

図5 Vpの季節消長と水温及び塩分濃度の関係

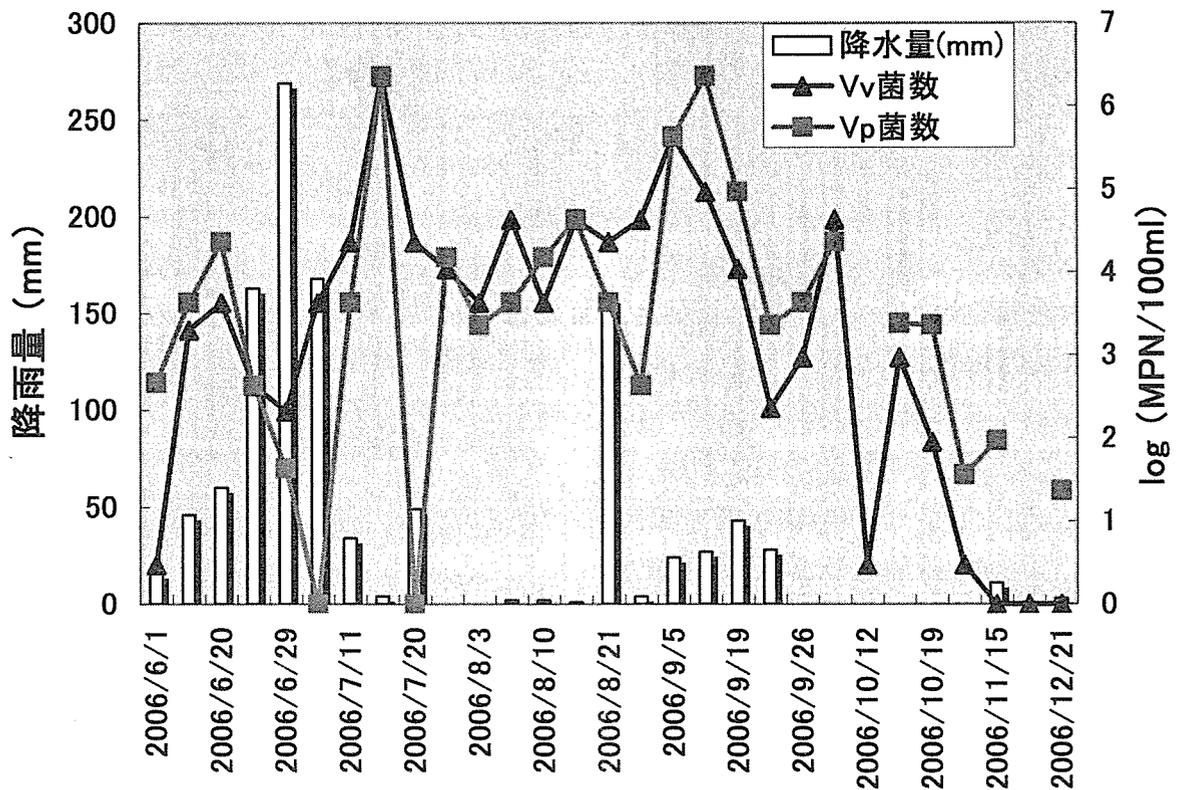


図6 Vv、Vpの菌数と降雨量との関係

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

食品や海水からの耐熱性溶血毒(TDH)産生腸炎ビブリオおよび
ビブリオ・バルニフィカスの検出状況について

研究要旨

食品や環境中における耐熱性溶血毒（TDH）産生腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの分布を明らかにするため、魚介類及び海水を検体として両菌の検出を行ったところ、魚介類 76 検体中アサリ及びアオヤギ各 1 検体計 2 検体（2.6%）から TDH 産生腸炎ビブリオが検出された。なお、非病原性株も含む腸炎ビブリオは 43 検体（56.6%）から検出され、その汚染菌量は 0.3/g から 93,000/g であった。また、20 検体（26.3%）の魚介類からビブリオ・バルニフィカスが検出され、その汚染菌量は 0.36/g から 2,000/g で、特に二枚貝であるアサリやアオヤギからは高頻度に検出された。

さらに、海水からの腸炎ビブリオ（非病原株）とビブリオ・バルニフィカスの検出においては、採水定点による差が見られた。また両菌の検出にはほぼ同様の傾向があり、それらの検出と海水温には関連性が認められた。

協力研究者

杉山寛治（静岡県環境衛生科学研究所）

A. 研究目的

平成 13 年 6 月食品衛生法施行規則等の一部改正が行われ、新たに生食用鮮魚介類等について腸炎ビブリオに関する成分規格が設けられた。そのため食品や環境における腸炎ビブリオの汚染状況を調査すること、なかでも耐熱性溶血毒（Thermostable direct hemolysin）産生腸炎ビブリオの汚染実態を把握することは極めて重要となっている。

さらに、平成 13 年 8 月、静岡県西部地区において腸炎ビブリオと同属菌であるビブリオ・バルニフィカスの感染による敗血症により死者が発生した。また熊本県や千葉県等においても同様の報告があり、なかには魚介類の生食に起因すると推定された事例もあった。そのため魚介類の生食の機会が特に多い日本においては、腸炎ビブリオ同様な菌の分布や季節的消長の解明が求められている。

B. 研究方法

1. 材料

6月から翌年の3月にかけて、市場等で購入したアサリ30検体、アジ20検体、アオヤギ19検体（「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ3検体を含む）及びカキ（加工用又は殻付）7検体計76検体の魚介類について腸炎ビブリオとビブリオ・バルニフィカスの検出を試みた。

また、6月から翌年の2月にかけて、月1回ごと（11月及び1月は未実施）駿河湾内N港沖6定点（A～F）の海水について海水温を測定し、両菌の検出を試みた。

2. 方法

魚介類はその25gを細切したものを、海水は約1Lをメンブランフィルターで濾過したフィルターをそれぞれアルカリペプトン水225mlで37℃、18時間増菌培養後、mCPC（セロビオース・ポリミキシンB・コリスチン）寒天培地及びクロモアガービブリオ寒天培地に塗抹し、37℃、18時間分離培養した。

また、アルカリペプトン水を用いたMPN（最確数）増菌培養法による両菌の菌数測定も実施した。

腸炎ビブリオについてはクロモアガービブリオ寒天培地から、ビブリオ・バルニフィカスはmCPC及びクロモアガービブリオの両寒天培地から各々疑わしい集落を2% NaCl加TSI培地、NaCl（0%及び7%又は8%）加Nutrient Brothに接種して鑑別培養した。さらにビブリオ・バルニフィカスについて発育性状が一致した分離株は、PCR法により本菌に特異的なcytotoxin-hemolysin遺伝子保有の有無を確認して同定した。

