

我国における主要な細菌性食中毒原因菌の一つであるサルモネラの輸入魚介類における汚染実態を調査した結果、魚介類全体からのサルモネラ検出率は、*Salmonella invA* 遺伝子のみを検出した3検体を含め5件1.4% (5/353)であった。すべてエビ由来で、エビからの検出率としては2.4% (5/212)であった。そのうちサルモネラを検出したのはブラックタイガーのみ2検体4.3% (2/47)で、そのサルモネラ汚染菌数はインドネシア産が40 CFU/100g、一般生菌数は7.48 log CFU/g、ベトナム産が30 CFU未満/100g、一般生菌数は5.18 log CFU/gであった。検出菌の血清型はいずれも *Salmonella* Weltevreden であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M. Loop-Mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. FEMS Microbiology Letters. 253:155-161, 2005.

Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Salmonella* in unpasteurized liquid egg and typing of the isolates. Applied and Environmental Microbiology. 71: 6730-6735, 2005.

工藤由起子、尾上洋一、中川 弘、高橋

淳子、高鳥浩介。小規模液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点とその改善について。日本食品衛生学会。印刷中。

Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., and Takatori, K. Incidence of *Salmonella* in imported spices in Japan. J. Food Prot. In press.

### 2. 学会発表

谷口裕之、工藤由起子、熊谷進。絶飲絶食ストレス下のウズラにおけるサルモネラ経口感染。日本防菌防黴学会。平成17年5月。大阪。

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進。乾燥環境におけるサルモネラの生存。日本防菌防黴学会。平成17年5月。大阪。

飯渕るり子、工藤由起子、熊谷進。サルモネラのバイオフィルム形成性と乾燥環境下における生残。第140回日本獣医学会学術集会。平成17年9月。鹿児島。

山路史子、大塚佳代子、古川一郎、尾上洋一、大友良光、工藤由起子。香辛料、ハーブ等におけるサルモネラ汚染。日本食品衛生学会第91回学術講演会。平成17年10月。埼玉。

右井淳子、近藤和雄、澤田拓士、工藤由起子。シリアル、ドライフルーツおよびシード類におけるサルモネラおよび黄色ブドウ球菌の生残に関する

研究. 日本食品衛生学会第 91 回学  
術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.

大塚佳代子、倉園貴之、柳川敬子、工藤  
由起子、高鳥浩介. 食品および人に  
おける *Salmonella* Senftenberg と  
Weltevreden の分布と細菌学的解析  
. 第 25 回日本食品微生物学会. 平  
成 17 年 11 月. 金沢.

工藤由起子. 卵でのサルモネラ汚染と  
その食中毒について. 静岡県平成 17  
年度食中毒処理研修会. 平成 17 年  
11 月 16 日. 静岡市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

