

平成 19 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)
細菌性食中毒の防止対策に関する研究
主任研究者 熊谷 進
(東京大学大学院生命科学研究科)

分担研究

腸炎ビブリオ食中毒の防止対策に関する研究
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

遺伝子検出法を用いた TDH 陽性腸炎ビブリオの検出の検討

研究要旨

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒(TDH)は本菌の主な病原性として考えられており、検出の対象マーカーとして頻繁に用いられている。近年開発され、既に多くの病原微生物の高感度で迅速な検出方法の一つとして LAMP 法があるが、本研究では開発された *tdh* 遺伝子検出 LAMP 法の特異性および感度を検討し、さらに実検体からの検出において検討した。その結果、LAMP 法の特異性および感度は PCR 法と同等であった。実検体では、PCR 法および LAMP 法の検出が一致する検体が 37 検体中 31 検体であったが、PCR 法で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認められるという判定が難しい検体が 6 検体あった。両方法の特異性および感度は同等であったことから、LAMP 法では判定が容易にできる点が長所として考えられた。今後、リアルタイム PCR 法など他の遺伝子検出法についても応用の検討が必要と考えられた。

研究協力者

小沼博隆、高橋貴一 東海大学海洋学部
池戸正成 栄研化学(株)生物化学研究所

A. 研究目的

魚介類や海水などから検出される腸炎ビブリオ(*Vibrio parahaemolyticus*)の多くは、耐熱性溶血毒(TDH)等の病原因

子を保有しない菌であり、一部の魚介類や海水に汚染した病原性の腸炎ビブリオが食中毒の原因となっている。このため、直接的に病原因子を検出する方法

が望ましい。病原因子の検出には PCR 法などの遺伝子を対象にした検出法が主に使われている。このため、TDH も直接的に食品培養液から検出できれば迅速に汚染の有無を判定できると考えられる。しかし、安価なことから最も汎用されている PCR 法とアガロースゲル電気泳動法の組み合わせは、遺伝子増幅の後に目的の大きさの PCR 産物を検出するものであり、煩雑さに加え判定までに 5 時間を要する。現在の食品の一般検査では培養による腸炎ビブリオの分離の後に病原因子の保有の確認を行っており、遺伝子検査の導入は食中毒原因究明のための検体や一部の機関でしか行われていない。本研究では、遺伝子検査の中では試薬調整が簡易で、その反応原理に由来して特異性の高い LAMP 法を使った TDH 検出を実検体で検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

海洋細菌である *Vibrio* 属および *Grimontia* 属菌 (表1) を対象に LAMP 法による TDH 検出の特異性を試験した。各菌株は 2.0% (W/V) 食塩加 BHI ブロスに接種し、37°C 18 時間培養した。その培養液を用いて後述の PCR 法による *tdh* 遺伝子検出、RPLA 法 (デンカ生研) による TDH 検出、5% ヒ

ト赤血球加我妻培地による神奈川現象 (溶血反応) の確認および LAMP 法による *tdh* 遺伝子検出を行った。また、*tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオ培養液を 10 段階希釈して *tdh* 遺伝子検出の PCR 法および LAMP 法での検出特異性および感度の試験に用いた。

2. 供試検体

2007 年 8 月から 11 月に、東京都内で購入したアオヤギ 37 検体について腸炎ビブリオの検出を行った。検体を購入後、室温で 2 時間以内に研究所へ輸送し、15°C で保管し 5 時間以内に試験に供試した。

3. 腸炎ビブリオの分離

ストマッカー袋に入れたアオヤギ検体 25 g にアルカリペプトン水 (日水製薬) 225 ml を加え、35-37°C で 18 時間培養した。増菌培養液 10 μ l をクロモアガー・ビブリオ培地に直接塗抹し、35-37°C で 18 時間培養した。生育したクロモアガー・ビブリオ培地上のコロニーを観察し、腸炎ビブリオと思われる藤色のコロニーを釣菌し糖分解性試験、硫化水素生産性試験、塩分濃度耐性試験および *toxR* 遺伝子を標的にした PCR 法を行い確定した。糖分解性試験に 2% NaCl 添加 Triple Sugar Iron Agar (TSI) 半斜面培地、また、塩分濃度耐性試験に NaCl 添加 Nutrient Broth (NB) を使用した。分離し

た藤色のコロニーを釣菌し、0%、3%、7%および8%NaCl添加NB培地に浸した後、TSI培地に画線および突刺し、それぞれ35°Cで18時間培養を行った。腸炎ビブリオの典型的な性状はNB培地において、0%塩濃度で生育せず、3%、7%および8%塩濃度で生育し、2%NaCl添加TSI半斜面培地において、斜面部が赤色、高層部が黄色を示す。また、各コロニーを腸炎ビブリオ *toxR* 遺伝子を対象にしたPCRに供試した。PDR産物は3%アガロース (NuSieve 3:1 agarose: Cambrex Bio Science Rockland) にて電気泳動し産物の大きさの確認を行った。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。

4. DNA抽出方法

増菌液1mlおよび0.1mlを10,000 × gで10分間遠心後、上清を除き沈殿に滅菌蒸留水を加え再浮遊させた。滅菌蒸留水量は、増菌液1mlには0.1ml (これを10倍濃縮とする)、増菌液0.1mlには1ml (これを10倍希釈とする)とした。その後、100°Cで5分加熱し、10,000 × gで5分遠心して得られた上清をTemplate DNAとした。また、クロモアガー・ビブリオ培地上に生育した藤色のコロニーおよび2%NaCl添加TSA培地

に生育したコロニーは、滅菌蒸留水0.1mlにコロニーを適当量浮遊させ、100°Cで10分間加熱し、DNAを抽出し、10,000 × gで5分遠心して得られた上清をTemplate DNAとした。

5. *tdh* 遺伝子検出PCR法

Template DNAの調整のために、培養液1mlおよび0.1mlを高速遠心(6,000 rpm以上10分)し、上清を捨て沈殿に滅菌蒸留水を加え再浮遊させた。滅菌蒸留水量は、培養液1mlには0.1ml (10倍濃縮)、培養液0.1mlには1mlとし(10倍希釈)、使用時まで-30°Cで保存した。PCRはTadaらの方法 (Molecular Cellular Prob. 1992, 6: 477-487) によって行い、反応試薬液45 μlにTemplate DNA 5 μlを加え計50 μlの反応とした。PCR条件は、熱変性94°C1分、アニーリング55°C1分、伸長72°C1分を1サイクルとし、35サイクルとした。得られたDNA増幅液を泳動し *tdh* 遺伝子の確認を行った。

6. RPLA法

逆受け身ラテックス凝集反応キット (KAP-RPLA, デンカ生研株式会社、日本) を用いた。まず、分離菌株の一白金耳量を釣菌し、5%食塩加マンニットペプトン水に接種し、35°Cで18時間培養を行った。その培養液1mlを3,000 × rpmで20分間遠心し、

上清 0.1 ml を取りサンプルとした。その後、V型マイクロプレートに希釈液 25 μ l を分注し、最前列の穴にサンプル 25 μ l を滴下した。同一サンプルについて4段目まで2倍段階希釈を行った。同様に陽性コントロールとして対象耐熱性溶血毒を用いて、上記と同様の操作を行った。さらに、感作ラテックスをそれぞれの系列に 25 μ l ずつ滴下して液を均一になじませ、18 時間室温で静置後に結果の判定を行った。結果の判定は、V型マイクロプレートを黒い台の上に置き、上から各穴のラテックス沈降像を肉眼で観察し、凝集を確認できたサンプルを陽性とした。

