

は、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 55°C 1 分、 長 72°C 1 分を 1 サイクルとし、35 サイクルとした。得られた PCR 産物 (250 bp) を泳動し *trh* 遺伝子の確認を行った。

3. PFGE 解析

血清型によって大きく分け 01:K25・01:KUT、03:K6、04:K8、04:K9、04:K68 の 5 グループとその他血清型のグループについて別個に解析し型番を付した。

各菌株を LB にて短時間培養した培養液 0.1 ml に 1 %Seakem gold 0.1 ml を加え混合し、プラグキャスターに流し入れ固めた。Protainase K 溶液に固化したプラグを入れて 50°C で一 振とうし反応した。プラグを適当な大きさに切り、TE buffer および PMSF 0.01 ml を加えて 50°C で 30 分振とうを 2 回 り返した。その後、冷下で 30 分振とうし、さらに酵素バッファーに変え 冷下で 30 分振とうし、50U の制限酵素 *Not I* を加え 37°C で、また *Sfi I* については 50°C で 4 時間反応した。酵素処理したプラグを PFGE 用のアガロースゲルに め込み 14°C の泳動バッファーにて泳動した。泳動条件は *Not I* では 6 V/cm を 4-8 秒で 11 時間、8-50 秒で 9 時間、*Sfi I* では 6 V/cm を 10-35 秒で 18 時間であった。泳動後、ゲルをエチレンブロマイドにて染色し、UV 下にて泳動 を確認した。系統解析は、Fingerprinting II (バイオ・ラド) を用いて類似性係数 Jaccard としデンドログラムタイプ UPGMA を設定して行なわれた。相同性が 100% のものを同型とし、90% 以上の相同性を示した場合は同型の亜型とした。

4. 統計学的解析

国産アオヤギ、国産アカガイ、輸入アカガイおよび輸入アサリについて、各検体種間の総腸炎ビブリオ菌数の平均値の差、*tdh* 陽性腸炎ビブリオ菌数の平均値の差、*tdh* 陽性腸炎ビブリオ検出率の差の有意差検定 (Welch の 検定、Student の *t* 検定または 二乗検定) を行った。また、各検体種における *tdh* 陽性検体と *tdh* 陰性検体の総腸炎ビブリオ菌数の平均値の差、全検体での *tdh* 陽性検体と *tdh* 陰性検体の総腸炎ビブリオ菌数の平均値について、同様に有意差検定を行った。

5. 食品取り扱い営業を対象としたアンケート調査

静岡県とその近県において魚介類を取り扱う食品営業者を対象に、下記項目の質問からなるアンケート調査を実施した。アンケート用 は主に直接手渡し方式で、書き込み済み用 は 送で回収した。

6. 気象 海水温データ

気象 ホームページに掲載されている海面水温のデータより、平成 2 年から平成 20 年 (1990 から 2008 年) の黄海、東シナ海北部、東シナ海 部、 路沖、三 沖、関東の東、関東の 、日本海北東部、日本海中部、日本海 部、四国東海沖北部、四国東海沖 部、先島諸島の計 13 カ所の年次変化値を入手した。

7. 漁業統計

農林水産省が公表している漁業・養殖業生産量と冷凍・冷蔵工場の冷蔵能力の年次変化はポケット水産統計 (平成 14、21 年度版)、冷蔵水産物の在庫量の年次変化はポケット食品統計 (平成 20 年度版) よ

り入手した。

C. 結果

1. 腸炎ビブリオの分離での定性分析

全検体である 843 検体中の 718 検体 (86.4%) で腸炎ビブリオが分離され、アサリがもっとも分離率が高かった。アサリは韓国で 24 検体中全検体、中国で 8 割以上であった。ついでアオヤギ、アカガイが高かった。

2. *tdh* 陽性腸炎ビブリオの定性分析

tdh 遺伝子を対象とした PCR 法では、64 検体 (7.6%) で *tdh* 遺伝子が検出された。検体種ごとでは、輸入アカガイが最も高く約 18%、輸入アサリで約 14%、国内産アカガイで約 5%であった。

検体数の多い国内産アサリと同アジの *tdh* 陽性率はそれぞれ 9.4%と 2.9%であり、さらに輸入アサリの方がそれらよりも陽性率が高く 13.4%出会った。アカガイについても輸入品の方が国産品よりも高かった。輸入品では韓国産の方が中国産よりも *tdh* 陽性率が高かった。

3. 腸炎ビブリオの定量分析

生食用鮮魚介類の規格基準である腸炎ビブリオ菌数 100 MPN/g を超えるものは約 3 割であった。輸入アサリでは約 7 割が、アカガイでは国産、輸入および全体ともに約 2 割、国産アオヤギでは約 2 割が 100 MPN/g を超えていた。

4. *tdh* 陽性腸炎ビブリオの定量分析

定性分析で *tdh* 遺伝子陽性の 24 検体 (アカガイ 19 検体、アサリ 5 検体) について *tdh* 遺伝子陽性腸炎ビブリオ菌数を求めた。アカガイでは輸入検体で高い傾

向があり最大値は 460 MPN/10 g (46 MPN/g) であった。しかし、半数は検出限界である 3 未満であった。アサリでは最大値は、9.2 MPN/10 g (0.92 MPN/g) であったが、多くは 3.6 MPN/10 g (3.6 MPN/g) であった。各検体種での総腸炎ビブリオ数を *tdh* 陰性検体および *tdh* 陽性検体の間で比較したところ、輸入アカガイでは *tdh* 陽性検体が有意 ($p < 0.01$) に高い結果であった。全検体種を総合して比較したところ、*tdh* 陽性検体が有意 ($p < 0.01$) に高い結果であった。

5. *tdh* 陽性の腸炎ビブリオ分離菌株

tdh 遺伝子陽性の 24 検体のうち 7 検体から *tdh* 遺伝子陽性菌株が分離された。これら分離菌株の性状及び *toxR* 遺伝子の有無を試験した結果、全菌株が腸炎ビブリオの性状と一致し、*toxR* 遺伝子も検出された。TDH 毒素産生性を RPLA 法にて試験したところ、ほとんどの株で確認されたが、韓国産アサリおよび韓国産アカガイの各 1 検体から分離された 2 株では、*tdh* 遺伝子が検出されたが、TDH 毒素産生は非常に弱かった。また、血清型を確認したところ、国産魚介類では 04:KUT が最も多数の検体から、ついで 010:K52、03:K6、04:K37、などが分離され、輸入魚介類からは 03:K6 が最も多くの検体から分離された。Group specific PCR 法による解析では、03:K6 はいずれも陽性で pandemic 株であったが、03:K6 以外の株はいずれも陰性で pandemic 株ではなかった。

6. PFGE 解析

血清型 03:K6 では、平成 19 年 (2007 年) には *tdh* 陽性株が分離できなかった。平

成 20 年 (2008 年) には 4 株の *tdh* 陽性株が国産アサリ 2 検体から分離され、いずれも GS-PCR 陽性であった。PFGE 解析では、それら 2 検体からは同一の PFGE 型は得られなかった。平成 21 年 (2009 年) には韓国産アカガイから分離された 03:K6 株が制限酵素 *NotI* で 2 型、*SfiI* で a 型となった。同じく *SfiI* で a 型となったのは平成 20 年 (2008 年) 国産アサリから分離した株であったが、*NotI* では 3 型であった。ちなみに、この検体からは *tdh* 陽性株として血清型 03:K7 および 08:K21 も分離されている。また、中国産アカガイ 3 検体からも 03:K6 が分離され、すべて 11 型であった。ただし、1 検体では 11 型と 7 型の二つの型であった。一方、その他の血清型 (03:K7、04:K37、05:KUT、08:K21、010:KUT など) のグループでは、血清型が同じであれば PFGE 型が一致する結果が多かったが、010:K52 では二つの型が認められた。また、010:KUT が 010:K52 と型が一致するなど、0 または K が UT (untypable) の株が血清型が一定している株と PFGE が一致する場合もあった。

