

図11. *Stromateus stellatus* の総脂質の薄層クロマトグラム

表2. ブタスイ臓リパーゼによる処理後の脂質組成 (%)

基質 基質量 (mg)	DAGE+TAG		DAGE		WE		TAG	
	50	10	50	10	50	10	50	10
DAGE	51	2	98	98	0	0	0	0
WE	0	0	0	0	100	100	0	0
TAG	13	0	0	0	0	0	72	16
FFA	14	49	0	0	0	0	11	52
DG/MAGE	18	37	1	1	0	0	11	9
MG/GE	3	12	1	1	0	0	1	2

DAGE: ジアシルグリセリルエーテル

WE: ワックスエステル

TAG: トリアシルグリセロール

MG: モノアシルグリセリルエーテル

GE: アルキルグリセリルエーテル

DG: ジアシルグリセロール

表3. 脂質投与前後のマウス体重増減 (g)

脂質量 マウス体重に対する比	1/40	1/80	1/160
スケソウダラ肝油	1.7 ± 0.1	NT	NT
WE	-3.2 ± 0.8	-1.0 ± 0.9	-1.7 ± 0.5
DAGE	-4.4 ± 1.7	2.7 ± 0.5	-3.7 ± 0.9
DAGE+TAG	-4.5 ± 0.4	-4.0 ± 1.2	-3.9 ± 1.4

表4. 脂質経口投与におけるマウスの死亡率

脂質	投与量	死亡数	全死亡率 (死亡数)
DAGE	1/40	3/4	40% (4)
	1/80	0/3	
	1/160	1/3	
DAGE+TAG	1/40	3/3	56% (5)
	1/80	2/3	
	1/160	0/3	
WE	1/40	0/5	0% (0)
	1/80	0/5	
	1/160	0/5	

## 平成 11 年度厚生科学研究

### 食肉中の高度バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に関する調査、研究

分担研究者 池 康嘉

研究協力者 谷本弘一、小澤良之、野村隆浩、藤本修平、富田治芳  
(群馬大学医学部微生物学教室、同薬剤耐性菌実験施設)

国内 2 施設食肉検査所由来国産鶏肉、豚肉、及び横浜及び神戸検疫所由来外国産鶏肉、豚肉から分離された腸球菌の高度バンコマイシン耐性 (type A VRE) を調べた。検査した国内の検体数は鹿児島、宮崎それぞれ鶏肉 30、豚肉 15 検体である。横浜、神戸検疫所由来外国産鶏肉はそれぞれ 66、124 検体 (計 190 検体) 豚肉はそれぞれ 28、31 検体 (計 59 検体) である。検査したタイ産鶏肉 49 検体中 6 検体 (12%) から VanA 型高度バンコマイシン耐性 VRE が分離された。タイ産鶏肉以外の肉及び国内産肉からは VRE は分離されなかった。タイ産鶏肉から分離された VanA 型 VRE はすべて高度バンコマイシン耐性、低度テイコプラニン耐性で過去にタイ産鶏肉から分離された VanA 型 VRE と同様の耐性値を示した。

#### A. 研究目的

腸球菌はグラム陽性菌で、典型的な日和見感染菌であるが、近年院内感染により易感染患者に重篤な菌血症をおこす重要な細菌の一つとして欧米において問題になっている。アメリカ合衆国の Center for Disease Control and Prevention (CDC) の報告では 1989 年から 1993 年の 5 年間で VRE による院内感染が 20 倍に増加している。この菌はグラム腸性菌の中では最も多剤耐性菌が存在することが特徴である。セフェム系、アミノ糖系薬剤に対しては薬の透過性が低いために自然耐性でありさらにほとんどすべての抗菌剤に対して獲得耐性により高度耐性になり得る。これらのなかでも特に高度バンコマイシン耐性菌 (type A VRE) は、ペニシリン系、アミノ糖系を含めすべての抗菌剤に高度耐性の多剤耐性であることが多くその感染症に有効な抗菌剤が存在しないこともおこり得る。欧来においては院内感染症、人糞便、環境、家畜等からのバンコマイシン耐性腸球菌の分離頻度が増加している。

