。定量 PCR 法も有用と思われたが、さらに精度についての検討を行う必要が有る。今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。国内 6 県の海域についての検体を供試したが、東北では検出率が低く、関東以南では検出率が高かった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., and Hara-Kudo, Y. Development of a Quantitative Real-Time PCR Method for Estimation of the Total Number of *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Foods. J. Food Prot. 68: 1083-1088, 2005.

Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO<sub>2</sub> oxidation. Chemosphere. In press.

#### 2. 学会発表

工藤由起子、山田加奈子、松寄洋輔、吉川邦衛、林谷秀樹、熊谷進. 腸炎ビブリオの挙動解析に有用な指標菌の検索. 日本食品衛生学会第 87 回学術講演会. 平成 16 年 5 月、東京。

高橋肇、岩出義人、小沼博隆、工藤由起子. Real-Time PCR 法を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の定量法の確立. 第 24 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京。

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 光触媒を用いたノリ加工廃水の浄化・再生に関する研究. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

表1. *V. vulnificus* の検出に関する既存の方法について

対象	増菌	分離	結論	情報由来
カキ アサリ	1. Glucose-salt-Teepol broth 2. APW いずれも 35°C一晩	Sodium dodecyl sulfate-polymyxin B- Sucrose 寒天培地		AEM 1987: 1556-9. Bryant et al.
カキ	APW 37°C18h	Cellobiose-polymyxin-colistin 37°C18-24 h		AEM 1989: 3072-9. Kaysner et al.
海水 海泥	Polymyxin APW 37°C18-24h	Cellobiose-colistin 寒天培地 40°C一晩 mCPC, TCBS	Cellobiose-colistin は mCPC, TCBS より優れる	AEM 1998:1721-4. Hoi et al.
(培養液中での検討)	PNC 35°C8h APW より優れる colistin PNC 35°C8h 環境検体に推奨		PNC colistin PNC	AEM 1998:2701-4. Hsu et al.
海水 貝	APWS 40°C3h	TCBS CPC 40°C18h	CPC	SAM 1998:128-34. Covadonga et al.
貝	(直接)	VVM 37°C 24-48h		AEM 2000:855-9. Cerda-cuellar et al.
ウナギ養殖水・ウナギ臓器	APW Polymyxin APW 37°C4-6h	CC VVMc 37 と 40°C一晩	APW CC VVMc	JAM 2001:322-7. Cerda-cuellar et al.
海水 貝	APW 40°C	CPC	VV の分離不可能	JAM 1999: 125-34. Arias et al.
海水 魚介類	APW 37°C18h	mCPC クロモアガー 37°C18h		静岡衛研報 2001:1-4. 大畑ら



カキ	APW 35°C16-20h	mCPC 39-40°C18-24h 黄色中心不透明端透 明コロニー	JFP 2002:79- 87. Cook et al.
海水 カキ 海泥	Cellobiose Polymyxin APW 37°C18h	Cellobiose-colistin 寒天培地 37°C18h	感染症学雑 誌 2002:528- 大仲ら

その他 増菌培地 CCP プロス  
分離培地 クロモアガービブリオ

### 表 1 の備考：培地組成

#### 1. 平板培地

VVM	組成	用量 (g/l)
	D-(+)-cellobiose	15
	NaCl	10
	Yeast extract	4
	MgCl <sub>2</sub> /6H <sub>2</sub> O	4
	KCl	4
	Cresol red	0.04
	Bromthymol blue	0.04
	Polymyxin B	100,000 U
	Colistin methanesulfonate	100,000 U
	agar	15

オートクレーブ不可。加温溶解後、50°Cに冷却し5MのNaOHを用いてpHを8.5に合わせる。

CPC	組成	用量 (g)
	Peptone	10
	NaCl	20
	Beef extract	5
	Cresol red	0.04
	Bromthymol blue	0.04
	agar	15
	DW	900 ml
pH7.6, 121°C15 分し CPC 溶液(濾過滅菌)100ml 添加		
	Polymyxin B	100,000 U
	Colistin methanesulfonate	1,000,000 U
	D-(+)-cellobiose	15 g
	DW	100ml