さらに、平成 9 年 (1997 年) 以降の魚貝類および患者由来の *tdh* または *trh* 陽性株、平成 13 年 (2001 年) の厚生科学研究事業での魚貝類からの分離株を含めて比較した。血清型 03:K6 では、平成 13 年 (2001 年) イワガキおよび平成 20 年 (2008 年) のアサリ分離株と平成 13 年 (2007 年) 食中毒患者株が *NotI* での PFGE が 3 型で、*SfiI* での PFGE が a 型である pandemic 株として一致した。また、平成 13 年 (2001 年) アオヤギ分離株と平成 18

年 (2006 年) 食中毒患者株が *NotI* での PFGE が 3 型で、*SfiI* での PFGE が e 型である pandemic 株として一致した。平成 13 年 (2001 年) イワガキ分離株および平成 21 年 (2009 年) 韓国産アカガイ分離株と平成 10、17、18 年 (1998、2005、2006 年) 食中毒患者株が *NotI* での PFGE が 2 型で、*SfiI* での PFGE が a 型である pandemic 株として一致した。平成 20 年 (2008 年) 国産アサリ分離株と平成 19 年 (2007 年) 食中毒患者株が *NotI* での PFGE が 10 型で、*SfiI* での PFGE が a' 型である pandemic 株として一致した。しかし、いずれの事例も 03:K6 の分離された魚介類の種類が喫食されたことは確認されなかった。血清型 04:K9 でも、平成 19 年 (2007 年) 国産アサリと平成 19 年 (2007 年) 食中毒患者株が *NotI* での PFGE が 1 型で、*SfiI* での PFGE が i 型である非 pandemic 株として一致した。これらの 04:K9 株は分離時期が 5 月と 9 月に分かれるものの同一県内での分離であり、県内でのアサリ生産地に長期に生息していた株が食中毒に関与したことも可能性として考えられる。

これらのことから、腸炎ビブリオ食中毒が非常に多く、主に 03:K6 によって発生していた頃の日本の海域での魚貝類に汚染していた同血清型株が依然として日本の海域の魚貝類に生息し、またアジアでも魚貝類を汚染し、日本に入荷されていることが示唆された。

7. アンケート調査結果

アンケート回収総数 244 施設のうち静岡県内の業者からのものが 236 占めた。

業種としては、魚介類販売業が最多を占め (35 施設)、以下、保育、福祉施設、学給食施設、飲食店、給食施設、食堂、病院、老人福祉施設の順に多かった。従業員数は 10-50 名が最も多く (87 施設)、以下、5-10 名 (57 施設)、2-5 名 (56 施設)、50-100 名 (12 施設)、2 名 (10 施設)、100-500 名 (9 施設) の順に多く、500-1000 名と 1 名が若干数であった。

食中毒 報と腸炎ビブリオ 報を知っている施設の割合は、それぞれ 239/243 と 148/239 であった。平成 13 年 (2001 年) に「生食用冷凍魚介類は腸炎ビブリオ菌数が 1 グラム中 100 個以下、「でだこ」および「でがに」中の腸炎ビブリオが陰性であること」と定められたことを知っている施設は回答総数 235 施設のうち約 1/4 を占めた。平成 13~15 年頃 (2001~2003 年頃) から、魚介類の取扱に対する指導や取締りが従来よりも強化されたと思う施設は回答総数 224 施設のうち約 2/3 を占めた。平成 13 年 (2001 年) 以降、調理場 (厨房) 施設の増改築または新築を行った施設 (45) のうち冷蔵庫を新設した施設が多数 (34) を占めた。調理器具については平成 13 年 (2001 年) 以降に改善を図った施設は回答総数 168 施設の 8 割を占め、包丁を増やし食材による使い分けを徹底した施設が半数を超えた。生鮮魚介類の保存または保管の方法に関しては、生食用魚介類は提供直前まで冷蔵するようにした施設が回答総数 134 施設の約半数を占めたが、生食用魚介類を提供しないようにした施設も 1/4 を占めた。改善した年は平成 13 年

(2001 年) が最多であった。生食用魚介類の取り扱いや調理の方法は、平成 13 年

(2001 年) 以降にまな板と包丁の洗浄を生水で頻りに行うようにした施設が回答総数 117 施設のうち 1/3 を超えたが、生食用の魚は調理後のものを購入するようにした施設も多数を占めた。いけすの管理について改善を図った施設は少数であった。従業員の衛生管理について、平成 13 年 (2001 年) 以降に検便の義務づけ、手洗い方法の定期的点検、研修の機会を設置のすべてを行うようにした施設が回答総数 178 施設のうち 1/3 を占めた。

8. 海水温の変化

海水温は、日本海中部、関東の、日本海、四国東海沖北部、四国東海沖部、東シナ海北部において平成 8 年 (1996 年) から平成 10 年 (1998 年) にかけて増加が認められた。しかし、日本海中部と東シナ海北部においてはその後数年間明らかな低下が見られず、その他の水域においても同程度の水温が認められた年が認められる。平成 8 年 (1996 年) から平成 10 年 (1998 年) にかけての海水温の増加と一致して年平均気温の増加も見られる。

D. 考察

食中毒の発生は年によって変化し単年で増減が著しく異なることは他の食中毒細菌などでも認められ、腸炎ビブリオにおいても昭和 37 年 (1962 年) 以降に変動を繰り返していた。しかし、平成 11 年 (1999 年) 以降にこれまでに見られたことがない急速な減少カーブを描いて統計

上の最小数までに減少し、平成 21 年 (2009 年) の患者数 280 名、事件数 14 件は平成 10 年 (1998 年) の患者数の約 1/40、事件数の約 1/60 であり、食中毒統計に腸炎ビブリオが原因物質として加わった昭和 37 年 (1962 年) 以来の食中毒統計上の最低の事件数であった。この現象自体が対策の効果が影響したことを状況証拠的に示唆しているが、現在の日本での魚貝類の汚染状況、食中毒発生との関連性、環境要因、食品営業者の改善事項など調査し解析を行った。

平成 19-21 年 (2007-2009 年) の調査によって、843 検体中のうち 727 検体 (86.2%) から腸炎ビブリオが分離され、*tdh* 陽性検体は 64 検体 (7.6%) を数えた。これらの結果は、2001 年の調査での国内産魚介類の腸炎ビブリオ陽性率 95.4% (165/173 検体)、*tdh* 陽性率 10% (33/329 検体) と比較して極端に減少はしてはいない。また、依然として *tdh* 陽性腸炎ビブリオを含む腸炎ビブリオの魚介類への汚染は認められ、腸炎ビブリオ食中毒の患者数および事件数の著しい減少の理由として、腸炎ビブリオ汚染率の減少を挙げることはできない。そこで、分離された *tdh* 陽性菌株の解析結果を比較すると、平成 13 年 (2001 年) の調査では全分離株が 03:K6 であったが、平成 19 年 (2007 年) の国内産の 5 検体由来株は 04、04:OUT、K37、K38、KUT 等の組み合わせであり 03:K6 は分離されず、平成 20 年 (2008 年) に分離の国内産の 2 検体由来株が 03:K6 であり 4 検体は 04:KUT、05:K17、010:K52、010:KUT であった。平成 21 年

(2009 年) では、国内産検体から分離されなかったが、輸入検体では 03:K6 が 4 検体から分離され、3 検体からは 010:KUT、01:KUT、05:KUT の各々が分離された。また、03:K6 が分離された 1 検体からは 08:K21、03:K7 が同時に分離された。総合すると近年 3 年間の 18 検体中 6 検体すなわち 1/3 が 03:K6 を保有し、2/3 が 03:K6 以外の *tdh* 陽性腸炎ビブリオであることから、魚介類での *tdh* 陽性 03:K6 の分布が減少したことが明らかになった。このことは 03:K6 による食中毒発生の減少と一致している。

魚介類での *tdh* 陽性 03:K6 の汚染頻度の減少のプロセスについては、①血清型 03:K6 は他の血清型と比べ環境・魚介類中での生残・増殖性が弱く自然界で減少された、②規格基準の設定によって鮮魚介類の衛生的な取り扱いが徹底され食中毒患者が減少し始めたために海水および魚介類の汚染が減少して食中毒が起りにくくなり、これが毎年繰り返され次第に自然界から減っていった、などが考えられる。血清型 03:K6 の生残性は以前の研究 (長谷川ら、食品衛生学雑誌、Vol. 43, p90-94) から他の血清型 (01:K56 および 04:K8) と差異がないことが示されている。一方で、本研究で行った魚貝類取り扱い業者へのアンケート結果から、平成 13 年 (2001 年) 以降、末端食品営業における低温管理と調理器具の使い分けに高い頻度での改善が認められたことから、魚貝類の取り扱いや消費方法の衛生的改善があったものと考えられた。また、①腸炎ビブリオ食中毒の激減は 03:K6 に

