

表2. 各地域における *V. vulnificus* の検出結果 (続き)

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°C	35°C	25°C	35°C		
九州A	F1	アサリ	1.1×10^4	1.1×10^4	2.4×10^3	1.1×10^5	8/17	2.8×10^6
	F2	アサリ	2.0×10^3	4.6×10^3	1.1×10^3	2.4×10^3	8/17	4.5×10^5
	F3	マゴチ	<3	<3	<3	<3	8/26	3.0×10^5
	F4	テングニシ	3.6	<3	9.2	38	8/27	6.5×10^2
	F5	アカニシ	<3	<3	<3	<3	8/27	9.5×10^3
	F6	ヒラ (鰓)	15	240	240	240	9/6	1.9×10^5
	F7	セイゴ (鰓)	1.1×10^5	2.4×10^4	1.1×10^5	2.4×10^4	9/6	1.2×10^5
	F8	ボラ	2.4×10^5	1.1×10^5	2.1×10^6	7.5×10^4	9/21	4.2×10^5
	F9	クロダイ	2.1×10^3	4.6×10^3	4.4×10^5	4.6×10^3	9/21	4.0×10^5
	F10	ヒラ	<3	<3	15	3.6	10/4	4.9×10^3
	F11	シロクチ (鰓)	3	11	140	150	10/4	2.3×10^4
	F12	ワタリガニ	11	3	4.6×10^4	7.3	10/18	6.7×10^5
	F13	ヒラ	<3	<3	<3	<3	10/18	1.0×10^3
	F14	コノシロ	23	460	460	460	11/1	1.8×10^4
	F15	シロクチ	2.4×10^3	2.4×10^3	2.4×10^3	2.4×10^3	11/1	1.4×10^4
	F16	シロクチ	<3	3.6	13	210	11/22	2.6×10^4
	F17	クマエビ	1400	<3	24000	43	11/22	6.2×10^4
九州B	1	シオフキ	1.1×10^3	1.5×10^4	20	1.4×10^3	7/1	1.8×10^4
	2	アサリ	93	23	93	23	8/4	2.8×10^5
	3	アサリ	3	3.6	43	120	8/17	3.9×10^4
	4	アジ	3	14	6	75	9/22	9.4×10^4
	5	アサリ	43	21	93	240	9/27	9.0×10^3
	6	シオフキ	15	240	460	240	9/27	1.3×10^4
	7	アサリ	7	<3	15	23	10/27	1.3×10^4
	8	シオフキ	3	9	15	23	11/24	8.5×10^3
	9	シオフキ	4	<3	4	<3	11/30	1.0×10^4
	10	シオフキ	4	<3	4	<3	12/8	1.5×10^4

表 3. MPNの培養温度の違いによる*V. vulnificus* 検出の比較

菌の検出方法	培養法		PCR法	
25℃>35℃	17*	(10)**	12	(9)
	34.7%		24.5%	
35℃>25℃	23	(18)	27	(14)
	46.9%		55.1%	
25℃=35℃	9		10	
	18.4%		20.4%	
計	49		49	

*差のあった検体数

*()内は5倍以上の差のあった検体数

表 4. MPN培養後の検出方法の違いによる*V. vulnificus* 検出の比較

MPN培養温度	25℃		35℃	
平板培養>PCR	5*	(2)**	6	(2)
	10.2%		12.3%	
PCR>平板培養	31	(23)	30	(25)
	63.3%		61.2%	
平板培養=PCR	13		13	
	26.5%		26.5%	
計	49		49	

*差のあった検体数

*()内は5倍以上の差のあった検体数

表5. *V. vulnificus*検出における定量PCR法およびMPN法の検出結果の比較

地域	検体番号	検体種	試験開始日	一般生菌数 (cfu/g)	検出方法		
					培養法 (MPN/10g)	PCR法 (MPN/10g)	Real-time PCR(/10g)
					35℃	35℃	
東京ほか、 関東周辺	1	アサリ	7/28	1.8×10^5	430	1.1×10^3	3.8×10^3
	2	アサリ	8/17	1.4×10^3	23	93	2.6×10^3
	3	アサリ	9/6	5.0×10^3	4	4	N.D.
	4	アサリ	9/6	7.2×10^4	16	240	2.5×10^3
	5	アサリ	9/6	5.7×10^4	<3	<3	N.D.
	6	アサリ	9/6	8.2×10^4	3	460	2.5×10^3
	7	アサリ	9/6	2.3×10^4	<3	43	N.D.
	8	アサリ	9/6	1.4×10^6	60	2.4×10^3	4.2×10^3

