報 文

海ぶどう（クビレヅタ）の養殖工程および製品の細菌学的汚染調査

(平成 19 年 6 月 8 日受理)

久高 潤^{1,*} 糸数 清正¹ 平良 勝也¹ 仁平 稔¹ 岡野 祥¹
 中村 正治¹ 岩永 節子¹ 富永 正哉² 大野 惇²

Investigation and Culture of Microbial Contaminants of *Caulerpa lentillifera* (Sea Grape)

Jun KUDAKA^{1,*}, Kiyomasa ITOKAZU¹, Katsuya TAIRA¹, Minoru NIDAI¹, Sho OKANO¹,
 Masaji NAKAMURA¹, Setsuko IWANAGA¹, Masaya TOMINAGA² and Atsushi OHNO²

¹ Department of Biological Sciences, Okinawa Prefectural Institute of Health
 and Environment: 2085 Ozato, Nanjo-shi, Okinawa 901-1202, Japan;

² Department of Health and Welfare, Okinawa Prefecture: 1-2-2 Izumizaki, Naha-shi,
 Okinawa 901-8570, Japan; * Corresponding author

Caulerpa lentillifera is a kind of edible seaweed, known as 'sea grape' or 'green caviar'. It is used in fresh salads. However, it is sensitive to low temperature and osmotic pressure, and is easily spoiled by storage in a refrigerator or washing with tap water. That is the reason why it is difficult to prevent food poisoning, especially due to *Vibrio parahaemolyticus*. In this study we investigated of marine bacteria and *V. parahaemolyticus* in *C. lentillifera* and cultured them in order to develop effective control of bacteria in commercial farms. The sixteen farms in the Okinawa Islands were investigated from August to September in 2006. A total of 176 samples were collected from eleven points during the cultivation processes and from the products. About 10^3 cfu/mL of marine bacteria were detected in the seawater used in the tank culture, but after cultivation of *C. lentillifera* the number had increased to about 10^6 cfu/mL. The number of marine bacteria in *C. lentillifera* did not change significantly through the process of planting to the final product (about 10^7 cfu/g). *V. parahaemolyticus* was detected in seawater from all processes and *C. lentillifera* was isolated from 56% of seawater, 25% of seed-stocks, and 18.8% of product samples, though but thermostable direct hemolysin gene was not detected from enrichment cultures or isolated *V. parahaemolyticus* strains. These results indicate that for prevention of food poisoning by *V. parahaemolyticus* in *C. lentillifera*, it is important to establish a suitable sterilization procedure for each process.

(Received June 8, 2007)

Key words: クビレヅタ *Caulerpa lentillifera*; 海ぶどう sea grape; 海洋細菌 marine bacteria; 腸炎ビ
 ブリオ *Vibrio parahaemolyticus*

緒 言

海ぶどう（クビレヅタ: *Caulerpa lentillifera*）はイワ
 ヅタ科に属する熱帯性の食用海藻で、別名グリーンキャビ
 アとも呼ばれ、主に東南アジア、南太平洋諸島などの熱
 帯・亜熱帯地方の栄養に富んだ海に分布し、日本では沖縄
 県の宮古島および久米島などに自生している。フィリピン
 においては 1950 年代より、海から水路を通して海水を池
 に引き込んだ養殖法により生産されている¹⁾が、沖縄県で
 は海水をポンプでくみ上げた陸上タンク（水槽）での養
 殖²⁾に成功し、1994 年以降本格的な出荷が開始された。

その後、県内の離島を含む各地域に養殖事業が広がり、
 2006 年の推定生産量は 214 t で、生産額 6 億 6,000 万円
 を超える県の重要な産業に成長した。養殖方法は母藻を
 30～40 日間、無性生殖により増殖させ、直径 2 mm ほど
 の匍匐枝（ほふくし）から直立して伸びるブドウ房状の葉
 状部をつみ取り、養生、洗浄後海ぶどうとして出荷する。
 見た目や独特な食感が人気の食材で、主におみやげや飲食
 店で消費されており、近年、急激に需要が拡大し、生産者
 も急増している。