よるものだけでなく他の血清型によるものにも認められていること、②現状では、03:K6 以外の血清型の *tdh* 陽性腸炎ビブリオが魚介類から分離されており、*tdh* 陽性検体率も以前と変わらないにもかかわらず、これら血清型菌による食中毒発症が認められないこと、③PFGE 解析で pandemic 株の腸炎ビブリオが流行した平成 10 年 (1998 年) 前後に分離された株がいまだに国内に生息し輸入食品にも存在し、それが現在でも少数ながら食中毒を起こしていることから、平成 13 年 (2001 年) 以降 (厳密には指導を開始した平成 12 年・2000 年以降) の流通末端から消費における魚介類取り扱いの衛生的改善が食中毒減少に貢献してしたものと考えられる。

tdh 陽性の血清型 03:K6 は、平成 20 年度 (2008 年度) は国産アサリ 2 検体から計 4 株、平成 21 年度 (2009 年度) は韓国産アカガイ 1 検体、中国産アカガイ 3 検体から計 7 株が分離され、いずれも pandemic 株であったが、中国産の 3 検体からは PFGE 解析で同一の株が分離されたが、韓国産および日本産アサリからの分離株は中国産アカガイからの株とは異なる PFGE 型であった。主な血清型を 03:K6 とする pandemic 株が 90 年代に東アジアから生じて日本を含むアジアやアメリカなど多数の国に伝播したが、既に各国の環境に定着して遺伝子型が国や地域によって異なることが考えられる。本研究でも時期や購入先が異なる中国由来アカガイから同一の PFGE 型の株が分離されたことから、その型の株の定着が示

唆された。

他の血清型では、*tdh* および *trh* 陽性の 05:K17 が韓国産アサリと日本産アサリで分離され PFGE 型が一致している。また、*tdh* および *trh* 陽性の 010:K52 が韓国産アサリと日本産アジで分離され PFGE 型が一致した。このように外国産の輸入品とも PFGE で一致することがあった。日本でのアサリの養殖は韓国や中国から貝を輸入して行われていることもいわれているため、これらの国に生息する株が日本に移動し定着している可能性も考えられる。腸炎ビブリオのみならず他のビブリオ属病原菌の伝播における輸入貝類、特に貝の重要性については、今後の研究が必要である。

アカガイについては、*tdh* 陽性率が輸入品は国産の 3 倍以上高かった。流通量の細が不明であるが、検体購入時の市場での販売では輸入品が国産より圧倒的に多く見受けられ、輸入品の価格は国産の 1/2 以下であることも多く、消費されているアカガイの多くは輸入品であることが推察される。アカガイの主な輸出国は中国と韓国であるが、*tdh* 陽性率は韓国が 26.3%、中国が 13.7%と韓国が中国の 2 倍であった。これら輸入品についてさらに調査または輸入時の監視が必要であると考えられる。また、国産については東北の検体では検出されなかったが、中部・近畿での検体が 11.8%の *tdh* 陽性率であった。*tdh* 陽性株は分離されなかったが、これら検体についても今後の調査が必要と考えられた。

腸炎ビブリオ食中毒対策の中の「10℃

以下での食品の管理」の効果や衛生改善の裏付けをとるために、食品営業者を対象にアンケート調査を行った。すなわち、腸炎ビブリオ食中毒事例が平成 11 年（1999 年）以降に顕著に減少し平成 20、21 年（2008、2009 年）には 0 件を記録した静岡県に着目し、同県を中心に魚介類を取り扱う食品営業者を対象に衛生管理に関するアンケート調査を実施した。その結果、平成 13～15 年（2001～2003 年）頃から、魚介類の取扱に対する指導や取締りが従来よりも強化されたと思う施設が約 2/3 を数えたことは、平成 13 年（2001 年）に厚生労働省が打ち出した生食用鮮魚介類等の成分規格を含む一連の対策にしたがった地方自治体の指導・取り締まりの強化を反映したものと考えられる。平成 13 年（2001 年）以降、調理場（厨房）施設の増改築または新築を行った施設（45）のうち冷蔵室を新設した施設が多数（34）を占め、生鮮魚介類の保存または保管の方法に関して、生食用魚介類は提供直前まで冷蔵するようにした施設が回答総数 134 施設の約半数を占めたことは、この間、魚介類の低温管理の底が図られたことを示唆している。また、その他の衛生管理に関しても営業者による改善が図られたことは、調理器具については平成 13 年（2001 年）以降に改善を図った施設は回答総数の 8 割を占め、包丁を増やし食材による使い分けを底した施設が半数を超えたこと、生食用魚介類の取り扱いや調理の方法についても、平成 13 年（2001 年）以降にまな板と包丁の洗浄を生水で頻に行うようにした施設

が回答総の 1/3 を超え、生食用の魚は調理後のものを購入するようにした施設も多数を占めたことに見られる。しかし、いけすの管理について改善を図った施設は少数であったことから、食中毒発生において、いけすの衛生管理の重要性は比較的低いものと推察された。

市場海水の汚染実態、等の使用による保管状況など対策の行われた項目について調査データを得たが、母数が非常に少ないため判断が難しく、さらに協力を求めて調査する必要がある（細）。しかし、水産物流通に関わる冷蔵工場数の調査では、平成 10 年（1998 年）度から 20 年（2008 年）度にかけて、水産物流通に関わる冷蔵工場数は 5,830 施設から 5,738 施設へと若干減少したが、総冷蔵能力は 11,054 千トンから 11,729 千トンへと増加傾向が見られ、冷凍工場数にあっては 2,673 施設から 3,815 施設に、冷凍施設従業者数も 87,642 人から 164,564 人へと著しい増加が認められている。これらの数値は、この間、魚介類流通における低温管理の強化が図られたことを示唆している。

魚介類消費量の減少の関連性について調査した。漁業生産量はこの十数年間減少傾向にあるが、平成 10 年（1998 年）度から 19 年（2007 年）度までの沿岸漁業の生産量は約 20%、沖合漁業生産量は約 11%の減少が見られたにすぎない。また、平成 10 年度（1998 年度）から 20 年度（2008 年度）までに、国内消費向け食用生鮮・冷凍魚介類の量は約 13%（3,502 千トン 3,044 千トン）、年間一人当たり水産物

消費量も鮮魚について 13% (12,024g 10,515g)、そのうちまぐろが 21%、貝類について 32% (1,603g 1,087g)、それぞれ減少が認められているにすぎない。したがって、この間の 839 件から 17 件への腸炎ビブリオ食中毒件数の減少は、魚介類消費量の減少のみで説明はできない。

環境要因についても関連性を調査した。平成 8 年 (1996 年) から 10 年 (1998 年) にかけて気温の上昇と一致して日本近海の海水温の上昇が認められたことは、この間の腸炎ビブリオ食中毒事例の増加と一致している。しかし、その後の同食中毒の減少は海水温の変化と一致しない。したがって、平成 8 年 (1996 年) から 10 年 (1998 年) にかけての海水温の上昇は、沿岸海水の腸炎ビブリオ増殖、その結果として食中毒増加の一因であったことは否めないが、その後の食中毒減少は海水温の変化によるものではないといえる。

以上より、平成 13 年 (2001 年) に腸炎ビブリオ食中毒対策としてあげられた ① 腸炎ビブリオ汚染海水の魚介類への使用防止、② 10℃以下での流通販売、③ 生食用鮮魚介類の腸炎ビブリオ数 100 MPN/g の規格基準設定に基づき、地方自治体による指導が強化され、営業者による衛生管理の向上への努力が功を奏し、本菌汚染食品の摂取を減少させたものと考えられる。

本研究では、腸炎ビブリオ食中毒対策の効果を検証することを目標とし、主に平成 13 年 (2001 年) と平成 19-21 年 (2007-2009 年) の流通過程で採取した魚介類の腸炎ビブリオ汚染データ、食中毒発生

