HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	電解海水を用いた蓄養によるウニ内臓からの Vibrio parahaemolyticus 除菌効果について
Author(s)	木村, 稔; 三上, 加奈子; 干川, 裕 他
Citation	日本水産学会誌, 72(1), 1-5 https://doi.org/10.2331/suisan.72.1
Issue Date	2006-01-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38409
Rights	本文データは学協会の許諾に基づきCiNiiから複製したものである
Type	journal article
File Information	yoshimizu-243.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

The Japanese Society of Fisheries Science

Nippon Suisan Gakkaishi 72(1), 1–5 (2006)

電解海水を用いた蓄養によるウニ内臓からの *Vibrio parahaemolyticus* 除菌効果について

木村 稔,[1]* 三上加奈子,[1] 干川 裕[1]
森 立成,[1] 笠井久会,[2] 吉水 守[2]

(2005年4月6日受付, 2005年6月22日受理)

[1]北海道立中央水産試験場, [2]北海道大学大学院水産科学研究科

Effect of rearing using an electrolyzed seawater on reduction of *Vibrio parahaemolyticus* from sea urchin

MINORU KIMURA,[1]* KANAKO MIKAMI,[1] HIROSHI HOSHIKAWA,[1]
TATSUNARI MORI,[1] HISAE KASAI[2] AND MAMORU YOSHIMIZU[2]

[1]*Hokkaido Central Fisheries Experiment Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555,* [2]*Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan*

A study was carried out in order to reduce the hygienic bacteria from sea urchin *Strongylocentrotus nudus* viscera. The effect of pre-culturing before shipment using electrolyzed seawater on reduction of *Vibrio parahaemolyticus* and viable bacteria inhabiting the sea urchin viscera was examined. When 3% salt water suspended with *V. parahaemolyticus* was electrolyzed, the viable number of *V. parahaemolyticus* was reduced by more than 99.99% after treatment with 0.23 mg/L chlorine for one minute. In the case of sea urchin reared with electrolyzed seawater containing 0.76 mg/L chlorine for 2 days, a lot of dejecture was discharged, and the bacteria in the sea urchin viscera were reduced by more than 90%.

キーワード：ウニ，殺菌，除菌，蓄養，腸炎ビブリオ，電解海水

緒　言

北海道におけるウニ漁獲量は日本全国のほぼ半分を占め，日本海側では主に夏期に漁獲されている。漁獲されたウニは，折りウニなど生鮮品として消費されているほか，近年，カップ容器に塩水と生ウニを入れたカップウニの流通量が増加している。しかし，ウニ加工地域においては，家内工業的な漁家加工が多く，衛生管理が遅れているのが現状である。

近年，国内では，ノロウイルスやカンピロバクターによる食中毒事例が多発しているが，夏季には依然として腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* による食中毒も発生し，食中毒原因細菌の上位を占めている。腸炎ビブリオ食中毒の原因食品としては水産物が最も多く，平成元年から10年までの全国原因食品別発生件数の平均では貝類が約16%，ウニでは単独品目で約5%と高い割合を占め，[1] 今後の動向によっては，消費への影響も強く懸念される。

平成13年5月，厚生労働省では腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための生食用鮮魚介類加工品の成分規格を製品1gあたり腸炎ビブリオ最確数100以下と規定した。[2] この様な防止対策により，ここ数年は大規模な腸炎ビブリオ食中毒は発生していないが，小規模で多発する傾向が認められている。また，気象・海流の影響や地球規模での温暖化などに伴い，海洋環境中の腸炎ビブリオ数が増加し，成分規格をクリアできない場合も想定される。現在，漁獲直後のウニから腸炎ビブリオを除去する技術はなく，知見も皆無であるが，カキにおいては，人工浄化によるカキの微生物制御について詳細に報告されている。[3] 一方，海水の殺菌技術については，オゾンや紫外線の他に，電解水など新たな方法が開発され，海産魚介類の種苗生産施設において飼育用水および排水な

* Tel : 81-135-23-8703. Fax : 81-135-23-8720. Email : kimuram@fishexp.pref.hokkaido.jp