7. *tdh* 遺伝子検出 LAMP 法

4種類の *tdh* 特異的プライマーが入った Reaction Mix を含む試薬 21 μ l のうち 20 μ l を Loopamp 反応チューブに分注し、増菌 1 の増菌液から抽出した DNA を Template DNA として 5 μ l を加え、計 25 μ l とし、濃度測定装置 (Loopamp リアルタイム濃度測定装置 : LA320C) で反応を行った。反応条件は、65°C で 1 時間の反応を行った。核酸増幅の検出は、増幅反応の副産物である白色沈殿のピロリン酸マグネシウムの濁度の変化によって行い、濁度の上昇が濃度測定装置によって確認できたものを陽性とした。陽性コントロールと

陰性コントロールを試験の際には必ず使用した (図 1)。

8. 血清型別試験

分離菌株の白金耳量を釣菌し、2%NaCl 添加 TSA に画線し 35°C で 18 時間培養を行った。生育したコロニーを用いて市販血清の説明書に従い、スライド凝集法による K 型別試験および O 群別試験を行った。

C. 結果

1. *tdh* 遺伝子検出 LAMP 法の特異性および感度

特異性を検討した結果、腸炎ビブリオの神奈川現象陰性の 10 株は、PCR 法および RPLA 法で *tdh* および TDH 陰性であり、LAMP 法でも陰性であった。一方、神奈川現象陽性の 31 株は、PCR 法および RPLA 法で *tdh* 遺伝子および TDH 陽性であり、LAMP 法でも陽性であった。腸炎ビブリオ以外の *Vibrio* 属菌である *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus* および *Vibrio vulnificus* や *Grimontia hollisae* は、PCR 法で *tdh* 陰性であり、LAMP 法でも *tdh* 陰性であった。

Tdh 陽性腸炎ビブリオ 5 株を用いて感度を検討した結果、1

反応あたり菌数が 42~9 cfu および 4.2~0.9 cfu では 10 反応試験中全試験で陽性であった (表 2)。また、0.4~0.1 cfu では 10 検体中 PCR 法が 4 検体、LAMP 法が 3 検体陽性であった。

2. アオヤギ検体での腸炎ビブリオ検出

供試した 37 検体中の 29 検体 (78.4%) で腸炎ビブリオが分離された (表 3)。産地別では、北海道産は 34 検体中の 26 検体 (76.5%)、千葉県産は 2 検体中の 2 検体 (100%)、愛知県産は 1 検体中の 1 検体 (100%) で腸炎ビブリオが分離された。検体の入手の月別では、8 月は 5 検体中の 5 検体 (100%)、9 月は 12 検体中の 12 検体 (100%)、10 月は 16 検体中の 12 検体 (75%)、11 月は 4 検体中の 0 検体 (0%) で腸炎ビブリオが分離された。

3. アオヤギ検体での *tdh* 遺伝子検出

tdh 遺伝子を対象とした PCR 法では、全検体である 37 検体中の 6 検体 (16.2%) で *tdh* 遺伝子の増幅と同等の大きさの明瞭な遺伝子産物が検出された (図 2 のレーン 3 および表 3)。さらに、他の 5 検体で、不明瞭であるが *tdh* 遺伝子の増幅と同等の大きさの遺伝子産物が検出されたが、目的の大きさ以外の産物が主として認められまた多数の不明瞭な産物も認められた (図

2 のレーン 4 および表 3)。

また、*tdh* 遺伝子を対象とした LAMP 法では、37 検体中の 6 検体 (16.2%) で *tdh* 遺伝子が検出された (表 3)。本研究では、*tdh* 遺伝子を対象とした PCR 法および LAMP 法の両方法で *tdh* 遺伝子が検出された検体を *tdh* 遺伝子陽性検体としたので *tdh* 遺伝子陽性検体は 6 検体であった。検体の産地別では、北海道産は 34 検体中の 6 検体 (17.6%)、千葉県産は 2 検体中の 0 検体 (0%)、愛知県産は 1 検体中の 0 検体 (0%) で *tdh* 遺伝子が検出された。検体の月別では、8 月は 5 検体中の 0 検体 (0%)、9 月は 12 検体中の 4 検体 (33%)、10 月は 16 検体中の 2 検体 (12.5%)、11 月は 4 検体中の 0 検体 (0%) で *tdh* 遺伝子が検出された。

4. *tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオの分離とその菌株の血清型

tdh 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオは 3 検体から分離された。いずれも PCR 法および LAMP 法で *tdh* 遺伝子が陽性結果を示した検体であった。しかし、PCR 法および LAMP 法で *tdh* 遺伝子が陽性であった別の 2 検体では *tdh* 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオが分離されなかった。また、LAMP 法で *tdh* 遺伝子陰性であり PCR 法で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認め

られた5検体でも、*tdh* 遺伝子陽性菌の腸炎ビブリオは分離されなかった。

tdh 遺伝子陽性菌株の血清型は、04:K37、04:K38、04:KUT、OUT:K37、OUT:K38、OUT:KUTであり、O群は04およびOUTであり、K型はK37、K38およびKUTで類似していた。*tdh* 遺伝子陰性菌株の血清型は、011:K51、04:KUT、06:KUT、010:KUT、011:KUT、OUT:K37 および OUT:KUTであった。

D. 考察

本研究では、アオヤギからの *tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオを検出するために *tdh* 遺伝子検出PCR法およびLAMP法を用いたが、その結果に差が認められた。両方法ともに、37検体中6検体で *tdh* 遺伝子が検出された。しかし、PCR法では、*tdh* 遺伝子と同等の大きさの増幅産物が若干認められるものの、その他の多種類の増幅産物も認められ *tdh* 遺伝子以外の遺伝子が増幅されていたと考えられるものが5検体あった。PCR法は最も汎用されている微生物遺伝子検出法であるが、増幅産物をアガロースゲル電気泳動法後に目視で産物の泳動像を観察し判定する方法が主流であり、その際に判定が難しい場合がある。本研究では、PCR法とLAMP法の特異性と感度が同等で

あることが確認された。このことから、実検体で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの増幅産物が若干認められたが、その他の多種類の増幅産物が認められ *tdh* 遺伝子以外の遺伝子が増幅されていたものは、検体中の微量な *tdh* 遺伝子がLAMP法で検出されずにPCR法だけで検出されたとは考えられなかった。今後さらに、PCRでの増幅産物の解析を行うなど検討し、確認が必要である。

LAMP法の特徴に、65℃で60分間の反応で判定が可能で、試薬の調整が簡易であり、PCR法で必要である電気泳動が省略できることがあげられる。今後、検体数が多く迅速検査を必要とする場合に大いに活用可能であることが考えられた。腸炎ビブリオ食中毒患者分離株のほとんどが *tdh* または *trh* 遺伝子を保有する病原性菌株であるのに対し、環境中に分布する病原性株の頻度は極めて低く、魚介類などの環境サンプルから病原性菌株を分離するのは困難である。しかし、本研究では37検体中6検体から *tdh* 遺伝子が検出された。このことから、遺伝子検出法を用いることによって、魚介類などの環境サンプルからの *tdh* 遺伝子を保有する腸炎ビブリオの検出が効率よく行えると考えられた。今後さらに、リアルタイムPCR法など他の遺伝子検出法につい