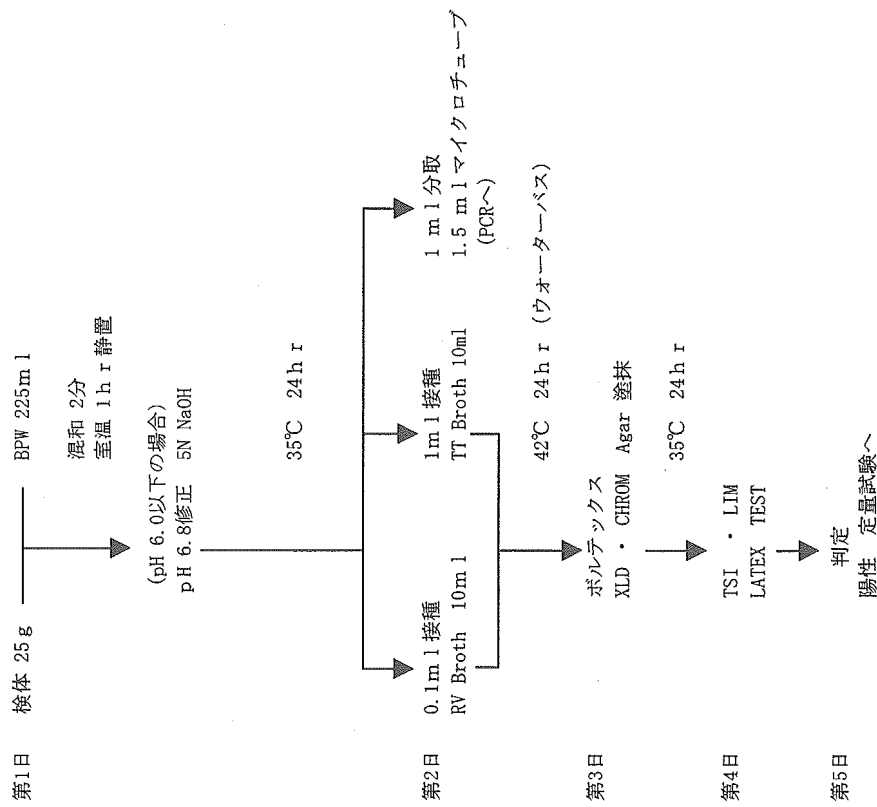


図1 魚介類からのサルモネラの定性試験

\* 解凍は、25°Cで18h r 以内または45°C以下のウォーターバスで15分以内に行う。

\* 残検体は、-20~-30°Cに保存する（陽性検体の定量試験実施のため）。

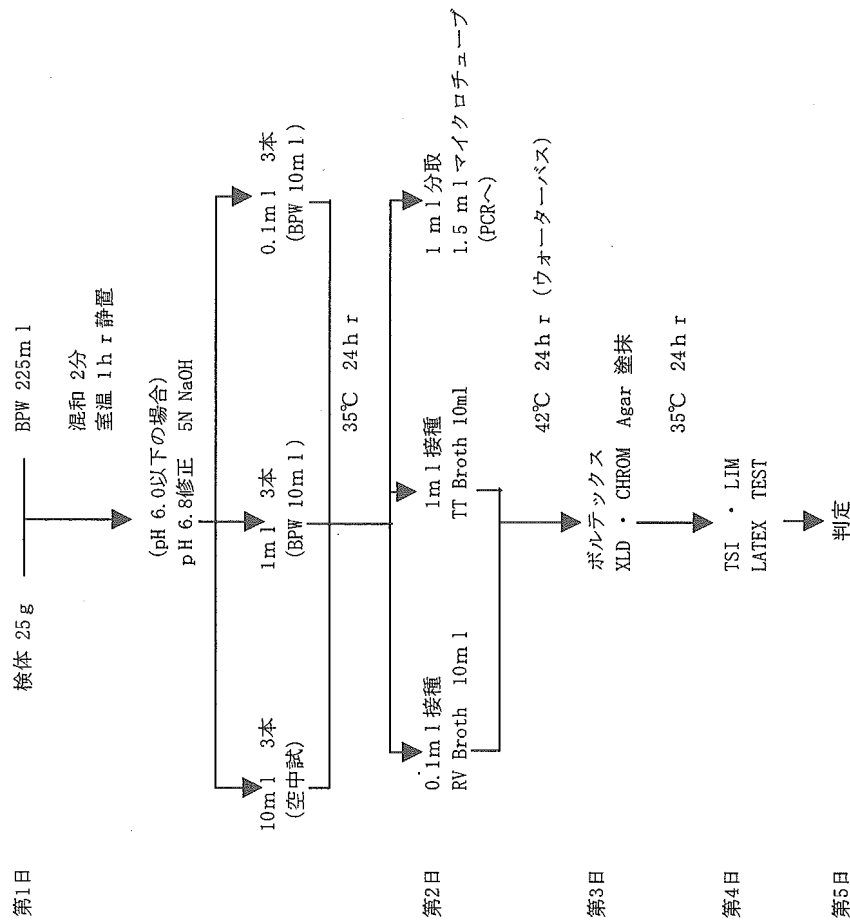


図2 魚介類からのサルモネラの定量試験 (MPN 3本法)

\* 希釈水：リン酸緩衝希釈水  
「原液」

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.4 g  
D. W. 50m l  
pH7.2調整 (1N NaOH 17.5m l)  
全量 100m l (D. W.)

