

59.1%の検体において 35°Cが 30°Cよりも優れており、分離培養法および PCR 法の両方法において 84.1%の検体において、35°Cは 30°C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、30°C増菌では約 93.2%、35°C増菌では約 91.0%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。PCR 法での検出率を 5 地域で比較すると、本研究では関東以南が対象であったが、どの地域でも約半数以上から検出された。特に、東京ほか関東周辺以外の地域では 100 MPN/10g 以上の検体が 25~44%であることが認められた。さらに、熊本では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2%も認められた。以上の傾向は培養法を用いた検出結果においても同様であった。

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

*V. vulnificus* は、133 検体中 48 検体から菌分離され、59 検体が PCR で検出された。*V. parahaemolyticus* は 92 検体から菌分離された。*V. vulnificus* が各月で 5 地点以上検出された採取時期は 2004 年 9~10 月、2005 年 7~10 月で PCR 法も同様であった。

沿岸 4 地点の海水では *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* は水温とともに MPN 値が上昇していることが確認された。A, C, E の 3 地点は夏季に MPN 値の上昇が見られたが、F 地点は通年 MPN 値が低い検出された。

沿岸 7 地点の海水温と *V. vulnificus* の菌数と PCR の MPN 値の相関係数を求め

ると菌数と水温は 0.2054、PCR と水温は 0.3203 であった。

沿岸 7 地点の塩分と *V. vulnificus* の菌数と PCR の MPN 値の相関係数を求めると菌数と塩分は -0.2038、PCR と塩分は -0.3386 であった。

## 3. 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

全検体の体表において腸炎ビブリオは検出されなかった。検体のそれぞれの部位の腸炎ビブリオ検出率は鰓では 6/30 (25%)、消化管では 14/30 (47%)であった。定量ができた検体の腸炎ビブリオ定量値は、鰓では 2.5~4.1 log cfu/g (2.8~5.7 log cfu/尾) であった。消化管では 1.4~4.1 log cfu/g (1.7~4.7 log cfu/尾) であった。

## D. 考察

### 1. ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

昨年に得られた結果をもとにビブリオ・バルニフィカスの定量検査方法について増菌・分離培養および遺伝子検出方法を模索・確認した。前年度の結果と同様に、今年度の検出においても分離培養法よりも PCR 法の方が検出率が高かった。このことから、PCR 法を用いた方が正確に測定が行われることが考えられる。今年度調査した 60 検体のうち特に  $10^6$  を超える菌数を示す検体は、熊本県で認められた。それら検体は 7 月に採取された二枚貝であったが、同時期に採取された他地域の二枚貝においては高い菌数が認められず、ビブリオ・バルニフィカス生息環境の地域的な特徴があった。これは

患者の発生率と魚介類の汚染率に関連が有ることを示している。また一方で、患者の発生が少ない地域においても汚染率は認められるため、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。本研究で確認された培養方法および PCR 法を用いた定量方法は水産物および環境検体等における *V. vulnificus* の正確な菌数の把握や事例における原因となった食品や要因の解明などについても役立つものと思われる。

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

*V. vulnificus* 感染症による患者の発生は有明海沿岸の熊本、福岡、佐賀、長崎の 4 県に集中している。その長崎県の魚介類における汚染状況については昨年度本研究の報告書で報告した。しかしながら、長崎の沿岸海水における調査はこれまでに実施されていない。本調査の結果、沿岸 7 地点の海水では 7 月～10 月の夏季・秋季に 5～6 地点から *V. vulnificus* が分離され、F 地点のみ通年検出される環境であることが確認された。また、PCR では 2 地点以上検出された月は、2004 年の 9～12 月、2005 年 6～11 月であり、菌分離よりも PCR で検出期間が長くなることが確認された。海水温と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 15.5℃を下限とし、PCR で 14℃を下限とし、検出されなかった。塩分と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 28‰を上限とし、PCR で 32‰を上限とし、検出されなかった。また、海水温、塩分と本菌の関係は、海水温で正の相関、塩分で

負の相関が推察された。しかしながら、今回全地点における解析のため、相関係数が低い値であったが、採取地点により、本菌の検出状況が異なることもあり、採取地点毎に相関を考察する必要があるものと思われた。

## 3. 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

魚類における部位別の腸炎ビブリオの定量実験を行った結果、腸炎ビブリオの検出率においては、鰓よりも消化管が高い検出率を示した。腸炎ビブリオ数に関しては、消化管において多く定量でき、消化管よりは少ないが鰓からも定量された。この要因の一つとして、供試した魚の食性が原因だと考えられる。本実験で供試した魚の食性は主にプランクトン食性である。腸炎ビブリオをはじめ海洋細菌は、プランクトンの殻に含まれる物質であるキチンに吸着しやすい性質を有するため腸炎ビブリオが付着したプランクトンを食することによって菌が内臓に多く含まれていると考えた。また、鰓に関しては、海中のプランクトンが鰓に蓄積したために、腸炎ビブリオが多く検出されたのではないかと考えられた。このことから魚類を調理する際には、消化管を含む内臓と鰓を完全に除去すること、また調理後の器具等を放置しないこと等で本菌の増殖を抑制することができると思われる。

## E. 結論

ビブリオ・バルニフィカスの海産物からの検出方法を温度や遺伝子検出を組

み合わせて検討した。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°C 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必須であり、遺伝子検出法の併用によって感度を補える。国内 5 県の海域は検体の約半数以上から検出され、特に、九州地域では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2% も認められ環境に高菌数で生息することが判明した。

海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長では、海水温と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 15.5°C を下限とし、PCR で 14°C を下限とし、検出されなかった。塩分と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 28‰ を上限とし、PCR で 32‰ を上限とし、検出されなかった。また、海水温、塩分と本菌の関係は、海水温で正の相関、塩分で負の相関が推察された。

腸炎ビブリオの魚類における部位別定量については、鰓及び消化管では、腸炎ビブリオが高頻度の高菌数で検出された。魚介類の取扱い時には鰓及び消化管の除去やこれらからの二次汚染防止が重要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

工藤由起子、三輪憲永、山崎省吾、八柳潤、岩出義人、高橋肇、宮坂次郎。  
魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討。感染症学会誌。79: 931-936, 2005.

