論　文

市販食用貝類に存在する*Vibrio vulnificus*に関する研究

上田龍太郎[※1]・佐藤由佳子[※2]

Occurrences of *Vibrio vulnificus* in Various Shellfish Sold in Fish Shops

Ryutaro UEDA[※1] and Yukako SATO[※2]

ABSTRACT

This study was undertaken to examine the occurrence of *Vibrio vulnificus* in eleven species of seafood shellfish (eight species of bivalves and three species of conches) sold in fish shops around Mishima city, Shizuoka Pref. Japan during warmer season (July to October). Viable counts of bacteria on PYBG agar plates were from 6.13 x 10^4 to 3.99 x 10^7 in bivalves samples and from 1.34 x 10^4 to 2.07 x 10^5 in conches samples respectively. In bivalve samples, *V. vulnificus* was detected in five of eight animal species examined and high densities (2000 to 7500 MPN/100g) of *V. vulnificus* were detected in Japanese littleneck samples. *V. vulnificus* was only detected in Top shellfish among three species of conches samples, with occurrences of 80% and the densities were ranging from 360 to 2300 MPN/100g.

１．目的

*Vibrio vulnificus*は、腸炎ビブリオやコレラ菌と同じビブリオ属に含まれ、ヒトに感染症を起こす細菌の一種である。本菌は、海水と淡水が交わる汽水域を中心に分布しており、塩分濃度２～３％で良好に発育する低濃度好塩性のグラム陰性桿菌である[1,2]。本菌は、腸炎ビブリオと同様に水温が15℃以上で増殖が可能となり、20℃を越す６月から９月には活発に増殖することが知られている[4]。

本菌による感染症は消化器感染型と皮膚感染型に大別されるが、多くのビブリオ属細菌が下痢症などを引き起こすのに対し、本菌は肝硬変などの慢性疾患を基礎疾患として有する場合に消化器感染を起こすと、全身症状を示すのが特徴であり、重篤な敗血症に至ることもある[3]。我が国で報告されている患者のほとんどは、基礎疾患として肝障害を持ち、アルコール飲料を多飲する人が多く、他に糖尿病や悪性腫瘍なども見られる。症例の多くが中高齢の男性であることも本菌感染症の特徴である[4]。我が国において、*V. vulnificus*感染症は1976年に長崎県で報告されて以来、これまでに約200例が確認されている。発生地域は熊本県が24例と最も多く、福岡県、佐賀県、長崎県を含む九州地域での発生が全体の50％を占めている[5]。

*V. vulnificus*に関する研究は、臨床分離株のみならず自然環境からの分離株についても多く行われており、特に本菌の生息域である沿岸域の海水や底泥からの分離菌に関する報告が多い[6－8]。また、沿岸域に生息する様々な魚介類からも本菌の検出報告があり、特に貝類に多く存在することが知られている[9－11]。

我が国で流通している貝類は、加熱用のものを除いて生きた状態で市販されているものが多いが、流通過程で適切な温度管理がなされていないと付着細菌が増殖し、腐敗や食中毒の原因となる可能性がある。特に、*V. vulnificus*は水揚げ後の貝類の体内で増殖可能なため、迅速な冷蔵が必要であることが指摘

※１　日本大学短期大学部（三島校舎）食物栄養学科　教授　Professor, Department of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

※２　日本大学短期大学部専攻科食物栄養専攻　卒業生　Former student, Advanced Course of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

されおり[12]、カキの生食が盛んな米国では海水温に応じて推奨されるカキの水揚げから喫食までの時間が異なり、18～23℃のときは14時間以内、23～28℃のときは12時間以内、28℃を超えるときは６時間以内が目安とされている[13]。また、Cook[12]は漁獲されたカキが気温24～33℃の条件下で漁船の甲板に置かれて輸送されている間に*V. vulnificus*が急速に増殖することを見出し、市場に流通している貝類の*V. vulnificus*汚染に注意する必要があることを示唆している。