ても応用の検討が必要と考えられた。

E. 結論

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒 (TDH) は本菌の主な病原性として考えられており、検出の対象マーカーとして頻繁に用いられている。近年開発され、既に多くの病原微生物の高感度で迅速な検出方法の一つとして LAMP 法があるが、本研究では開発された *tdh* 遺伝子検出 LAMP 法の特異性および感度を検討し、さらに実検体からの検出において検討した。その結果、LAMP 法の特異性および感度は PCR 法と同等であった。実検体では、PCR 法および LAMP 法の検出が一致する検体が 37 検体中 31 検体であったが、PCR 法で *tdh* 遺伝子と同等の大きさの産物が弱い泳動像として認められ他の増幅産物が主として認められるという判定が難しい検体が 6 検体あった。両方法の特異性および感度は同等であったことから、LAMP 法では判定が容易にできる点が長所として考えられた。今後、リアルタイム PCR 法など他の遺伝子検出法についても応用の検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

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. International Journal of Hygiene and Environmental Microbiology. *In press.*

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

特になし

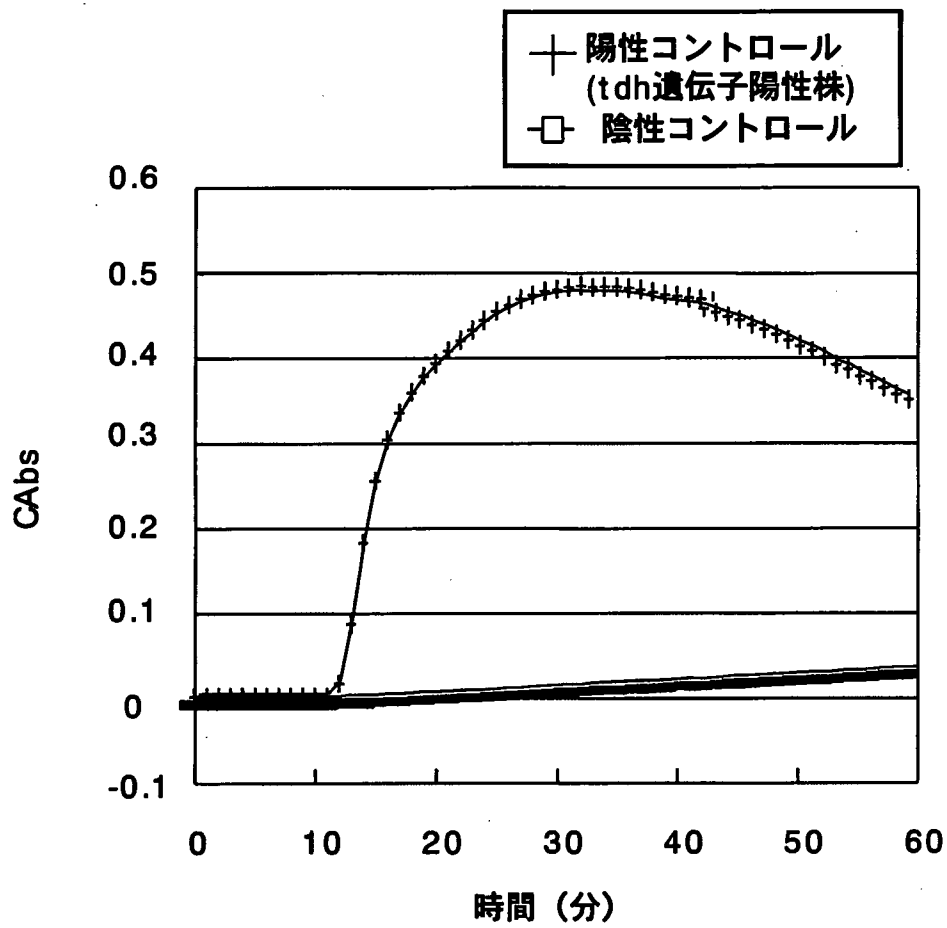


図1 LAMP法による tdh 遺伝子の検出

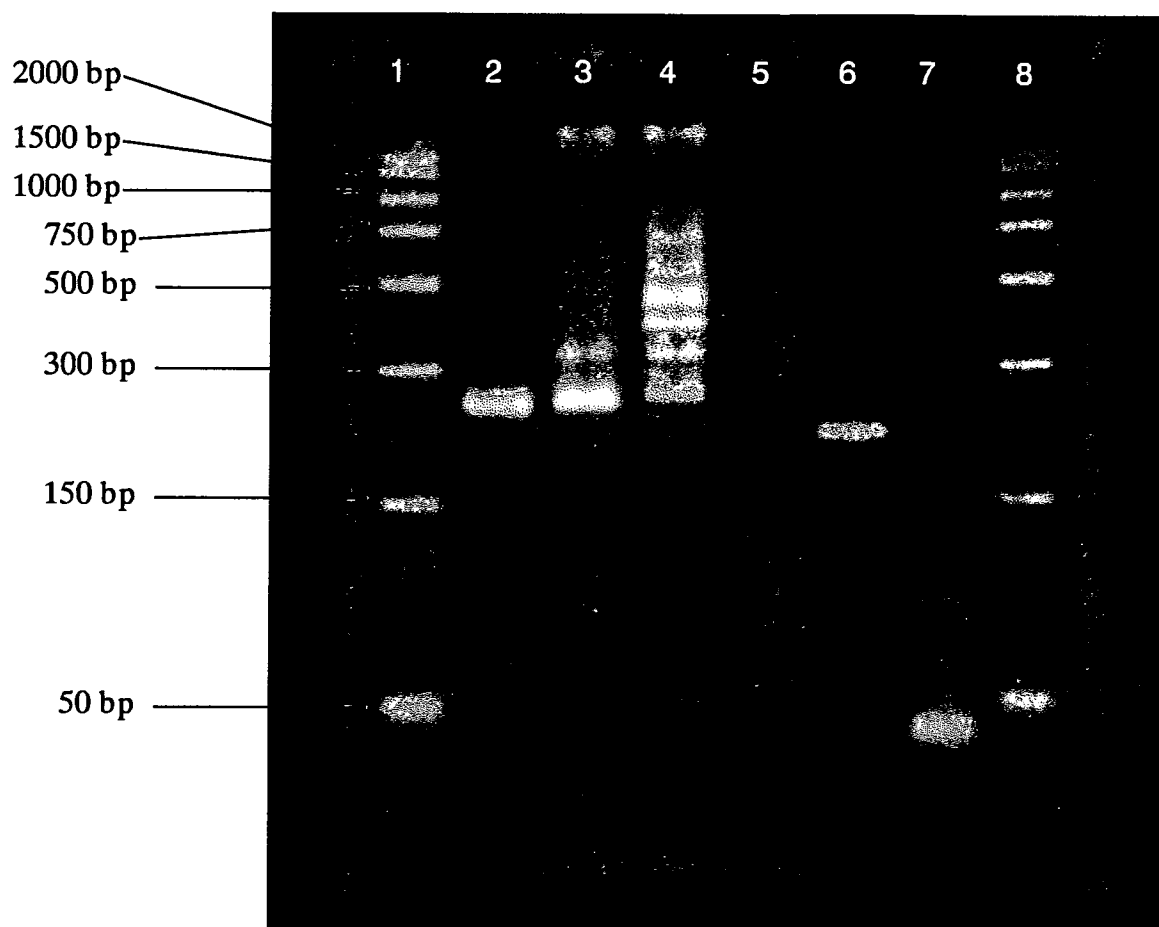


図2 *tdh*及び*trh*遺伝子を対象としたPCR法

- レーン1: マーカー
- レーン2: 陽性コントロール (*tdh*遺伝子陽性菌株)
- レーン3: 検体番号17番 (*tdh*遺伝子陽性)
- レーン4: 検体番号35番 (*tdh*遺伝子偽陽性)
- レーン5: 陰性コントロール
- レーン6: 陽性コントロール (*trh*遺伝子陽性菌株)
- レーン7: 陰性コントロール
- レーン8: マーカー