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. Microbiolog. Method, 61: 77-85, 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. 62: 149-154, 2006.

Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic bird in Japan. Epidemiology and Infection. In press.

Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. J. Vet. Med. Sci. 68: 195-199, 2006.

## 2. 学会発表

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫。三次元微細セル構造磁器質光触媒フィルターによるノリ加工廃水の浄化。日本防菌防黴学会。平成 17 年 5 月。大阪。

田久保好慶、後藤元樹、工藤由起子、小沼博隆。リアルタイム PCR 法を用いた魚介類における腸炎ビブリオの

部位別分布とその定量. 第 141 回日本獣医学会学術集会、平成 18 年 3 月、つくば.

山崎省吾、宮坂次郎、三輪憲永、岩出義人、八柳潤、高橋肇、工藤由起子.  
魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. 日本食品衛生学会第 91 回学術講演会. 平成 17 年 10 月. 埼玉.

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成 17 年度食品衛生監視員等研修会. 平成 17 年 6 月. さいたま市.

高橋肇、小沼博隆、工藤由起子. 生菌数の定量 PCR. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 17 年 11 月. 金沢.

小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子. 香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について. 日本食品衛生学会第 89 回学術講演会. 平成 17 年 5 月. 東京.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

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優れていた。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。国内 5 県の海域についての検体を供試したが、どの地域でも約半数以上から検出された。特に、近畿以南では 100 MPN/10g 以上の検体が 25～44%であることが認められ、九州地域では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2%も認められた。

#### 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	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
小沼 博隆	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 1975 年から 1997 年には 93 人の患者が認められ多くが有明海 4 県で発生した。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（図 1）。原因は汚染食品の摂取が最も多く

その他汚染海水や生物に接触すること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。昨年度に続き、

増菌及び分離方法を含む培養方法を中心に検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体

国内の 5 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 階段希釈液を作製し 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。

### 2. 培養方法

検体 25g に アルカリペプトン水 (APW、日水製薬) 225ml を加え、MPN 法 (3 本法) にて菌数を測定した (図 2)。増菌は①30°C 18 時間および②35°C 18 時間とした。また、MPN 使用後の液も培養した。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°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。

### 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 (図 3)。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。

### 4. *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 (図 3)。

## C. 結果

供試した 60 検体 (表 2) 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、59.1% の検体において 35°C が 30°C よりも優れていた (表 2)。逆に、30°C が 35°C よりも優れていた検体は 15.9% であった。PCR 法での検出結果では、54.5% の検体において 35°C が 30°C よりも優れていた。逆に、30°C が 35°C よりも優れていた検体は 15.9% であった。また、両方法において、35°C と 30°C が同等である検体が約 25 ~ 30% 認められた。総合すると分離培養法および PCR 法の両方法において 84.1% の検体において、35°C は 30°C 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、30°C 増菌培養では 63.6% 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 54% の検体では 5 倍以上の菌数の違いが認められた。(表 3)。逆に、分離培養法が PCR

法より優れていた検体は 6.8%であった。35℃培養では、65.9%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 58.6%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 9.1%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約 25~30%認められた。総合すると 30℃増菌では約 93.2%、35℃増菌では約 91.0%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。

PCR 法での検出率を 5 地域で比較すると、本研究では関東以南が対象であったが、どの地域でも約半数以上から検出された。特に、東京ほか関東周辺以外の地域では 100 MPN/10g 以上の検体が 25~44%であることが認められた。さらに、熊本では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2%も認められた（表 4）。以上の傾向は培養法を用いた検出結果においても同様であった。

#### D. 考察

昨年 to 得られた結果をもとにビブリオ・バルニフィカスの定量検査方法について増菌・分離培養および遺伝子検出方法を模索・確認した。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から、ビブリオ属菌の検出は困難な場合が多い。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。今回の確立した方法によって、従来よりは分離または検出が正確に行えると思われるが、なお一層の改善の必要はあると考える。

前年度の結果と同様に、今年度の検出においても分離培養法よりも PCR 法の方が検出率が高かった。このことから、PCR 法を用いた方が正確に測定が行われることが考えられる。昨年度に開発した定量 PCR はさらに精度についての検討を行う必要があるが、迅速性に優れるため今後応用を進める価値があると考えられる。

今年度調査した 60 検体のうち特に 10<sup>6</sup>を超える菌数を示す検体は、熊本県で認められた。それら検体は 7 月に採取された二枚貝であったが、同時期に採取された他地域の二枚貝においては高い菌数が認められず、ビブリオ・バルニフィカス生息環境の地域的な特徴があった。これは患者の発生率と魚介類の汚染率に関連が有ることを示している。また一方で、患者の発生が少ない地域においても汚染率は認められるため、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。

本研究で確認された培養方法および PCR 法を用いた定量方法を用いて水産物および環境検体等における *V. vulnificus* の正確な菌数の把握を行う必要があると考えられる。また、*V. vulnificus* の感染について、事例における原因となった食品や要因の解明などについても役立つものと思われる。さらに、リスクを軽減するた

めの食品の管理等取り扱い方法を示せることが予想される。

## E. 結論

昨年の結果をもとに、ビブリオ・バルニフィカスの海産物からの検出方法を温度や遺伝子検出を組み合わせで検討した。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必須であると思われた。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。国内 5 県の海域についての検体を供試したが、どの地域でも約半数以上から検出された。特に、近畿以南では 100 MPN/10g 以上の検体が 25~44% であることが認められ、九州地域では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2% も認められた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

工藤由起子、三輪憲永、山崎省吾、八柳潤、岩出義人、高橋肇、宮坂次郎。  
魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討。感染症学会誌。79: 931-936, 2005.