このように*V. vulnificus*は沿岸域に生息する様々な魚介類に存在することが明らかとなっているが、これまでの研究の多くは自然環境から直接採取した魚介類や海水、底泥などを実験材料に用いたものが多く、実際に鮮魚店やスーパーマーケットなどで流通している貝類に存在する*V. vulnificus*の定量を行った研究は少ない。そこで本研究では、静岡県三島市周辺で流通している市販の食用貝類を実験材料として、鮮度判定の指標となる一般生菌数の測定を行うと共に*V. vulnificus*の検出・定量を試みた。

２．材料および方法

２．１　実験材料

2006年～2007年の夏季を中心（７月～10月）に、静岡県三島市周辺の鮮魚店あるいはスーパーマーケットにて購入した、二枚貝８種（アカガイ；*Scapharca broughtonii*、アゲマキガイ；*Sinonovacula constricta*、アサリ；*Ruditapes philippinarum*、オキアサリ；*Gomphinase micancellata*、タイラギ；*Atrina pectinata*、トリガイ；*Fulvia mutica*、ハマグリ；*Meretrix lusoria*およびマガキ；*Crassostrea gigas*）、巻貝３種（サザエ；*Turbo cornutus*、トコブシ；*Haliotis diversicolor aquatilis*およびバテイラ；*Omphalius pfeifferi pfeifferi*）、計11種を各５個体ずつ用いた。各試料の産地、採取日、個体重量などについては、表１にまとめて示した。なお、実験開始前に各個体の殻が外部刺激に応じて開閉することを目視で確認し、生きた状態の個体のみ試料として用いた。

２．２　実験方法

２．２．１　一般生菌数の測定法

各個体から可食部を適量（25g以上の場合は25gとする）採取し、各検体に対して９倍量のPBSを加え、ストマッキング処理を行い、検体の10倍希釈液を作製した。これらについて、10^{-1}～10^{-5}倍に希釈し、Peptone-Yeast extract-Beef extract-Glucose（PYBG）寒天培地[14]に0.1mlずつ塗抹した後、好気的条件下で25℃、48時間の培養を行った。PYBG寒天培地１ℓあたりの組成は次の通りである。Trypticase peptone（BBL）10g、Phytone peptone（BBL）５g、Lab-Lemco powder（Oxoid）2.4g、Yeast extract（Difco）２g、Glucose １g、Agar No.1（Oxoid）10g、蒸留水500ml、海水500ml、pH7.5。

培養後、各培地に出現したコロニーを計数し、一般生菌数を算出した。

２．２．２　*Vibrio vulnificus*の定量法

*V. vulnificus*の定量は「食品衛生検査指針・微生物編」[15]に記載されている方法に準拠し、最確数（MPN）法により行った。まず一般生菌数の測定法と同様、各試料に９倍量のPBSを加えてストマッキング処理し、検体の10倍希釈液を作製した。次に検体の10倍希釈液１mlをPBS ９mlの入った試験管に入れ、検体の100倍希釈液を作製した。検体の10倍希釈液および100倍希釈をアルカリペプトン水10mlの入った３本の試験管にそれぞれ１mlずつ接種し、また検体の100倍希釈液をアルカリペプトン水10mlの入った３本の試験管に0.1mlずつ接種した。これらを37℃にて一夜培養後、エーゼを用いて各試験管の上層部をX-VP寒天培地（日水）に塗抹し、37℃で一夜培養した。各培地上に出現した*V. vulnificus*と推定される集落についてオキシターゼ試験、糖分解試験、リジン脱炭酸能試験、Voges-proskauer（VP）試験および耐塩性試験を行い、表２に示したような各性状が確認された菌株を*V. vulnificus*と同定した。各試験管の陽性本数を最確数表に当てはめ、試料100g当たりの最確数（MPN/100g）を求めた。

なお、得られた結果について各動物間の一元配置分散分析を行い、５％の有意水準で検定を行った。

３．結果

各動物種における一般生菌数および*V. vulnificus*の検出結果を、表３にまとめて示した。各動物種の一般生菌数は、二枚貝８種が10^4～10^7 CFU/g、巻貝３種が10^4～10^5 CFU/gであり、巻貝に比べて二枚貝の方がやや高い傾向が見られた。二枚貝の中でも特にアカガイ、アゲマキガイおよびオキアサリの３種において、10^7 CFU/gと比較的高い生菌数が認められた。