表6. 地域ごとによる魚介類からの*V. vulnificus* の分離結果

地域	MPN-分離培養法	<i>V. vulnificus</i> 菌数レベル(log MPN/10g of sample)						
		ND	<1	1	2	3	4	5
	総検体数*							
秋田	5	4(80)**	1(20)					
東京	8	2(25)	2(25)	3(37.5)	1(12.5)			
静岡	12	5(41.7)	3(25)	3(25)	1(8.3)			
三重	4	0(0)	1(25)	2(50)	1(25)			
長崎	17	6(35.3)	2(11.8)	1(5.9)	2(11.8)	3(17.6)	2(11.8)	1(5.9)
熊本	10	3(30)	2(20)	3(30)	1(10)	0(0)	1(10)	
計	56	20(35.7)	1(19.6)	12(21.4)	6(10.7)	3(5.4)	3(5.4)	1(1.8)
	MPN-PCR 法							
秋田	5	4(80)	0(0)	0(0)	1(20)			
東京	8	1(12.5)	1(12.5)	2(25)	2(25)	2(25)		
静岡	12	1(8.3)	2(16.7)	3(25)	5(41.7)	1(8.3)		
三重	4	0(0)	2(50)	0(0)	2(50)			
長崎	17	3(17.6)	2(11.8)	2(11.8)	4(23.5)	3(17.6)	2(11.8)	1(5.9)
熊本	10	2(20)	0(0)	4(40)	3(30)	1(10)		
計	56	11(19.6)	7(12.5)	1(19.6)	17(30.4)	7(12.5)	2(3.6)	1(1.8)

* 魚介類の種類

秋田:カキ(1),アサリ(1),Scallop(1),シジミ(1),白貝(1)

東京:アサリ(8)

静岡:アサリ(12)

三重:ムール貝(2),アサリ(2)

長崎:アサリ(2),マゴチ(1),チングニシ(1),アカニシ(1),ヒラ(3),スズキ(1),ボラ(1),クロダイ(1),イシモチ(3),コノシロ(1),ワタリガニ(1),クマエビ(1)

熊本:アサリ(4),アジ(1),シオフキ(5)

** 検体数 (%)

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

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

研究要旨

Vibrio vulnificus の定量リアルタイム PCR である TaqMan の検討を行った。*V. vulnificus* に特異的なプライマーとプローブを用いて海水に *V. vulnificus* を添加し検出を行ったところ海水 1 ml あたり 10 cfu を検出できることがわかった。さらに、実検体について海水中の *V. vulnificus* を検出したところ、TaqMan で測定した菌数はほとんどのサンプルにおいて培養法と同等だった。TaqMan は数日かかる培養法に比べて 5 時間ほどで結果が得られた。本研究で用いた TaqMan の分析方法は迅速で、海水における *V. vulnificus* のモニタリングに有効であり、定量性があることが示された。

研究協力者

宮坂 次郎 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
小沼 博隆 東海大学海洋学部

や季節によって異なる。このため、危害の程度の情報を得るために定量検出を迅速に正確に行うことが必要である。既存の定量方法は、MPN 法を基本として分離培養法または PCR 法によって菌の分離または特異的遺伝子の検出結果を下に算出される。この方法だと 2～4 日を要するが、近年、1 日ほどで結果を得られるリアルタイム PCR による定量 PCR 法が多く、*V. vulnificus* についても定量 PCR 法が応用できないか検討した。魚介類検体は *V.*