なお、一部の検体ではスクリーニング検査として増菌培養液を供試し、腸炎ビブリ

オの場合にはTDH遺伝子保有の有無を、ビブリオ・バルニフィカスの場合はcytotoxin-hemolysin遺伝子保有の有無を確認した。特にTDH遺伝子陽性と判定された検体については、腸炎ビブリオ抗K6血清を感作させた免疫磁気ビーズで処理後、クロモアガービブリオ寒天培地にて分離培養し、疑わしい集落を神奈川現象培地に接種してその溶血の有無を確認した。

血清型は、腸炎ビブリオでは市販のO及びK血清を用い、ビブリオ・バルニフィカスでは国立感染症研究所分与の01～07の抗血清を使用して型別した。

C. 研究結果

TDH産生腸炎ビブリオが検出されたのは、魚介類76検体中アサリ1検体及びアオヤギ1検体（「生食用鮮魚介類」には該当せず）計2検体（2.6%）（表1）で、その分離菌株（神奈川現象陽性）の血清型はO3:K6であった。非病原株を含む腸炎ビブリオは43検体（56.6%）から検出され、その内訳はアサリ30検体中18検体（60%）、アオヤギ19検体中16検体（84.2%、「生食用鮮魚介類」3検体を含む）、カキ7検体中3検体（42.9%）及びアジ20検体中6検体（30%）であった（表2）。なお、本菌が検出された魚介類43検体における魚介類別平均汚染菌量は、アサリ7,000/g、アオヤギ173/g、カキ94.6/g及びアジ7.5/gであった。また「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ3検体の平均汚染菌量は0.79/gで、1検体が0.91/g、2検体がともに0.73/gであった（表3）。

ビブリオ・バルニフィカスは、魚介類76検体中20検体（26.3%）から検出された。

その内訳はアサリ 30 検体中 13 検体 (43.3%), アオヤギ 19 検体中 5 検体 (26.3%), カキ 7 検体中 1 検体 (14.3%) 及びアジ 20 検体中 1 検体 (5%) であった。

しかし、「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ 3 検体からは検出されなかった(表1)。本菌が検出された魚介類 20 検体における魚介類別平均汚染菌量は、アサリでは 221 /g, アオヤギでは 13.4 /g, カキ及びアジでは各々 2.9 /g, 36 /g であった(表4)。なお、分離株の血清型は 01, 03, 04A, 06 及び UT (型別不能) であった。

駿河湾内 N 港沖の海水 6 定点における腸炎ビブリオの月別検出状況は、6 月が 4 定点、7 月が 4 定点、8 月が 1 定点、9 月が 3 定点、10 月が 3 定点及び 12 月が 4 定点において各々本菌が検出され、2 月はいずれの定点からも検出されなかった(表5)。なお、TDH 産生腸炎ビブリオは分離されなかった。

また、ビブリオ・バルニフィカスの検出状況は、7 月が 2 定点、8 月が 1 定点、9 月が 1 定点、10 月が 1 定点において各々陽性であったが、12 月及び 2 月には検出されなかった(表5)。なお、分離菌株の血清型は 04A, 06 及び UT であった。

さらに、両菌の海水における 6 月から 2 月までの定点別平均汚染菌量は、河川の流入部に近い海域である A 及び B 定点において腸炎ビブリオは各々 1,590 /100ml, 1,390 /100ml, ビブリオ・バルニフィカスは各々 8,300 /100ml, 250 /100ml であった。しかし、C 定点から F 定点における腸炎ビブリオは 0.51 /100ml から 30.5 /100ml の汚染菌量で、ビブリオ・バルニフィカスはいずれも検出限界以下であった(表6)。

なお、N 港沖海水の月別平均海水温は、6

月 : 20.4℃, 7 月 : 26.7℃, 8 月 : 25.3℃, 9 月 : 25.5℃, 10 月 : 20.5℃, 12 月 : 15.8℃, 2 月 : 10.6℃だった(表5)。

D. 考察

腸炎ビブリオに関しては、新たな成分規格として「生食用鮮魚介類」「むき身の生食用かき」「冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)」において最確数 1g あたり 100 以下と定められた。さらに、平成 14 年 6 月からは生食用鮮魚介類の加工基準中、海水の使用に関する規定が施行されている。今回供試した検体の中には「生食用鮮魚介類」に該当する食品としてアオヤギ 3 検体が含まれていたが、いずれも成分規格以下の汚染菌量で、TDH 産生菌は検出されなかった。しかし、夏季に採取・検査したアサリや「生食用鮮魚介類」に該当しないアオヤギからは病原株である TDH 産生菌が検出され、さらに腸炎ビブリオ総菌数の多い検体もあったので、貝類のむき身の処理工程時や海水からの「生食用鮮魚介類」等への二次汚染には充分注意する必要がある。なお本菌の分離培地として使用したクロモアガービブリオ寒天は酵素基質培地であるため、培地上の本集落(紫色)が他の集落に影響されにくく、分離が容易であった。今後はさらに優れた検出方法を検討し、特に食中毒発生時の原因食品から TDH 産生菌を分離できるようにするとともに継続して TDH 産生腸炎ビブリオの食品や環境中における汚染実態を把握していきたい。

ビブリオ・バルニフィカスに関しては健康人が感染することはほとんどないとされるが、肝疾患、免疫不全等の慢性基礎疾患を持つ人では敗血症から死に至ることもあ

りうる。今回の調査で魚介類や沿岸海水中に生息していることがあらためてわかり、アジに比較して特に多数の二枚貝から検出されたのは、海水中に生息する本菌を濃縮する形で中腸腺に保菌してしまうためと思われる。特に検出率及び汚染菌量とも高かったアサリは一般的に生食するものではないが、それらの生息海域から採れた他の魚介類の汚染指標にもなりえる。

また、海水中におけるビブリオ・バルニフィカスの検出状況について、本菌の存在と海水温とは密接に関係があるという報告もあり、今回の検査では海水温が約 15℃に下がった12月及びそれ以下になった2月には検出されなかった。さらに、腸炎ビブリオとビブリオ・バルニフィカスにおける検出状況や汚染菌量は、すべての海域が一様に汚染されているものではなく、河川の流入部に近い海域で高率、高菌量であるなど、海水の採取定点による差が顕著に見られた。また両菌の月別検出状況はほぼ同様の傾向が認められた。

今回のデータが示すように、ビブリオ・バルニフィカス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。静岡県では、腸炎ビブリオによる食中毒防止対策の一環として例年7月から8月にかけて主に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を行っているが、今後はこうした機会を通してビブリオ・バルニフィカス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。