「使用希釈水」

原液 1.25m l  
全量 1000m l (D. W.)  
121°C 15分

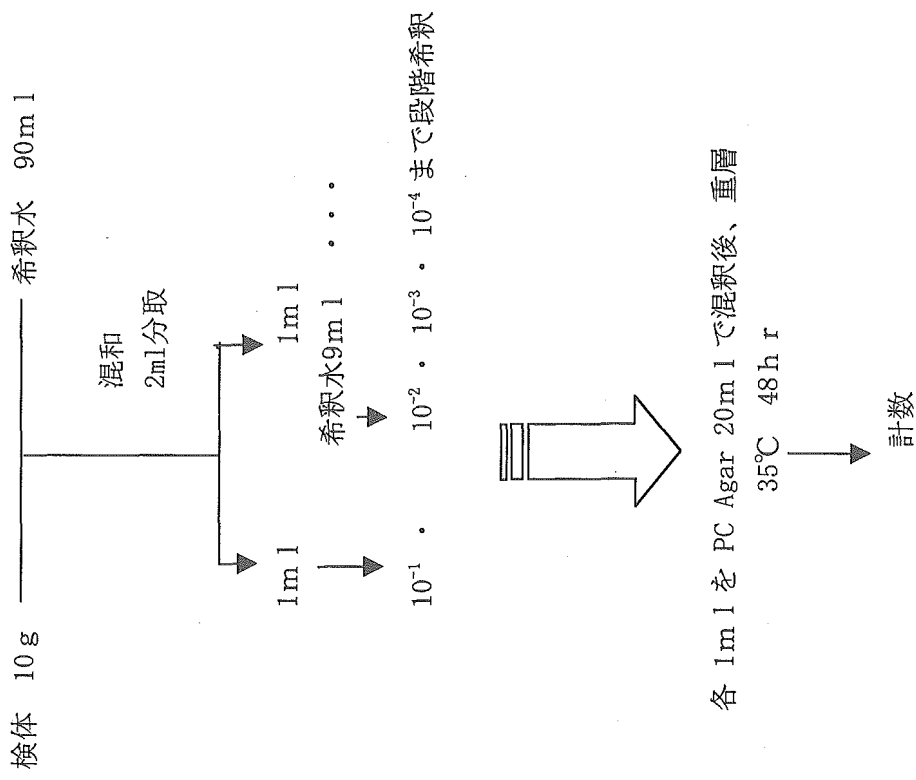


図3 魚介類の一般細菌数測定

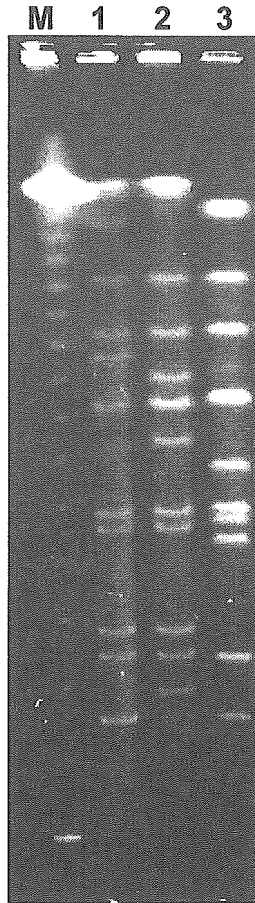


図4 ブラックタイガーから分離した*Salmonella Weltevreden*の*Bln I*によるPFGEパターン  
レーン：M,  $\lambda$ ラダー；lane 1, インドネシア産 H<sub>2</sub>S遅産生性；lane 2, インドネシア産H<sub>2</sub>S産生性；  
lane 3, ベトナム産

表1 供試検体

検体の種類		検体数			
エビ	212	むきエビ	54		
		ホワイトエビ	48		
		ブラックタイガー	47		
		殻付きエビ	29		
		甘エビ	21		
		バナメイエビ	13		
イカ	63	アカイカ	27		
		甲イカ	13		
		ヤリイカ	9		
		アオリイカ	8		
		スルメイカ	2		
		イカ その他	4		
		貝	61	はまぐり	25
イタヤ貝・小柱	8				
しじみ	6				
あさり	5				
赤貝	5				
ホッキ貝	3				
つぶ貝	2				
ほたて貝	2				
ムール貝	2				
トコブシ	1				
石垣貝	1				
アケ貝	1				
タコ	10			真ダコ	7
				蒸しダコ	2
		小ダコ	1		
カニ	6	ワタリガニ	3		
		ズワイガニ	2		
		タラバガニ	1		
ウニ	1	ウニ	1		
計		353			