A. 研究目的

Vibrio vulnificus は比較的全国的に海水やその中に生息する生物に存在すると考えられる。しかし、その濃度は海域

vulnificus 濃度の均一な検体液が作成しがたいと考え、今回は海水検体を対象にした。

B. 研究方法

1. *V. vulnificus* 定量 PCR 法の特異性

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 (Table 1)。また、*V. vulnificus* 以外の 25 株についても検討を行った。

2. 定量 PCR プライマーとプローブ

フォワードプライマーTox-130: TGT TCG GTT GAG CGC ATT AA、リバースプライマーTox-200: GCT TCA GAA GCT GCG TCA TTC、プローブTox-152: CGC TCC TGT CAG ATT CAA CCA ACA ACG。

3. 定量 PCR 法

反応液は全量 50 μ l で行った。反応条件は 50°C 2 分、95°C 10 分の後、95°C 15 秒、65°C 1 分を 40 サイクルの 2 ステップで行った。50 μ l の反応組成は TaqMan universal PCR master mix 25 μ l、テンプレート DNA (10ng/ μ l) 5 μ l、各プライマー 900 nM、プローブ 250 nM で行った。それぞれの反応における蛍光色素の強度は PCR 中に ABI PRISM 7000 sequence detector (Applied Biosystem) で自動的に読んだ。データは ABI PRISM 7000 SDS software (Applied Biosystem) を用いて解析した。増幅産物は 3% NuSieve agarose gel (Takara Bio, Shiga, Japan) 電気泳

動で確認した。泳動後のゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV (245 nm) トランスイルミネーターで確認した。

4. TaqMan の検出感度と増幅効率

TaqMan の感度を確認するために、4 株 (V02、V06、VV20、VV22) の DNA を精製し、終濃度が 50 ng~50 fg/ 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。

5. 純菌液と人工接種した海水からの *V. vulnificus* 数の定量

TaqMan による *V. vulnificus* 数の定量のために、V034 の 7 時間培養液を TSB+2% NaCl で 10 倍ずつ段階希釈し DNA extraction kit (Mag Extractor-Genome-; Toyobo, Osaka, Japan) を用いて DNA を抽出した。リアルタイム PCR は前に述べたとおりに行った。生菌数測定のため、 10^{-4} 希釈液 0.1 ml を TSA+2% NaCl に 2 枚ずつ塗抹した。35°C で 24 時間培養後、コロニー数を数えた。

海水中の *V. vulnificus* 数の定量には、国内 2 ヶ所で採取した海水を使用した。海水 1 ml をサンプルチューブに採り、*V. vulnificus* (V034) の TSB 培養液または 10 倍ずつ段階希釈した液 (10^{-1} - 10^{-7}) を 0.1ml 添加した。人工接種したサンプルと、未接種のサンプル 1 ml を前に述べたとおり DNA 抽出した。

6. 実検体海水中の *V. vulnificus* 数の定量

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 1 ml ずつ採り、MagExtractor で DNA 抽出した。抽出した DNA を TaqMan に使用した。さらに、海水中の *V. vulnificus* 数を MPN 法によって測定した。2×APW 10 ml に海水を 10 ml 加え、APW 10 ml に海水と海水の段階希釈液 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}) をそれぞれ 1 ml 添加した。MPN は 3 本法で行った。35°C で 18 時間培養後、APW 培養液を CHROMagar Vibrio agar (CHROMagar, Paris, France) に 1 白金耳 (10^{-1}) 画線した。35°C 24 時間培養後、*V. vulnificus* と思われるブルーコロニーを分離した。分離した株は本研究で開発した *toxR* プライマーと、*vvh* プライマー (Hill et al., 1991) を用いて PCR により確認した。

C. 結果

1. 定量 PCR の特異性

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 54 株において、*V. vulnificus* のみが同一で鮮明な 70pb の PCR バンドを得た (Table 1)。また、*V. vulnificus* 以外の 25 株については増幅産物は見られなかった。

2. *V. vulnificus* における TaqMan の検量線

TaqMan 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。検量線は直線の領域が DNA の濃度が最低 7 logs で交わり、そこでは相関係数が高く、0.995