表1 *tdh*遺伝子検出LAMP法の特異性の検討

菌種	菌株数	<i>tdh</i> 遺伝子検出			
		神奈川現象	PCR法	RALA法	LAMP法
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	-	-	-	-
	31	+	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	NT	-	NT	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	1	NT	-	NT	-
<i>Vibrio cholerae</i>	31	NT	-	NT	-
<i>Vibrio damsela</i>	1	NT	-	NT	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	3	NT	-	NT	-
<i>Vibrio furnissii</i>	1	NT	-	NT	-
<i>Vibrio metschnikovii</i>	2	NT	-	NT	-
<i>Vibrio mimicus</i>	5	NT	-	NT	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	NT	-	NT	-
<i>Grimontia hollisae</i>	1	+	+	-	+

表2 *tdh*遺伝子検出LAMP法の感度の検討

	菌株培養液の希釈倍数		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
菌数 (cfu) /反応	42-9	4.2-0.9	0.4-0.1
PCR法 (陽性反応数/試験数)	10/10	10/10	4/10
LAMP法 (陽性反応数/試験数)	10/10	10/10	3/10

表3 *tdh*遺伝子検出と腸炎ビブリオ分離の結果

検体番号	腸炎ビブリオの 分離	PCR法での <i>tdh</i> 遺伝子 検出	LAMP法での <i>tdh</i> 遺伝子 検出	<i>tdh</i> 遺伝子陽性菌株 の分離
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	-	-
4	+	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
8	+	+	+	-
9	+	-	-	-
10	+	+*	-	-
11	+	+*	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	-	-
14	+	+	+	+
15	+	-	-	-
16	+	+	+	NT
17	+	+	+	+
18	+	-	-	-
19	+	+	+	-
20	+	+	+	+
21	+	-	-	-
22	+	-	-	-
23	+	+*	-	-
24	+	-	-	-
25	+	-	-	-
26	-	-	-	-
27	+	-	-	-
28	+	+*	-	-
29	+	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	+*	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
陽性検体数/ 総検体数	29/37	6/37	6/37	3/37
偽陽性検体数 /総検体数	-	5/37	0/37	-

NT:試験なし

*偽陽性(*tdh*以外の産物のバンドが多数認められた)

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Poapolathep, A., Poapolathep, S., Imsilp, K., Wannapat, N., Klangkaew, N., Kusutjarit, N. and Kumagai, S.	Distribution and residue depletion of oxytetracycline in giant freshwater prawn (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>).	Journal of Food Protection	71	870-3	2008
N. Yoneyama, Y. Hara-Kudo, and S. Kumagai	Effects of Heat-degraded Sugars on Survival and Growth of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and Other Bacteria	Journal of Food Protection	70	373-7	2007
Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y.	<i>Salmonella</i> prevalence in seafood imported into Japan	Journal of Food Protection	71	In press	2008
永島江美子, 小田雄一郎, 小澤一弘, 仁科徳啓, 工藤由起子, 小沼博隆. 24:189-193, 2007.	<i>Vibrio vulnificus</i> の清水港湾内における分布	日本食品微生物学会誌	24	189-193	2007
工藤由起子	季節と食中毒 夏場の腸炎ピブリオ対策	食と健康	51(6)	6-15	2007



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Int. J. Hyg. Environ. Health ■ (■■■■) ■■■-■■■

International Journal
of Hygiene and
Environmental Health

www.elsevier.de/ijheh

Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in seawater

Akira Kamio^a, Yukiko Hara-Kudo^{b,*}, Jiro Miyasaka^c, Shunsuke Yahiro^c,
Hirotaka Konuma^a

^aDepartment of Oceanography, Tokai University, Shizuoka 424-8610, Japan

^bDivision of Microbiology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^cKumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Uto 869-0425, Japan

Received 11 April 2007; received in revised form 17 September 2007; accepted 19 October 2007

Abstract

The growth of *Vibrio vulnificus* in an enriched culture of seawater during the summer in Japan was monitored by a plating technique used as the culture method and a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay as the molecular method. *V. vulnificus* was detected by the real-time PCR assay in the samples of August and September but not by the culture method. *Vibrio parahaemolyticus*, however, was detected among all of the samples with both the culture method and real-time PCR assay. In the analysis of the bacterial populations in enrichment culture, it was demonstrated that the growth of *V. vulnificus* on agar media was inhibited by the rapid growth of *V. parahaemolyticus* after 4 h of incubation and the 100 times larger initial populations of bacteria other than *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*. These findings demonstrate that *V. vulnificus* detection by culture methods is a failure, and molecular methods are effective and detect *V. vulnificus* accurately.

© 2007 Published by Elsevier GmbH.

Keywords: *Vibrio vulnificus*; Real-time PCR; Detection

Introduction

Vibrio vulnificus is widely distributed in coastal and estuarine waters throughout the world and infections are reported in many countries (DePaola et al., 1994; Oliver et al., 1983; Hoi et al., 1998). Seafood was found to be related to approximately 40 fatal cases of *V. vulnificus* per year in the United States (Hlady and Klontz, 1996). In a recent surveillance of emergency medicine physicians in Japan, 425 cases of *V. vulnificus*

sepsis were estimated per year (Osaka et al., 2004). Oishi et al. (2006) studied the epidemiological and clinical characteristics of *V. vulnificus* infections reported in Japan from 1975 to 2005. They identified 185 cases using medical article search engines. Approximately 40% of the cases were reported in four prefectures around the Ariake Sea in Kyushu, which is in the southern part of Japan. Therefore, we have been trying to detect *V. vulnificus* from the seawater by culture methods and real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. However, we noticed that *V. vulnificus* was not detected in seawater using a technique of enrichment followed by culture methods, but was detected by real-time PCR assay. Subsequently we have monitored the growth

*Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 1141; fax: +81 3 3700 9527.

E-mail address: ykudo@nihs.go.jp (Y. Hara-Kudo).

during enrichment by culture methods, but by a real-time PCR assay.

In this study, we sorted the bacteria in seawater samples into three classifications, *V. vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* and other bacteria, and enumerated the bacteria numbers by using a culture method and real-time PCR assay (Lyon, 2000).

