

レスに関し実験室内モデル実験も含め研究が進められ、各種環境因子と菌の生態との関係が明らかにされることが期待される。また、*V. vulnificus*が増殖した夏場の海水との接触やそれらの海水の汚染を受けた魚介類を生食することにより、夏場に本感染症が多発しているものと思われる。そのため本菌を増殖させないために採取された魚介類は迅速に冷蔵保管及び冷蔵流通させる等の管理が必要である。基礎疾患を抱える人は、本菌が検出される時期にはなるべく魚介類の生食を避け、充分加熱して食べる等の予防策が必要である。保健所による魚介類販売業及び飲食店営業における生食用魚介類取り扱い施設の監視指導と衛生教育の機会を通して *V. vulnificus* に関する知識の伝達や注意の喚起も望まれる。今後、年間を通じた魚介類や海水における本菌の詳細な汚染状況の把握、分離菌株の病原性についての検討をしていく予定である。

2. *V. vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

今回は、*V. vulnificus* 感染症の原因となったと思われる食材が入手できたまれなケースであり、臨床由来株との比較を行った。残された「アナジャコ醤油漬け」からは高い菌数の *V. vulnificus* が分離された。調味料部の塩分濃度は17%であり、生存が難しいと考えられるにもかかわらず、高い生菌数を示したことは、調理を行った初期の菌数が非常に高かったと考えられる。*V. vulnificus* は冷蔵保存には弱く、高い菌数が僅かな時間で分離不能となる。しかし、発症原因食材を検査し

始めたのは調理した5日後であり、35日後に再度検査したが、まだ *V. vulnificus* の分離は可能であった (3 MPN /10g)。これは、食材中のなんらかの条件が菌の生存にかかわっていることが示唆された。また、高塩分、低温条件では *V. parahaemolyticus* は *V. vulnificus* に比べて高い抵抗性を示したことから、類似食品には注意を要することが示唆された。

3. 蓄養前後におけるアサリのビブリオ属細菌数の変化

今回の試験では、新鮮な貝類では畜養により細菌数を減少する可能性があるものの、逆に弱った貝類では細菌数が増加する危険性があるものと思われた。今回の試験では、アサリの量に比べ圧倒的に多量の人工海水を使用し、紫外線により殺菌しながら海水を循環していることから、実際の畜養条件と異なる点もあるものの、一度アサリから排出された細菌による再汚染の可能性は低く、アサリ体内から効果的に除菌する条件を検索するには有効な方法と考える。

E. 結論

V. vulnificus の検査法の検討では、APWでの35℃増菌の場合、分離法は *V. parahaemolyticus* には適しているが、*V. vulnificus* には不十分であると思われた。また、*V. vulnificus* が培養法で検出されなかったのは、*V. parahaemolyticus* やその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、*V. vulnificus* の効果的な選

増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると思われる。現時点では、リアルタイム PCR 法などの遺伝子検出法を取り入れることによって正確に菌数を把握できると考えられた。また、*V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の増菌時間は従来の 18 時間培養では長すぎる事が判明し、増菌培養時間の短縮が必要であることがわかった。また、*V. vulnificus* と水温、塩分濃度、降雨量との関係を詳細に把握できたが、菌数は様々な条件が重なって増減していることが推測された。また、*V. vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討では、「アナジャコ醤油漬け」の汚染再現による菌の挙動が明らかになり、塩分が高いにもかかわらず菌が生残することが判明した。原因食として頻度が高い当該食品を中心に注意喚起が必要と考えられる。さらに、新鮮な貝類では畜養により細菌数を減少する可能性があり、一度アサリから排出された細菌による再汚染の可能性は低く、アサリ体内から効果的に除菌する条件を検索するには有効な方法と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *Epidemiol. Infect.* 134: 780-785, 2006.

Yoneyama, N., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Effects of heat-degraded sugars on survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus* and other bacteria. *J. Food Prot.* 70: 373-377, 2007.

Kamio, A., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Yahiro, T. and Konuma, H. Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in seawater. 投稿中.

2. 学会発表

神尾暁、八尋俊輔、宮坂次郎、瀬川優子、工藤由起子、小沼博隆. 環境海水中の *Vibrio vulnificus* の分離における増菌及び分離培養法の問題点について. 腸炎ビブリオシンポジウム. 平成 18 年 11 月. 東京.

宮坂次郎、八尋俊輔、中島龍一、工藤由起子. 水鳥糞便中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の検索. 日本獣医公衆衛生学会 (九州), 平成 18 年 10 月, 熊本.

山崎省吾, 中村まき子, 右田雄二, 原健志, 工藤由起子, 三澤尚明, 岡本嘉六, 高瀬公三: 海水における *Vibrio vulnificus* の季節消長と環境因子, 日本獣医公衆衛生学会 (九州), 平成 18 年 10 月, 熊本.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食の安心・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

環境海水中の *Vibrio vulnificus* の分離における増菌及び分離培養法の問題点について

研究要旨

V. vulnificus は海水中に生息するため、海水での *V. vulnificus* の分布を検討した *V. vulnificus* の分離が困難な場合が認められた。その理由を調べるためにリアルタイム PCR 法を利用し菌数を定量し、増菌及び分離培養法の問題点について検討した。

本研究では *V. vulnificus* は、7 月の検体では培養法で検出されたが、8 月以降の検体ではリアルタイム PCR 法では検出されたにもかかわらず、培養法ではほとんど検出されなかった。このリアルタイム PCR 法で得られた *V. vulnificus* の菌数は *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* 以外のその他の菌の菌数の約 1/100 であった。また、*V. parahaemolyticus* は、*V. vulnificus* とは異なり、いずれの検体も培養法で測定でき、多くの検体でリアルタイム PCR 法と近い定量値であった。さらに、増菌前の検体でのその他の菌は、7 月の検体よりも 8 月以降の検体で 10~100 倍高い菌数であった。

以上の結果から、この増菌及び分離方法は *V. parahaemolyticus* には適しているが、*V. vulnificus* には不十分であると思われた。また、*V. vulnificus* が培養法で検出されなかったのは、*V. parahaemolyticus* やその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、*V. vulnificus* の効果的な選択増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると思われる。現時点では、リアルタイム PCR 法などの遺伝子検出法を取り入れることによって正確に菌数を把握できると考えられた。

研究協力者

小沼 博隆 東海大学海洋学部

神尾 暁 東海大学海洋学部

宮坂 次郎 熊本県保健環境科学研究所

八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所

瀬川 優子 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

海洋細菌である *V. vulnificus* は海産物や海水に広く分布し感染症を引き起こす原因菌として知られており、本菌の調査研究は、人の健康を保つために重要なことである。しかし、海洋環境、海洋生物や食品等からの *V. vulnificus* の検出は、競合する他の菌の海洋細菌によって阻害され困難な場合が多く、現在のところ十分な検出方法はない。このため、本研究では、*V. vulnificus* の効果的な検出方法を研究した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

国立医薬品食品衛生研究所の所有するアサリ由来 *V. vulnificus* (VV16)、ボイルホタテ由来 *V. parahaemolyticus* (VP15) を用いた。