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. Microbiolog. Method, 61: 77-85, 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. 62: 149-154, 2006.

Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic bird in Japan. Epidemiology and Infection. In press.

Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. J. Vet. Med. Sci. 68: 195-199, 2006.

## 2. 学会発表

山崎省吾、宮坂次郎、三輪憲永、岩出義人、八柳潤、高橋肇、工藤由起子。  
魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討。日本食品衛生学会第 91 回学術講演会。平成 17 年 10 月。埼玉。

工藤由起子。腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について。平成 17 年度食品衛生監視員等研修会。平成 17 年 6 月。さいたま市。

高橋肇、小沼博隆、工藤由起子。生菌数の定量 PCR。第 25 回日本食品微生物学会。平成 17 年 11 月。金沢。

瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫。三次元微細セル構造磁器質光触媒フイ



ルターによるノリ加工廃水の浄化.  
日本防菌防黴学会。平成 17 年 5 月。  
大阪。

小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤  
由起子。香草や薬味等に用いる植物  
葉等の抗菌作用について。日本食品  
衛生学会第 89 回学術講演会。平成  
17 年 5 月。東京。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

*V. vulnificus* 感染症の発生地域 (n=93)

古城ら, 日皮会誌, 109, 875-884 (1999)

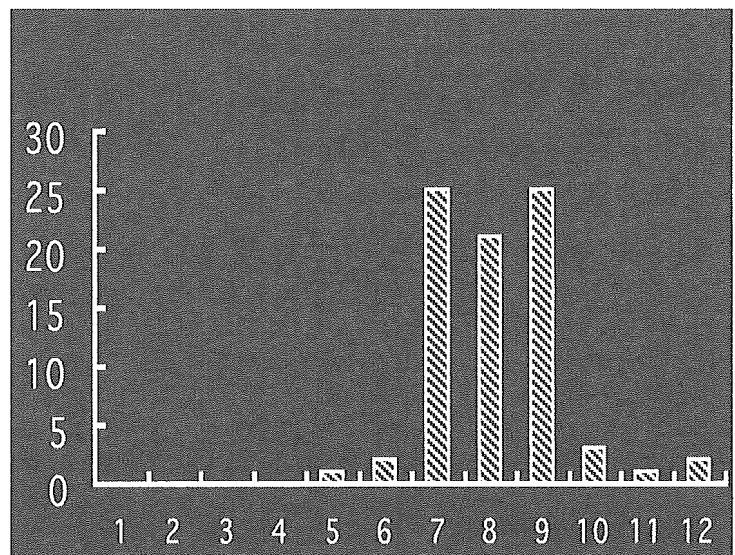
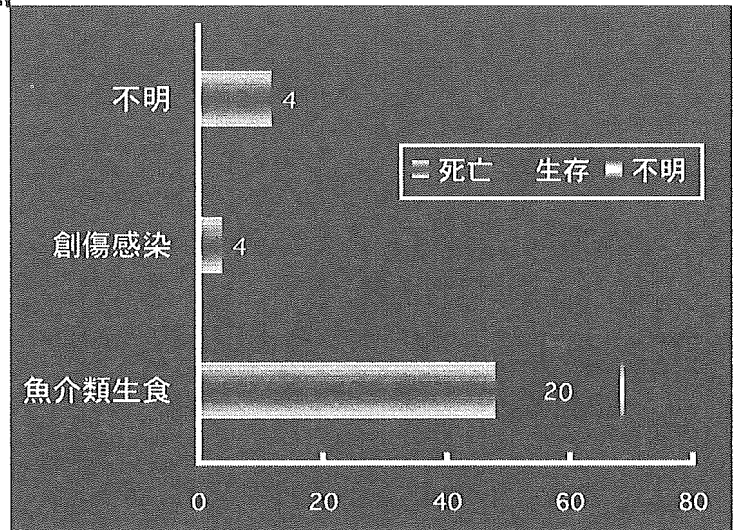
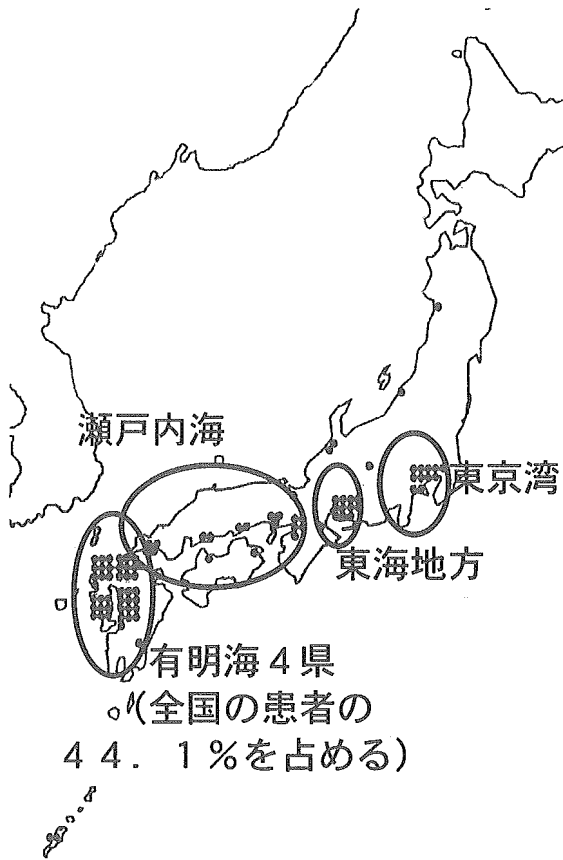