Cellulose-polymyxin-colistin 寒天培地

mCPC : Colistin methanesulfonate が 400,000U

CC (Cellulose-colistin 寒天培地) : CPC の Polymyxin B なし、Colistin  
methanesulfonate が 1,000,000-400,000U

## 2. 増菌培地

PNC	組成	用量 (g/l)
	Peptone	50
	NaCl	10
	Cellobiose	0.8

pH8.0

PNCC:PNCに1-4.1 UのColistin methanesulfonateを加える。

APW	組成	用量 (g/l)
	Peptone	10
	NaCl	10

pH 8.8

APWP: APW に polymyxin B 20,000 U pH8.6

APWPC: APWP に 0.08% Cellobiose 加

表2. 各地域における *V. vulnificus* の検出結果

地域	検体番号	検体種	検出方法				試験開始日	一般生菌数 (cfu/g)
			培養法 (MPN/10g)		PCR法 (MPN/10g)			
			25℃	35℃	25℃	35℃		
東北	1	イワガキ	<3	<3	<3	<3	8/9	$4.6 \times 10^3$
	2	アサリ	<3	2	<3	<3	8/27	$2.0 \times 10^4$
	3	白貝	40	<3	<3	<3	8/30	$5.5 \times 10^3$
	4	活ホタテ	<3	<3	<3	<3	9/6	$2.0 \times 10^2$
	5	シジミ	4	<3	93	240	9/27	$3.3 \times 10^5$
東京ほか、 関東周辺	1	アサリ	750	430	$1.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	7/28	$1.8 \times 10^5$
	2	アサリ	23	23	23	93	8/17	$1.4 \times 10^3$
	3	アサリ	<3	4	4	4	9/6	$5.0 \times 10^3$
	4	アサリ	<3	16	240	240	9/6	$7.2 \times 10^4$
	5	アサリ	<3	<3	<3	<3	9/6	$5.7 \times 10^4$
	6	アサリ	<3	3	750	460	9/6	$8.2 \times 10^4$
	7	アサリ	<3	<3	$9.3 \times 10^3$	43	9/6	$2.3 \times 10^4$
	8	アサリ	<3	60	9	$2.4 \times 10^3$	9/6	$1.4 \times 10^6$
東海	1	アサリ	7	4	23	930	8/2	$8.2 \times 10^4$
	2	アサリ	4	4	21	38	8/2	$1.7 \times 10^4$
	3	アサリ	<3	<3	<3	30	8/30	$6.5 \times 10^3$
	4	アサリ	30	<3	<3	3	8/30	$1.4 \times 10^5$
	5	アサリ	<3	6	280	930	9/5	$3.1 \times 10^4$
	6	アサリ	700	<3	$7.5 \times 10^3$	$7.5 \times 10^3$	9/5	$2.2 \times 10^4$
	7	アサリ	30	21	150	150	9/12	$6.1 \times 10^4$
	8	アサリ	15	90	90	240	9/12	$3.0 \times 10^4$
	9	アサリ	<3	<3	<3	9	9/28	$5.1 \times 10^3$
	10	アサリ	<3	210	430	930	9/28	$2.7 \times 10^4$
	11	アサリ	3	75	3	75	10/24	$7.7 \times 10^3$
	12	アサリ	<3	<3	<3	<3	10/24	$4.7 \times 10^3$
近畿	18	ムール貝	<3	30	<3	9	7/27	$2.7 \times 10^4$
	31	ムール貝	<3	11	<3	3	8/17	$1.4 \times 10^5$
	50	アサリ	30	110	30	930	9/14	$1.1 \times 10^5$
	51	アサリ	<3	6	30	290	9/14	$4.9 \times 10^5$

次頁に続く