～0.999 であることを示した。検出限界は 50 fg/50 μ l PCR 反応液だった。検量線の傾きは 3.15～3.24 で、PCR 効率は傾きから計算して 1.03～1.07 だった。

V. vulnificus を 10 倍ずつ段階希釈し、抽出した DNA をテンプレートとして TaqMan に供した (Fig. 1)。検量線は Ct 値と正確な検量線を作成する $10^1 \sim 10^7$ cells/ml の生菌数において相関係数 $r^2=0.9912$ を示した。

V. vulnificus が自然汚染していない海水を用いて確認した。Fig. 2 に示すように、サンプルの検量線は純菌液と同様だった。特に、海水の検量線は予測される生菌数と一致した。

3. TaqMan と MPN 法による海水中の *V. vulnificus* 数の定量

海水 10 サンプルを用いて TaqMan と MPN 法により、*V. vulnificus* 菌数を数えた (Table 2)。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、TaqMan では検出できなかった。No. 6 と No. 8 のサンプルは TaqMan と MPN 法において菌数に大きな差はなかった。No. 7 は TaqMan の方が MPN 法の 2 倍以上の菌数だった。No. 9 と No. 10 は TaqMan の菌数は MPN 法の半分だった。

D. 考察

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。

E. 結論

V. vulnificus の定量リアルタイム PCR である TaqMan の検討を行った。*V. vulnificus* に特異的なプライマーとプローブを用いて海水に *V. vulnificus* を添加し検出を行ったところ海水 1 ml あたり 10 cfu を検出できることがわかった。さらに、実検体について海水中の *V. vulnificus* を検出したところ、TaqMan で測定した *V. vulnificus* の菌数はほとんどのサンプルにおいて培養法と同等だった。TaqMan は数日かかる培養法に比べて 5 時間ほどで結果が得られた。本研究で用いた TaqMan の分析方法は迅速で、海水における *V. vulnificus* のモニタリ

ングに有効であり、定量性があることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 2005.

2. 学会発表

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。

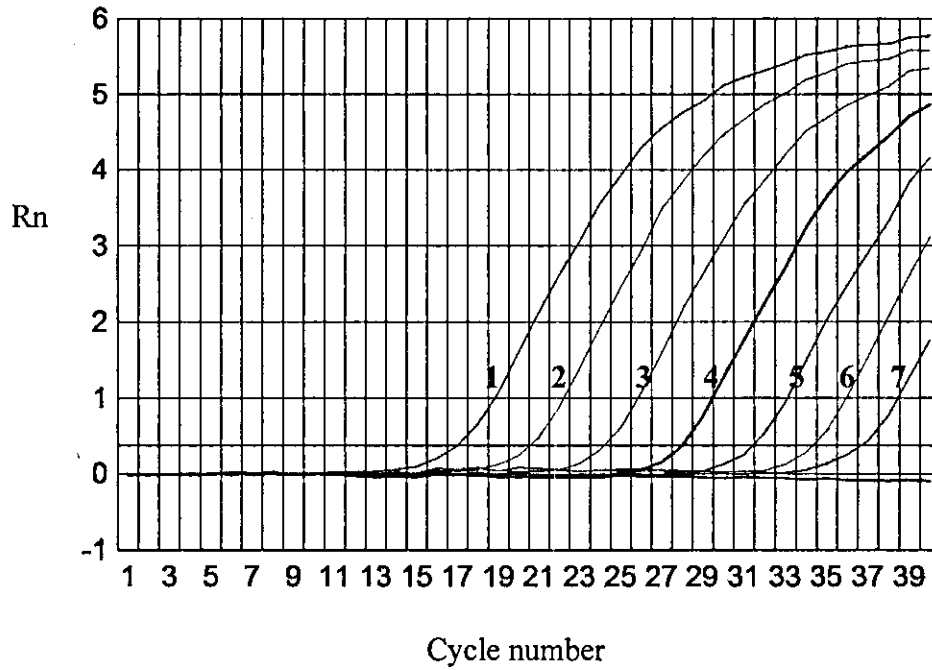


Fig. 1 *V. vulnificus* のリアルタイム PCR 増幅曲線

V. vulnificus 培養液の段階希釈液を Mag-Extractor で抽出した DNA をテンプレートとし、TaqMan に供した。生菌数 (log CFU/ml) は line 1; 7.4、line 2; 6.4、line 3; 5.4、line 4; 4.4、line 5; 3.4、line 6、2.4、line 7; 1.4。