表1 TDH 産生腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの魚介類別検出状況

	TDH 産生腸炎ビブリオ	ビブリオ・バルニフィカス
	陽性数／検体数 (%)	陽性数／検体数 (%)
アサリ	1／30 (3.3)	13／30 (43.3)
アオヤギ	1／19 (5.3) (0／3*)	5／19 (26.3) (0／3*)
カキ	0／7 (0)	1／7 (14.3)
アジ	0／20 (0)	1／20 (5)
計	2／76 (2.6)	20／76 (26.3)

* 「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表2 腸炎ビブリオの魚介類別検出状況

	陽性数／検体数 (%)
アサリ	18／30 (60)
アオヤギ	16／19 (84.2) *3／3 (100)
カキ	3／7 (42.9)
アジ	6／20 (30)
計	43／76 (56.6)

* 「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表3 腸炎ビブリオの魚介類別平均汚染菌量

	菌量／g
アサリ	7,000 (0.91～93,000)
アオヤギ	173 (0.3～2,400) *0.79 (0.73～0.91)
カキ	94.6 (0.91～240)
アジ	7.5 (0.36～20)

* 「生食用鮮魚介類」に該当するアオヤギ

表4 ビブリオ・バルニフィカスの
魚介類別平均汚染菌量

	菌量/g	
アサリ	221	(0.91~2,000)
アオヤギ	13.4	(0.36~36)
カキ	2.9	(2.9)
アジ	36	(36)

表5 腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの海水における月別検出状況

	陽性数/検体数						
	6月	7月	8月	9月	10月	12月	2月
<i>V. p</i>	4/6	4/6	1/6	3/6	3/6	4/6	0/6
<i>V. v</i>	NT	2/6	1/6	1/6	1/6	0/6	0/6
平均海水温(°C)	20.4	26.7	25.3	25.5	20.5	15.8	10.6

NT: Not Tested *V. p*: 腸炎ビブリオ *V. v*: ビブリオ・バルニフィカス

表6 腸炎ビブリオ及びビブリオ・バルニフィカスの海水における定点別平均汚染菌量

	A	B	C	D	E	F
<i>V. p</i>	1,590/100ml	1,390/100ml	12.9/100ml	30.5/100ml	0.51/100ml	13.3/100ml
<i>V. v</i>	8,300/100ml	250/100ml	<3/100ml	<3/100ml	<3/100ml	<3/100ml

A~F: 海水採取定点 *V. p*: 腸炎ビブリオ, *V. v*: ビブリオ・バルニフィカス

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 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

研究要旨

平成 17 年 7 月、熊本県内の一般家庭で生のアナジャコを原料として作られた「アナジャコ醤油漬け」が感染原因と推測される *Vibrio vulnificus*（以下、Vv）感染症が発生した。

本研究では、医療機関の協力により入手した「アナジャコ醤油漬け」から Vv 及び *Vibrio parahaemolyticus*（以下、Vp）の定量分離を行った。その結果、塩分濃度 17%の「アナジャコ醤油漬け」から高い数値の Vv 及び Vp を検出した。しかし、分離した Vv 株と臨床由来株との PFGE による解析では泳動パターンは一致しなかった。また、「アナジャコ醤油漬け」に関する Vv 及び Vp の生存試験では 4℃条件でそれぞれ 48 時間～96 時間までの生存を確認した。

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）

本研究では、残っていた「アナジャコ醤油漬け」のアナジャコ部と調味料部から Vv 及び *Vibrio parahaemolyticus*（以下、Vp）の分離を行い、分離された Vv 株を用いて血清型と PFGE 法による臨床由来株との比較を行った。

加えて、塩分濃度の高い醤油漬けに Vv 及び Vp が生存していたことから、当所で「アナジャコ醤油漬け」を作成し、Vv 及び Vp の生存試験を行った。

A. 研究目的

当所では、2001 年から 2006 年の間に 23 例の *Vibrio vulnificus*（以下、Vv）感染症発生事例を経験しているが、感染原因と推測される食品が残されていた例は今回がはじめてであった。今回残っていた「アナジャコ醤油漬け」は、県内の一部の地域で食される食品で、生のアナジャコを洗浄し、脚や鰓を取り除いた後、醤油に焼酎やみりんを加えた調味料に漬け込んだものである。

B. 研究方法

1. 定量法と同定

Vv と Vp の分離は、家庭で冷蔵保存されていた「アナジャコ醤油漬け」を

作成日から 5 日目及び 35 日目(3℃保存)の 2 回に分けてアナジャコ部と調味料部について増菌培地をアルカリ性ペプトン水、分離培地は CHROMagar Vibrio 用いて MPN3 本法による定量法で行った。

臨床由来株及び「アナジャコ醤油漬け」から分離した Vv 及び Vp を疑うコロニーは、Oxidase、2%NaCl 加 TSI、LIM、VP、及び 0、3、8、10%の塩分発育試験により確認した。なお、Vv は Hill1) らの cytotoxin-hemolysin 遺伝子による確認を行った。

Vv の O 血清型別試験は、臨床由来株と「アナジャコ醤油漬け」からの分離株(21 株)について、O1~O7 抗血清によるスライド凝集法試験により行った。なお、抗血清は国立感染症研究所から分与を受けた。

2. PFGE 解析

「アナジャコ醤油漬け」から分離した Vv のうち臨床由来株(同一患者から異なった血清型および PFGE 型が分離されたことがなく、本件でも分離株の血清型は同一であったことから代表株一株を使用した)と同じく血清型が UT であった 7 株を用い、PFGE 法による分子疫学解析を行った。PFGE は制限酵素に *NotI* を使用し、泳動条件は 6.0V/cm、5 to 50 sec、19h、12℃で行った。

3. Vv 及び Vp の生存試験

「アナジャコ醤油漬け」については、醤油、焼酎及びみりんの詳細な分量が

不明なため、患者家族聞き取り意見を参考にして塩分濃度を目安として作成した。具体的には、熊本県内製造の醤油約 7、みりん約 2、焼酎(アルコール 25 度)約 1 を調味料として、水道水で洗浄したアナジャコの脚、鰓を取り除いて加えた。保存温度を 4℃として、予め Vv 及び Vp の菌数を測定した自然汚染アナジャコを用いて 2 回を行った。

C. 研究結果

1. 定量と同定結果

「アナジャコ醤油漬け」の Vv 及び Vp の定量結果を表 1 に示す。5 日目では Vv、Vp とともに非常に高い菌数で生存し、35 日目でもアナジャコ部でわずかながら Vv の生存を確認した。Vp は Vv に比べて生存菌数は多く、35 日目でも 103 を維持していた。5 日目では Vv、Vp とともに非常に高い菌数で生存し、35 日目でもアナジャコ部でわずかながら Vv の生存を確認した。Vp は Vv に比べて生存菌数は多く、35 日目でも 103 を維持していた。