2. 供試検体

2006年7月から9月に、熊本県宇城市松合漁港及び静岡県静岡市清水港及び巴川下流において海水を採水し、滅菌ボトルにいれ室温で研究所へ輸送した。検体は7月に1検体、8月に3検体、9月に4検体の計8検体であった(表1)。

3. 検体の培養

あらかじめ 35℃ に温めておいた Alkaline Peptone Water (APW : Nissui Pharmaceutical Co., 日本) 90 ml に海水検体 10 ml を加え、0-24 時間 35℃ にて培養を行った。菌数測定は培養開始 0、2、4、6、8、10、14、18 及び 24 時間目に行った。測定には各培養液 0.1 ml を 2% 食塩加 PBS (Dulbecco's PBS (-) : Nissui Pharmaceutical Co., 日本) にて 10 倍階段

希釈を行った。この各希釈液 0.1 ml を CHROMagar™ Vibrio (CHROMagar Vibrio : CHROMagar, フランス) 培地に塗抹し 35℃ で 22 時間培養を行った。また、各時間における培養液 0.1 ml をアルカリ熱抽出法を行い、リアルタイム PCR に供試した。

4. *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の培養法での定量

検体の培養液中の菌数測定にはまず、培養液を 2% 食塩加 PBS 0.9 ml にて 10⁻⁸ まで 10 倍階段希釈を行った。原液及び各希釈液 0.1 ml を CHROMagar Vibrio 培地に塗抹し、35℃ にて 22 時間培養した。CHROMagar Vibrio 培地上に生育したコロニーを青色、藤色及びその他の 3 つに区分した。青色及び藤色のコロニーをそれぞれ *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* と疑い、以下の糖分解性試験、硫化水素生産性試験、塩分濃度耐性試験及び *toxR* 遺伝子^{1、2)} を標的にした PCR 法を行い、菌種を確定した。その結果から *V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* 及びその他の菌と分類して各菌の菌数を確定した。試験には糖分解性試験及び硫化水素生産性試験に TSI 半斜面培地、また、塩分濃度耐性試験に NaCl 添加 NB 培地を使用した。培地上の疑わしいコロニーを一白金線釣菌し、NB 培地に浸した後、TSI 培地に画線及び突刺し、それぞれ一晩培養した。また、各コロニーを PCR に供試した。3% アガロース (Nu Sieve 3 : 1 agarose : Cambrex Bio Science Rockland) にて電気泳動し産物の確認を行った。DNA の泳動バンドを検出するために、ゲルをエチジウムブロマイドにて染色を行

った。

5. *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の real-time PCR 法での定量

検体の各時間での培養液 0.1 ml をアルカリ熱抽出法によって DNA を抽出し、下記のマスターミックス 45 µl に Template DNA を 5 µl 加え、計 50 µl とした。これを ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて 95°C で 15 秒及び 60°C で 1 分の工程を 40 サイクル指定し、リアルタイム PCR 法^{3, 4)}を行った。得られた Ct 値を作成した検量線に当てはめて菌数を算出した。なお、検量線の作成のため菌株を APW にて 35°C で 8 時間前培養を行い培養液を APW にて 10⁻⁷ まで 10 倍階段希釈した。培養液中の菌数を知るために、2% 食塩加 Tryptone Soya Agar (TSA: OXOID、イギリス) 培地に希釈液から 0.1 ml ずつ塗抹し、35°C で 18 時間培養後に菌数を測定した。各希釈液から、アルカリ熱抽出法を用い DNA を抽出した。アルカリ熱抽出法は、まず、希釈液 0.1 ml を 10,000 × g で 10 分間遠心し、上清を除去した。そこに、50 mM NaOH を 0.1 ml を添加し、攪拌した。100°C で 10 分間加熱した。その後、1 M Tris-HCl pH7.0 を 16 µl 加え中和し、10,000 × g で 10 分間遠心した。上清を Template DNA とした。得られた DNA をリアルタイム PCR に供試し、Ct 値から検量線を作成した。

C. 結果

1. 海水検体からの培養法での *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の検出

本研究での培養法での検出限界値は 10

cfu/ml であった。*V. vulnificus* は、7 月 28 日の検体では 4 時間目から検出され、24 時間目で検出されなかった (図 1 a)。しかし 8 月以降の検体では殆ど検出されなかった (図 1 b)。また、*V. parahaemolyticus* は、全ての検体から検出された。

2. *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の定量のためのリアルタイム PCR 法における検量線の作成

接種実験の結果、*V. vulnificus* では定量可能な範囲は Ct 値で 22.07~38.13 であった。*V. parahaemolyticus* では定量可能な範囲は Ct 値で 19.98~37.69 であった。検量線は *V. vulnificus* で $y = -0.3117x + 14.891$ であり、*V. parahaemolyticus* で $y = -0.2867x + 13.726$ であった。

3. 海水検体からのリアルタイム PCR 法での *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の検出

本研究でのリアルタイム PCR 法での検出限界値は 200 cfu/ml であった。全ての検体で *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* が検出された。*V. vulnificus* は、培養法で *V. vulnificus* が検出された 7 月 28 日の検体では、4 時間目から検出され 24 時間目まで検出された (図 1 a)。*V. vulnificus* が培養法で殆ど検出されなかった 8 月以降の検体については、4 時間目から検出され、24 時間目まで徐々に増殖した (図 1 b)。7 月 28 日の検体と 8 月以降の検体を比較してみると、8 月以降の検体のほうが増殖性が弱かった。*V. parahaemolyticus* は、2 時間目から検出され、24 時間目まで検出された (図 1 c)。培養法での検出値と同様の値を示した。

4. *V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus*

及びその他の菌の菌数の比較

リアルタイム PCR 法で測定した *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の菌数、及び培養法で測定したその他の菌の菌数について、培養法で *V. vulnificus* が検出された7月28日の検体を検出されなかった8月以降の検体と比較した。*V. vulnificus* では、*V. vulnificus* が培養法で検出された7月28日の検体では、急速な増殖をし8時間目で7.2 log cfu/ml になり、その後の菌数は一定であった(図2a)。しかし、検出されなかった8月以降の検体では14時間目の6.2 log cfu/ml まで徐々に増殖し、その後の菌数は一定であった。両者の差が広がり始めたのは6時間目からであった。*V. parahaemolyticus* では、7月28日の検体及び8月以降の検体で急速な増殖をみせ、14時間目でそれぞれ7.3 log cfu/ml 及び7.0 log cfu/ml まで増殖し、その後の菌数は一定した(図2b)。両者で同様の増殖性が見られた。その他の菌では、7月28日の検体と8月以降の検体の2者間の初期菌数がそれぞれ2.1 log cfu/ml 及び3.7 log cfu/ml と違いがあったが、十分に増殖し、8時間目にはそれぞれ6.8 log cfu/ml 及び7.2 log cfu/ml となりその後は同様の増殖性が見られた(図2c)。これら3つの菌群の海水検体の培養液中の菌数の違いは、培養6時間目までが重要であると考えられた。

D. 考察

V. vulnificus 感染者が発生する海域では、*V. vulnificus* 感染者がみられない海域と比較して、6月から10月にかけて非常に多くの *V. vulnificus* が生息していることが報告されており、そこで、*V. vulnificus* 感染者