欧州においては、バンコマイシン類似体のアポパルシンが特にトリの家畜飼料に添加され長期に

用いられたことがバンコマイシン耐性腸球菌が増えたことに影響していると考えられている。我が国においては 1996 年春に一例の尿路感染症の患者から菌交代現象として検出された腸球菌が高度バンコマイシン多剤耐性腸球菌 (VanA 型) であったことが最初に報告された。以後国内で 12 例の患者から高度バンコマイシン耐性腸球菌 (VanA 型) が分離されているが、いずれも個別感染にとどまっている。しかしながら今後院内感染原因菌として増加する可能性がある。

人の細菌叢、環境等にバンコマイシン耐性菌が入ってくる最も可能性の高い経路の一つとして欧州と同様、家畜からの経路と輸入肉の汚染経路が考えられる。1998 年、及び 1999 年の輸入鶏肉、国内鶏肉の VRE の調査で、アポパルシン使用歴のあるタイ、フランスの輸入鶏肉から高頻度に VanA 型 VRE が分離された。今回の研究班の研究においては 2000 年度に横浜、神戸検疫所輸入食品検疫・検査センターで取り扱う外国由来の鶏肉の高度バンコマイシン耐性腸球菌による汚染の可能性を調べた結果を報告する。

#### B. 材料及び方法

腸球菌分離施設；2000年1月から3月の間に食肉取扱い施設で取り扱った国内検体より採集した検査材料を用いた。鹿児島（鶏肉30検体、豚肉15検体）、宮崎（鶏肉30検体、豚肉15検体）、横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター（横浜）（鶏肉66検体、豚肉28検体）、神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター（神戸）（鶏肉124検体、豚肉31検体）。

用いた培地；腸球菌分離には Enterococcosel Broth (BBL)及び Bile esculin azide agar (Difco)を使用。薬剤耐性検査は Todd Hewitt broth (Difco)及び Todd Hewitt broth agar を用いた。

用いた薬剤と用いた薬剤濃度；バンコマイシン (vancomycin) (Van)、テイコプラニン (teicoplanin) (Teic)、アンピシリン (ampicillin) (Apc)(25 $\mu$ g/ml)、エリスロマイシン (Em) (12.5 $\mu$ g/ml)、ゲンタマイシン (Gm) (500 $\mu$ g/ml)、カナマイシン (Km) (1000 $\mu$ g/ml)、ストレプトマイシン (Sm) (1000 $\mu$ g/ml)、テトラサイクリン (Tc) (6 $\mu$ g/ml)。

腸球菌の分離；type A VRE 検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル（神戸検疫所は綿棒ふき取りサンプル）を、バンコマイシン 12.5  $\mu$ g/ml 加 Enterococcosel Broth で48時間選択的増菌後、バンコマイシン 12.5  $\mu$ g/ml 加 Bile esculin azide agar 選択培地にまくことにより選択した。選択用寒天平板の培養時間はすべて37 $^{\circ}$ C、48時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は1夜液体培地培養後の菌を $\times 100$ 倍希釈することにより用いた。

バンコマイシン耐性の決定；サザンプロット法、PCR法を用いた。

### C. 結果

輸入鶏肉合計190検体のうち6検体よりVanA型VREが分離された。VREが分離された検疫施設と、検体が由来した国、VREの菌種、glycopeptide耐性値は表1に示した。VREが分離された6検体はいずれもタイ産鶏肉であった。6検体が検出された検疫所は、横浜検疫所タイ産鶏肉25検体中5検体、神戸検疫所鶏肉24検体中1検体からそれぞれ分離

された。腸球菌の菌種は *E. durans*, *E. faecalis*, 及び *E. faecium* であった。グリコペプチド耐性は vancomycin 高度耐性、teicoplanin 低感受性（または低度耐性）でこれまでタイ産由来鶏肉から分離された VanA 型 VRE と同様の耐性値を示した。PCR と vanA 遺伝子を用いた Southern blotting で確認した。その他の外国産鶏肉及び国内産鶏肉からは VRE は検出されなかった。また輸入豚肉及び国内産豚肉からは VRE は検出されなかった（表2）。