状況、魚貝類および食中毒患者分離菌株の解析、食品営業者の衛生改善状況、気象データなどに基づき、腸炎ビブリオ食中毒減少に対する対策の効果についての推定を得た。理想的には、腸炎ビブリオの生息環境である沿岸海域における腸炎ビブリオの生息実態、産地における汚染実態、流通市場と末端小売りにおける汚染実態のすべてについての年次データが備わっていることが望ましいが、それらデータを蓄積するには、国内の多数の地域のネットワークに基づく長期的な調査事業が必要である。本研究事業での成果が他の食中毒対策の検証への応用につながることに期待したい。

E. 結論

腸炎ビブリオ食中毒は、平成 10 年 (1998 年) までに急増し食中毒防止対策がとられた。その後、平成 21 年 (2009 年) までこれまでにない減少カーブを描き患者数が約 1/40、事件数の約 1/60 に減少し食中毒統計上の最低レベルを維持している。この激減は、この間の海水温や気温などの環境要因の変化、魚介類の消費量の変化によっては説明できない。しかし、本研究から現在でも他の血清型の *tdh* 陽性腸炎ビブリオは魚介類から分離されており、*tdh* 陽性検体率も以前と変わらないにもかかわらず、これら血清型菌による食中毒発生も起こっていないこと、PFGE 解析で pandemic 株の腸炎ビブリオが流行した平成 10 年 (1998 年) 前後に分離された株がまだに国内にも生息および輸入食品として国内に存在して

おり、腸炎ビブリオ食中毒が非常に減少した現在も食中毒を起こしていることなどから、流通末端と消費段階での魚介類取り扱いの衛生的改善が食中毒減少に大きく貢献したものと考えられる。この衛生的改善は、魚介類取り扱い食品営業者に対するアンケート調査からも伺うことができた。したがって、平成13年(2001年)に腸炎ビブリオ食中毒対策としてあげられた①腸炎ビブリオ汚染海水の魚介類への使用防止、②10℃以下での流通販売、③生食用鮮魚介類の腸炎ビブリオ数100 MPN/gの規格基準設定に基づき、地方自治体による指導が強化され、営業者による衛生管理の向上への努力が功を奏し、本菌汚染食品の摂取を減少させたものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

永島江美子, 小田雄一郎, 小澤一弘, 仁科, 工藤由起子, 小沼博隆. *Vibrio vulnificus*の清水湾内における分布. 日本食品微生物学会. 24:189-193, 2007.

工藤由起子. 季節と食中毒 夏場の腸炎ビブリオ対策. 食と健康. 社団法人日本食品衛生協会. 51巻:6-15. 2007.

Asai, Y., Kaneko, M., Ohtsuka, K., Morita, Y., Kaneko, S., Noda, H., Furukawa, I., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. *Salmonella* prevalence in seafood imported into Japan. J. Food Prot. 71:1460-1464. 2008.

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. 211(no. 5-6):518-523, 2008.

山省吾, 田雄二, 中村まき子, 工藤由起子, 三澤明, 岡本六, 瀬公三. 長崎県沿岸における *Vibrio vulnificus*の分布と環境因子. 日本獣医学会誌. 62:649-655, 2009.

Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Koima, T., Ikedo, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y. Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the Loop-mediated isothermal amplification. J. Food Prot. 72:748-754, 2009.

2. 学会発表

大塚佳代子, 齋藤志保子, 杉山寛治, 山崎省吾, 八尋俊輔, 大友良光, 田中廣行, 中川弘, 小沼博隆, 熊谷進, 小西良子, 工藤由起子. 腸炎ビブリオ食中毒が減少した日本における本菌の二枚貝等鮮魚貝類汚染状況. 第96回日本食品衛生学会学術講演会. 平成20年9月. 戸.

藤志保子, 大塚佳代子, 杉山寛治, 山崎省吾, 八尋俊輔, 大友良光, 田中廣行, 中川弘, 小沼博隆, 熊谷進, 小西良子, 工藤由起子. 二枚貝

等の鮮魚介類における腸炎ビブリオ分離状況とTDH陽性株の分子疫学的性状について. 第29回日本食品微生物学会学術総会. 平成20年10月. 広島.

山 省吾、 藤志保子、大塚佳代子、杉山寛治、八尋俊輔、大友良光、田中廣行、中川弘、小沼博隆、熊谷進、小西良子、工藤由起子. わが国における鮮魚介類の腸炎ビブリオおよびTDH産生株の分離状況. 第12回腸炎ビブリオシンポジウム. 平成20年10月. 富山.

大友良光、杉山寛治、齋藤志保子、大塚佳代子、八尋俊輔、山中葉子、山 省吾、田中廣行、川村美佐子、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 腸炎ビブリオの魚介類汚染状況とTDH陽性株の解析. 日本食品衛生学会第98回学術講 会. 平成21年10月. 館.

矢部美穂、山崎省吾、大塚佳代子、杉山寛治、齋藤志保子、八尋俊輔、大友良光、山中葉子、田中廣行、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 国内産のアジ及びアサリにおける腸炎ビブリオの汚染調査. 第30回日本食品微生物学会学術総会. 平成21年10月. 東京.

八尋俊輔、山中葉子、 藤志保子、大塚佳代子、大友良光、杉山寛治、山 省吾、田中廣行、中川 弘、小沼博隆、熊谷 進、小西良子、工藤由起子. 国内産のアジ、アサリにおける腸炎ビブ

リオおよび TDH 産生株の分離状況.
第13回腸炎ビブリオシンポジウム.
平成21年11月. 岡山

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者 名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
永島江美子, 小田雄一郎, 小澤一弘, 仁科, 工藤由起子, 小沼博隆	<i>Vibrio vulnificus</i> の清水湾内における分布	日本食品微生物学会雑誌	24 巻	189-193	2007
工藤由起子	季節と食中毒 夏場の腸炎ビブリオ対策	食と健康	51 巻	6-15	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	J. Food Prot	71 巻	1460-1464	2008
Kamio, A., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Yahiro, T. and Konuma, H	Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect <i>Vibrio vulnificus</i> in seawater	International Journal of Hygiene and Environmental Microbiology	21 巻、5-6 号	518-523	2008
Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Ko ima, T., Ikedo, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y.	Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> by the Loop-mediated isothermal amplification	Journal of Food Protection	72 巻	748-754	2009
山 省吾, 田雄二, 中村まき子, 工藤由起子, 三澤明, 岡本 六, 瀬公三	長崎県沿岸における <i>Vibrio vulnificus</i> の分布と環境因子	日本獣医 会誌	62 巻	649-655	2009
Ruriko Iibuchi, Yukiko Hara-Kudo, Akio Hasegawa and Susumu Kumagai	Survival of <i>Salmonella</i> on Plastic Surface under Dry Condition in Relation to Biofilm Formation Ability	Journal of Food Protection	印刷中		2010

長崎県沿岸における *Vibrio vulnificus* の分布と環境因子

山崎省吾^{1), 2)†} 右田雄二¹⁾ 中村まき子¹⁾ 浦 伸孝¹⁾ 工藤由起子³⁾

三澤尚明^{2), 4)} 岡本嘉六^{2), 5)} 高瀬公三^{2), 5)}

- 1) 長崎県環境保健研究センター (〒856-0026 大村市池田2-1306-11)
- 2) 山口大学大学院連合獣医学研究科 (〒753-8515 山口市吉田1677-1)
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1)
- 4) 宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)
- 5) 鹿児島大学農学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

長崎県沿岸における *Vibrio vulnificus* の分布と環境因子山崎省吾^{1), 2)†} 右田雄二¹⁾ 中村まき子¹⁾ 浦 伸孝¹⁾ 工藤由起子³⁾三澤尚明^{2), 4)} 岡本嘉六^{2), 5)} 高瀬公三^{2), 5)}

- 1) 長崎県環境保健研究センター (〒856-0026 大村市池田2-1306-11)
- 2) 山口大学大学院連合獣医学研究科 (〒753-8515 山口市吉田1677-1)
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 世田谷区上用賀1-18-1)
- 4) 宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)
- 5) 鹿児島大学農学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

(2008年8月27日受付・2009年4月23日受理)

要 約

長崎県沿岸の漁港7地点(有明海5地点, 橘湾2地点)における海水中の *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) 菌数を Most probable number (MPN)-PCR法を用いて測定し, その菌数の増減に及ぼす各種環境因子(水温, 塩分濃度, DO, COD, 総窒素量, 総リン量, クロロフィルa量)の影響を海域性および季節性を加えながら統計的に解析し, 検討した。*V. vulnificus* 菌数は, 有明海では6月から菌数上昇傾向を示し7月に最高値 ($4.50 \times 10^4 \pm 17.1$ MPN/100ml) となり, 橘湾では8月に最高値を示した。両海域での *V. vulnificus* 菌数は, 水温 ($r_s = 0.711$) および塩分濃度 ($r_s = -0.712$) との間に高い相関を認めた。またDO, 総窒素量およびクロロフィルa量と *V. vulnificus* 菌数の間には, 単回帰分析 ($R^2 > 0.1$) で低度の寄与率が認められた。*V. vulnificus* は, 有明海産魚介類からの分離率が橘湾のそれらよりも高く, 二枚貝で90%および魚類で94.1%を示し, その菌数の最高値は 10^6 MPN/100gであった。

——キーワード: 有明海, 分布, 環境因子, MPN値, *Vibrio vulnificus*.