が多い熊本県の7~9月の海水を検体とし、海水検体からの *V. vulnificus* の培養時間を追って分離を試みた。その結果、7月の検体では培養法で検出することができたが、8月に入ると、検出することが殆どできなかった。そこで、培養法と同時に行ったりリアルタイム PCR 法も用いて原因を考えることにした。

結果の4から培養6時間目までが *V. vulnificus* の増殖性に重要であることが考えられた。そこで6時間目までの結果をさらに詳しく検討し、*V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* 及びその他の菌の増殖を比較した(図2d)。培養法で *V. vulnificus* が検出された7月28日の検体では、*V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* 及びその他の菌の菌数の差は殆ど見られなかった。しかし、培養法で *V. vulnificus* が検出されなかった8月以降の検体では、*V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の菌数の差が大きかった。この原因を調べるために4時間目に着目し7月28日の検体と8月以降の検体を比較したところ、*V. vulnificus* は、近い菌数であった。*V. parahaemolyticus* は、8月以降の検体での菌数が7月28日の菌数よりも10倍以上高く、8月以降の検体で *V. parahaemolyticus* の増殖性が高かったことがわかった。また、その他の菌では、8月以降の検体の初期菌数が7月28日の検体よりも高かった。これらのことより、*V. vulnificus* が培養法で検出されなかった理由としては、培養開始4時間目までの *V. parahaemolyticus* の増殖性が高いこと、及びその他の菌の菌数が高いことによって、4時間以後の *V. vulnificus* の増殖が抑制されたことが考え

られた。

V. vulnificus が検出されなかった 8 月以降の検体では、*V. vulnificus* は殆ど検出されなかった。リアルタイム PCR 法での定量値を見ると、*V. vulnificus* の菌数が低かったことがわかった。このことから、APW 中の *V. vulnificus* の増殖が *V. parahaemolyticus* よりも遅く、十分な増殖ができなかったことが考えられた。そこで菌株での APW 中の増殖性を調べると、*V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* は両菌種とも同様の増殖を示し十分に増殖し、両菌とも 8 時間目までにそれぞれ 10^8 cfu/ml 近くまで増殖した。このことより、*V. vulnificus* の増殖は *V. parahaemolyticus* より遅いことはないことがわかった。そこで、*V. vulnificus* が増殖できなかった理由として、APW 中での *V. parahaemolyticus* 及びその他の菌が影響していると考えた。多くの検査室で、ビブリオ属菌の増菌には比較的選択性の弱い増菌培地の使用が好まれ、APW は *V. vulnificus* をはじめとする病原性ビブリオの増菌培地としてよく使用されている。しかしこのため、*V. vulnificus* 以外の菌も増殖する。また、その他の菌の増殖が早いことから、*V. vulnificus* が増殖する前に、急激にその他の菌が増え、*V. vulnificus* の増殖が抑制されたと考えられた。

本研究で供試した APW の塩分濃度は 1% であった。*V. vulnificus* をはじめとする多くのビブリオ属菌は至適塩分濃度が 2~3% であることから、この塩分濃度の差が多少の影響を与えていたとも考えられた。そこで、今後 APW の塩分濃度を高めて、その他の菌の影響を受けにくく、また分離

しやすくする検討が必要であると考えられた。また、現在あるデンプン-ゼラチン-ポリミキシンプイオンは環境調査で有効であることが見つけられたが、極めて優良とされる選択増菌培地は知られていない。*V. vulnificus* が増菌培地中で十分に増殖するためには、*V. parahaemolyticus* 及びその他の菌の増殖が抑制されることが必要である。今後さらに、*V. vulnificus* のより効果的な増菌培地の開発が急務であると考えられた。

V. vulnificus の分離培地として TCBS 寒天培地が多く使用されている。*V. parahaemolyticus* は、白糖非分解性で培地上で緑色のコロニーを形成する。しかし、多くの *V. vulnificus* も白糖非分解性なので、*V. parahaemolyticus* と同様に緑色のコロニーを形成する。このため TCBS 上で *V. vulnificus* を分離するのは困難なため、更なる試験が必要となる。また、数種類の選択性の強い培地の使用が報告されているが、それらは選択性が強すぎる傾向があり、増菌培地と同様に極めて優良とされる分離平板培地は知られていない。また近年では、CHROMagar Vibrio 培地が *V. parahaemolyticus* の分離培地として開発された。CHROMagar Vibrio 培地では *V. vulnificus* も発色の違いから分離が可能である。培地上で *V. parahaemolyticus* は藤色に発色し、*V. vulnificus* は青色に発色する。そのため、本研究では CHROMagar Vibrio 培地を使用した。しかし、結果を見ると、殆どの検体で *V. vulnificus* の検出が困難であった。CHROMagar Vibrio 培地は *V. parahaemolyticus* の選択分離培地なので、*V. vulnificus* は抑制された可能性が考

えられた。NB 培地での *V. parahaemolyticus* の発育は3、8%食塩に陽性に対して、*V. vulnificus* は3%のみに陽性であった。*V. vulnificus* は低濃度好塩性の細菌なので、CHROMagar Vibrio 培地に含まれる塩分濃度は約5%と高く、発育を抑制されたと考えられた。また、8月以降の検体では *V. parahaemolyticus* 及びその他の菌の菌数が高かったために、CHROMagar Vibrio 培地上で、*V. vulnificus* が生育する前に *V. parahaemolyticus* 及びその他の菌が生育してしまい、コロニーが分離できなかったと考えられた。平板培地上で *V. vulnificus* を選択分離するには、その他の菌及び *V. parahaemolyticus* の生育も抑制できる分離培地の開発が必要であると考えた。

以上のことから、本研究の培養方法は *V. parahaemolyticus* には適しているが、*V. vulnificus* には不十分であることが示された。*V. parahaemolyticus* はその他の菌がどんなに多くても、増菌培地中で十分に増殖することができた。しかし、*V. vulnificus* は、増菌培地中で十分に増殖ができず、また *V. vulnificus* の選択分離培地がないことが明らかになった。よって今後、*V. vulnificus* に効果的な選択増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

V. vulnificus は海水中に生息するため、海水での *V. vulnificus* の分布を検討したが、*V. vulnificus* の分離が困難な場合が認められた。その理由を調べるためにリアルタイム PCR 法を利用し菌数を定量し、増菌及び

分離培養法の問題点について検討した。

本研究では *V. vulnificus* は、7月の検体では培養法で検出されたが、8月以降の検体ではリアルタイム PCR 法では検出されたにもかかわらず、培養法ではほとんど検出されなかった。このリアルタイム PCR 法で得られた *V. vulnificus* の菌数は *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* 以外のその他の菌の菌数の約 1/100 であった。また、*V. parahaemolyticus* は、*V. vulnificus* とは異なり、いずれの検体も培養法で測定でき、多くの検体でリアルタイム PCR 法と近い定量値であった。さらに、増菌前の検体でのその他の菌は、7月の検体よりも8月以降の検体で 10~100 倍高い菌数であった。

以上の結果から、この増菌及び分離方法は *V. parahaemolyticus* には適しているが、*V. vulnificus* には不十分であると思われた。また、*V. vulnificus* が培養法で検出されなかったのは、*V. parahaemolyticus* やその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中の増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、*V. vulnificus* の効果的な選択増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると思われる。現時点では、リアルタイム PCR 法などの遺伝子検出法を取り入れることによって正確に菌数を把握できると考えられた。

F. 参考文献

- 1) Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, J. Garg, T. Rammamurthy, H. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, J. Albel, and M. Nishibuchi. (2000): Pandemic Spread

of an O3 : K6 Clone of *Vibrio parahaemolyticus* and Emergence of related Strains Evidence by Arbitrarily primed PCR and *toxRS* Sequence Analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 578-585.