### D. 考察

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、バンコマイシン及びテイコプラニン耐性値から、VanA 型（高度耐性）、VanB 型（中等度耐性）、VanC 型（低度耐性）に分類される。この中で、人感染症から分離頻度が最も高く、院内感染、及び临床上最も問題となる VRE は VanA 型である。今回の調査では、平成9年度、及び10年度の調査と同様 VanA 型 VRE を検出することをその目的とした。その結果、国内産肉からは VanA 型 VRE は検出されなかった。外国産鶏肉の中でタイ産の鶏肉から検査検体49検体中6検体（12%）から VanA 型 VRE が分離された。タイは最近まで鶏飼料添加物としてアボパルシンが使用されていた国である。タイにおいては平成10年7月にアボパルシン使用を法的に禁止されたところであるが、アボパルシン使用の影響は現在も残っている可能性が推測される。過去2回の調査ではタイ産鶏肉から検査検体当たり20%の頻度で VRE が分離されていたが今回 VRE の分離頻度は12%と低下した。現時点では断定できないがタイにおけるアボパルシン禁止により VRE が養鶏環境で減少し、鶏肉の VRE 汚染が改善していることが推測できる。またタイの養鶏場の中で一部の養鶏場からの鶏肉から分離された可能性もある。

これまで検査鶏肉当たり常に50%の頻度で VanA 型 VRE が分離されていたフランス産鶏肉からは今回分離されなかった。しかしながら、今回検査を行ったフランス産鶏肉は1検体のみであり、VRE 汚染がなくなっているか否かは解らない。豚肉に

ついでにはヨーロッパにおいてVREが分離されると  
いう報告があるが今回の調査では分離されなかつ  
た。しかしながら、ヨーロッパ産の検体数は16で

あり、ヨーロッパにおける豚肉のVRE汚染の有  
無は判断できない。

表1 輸入鶏肉及び国内鶏肉からの type A VRE の分離

国名	検体取扱い 検疫所	検体件数 合計	type A VRE が 分離された検 体番号	菌種	Glycopeptide 耐性値 (MIC, µg/ml)		分離頻度(%)
					Vancomycin	Teicoplanin	
					タイ	横浜	
			1999	<i>E. faecalis</i>	256	2	
			3487	<i>E. faecalis</i>	512	4	
			5280	<i>E. durans</i>	256	0.5	
			5282	<i>E. durans</i>	128	0.5	
	神戸	24	3549	<i>E. faecium</i>	256	0.5	
		49					6/49 (12)
フランス	横浜	0					
	神戸	1					
		1					
ブラジル	横浜	10					
	神戸	12					
		22					
アメリカ 合衆国	横浜	11					
	神戸	34					
		45					
中国	横浜	20					
	神戸	53					
		73					
日本	鹿児島	30					
	宮崎	30					

表2 豚肉検体数

国名	検体取扱い 検疫所	検体件数 type A VRE が	
		合計	分離された検 体番号
フランス	横浜	4	0
	神戸	2	0
		6	0
アメリカ 合衆国	横浜	10	0
	神戸	8	0
		18	0
韓国	横浜	4	0
	神戸	10	0
		14	0
メキシコ	横浜	7	0
	神戸	2	0
		9	0
デンマーク	横浜	2	0
	神戸	7	0
		9	0
オランダ	神戸	1	0
		1	0
オーストラリア	神戸	1	0
		1	0
チリ	横浜	1	0
		1	0
日本	鹿児島	15	0
	宮崎	15	0
		30	

平成 11 年度 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

## *Coxiella burnetii* 死滅温度に関する実験的研究

研究協力者 山本茂貴（国立公衆衛生院）

研究協力者 長岡宏美（静岡県環境衛生科学研究所）

研究協力者 春日文字（国立感染症研究所）

### 研究要旨

前年度は、生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *Coxiella burnetii* の生残状況について調査研究を行った。その結果、62℃30分および63℃30分殺菌市販乳においてマウスを用いた *C. burnetii* 分離を試みたところ、限られた製造元での調査ではあったが、*C. burnetii* が分離された。そこで、今年度は、*C. burnetii* に汚染されていない生乳に菌を添加し、加熱致死温度について検討した。