臨床由来株から生化学性状試験で同定した Vv は、O 血清型別試験を行った結果、O1~O7 抗血清には凝集しない UT 株であった。「アナジャコ醤油漬け」から Vv 同定後、21 株を釣菌して UT:7 株、O1:8 株、O4:1 株、O6:5 を分離した。このうち、臨床株と同じ UT の株(7 株)を PFGE に使用した。

2. PFGE 解析

泳動結果を表 2、図 1 に示す。PFGE の結果、臨床分離株と食材分離株の泳動パターンは一致しなかった。

3. 生存試験

Vv 及び Vp の生存試験結果を表3、表4に示す。なお、生存試験用として作成した「アナジャコ醤油漬け」の最終的な塩分濃度は18%であった。

1回目の試験は、Vv 及び Vp の菌数がそれぞれ 1,500 と 23,000/10g のアナジャコで行い、Vv は24時間後には検出不可能となった。Vp は48時間まで生存した。

2回目の試験は、Vv 及び Vp の菌数がそれぞれ 43,000,000 と 93,000,000/10g のアナジャコで行い、Vv は48時間後まで生存した。Vp は96時間まで生存を確認した。

D. 考察

今回は、Vv 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」からは正確な温度は不明であるが冷蔵保存されていたにもかかわらず高い菌数の Vv 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。その後、当所で実施した醤油漬けの生存試験からも分るように、Vv 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 Vv の分離は可能であった(MPN 3/10g)。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 Vp は Vv 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。

「アナジャコ醤油漬け」分離株と臨床株との PFGE 比較では、「アナジャコ醤油漬け」には多様な O 血清型の Vv が生存しており、血清型を UT にしぼって実施した PFGE でも臨床由来株と同じパターンを示す株は分離できなかった。このことは、Vv はある特定の病原株が存在するか、もしくはどの株でも感染する可能性があることを示唆している。

本研究においても、患者から分離された株は同一の血清型であったが、一つの感染例から分離される株は同一の血清型および PFGE 型であることが、現在までに経験した以下の事例から実証されている。詳細：①3事例において、患者の血液から増菌せず直接分離した Vv を100コロニー以上分離しても全て同じ血清型であった。②1事例において、同一患者の腹水と便から分離した Vv は同じ血清型であり、PFGE パターンも同一であった。③1事例において、同一患者の組織から運動性 Vv 血液から非運動性の Vv を直接分離した。しかし、PFGE パターンは同じであった。④居住地がごく近隣で1~2日の間隔で発症した経口感染例において、同一血清型が分離され PFGE パターンではバンドが1本だけ異なった。

最後に今回の経験から「アナジャコ醤油漬け」のような高塩分食品中の Vv 及び Vp の生存条件等は今後も検討していく必要があると思われる。

E. 謝辞

本研究を実施するにあたり患者分離株及び患者に関係する食材を含め疫学

情報等を提供していただいた熊本大学医学部井上雄二氏に深謝いたします。

F. 参考文献

1) Hill, W. E., Keasler, S. P., Trucksess, M. W., Feng, P., Kaysner, C. A., Lampel, K. A., 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 707-711.

G. 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.

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.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 醤油漬けからの分離結果

菌種	検体	5日目	35日目
Vv	アナジャコ部	430,000	3
	調味料部	230,000	<3
Vp	アナジャコ部	>230,000,000	4,300
	調味料部	430,000,000	2,300

※アナジャコ部:MPN/100ml 調味料部:MPN/10g

※

表2 PFGE に用いた株

Lane No.	由来	血清型
M	λ ladder	UT
1	食材分離株	UT
2	食材分離株	UT
3	食材分離株	UT
4	食材分離株	UT
5	食材分離株	UT
6	食材分離株	UT
7	食材分離株	UT
8	臨床由来株	UT

食材:「アナジャコ醤油漬け

表3 Vvの消長実験-1回目

菌種	検体	菌数 (MPN/10g)		
		生体	24h	48h
Vv	アナジャコ部	1,500	<3	<3
	調味料部		<3	<3
Vp	アナジャコ部	23,000	23	23
	調味料部		240	23

表4 Vvの消長実験-2回目

菌種	検体	菌数 (MPN/100ml・10g)		
		生体	48h	96h
Vv	アナジャコ部	43,000,000	4,600	<3
	調味料部		<3	<3
Vp	アナジャコ部	93,000,000	2,300,000	230,000
	調味料部		230,000	23,000

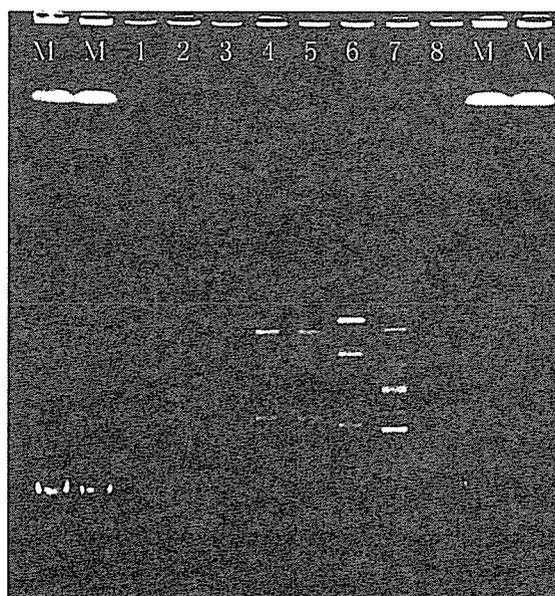


図1 PFGE 結果

平成 18 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

海水中の *Vibrio vulnificus* と環境因子

研究要旨

本調査は、*Vibrio vulnificus* の増減と環境因子との係わり合いについて調査した。調査は 2004 年 9 月から 2006 年 3 月(一部同年 8 月)までの 1 年 7 ヶ月(1 年 11 ヶ月)に渡り、長崎県島原半島中心の 7 地点の沿岸海水とし、*V. vulnificus* は、菌分離と PCR を併用して実施し、*V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の MPN 値と各種環境因子(降水量、海水温、pH、海水塩分、DO、生菌数)の相関を調べた。

その結果、*V. vulnificus*-PCR(vvh)-MPN 値は、降水量、海水水温、海水塩分、DO、*V. parahaemolyticus* 菌数と相関が認められた。