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

どの殺菌に十分な効果が認められ，普及しつつある。[4-6]

本研究では，まず海水の電気分解により産生される次亜塩素酸の *V. parahaemolyticus* に対する殺菌効果について検討し，次いでウニを電解海水で蓄養した場合のウニ内臓からの *V. parahaemolyticus* 除菌効果について検討した。

材料と方法

供試細菌 腸炎ビブリオ食中毒の原因菌である *Vibrio parahaemolyticus*（LMG 2850^T）を供試した。*V. parahaemolyticus* の培養には海水培地[7]を用い，坂口フラスコで37℃，24時間振盪培養後，1,800×*g*，20分間遠心分離し，上清を除去後，菌体を滅菌生理的食塩水に懸濁し試験に供した。なお供試細菌の生菌数はTCBS寒天培地を用いて測定した。

海水電解装置による *V. parahaemolyticus* 殺菌効果判定試験 脱塩素処理水道水に食塩を溶解して3％溶液を作成し，*V. parahaemolyticus* が 10^6 CFU/mLになるように懸濁した。この懸濁液を水流ポンプを用いて海水電解装置（試作機，㈱ホクト環境システム）[5]に通し，流量を0.72 m^3/h，電流を0.05，0.2および0.5 Aとして電気分解し，電解海水を採取して有効塩素濃度を測定した。次亜塩素酸との反応時間を0, 1.0, 2.5および5.0分間として作用させた後に，9倍量の1％ペプトン水（pH 8.6）を次亜塩素酸の作用を停止させる目的で加えた。次いで，この液0.1 mLをTCBS寒天培地表面に塗抹し37℃で24時間培養後の出現コロニー数を測定し，1 mLあたりの生菌数を算出した。対照には無処理の懸濁液に1％ペプトン水を加え，同様に生菌数を測定した。なお殺菌率は2回の平均値から求めた。

電解海水を用いた蓄養によるウニ内臓からの *V. parahaemolyticus* 除菌効果判定試験 平成15年8月～9月において，北海道後志支庁管内で採取したキタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus*（平均殻径約5 cm，平均湿重量約65 g）を北海道立中央試験場に搬入し，海水電解装置（H-100，東和電機製作所）で処理し得られた電解海水及び北海道余市沖から取水した天然海水で2日間蓄養（各試験区ウニ12個/60 L水槽，水温約18℃調温，流量約2 L/min）した。8月5日の試験Iでは，電圧値2.5 V，電流値0.5 A，有効塩素濃度1.6 mg/L，9月1日の試験IIでは，電圧値2.25 V，電流値0.25 A，有効塩素濃度0.76 mg/Lであった。なお，有効塩素濃度の測定は，DPD法により行った。

試験開始後，水槽から経時的にウニ5個を取り出し，その内臓（生殖巣，消化管及び内容物）全てをホモジナイズにより均一にした後，均一試料から25 g採取し，*V. parahaemolyticus* 数と一般生菌数を調べた。

V. parahaemolyticus については，食品衛生検査指針[8]に従い，試料に9倍量の3％食塩加リン酸緩衝液を加えストマッキング処理した。この10％乳剤を，アルカリペプトン水によるMPN法（3本法）で37℃，24時間培養し，クロモアガービブリオ培地に塗抹後，37℃，24時間培養し，藤色コロニーが出たものを *V. parahaemolyticus* 陽性としMPNを求めた。さらに陽性管については，培養液を遠心分離しTEで数回洗浄した後，加熱処理しDNAを抽出した。DNA抽出液について，PCRによる *toxR*[8]遺伝子の確認と *tdh*[9]遺伝子有無の検査も行った。一般生菌数は適宜3％食塩加リン酸緩衝液で希釈し，Marine-Agar（Difco）寒天培地に塗抹後，20℃で5日間培養し，コロニー数から1 gあたりの生菌数を求めた。