今回の結果から、65℃30分加熱では *C. burnetii* が死滅するが、63℃30分では2/15と割合は低いものの *C. burnetii* が生残することが確認された。今回実験室で行った加熱方法は、目的温度までの上昇が速やかに起こっていることが、温度記録から明らかとなった。この結果から、単に目的温度で30分加熱するだけでは不十分な事が明らかとなった。一方、通常のバッチ式加熱方式では温度の上昇は緩やかであると考えられ、目的温度以下での加熱時間が *C. burnetii* を完全に死滅させるのに必要である可能性が考えられ、この点についてさらに検討する予定である。

### 研究目的

前年度は、生乳の汚染状況および種々の殺菌温度の市販乳における *Coxiella burnetii* の生残状況について調査研究を行った。その結果、62℃30分および63℃30分殺菌市販乳においてマウスを用いた *C. burnetii* 分離を試みたところ、限られた製造元での調査ではあったが、*C. burnetii* が分離された。そこで、今年度は、*C. burnetii* に汚染されていない生乳に菌を添加し、加熱致死温度について検討した。

### 材料と方法

生乳：マウス接種で3代継代しても *C. burnetii* が確認されなかった製造工場の原乳を用いた。

*C. burnetii* 株：Nine Mile II 相菌を BGM 細胞で増殖させ、細胞ごと回収して菌液として用いた。原液を 100 倍希釈して PCR が陰性となる菌量の物を *C. burnetii* 液とした。この菌液には少なくとも  $10^6$  / ml の *C. burnetii* が含まれていると推定された。

加熱処理：密封付き 4 ml のガラスバイアルに生乳 0.9 ml を入れ、*C. burnetii* 液 0.1 ml を添加し、62℃、63℃、65℃に設定したウォーターバス（MM-10、タイテック（株）、東京）に浸漬し、30分間加熱した。加熱温度は熱伝対式記録温度計（温度センサー SE5951、データコレクター AM-7002(K)、安立計器（株）、東京）で菌未添加生乳 1 ml の温度を実験群の代わりに測定し、所定の温度に上昇してから時間の計測を始めた。温度記録の一部

を図1に示した。熱電対式温度計の検証は検定付き棒状精密温度計（（株）東亜計器製作所、東京）を用いて行った。

マウス接種実験：サイクロフォスファミド 4 mg を前処置したA/J系5週齢の雌マウスを実験群（*C. burnetii* 添加加熱処理）5匹、陽性対照（*C. burnetii* 添加未加熱）3匹、陰性対照（*C. burnetii* 未添加加熱処理）3匹、およびマウス陰性対照（免疫抑制剤のみ接種）2匹としてそれぞれ用いた。P3施設内で3週間飼育し、その間5日間隔でサイクロフォスファミド 5 mg を腹腔内注射した。その後、エーテル麻酔下で血清と脾臓を採取し、脾臓スタンプ標本のギムザ染色、IF抗原試験、Nested PCR、および血清抗体価の測定を行った。すべての項目が陽性となったものを *C. burnetii* 分離陽性と判定した。なお、63℃30分加熱実験は3回繰り返した。

## 結 果

65℃30分加熱実験で実験群からは *C. burnetii* は分離されなかった。63℃30分加熱実験で実験群の1回目1/5、2回目1/5、および3回目0/5で *C. burnetii* が分離された。62℃30分加熱実験では実験群の3/5で *C. burnetii* が分離された。これらのことから、63℃30分の加熱でも *C. burnetii* が生残することが明らかとなった。図2-6にNested PCRの結果を示したが、明らかな陽性バンドが認められた。

## 考 察

今回の結果から、65℃30分加熱では *C. burnetii* が死滅するが、63℃30分では2/15と割合は低いものの *C. burnetii* が生残することが確認された。今回実験室で行った加熱方法は、目的温度までの上昇が速やかに起こっていることが、温度記録から明らかとなった。この結果から、単に目的温度で30分加熱するだけでは不十分な事が明らかとなった。一方、通常のバッチ式加熱方式では温度の上昇は緩やかであると考えられ、目的温度以下での加熱時間が *C. burnetii* を完全に死滅させるのに必要である可能性が考えられ、この点についてさらに検討する予定である。