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)

parahaemolyticus(*V. p*) の MPN 値と各種環境因子(降水量、海水温、pH、海水塩分、DO、生菌数)の相関を調べた。

また、昨年度の本調査報告では、主に *V. v* および *V. p* 菌数と海水温および海水塩分との関係について述べた。本報告では、昨年の報告と併せ、本菌と環境因子との関係について評価した。

A. 目的

Vibrio vulnificus (*V.v*) に関する WHO/FAO 報告書によると、本菌と環境因子に関し、海水塩分と海水水温との関係について解析が進んでいる。しかしながらその報告書でも各種環境因子[pH、溶存酸素(dissolved oxygen; DO)、化学因子および日照、降水量等]が本菌に与える影響についてはいまだ不明とされる。

そこで、本研究では、*V. v* の増減に関与する環境因子を探る為、*V. v* と *V.*

B. 材料および方法

1 材料

2004 年 9 月から 2006 年 3 月(一部、同年 8 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)の沿岸海水を各月 1 回採取した総計 133(168)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

(ア) *V. v.*, *vvh* および *V. p.* の菌数測定法

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. v.* は水色を、*V. p.* 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. v.* の遺伝子を検出した。

PCR 法:ヘモリシン遺伝子(*vvh*)の検出は Hill らの方法に従い検出を行った。

(イ) 各種環境因子の測定法

生菌数:Tryptic Soy Agar (Difco) を用い、直接塗抹法にて菌数を測定した。

塩分および水温: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。

降水量:気象庁ホームページの降水量データを参照し、各月採取地点毎に、採水日前日までの7 日間の降水量を合計した。

pH:検体採取時に pH 計(D-51, 堀場製作所)を用い測定した。

DO:定法(ウィンクラー-アジ化ナトリウム変法)に従い測定した。

C. 結果

採取4 地点の結果であるが *V. v.*-MPN 値は、7~10月に検出地点の増加およびMPN 値の上昇が認められ、それに伴い水温の上昇が観察された(図1)。

夏季の水温上昇に反する傾向で塩分の低下が認められた。また、一部異なる傾向が認

められるが、夏季の降水量の上昇が観察された(図2)。

vvh-MPN 値の夏季に増加する季節周期性に反し、採取7地点海水の生菌数の平均値は、採取月毎に菌数の変化が認められるが、 10^2 から 10^4 cfu/ml で推移しており、季節特異性は認められなかった(図3)。

vvh, *V. v.* および *V. p.* と海水温および塩分の関係を、各々のMPN 値を基に9段階区分し、傾向を観察した。*vvh* および *V. v.* とともに水温の減少し、塩分が増加することにより、各々のMPN 値が減少する傾向であった。*vvh* 検出限界が水温下限14.0°C、塩分上限32‰で、*V. v.* 検出限界が水温下限15.5°C、塩分上限28‰あった。一方、*V. p.* は塩分が10‰前後でMPN 値が著しく減少する傾向が認められ、その検出限界は、水温下限15.9°C、塩分の上限は *vvh* のそれよりも高く、下限もまた高い傾向であることが観察された(表1~3, 図4~6)。

vvh, *V. v.* および *V. p.*-MPN 値と環境因子をピアソンの積率相関係数を用い相関係数(r)を求め、簡約統計数値表の r の有意点より評価した。*vvh* は、降水量、海水水温に対し正の相関を示し、塩分、DO に対し負の相関を示した。*V. v.* も同様に、降水量、海水水温に対し正の相関を示し、塩分に対し負の相関を示したが、DO では無相関であった。しかしながら、*V. p.* は、降水量およびDO に対し相関は認められなかったが、*vvh* および *V. v.* と同様に水温に対し正の相関、塩分に対し負の相関が認められた。一方、pH および生菌数はいずれのMPN 値に対し相関は認められなかった(表4)。

D. 考察

本研究では、近年研究が進められているが、その生態について未だ不明な点が残されている *V. v* と食中毒菌としてよく知られる *V. p* を比較対照として用い、各種環境因子との係わり合いについて調査し、比較した。

その結果、海水塩分および水温に対し、*V. p* と同様に *V. v* もまた相関があることが推定され、*V. p* と比較し、*V. v* はより低い塩分環境を好む傾向があった。これは、*V. p* の好適発育塩分環境より *V. v* が低塩分環境を好適とすることが示唆された。

これまで、*V. v* 感染症の患者発生と夏季の長雨の影響が推測されていたが、確認されていなかった降水量との相関について、本調査では *V. v* と降水量と相関が認められた。これは、降水量の増加および塩分の低下が、*V. v* の増加に関与していることが考えられ、*V. v* の増加要因の一つとして夏季の降水量の増加との関係が示唆されるものであった。一方、*V. p* は相関が認められなかったことより、*V. v* よりも降水量の関与が低いものと推定された。

DO は *vvh* のみ相関が認められたが、環境中の酸素濃度が *V. v* の発育に対し、どのような影響を与えているのかについて、今後、モデル実験で確認する必要があると思われる。

これまで数多くの環境因子の検査法やデータが示され、赤潮発生のメカニズム解明や環境汚染度の指標として用いられてきた。現在の *V. v* に関する報告でも、それらを応用し、水温、塩分およびクロロフィル A などの環境因子と *V. v* 増加の影響について示唆した報告があるものの未だ *V. v* と環境因子との関係は不確かである。

海水などの環境は複雑な係わり合いがあるため、今後、環境因子のスト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 *V. v* の生態との関係が明らかにされることが期待される。

E. 参考文献

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。

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 17 年度総括・分担研究報告書、p95-130 平成 18 年 3 月。

WHO/FAO: Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters, Interretative Summary and Technical Report, 2005.

Walter B. Hill *et al*: Polymerase Chain Reaction Identification of *Vibrio vulnificus* in Artificially Contaminated Oysters. Appl. Environ. Microbiol., 57: 707-711, 1991.

F 研究発表

1 論文発表

特に無し

2 学会発表

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.