*V. vulnificus*は、今回実験を行った貝類11種のうち、６種（アゲマキガイ、アサリ、オキアサリ、サザエ、タイラギおよびトリガイ）から検出された。二枚貝においては８種中５種から*V. vulnificus*が検出された。各動物種５個体における検出率を見ると、アサリの

100％が最も高く、トリガイが80％、アゲマキガイが40％、オキアサリおよびタイラギがそれぞれ20％であった。巻貝においては３種中１種（サザエ）からのみ*V. vulnificus*が検出され、検出率は80％であった。

各動物種における*V. vulnificus*の平均検出濃度（５個体の平均MPN/100g）について見ると、二枚貝ではアサリの3620 MPN/100gが最も高く、アサリは他の動物種に比べて有意に高い*V. vulnificus*の検出率および検出濃度が認められた（$p<0.001$）。また、今回実験を行った11種55個体の試料中、個体別に見て*V. vulnificus*が最も高い濃度で検出されたのは、アサリの7500 MPN/100gであった。二枚貝ではトリガイからも1128 MPN/100g濃度で*V. vulnificus*が検出され、巻貝ではサザエから1014 MPN/100g濃度で*V. vulnificus*が検出された。

４．考察

貝類の流通過程における*V. vulnificus*の増殖に影響を与える要因として、水揚げから販売までに要した日数や保存温度が重要である[12]。本研究の結果においてもこれらの要因が影響していることが考えられるものの、今回は保存温度などに関する情報が得られなかった。そこで水揚げから販売までに要した日数や保存温度の状況を推し量る目的で一般生菌数を測定したところ、一部の検体で多数の細菌が検出されたことから、*V. vulnificus*も流通過程において増殖した可能性が考えられる。

杉田ら[14]は、５～10月に東京湾で採取した二枚貝６種の細菌相を本研究と同じPYBG寒天培地を用いて調べた結果、生菌数は10^4～10^5 CFU/gであったことを報告している。本研究の試料に用いた貝類は全て生きた状態で販売されていたものであり、今回実験を行った貝類11種中７種の一般生菌数も10^5 CFU/g以下と一般生菌数を指標とする鮮度判定において良好な状態であったが、アカガイ、アゲマキガイおよびオキアサリの一般生菌数は10^7 CFU/gとやや高い値が認められた。そのため、これら３種の貝類では水揚げ後の流通過程において生菌数が増加した可能性が考えられる。

*V. vulnificus*は我が国沿岸の広い範囲に分布することが知られており、これまで種々の魚介類から検出されている。宮城県、神奈川県、川崎市、島根県および熊本県の各衛生研究所が市販流通生鮮魚介類における本菌の汚染実態調査を行った結果、特にアサリなどの貝類が高頻度で汚染されていることが報告されている[9,10]。本研究において、夏季を中心に鮮魚店で購入した種々の食用貝類から*V. vulnificus*の検出を試みた結果、11種中６種から本菌が検出され、特に二枚貝においては今回実験を行った８種40個体中13個体（32.5％）から*V. vulnificus*が検出された。中でもアサリからは有意に高い濃度で*V. vulnificus*が検出され（$p<0.001$）、検出率も100％（５個体中５個体）であった。*V. vulnificus*は塩分濃度の低い内湾環境に多く分布すると言われており[2,6]、アサリは塩分濃度の低い河口域の潮干帯や内湾の浅瀬を中心に生息しているため、*V. vulnificus*が多く検出されたことが推察される。斉藤ら[10]は６～10月に入手した種々の魚介類における*V. vulnificus*の検出状況を調べた結果、アサリからの検出率が53.8％と高く、特に７月の福島県産および９月の愛知県産アサリは100g当たりのMPN値が10000以上と高値を示したことを報告している。多くの魚介類を生で食すことの多い我が国においてもアサリを生食することはないため、加熱調理したアサリを食すことにより本菌に感染する危険性は低いと思われるが、調理器具を介して他の食材への二次汚染や創傷感染の可能性はあるため、本菌の存在には注意を払う必要があるものと思われる。