表 1 生乳中の *C. burnetii* 加熱致死試験

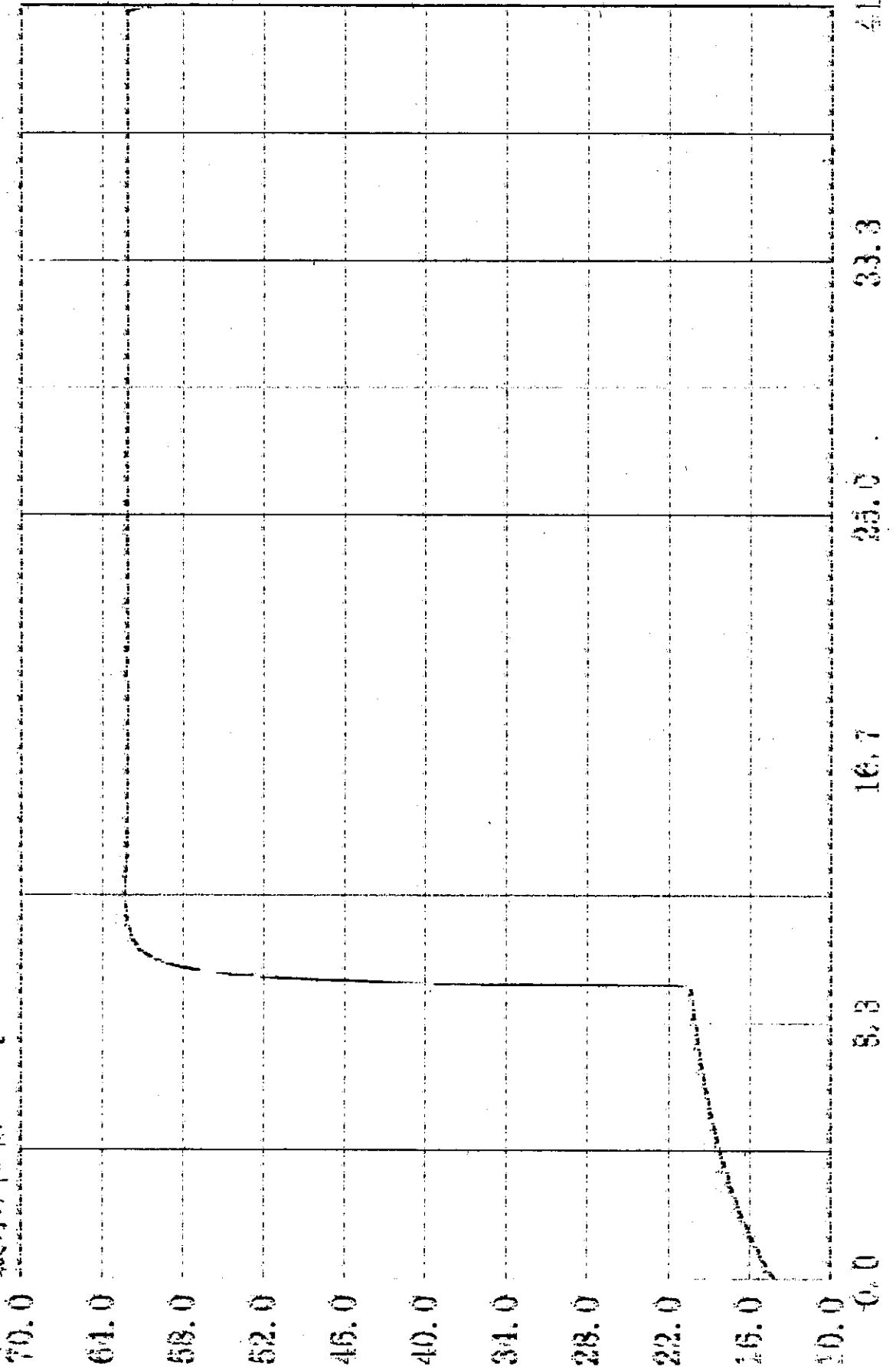
加熱温度条件		マウスにおける <i>C. burnetii</i> 分離成績 (陽性数/接種数)		
62 °C、30 分	実験群	3 / 5		
	陽性対照群	3 / 3		
	陰性対照群	0 / 3		
	マウス陰性対照群	0 / 2		
63 °C、30 分	実験群	1 / 5	1 / 5	0 / 5
	陽性対照群	3 / 3	3 / 3	3 / 3
	陰性対照群	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	マウス陰性対照群	0 / 2	0 / 2	0 / 2
65 °C、30 分	実験群	0 / 5		
	陽性対照群	3 / 3		
	陰性対照群	0 / 3		
	マウス陰性対照群	0 / 2		