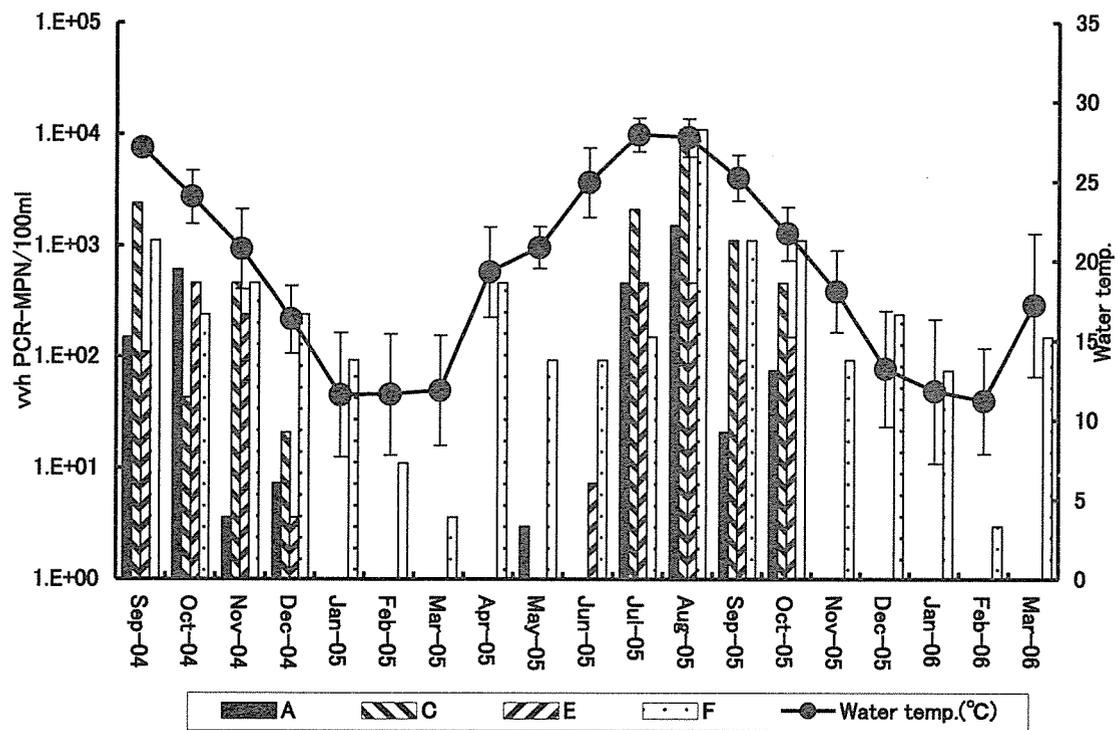


図1 採取地点A-EのPCR(vh)-MPN値と水温平均値の推移(H17年度報告書より)

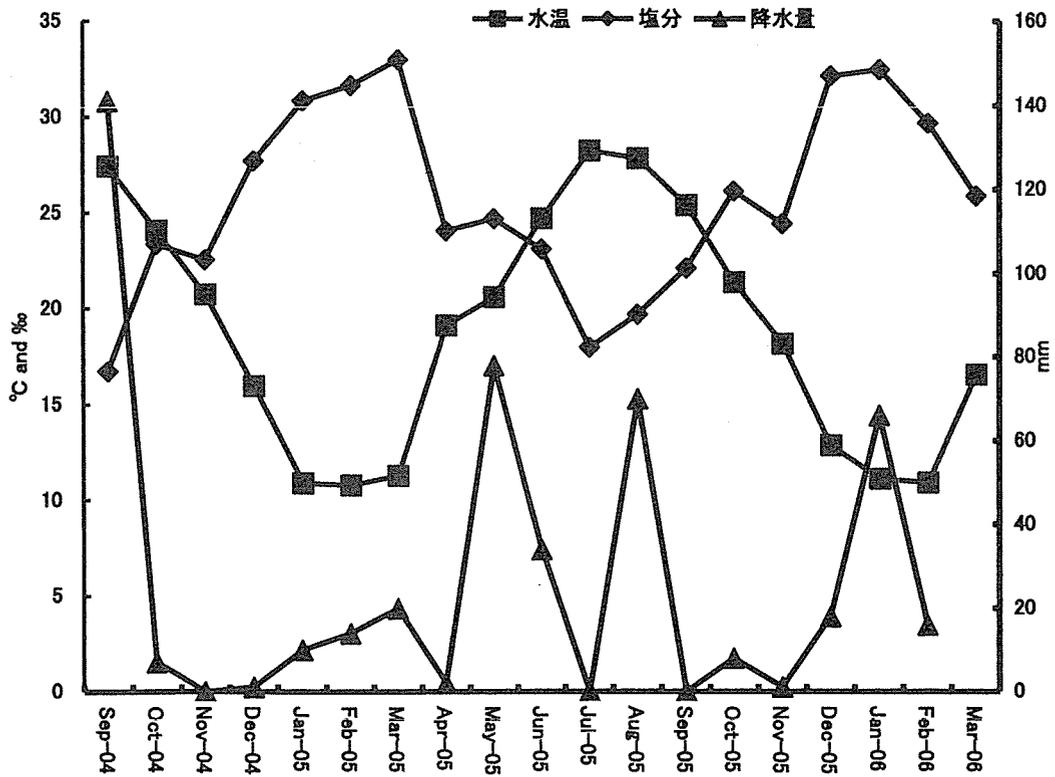


図2 採取7地点の水溫、塩分および降水量の平均値の推移 (n=133)