表2 原産国一覧

原産国	検体数
中国	75
インド	61
インドネシア	61
ベトナム	24
タイ	22
ペルー	12
サウジアラビア	11
グリーンランド	10
カナダ	9
モロッコ	9
ミャンマー	8
ロシア	8
日本	6
アフリカ	3
韓国	3
チリ	3
パキスタン	3
フィリピン	3
マレーシア	3
モーリタニア	3
アルゼンチン	2
オーストラリア	2
ニュージーランド	2
メキシコ	2
アメリカ	1
イエメン	1
イラン	1
スリランカ	1
台湾	1
デンマーク	1
ブラジル	1
マダガスカル	1
計 32カ国	353

表3 検体別原産国と検体数

検体名	原産国	検体数
エビ 212 (21カ国)	インドネシア	60
	インド	58
	ベトナム	18
	サウジアラビア	11
	中国	11
	グリーンランド	10
	タイ	10
	ミャンマー	8
	カナダ	6
	ロシア	4
	パキスタン	3
	オーストラリア	2
	フィリピン	2
	メキシコ	2
	アルゼンチン	1
	イラン	1
	スリランカ	1
	デンマーク	1
	ブラジル	1
	マダガスカル	1
	マレーシア	1
イカ 63 (16カ国)	中国	14
	タイ	12
	ペルー	12
	ベトナム	5
	モロッコ	4
	インド	3
	日本	3
	マレーシア	2
	アフリカ	1
	アメリカ	1
	アルゼンチン	1
	イエメン	1
	インドネシア	1
	チリ	1
ニュージーランド	1	
フィリピン	1	
貝 61 (9カ国)	中国	46
	カナダ	3
	韓国	3
	日本	3
	ロシア	2
	台湾	1
	チリ	1
	ニュージーランド	1
	ベトナム	1
タコ 10 (3カ国)	モロッコ	5
	モーリタニア	3
	アフリカ	2
カニ 6	中国	4
	ロシア	2
ウニ 1	チリ	1



表4 検体種類別原産国一覧

検体の種類		検体数	原産国と検体数							
エビ 212	むきエビ	54	インド	19	インドネシア	14	中国	8	ベトナム	7
	ホワイトエビ	48	ミャンマー	4	タイ	1	アルゼンチン	1		
			インド	22	サウジアラビア	10	インドネシア	6	パキスタン	2
			メキシコ	2	ミャンマー	2	マレーシア	1	スリランカ	1
	ブラックタイガー	47	イラン	1	ブラジル	1				
			インドネシア	20	インド	13	ベトナム	10	フィリピン	2
	殻付きエビ	29	タイ	2						
			インドネシア	13	インド	4	カナダ	3	オーストラリア	2
			ミャンマー	2	サウジアラビア	1	ベトナム	1	マダガスカル	1
	甘エビ	21	中国	1	パキスタン	1				
グリーンランド			10	ロシア	4	カナダ	3	中国	2	
デンマーク			1	タイ	1					
バナメイエビ	13	インドネシア	7	タイ	6					
イカ 63	アカイカ	27	ペルー	12	中国	11	日本	3	チリ	1
	甲イカ	13	モロッコ	4	タイ	3	マレーシア	2	中国	1
	ヤリイカ	9	インド	1	イエメン	1	不明(アフリカ)	1		
			タイ	3	ベトナム	2	インドネシア	1	フィリピン	1
	アオリイカ	8	インド	1	アメリカ	1				
			タイ	6	ベトナム	2				
	スルメイカ	2	ニュージーランド	1	中国	1				
	イカ その他	4	中国	1	インド	1	アルゼンチン	1	ベトナム	1
貝 61	はまぐり	25	中国	25						
	イタヤ貝・小柱	8	中国	8						
	しじみ	6	中国	5	日本	1				
	あさり	5	中国	3	韓国	1	日本	1		
	赤貝	5	中国	3	韓国	2				
	ホッキ貝	3	カナダ	3						
	つぶ貝	2	ロシア	2						
	ほたて貝	2	中国	1	日本	1				
	ムール貝	2	ニュージーランド	1	チリ	1				
	トコブシ	1	台湾	1						
	石垣貝	1	中国	1						
アケ貝	1	ベトナム	1							
タコ 10	真ダコ	7	モロッコ	3	モーリタニア	3	不明(アフリカ)	1		
	蒸しダコ	2	モロッコ	2						
	小ダコ	1	不明(アフリカ)	1						
カニ 6	ワタリガニ	3	中国	3						
	ズワイガニ	2	中国	1	ロシア	1				
	トラバガニ	1	ロシア	1						
ウニ 1	ウニ	1	チリ	1						