本研究で調べた巻貝３種において、*V. vulnificus*はサザエからのみ検出されたが、検出率は80％、平均濃度は1014 MPN/100gであった。サザエは、内湾の砂泥底に生息するアサリなどの二枚貝と異なり、主に外洋域に生息しているが、福島[11]は島根県沿岸で漁獲されたサザエの25％から*V. vulnificus*を10^4～10^6 MPN/100gの濃度で検出したことを報告しており、二枚貝以外の貝類にも*V. vulnificus*が広く分布していることが推察される。

本研究の結果から一般細菌数が多い検体では*V. vulnificus*の菌数も多い傾向が認められたため、水揚げから販売までに本菌が増殖した可能性が考えられる。今回は夏季に採取・販売されていた貝類を試料に用いたが、流通過程の温度管理が適切に行われていないと菌の増殖が起こりやすいことが想定されることから、*V. vulnificus*の増殖を防ぐためにも貝類の流通過程における低温管理や販売までの日数短縮化が重要と思われる。

５．まとめ

静岡県三島市周辺の鮮魚店やスーパーマーケットで夏季を中心に入手した市販食用貝類11種を実験材料として、各動物種の一般生菌数を調べると共に*Vibrio vulnificus*の定量を試みた。得られた結果の概

要は以下の通りである。

１）各試料の一般生菌数は、10^4～10^7 CFU/gの範囲であった。11種中７種の生菌数は10^5 CFU/g以下であったが、アカガイ、アゲマキガイおよびオキアサリにおいて10^7CFU/gと比較的高い生菌数が認められた。

２）今回実験を行った貝類11種のうち、６種（アゲマキガイ、アサリ、オキアサリ、サザエ、タイラギおよびトリガイ）から*V. vulnificus*が検出され、夏季に流通している貝類には本菌が広く分布していることが明らかになった。

３）*V. vulnificus*の検出率は二枚貝において高く、今回実験を行った二枚貝８種中、５種（54.5%）から本菌が検出された。動物種別の検出率はアサリの100%が最も高く、トリガイが80%、アゲマキガイが40%、オキアサリおよびタイラギがそれぞれ20%であった。

４）各試料の*V. vulnificus* 検出濃度（５個体の平均MPN/100g）は、二枚貝ではアサリの3620 MPN/100gが最も高く、トリガイも1128 MPN/100gとやや高い値が認められた。巻貝ではサザエが1014 MPN/100gとやや高い値であった。また、個体別に見て本菌が最も高濃度で検出されたのは、アサリの7500 MPN/100gであった。

謝　辞

本研究の一部は日本大学国際関係学部生活科学研究所個人研究費で行った。ここに記して感謝の意を表する。

６．参考文献

１）篠田純男（2000）：ビブリオ・バルニフィカスについて，日本食品微生物学会雑誌，17 (3)，155～161.

２）Colwell R.R.(ed) (1984)：*Vibrios* in the Environment. John Wiley & Sons, New York, 634p.

３）木下千恵・堀田吏乃・橋本好司・近藤正治・松枝智子・佐川公矯（2004）：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.

４）篠田純男（2005）：ビブリオの病原因子―*Vibrio vulnificus*を中心に―，薬学雑誌，125，531～547.

５）山本茂貴（2006）：ビブリオ・バルニフィカスによる重篤な感染症について，食品衛生研究，56，25～28.

６）Oliver, J.D., R.A. Warner, and D.R. Cleland (1983)：Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting *vibrios* in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol., 45, 985-998.

７）Kaysner, C.A., C. Abeyta, Jr., M.M. Wekell, A. Depaola, Jr., R.F. Scott, and J.M.Leitch (1987)：Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West Coast. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1349-1351.

８）Aono, E., H. Sugita, J. Kawasaki, H. Sakakibara, T. Takahashi, K. Endo, and Y. Deguchi (1997)：Evaluation of the polymerase chain reaction method for identification of *Vibrio vulnificus* isolated from marine environments. J. Food Protection, 60 (1), 81-83.