さらに，蓄養中に水槽底に沈んだウニの糞を採取し，重量を測定した乾燥濾紙（5A）で吸引濾過した。これを，蒸留水で洗浄した後，105℃で24時間乾燥させた後に重量を測定し，乾燥糞量を算出した。

結　果

海水電解装置による *V. parahaemolyticus* 殺菌効果 海水電解装置を用い，3％食塩水に懸濁した *V. parahaemolyticus* を流量0.72 m^3/h，電流0.05～0.5 Aで1～5分間処理したときの殺菌率をTable 1に示した。有効塩素濃度0.09 mg/Lの場合，処理時間1分で99.87％，2.5分で99.83％，5分で99.88％の殺菌率を示した。有効塩素濃度が0.23 mg/L～0.47 mg/Lの場合，1分間以上処理することによって99.99％以上の殺菌率が得られた。

電解海水を用いた蓄養によるウニ内臓からの *V. parahaemolyticus* 除菌効果 電解海水を用いた蓄養によるウニ内臓の生菌数の変化をFig. 1（試験I）および

Table 1 The effect of hypochlorate produced by electrolysis of 3% salt water on the viability of *Vibrio parahaemolyticus*

Chlorine concentration (mg/L)	Electricity (A)	Treatment time (min)	Viable counts (CFU/mL)	Reduction (%)
0.00	0.00	0.0	3.1×10^6	—
0.09	0.05	1.0	4.0×10^3	99.87
		2.5	5.4×10^3	99.83
		5.0	3.6×10^3	99.88
0.23	0.20	1.0	1.0×10^2	>99.99
		2.5	$<1.0\times10^1$	>99.99
		5.0	1.8×10^2	99.99
0.47	0.50	1.0	$<1.0\times10^1$	>99.99
		2.5	$<1.0\times10^1$	>99.99
		5.0	$<1.0\times10^1$	>99.99

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

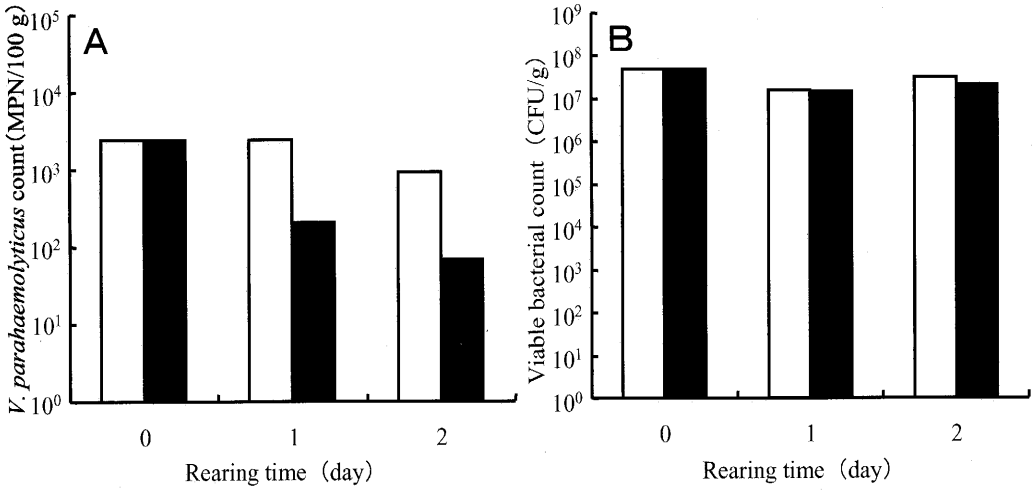

Fig. 1 Effect of rearing using electrolyzed seawater on reduction of *Vibrio parahaemolyticus* (A) and viable bacteria (B) from sea urchin on 5th August, 2004 (exp. I). Current was 0.5 A. Chlorine concentration and flow rate were 1.6 mg/L and 2 L/min, respectively. □, seawater; ■, electrolyzed seawater.