海ぶどうは、暖かい海でのみ発育し、根・茎・葉はある
 もの、非常に大きな単一細胞からなる海藻であるため、
 浸透圧や水温の影響を受けやすく、15℃以下の温度では
 房がしぼみ、真水による洗浄では房が落ちてしまう。その
 ため出荷前の洗浄は、数十秒程度流水ですすぐ程度で、保

* 連絡先

¹ 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班; 〒901-1202 沖縄県南
 城市大里字大里 2085 番地

² 沖縄県福祉保健部; 〒900-8570 沖縄県那覇市泉崎 1-2-2

Fig. 1. Location of Okinawa prefecture in Japan

The circles indicated the farms from which *C. lentillifera* was sampled.

存・流通は室温で行われる。また、通常サラダなど生で食べる食材であるため加熱は行わない。そのために食中毒の予防対策が困難であり、*Vibrio parahaemolyticus* (以下、腸炎ビブリオ) による食中毒のリスクが高い食材である。そのようななか、2004年に海ぶどうを原因とした腸炎ビブリオによる食中毒事例が報告されている³⁾。

これまで海ぶどうの腸炎ビブリオ汚染状況に関する報告

はない。筆者らは、2006年より安全で安心して消費できる海ぶどうの生産・供給をめざし、海ぶどうの衛生的な育生・生産および保存方法に関する調査・研究を開始した。本稿においては、海ぶどうの細菌学的汚染状況を把握し、効果的な衛生対策を確立することを目的に、各生産段階における腸炎ビブリオおよび海洋細菌の汚染実態調査を実施したのでその結果について報告する。

実験方法

1. 試料

2006年8月から9月にかけて、Fig. 1に示す沖縄本島内11か所、久米島1か所、宮古島2か所および石垣島2か所の合計16か所の養殖場において調査を行った。検体はFig. 2に示す各養殖工程より海水4検体（養殖使用海水②、養殖30～40日後の海水（以下、養殖海水③）、養生使用海水⑥および養生3日目の養生槽の海水（以下、養生海水⑦））、海ぶどう4検体（植え付け前の母藻（以下、母藻①）、養殖30～40日後の海ぶどう（以下、つみ取り前④）、養生後3日後の海ぶどう（以下、養生後⑧）および出荷直後の海ぶどう（以下、出荷直後⑨））、養殖後30～40日後の水槽壁面のふき取り検体（以下、壁面⑤）、合計9検体を採取した。また、製品を27℃で7日間保存した海ぶどう（以下、消費期限⑩）と、それを10Lの水道水を満たした容器にて毎分8Lの水道水で1分間流水洗浄をした海ぶどう（以下、流水洗浄後⑪）を同様に検査し、1養殖場あたり11検体（総計176検体）について調査した。検査は海洋細菌数および腸炎ビブリオについて検

Fig. 2. Processes of tank cultivation of *C. lentillifera* (A to G) and the sampling points of sea water and *C. lentillifera* (① to ⑪).

Tank cultivation A) Plant *C. lentillifera* in the culture tank. B) Culture *C. lentillifera* for 30 to 40 days, regulating the level of seawater, fertilizer and sunlight. C) Selection and harvest. D) Close wounded stems in UV-sterilized or non sterilized sea water. E) Wash *C. lentillifera* with tap water or ozone water for few seconds. F) Weigh and pack. G) Ship to market at room temperature.

Samples ①: Seedstock of *C. lentillifera*, ②: Seawater using in the tank culture, ③: Seawater before harvest, ④: Swab taken from the inside of the tank wall before harvest, ⑤: *C. lentillifera* after harvest, ⑥: Seawater using for curing *C. lentillifera*, ⑦: Seawater for curing *C. lentillifera* after 3 days, ⑧: *C. lentillifera* for curing after 3 days, ⑨: *C. lentillifera* product before shipping, ⑩: Product kept for 7 days at 27℃ (shelf life). ⑪: Product from “⑩” washed in 8 L/min tap water for 1 min.