図1 *V. Vulnificus* 感染症の国内での発生地域と感染源 (1975~1997)

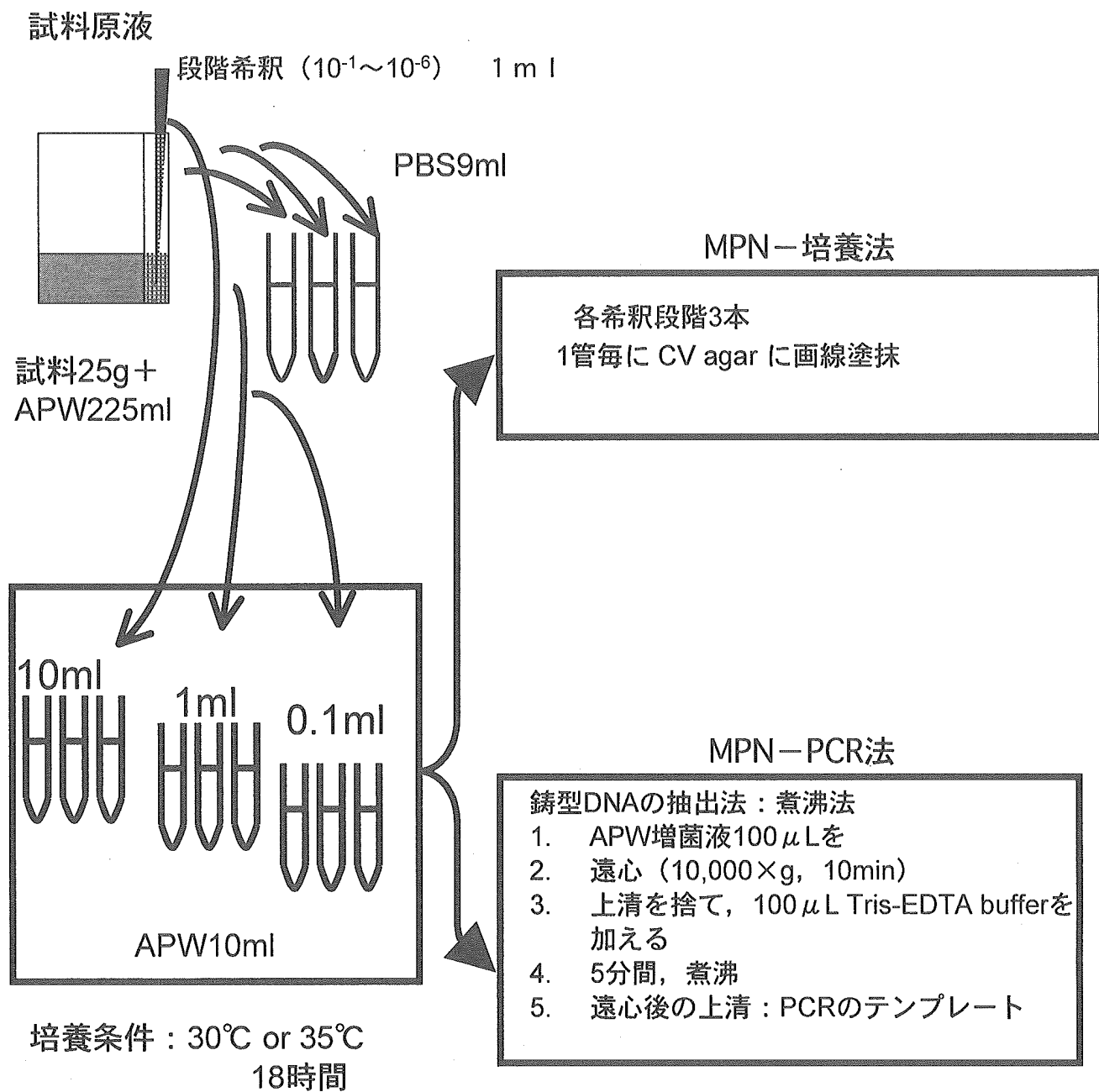
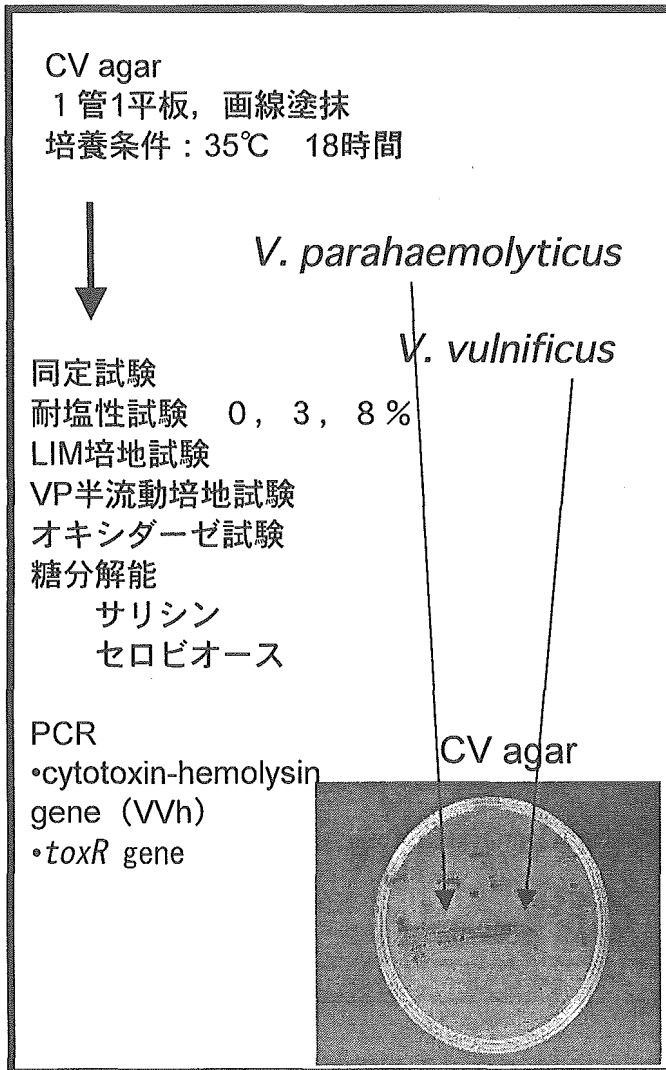