- 2) Kim, Y., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. (1999) : Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1173-1177.
- 3) Takahashi, H., Y. Hara-Kudo, J. Miyasaka, S. Kumagai, and H. Konuma. (2005) : Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol. Methods.* 61 : 77-85
- 4) Takahashi, H., Y. Iwade, H. Konuma, and Y. Hara-Kudo. (2005) : Development of a Quantitative Real-Time PCR Method for Estimation of the Total Number of *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Shellfish and Seawater. *J. Food Prot.* 68 : 1083-1088.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoneyama, N., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Effects of heat-degraded sugars on survival and growth of *Vibrio*

parahaemolyticus and other bacteria. *J. Food Prot.* 70: 373-377, 2007.

Kamio, A., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Yahiro, T. and Konuma, H. Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in seawater. 投稿中.

2. 学会発表

神尾暁、八尋俊輔、宮坂次郎、瀬川優子、工藤由起子、小沼博隆. 環境海水中の *Vibrio vulnificus* の分離における増菌及び分離培養法の問題点について. 腸炎ビブリオンシンポジウム. 平成 18 年 11 月. 東京.

宮坂次郎、八尋俊輔、中島龍一、工藤由起子. 水鳥糞便中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の検索. 日本獣医公衆衛生学会(九州), 平成 18 年 10 月, 熊本.

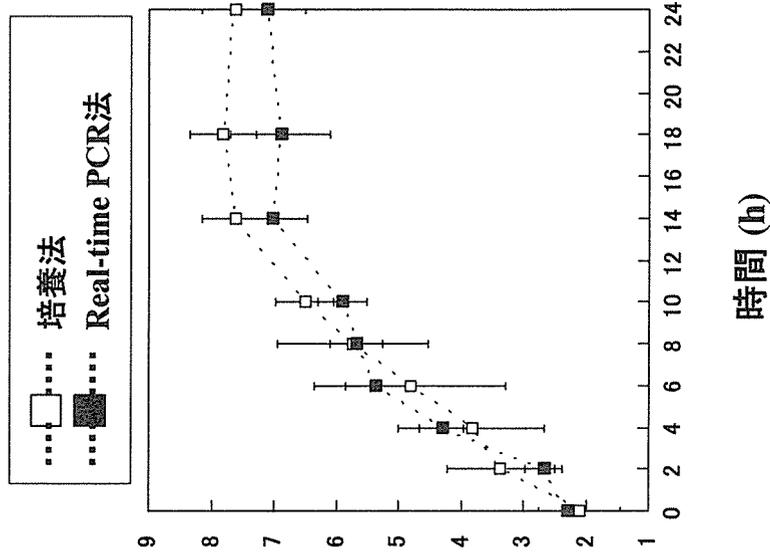
山崎省吾, 中村まき子, 右田雄二, 工藤由起子, 三澤尚明, 岡本嘉六, 高瀬公三. 海水における *Vibrio vulnificus* の季節消長と環境因子. 日本獣医公衆衛生学会(九州), 平成 18 年 10 月, 熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況

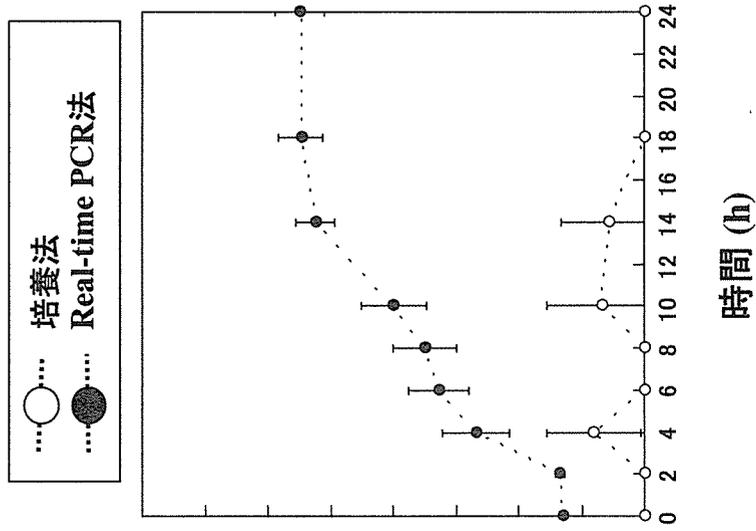
(予定も含む)

特になし

(c) *V. parahaemolyticus*



(b) 8月以降での
V. vulnificus



(a) 7月28日での
V. vulnificus

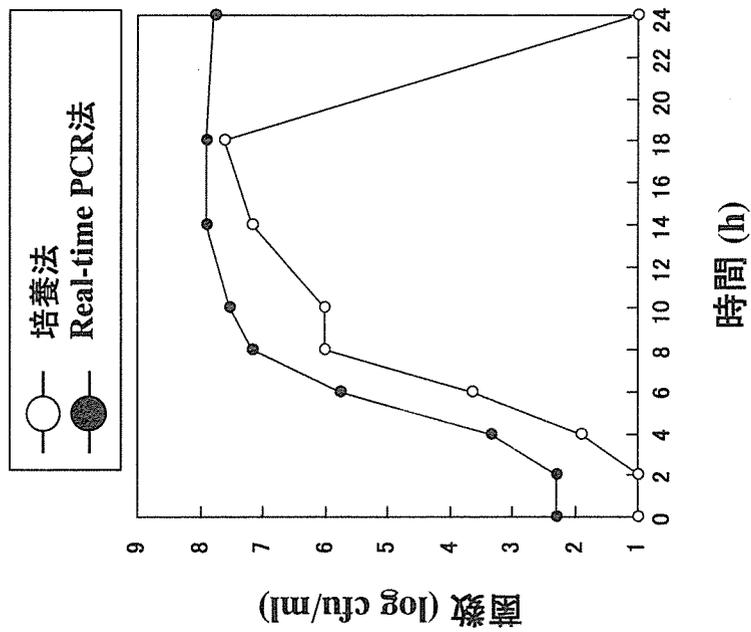
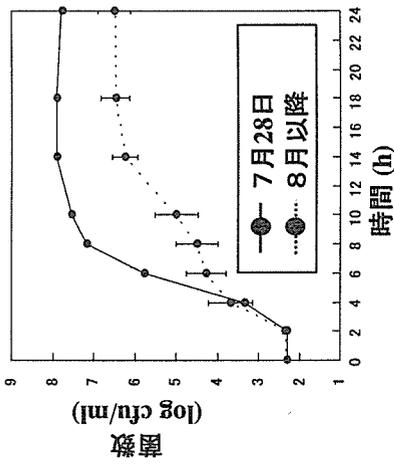
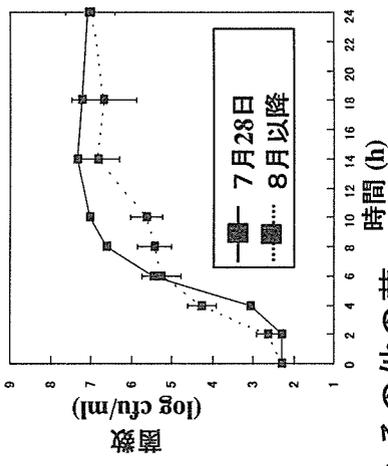