表5 菌分離および遺伝子検出検体の一般生菌数

No.	検体名	原産国	サルモネラ 分離	invA PCR	生菌数 (log CFU/g)
1	ホワイトエビ	インド	—	+	6.70
2	ホワイトエビ	インドネシア	—	+	5.52
3	ブラックタイガー	インドネシア	+	+	7.48
4	ブラックタイガー	タイ	—	+	3.76
5	ブラックタイガー	ベトナム	+	+	5.18

表6 主要検体種類別一般生菌数

検体の種類	検体数	平均値	標準偏差	最大値	最小値	
		log CFU/g				
エビ 212	むきエビ	54	4.94	1.49	7.69	2.66
	ホワイトエビ	48	4.90	1.13	7.11	3.18
	ブラックタイガー	47	5.04	1.16	7.59	2.08
	殻付きエビ	29	4.54	1.21	6.48	1.18
	甘エビ	21	3.27	1.54	6.41	0.95
	バナメイエビ	13	4.50	0.47	5.45	3.90
イカ 63	アカイカ	27	4.09	0.97	5.73	2.26
	甲イカ	13	4.53	1.65	7.48	1.54
	ヤリイカ	9	4.35	1.73	7.18	2.93
	アオリイカ	8	2.94	0.66	4.18	2.11
	スルメイカ	2	4.23	1.23	5.10	3.36
	イカ その他	4	4.10	1.45	6.18	2.78
貝 61	はまぐり	25	4.05	0.93	5.64	1.78
	イタヤ貝・小柱	8	3.31	0.90	4.32	1.60
	しじみ	6	5.44	1.44	7.72	3.18
	あさり	5	4.01	1.62	6.85	3.03
	赤貝	5	5.47	1.28	7.58	4.23
	ホッキ貝	3	3.18	1.74	4.24	1.18
	貝 その他	9	3.31	1.90	6.88	0.95
タコ 10	真ダコ	7	4.06	1.00	5.40	2.77
	タコ その他	3	4.48	0.61	5.11	3.90
カニ 6	ワタリガニ	3	4.05	1.21	5.15	2.76
	カニ その他	3	4.36	0.22	4.59	4.15
ウニ 1	ウニ	1	4.73			
計		353				