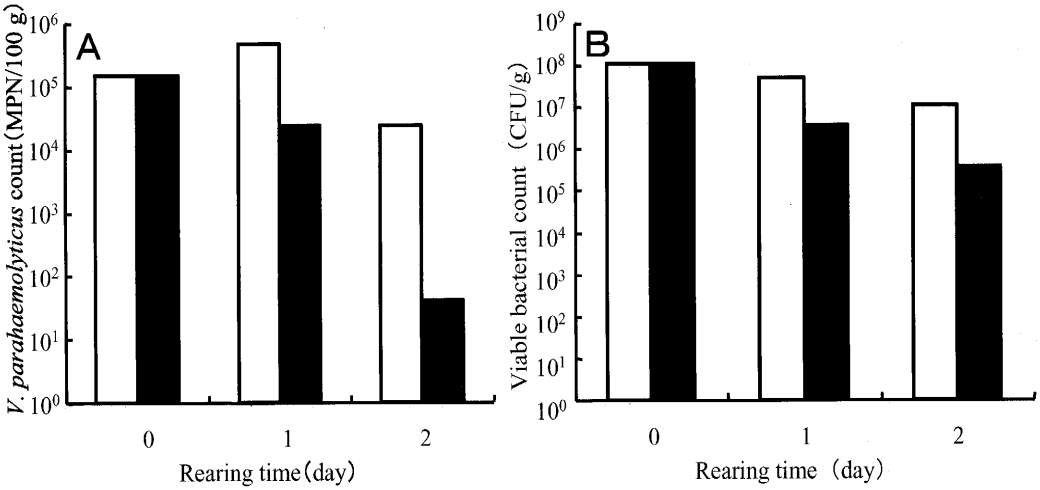

Fig. 2 Effect of rearing using electrolyzed seawater on reduction of *Vibrio Parahaemolyticus* (A) and viable bacteria (B) from sea urchin on 1st September, 2004 (exp. II). Current was 0.25 A. Chlorine concentration and flow rate were 0.76 mg/L and 2 L/min, respectively. □, seawater; ■, electrolyzed seawater.

Fig. 2（試験II）に示した。試験Iにおいて，水揚げ直後におけるウニ内臓の *V. parahaemolyticus* 数は，2.4×10^3（MPN/100 g）で，天然海水では蓄養2日目で若干減少したが，電解海水では蓄養2日目で7.0×10（MPN/100 g）まで大きく減少した。一般生菌数は水揚げ直後4.8×10^7（CFU/g）存在し，蓄養1日目で若干減少したが，2日目には変化がなかった。この条件下におけるウニの写真をFig. 3に示した。天然海水で蓄養した殻付きウニは全て生残したが，電解海水で蓄養したものは，棘が抜けはじめて動かなくなり1日目で半数の6個体が死滅し，2日目には全滅した。

そこで試験IIとして，有効塩素濃度を0.76 mg/Lと低く設定し，同様の試験を行った。供試したウニの *V. parahaemolyticus* 数は水揚げ直後において1.5×10^5（MPN/100 g）となり，試験Iで用いた個体に比べかなり高い値であった。蓄養試験において，*V. parahaemolyticus* は天然海水での蓄養1日目で若干増加したのに対し，電解海水での蓄養では減少した。さらに2日目には天然海水で2.4×10^4（MPN/100 g，減少率：84.00%），電解海水で4.0×10（MPN/100 g，減少率：99.97%）と測定され，電解海水での減少が顕著であった。

一般生菌数は，水揚げ直後1.1×10^8 CFU/g存在したが，蓄養期間により天然海水，電解海水共に減少する傾向を示し，2日目でそれぞれ，1.1×10^7（CFU/g，減少率：80.00%），3.7×10^5（CFU/g，減少率：99.66%）となり，*V. parahaemolyticus* の場合と同様に，電解海水での減少が顕著であった。本試験区では，ウニに脱棘