図1 培養法とリアルタイムPCR法の比較

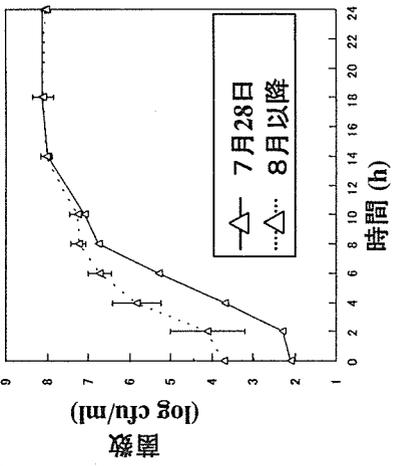
(a) *V. vulnificus*



(b) *V. parahaemolyticus*



(c) その他の菌



(d) 6時間目までの拡大図

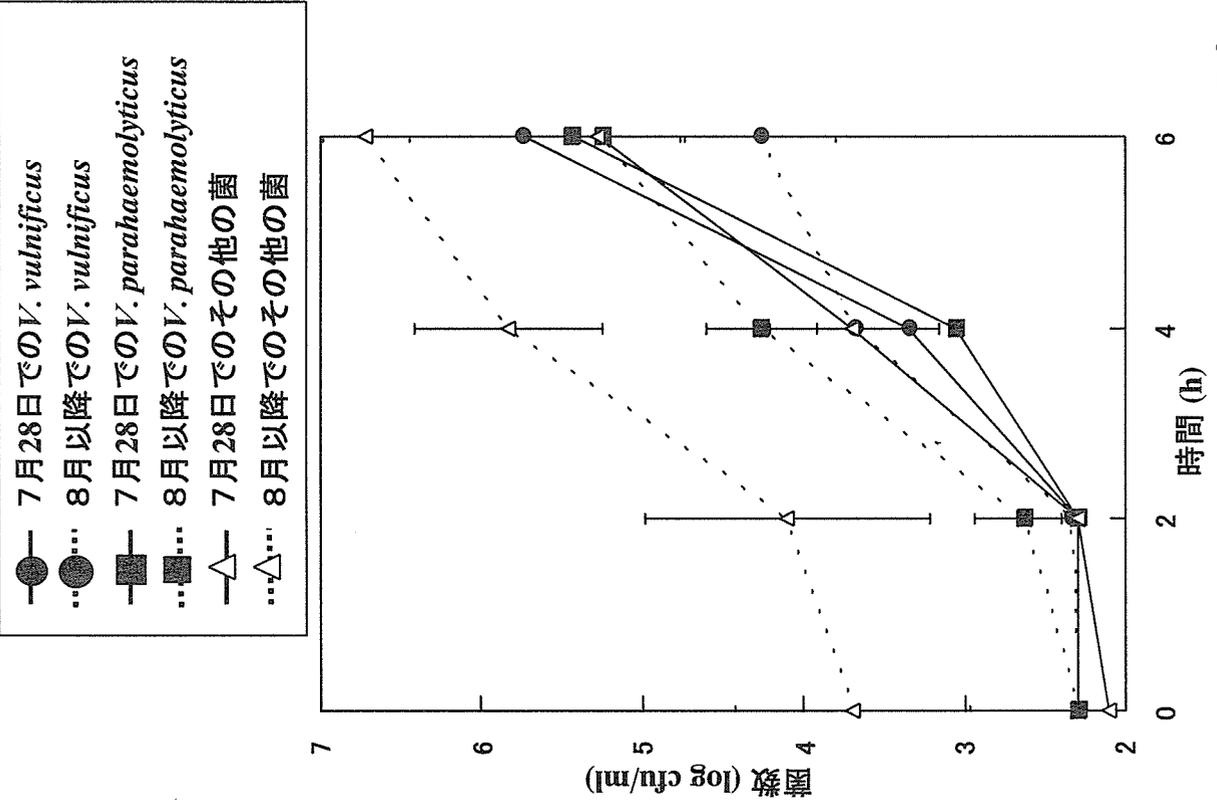


図2 7月28日と8月以降の比較

表1 実験に供試した検体

検体番号	採水日	採水場所	水温(°C)	塩分濃度(‰)
1	7月28日	熊本県(松合漁港)	30.0	13
2	8月 4日	静岡県 (清水港)	25.2	28
3	8月26日	静岡県(巴川下流)	26.4	12
4	8月30日	熊本県(松合漁港)	29.5	22
5	9月 5日	熊本県(松合漁港)	28.0	25
6	9月12日	熊本県(松合漁港)	26.5	26
7	9月19日	熊本県(松合漁港)	25.5	25
8	9月26日	熊本県(松合漁港)	24.5	28

平成 18 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

Vibrio vulnificus の増菌培養時間の検討と平成 18 年度の季節消長

研究要旨

Vibrio vulnificus の適正な増菌培養時間の検討を行うため、増菌培地にアルカリ性ペプトン水を用い、8 時間から 20 時間まで 1 時間ごとに MPN-PCR 法、2 時間ごとに MPN-分離培養法で比較した。その結果、アルカリ性ペプトン水による増菌は 10～12 時間が最適であることがわかった。また、熊本内の同一地点で週に 1～2 回採水し、*Vibrio vulnificus* (以下、Vv) と *Vibrio parahaemolyticus* (以下、Vp) の季節消長を MPN 法で測定した。結果、*Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の詳細な季節消長のデータを得ることができ、水温、塩分濃度及び降水量とそれぞれの菌数との関係が明らかとなった。

研究協力者

宮坂 次郎, 八尋 俊輔, 中島龍一
(熊本県保健環境科学研究所)

消長を得るために、6 月から 12 月まで週 1 回から 2 回(計 29 回)、同一地点で海水を採水し、その菌数を測定した。

A. 研究目的

Vv の分離法は未だ確立されていない。特に増菌培養時間は、通常 18 時間程度で行われているが、ビブリオ属の増菌時間は長くなるに従い、分離が悪くなることが知られている。そのため、Vv と Vp の最適な増菌培養時間を決定するため、8 時間から 20 時間の各増菌培養時間における菌数の比較を MPN3 管法で行った。

また、Vv の季節消長は各地で報告されているが、月に 1 回程度の採水のデータがほとんどである。今回、我々は詳細な季節

B. 研究方法

1. 増菌時間の検討

増菌培地にアルカリ性ペプトン水(日水、以下 APW とする)を用い、Vv の菌数が高くなる夏場の海水を用いて検討した。増菌時間を 8 時間から 20 時間までとし、Vv は 1 時間ごとに PCR による MPN 測定(以下 MPN-PCR 法)を、2 時間ごとにクロモアガービブリオ(以下、CAV)を用いて培養法で MPN を測定(以下、MPN-分離培養法)した。MPN の測定方法は工藤らの報告に準じて行った¹⁾。一方、Vp は 2 時間ごとに MPN-分離培養法で測定した。