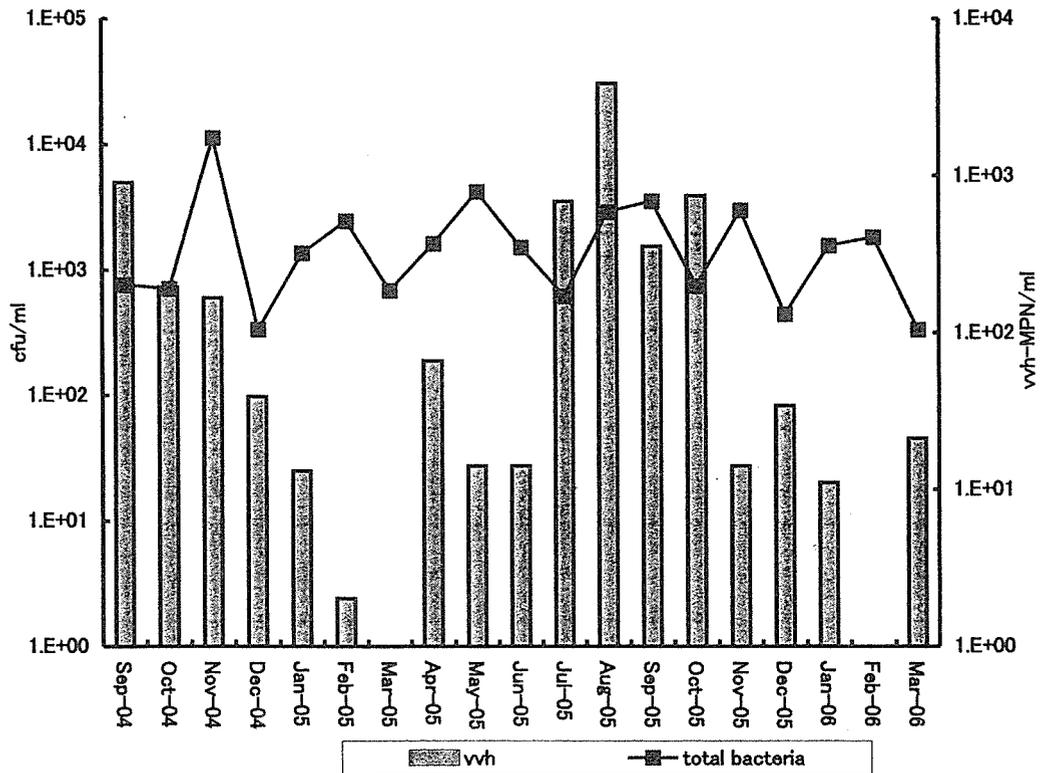


図3 採取7地点のPCR(vvh)-MPN値および生菌数の平均値の推移 (n=133)

図4 PCR(vwh)-MPN値による9段階区分における水温および塩分の関係 (n=168)

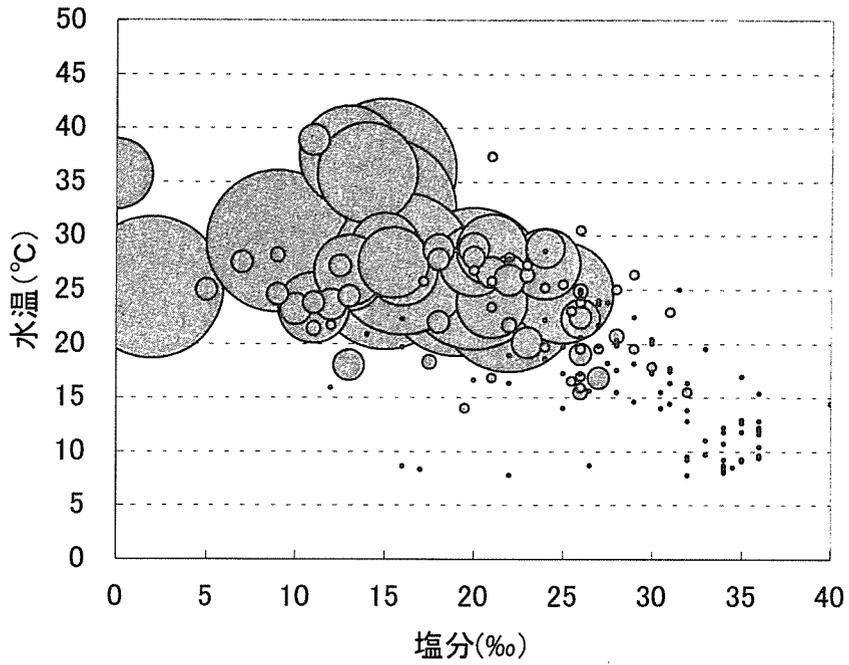


図4-A PCR(vwh)-MPN値と水温・塩分

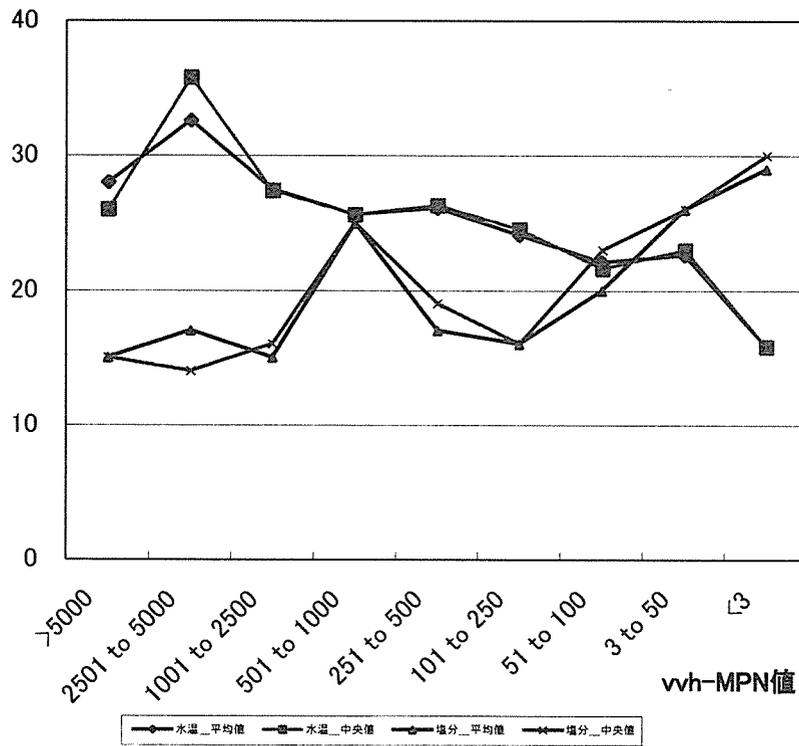


図4-B PCR(vwh)-MPN値と水温・塩分の平均値および中央値の推移

図5 *V. vulnificus*-MPN値による9段階区分における水温および塩分の関係 (n=168)