図2 検出方法1 (MPN法)

## MPN-培養法



## MPN-PCR法

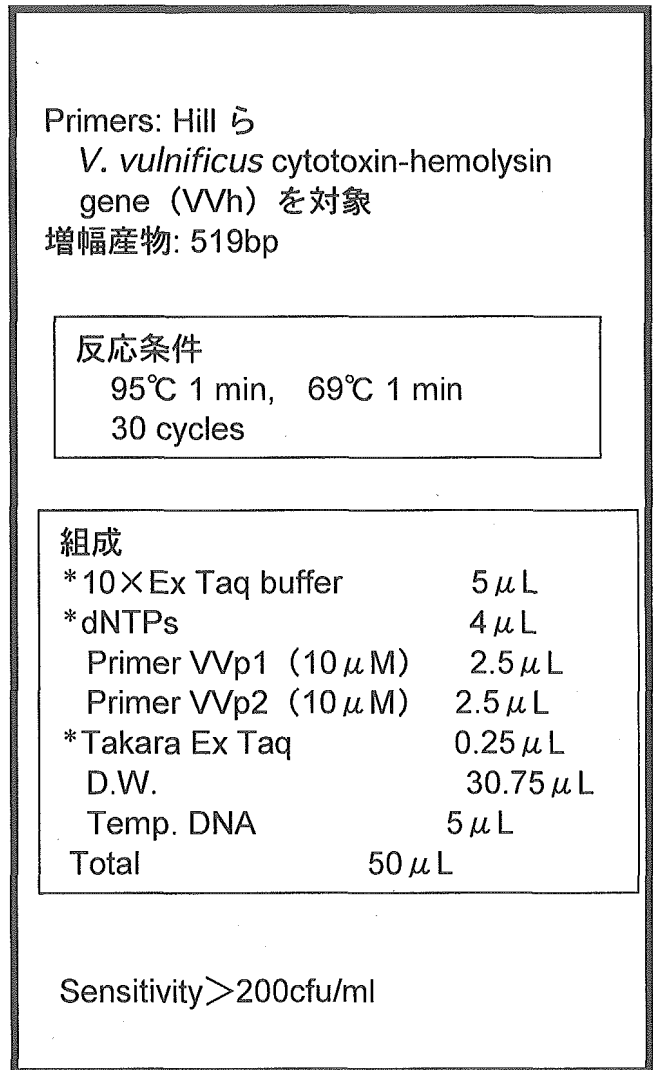


図3 検出方法2 (MPN-培養法およびMPN-PCR法)

表 1. 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)			
			30°C	35°C	30°C	35°C		
東京ほか	1	アサリ	<3	15	9	23	8/1	4.6×10 <sup>3</sup>
関東周辺	2	アサリ	<3	<3	<3	<3	8/1	4.6×10 <sup>3</sup>
	3	アサリ	<3	<3	<3	<3	8/15	9.3×10 <sup>3</sup>
	4	アサリ	<3	15	<3	43	8/15	8.8×10 <sup>5</sup>
	5	アサリ	4	37	37	37	9/13	1.2×10 <sup>4</sup>
	6	アサリ	<3	9	<3	9	9/27	8.6×10 <sup>3</sup>
	7	アサリ	<3	<3	<3	<3	9/27	3.8×10 <sup>3</sup>
	8	アサリ	<3	<3	<3	<3	10/24	3.4×10 <sup>3</sup>
	9	アサリ	3	<3	43	<3	10/24	7.0×10 <sup>3</sup>
	静岡	1	アサリ	<3	<3	<3	<3	8/16
2		アサリ	73	62	930	930	8/16	5.7×10 <sup>5</sup>
3		アサリ	<3	<3	15	4	8/30	3.5×10 <sup>4</sup>
4		アサリ	<3	11	430	430	8/30	2.7×10 <sup>4</sup>
5		アサリ	<3	30	75	75	8/30	1.3×10 <sup>6</sup>
6		アサリ	<3	<3	6.1	3	9/13	5.8×10 <sup>5</sup>
7		アサリ	<3	<3	<3	30	9/13	4.2×10 <sup>4</sup>
8		アサリ	3	6.1	29	36	9/27	4.5×10 <sup>4</sup>
9		アサリ	<3	<3	<3	<3	9/27	2.9×10 <sup>3</sup>
10		アサリ	7.2	110	36	24000	10/4	9.3×10 <sup>4</sup>
11		アサリ	<3	6.2	3	240	10/4	3.9×10 <sup>4</sup>
三重	10	ハマグリ	<3	<3	<3	<3	7/5	4.0×10 <sup>4</sup>
	11	ムール貝	<3	<3	<3	<3	7/5	4.0×10 <sup>3</sup>
	12	アサリ	<3	<3	<3	<3	7/5	3.3×10 <sup>4</sup>
	15	ムール貝	<3	4	9	9	7/12	2.7×10 <sup>3</sup>
	16	アサリ	4	93	4300	4300	7/12	4.8×10 <sup>4</sup>
	18	ムール貝	4	7	<3	6	7/20	4.2×10 <sup>3</sup>
	19	アサリ	2100	120	2300	9300	7/20	3.2×10 <sup>4</sup>
	21	ムール貝	<3	<3	3	4	7/26	1.6×10 <sup>3</sup>
	24	ムール貝	<3	75	<3	150	8/2	1.3×10 <sup>3</sup>
	28	アサリ	11	2300	<3	4	8/9	6.3×10 <sup>5</sup>
	32	アサリ	<3	9	<3	9	8/23	8.5×10 <sup>2</sup>
	33	ムール貝	<3	<3	<3	<3	8/23	3.3×10 <sup>4</sup>
	41	ムール貝	<3	<3	<3	<3	9/13	1.4×10 <sup>5</sup>
	49	ハマグリ	430	4600	4600	4600	10/11	5.2×10 <sup>4</sup>
	50	アサリ	<3	<3	<3	35	10/12	2.0×10 <sup>4</sup>
51	ムール貝	<3	3.6	<3	<3	10/12	9.2×10 <sup>4</sup>	