2. 季節消長

定点を熊本県の八代海に面する A 漁港に設定し、週 1~2 回採水を行った。採水した海水を APW で増菌し、CAV で分離後、V_v と V_p の菌数を MPN 法で測定した。増菌培養は 35℃、12~15 時間、分離培養は 35℃、18 時間とした。

C. 研究結果

1. 増菌時間検討結果

V_v では、1 時間ごとに行った MPN-PCR 法は培養 10 時間でピークとなり、以降 20 時間まで同じ結果を得た(7,500/100ml)。しかし、MPN-分離培養法は、MPN-PCR 法と同じく 10 時間でピークとなったが、以後時間の経過とともに、検体量の多い管から塗抹した CAV からの分離が困難となっていき、培養 18 時間では 10ml、1ml、0.1ml の管より塗抹した CAV から分離できない場合が出てきた(表 1、図 1)。また、V_p も MPN-分離培養法は V_v と同じく 10 時間でピークを迎え、時間の経とともに V_v ほどではないが、管によっては検出不可能となるものもでてきた(表 2、図 2)。

2. 季節消長の結果

6 月 1 日より 12 月 21 日までの全採水記録を表 3 に示す。水温、塩分濃度及び V_v の菌数の関係を図 3 に示す。

V_v は、図 4 に示すとおり、例年にない多雨のため、県内の過去のデータと比較して²⁾ 全体的に菌数は高く、調査期間中 10³~10⁶ を継続した日数は 7 月 4 日~9 月 19 日までの 78 日であった。また、その期間の塩分濃度は 3~26‰ で平均 17‰ であった。この塩分濃度は、外海の通常の濃度 30~35‰ の約半分程度であった。V_v の菌数は、水温の上昇とともに菌数は増加する傾向

にあったが、30℃を超えるとやや減少する傾向にあり、17℃以下になると検出されなかった。また、塩分濃度が 28‰ を超えると菌数は低下したが、それ以下の場合、塩分濃度の増減には影響されなかった。

次に、水温、塩分濃度及び V_p の菌数の関係を図 5 に示す。V_p は、塩分濃度が 10‰ 以下になると菌数は減少し、5‰ 以下では検出できなくなった。

降雨量と V_v、V_p の菌数との関係を図 6 に示す。V_v、V_p の菌数のピークは 7 月 18 及び 9 月 5~12 日頃にみられ、降雨量の多い日は菌数のピークより約 2 週間前にみられる。

D. 考察

1. 増菌培養時間の検討

今回、V_v の基礎的研究として増菌培養時間の検討を行ったが、18 時間以上になると検体量の多い管からの V_v の分離が困難になり、V_v の MPN-分離培養法での正確な MPN が得られなかった。PCR では陽性を示したが、CAV 上では雑菌が多く発育しており、分離することができなかった。これは、V_v が死滅しているか、他菌に対し V_v の割合が少なくなることが考えられた。MPN の測定で、CAV から最も V_v の検出が容易だったのは増菌培養時間が 10~12 時間の場合だったことから、増菌培地に APW を用いる場合は、増菌培養時間は 10 時間で十分であり、長くても 12 時間以内が望ましいと思われた。しかし、実際検査を実施する場合、12 時間培養は困難であり、15 時間程度が限界と思われるが、従来から実施されている 18 時間培養は V_v の増菌培養時間としては明らかに不適であると思われた。また、V_p は V_v に比べ分

離は可能であったが、Vvと同様に10～12時間が最も分離が容易であり、増菌培養時間は10時間で十分であったことから、VpもVvと同様、増菌時間の短縮が望まれた。

2. 季節消長

本年度調査を開始した6月1日にはVvはすでに検出され、水温の低下した11月15日の時点でVvは検出されなくなった。本年度は週1～2回と高い頻度で検査を行い、水温、降雨量、塩分濃度とVv、Vpの菌量との関係の詳細が明らかになった。以下に得られた知見を示す。

- Vvは塩分濃度が27%より低い場合は、塩分濃度が一桁台であっても検出され、あまり影響は受けない。また、28%を超えると検出されにくくなる。
- 雨量の増加により塩分濃度が下がり、10%以下になるとVpは検出しにくくなり、5%以下になると検出不能になる。このことは、VpはVvに比べ低塩分条件での生息が難しいことを示している。
- 水温が上昇すると、Vv及びVpの菌数は増加したが、30℃を超えるとそれぞれの菌数は若干減少した。このことにより、至適海水温度は27℃前後と思われた。また、検査を実施した期間中、水温の低下によってVpの菌数減少はみられるものの検出不能になることはなかった。Vvは水温が17.5℃以下では検出されなかった。

以上により、Vv及びVpの菌数の増減には水温、塩分濃度、降雨量が深くかかわっていることが改めて確認された。しかし、ひとつの環境要因だけでなく、様々な要因が重なって菌数が変化していることが推測された。

E. 結論

本年度の検討で、Vv、Vpの増菌時間は従来の18時間培養では長すぎる事が判明し、増菌培養時間の短縮が必要であることがわかった。また、週2回の採水により、Vvと水温、塩分濃度、降雨量との関係を詳細に把握できたが、Vvの菌数は様々な条件が重なって増減していることが推測された。

今回、調査対象とした八代海沿岸では本年7月14日から19日にかけて3例のVvによる感染症が発生し、この時期は調査期間中のVv菌数の最も多い時期と一致したことから、今後も注意深く環境調査を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) 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。感染症誌 2005；79：931-6
- 2) 宮坂次郎、八尋俊輔、荒平雄二、濱州大輔、甲木和子、徳永晴樹：熊本県内の *Vibrio vulnificus* の環境分布と *Vibrio vulnificus* 感染症発生状況 (2001～2004)。熊本県保健環境科学研究所報, 34, 37(2004)

F. 研究発表

1. 誌上発表

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. Epidemiol.

Infect. 134:780-785, 2006.

2. 学会発表

宮坂次郎、八尋俊輔、中島龍一、工藤由起子. 水鳥糞便中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の検索. 日本獣医公衆衛生学会(九州), 平成18年10月, 熊本.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 Vvの増菌培養時間の検討(数字はCAV上のVvのコロニー数を示す)

増菌時間	検体量	10ml	1ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml	10 ⁻⁴ ml	10 ⁻⁵ ml	MPN/100ml
8	平板上の菌数	30	35	10	0	0	0	0	2,300
	陽性管数	25	>50	10	0	0	0	0	
10	平板上の菌数	10	>50	40	0	0	0	0	7,500
	陽性管数	3	3	3	0	0	0	0	
12	平板上の菌数	7	>50	>50	0	0	0	0	7,500
	陽性管数	4	20	>50	>50	0	0	0	
14	平板上の菌数	2	7	>50	0	>50	0	0	7,500
	陽性管数	3	3	3	1	1	0	0	
16	平板上の菌数	4	5	7	0	0	0	0	7,500
	陽性管数	1	5	19	>50	0	0	0	
18	平板上の菌数	2	5	40	0	>50	0	0	判定不能
	陽性管数	3	3	3	1	1	0	0	
20	平板上の菌数	4	11	4	0	0	0	0	判定不能
	陽性管数	4	15	10	>50	0	0	0	