Fig. 3. Changes of marine bacteria in seawater and *C. lentillifera* during farming processes

Sampling points of ① to ③ and ⑤ to ⑩ are defined in the legend to Fig. 2. A to P represent the 16 farms.

査した。また、検体採取時には施肥の状況、殺菌装置の使用有無などについても調査を行った。

2. 海洋細菌数の測定

海洋細菌数の測定法の概略は、海ぶどう 10 g を滅菌ストマッカー袋に採り、90 mL の滅菌海水を加え、ストマッカーで 90 秒間処理したものを試料原液とし、海水検体はそのままの状態を試料原液とした。次に試料原液の 1 mL を 9 mL の滅菌海水で 10 段階希釈した。試料原液および各希釈段階から 100 μ L を採り、それぞれ 2 枚の Marine agar (BD) の表面へ接種・塗抹し、25°C、7 日間培養後、生菌数を計測し BAM の方法⁴⁾に従い集落数の算定を行った。

3. 腸炎ビブリオの検出

海水検体は定性試験、海ぶどうおよび壁面のふき取り検体は定性および最確数法 (MPN 法) による定量試験を実施した。海水検体 1 L を 0.45 μ m のミリポアフィルターでろ過し、フィルターをアルカリペプトン水 (日水製薬) 100 mL に入れ、37°C、16~18 時間培養後した。培養液 1 mL を 12,000 rpm で 10 分間遠心分離して得られた沈渣を 25 mM NaOH 液 100 μ L に懸濁、95°C、10 分間加熱・アルカリ処理後、80 M Tris-HCl (pH 7.0) を 100 μ L 加え DNA を抽出し、Multiplex PCR (PCR) 法にて腸炎ビブリオ種特異的遺伝子である *toxR*⁵⁾ および耐熱性溶血毒素遺伝子 *tdh*⁶⁾ のスクリーニングを行った。スクリーニング陽性の培養液は、上清から 1 mL 採取し、10 mL のポリミキシンブイオン (日水製薬) で 37°C、16~18 時間二次増菌培養後、2 枚の TCBS 寒天培地 (栄研化学) に画線塗抹後 37°C で一晚培養した。培養後に出現した、緑色の腸炎ビブリオが疑われる集落を 1~5 個釣菌・純培養後し、TSI 寒天培地 (日水製薬)、LIM 培地 (日水製薬)、オキシダーゼ (栄研化学) の生化学的性状試験と PCR 法による *toxR* 遺伝子による同定と *tdh* 遺伝子の有無について検討した。

海ぶどうは 10 g を検査に用いた。また、養殖槽壁面ふき取り検体は水面下 10 cm² を滅菌ガーゼタンポン (10

cm² を折りたたんだもの) でふき取ったものを検査した。検体に 90 mL のアルカリペプトン水を加え 1 分間ストマッキング処理した後、MPN 法による定量のため 10 mL、1 mL および 0.1 mL を各 3 本接種した。MPN 法にて分取した残りは、海水検体同様に定性試験を行った。MPN 用のアルカリペプトン水は 37°C、16~18 時間培養した。定性試験の PCR スクリーニング試験の結果、陽性を示した検体は、MPN 法の各培養液より TCBS 寒天培地へ画線培養し 37°C で一晚培養した。以下、定性試験と同じように確認試験を実施した。