To detect or identify *Vibrio* species, several genes that reflect the phylogenetic relationship, such as the *ToxR* gene (*toxR*), are commonly used. The *toxR*, which codes for a trans-membrane DNA-binding regulatory protein, is present on the ancestral chromosome (Provenzano et al., 2000). However, a partial sequence of *toxR* is different among *Vibrio* species. The different sequence of *toxR* for each *Vibrio* species has been used as an effective marker for the identification of *V. parahaemolyticus* (Kim et al., 1999) and *V. vulnificus* (Takahashi et al., 2005a, b). In this study, real-time PCR assays for *V. vulnificus* (Takahashi et al., 2005a, b) and *V. parahaemolyticus* (Takahashi et al., 2005a, b) were used.

Because 9–15% of the *V. vulnificus* strains can ferment sucrose and form yellow colonies (Tamplin et al., 1982; Cerdà-Cuellar et al., 2001) and the rest do not ferment sucrose but rather form green colonies on thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS) medium, it is impossible to distinguish *V. vulnificus*. Recently, chromogenic agar media such as CHROMagar *Vibrio* (CV; CHROMagar, Paris, France) (Hara-Kudo et al., 2001) medium has been utilized for isolating *V. parahaemolyticus*. This medium is also able to distinguish *V. vulnificus* from other bacteria by forming a different colony color. In an elementary study using CV, TCBS and modified cellobiose-polymyxin B-colistin agar media for isolation of *V. vulnificus* from seafood, CV medium was better than the other media. Thus we used it to isolate *V. vulnificus* in this study.

Materials and methods

Bacterial strains

V. vulnificus (VV16; from short-neck clam) and *V. parahaemolyticus* (VP15; from scallop) were used in this study. The strains were incubated in APW at 35 °C for 8 h to use for quantification in TaqMan PCR.

Seawater samples

A total of eight seawater samples were obtained from Kumamoto and Shizuoka prefectures from July to September 2006 (Table 1). They were packed in polyethylene bottles, kept in a styrene foam box, and transferred to our laboratory at a room temperature. Culture was started within 2 days.

Culture

A portion (10 ml) of seawater sample was added to 90 ml of APW pre-warmed at 35 °C, and incubated at 35 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18 and 24 h. To quantify the number of bacteria of each time, the culture fluid was 10-fold diluted with phosphate buffered saline (PBS; Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) containing 2% NaCl. Each dilution (0.1 ml) was plated onto CV agar. The plate was incubated at 35 °C for 22 h. Blue and purple colonies were suspected as *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus*, respectively. To identify each of the bacteria species, the PCR assay targeting for *toxR*, was carried out described below. Blue colonies and purple colonies on the CV agar plate were inoculated into triple sugar iron agar medium (OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK), nutrient broth (Becton Dickinson, Sparks, MD), and nutrient broth supplemented with 3% and 8% NaCl.

Table 1. Seawater samples used in this study

Sample no.	Sampling date	Water temperature (°C)	Salt concentration (‰)	Detection of the <i>V. vulnificus</i> growth	
				Culture method	Real-time PCR assay
1	28 Jul.	30.0	13	+	+
2	4 Aug.	25.2	28	–	+
3	26 Aug.	26.4	12	–	+
4	30 Aug.	29.5	22	–	+
5	5 Sep.	28.0	25	–	+
6	12 Sep.	26.5	26	–	+
7	19 Sep.	25.5	25	–	+
8	26 Sep.	24.5	28	–	+

Please cite this article as: Kamio, A., et al., Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in.... Int. J. Hyg. Environ. Health (2007), doi:10.1016/j.ijheh.2007.10.001

DNA extraction for TaqMan PCR assay

Enrichment culture of seawater and bacterial culture were centrifuged at 10,000g for 10min. After the supernatant was removed, the pellet was re-suspended in 0.1ml of 50mM NaOH and heated at 100 °C for 10min. The solution was neutralized by adding 16µl of 1 M Tris-HCl pH 7.0 and then centrifuged at 10,000g for 10min and the supernatant was transferred to a new tube and stored at -20 °C until the TaqMan PCR assay.

TaqMan PCR

To quantify the number of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* by TaqMan PCR assay, 8h enrichment culture of *V. vulnificus* (strain no. VV16) and *V. parahaemolyticus* (strain no. VP15) were serially 10-fold diluted in APW. The DNA was extracted as described above. TaqMan PCR targeting of *toxR* of *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* was performed by the methods of Takahashi et al. (2005a, b). To determine the viable cell counts of the overnight culture, 0.1ml of the 10⁻⁴-10⁻⁷ dilutions of the culture was plated onto tryptone soya agar (TSA; OXOID Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) containing 2% NaCl in duplicate. After incubation for overnight at 35 °C, the number of colonies was counted.

Results and discussion

A total of eight seawater samples obtained from July to September 2006 in Japan (Table 1) were monitored for the bacterial growth. The growth of *V. parahaemolyticus* detected by the culture method and the real-time PCR assay was similar in all of the samples (Fig. 1a). *V. parahaemolyticus* linearly grew to 14h and stabilized thereafter. However, the growth of *V. vulnificus* was different in the different detection methods. In the sample of July 28, the population of *V. vulnificus* rapidly increased from 4 to 18h. However, at 24h, it was below the level detectable by the culture method (Fig. 1b), although *V. vulnificus* was detected by the real-time PCR assay. *V. vulnificus* might be dead by 24h. In the samples of August and September, the growth of *V. vulnificus* was almost not detected in any of the samples by the culture method (Fig. 1c). However, by the real-time

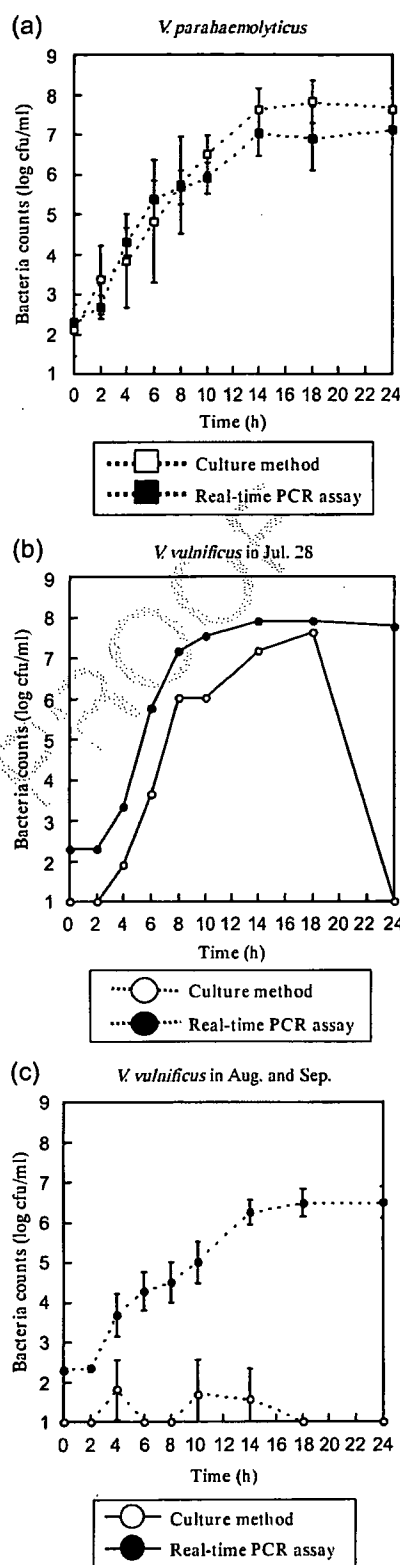


Fig. 1. Detection of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* by a culture method and real-time PCR assay. (a) *V. parahaemolyticus*: the mean of all of the samples in this study. (b) *V. vulnificus*: the sample of July 28. (c) *V. vulnificus*: the mean of the samples of August and September. Undetectable levels of the culture method and the real-time PCR assay were 1.0 and 2.3, respectively.