表 1. つづき

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)			
			30℃	35℃	30℃	35℃		
長崎	F1	アサリ	<3	<3	<3	<3	7/5	1.0 × 10 <sup>3</sup>
	F2	クツゾコ	3	<3	23	23	7/5	1.8 × 10 <sup>4</sup>
	F3	シャコ	360	150	4600	1500	7/20	1.4 × 10 <sup>4</sup>
	F4	赤貝	3	<3	21	23	7/20	2.6 × 10 <sup>4</sup>
	F5	アサリ	9	11	43	93	8/9	6.2 × 10 <sup>4</sup>
	F6	シャコ	<3	15	93	43	8/9	1.8 × 10 <sup>4</sup>
	F7	シャコ	<3	3	11	200	8/23	2.8 × 10 <sup>5</sup>
	F8	キジエビ	<3	3	7	150	8/23	3.9 × 10 <sup>4</sup>
	F9	アサリ	4	3	9	120	9/6	9.4 × 10 <sup>4</sup>
	F10	シャコ	<3	13	<3	460	9/20	9.0 × 10 <sup>3</sup>
	F11	ワタリガニ	<3	<3	3.6	<3	9/21	1.3 × 10 <sup>4</sup>
	F12	アサリ	21	36	93	460	9/21	1.3 × 10 <sup>4</sup>
	F13	シャコ	<3	<3	7.3	7.3	9/21	8.5 × 10 <sup>3</sup>
	F14	アサリ	<3	<3	<3	<3	10/12	1.0 × 10 <sup>4</sup>
	F15	シャコ	<3	<3	23	3.6	10/12	1.5 × 10 <sup>4</sup>
熊本	1	シオマネキ	>1100000	>1100000	>1100000	>1100000	7/20	6.5 × 10 <sup>2</sup>
	2	アサリ	>1100000	>1100000	>1100000	>1100000	7/20	9.5 × 10 <sup>3</sup>
	3	アサリ	3	36	3	36	8/3	1.9 × 10 <sup>5</sup>
	4	セイゴ	46000	46000	46000	46000	9/21	1.2 × 10 <sup>5</sup>
	5	アサリ	2300	9300	2300	9300	9/21	4.2 × 10 <sup>5</sup>
	6	セイゴ	<3	<3	<3	<3	10/18	4.0 × 10 <sup>5</sup>
	7	カキ	9.2	43	<3	7.4	10/18	4.9 × 10 <sup>3</sup>
	8	カキ	<3	<3	<3	<3	11/15	2.3 × 10 <sup>4</sup>
	9	カキ	<3	<3	<3	<3	11/15	6.7 × 10 <sup>5</sup>

表 2. 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	
30℃>35℃	7*	(1)**	7	(3)
35℃>30℃	26	(11)	24	(11)
30℃=35℃	11		13	
計	44		44	

\*差のあった検体数

\*()内は5倍以上の差のあった検体数

表 3. 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	30℃		35℃	
平板培養>PCR	3*	(0)**	4	(2)
PCR>平板培養	28	(15)	29	(17)
平板培養=PCR	13		11	
計	44		44	

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

地域	総検体数*	<i>V. vulnificus</i> 菌数レベル(log MPN/10g of sample)							
		ND	<1	1	2	3	4	5	6
MPN-分離培養法									
東京ほか関東周辺	9	5(55.6)**	1(11.1)	3(33.3)					
静岡	11	5(45.5)	2(18.2)	3(27.3)	1(9.1)				
三重	16	7(43.8)	4(25)	2(12.5)	1(6.3)	2(12.5)			
長崎	15	7(46.7)	3(20)	4(26.7)	1(6.7)				
熊本	9	3(33.3)	0(0)	2(22.2)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)	0(0)	2(22.2)
計	60	27(45)	10(16.7)	14(23.3)	3(5)	3(5)	1(1.7)	0(0)	2(3.3)
MPN-PCR 法									
東京	9	5(55.6)	1(11.1)	3(33.3)					
静岡	11	2(18.2)	2(18.2)	3(27.3)	3(27.3)	0(0)	1(9.1)		
三重	16	6(37.5)	5(31.3)	1(6.3)	1(6.3)	3(18.8)			
長崎	15	3(20)	2(13.3)	4(26.7)	5(33.3)	1(6.7)			
熊本	9	3(33.3)	1(11.1)	1(11.1)	0(0)	1(11.1)	1(11.1)	0(0)	2(22.2)
計	60	19(31.7)	11(18.3)	12(20)	9(15)	5(8.3)	2(3.3)	0(0)	2(3.3)

\* 魚介類の種類

東京: アサリ(9)

静岡: アサリ(11)

三重: ハマグリ(2), ムール貝(8), アサリ(6)