結 果

1. 海洋細菌数の推移

各養殖段階の海水および海ぶどうの海洋細菌数の推移を Fig. 3 に示す。養殖使用海水②および養生使用海水⑥は、海洋細菌数が検出限界値である 3.0×10^3 /mL 程度で比較的海洋細菌の汚染が少なかった。養殖槽海水③は、養殖場により $10^4 \sim 10^8$ /mL のばらつきが認められるものの、平均 8.6×10^6 /mL まで菌数が上昇した。養生槽海水⑦は平均 7.9×10^4 /mL であった。一方、海ぶどうにおける海洋細菌数は、母藻①の段階においてすでに平均 6.8×10^7 /g の菌数が認められ、つみ取り前⑤は平均 1.5×10^8 /g と養殖段階にて若干菌数が上昇した。その後、養生後⑧で平均 2.3×10^7 /g まで若干減少し、出荷直後⑨の製品は $10^6 \sim 10^8$ /g で養殖場によりばらつきが認められるものの平均 3.5×10^7 /g であった。また、消費期限⑩の菌数は平均 3.3×10^7 /g であった。つまり、母藻①から消費期限⑩まで、ほぼ変わらない高い菌数で推移していた。流水洗浄後⑩は消費期限⑩ (流水洗浄前) とほぼ同じ菌数で、水道水 1 分間の流水洗浄効果は認められなかった。

2. 腸炎ビブリオの検出状況

各検体の増菌培養液からの *tdh* の検出と腸炎ビブリオの分離状況を Table 1 に示した。増菌培養液のスクリーニング試験において、*toxR* はいずれのサンプリングポイントからも高率に検出されたものの、*tdh* は検出されなかつ

Table 1. Detection of *toxR*, *tdh* genes from enrichment culture and isolation of *V. parahaemolyticus* during the farming processes

Samples	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪
No. of positive <i>toxR</i> (<i>N</i> =16) (%)	9 (56.3)	13 (81.3)	15 (93.8)	12 (75.0)	12 (75.0)	14 (87.5)	15 (93.8)	14 (87.5)	11 (68.8)	12 (75.0)	14 (87.5)
No. of positive <i>tdh</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. of <i>V. p</i> isolated (<i>N</i> =16) (%)	4 (25.0)	9 (56.3)	3 (18.8)	4 (25.0)	3 (18.8)	6 (37.5)	5 (31.3)	3 (18.8)	3 (18.8)	3 (18.8)	3 (18.8)
The mean MPN/g	17.3	—	—	8.3	3.2	—	—	8.8	13.7	14.7	53.2

Samples of ① to ⑪ are defined in the legend to Fig. 2.

N: Number of farms, MPN: Most probable number

Table 2. Relationship between existence of fishing port and detection of *V. parahaemolyticus* in seawater

Fishing port	<i>V. p</i> ⁺ (%)	<i>V. p</i> ⁻	Total
Exist	8 (72.7)	3	11
Not exist	1 (20.0)	4	5
Total	9 (56.3)	7	16

V. p: *V. parahaemolyticus*, *p* value=0.049

Table 3. Relationship between UV sterilization and detection of *V. parahaemolyticus* in seawater from the curing tank

UV sterilization	<i>V. p</i> ⁺ (%)	<i>V. p</i> ⁻	Total
Used	2 (28.6)	5	7
Not used	3 (33.3)	6	9
Total	5 (31.3)	11	16

p value=0.84

た。一方、腸炎ビブリオの分離状況は、16か所の養殖場のうち、養殖使用海水②から56.3% (9か所)、養殖海水③から18.8% (3か所)、養生使用海水⑥から37.5% (6か所)、および養生海水⑦から31.3% (5か所) 腸炎ビブリオが検出された。海ぶどうは、母藻①から25.0% (平均17.3 MPN/10 g)、つみ取り前④から31.3% (8.3 MPN/10 g)、養生後⑧および出荷直後⑨の海ぶどうからそれぞれ18.8% (8.8 MPN/g, 13.7 MPN/g) 腸炎ビブリオが検出された。消費期限⑩および流水洗浄後⑪の海ぶどうも同様に18.8%検出され、菌数の減少も認められなかった (Table 1)。