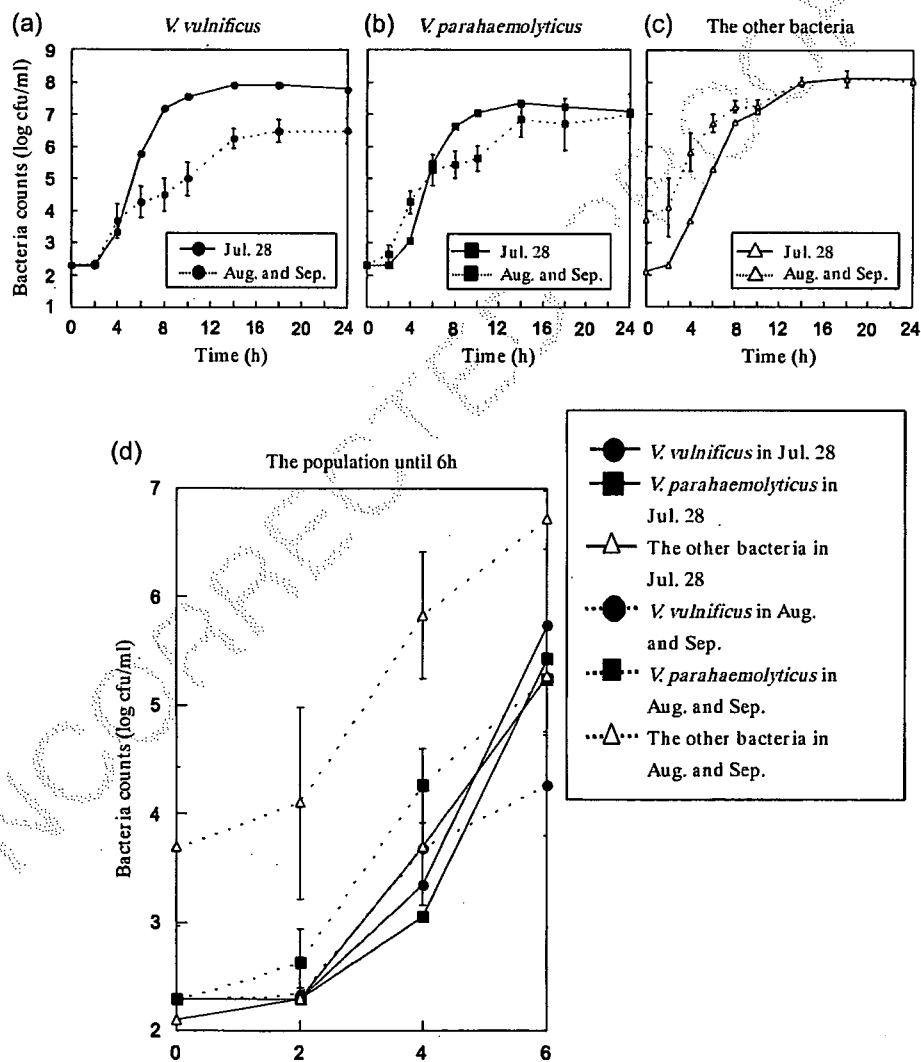
Please cite this article as: Kamio, A., et al., Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in... Int. J. Hyg. Environ. Health (2007), doi:10.1016/j.ijheh.2007.10.001

1 PCR assay, an increase of *V. vulnificus* population was
 2 detected from 4 to 24 h. The growth of *V. vulnificus* in
 3 the samples of August and September was weaker than
 4 that of July 28. To determine the reasons why the
 5 growth of *V. vulnificus* was not detected by the culture
 6 method in the samples of August and September, we
 7 more closely analyzed the monitored population of *V.*
 8 *vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and the other bacteria by
 9 the real-time PCR assay.

10 The populations of *V. vulnificus* (Fig. 2a), *V.*
 11 *parahaemolyticus* (Fig. 2b) and the other bacteria (Fig.
 12 2c) on July 28 were compared to those in August and
 13 September. In *V. vulnificus* (Fig. 2a), the values of the
 14 samples of August and September were lower after 4 h
 15 than those of the sample of July 28. In *V. parahaemo-*
 16 *lyticus* and the other bacteria, the populations had an

17 increase in the samples of July 28, and also of August
 18 and September (Fig. 2b and c). The initial population of
 19 the other bacteria in the sample of July 28 was different
 20 from the mean of the samples of August and September
 21 (Fig. 2c), although the value was similar after 8 h of
 22 incubation. The populations of *V. vulnificus* in the
 23 sample of July 28 were quite different from the mean of
 24 the samples of August and September, although the
 25 populations were similar before 6 h.

26 Therefore, the details of *V. vulnificus*, *V. parahaemo-*
 27 *lyticus* and the other bacteria until 6 h of incubation
 28 were analyzed (Fig. 2d). The populations of *V.*
 29 *vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and the other bacteria
 30 in the sample of July 28 similarly increased during the 6-
 31 h incubation. However, in the samples of August and
 32 September, there was a significant difference among the



33
 35
 37
 39
 41
 43
 45
 47
 49
 51
 53
 55
 Fig. 2. Detection of *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and the other bacteria. (a) Quantification of the number of *V. vulnificus* using real-time PCR assay. (b) Quantification of the number of *V. parahaemolyticus* using real-time PCR assay. (c) Quantification of the number of the other bacteria using the culture method. (d) The numbers of *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and the other bacteria.

populations of *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and the other bacteria. We considered the reason that the growth of *V. vulnificus* in the samples of August and September was not properly monitored by the plating method and the growth was therefore found to be weaker than that of July 28. The mean of the population of *V. vulnificus* in the samples of August and September was similar compared with the samples of July 28 until 4 h, but the population on July 28 was more than 10 times larger than) the mean of the samples in August and September at 6 h. Until 4 h, *V. parahaemolyticus* in the samples of August and September grew more than 10-fold higher than in the sample of July 28. The initial population of the other bacteria in the samples of August and September was approximately 100 times higher than that of July 28.

In the sample of July 28, *V. vulnificus* was not detected at 24 h by the plating method. As a reason, it was considered whether the bacteria was decreased or had been eradicated. By the real-time PCR assay, the population of the bacteria did not change from 18 to 24 h. Therefore it is possible that the DNA of dead bacteria may also be extracted and quantified by the real-time PCR assay. In order to enumerate only live cells, RT-real-time PCR assay may be effective, although more extraction environments to prepare the assay are required.

APW has been successfully used as an enrichment medium for pathogenic vibrios including *V. vulnificus* (Donovan and Netten 1995), although the selectability is low. Therefore, during *V. vulnificus* growth in APW, the other bacteria also grow. The rapid growth of the other bacteria might be inhibitory towards *V. vulnificus* growth. It will be necessary to develop new selective enrichment media for *V. vulnificus* to inhibit the growth of the other bacteria.