長崎: アサリ(5), クツゾコ(1), シャコ(6), 赤貝(1), キジエビ(1), ワタリガニ(1)

熊本: シオマネキ(1), アサリ(3), セイゴ(2), カキ(3)

\*\* 検体数 (%)



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

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

—有明海沿岸海水の検索—

研究要旨

*Vibrio vulnificus* 感染症による患者は、熊本県などの有明海沿岸に集中して発生し、その分布・季節消長に関する調査は近年各県で報告されている。しかしながら、有明海沿岸に面する長崎県下での分布・季節消長に関する調査は実施しておらず、今回長崎県下の生息状況を把握することを目的とし実施した。調査は 2004 年 9 月から 2006 年 3 月までの 1 年 7 ヶ月に渡り、長崎県島原半島中心の 7 地点の沿岸海水から *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の検出状況を MPN 値で比較した。また、*V. vulnificus* は、菌分離と PCR を併用して実施し、MPN 値と海水塩分・水温との関係を比較した。

その結果、*V. vulnificus* は 7 月～10 月に 5 地点以上から菌分離され、PCR では 6～11 月に 2 地点以上から検出され、1 地点のみ周年検出されることが判明した。*V. parahaemolyticus* は、5 月～10 月に全 7 地点から菌分離され、4 月～12 月に 4 地点以上から菌分離され、1 地点のみ周年分離されることが判明した。また、海水温と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 15.5℃が下限、PCR で 14℃が下限であった。塩分と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 28‰が上限、PCR で 32‰が上限であった。

研究協力者

山崎省吾，中村まき子，右田雄二  
（長崎県衛生公害研究所）

同属で主要な生化学性状も似た海洋細菌である。*V. vulnificus* による感染症は有明海を中心とした地域に患者が多く報告されており、古城らの 1978 年以來の全国 93 例の集計でも有明海沿岸 4 県（熊本、福岡、佐賀、長崎）で 41 例、その内長崎県では 9 例の患者発生が報告されている。

A. 目的

*Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) は *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) と

以上のように長崎県は全国的に見ても患者の発生リスクが高い地域であるとい

えるが、過去に本県の沿岸海水を調査した報告は無い。そこで本研究では県下における *V. vulnificus* の汚染状況を把握する為、有明海に面する島原半島を中心とした *V. vulnificus* の分布状況とその季節性を把握することを目的とし調査した。また、*V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の検出状況を比較し、更に海水塩分、海水温等の環境要因との相関関係を比較した。

## B. 材料および方法

### 1 材料

2004年9月から2006年3月に渡り、有明海に面する島原半島を中心とした長崎県下7地点(図1)の沿岸海水を毎月1回採取した総計133検体を材料とした。

検体は、沿岸部の表層の海水とした。

### 2 検査方法

塩分および水温は、検体採取時に測定し、塩分は海水濃度屈折計サリニティS/Mill-E(アタゴ)を用いた。

培養法：採取した検体を採取日当日中に検査室に搬入し、検査を開始した。検体は、アルカリペプトン水(APW)を用い、MPN法(3本法)にて菌数を測定した。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、次に示すPCR法にて*V. vulnificus* の遺伝子を検出した。PCR法：ヘモリシン遺伝子(*vh*)の検出はHillらの方法に従い検出を行った。

## C. 結果

沿岸7地点の海水からの *V. vulnificus* の菌分離とPCR、*V. parahaemolyticus* の菌分離状況を表1に示した。*V. vulnificus* は、133検体中48検体から菌分離され、59検体がPCRで検出された。*V. parahaemolyticus* は92検体から菌分離された。*V. vulnificus* が各月で5地点以上検出された採取時期は2004年9~10月、2005年7~10月でPCR法も同様であった。

沿岸4地点の海水からの *V. vulnificus* の菌分離とPCRのMPN値と海水温の月別推移を図2、3に示した。また、*V. parahaemolyticus* の菌分離によるMPN値と海水温の月別推移を図4に示した。*V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* は水温とともにMPN値が上昇していることが確認された。A、C、Eの3地点は夏季にMPN値の上昇が見られたが、F地点は通年MPN値が低いと検出された。

沿岸7地点の海水温と *V. vulnificus* の菌数とPCRのMPN値の相関を図5、図6に各々示した。相関係数を求めると菌数と水温は0.2054、PCRと水温は0.3203であった。

沿岸7地点の塩分と *V. vulnificus* の菌数とPCRのMPN値の相関を図7、図8に各々示した。相関係数を求めると菌数と塩分は-0.2038、PCRと塩分は-0.3386であった。

沿岸7地点の海水における *V. vulnificus* の菌分離とPCRのMPN値の相関を図9および表2に示した。菌分離では48検体、PCRでは59検体から *V. vulnificus* が検出された。MPN値を比較すると菌分

離の方が PCR より MPN 値が高かった検体数が 4 検体, 一方, PCR の方が菌分離より MPN 値が高かった検体数が 50 検体であった。菌分離と PCR の MPN 値が同等であった検体数が 5 検体であった。PCR で検出された 59 検体の内 48 検体から菌分離され, PCR で検出されなかった検体から菌分離された検体は無かった。

#### D. 考察

*V. vulnificus* 感染症による患者の発生は有明海沿岸の熊本, 福岡, 佐賀, 長崎の 4 県に集中している。その長崎県の魚介類における汚染状況については昨年度本研究の報告書で報告した。しかしながら, 長崎の沿岸海水における調査は実施していない。また, 昨年度の本研究班の報告では, APW, クロモアガー・ビブリオおよび PCR を組み合わせた検査法を魚介類で検討し, 現時点での優れた検出法として報告してきた。

以上を踏まえ, 本調査は, 魚介類で検討した APW, クロモアガー・ビブリオおよび PCR 法の組み合わせを応用し, 長崎県の沿岸海水の調査を行うこととした。また, 併せて菌分離と PCR による MPN 値の関係を考察させた。