表7 検体種類別・主要原産国別一般生菌数

検体の種類	原産国	検体数	平均値	標準偏差	最大値	最小値
エビ 212	インド	19	4.78	1.46	7.48	2.79
	インドネシア	14	5.09	1.58	7.69	2.70
	中国	8	5.36	1.87	7.48	2.66
	ベトナム	7	5.40	1.39	7.48	3.92
	他 3カ国	6	4.03	0.69	4.85	3.26
	インド	22	5.16	1.06	6.85	3.30
	サウジアラビア	10	4.28	1.35	7.11	3.18
	インドネシア	6	5.08	0.99	6.00	3.18
	他 7カ国	10	4.83	1.03	6.93	3.62
	インドネシア	20	5.32	1.19	7.59	3.48
	インド	13	5.15	0.63	6.45	4.26
	ベトナム	10	4.60	1.48	6.74	2.08
	他 2カ国	4	4.38	1.28	6.28	3.53
	インドネシア	13	4.56	1.10	6.48	3.37
	インド	4	5.33	0.92	6.48	4.54
	カナダ	3	3.34	1.87	4.53	1.18
	他 7カ国	9	4.55	1.11	6.38	2.90
	グリーンランド	10	3.41	1.74	6.41	1.40
	ロシア	4	3.24	1.65	4.84	0.95
	カナダ	3	3.02	2.20	5.34	0.95
	他 3カ国	4	3.13	0.81	4.10	2.15
インドネシア	7	4.66	0.48	5.45	4.00	
タイ	6	4.31	0.42	4.92	3.90	
イカ 63	ペルー	12	4.39	1.03	5.73	2.60
	中国	11	3.89	0.70	4.68	2.83
	他 2カ国	4	3.73	1.37	5.53	2.26
	モロッコ	4	6.09	1.21	7.48	4.53
	タイ	3	3.40	1.19	4.59	2.22
	他 5カ国	6	4.06	1.46	5.41	1.54
	タイ	3	4.35	2.44	7.18	2.93
	他 5カ国	6	4.35	1.55	7.07	3.15
	タイ	6	3.02	0.66	4.18	2.18
	ベトナム	2	2.70	0.82	3.28	2.11
	2カ国	2	4.23	1.23	5.10	3.36
4カ国	4	4.10	1.45	6.18	2.78	
貝 61	中国	25	4.05	0.93	5.64	1.78
	中国	8	3.31	0.90	4.32	1.60
	中国	5	5.46	1.61	7.72	3.18
	他 1カ国	1	5.32			
	中国	3	4.31	2.20	6.85	3.03
	他 2カ国	2	3.55	0.45	3.87	3.23
	中国	3	4.85	0.67	5.55	4.23
	他 1カ国	2	6.41	1.65	7.58	5.25
	カナダ	3	3.18	1.74	4.24	1.18
	7カ国	9	3.31	1.90	6.88	0.95
タコ 10	モロッコ	3	3.54	0.50	4.11	3.20
	モーリタニア	3	4.26	1.35	5.40	2.77
	他 1カ国	1	5.00			
	2カ国	3	4.48	0.61	5.11	3.90
カニ 6	中国	3	4.05	1.21	5.15	2.76
	2カ国	3	4.36	0.22	4.59	4.15
ウニ 1	チリ	1	4.73			
計		353				

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

研究要旨

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ 106 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果の得られた事例は 5 件（サルモネラ 3 件、病原性大腸菌（毒素原性大腸菌）1 件、カンピロバクター 1 件）であった。その結果から、病原物質の推定摂取量は、サルモネラ（血清型 Enteritidis）においては患者一人当たりについて 288MPN、400 MPN および 2,800,000,000 cfu（最小値）、毒素原性大腸菌においては 25 MPN（最小値）であり、さらにカンピロバクターについては 360 MPN の摂取が推定された。この結果から、ほとんどの事例において発症菌数は一人当たり 100-1,000 MPN であった。

研究協力者

工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所	千葉市	保健福祉局健康部
福岡県	保健環境研究所		環境保健研究所
静岡県	健康福祉部、中部保健所	横須賀市	健康福祉部
			健康安全科学センター

A. 研究目的

細菌性食中毒の予防対策には近年世界的に普及しているリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が求められている。

日本においても取り組みが進みつつあるが、ほとんどが海外のデータを用いたリスクアセスメントであるため、日本にそのまま導入することは難しい。特に、日本では生食

の嗜好が強く、魚介類、卵、肉などは海外の食生活と大きく異なるものもあり、対象食品の日本人の摂食状況として摂食頻度や摂食量などの数値を考慮することが必要である。

このため、本研究では昨年度に引き続き、日本で問題になっている主要な食中毒原因菌による実際の食中毒事例を調査し摂食状況や発症菌量を明確にすることを目的として各自治体の協力により事業を進めることとした。

## B. 研究方法

2005年度の食中毒事例における原因食品中の食中毒菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ 106自治体から承諾を得た。依頼項目として、原因物質名、発生年月日、患者数(人)、摂食者数(人)、原因食品名、原因食品中の菌数、原因食品の推定摂食量、病因物質の推定摂取量、検査までの検体の保管状況、検査方法などについて指定した報告方法に沿って詳細な情報を取りまとめた。

## C. 研究結果

調査依頼による協力自治体は 106自治体であったが、実際に測定結果の得られた事例は 5件であった。内訳は、サルモネラ 3件、病原性大腸菌(毒素原性大腸菌) 1件、カンピロバクター 1件であった(表 1)。その結果から、病原物質の推定摂取量は、サルモネラ(血清型 Enteritidis)においては患者一人当た