In most of samples except for July 28, the water temperature was lower than 30 °C and salt concentration was higher than 22‰. Because *V. vulnificus* is very sensitive to temperature and salt concentration (Kelly, 1982, Tilton and Ryan, 1987), it is possible that the pathogen in most of samples except July 28 was dead. However, the growth of *V. vulnificus* in the all samples of this study was detected by the monitoring using a real-time PCR assay (Fig. 1). It indicates that the real-time PCR assay detected viable *V. vulnificus* but not DNA fragment from dead cells in all the samples.

In the present study, it is demonstrated that culture methods, including enrichment in APW and plating onto agar medium, are appropriate for detecting *V. parahaemolyticus* but not *V. vulnificus* in environmental samples. Molecular methods for detecting *V. vulnificus* are available to confirm the presence in a sample, although dead cells may also be detected. In addition, it is necessary to develop more effective selective culture

methods utilizing enrichment and plating so as to better isolate *V. vulnificus*.

Uncited references

Fukushima and Seki (2004); Gulig et al. (2005).

Acknowledgment

This work was supported by a Health Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- Cerdà-Cuellar, M., Permin, L., Larsen, J.L., Blanch, A.R., 2001. Comparison of selective media for the detection of *Vibrio vulnificus* in environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 91, 322–327. 75
- DePaola, A., Capers, G.M., Alexander, D., 1994. Densities of *Vibrio vulnificus* in postharvest Gulf Coast shellstock oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 984–988. 77
- Donovan, T.J., Netten, P., 1995. Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 77–91. 79
- Fukushima, H., Seki, R., 2004. Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane. 48, 221–229. 81
- Gulig, P.A., Bourdage, K.L., Starks, A.M., 2005. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol.* 43, 118–131. 83
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S., 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5819–5823. 85
- Hlady, W.G., Klontz, K.C., 1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981–1993. *J. Infect. Dis.* 173, 1176–1183. 87
- Hoi, L., Larsen, J.L., Dalsgaard, I., Dalsgaard, A., 1998. Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 7–13. 89
- Kelly, M.T., 1982. Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Beneckea) vulnificus* occurrence in a Gulf coast environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 820–824. 91
- Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1173–1177. 93
- Lyon, W.J., 2000. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4685–4693. 97
- Oishi, H., Ura, Y., Mitsumizo, S., Nakashima, M., 2006. A collective review of *Vibrio vulnificus* infection in Japan. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 80, 680–689. 101

- 1 Oliver, J.D., Warner, R.A., Cleland, D.R., 1983. Distribution
of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in
3 the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45,
985–998.
- 5 Osaka, K., Komatsuzaki, M., Takahashi, H., Sakano, S.,
Okabe, N., 2004. *Vibrio vulnificus* septicaemia in Japan: an
7 estimated number of infection and physicians' knowledge
of the syndrome. *Epidemiol. Infect.* 132, 993–996.
- 9 Provenzano, D., Schuhmacher, D.A., Barker, J.L., Klose,
K.E., 2000. The virulence regulatory protein ToxR
mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and
11 other pathogenic *Vibrio* species. *Infect. Immun.* 68,
1491–1497.
- 13 Takahashi, H., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Kumagai, S.,
Konuma, H., 2005a. Development of a quantitative real-
time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for
detection of *Vibrio vulnificus*. *J. Microbiol. Methods* 61,
77–85.
- Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., Hara-Kudo, Y.,
2005b. Development of a quantitative real-time PCR assay
for estimation of the total number of *Vibrio parahaemoly-*
ticus in contaminated shellfish and seawater. *J. Food Prot.*
68, 1083–1088.
- Tamplin, M., Rodrick, G.E., Blake, N.J., Cuba, T., 1982.
Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two
Florida estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1466–1470.
- Tilton, R.C., Ryan, R.W., 1987. Clinical and ecological
25 characteristics of *Vibrio vulnificus* in the Northeastern
United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 6, 109–117. 27

=調査=

Vibrio vulnificus の清水港湾内における分布

永島江美子*¹・小田雄一郎*²・小澤一弘*³・
工藤由起子*⁴・仁科徳啓*^{1, 3, †}・小沼博隆*²

(*¹東海大学短期大学部食物栄養学科, *²東海大学海洋学部,
*³(株)中部衛生検査センター, *⁴国立医薬品食品衛生研究所)

(受付: 平成 19 年 6 月 8 日)

(受理: 平成 19 年 10 月 2 日)

Distribution of *Vibrio vulnificus* in Shimizu Harbor Areas

Emiko NAGASHIMA*¹, Yuuichiro ODA*², Kazuhiro OZAWA*³,
Yukiko HARA-KUDO*⁴, Tokuhiko NISHINA*^{1, 3, †} and Hirotaka KONUMA*²

(*¹Department of Food and Nutrition, Tokai University Junior College, 101,
Miyamae-cho Aoi-ku Shizuoka-shi, 420-8511; † Corresponding author)

(*²Department of Fisheries, Tokai University, 3-20-1 Orido Shimizu-ku Shizuoka-shi 428-8610)

(*³Chubu Food and Environmental safety Center, 663-3 Shima Shimada-shi 428-0007)

(*⁴Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga Setagaya-ku Tokyo, 158-8501)

Vibrio vulnificus は、腸炎ビブリオと同様に水温が 15°C 以上で増殖が可能になり、20°C を越す 6 月から 9 月では旺盛に増殖することが知られている。したがって本菌感染症はこの時期を中心に、多くの感染事例が報告される傾向にある。わが国では 1976 年に長崎で第一例が発生して以来、200 例余の感染事例が報告され、これらのうち九州地方、瀬戸内海北岸および東京湾沿岸での患者発生が目立ち、特に九州北部が全体の 50% ほどを占めている¹⁰⁾。

本菌が肝硬変などの基礎疾患を有する主に 50 歳以上の男性に感染した場合は、進入門戸の創傷部において蜂巣炎等の皮膚病変が拡大し、病変部で増殖した菌は血行性に移行して敗血症を起こし、その 50% 程度が数時間で死の転帰をとることが報告され¹²⁾、社会的に注目されている。2001 年 7 月に熊本県内で 3 名が *V. vulnificus* 感染症を発症した事例では、うち 2 名が死亡、1 名は重症に陥ったことが報告されている。本事例では、感染者 3 名はいずれも 50 歳以上の男性で肝臓疾患を有しており、発症前日にそれぞれコチの刺身、ジャク味噌、ジャクのしょうゆ漬けなどを喫食しており、これらが感染源

と考えられている⁹⁾。また 1999 年 6 月に岡山県倉敷において死亡した事例では、患者は毎日ビールを飲む 63 歳男性で肝機能の異常を呈し、発症前にニベ(スズキ目)の刺身を食べており、その後、敗血症に移行している⁷⁾。宮坂ら⁶⁾は熊本県内で *V. vulnificus* 感染症が毎年発生していることに注目し、同県内の環境汚染調査を行い、本感染症が発生する 6 月から 10 月には、海水および海泥から高率に本菌が分離されることを報告している。