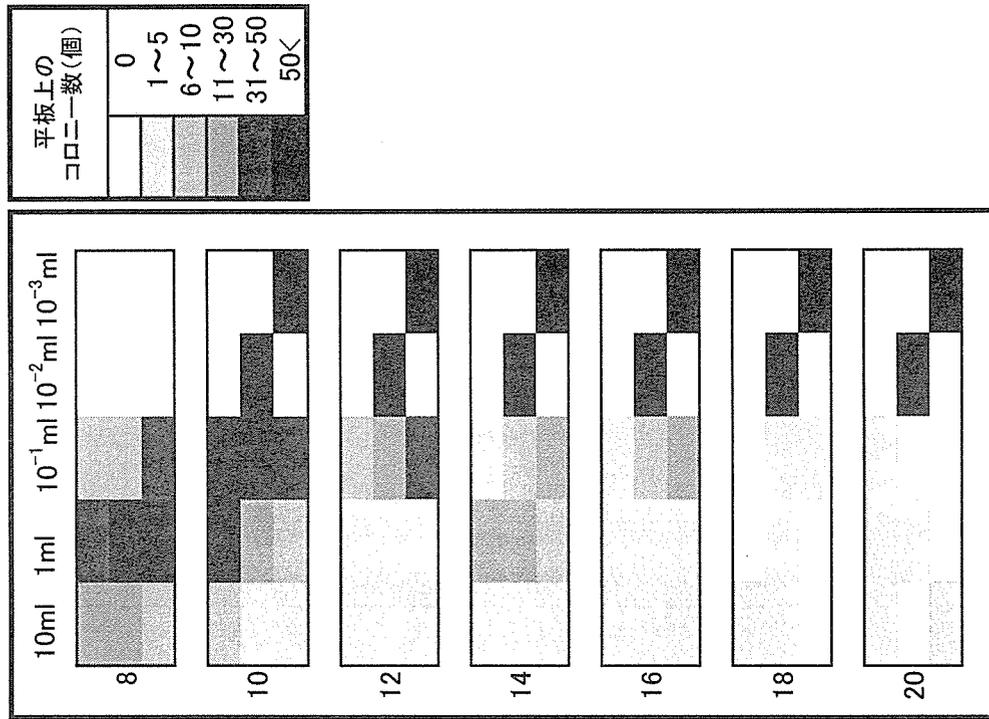


図1 Vvの増菌培養時間の検討

表 2 Vpの増菌培養時間の検討(数字はCAV上のVpのコロニー数を示す)

増菌時間	検体量	10ml	1ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml	10 ⁻⁴ ml	10 ⁻⁵ ml	MPN/100ml
8	平板上の菌数	>50	>50	>50	0	0	0	0	2,300
	陽性管数	3	3	3	0	0	0	0	
10	平板上の菌数	>50	>50	13	>50	0	0	0	9,300
	陽性管数	3	3	3	2	0	0	0	
12	平板上の菌数	30	15	10	>50	0	0	0	9,300
	陽性管数	6	5	3	0	0	0	0	
14	平板上の菌数	>50	>50	>50	3	0	0	0	9,300
	陽性管数	3	3	3	2	0	0	0	
16	平板上の菌数	>50	>50	10	>50	0	0	0	2,100
	陽性管数	3	3	3	2	0	0	0	
18	平板上の菌数	>50	>50	7	>50	0	0	0	9,300
	陽性管数	3	3	2	2	0	0	0	
20	平板上の菌数	13	10	1	5	0	0	0	2,100
	陽性管数	7	5	2	0	0	0	0	