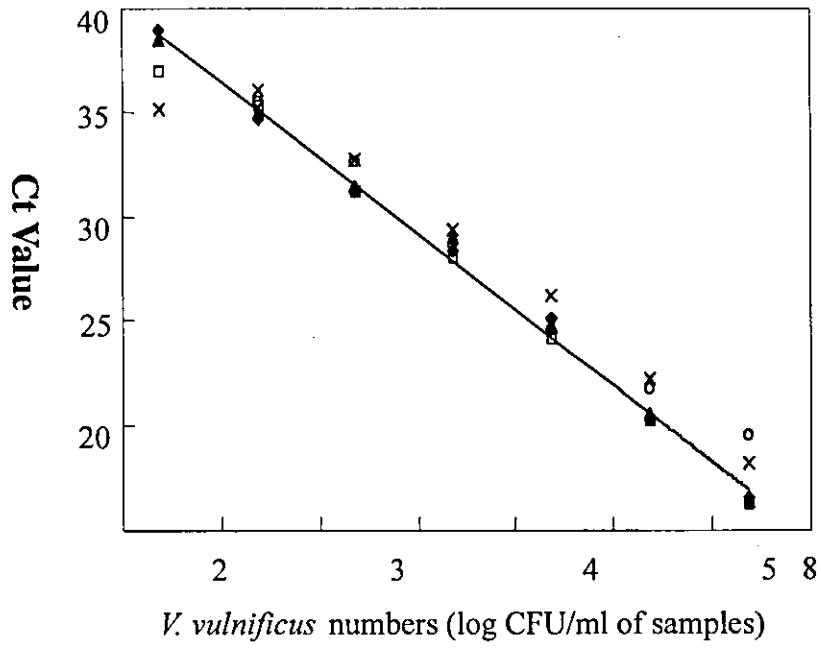


Fig. 2. *V. vulnificus* 培養液、海水の検量線
 生菌数(log)と Ct 値をプロットした。回帰係数(r^2)は 0.996 だった。

表 1. 各種菌株におけるプライマーの特異性

Strains	Source	Country	PCR		TaqMan	
			<i>vvh</i>	<i>toxR</i>	ΔRn	Ct
<i>Vibrio vulnificus</i>						
IFO15645			+	+	6.01	20.1
VO2	Hen clam	Japan	+	+	5.46	19.7
VO3	Hen clam	Japan	+	+	5.46	19.6
VO4	Hen clam	Japan	+	+	5.93	19.7
VO6	Hen clam	Japan	+	+	5.74	20.1
VO7	Hen clam	Japan	+	+	6.07	19.7
VO11	Hen clam	Japan	+	+	5.44	20.3
VO12	Hen clam	Japan	+	+	5.40	20.0
VO15	Hen clam	Japan	+	+	6.47	19.3
VO16	Hen clam	Japan	+	+	5.50	19.7
VO31	Grouper	Thailand	+	+	6.21	18.9
VO32	Short-neck clam	Thailand	+	+	6.40	18.3
VO34	Cockle	Thailand	+	+	5.94	19.8
t31-4	Cockle	Thailand	+	+	6.43	19.7
t45-2	Cockle	Thailand	+	+	5.58	20.0
VV16	Short-neck clam	Japan	+	+	5.58	20.6
VV17	Short-neck clam	Japan	+	+	6.12	18.6
VV18	Flathead	Japan	+	+	6.39	19.0
VV19	Seawater	Japan	+	+	6.08	19.5
VV20	Japanese mantis sh	Japan	+	+	5.87	18.7
VV22	Flathead	Japan	+	+	6.56	18.8
VV23	Flathead	Japan	+	+	6.04	19.2
VV25	Seawater	Japan	+	+	5.49	20.6
VV27	Seawater	Japan	+	+	6.11	18.4
VV29	Seawater	Japan	+	+	6.45	18.1
VV30	Sediment	Japan	+	+	5.91	18.5
VV31	Seawater	Japan	+	+	6.56	18.8
VV33	Seawater	Japan	+	+	6.20	19.0
VV36	Clinical isolate	Japan	+	+	5.40	19.6
<i>Vibrio cholerae</i>						
VO35	Clinical isolate	Japan	-	-	0.00	
VO41	Clinical isolate	Japan	-	-	0.00	
VO8	Hen clam	Japan	-	-	0.00	
VO17	Black tiger shrimp	Japan	-	-	0.00	
VO18	Black tiger shrimp	Japan	-	-	0.21	
VO19	Black tiger shrimp	Japan	-	-	0.02	
VO20	Black tiger shrimp	Japan	-	-	0.10	
t146-1	Fresh water shrimp	Thailand	-	-	0.04	
t147-1	Fresh water shrimp	Thailand	-	-	0.17	
t169-2	Fresh water shrimp	Thailand	-	-	0.03	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>						
VP80	Hen clam	Japan	-	-	0.00	
VO9	Hen clam	Japan	-	-	0.00	
VV13	Hen clam	Japan	-	-	0.04	