また、いずれの腸炎ビブリオ分離株からも *tdh* は検出されなかった。

3. 養殖法と腸炎ビブリオ検出の関連性

次にアンケート調査から得られた情報と腸炎ビブリオ検出率について χ^2 検定により比較した。養殖に使用している海水を漁港から採水している場合は72.7%、漁港以外の場合は20%で、漁港海水の腸炎ビブリオ検出率が有意に高かった (Table 2)。また養生工程では、UV 殺菌装置を導入している養殖場の養生海水から14.3%、殺菌装置を使用していない養殖場からは55.6%と、使用していない群の腸炎ビブリオ検出率が高い傾向を示したが、有意な差は認められなかった (Table 3)。

その他、以下の条件でも腸炎ビブリオの検出率に有意な差は認められなかった。養殖使用海水では、採水場所付近に流域面積8 km²以上の河口がある場合60% (5か所中3か所)、ない場合が54.5%であった (11か所中6か所)。養生中の海ぶどうは、工程に海水のUV 殺菌装置を使用している場合が28.6% (7か所中2か所)、使用していない場合が11.1% (9か所中1か所) であった。最終製品で出荷前に水道水で洗浄している場合は11.1% (9か所中1か所)、洗浄していない場合は28.6% (7か所中2か所) であった。

考 察

わが国における腸炎ビブリオ食中毒は、1998年の839件をピークに漸次減少し、2006年は71件と約12分の1に激減している。一方、沖縄県ではこれまで腸炎ビブリオによる食中毒は比較的少なかったが、過去10年間を5年ごとに比較した場合、1997～2001年は発生数8事例、患者数48名であったのに対し、2002～2006年は、発生数12事例、患者数144名に増加している。これまでの統計によると海ぶどうが原因食品とされた事例は2004年の1事例のみであるが、不明事例の中の患者喫食状況調査メニューには、海ぶどうが関連したことが否定できない事例がいくつか存在する^{*1, *2}。

今回の調査で、海ぶどうや養殖海水には少量ながらも腸炎ビブリオが付着しており、これは海水や母藻に由来することが明らかになった。これまで漁港の海水は腸炎ビブリオ汚染頻度が高いことが報告^{7), 8)}されているが、今回の調査においても、漁港の海水を利用した養殖場では、海水中から腸炎ビブリオが検出される割合が高い傾向が見られたのでさらなる注意が必要である。また、海水と海ぶどうから検出される海洋細菌数の推移を比較した場合、海ぶどうは母藻、養殖、出荷段階および消費期限に至るまで、付着した海洋細菌数が10⁷～10⁸/gでほとんど変化していない。また、紫外線殺菌海水による養生あるいは、出荷前の

*1 笠原文子, 伊元信治, 櫻井秀樹, 吉田 崇, 盛島明隆, 金城康正, 腸炎ビブリオを原因とした食中毒事例について, 第37回沖縄県衛生監視員研究発表会抄録, p. 3-4 (2006)。

*2 幸喜得真, 宮平誠人, 大野明美, 小渡静夫, 海ぶどうが原因と推定される有症苦情事例, 第35回沖縄県衛生監視員研究発表会抄録, p. 3-4 (2005)。

流水洗浄の有無による腸炎ビブリオの検出を比較しても腸炎ビブリオの検出に有意な差は認められなかった。さらに、消費期限の海ぶどうとそれを流水洗浄した海ぶどうを比較しても、海洋細菌、腸炎ビブリオ共に菌数の減少は認められなかった。これらのことから、海ぶどうの表面に菌が強力に接着しているか、バイオフィームのようなものが形成され、紫外線滅菌海水や水道水による流水洗浄程度で除菌は困難であることが示唆された。