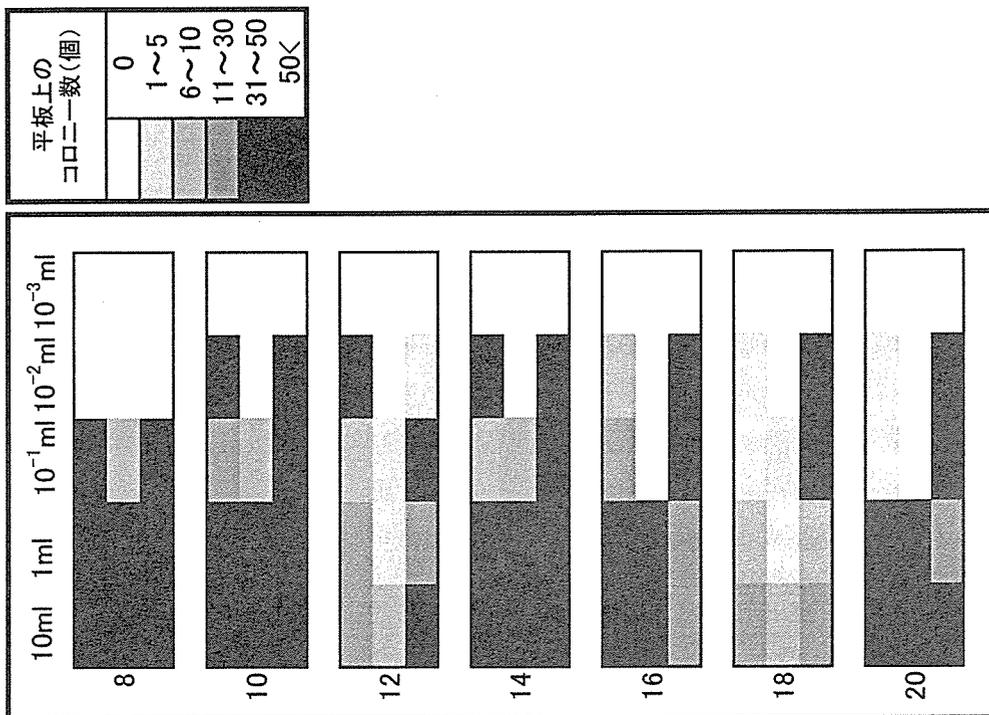


図2 Vpの増菌培養時間の検討

表3 平成18年度採水記錄

採水日	採水時刻	塩分濃度 (%)	気温(°C)	水温(°C)	降雨量 (mm)	透視度 (cm)	増菌培養 時間(h)	Vv (MPN/100mL)	Vp (MPN/100mL)
2006/6/1	10:00	26	24.5	23	16	no data	15	3	460
2006/6/15	10:00	25	23	24	46	22	12	2000	4300
2006/6/20	10:00	16	25.5	27	60	23	13	4300	23000
2006/6/27	9:30	4	26	25	163	5	12	430	430
2006/6/29	9:45	5	27	26	269	23	12	210	43
2006/7/4	10:00	3	27	25.5	168	9	12	4300	<3
2006/7/11	9:30	13	30.5	28.5	34	18	12	23000	4300
2006/7/18	10:00	19	28.5	29	4	5	12	>2300000	>2300000
2006/7/20	9:00	5	27	27	49	10	12	23000	<3
2006/8/1	14:20	14	34	33	0	21	12	11000	15000
2006/8/3	16:00	15	33	32	0	28	12	4300	2300
2006/8/8	12:00	18	34	33	2	18	15	43000	4300
2006/8/10	10:30	22	32.5	31.5	2	25	15	4300	15000
2006/8/15	10:00	25	33	31	1	20	15	43000	43000
2006/8/21	16:00	16	34	31	158	20	15	23000	4300
2006/8/30	10:00	22	29	29.5	4	24	15	43000	430
2006/9/5	10:00	25	27.5	28	24	30	15	430000	430000
2006/9/12	10:00	26	28	27	27	27	15	93000	2300000
2006/9/19	10:00	25	27.5	25.5	43	>50	15	11000	93000
2006/9/21	9:30	28	27.5	26.5	28	>50	15	230	2300
2006/9/26	9:30	28	27	24.5	0	25	15	930	4300
2006/10/3	10:00	27	27	25	0	34	15	43000	23000
2006/10/12	11:30	29	27.5	24.5	0	30	15	3	no data
2006/10/16	10:30	30	27	23.2	0	20	15	930	2400
2006/10/19	10:00	29	23.5	23.5	0	27	15	90	2300
2006/11/1	14:30	30	24.5	22	0	17	15	3	36
2006/11/15	10:00	31	19	17.5	11	23	15	<3	93
2006/12/6	10:00	30	12	12	1	28	15	<3	no data
2006/12/21	14:20	29	14	12.5	3	22	15	<3	23

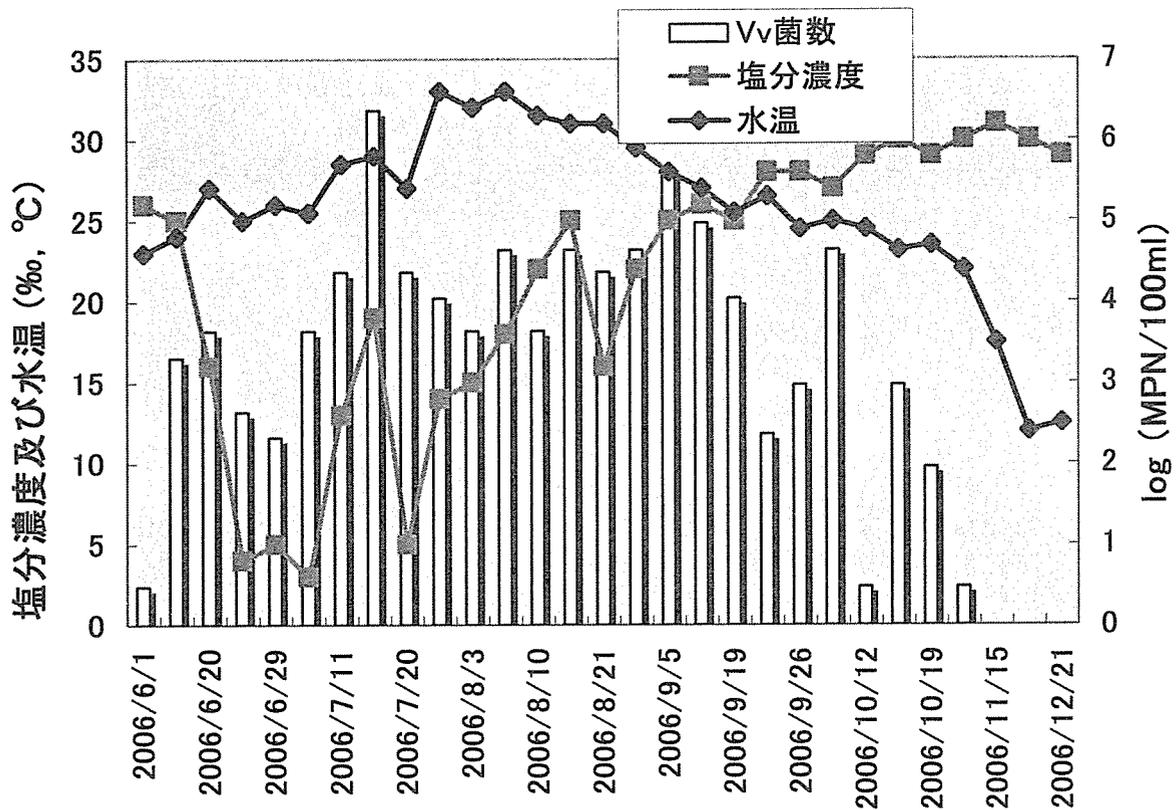


図3 Vvの季節消長と水温及び塩分濃度の関係

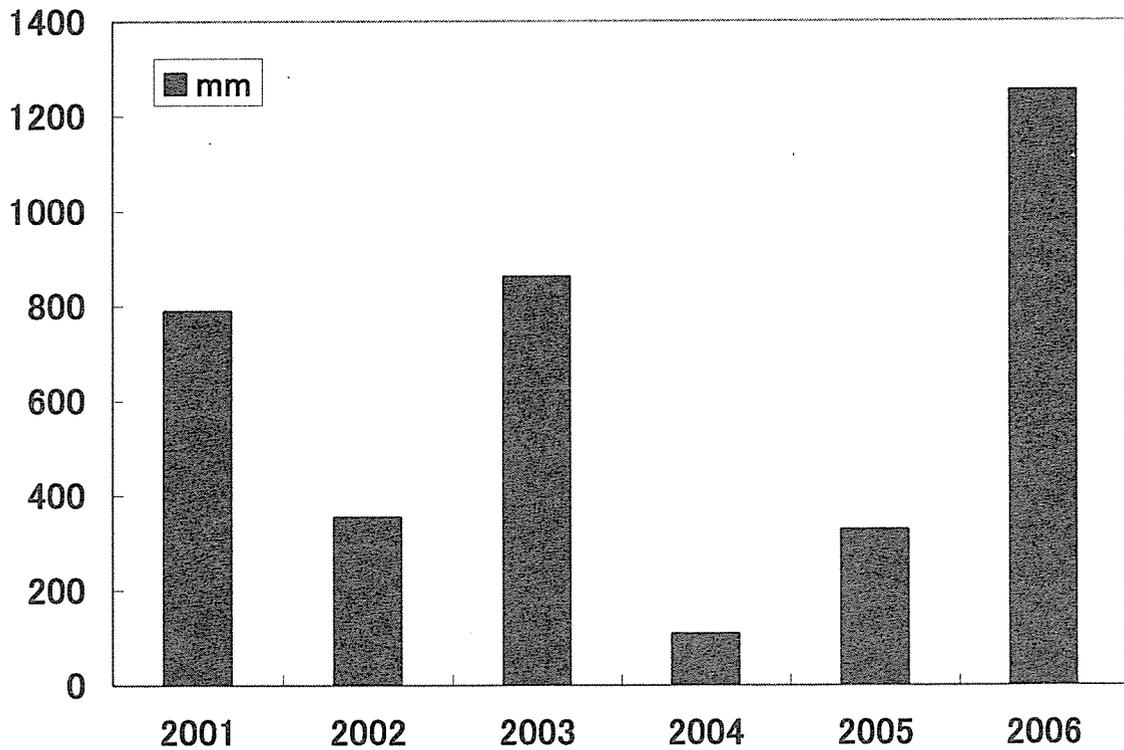


図4 梅雨期降雨量(6/16~7/23)の推移