<i>Vibrio alginolyticus</i>						
IFO 15630				-	-	0.04
VO5	Hen clam	Japan		-	-	0.00
t135-1	Green mussel	Thailand		-	-	0.00
<i>Vibrio hollisae</i>						
ATCC 33564				-	-	0.00
<i>Vibrio mimicus</i>						
ATCC 33653				-	-	0.04
t42-2	Oyster	Thailand		-	-	0.08
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>						
VO24	Cod	Japan		-	-	0.00
t118-1	Oyster	Thailand		-	-	0.20
<i>Aeromonas veronii</i>						
VO25	Cod	Japan		-	-	0.00
VO26	Cod	Japan		-	-	0.01
VO27	Cod	Japan		-	-	0.00
<i>Enterobacter cloacae</i>						
JCM1232				-	-	0.07
<i>Enterobacter aerogenes</i>						
JCM 1235				-	-	0.00
VO29	Mackerel	Japan		-	-	0.03
<i>Escherichia hermannii</i>						
JCM1473				-	-	0.05
<i>Escherichia coli</i>						
JCM 1649				-	-	0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>						
JCM 1662				-	-	0.01
<i>Hafnia alvei</i>						
JCM1666				-	-	0.00
<i>Proteus mirabilis</i>						
JCM 1669				-	-	0.03
<i>Morganella morganii</i>						
VV10	Hen clam	Japan		-	-	0.00
<i>Citrobacter freundii</i>						
JCM 1657				-	-	0.02
VO28	Cod	Japan		-	-	0.00

*All isolates were identified by the partial of 16S rDNA sequence

表 2. 海水からの *V. vulnificus* の検出

Sample No.	Area	Temperature of seawater	Sodium concentration	Viable bacterial (cfu/ml)	Detectio of <i>V. vulnificus</i>	
					TaqMan (cells/100ml)	MPN (MPN/100ml)
1	A	24.5	2.28	9.0×10^2 /ml	ND	3
2	A	24.5	2.28	7.6×10^2	ND	6
3	B	23.0	0.77	2.4×10^1	ND	9
4	C	23.0	0.79	2.4×10^1	ND	7
5	D	19.2	0.09	3.0×10^3	ND	3
6	E	21.2	1.87	7.6×10^3	10300	9300
7	E	21.2	1.93	4.6×10^3	11400	4300
8	E	20.5	1.59	2.4×10^3	7800	11000
9	F	21.4	0.59	1.5×10^5	13400	29000
10	F	21.4	0.75	2.8×10^4	7270	15000