日獣会誌 62, 649~655 (2009)

Vibrio vulnificus (以下, *V. vulnificus*) は, 腸炎ビブリオ [*Vibrio parahaemolyticus* (以下, *V. parahaemolyticus*)] やコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 等と同じビブリオ属のグラム陰性桿菌である。他のビブリオ属の多くがおもに経口感染により消化器系感染症の原因になるのに対し, *V. vulnificus* は経口および創傷部感染により原発性敗血症を引き起こす [1]。また, *V. vulnificus* 感染症は易感染性の患者に発症した場合, 急激な転帰をたどる劇症型感染症の原因菌として知られている。ただし, 健常人ではこのような感染症はまれで, 患者のほとんどに肝硬変などの慢性基礎疾患が認められる [1]。

わが国における *V. vulnificus* 感染症の多くは有明海, 東京湾および瀬戸内海の沿岸で報告されていることから [2-4], これらの地域では沿岸海水および魚介類における *V. vulnificus* の分布が調査されている [5-8]。 *V. vulnificus* は, 沿岸海水や汽水域に広く存在し, 水温が

20℃以上で旺盛に増殖し, 発育至適塩分濃度が *V. parahaemolyticus* のそれよりも低いことが明らかになってきた [5, 9-12]。しかしながら, pH, 溶存酸素 (dissolved oxygen; DO), 化学因子, 日照および降水量等の各種環境因子が *V. vulnificus* の増殖に与える影響については, いまだ不明な点が多く残されている [13]。有明海の海水における *V. vulnificus* と水温, 塩分濃度, 季節性および魚介類の汚染状況との関係は木下ら [7] の報告があるものの, その他の環境因子について調査した報告は見当たらない。

有明海は干満の差が大きく, 大潮時の干満差は約6mにおよび, 日本一の干潟を形成する特徴的な閉鎖性水域である。いっぽう, 橘湾は, 東シナ海に面し, 対馬暖流の影響を受ける比較的開放的な湾である。本調査では両海域の海水温, 塩分濃度およびその他5種の環境因子を比較しながら, 有明海の環境が *V. vulnificus* の増殖に

† 連絡責任者: 山崎省吾 (長崎県環境保健研究センター)

〒856-0026 大村市池田2-1306-11

☎0957-48-7560 FAX 0957-48-7570

E-mail: syamasaki@pref.nagasaki.lg.jp

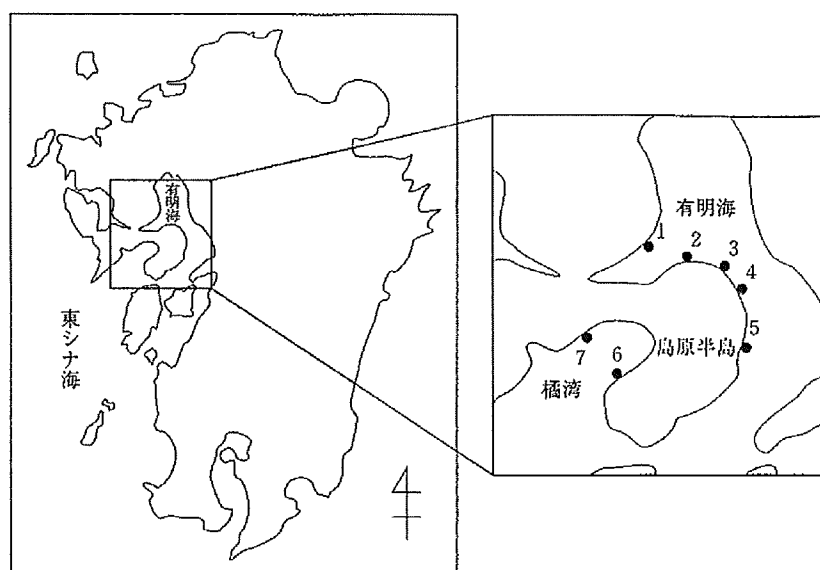


図1 長崎県の有明海および橘湾における検体採取地点

与える影響について統計学的に検証した。

さらに、同海域で採取された魚介類中の *V. vulnificus* による汚染状況を調査し、他海域との違いについて考察した。

材料および方法

検体の採取と処理：長崎県域有明海沿岸の漁港5カ所（地点1～5）および橘湾沿岸の漁港2カ所（地点6および7）の計7カ所の漁港内の表層海水を細菌検査用に100ml、環境因子検査用に1lをそれぞれ採取した（図1）。細菌分離、水温および塩分濃度は2004年8月から2007年1月に採取された210検体、DOは2004年8月から2006年3月までの140検体、化学的酸素要求量（COD：Chemical oxygen demand）、総窒素量および総リン量は2006年3月から2007年1月までの77検体、さらにクロロフィルa量は2006年6月から2007年1月までの55検体を供試した。

魚介類は、2004年から2007年の7月から10月に海水採取地域沿岸の直売所から購入した二枚貝、巻貝、甲殻類および魚類を検体とした。二枚貝、巻貝および甲殻類は剥き身の25g、魚類は鰓の25gを採取し、それぞれにアルカリ性ペプトン水（APW：日水製薬㈱、東京）225mlを加え、懸濁液を作製した。

菌数の測定：*V. vulnificus*の菌数定量は、工藤ら[6]の方法を一部変更して、*V. vulnificus-cytotoxin-hemolysin* 遺伝子による3管法のMost probable number（MPN、最確数）法にて菌数を測定した。すなわち、海水および魚介類の懸濁液を1% NaCl添加リン酸緩衝生理食塩水（PBS（-）、日水製薬㈱、東京）にて 10^{-5} まで10倍階段希釈した。海水の10mlを2倍濃度

APW 10mlに、魚介類懸濁液の10mlをAPW 10mlに、また1mlをそれぞれAPW 10mlに、および各希釈液1mlをAPW 10mlに接種し、35℃、18時間培養した。その培養液100 μ lを10,000rpm、5分間遠心後、その沈渣にTE緩衝液100 μ l添加し、100℃、5分間加熱し、DNAを抽出した。PCRの条件は、Hillら[14]の方法に従った。また、*V. parahaemolyticus*はMPN値を測定し[15]、一般生菌数は1% NaCl添加 Tryptic Soy Agar（Becton, Dickinson and Company, U.S.A.）を用いた直接塗抹法にて測定した。

環境因子の測定：水温は電子式温度計（㈱佐藤計器製作所、東京）、塩分濃度は塩分濃度屈折計S/Milli-E（㈱アタゴ、東京）を用いて測定した。DO濃度、COD、総窒素量、総リン量は日本工業規格（Japanese Industrial Standard：JIS）法およびクロロフィルa量は海洋観測指針・蛍光光度法に従い測定した。