りについて 288 MPN、400 MPN および 2,800,000,000 - 14,000,000,000 cfu、毒素原性大腸菌においては 25 - 1,000 MPN であり、さらにカンピロバクターについては 360 MPN の摂取が推定された。この結果から、ほとんどの事例において発症菌数は一人当たり 100-1,000 であった。

## D. 考察

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまで Enteritidis や Typhimurium については比較的知見が多い。今回も 3事例の Enteritidis 食中毒事例において少数の感染菌数であることが報告された。事例 1 では、原因食品の炒り卵が加熱調理が不十分で作られたか、調理後の鶏卵原料によって二次汚染されたのではないかと推察された。一人当たりの摂取菌量が 400 MPN であることが推測されているが、摂食者 84 人中 19 人が発症していることから、原因食品中での汚染の偏りが存在したことも考えられた。事例 2 では、販売前日の午後に作製し販売まで約 19 時間室温で保存した赤飯が原因食品であった。その赤飯中の菌数は  $10^6 \sim 10^7$  cfu/g と異常に高く、加熱調理後に赤飯に 2 次汚染したサルモネラが保存中に十分に増殖をしたものと考えられる。このような高菌数のサルモネラを摂取したため、6 人の摂食者全員が発症した。事例 3 では、保育園給食のおやつとして提供されたみ

たらし団子を原因食品として発生した。餅部分は午前中に蒸して作られ加熱調理された蜜をかけ、室温で放冷および保管された。蜜と餅の両方から検出されているが、蜜の方が若干高い定量値であった。一人当たり 288 MPN のサルモネラを摂取したことが算出され、113 人摂食したうちの 75 人が発症した。

病原性大腸菌（毒素原性大腸菌）の事例（事例 4）では、刑務所内の食事として提供された白菜キムチ漬が原因食品であった。提供する 2 日前に白菜を塩漬し冷蔵庫に保管され提供当日に水切りしてキムチの素を混合した。原材料の白菜とキムチの素から毒素原性大腸菌は検出されなかったことから二次汚染の可能性も考えられる。汚染菌数は低く 1~40cfu/g であった。摂食食品量は 25g であることから一人当たり 25~1,000 cfu の摂食であると推測されるが、成人摂食者 431 人中 401 人が発症し高い発症率であった。毒素原性大腸菌の食品からの検出は非常に難しく、今回得られた感染菌量の事例でのデータは貴重である。

カンピロバクターの事例（事例 5）では、焼肉店で提供された牛レバー刺しが原因食品であった。摂食菌量は 360 MPN であり、14 人が摂食し 7 人が発症した。牛レバーのカンピロバクター汚染はカンピロバクター感染牛は胆汁内に比較的高濃度の本菌を保有することが知られており、この牛のレバーは内部も汚染されていることから非加熱で食することによっ

て感染を引き起こす。生で食することによる感染リスクについてさらに情報提供をする必要がある。

本事業は、食中毒発生現場に最も近い地方自治体の協力のもとで実施してきたが、各自治体の積極的な参加ではあったが、実際細菌性食中毒事例として調査できたのは 5 件にすぎなかった。食中毒発生予防のためには、病因物質の解析に限らず病因物質の推定摂取量の把握も重要な要因であり、さらに自治体の協力により本事業を推進していきたく考えている。

#### E. 結論

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌数の測定を全国の地方自治体に依頼したところ 106 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果を得られた事例はサルモネラ 3 件、毒素原性大腸菌 1 件、カンピロバクター 1 件の 5 件であった。

患者一人当たりサルモネラ血清型 Enteritidis においては患者一人当たりについて 288MPN、400 MPN および 2,800,000,000 cfu（最小値）、毒素原性大腸菌においては 25 MPN（最小値）であり、さらにカンピロバクターについては 360 MPN の摂取が推定された。この結果から、ほとんどの事例において発症菌数は一人当たり 100-1,000 MPN であった。