ND: not detected

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

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－

研究要旨

海水や魚介類のビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*、以下「V.v」) 及び腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*、以下「V.p」) 生息状況を反映するものとして、その周辺に生息する水鳥の食性に注目し、その糞便から V.v 及び V.p を検出することを試みた。その結果、既報^{1),2)}で報告した海水や魚介類の V.v 及び V.p の季節変動とほぼ同じ傾向であったことから、今後、水鳥の糞便から生息環境中の病原微生物の存在が明らかになる可能性が示唆された。

研究協力者

宮坂次郎、八尋俊輔、荒平雄二、
徳永晴樹、甲木和子
(熊本県保健環境科学研究所)

及び腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*、以下「V.p」) は広く海水中に生息する病原細菌である。これらは本県の海水や魚介類に冬季の一時期を除きほぼ通年生息し、V.p は V.v より低温で生息できる傾向にあることを報告した^{1),2)}。また、冬季の 10～4 月

A. 目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*、以下「V.v」)

に飛来する水鳥の糞便から高率に V. p を検出し結果を報告してきた¹⁾。今回は、例年より 2 ヶ月ほど早く飛来した 2003 年夏期の水鳥の糞便を調査したので、既報¹⁾の冬季結果及び周辺海域の調査と併せて報告する。

B. 材料および方法

1 検査材料

2002 年 1~4 月、10~12 月及び 2003 年 9~11 月に、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(表 1)。また、糞便採取時に周辺海水を採取して検査材料とした。

2 検査方法

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、35±1℃で 18±2 時間培養後、その 1 白金耳をクロモアガー・ビブリオ寒天

培地に塗抹し、35±1℃で 18±2 時間培養した。

V. v 及び V. p と推定されるコロニーを各種生化学性状試験(オキシダーゼ、2%NaCl 加 TSI 寒天培地、2%NaCl 加 LIM、半流動培地、2%NaCl 加 VP 半流動培地、0, 3, 8, 10% 塩分濃度による発育試験)により同定した。海水試料は、10ml を 2 倍濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に、1ml を規定濃度アルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に接種し、以下 10⁻⁴まで PBS で 10 倍段階希釈し、各 1ml をアルカリ性ペプトン水 10ml の 3 本に接種し、それぞれを 35±1℃で 18±2 時間培養した。混濁が見られた培養液から 1 白金耳をクロモアガー・ビブリオ寒天培地に塗抹し、35±1℃で 18±2 時間培養した。その後糞便に準じて同定し、V. v と V. p 陽性本数を最確数表に当てはめて 100ml 中の MPN 値を算出した。冬季の 11 月以降は海水 500ml を吸引ろ過し、そのメンブランフィルター(0.45µm)を 40ml のアルカリ性ペプトン水に入れ、35±1℃で 18±2 時間培養し、定性試験と

した。

なお、海水及び水鳥糞便の培養液から V.v を検出するため、既報³⁾に準じて、cytotoxin-hemolysin 遺伝子を確認した。また、Template 作製までは V.v に準じ、V.p の耐熱性溶血毒 (TDH) 及び耐熱性溶血毒類似毒素 (TRH) 遺伝子を確認した。

分離した V.v 株は、国立感染症研究所から分与を受けた O1~O7 抗血清を使用して凝集法による血清型別試験を行った。V.p 株の血清型別試験は、O 及び K 型別血清 (デンカ生研) を用いて凝集法で行った。

C. 結果

雑食性水鳥の V.v 及び V.p 検査結果を表 2 に示す。345 検体中 V.v が検出されたのは 84 検体 (24.3%)、V.p 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.v0 検体 (0%)、V.p 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.v が検出されたの

は 83 検体 (33.9%)、V.p は 181 検体 (73.9%)、ユリカモメ群 100 検体中 V.v1 検体 (1.0%)、V.p58 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.p が検出されたのみであった。

また、水鳥から分離した V.v 中 55 株について行った、O 血清型別結果を表 4 に示す。O1~O7 型血清中、O2 以外は全て検出された。O1 及び O6 が共に 11 株 (20.0%) で最も多く、O4 が 8 株 (14.5%) で、使用した O1~O7 型で、型別できなかった株は 21 株 (38.2%) であった。分離された V.p117 株について、O 及び K 血清型別結果を表 5 に示した。近年、本県で V.p による食中毒事例で検出された O3:K6、O4:K8 と同じ型の株も検出されたが、それらを含めて PCR 法による TDH、TRH は全て陰性であった。