統計解析：有明海および橘湾の各測定値についてt検定で月別測定値の差を比較した。全測定期間での *V. vulnificus* 菌数に対する *V. parahaemolyticus* 菌数、一般生菌数および各種環境因子の測定値との関係を回帰分析およびSpearmanの順位相関係数を用い調べた。単回帰分析で $R^2 > 0.1$ の回帰係数を示す環境因子を用い、調査期間の違いにより、2系統の重回帰分析を行い、 R^2 （自由度修正済み決定係数） > 0.7 を示した環境因子について偏相関係数を求めた。なお、菌数は検出下限値（3 MPN/100ml）に至らない場合は、1 MPN/100mlとし、常用対数変換後に解析に用いた。計算の結果、得られた危険率 $P < 0.05$ を有意とした。

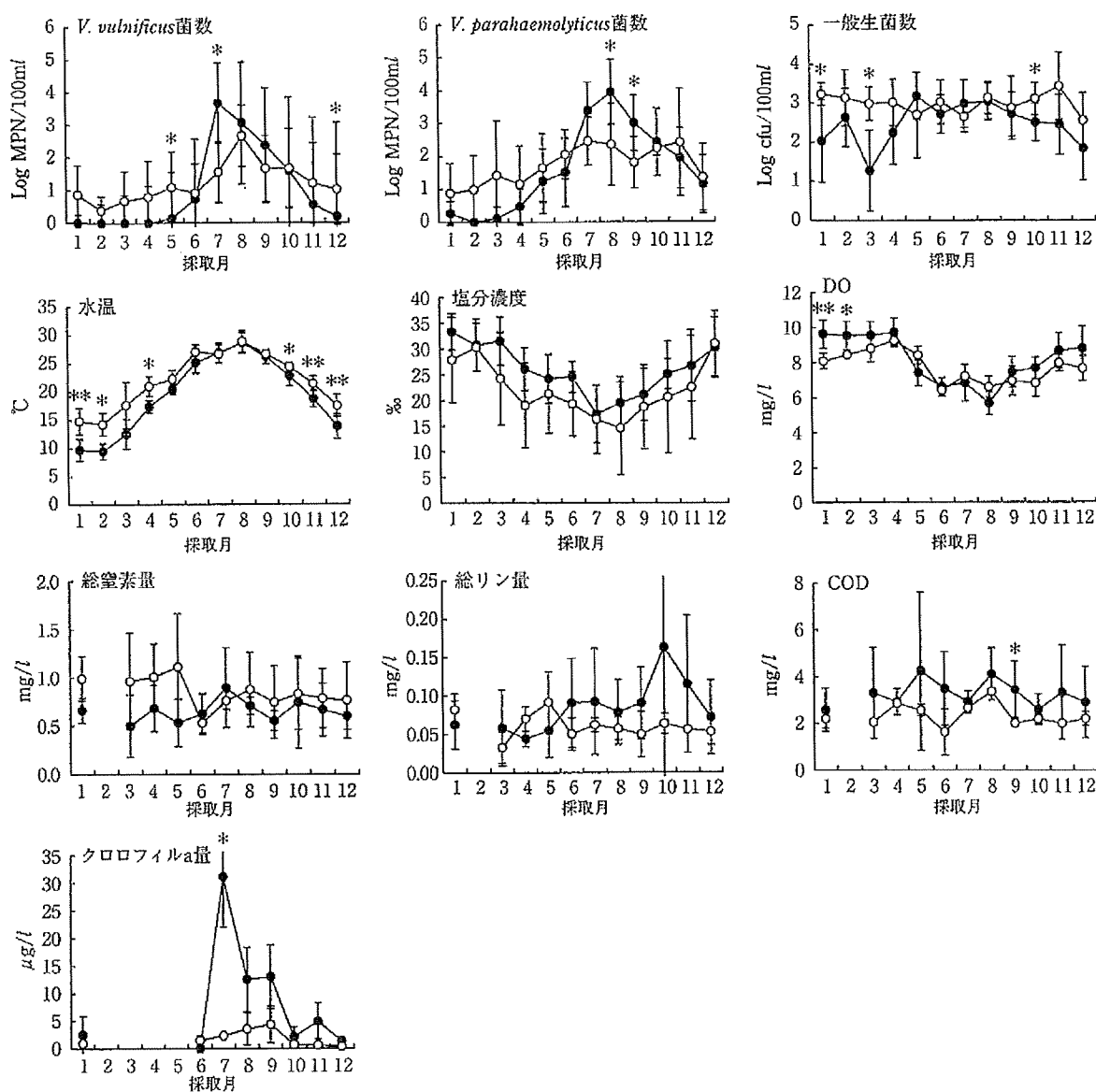


図2 菌数および環境因子の季節周期性

測定値の変化は、有明海 (●), 橘湾 (○) を示し、平均値 ± 標準偏差を示す。同月における有明海と橘湾の測定値の有意差あり、* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 。

成 績

海域ごとにおける各測定値の季節性：各項目は検査期間が異なるが、項目ごとに有明海および橘湾での測定値の月別変動を平均値 ± 標準偏差で示した (図2)。有明海の *V. vulnificus* 菌数は6月から上昇傾向を示し、7月は $4.50 \times 10^4 \pm 17.1$ MPN/100ml に、橘湾では8月に $4.46 \times 10^2 \pm 8.72$ MPN/100ml と高値を示した。また、*V. vulnificus* 最高菌数は有明海海水で 2.40×10^6 MPN/100ml (2006年8月, 採取地点1), 橘湾海水で 1.10×10^4 MPN/100ml (2005年8月, 採取地点6) であった。*V. parahaemolyticus* 菌数は両海域で7~8月に高値を

示す傾向が認められた。しかし、一般生菌数は両海域とも顕著な季節変動性は認められなかった。海水温は両海域とも8月がピークであったが、塩分濃度は有明海で7月に橘湾では8月に低値となった。DOは両海域とも夏季(6~9月)に低下傾向を示したが、COD, 総窒素量および総リン量は両海域とも顕著な季節変動性は認められなかった。しかし、クロロフィルa量は夏季(7~9月)に高値を示した。

各海域における夏季の各測定値の差：7月の *V. vulnificus* 菌数 ($P < 0.05$), 8月と9月の *V. parahaemolyticus* 菌数 ($P < 0.05$) および7月のクロロフィルa量 ($P < 0.05$) は、いずれも有明海の方が橘湾に比

表1 沿岸海水における*V. vulnificus*菌数に対する各因子の単回帰分析およびSpearmanの順位相関

因子	n			単回帰分析						順位相関		
	両海域 ¹⁾	有明海 ²⁾	橘湾 ³⁾	両海域 ¹⁾		有明海 ²⁾		橘湾 ³⁾		両海域 ¹⁾	有明海 ²⁾	橘湾 ³⁾
				R ²	b'	R ²	b'	R ²	b'			
<i>V. parahaemolyticus</i> 菌数	210	150	60	0.551**	0.720**	0.619**	0.760**	0.331**	0.557**	0.761**	0.792**	0.673**
一般生菌数	210	150	60	0.188**	0.700**	0.210**	0.780**	0.125**	0.577**	0.465**	0.463**	0.396**
水温	210	150	60	0.444**	0.144**	0.506**	0.154**	0.234**	0.113**	0.711**	0.763**	0.470**
塩分濃度	210	150	60	0.452**	-0.117**	0.441**	-0.141**	0.603**	-0.093**	-0.712**	-0.676**	-0.782**
DO	140	100	40	0.209**	-0.386**	0.294**	-0.418**	0.010	-0.119	-0.463**	-0.559**	-0.081
総窒素量	77	55	22	0.122**	1.680**	0.102*	1.955*	0.391**	1.718**	0.416**	0.349**	0.585**
総リン量	77	55	22	0.018	3.141	0.017	2.969	0.022	6.173	0.294**	0.353**	0.206
COD	77	55	22	0.014	0.123	0.008	0.091	0.187*	0.792*	0.268*	0.288*	0.360
クロロフィルa量	55	40	15	0.367**	0.123**	0.437**	0.135**	0.033	-0.090	0.319*	0.526**	-0.408

*: P<0.05, **: P<0.01.

1) 有明海および橘湾を併せた全検体, 2) 有明海採取検体のみ, 3) 橘湾採取検体のみ.

R²: 決定係数, b' 回帰係数, r_s: Spearmanの順位相関係数, DO: 溶存酸素量, COD: 化学的酸素要求量.

べ有意に高かったが, その他の測定値は海域毎での有意差は認められなかった.