沿岸 7 地点の海水では 7 月~10 月の夏季・秋季に 5~6 地点から *V. vulnificus* が分離され, F 地点のみ通年検出される環境であることが確認された。また, PCR では 2 地点以上検出された月は, 2004 年の 9~12 月, 2005 年 6~11 月であり, 菌分離よりも PCR で検出期間が長くなることが確認された。

海水温と *V. vulnificus* の関係は, 菌分離

で 15.5°C を下限とし, PCR で 14°C を下限とし, 検出されなかった。塩分と *V. vulnificus* の関係は, 菌分離で 28‰ を上限とし, PCR で 32‰ を上限とし, 検出されなかった。また, 海水温, 塩分と本菌の関係は, 海水温で正の相関, 塩分で負の相関が推察された。しかしながら, 今回全地点における解析のため, 相関係数が低い値であったが, 採取地点により, 本菌の検出状況が異なることもあり, 採取地点毎に相関を考察する必要があるものと思われた。

菌分離と PCR による MPN 値での比較は, PCR の方が菌分離より MPN 値が高い傾向があることが判明した。これらは, 本研究班の前年度報告の魚介類における検討でも同様であったが, 死菌や競合する海洋細菌の影響により多くの検体で PCR の MPN 値が高く, 菌分離が低い結果となったものと推察された。

#### E. 参考文献

- 古城八寿子ら: *Vibrio vulnificus* 感染症—診断と治療のフローチャートの試み—, 日皮会誌: 109(6), 875—884, 1999.
- Walte r B. Hill *et al*: Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 707-711, 1991.
- 高鳥浩介: 厚生労働科学研究費補助金, 食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」平成 16 年度総括・分担研究報告書, p109—123 平成 17 年 3 月.

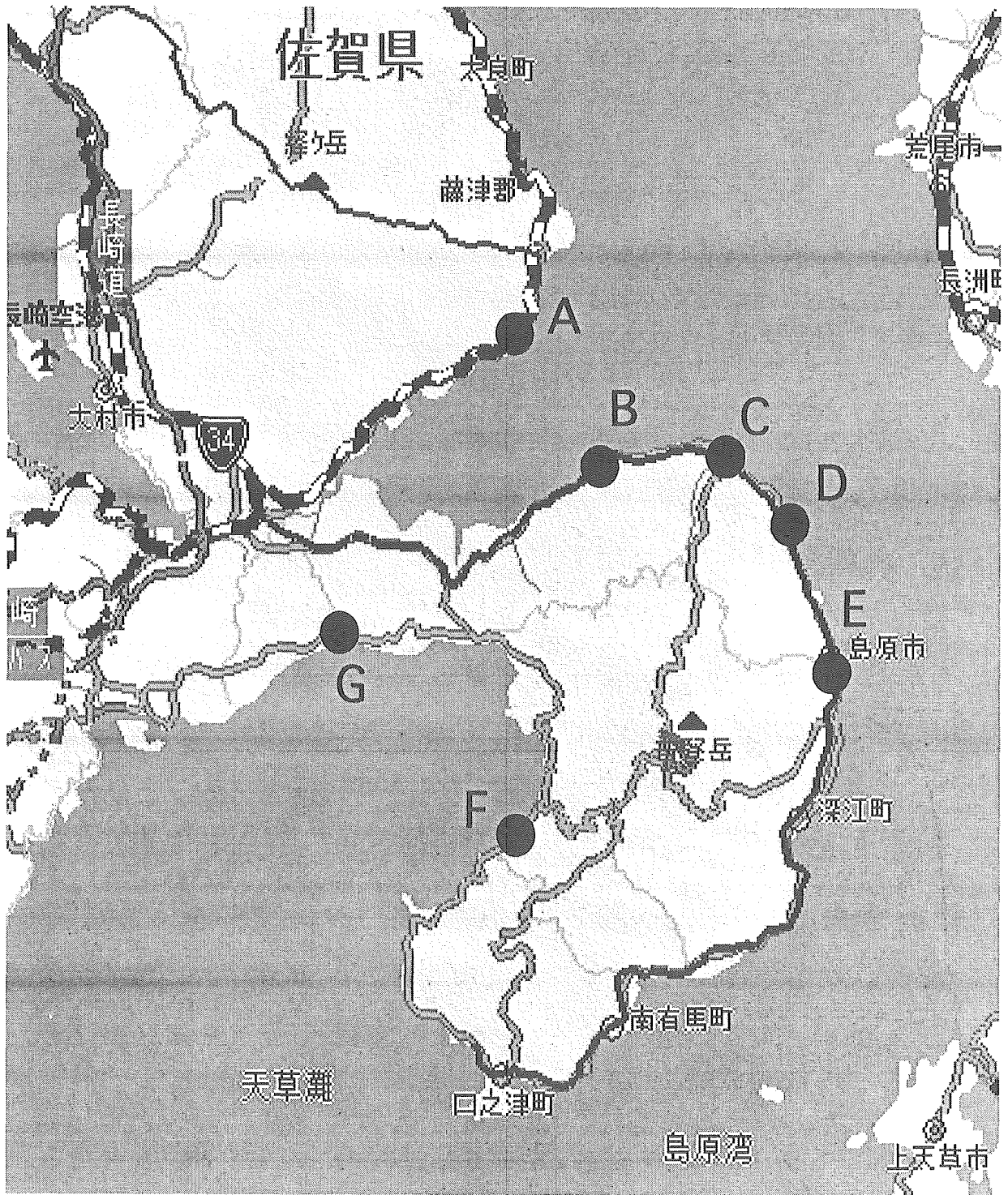


図1 本調査の検体採取7地点