食中毒事例の原因食品中の菌数について、次年度も継続して調査を行い、データを蓄積する必要があると思われる。

## 謝 辞

本事業に関して、該当事例の有無にかかわらず積極的に調査協力を承諾していただいた 106 地方自治体の関係部局各位に深謝致します。

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： Enteritidis)	サルモネラ (血清型： Enteritidis)
発生年月	2005年7月	2005年9月	2005年10月
患者数(人)	19	6	75
摂食者数(人)	84	6	113
原因食品名	炒り豆腐	赤飯(折り詰め弁当)	みたらし団子
原因食品中の菌数	4 MPN/g	14,000,000 cfu/g	蜜 2.3 MPN/g 餅 0.9 MPN/g
原因食品の推定摂取量	約100 g	200 - 500 g	90g (一串)
病因物質の推定摂取量	400 MPN	2,800,000,000- 14,000,000,000 cfu	288 MPN
検査までの検体の保管状況	-20℃以下 239時間	約30℃にて24時間後、 冷蔵庫で70.5時間	-21℃にて216時間

(次項につづく)



表 1. 事例の詳細 (続き)

事例番号	4	5
原因物質	毒素原性大腸菌 (O6:H16, LT, ST 産生性)	カンピロバクター
発生年月	2005 年 8 月	2005 年 6 月
患者数 (人)	401	3
摂食者数 (人)	431	8
原因食品名	白菜キムチ漬	牛レバー刺し
原因食品中の 菌数	1-40 cfu/g	3.6 MPN/g
原因食品の 推定摂取量	25 g	100 g
病因物質の 推定摂取量	25 - 1,000 cfu	360 MPN
検査までの検 体の保管状況	-10°C 2 日間	10°C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 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

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。また、魚介類や海水中の汚染について把握する必要がある。さらに、腸炎ビブリオについても海水中の汚染菌数の把握を行うと共に魚類での汚染部位の解明を行う必要がある。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) 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長  
ー有明海沿岸海水の検索ー
- (3) 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

研究協力者

宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
右田 雄二	長崎県衛生公害研究所	中村まき子	長崎県衛生公害研究所
小沼 博隆	東海大学海洋学部	田久保好慶	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。日本では有明海近県の4県で発生が多く、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。しかし、原因食品や汚染源の解明のために海水や

生物または食品等からの分離は、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り、昨年度に続き、海産物からの検出のための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、有明海の海水について季節を追って

ビブリオ・バルニフィカスの菌数を調査した。さらに、腸炎ビブリオについても海水中の菌数を把握し、魚類における汚染部位をリアルタイム PCR を用いた定量法によって解明した。

## 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

国内の 5 地域の産地の明らかな鮮魚介類（計 60 検体）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。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。増菌は 30°C18 時間および 35°C18 時間とした。その培養液をクロモアガービブリオに 1 白金耳を画線し 35°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。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。*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（ヘモリジン遺伝子）および *toxR* gene の保有を次に示す方法によって確認した。

### 2. 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長

2004 年 9 月から 2006 年 3 月に、有明海に面する長崎県下 7 地点の沿岸海水を

各月 1 回採取した総計 133 検体を材料とした。アルカリペプトン水(APW)を用い、MPN 法（3 本法）にて検体中の菌数を測定した。培養条件は 35°C18 時間とした。培養液をクロモアガー・ビブリオに 1 白金耳量を画線し、35°C18 時間培養した。*V. vulnificus* は水色を、*V. parahaemolyticus* を藤紫色を釣菌し単離した。また、MPN 培養液について、PCR 法にて *V. vulnificus* の *toxR* 遺伝子を検出した。

### 3. 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

東京湾において魚類（計 30 検体）を採取し、滅菌済みの解剖用具を使い部位ごとにわけ、それぞれを PBS の入ったチューブに投入し攪拌した。解剖部位は、鰓、消化管（胃～肛門）の 2ヶ所を選択した。鰓と消化管は  $10^{-3}$  まで 10 倍階段希釈し、クロモアガービブリオ培地に塗抹し、35°C で一晚培養した。培地上の腸炎ビブリオである可能性があると思われる藤色のコロニーを白金線で釣菌し、同定試験を行った。また、PCR にて *V. parahaemolyticus* の *toxR* 遺伝子を確認した。

## C. 結果

### 1. ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

供試した 60 検体のうち、いずれの方法でも検出できなかった 16 検体は除き 44 検体について検出結果を取りまとめた。

増菌培養温度において 30°C と 35°C を比較すると分離培養法での検出結果では、