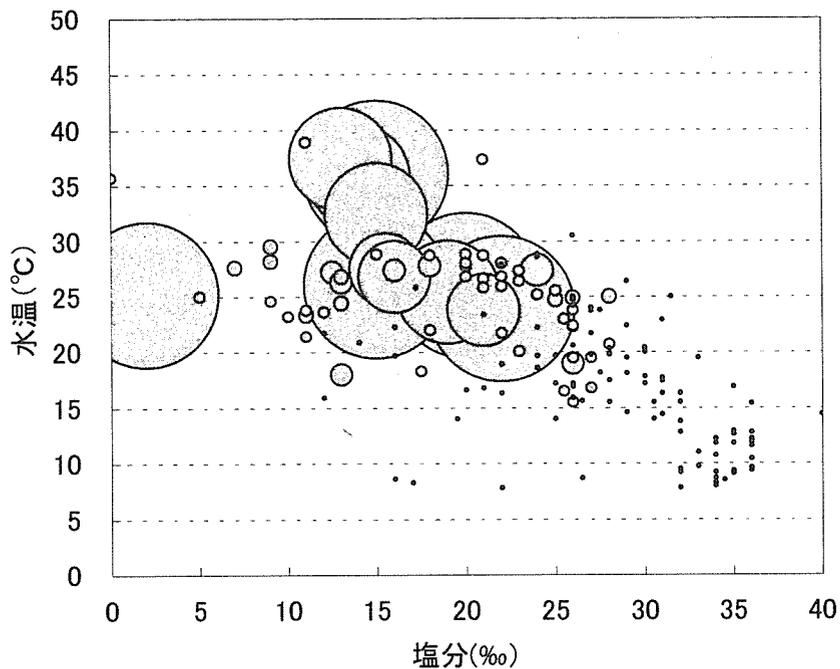


図5-A *V. vulnificus*-MPN値と水温・塩分

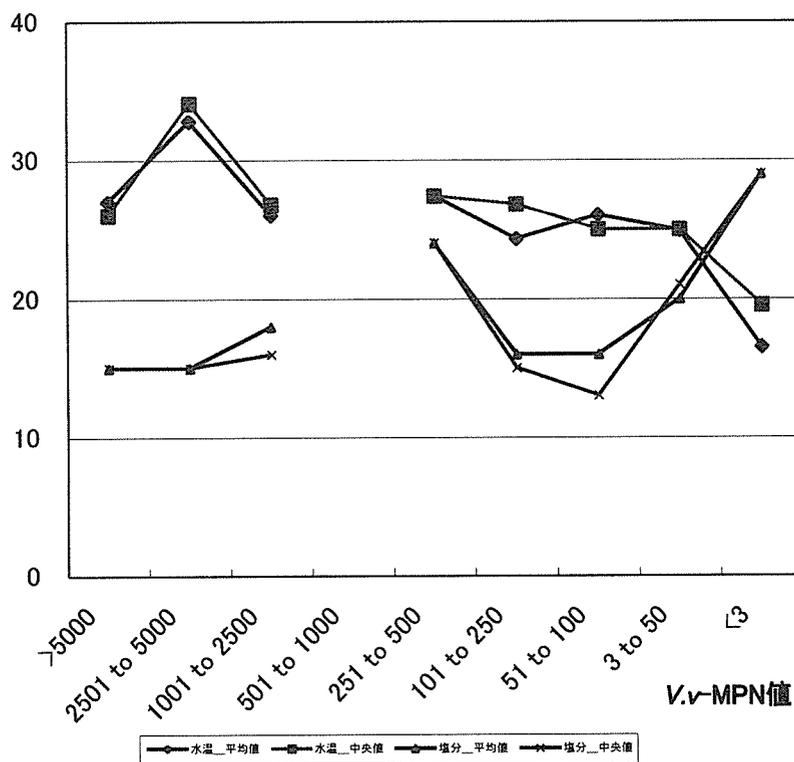


図5-B *V. vulnificus*-MPN値と水温・塩分の平均値および中央値の推移

図6 *V. parahaemolyticus*-MPN値による9段階区分における水温および塩分の関係 (n=168)

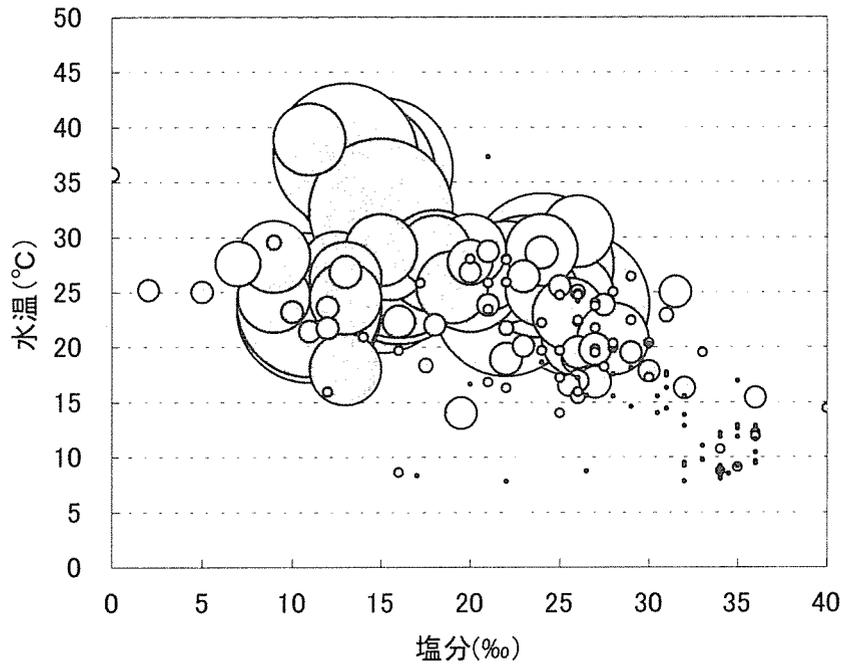


図6-A *V. parahaemolyticus*-MPN値と水温・塩分

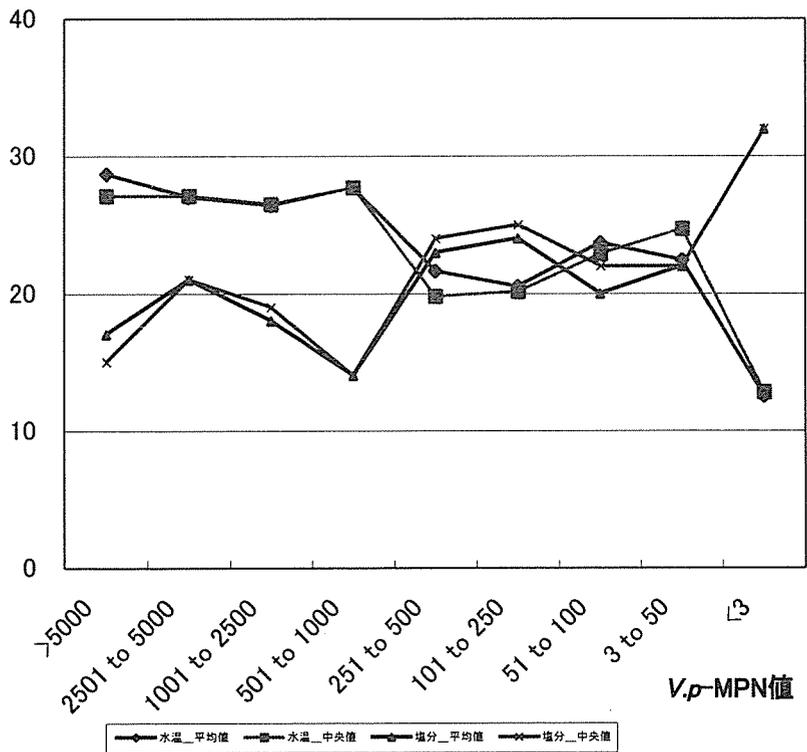


図6-B *V. parahaemolyticus*-MPN値と水温・塩分の平均値および中央値の推移