９）宮坂次郎・八尋俊輔・荒平雄二・濱州大輔・甲木和子・徳永晴樹（2004）：熊本県内の*Vibrio vulnificus*の環境分布と*Vibrio vulnificus*感染症発生状況，熊本県保健環境科学研究所報，34，37～43.

10）斎藤紀行・山田わか・渡邉節・小林妙子・川野みち・田村広子・三品道子・菅原直子・佐藤由美・畠山敬・谷津壽郎・秋山和夫・川向和雄（2005）：宮城県内の海水および市販魚介類からのビブリオ・バルニフィカスの検出，宮城県保健環境センター年報，23，102～107.

11）福島博(2006)：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，感染症学雑誌，80，220～230.

12）Cook, D.W. (1997)：Refrigeration of oyster shellstock conditions which minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. J. Food Protection, 60 (4), 349-352.

13）U.S. Department of Health and Human Services (1995)：Revision. National shellfish sanitation program, Manual of operations, Part II. Sanitation of the harvesting, Processing and Distribution of Shellfish, 35-40.

14）杉田治男・店網秀男・小橋二夫・出口吉昭（1981）：沿岸二枚貝の細菌相，日本水産学会誌，47 (5)，655～661.

15）厚生労働省（2004）：食品衛生検査指針　微生物編，201～223.

表１　本研究に用いた試料

区分	動物種	産地	採取日	個体別重量（g）		
				最大	最小	平均
二枚貝	アカガイ	千葉県	2007. 7.2	95.6	56.8	74.5
	アゲマキガイ	香川県	2006. 9.28	24.7	19.5	21.5
	アサリ	静岡県	2007. 7.11	64.7	51.9	58.2
	オキアサリ	三重県	2006. 9.28	172.9	144.6	159.3
	タイラギ	三重県	2007. 7.11	280.5	143.2	223.8
	トリガイ	千葉県	2007. 7.2	87.9	64.7	73.8
	ハマグリ	三重県	2006.10.26	101.4	81.7	88.6
	マガキ	宮城県	2007. 9.25	191.7	161.8	178.9
巻貝	サザエ	静岡県	2007. 9.25	97.5	80.8	86.2
	トコブシ	静岡県	2006.10.26	18.1	14.0	16.0
	バテイラ	静岡県	2006.10.26	24.9	10.8	14.6

表２　*V. vulnificus* の同定基準

オキシターゼ	糖分解試験（TSI寒天）				リシン脱炭酸・インドール・運動性試験（LIM培地）			VP試験	耐塩性試験（NaCl%）			
	斜面	高層	硫化水素	ガス	リシン	インドール	運動性		0%	3%	8%	10%
＋	赤・黄	黄	－	－	＋	＋	＋	－	－	＋	－	－

＋：90%以上が陽性、 －：90%以上が陰性、 d：11～89%が陽性

表３　各動物種における一般生菌数および*V. vulnificus* の検出結果

区分	動物種	一般生菌数（5個体の平均, CFU/g）	*V. vulnificus* (MPN/100g)						
			個体1	個体2	個体3	個体4	個体5	平均	検出率（%）
二枚貝	アカガイ	1.79×10^7	ND*	ND	ND	ND	ND	−	0
	アゲマキガイ	3.99×10^7	ND	ND	360	300	ND	330	40
	アサリ	9.77×10^5	2000	4300	2300	7500	2000	3620	100
	オキアサリ	1.53×10^7	ND	360	ND	ND	ND	360	20
	タイラギ	1.16×10^5	ND	ND	ND	300	ND	300	20
	トリガイ	1.20×10^6	300	ND	610	1600	2000	1128	80
	ハマグリ	6.13×10^4	ND	ND	ND	ND	ND	−	0
	マガキ	3.82×10^5	ND	ND	ND	ND	ND	−	0
巻貝	サザエ	2.07×10^5	2300	910	ND	1500	360	1014	80
	トコブシ	5.31×10^4	ND	ND	ND	ND	ND	−	0
	バテイラ	1.34×10^4	ND	ND	ND	ND	ND	−	0

*検出せず