周辺海水の V.v 及び V.p の MPN 値を表 2 に示した。V.v は 1~3 月と 11~12 月に不検出の時期があったが、V.p 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.v, V.p 共に 9~10 月には高い MPN 値を示した。なお、V.v の PCR は分離培養とほぼ同じ成績を示したが、MPN3 本法の低希釈段階で陽性バンドが出にくい傾向にあった。

D. 考察

雑食性の水鳥群では、飛来が見られず、糞便の採取ができなかった 5~8 月を除いて全ての月で V.p を検出した。9 月には 100%の陽性率を示した。V.v は、2002 年 10 月及び 2003 年 9~11 月に検出した。特に 2003 年 9 月 1 日~11 月 18 日の調査では、周辺海水の MPN 値と比例した変動がみられ、9 月の検出率 100%から次第に減少していく傾向が明らかであった。

しかし、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.p が検出されたのに比べ、V.v は 9~11 月に限られていたことから、V.p 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（写真 1, 写真 2）、その際、球状にした不消化物を吐き戻す習性がみられた（写真 3）。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.v や V.p 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.p 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. 参考文献

- 1) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 32, 31(2002).
- 2) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 荒平雄二, 甲木和子: 熊本県保健環境科学研究所報, 32, 42(2002).

- 3) 宮坂次郎, 徳永晴樹, 甲木和子 : 特になし
 熊本県保健環境科学研究所報,
 31, 31(2001).

F. 知的財産権の出願・登録状況
 (予定も含む)

表 1 採取検体の種類別

	種 類	検体数
雑食性	ウミネコ・セグロカモメ群	245
	ユリカモメ群	100
	小 計	345
植物質食性	ヒドリガモ群	9
	マガモ群	10
	コガモ群	3
	小 計	22
	合 計	367

表2 水鳥採取糞便中のV.vおよびV.p

採取年月日	雑食性水鳥		植物質食性水鳥		海水MPN/100ml	
	検体数	V.v	V.p	検体数	V.v	V.p
2002						
1/29	2	0	2		-	+
1/30	2	0	2		-	-
2/20				3	0	1
2/24	51	0	33		+	+
3/4	33	0	17		+	+
4/4	36	0	12		+	4
4/16	17	0	7		+	+
10/28	3	1	3		430	230
11/12	8	0	5	10	0	0
11/19	21	0	17	9	0	1
12/24	20	0	12		-	+
2003						
9/1	15	15	15		4,300	9,300
9/16	30	25	30		240	4,300
9/17	17	11	17		70	930
10/15	50	26	33		4	230
11/18	40	6	35		-	21
計	345	84	240	22	0	2
率		24.3%	69.6%		0.0%	9.1%

(注) MPNにおける+, -は定性試験

表3 水鳥種類別糞便のV.vおよびV.p

採取年月日	ウミネコ・セグロカモメ		ユリカモメ		マガモ		ヒドリガモ		コガモ			
	検体数	V.v	V.p	検体数	V.v	V.p	検体数	V.v	V.p	検体数	V.v	V.p
2002	1	0	1	1	0	1						
1/29	1	0	1	1	0	1						
1/30	1	0	1	1	0	1						
2/20							3	0	1			
2/24	32	0	22	19	0	11						
3/4	18	0	10	15	0	7						
4/4	20	0	7	16	0	5						
4/16	8	0	1	9	0	6						
10/28	1	0	1	2	1	2						
11/12	8	0	5				10	0	0			
11/19	4	0	3	17	0	13	6	0	1	3	0	0
12/24				20	0	12						
2003	15	15	15									
9/1	15	15	15									
9/16	30	25	30									
9/17	17	11	17									
10/15	50	26	33									
11/18	40	6	35									
計	245	83	181	100	1	58	9	0	2	10	0	0
率		33.9%	73.9%		1.0%	58.0%		0.0%	22.2%		0.0%	0.0%