*V. vulnificus*菌数に対する各因子の寄与率: 両海域における単回帰分析では, *V. parahaemolyticus*菌数, 塩分濃度, 水温, クロロフィルa量およびDOは決定係数(寄与率: R²)が0.2以上と比較的高かったが, 一般生菌数, 総窒素量, 総リン量およびCODは0.2未満と低かった(表1). また, 有明海採取検体で両海域と同様の傾向を示した. 両海域における水温, 塩分濃度およびDOの3項目の重回帰分析では, R² = 0.561 (P<0.001)であった. 同様に水温, 塩分濃度, 総窒素量およびクロロフィルa量の4項目でR² = 0.723 (P<0.001)と高い値を示し, 4項目間における偏相関係数はクロロフィルa量が0.639 (P<0.001), 塩分濃度が-0.391 (P<0.01)を示した.

*V. vulnificus*菌数に対する各因子の相関: 両海域における*V. vulnificus*菌数について, Spearmanの順位相関係数を求めた(表1). *V. vulnificus*菌数に対し*V. parahaemolyticus*菌数, 水温および塩分濃度は高い相関(|r_s|>0.7)を, 一般生菌数, DO, 総窒素量およびクロロフィルa量はやや低い相関(0.3<|r_s|<0.7)を, 総リン量およびCODは低い相関(r_s<0.3)を示し, 塩分濃度およびDOのみが負の相関を示した. また, 有明海採取検体でも両海域と同様の傾向を示した.

魚介類における*V. vulnificus*の検出状況: 魚介類68検体中49検体(72.1%)が*V. vulnificus*陽性であった. 内訳は二枚貝21検体中19検体(90.5%)が陽性で, このうち11検体(61.1%)が≥10⁴MPN/100gであった. 巻貝類は9検体中3検体(33.3%)が陽性で, いずれも<10⁴MPN/100gであった. 甲殻類は14検体中8検体(57.1%)が陽性であった. 魚類は24検体中19検体(79.2%)が陽性で, 7検体が≥10⁴MPN/100gであ

表2 長崎県内における市販魚介類の*V. vulnificus*菌数の分布

検体種	検体数	<i>V. vulnificus</i> 菌数(MPN/100g)						陽性数(%)	
		ND	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵		10 ⁶
二枚貝類									
有明海	20	2	2	5	5	3	3	18 (90)	
橘湾	1		1					1 (100)	
小計	21	2	3	5	5	3	3	9 (90.5)	
巻貝類									
有明海	6	4	1	1				2 (33.3)	
橘湾	3	2	1					1 (33.3)	
小計	9	6	2	1				3 (33.3)	
甲殻類									
有明海	9	3	2	1	2	1		6 (66.7)	
橘湾	5	3	1		1			2 (40)	
小計	14	6	3	1	3	1		8 (57.1)	
魚類									
有明海	17	1	2	2	5	5	2	16 (94.1)	
橘湾	7	4	2	1				3 (42.9)	
小計	24	5	4	3	5	5	2	19 (79.2)	
海域毎									
有明海	52	10	5	6	12	11	5	3	42 (80.8)
橘湾	16	9	4	2	1				7 (43.8)
総計	68	19	9	8	13	11	5	3	49 (72.1)

ND: 検出せず.

った. 海域毎にみると, 有明海産52検体のうち42検体(80.8%)が陽性, 橘湾産16検体のうち7検体(43.8%)が陽性であった(表2).

考 察

わが国における*V. vulnificus*感染症の発生は, 散発的な症例のみであったが, 2001年に熊本県有明海沿岸地域において患者数9名(うち死亡者4名)と患者が多発した[3, 4]ことから注目され, その対策が求められ

るようになってきた。また、大石ら [3] は誌上調査により、*V. vulnificus* 感染者 165 例は 7 月に 48 例、8 月に 46 例、9 月に 36 例と 7~9 月に 78.8% を占め、さらに全国の患者の約 4 割が有明海沿岸地域で発生していたことから、この地域が *V. vulnificus* の増殖しやすい環境であり、患者が多発する地域であることを指摘している。したがって、有明海沿岸地域の環境下における *V. vulnificus* の生態を把握することは、本感染症対策上で重要である。

わが国の海水における *V. vulnificus* の調査では、東京湾の 4 地点の最高菌数は、 $2.8 \times 10^3 - 1.1 \times 10^5$ MPN/100ml [8]、鳥根県沿岸の調査では 10^4 MPN/100ml であった [5]。いっぽう、米国では、ノースカロライナ州 Pamlico 河口で $10^3 - 10^4$ cfu/100ml (直接塗抹平板法) [16]、メリーランド州チェサピーク湾 Choptank 河で 10^3 cells/100ml (蛍光オリゴヌクレオチド・プローブ法) [17] であった。今回の調査では、海水中の *V. vulnificus* 菌数の最高値は、有明海で 2.40×10^6 MPN/100ml と橘湾のそれより 5.2 倍高く、また、7 月における有明海の *V. vulnificus* 菌数は橘湾に比べ有意に高く ($P < 0.05$)、その他の地域 [5, 8, 16, 17] と比べても高値を示した。

今回調査した両海域の一般生菌数に顕著な季節性は認められなかったが、*V. parahaemolyticus* 菌数と *V. vulnificus* 菌数間の相関は高く、いずれも夏季に菌数が上昇する傾向にあった。しかし、菌数がピークに達する月が両菌種で異なっていた。これは両菌の増殖に対する好適塩分濃度の違い [5, 9-12] が原因と考えられた。

V. vulnificus 菌数の増減と水温、塩分濃度および DO 濃度は、これまでの報告 [11, 16, 18] と同様の傾向を示した。有明海および橘湾の両海域で、水温の上昇および DO 濃度の低下は 8 月におおのピークを示した。塩分濃度の低下は、有明海で 7 月に、橘湾で 8 月に最低値を示し、おおの 1 カ月の差が生じたものの、海域毎の濃度差に有意な差は認められなかった。*V. vulnificus* 菌数は水温および塩分濃度との間に高い相関が、また DO 濃度はやや低い負の相関 (両海域 $r_s = -0.463$, 有明海 $r_s = -0.559$) が認められた。Randa ら [18] は水温と *V. vulnificus* 菌数に正の相関 ($r_s = 0.775$) が、塩分濃度との間には負の相関 ($r_s = -0.451$) があることを報告している。また、Pfeffer ら [16] も、塩分濃度の影響が少ない海水で、*V. vulnificus* 菌数と水温は高い正の相関 ($r_s = 0.81845$) を示すことを報告している。大石ら [3] は、わが国における夏季の *V. vulnificus* 菌数の増加は、降水量増加による塩分濃度の低下に起因することを示唆している [3]。また、Pfeffer ら [16] は、*V. vulnificus* 菌数と DO 濃度の間には負の相関があり、水温の上昇は DO 濃度の低下を招くことを示している。し

たがって、水温、塩分濃度および DO 濃度は、*V. vulnificus* 菌数の増減に大きく関与している重要な環境因子であると考えられる。しかし、有明海と橘湾の間には夏季水温の差がないにもかかわらず、本菌の菌数には海域間で差がみられた。また、夏季の塩分濃度の低下は梅雨を有する日本、特に本州以西では広く認められる現象であり、長崎県沿岸地域より海水温が高い鹿児島県や沖縄県に患者報告が少ない [3] こと等を考えると、*V. vulnificus* 菌数に影響を与える有明海特有の環境因子が存在するものと思われる。

Pfeffer ら [16] は、総窒素量と *V. vulnificus* 菌数との相関は低いことを報告している。本調査ではこれらはやや正の相関 (両海域 $r_s = 0.416$) を示したものの、明らかな季節変動および海域毎の差は認められなかった。また、COD および総リン量とは低い相関であった。今後これらの環境因子と *V. vulnificus* の菌数の関連性についても検討が必要であろう。