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

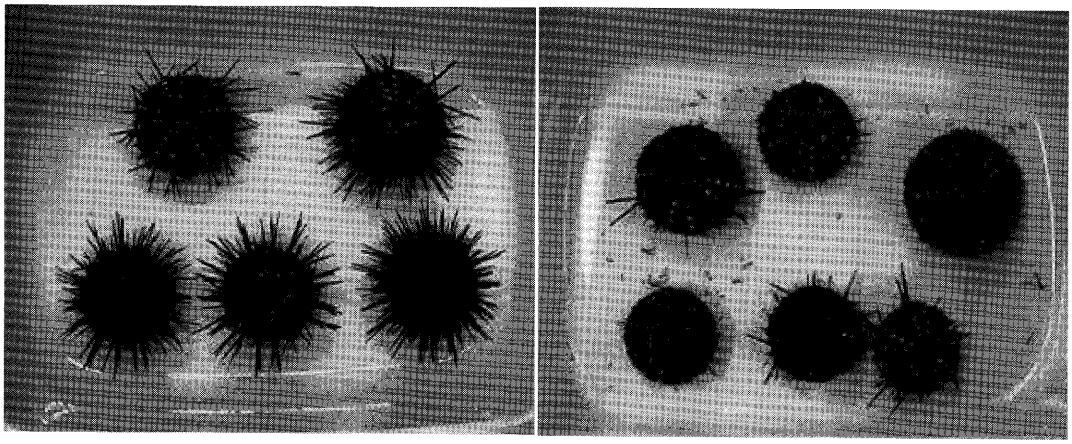

Fig. 3 Picture of sea urchin after rearing using electrolyzed seawater on 5th August, 2004 (exp. I). Chlorine concentration and flow rate were 0.76 mg/L and 2 L/min, respectively.

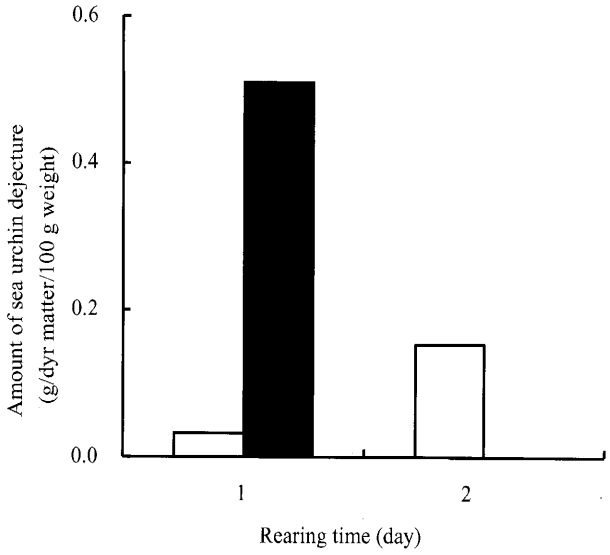

Fig. 4 Amount of sea urchin dejecture after rearing using electrolyzed seawater on 5th August, 2004 (exp. II). □, seawater; ■, electrolyzed seawater.

等の異常は観察されなかった。

次に，試験中に排出されたウニ糞量をFig. 4に示した。糞の状態は，餌であるコンブが細かく裁断された状態であり，やや未消化のまま排泄されていた。天然海水蓄養におけるウニ糞量が徐々に増加したのに対して，電解海水蓄養のウニ糞量は1日目で天然海水蓄養個体の約20倍と非常に多く，2日目にはほとんど排泄されなかった。

今回の試験中，3本法での腸炎ビブリオ陽性管について，*toxR*遺伝子は全て陽性となったが*tdh*遺伝子は全く検出されなかった。

考　察

厚生労働省は平成13年5月に，腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格及び基準を設定した。成分規格については，製品1 gあたり腸炎ビブリオ最確数を100以下とし，加工に使用する海水の基準については，腸炎ビブリオによる二次汚染防止のため，殺菌海水や人工海水の使用が規定されている。現場でも，腸炎ビブリオ食中毒防止対策として，調理室や器具の洗浄，調理前後の手洗い，調理後の速やかな喫食，冷蔵保存あるいは加熱調理などが実施されている。