63 °C、30 分の加熱致死試験は 3 回繰り返した。

実験群、*C. burnetii* 添加加熱；陽性対照群、*C. burnetii* 添加未加熱；陰性対照群、*C. burnetii* 未添加加熱；マウス陰性対照群、サイクロフォスファミドのみ処置

図1. 63°C

ファイル名 AM-0302  
 計測開始時間 99/06/11 12:37:40 ｲﾝﾀｰﾊﾞﾙ 1秒 ｻｲｸﾙ No. 0  
 (C) 表示モード

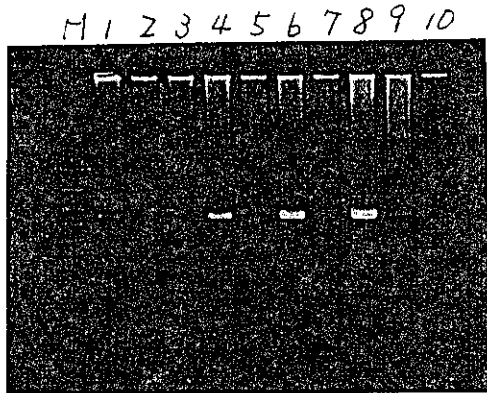


(参考)

Nested PCR によるマウス脾臓内の *C.burnetii* 遺伝子の確認

図2

62°C, 30 分加熱処理



M: サイズマーカー

1: PCR 陽性対照

2: PCR 陰性対照

3: 陰性対照

4: 陽性対照

5: 実験群 1

6: // 2

7: // 3

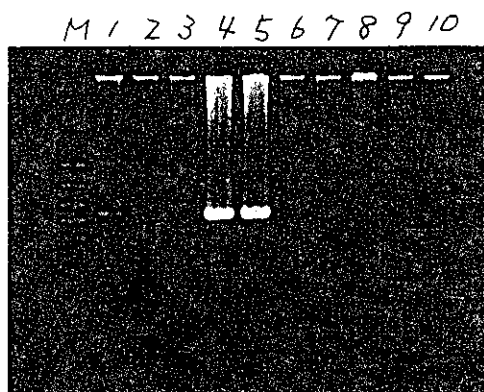
8: // 4

9: // 5

10: マウス陰性対照

図3

63°C, 30 分加熱処理(1回目)



M: サイズマーカー

1: PCR 陽性対照

2: PCR 陰性対照

3: 陰性対照

4: 陽性対照

5: 実験群 1

6: // 2

7: // 3

8: // 4

9: // 5

10: マウス陰性対照

図4

63°C, 30 分加熱処理(2 回目)



M: サイズマーカー  
1: PCR 陽性対照  
2: PCR 陰性対照  
3: 陰性対照  
4: 陽性対照  
5: 実験群 1  
6: " 2  
7: " 3  
8: " 4  
9: " 5  
10: マウス陰性対照

図5

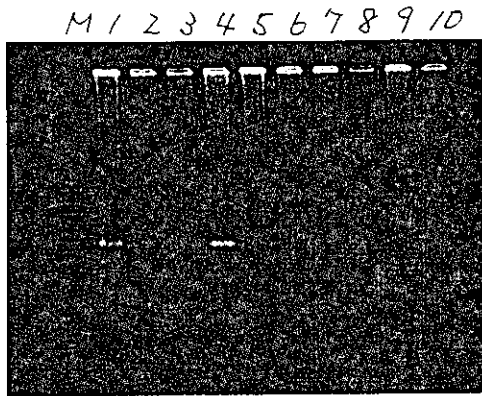
63°C, 30 分加熱処理(3 回目)



M: サイズマーカー  
1: PCR 陽性対照  
2: PCR 陰性対照  
3: 陰性対照  
4: 陽性対照  
5: 実験群 1  
6: " 2  
7: " 3  
8: " 4  
9: " 5  
10: マウス陰性対照