V. vulnificus の感染経路は、生の魚介類の摂取による感染または潮干狩りや浜遊びなどでの創傷感染と考えられている。工藤ら⁵⁾による魚介類の汚染調査では、近畿地方で 10³ MPN/100 g 以上の汚染が 25~44%、九州地方では 10⁷ MPN/100 g 以上の汚染が 22.2% に認められ、九州地方での汚染が高いことが報告されている。しかし全国的な規模の *V. vulnificus* に関する海水汚染調査が実施された報告は見られず、日本近海における本菌の分布は不明な点が多い。そこで海水浴、釣りなど住民が海水と接する機会が多い清水港の海水、カキおよび海泥(海泥、川泥)を対象に *V. vulnificus* の汚染実態を調査した。

材料および方法

1. 材料採取方法

検体採取は 2006 年 7 月 10 日、8 月 1 日、9 月 14 日、10 月 10 日、11 月 13 日、12 月 11 日に行い、海水は 10

† 連絡先

*¹ ☎420-8511 静岡市葵区宮前町 101

*² ☎424-8610 静岡市清水区折戸 3-20-1

*³ ☎428-0007 島田市島 663-3

*⁴ ☎158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

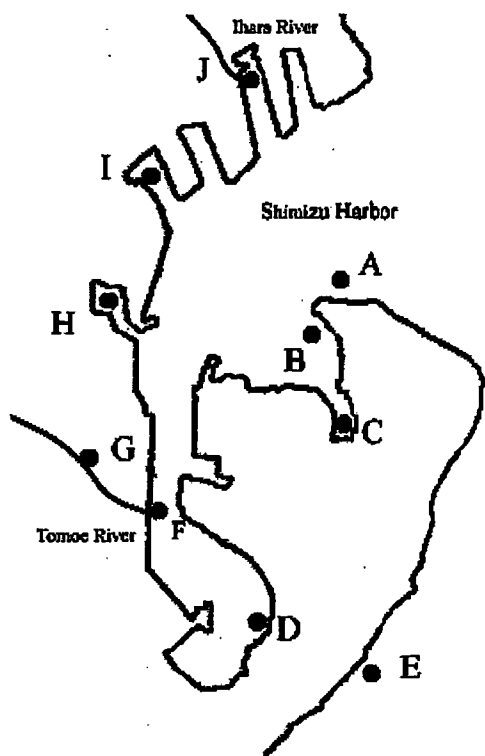


Fig. 1. Sampling points in Shimizu Harbor area.
 A: Masaki beach for sea bathing, B: Miho beach for sea bathing, C: The coast of 3797 Miho, D: The coast of Orido 4 chome, E: The coast of Orido 3 chome, F: The estuary of Tomoe river, G: Upper stream of Tomoe river, H: The coast of Minato-cho 1 chome, I: The coast of 149 Shimazaki-cho, J: The estuary of Ihara river.

カ所 A: 真崎海水浴場, B: 三保海水浴場, C: 三保 3797 番地海岸, D: 折戸 4 丁目海岸, E: 折戸 3 丁目海岸, F: 巴川河口, G: 巴川上流, H: 港町 1 丁目海岸, I: 島崎町 149 番地海岸, J: 庵原川河口の表層海水, カキは D および H の岸壁, 泥は海底 2 カ所および川底 1 カ所から採取し, 海泥は D および H の海底, 川泥は F の上流 300 M 付近 G の川底からそれぞれ採取した (Fig. 1). このうち C 地点の採取場所には, 浄水場からの浄水が流入していた. また G の巴川上流の検体採取場所は, 巴川の河口から 300 M 程度の上流であるが, 清水港湾の潮の干満の影響を受け易く, 海洋生物も生息していることから本調査報告では港湾の一部として扱った.

検体の採取時に海水はポリバケツを用いて 3 回ほど共洗った後にくみ取り, カキは港湾の岸壁に付着しているものをはぎ取り, 泥は柄杓ですくい取ったのち, それぞれ滅菌ポリ瓶および滅菌ポリ袋に入れ検体とした. 検体はクーラーボックスで 10°C 前後に保冷して研究室に持ち帰り, 直ちに供試した. 採取時の海水は, 採取直後の水温 (積水化学, SS-31A), pH (新電元, KS701) および塩分濃度 (積水化学, SS31-A) について測定した.

2. 海水, カキおよび泥の MPN 値による汚染菌数の測定法

海水, 泥およびカキの菌数は, 10 ml のアルカリペプトン水を用い MPN 法 (3 本法) により測定した.

海水は, 試料の原液あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 日水製薬) で調整した希釈液 10 ml, 1 ml, 0.1 ml および 0.01 ml (0.1 ml 以下は各希釈段階の希釈液 1 ml を用いた) を各々 3 本のアルカリペプトン水に接種した. カキと泥はそれぞれ 10 g に滅菌 PBS 90 ml を加えて 10 倍希釈したものを試料原液とした. 10 ml の試験管系列に試料 10 ml を接種する場合はアルカリペプトン水の濃度を常用の倍濃度としたものを用いた.

接種した各々のアルカリペプトン水は, 37°C, 24 時間培養後, 1 白金耳を CHROMagar Vibrio 培地 (CV 培地: 関東化学) に画線塗抹し, 発育した疑わしい集落について後述の方法によって生化学的性状を確認した. 生化学的性状検査の結果, *V. vulnificus* の性状に一致した各集落を用いて方法 4 に示す PCR 法に供試し, *V. vulnificus* が特異的に保有する溶血毒遺伝子 (*V. vulnificus* cytotoxin-hemolysin: *vvh* 遺伝子) の有無を確認した. *vvh* 遺伝子の保有が確認された MPN 試験管は, *V. vulnificus* 陽性試験管とし, それらの試験管の本数を MPN 表に照らし合わせて MPN 値を算定し, 試料の希釈倍数を乗じて菌数を求めた.

3. 分離菌株の生化学的性状試験

CV 培地上に発育した鮮やかな青色を呈し, 表面が盛り上がり, 辺縁がスムーズな *V. vulnificus* が疑われる集落を釣菌し, これを 1% 食塩加 Triple Sugar Iron 寒天培地 (TSI 培地: Oxoid) に移植して 37°C, 24 時間培養した.

培養後, 斜面部赤~黄変, 高層部黄変, ガスおよび硫化水素陰性の性状を示した菌株を, 食塩濃度を 0%, 1%, 8%, 10% に調整した Nutrient Broth 培地 (NB 培地: Becton Dickinson) に移植し, 食塩耐性試験を実施した. その結果, *V. vulnificus* が疑われた株は, カジトン培地へ移植し, PCR 用供試菌株として室温に保存した.

4. PCR による *vvh* 遺伝子の確認

PCR 用保存菌株は, *vvh* 遺伝子 (増幅産物: 519 bp) を標的遺伝子として Hill ら⁹⁾の法に従って PCR を行った. PCR 用に供試した DNA の抽出は, 保存菌株を標準寒天培地で再培養し, 発育した集落から釣菌し PBS に浮遊させた. 浮遊液は 95°C で 10 分間加熱後, 12,000 rpm, 10 分間遠心し, 得られた上澄みを抽出 DNA 液として PCR に供試した.

結 果

1. *V. vulnificus* の MPN 値

V. vulnificus の MPN 値および採取場所別平均 MPN