しかし腸炎ビブリオ食中毒は後を絶たず，より徹底した衛生管理が求められている。腸炎ビブリオは好塩性細菌であり，夏期の増殖期にはウニやホタテなど定着性沿岸水産物に付着して汚染が広がる可能性が高いと考えられる。消費者へより安全・安心な魚介類を提供するためには，漁場環境におけるウニの腸炎ビブリオ汚染状況を把握することはもちろんであるが，水揚げ時に腸炎ビブリオを除去・殺菌する技術の開発が重要である。今回，殺菌海水の大量生産が容易である電解装置を用い，キタムラサキウニ蓄養による*V. parahaemolyticus*除菌効果について検討した。

まず，海水電解装置の運転条件を決定するため，3％食塩水に*V. parahaemolyticus*を懸濁し，電気分解をした時の殺菌効果を検討したところ，有効塩素濃度が高くなるにつれて殺菌率も高くなった（Table 1）。有効塩素濃度が0.23～0.47 mg/Lの場合，1分間以上処理することによって99.99％以上の殺菌率が得られ，その値は笠井ら[4,5]の魚類病原細菌に関する報告と同程度であった。以上より，海水の電気分解による本菌の殺菌は十分可能であると考えられる。

海水電解装置で処理し得られた電解海水でウニを蓄養した場合，試験Iでウニが全滅したが（Fig. 3），この時，電解海水の有効塩素濃度は1.6 mg/Lであり，この条件ではウニが生存出来ないことが明らかとなった。そ

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Fisheries Science

こで試験IIでは，電解海水の有効塩素濃度を0.76 mg/Lとしたところ，脱棘等による衰弱や死亡も観察されず，この程度の有効塩素濃度では1～2日程度の蓄養に充分耐えられることが示された。なお，試験中，電解海水の有効塩素は，供給口でほぼ一定の濃度であり，排水口ではウニとの接触のため若干消費されていた。一方，ウニの蓄養中，*V. parahaemolyticus* 数，一般生菌数がともに減少する傾向がみられた（Figs. 1, 2）が，電解海水では，Fig. 4に示したとおり多量に糞が放出されたことにより，その中に存在する *V. parahaemolyticus* などの菌も一緒に排出されたと考える。さらに，今回測定していないが，排出された細菌が電解海水中の有効塩素により殺菌されていることも十分推察される。ウニは，電気分解で生成した塩素の刺激を受け，糞を大量に排泄したと考えられるが，塩素濃度と排泄との関係は今後詳細に検討したい。本研究により，天然海水を電気分解して得られる殺菌された電解海水による蓄養を1日行うだけで *V. parahaemolyticus* 数を減少させることが可能となったため，今後は実用化に向けた取り組みを行う予定である。

謝　辞

本研究を進めるにあたり，PCR検査に関する助言を賜った北海道立衛生研究所の山口敬治氏に厚くお礼申し上げます。

文　献

1) 食品衛生調査会乳肉水産食品部会．腸炎ビブリオによる食中毒防止対策にする報告書．食品衛生調査会，東京．2001; 1–12.
2) 食品衛生調査会乳肉水産食品部会．腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格及び基準の設定について．食品衛生研究 2001; **51**: 47–53.
3) 小川博美．カキ衛生と微生物制御．広島県保健環境センター研究報告．1998; **6**: 1–14.
4) 笠井久会，石川麻美，堀　友花，渡辺研一，吉水　守．流水式海水電解装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果．日水誌 2000; **66**: 1020–1025.
5) 笠井久会，渡辺研一，吉水　守．バッチ式海水殺菌装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果．水産増殖 2001; **49**: 231–241.
6) 笠井久会，渡辺研一，吉水　守．流水式海水電解装置における飼育排水の殺菌．日水誌 2001; **67**: 222–225.
7) Yamamoto H, Ezura Y, Kimura T. Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Fish. Sci.* 1982; **48**: 1427–1431.
8) ㈳日本食品衛生協会．「食品衛生検査指針 微生物編（2004年版）」㈳日本食品衛生協会，東京．2004; 201–224.
9) Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37**: 1173–1177.
10) Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H, Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M, Takeda Y. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 1992; **6**: 477–487.

NII-Electronic Library Service