環境調査において、クロロフィル a 量は海水中の植物プランクトン増減の指標として用いられている。Randa ら [18] は、*V. vulnificus* の菌数とクロロフィル a 量の間には正の相関 ($r_s = 0.537$) が認められることを報告した。今回は調査期間が短かったもののクロロフィル a 量の決定係数は比較的高い値 (両海域 $R^2 = 0.367$, 有明海 $R^2 = 0.437$) で、正の相関 (両海域 $r_s = 0.319$, 有明海 $r_s = 0.526$) が認められた。また、重回帰分析における 4 項目 (水温、塩分濃度、総窒素量およびクロロフィル a 量) 間では、クロロフィル a 量は正の偏相関 (両海域 0.639) を示した。さらに有明海では夏季の *V. vulnificus* 菌数と同様にクロロフィル a 量も増加する傾向にあることから、有明海における *V. vulnificus* の増殖に植物プランクトンが関与している可能性が考えられる。今後、検体数を増やし植物プランクトンが本菌の増殖にどのように作用しているのか、さらに検討する必要があるものと思われる。

米国では、カキの生食による *V. vulnificus* 感染症が多く発生している [12-14, 19, 20]。わが国では、夏季のカキで 72.6% [8]、魚類で 17.2%、貝類では 43.8% [5] から *V. vulnificus* が検出されている。大仲ら [8] が東京湾のカキから 1.1×10^7 MPN/100g 以下、福島 [5] が国内流通の魚介類から 10^7 MPN/100g 以下の *V. vulnificus* を検出している。本調査では、*V. vulnificus* 菌数は同程度であったが、両海域の魚介類の分離率は有明海産で 80.8%、橘湾産で 43.8% と異なっていた。特に、有明海産の二枚貝類および魚類からそれぞれ 90% および 94.1% と高率に分離された。今回、検体数が少ないものの、他海域の魚介類に比べ有明海産魚介類の *V. vulnificus* 検出率が高い理由として、海水中の本菌数が関与している可能性がある。

複数の因子を用いた重回帰分析において *V. vulnificus* 菌数の増減への寄与率が上昇したこと等から、本菌の増殖には各環境因子が相互に係わっている可能性が考えられた。有明海産の魚介類からの *V. vulnificus* の分離率が高かったのは、環境因子が複合して形成される有明海特有の環境を反映した結果かもしれない。

検体採取に際し、御協力いただいた長崎県立保健所 食品衛生担当各位ならびに御助言をいただいた熊本県保健環境科学研究所（現 熊本県食肉衛生検査所）宮坂次郎、長崎県環境保健研究センター 吾郷昌信、森 淳子の諸氏に感謝する。本研究の一部は厚生労働科学研究費によって行われた。

引用文献

- [1] 平潟洋一, 河野 茂: ビブリオ・バルニフィカス, 病原菌の今日的意味, 松本麗蔵編, 改訂3版, 525-537, 医薬ジャーナル社, 大阪 (2003)
- [2] 古城八寿子, 城野昌哉, 中川敬一, 小野友道: *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, 875-884 (1999)
- [3] 大石浩隆, 浦由紀子, 三溝慎次, 中島幹夫: わが国における *Vibrio vulnificus* 感染症患者誌上調査, 感染症誌, 80, 680-689 (2007)
- [4] Osaka K, Komatsuzaki M, Takahashi H, Sakano S, Okabe N: *Vibrio vulnificus* septicemia in Japan: an estimated number of infections and physicians knowledge of the syndrome, *Epidemiol Infect*, 132, 993-996 (2004)
- [5] 福島 博: 島根県沿岸における *Vibrio vulnificus* の分布および市販魚介類の *V. vulnificus* 汚染状況, 感染症誌, 80, 220-230 (2006)
- [6] 工藤由起子, 三輪憲永, 山崎省吾, 八柳 潤, 岩出幾人, 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, 79, 931-936 (2005)
- [7] 木下千恵, 堀田吏乃, 橋本好司, 近藤正治, 松枝智子, 佐川公彦: 有明海干潟汚泥, 海水, 魚介類中における *Vibrio vulnificus* の季節別生息状況, 臨床病理, 52, 580-586 (2004)
- [8] 大仲賢二, 古畑勝則, 井口光二, 原 元宣, 福山正文: *Vibrio vulnificus* 感染症に関する基礎的研究 海水, 海泥およびカキからの本菌分離状況, 感染症誌, 76, 528-535 (2002)
- [9] Gram L, Bundvad A, Melchiorson J, Johansen C, Vogel BF: Occurrence of *Shewanella algae* in Danish Coastal Water and Effects of Water Temperature and Culture Conditions on Its Survival, *Appl Environ Microbiol*, 65, 3896-3900 (1999)
- [10] Kaspar CW, Tamplin ML: Effects of Temperature and Salinity on Survival of *Vibrio vulnificus* in Seawater and Shellfish, *Appl Environ Microbiol*, 59, 2425-2429 (1993)
- [11] Kelly MT: Effect of Temperature and Salinity on *Vibrio (Benecke) vulnificus* Occurrence in a Gulf Coast Environment, *Appl Environ Microbiol*, 44, 820-824 (1982)
- [12] Lin M, Payne DA, Schwarz JR: Intraspecific Diversity of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay Water and Oysters as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3137-3175 (2003)
- [13] FAO/WHO: Microbiological Risk assessment series No. 8, Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw Oysters, Interpretative Summary and Technical Report, 19-42, FAO/WHO, Roma/Geneva (2005)
- [14] Hill WE, Keasler SP, Trucksess MW, Feng P, Kaysner CA, Lampel KA: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters, *Appl Environ Microbiol*, 57, 707-711 (1991)
- [15] 荒川英二, 島田俊雄: 腸炎ビブリオおよびその類縁菌, 食品衛生検査指針, 微生物編, 厚生労働省監修, 2004, 201-213, 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- [16] Pfeffer CS, Hite MF, Oliver JD: Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina, *Appl Environ Microbiol*, 69, 3526-3531 (2003)
- [17] Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR: Seasonality of Chesapeake Bay Bacterioplankton Species, *Appl Environ Microbiol*, 68, 5488-5497 (2002)
- [18] Randa MA, Polz MF, Lim E: Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Population Dynamics as Assessed by Quantitative PCR, *Appl Environ Microbiol*, 70, 5469-5476 (2004)
- [19] Parvathi A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I: Detection and Enumeration of *Vibrio vulnificus* in Oysters from Two Estuaries along the Southwest Coast of India, Using Molecular Methods, *Appl Environ Microbiol*, 70, 6909-6913 (2004)
- [20] Cook DW, O'leary P, Hunsucker JC, Sloan EM, Bowers JC, Blodgett RJ, Depaola A: *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999, *J Food Prot*, 65, 79-87 (2002)

Effect of Environmental Factors on the Occurrence of *Vibrio vulnificus*
in Coastal Waters of Nagasaki Prefecture, Japan

Shogo YAMASAKI*[†], Yuji MIGITA, Makiko NAKAMURA, Nobutaka URA,
Yukiko HARA-KUDO, Naoaki MISAWA, Karoku OKAMOTO
and Kozo TAKASE

* Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Sciences and Public Health, 2-1306-11 Ikeda
Omura, 856-0026, Japan

SUMMARY

The present study was conducted to understand the effects of environmental factors on *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) cell counts using most probable number (MPN)-PCR in the waters of the Ariake Sea and Tachibana Bay, Nagasaki Prefecture, Japan. The authors also surveyed *V. vulnificus* cell counts in seafood harvested from these two sites. Maximum *V. vulnificus* cell counts in the seawater were $4.50 \times 10^4 \pm 17.1$ MPN/100ml in July in the Ariake Sea. In contrast, the maximum cell counts were found in August in Tachibana Bay. *V. vulnificus* cell counts in the seawater were positively correlated with the water temperature ($r_s = 0.711$) and negatively correlated with salinity ($r_s = -0.712$). Moreover, the values of R^2 of dissolved oxygen, total nitrogen and chlorophyll a were above 0.1. *V. vulnificus* cell counts in marine products were a maximum 10^6 MPN/100 g, while isolation rates were 90% in bivalves and 94.1% in fish from the Ariake Sea.

— Key words : Ariake Sea, distribution, environmental factor, MPN counts, *Vibrio vulnificus*.

† Correspondence to : Shogo YAMASAKI (Nagasaki Prefectural Institute for Environmental Sciences and Public Health)
2-1306-11 Ikeda, Omura, 856-0026, Japan TEL 0957-48-7560 FAX 0957-48-7570

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 649 ~ 655 (2009)

＝ 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℃以上で増殖が可能になり、20℃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³⁾。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