海ぶどうはその性質上、食中毒対策が困難な食材であることから、今回の調査結果を踏まえ養殖段階においては以下の点について注意し、積極的な消毒を試みる必要があると考える。海ぶどうの養殖は容量 10 t 程度の養殖槽に母藻をネットで挟み、施肥を行いながら養殖するが、腸炎ビブリオは供給される海水や母藻に付着しているので、供給する海水の紫外線殺菌、母藻はネットに挟む前に次亜塩素酸ナトリウムなどを用い殺菌を行う。また、養殖槽の壁面やネットにも腸炎ビブリオが付着しているので、養殖開始前後にこれらの定期的な洗浄・殺菌を実施する。約 30 日～50 日間養殖期間中、肥料を与えることにより海洋細菌は 10^8 /mL 程度まで一気に増殖するが、その間の細菌制御は困難であろう。その後、成長した房の部分を手でつまみ取り、2 t 程度の別の槽でさらに 3 日から 5 日間養生した後出荷されるが、この養生段階では 2 回の工程に分けることが望ましいと思われる。つまり、つまみ取り後傷口をふさぐ目的で 3 日間程養生し、その後エビや不純物、細菌を除くことを目的に海ぶどうの殺菌を行う。その後殺菌による海ぶどうのダメージ回復、消毒液の洗浄を目的に、海水を紫外線などで殺菌した別の清潔な槽に移し、さらに 3 日程養生を続ける。また、出荷前には再度適切な消毒を行う。これら一連の工程を科学的に検証し、HACCP の概念に基づいた総合的な対策を実践することにより衛生的で鮮度の良い海ぶどうの生産が可能であろう。

2001 年、「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」が改正⁸⁾になり、加工基準、保存基準、表示基準が制定された。海ぶどうを含め海藻についてはこの規格基準は適用されないが、今後、海ぶどうについても各企業や関係団体が独自の管理基準を策定し、自主管理に取り組む必要がある。生食用魚介類の規格基準の成分規格で腸炎ビブリオは 100 MPN/g 以下であり、今回の結果はすべてこれを下回るものであった。

現在、各養殖工程に適した具体的な消毒方法、殺菌装置の評価・改良、出荷後の保存方法について検討中であり、海ぶどうの消毒・保存法に関するマニュアルを作成する予

定である。今後も、安全で安心して消費できる海ぶどうの生産方法の確立を目指し継続して研究を実施する。

謝 辞

本研究は沖縄県水産業振興費海面養殖推進総合対策事業により実施した。本研究にご協力いただいた沖縄県農林水産部水産課の諸見里聰氏、水産業改良普及センター石川貴宣、山田真之の両氏および沖縄県各保健所生活環境班の諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Trono, G. C. Jr., "Manual on seaweed culture. 2: Pond culture of *Caulerpa* and 3: Pond culture of *Gracilaria*", FAO Corporate Document Repository, 1988.
- 2) Toma, T., Ecological and cultivation study of useful algae (four species) in sub-tropical area. Okinawaken Kaiyo Shinsosui Kenkyusho Tokubetuhokoku (Bulletin of Okinawa Prefectural Deep Sea Water Research Center), 2001, p. 57-86.
- 3) 財団法人沖縄県食品衛生協会 “食中毒予防読本” 2005, p. 5.
- 4) Maturin, L. J., Peeler, J. T., "FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3 Aerobic Plate Count", 8th ed., USA, AOAC International, 1998.
- 5) Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibuchi, M., Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the special level by PCR targeted to the *toxR* gene. J. Clin. Microbiol., **37**, 1173-1177 (1990).
- 6) Tada, J., Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fukushima, S., Takano, J., Takada, Y., 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, **6**, 477-487 (1992).
- 7) Gyobu, Y., Hosorogi, S., Tanaka, D., Shimizu, M., Isobe, J., Nagai, Y., Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in fishing ports. Shokuhin Biseibutu Gakkai Zasshi (Jpn. J. Food Microbiol.), **19**, 113-117 (2002).
- 8) Hosorogi, S., Tanaka, D., Isobe, J., Gyobu, Y., Kitamura, K., Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* in sea water and bottom mud at fishing ports of Toyama prefecture. Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research), **50**, 91-95 (2000).
- 9) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 “食品衛生法施行規則および食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 13 年 6 月 7 日、食発第 170 号 (2001).