図6

65°C, 30分加熱処理



- M: サイズマーカー
- 1: PCR 陽性対照
- 2: PCR 陰性対照
- 3: 陰性対照
- 4: 陽性対照
- 5: 実験群 1
- 6: " 2
- 7: " 3
- 8: " 4
- 9: " 5
- 10: マウス陰性対照

## 分担研究報告書

### 平成11年度厚生科学研究補助費 生活安全総合研究事業

動物性加工食品等の高度衛生管理に関する研究  
主任研究者 熊谷 進

分担研究「腸炎ビブリオ汚染実態調査研究」  
分担研究者  
島田俊雄（国立感染症研究所）

#### 研究協力者

八柳 潤	（秋田県衛生科学研究所）	齊藤紀行	（宮城県保健環境センター）
甲斐明美	（東京都衛生研究所）	山井志朗	（神奈川県衛生研究所）
杉山寛治	（静岡県環境衛生科学研究所）	山川清孝	（富山県衛生研究所）
仲西寿男	（神戸市環境保健研究所）	小沼博隆	（国立医薬品食品衛生研究所）
伊藤健一郎	（国立公衆衛生院）		

#### 研究要旨

腸炎ビブリオ病原株の環境（海水、海泥）における分布を把握するため、PCR（遺伝子増幅）法、免疫磁気ビーズ法および神奈川現象確認培地（我妻培地）を組み合わせた検査法を用い、耐熱性溶血毒産生株（TDH）の検出を8研究機関で実施した。その結果、これまでTDH産生株の検出が極めて困難とされた海水および海泥からTDH産生性の腸炎ビブリオを分離することができた。これらの分離株の血清型は、最近わが国のみならず、世界的に流行しているO3:K6であり、パルスフィールド電気泳動法による遺伝子型も最近の流行株と一致した。しかしながら、PCR法によるTDH遺伝子保有株のスクリーニングで陽性を示し、TDH陽性株の存在が示唆された検体であるにもかかわらず、TDH陽性菌株が分離できない事例がかなり多くみられた。今後、この現象の解明を早急に行う必要がある。

今回供試した海水中の腸炎ビブリオのMPN値（最確数）は10-10,000/100ml、海泥および魚介類では100-10,000/100mlの範疇にあった。なお、MPN値は従来のポリミキシンブイヨンよりもアルカリペプトン水の方が高い数値を示した。

## 海水、海泥 および 貝 の腸炎ビブリオ汚染実態と 血清型O3 : K6株の分布に関する研究

研究協力者 甲斐明美, 尾畑浩魅, 小西典子, 諸角 聖, 小久保彌太郎  
(東京都立衛生研究所)

夏季に東京湾岸6地点で病原ビブリオ分布状況を調べた結果、腸炎ビブリオおよびNAGビブリオ等の病原ビブリオが東京湾にも広く分布していることが確認された。しかし、腸炎ビブリオ菌量は海水で $10\sim 10^2$ 個/100ml、海泥で $10\sim 10^3$ 個、貝では一般的に海水や海泥と比較するとその菌数は少ない成績であった。すなわち、本菌食中毒の増加に伴って、腸炎ビブリオ菌数が特に増加しているような傾向は認められなかった。

腸炎ビブリオ食中毒患者から検出される菌は、その大部分がTDH産生性であるが、海水、魚介類などから検出される菌は通常TDHを産生しない。本研究では、PCR法を応用しTDH産生株の検出を試みたが、分離することはできなかった。

1996年以降急増している腸炎ビブリオ食中毒の主な原因菌である血清型O3:K6が夏季の海水に広く分布することが確認された。しかし、検出された菌株はすべてTDH非産生性であり、食中毒患者から検出されるTDH産生株とは異なっていた。これらの菌株間の異同については、更に検討が必要である。

腸炎ビブリオ食中毒が急増し続けている原因については、血清型O3:K6株の急増以外未だ不明である。この原因を解明するためには、さらに検査法の開発や血清型O3:K6株の自然界での生存性などの生態学的な研究が必要である。

### A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒は、1993年頃から増加し始めていたが、特に1996年以降急増し1997年にはサルモネラを抜き第1位となった。このように急増した腸炎ビブリオ食中毒の原因の一つとして、血清型O3:K6の異常な増加が指摘されている。

本研究ではこの急増した食中毒の原因を解明する手段の1つとして、海水、海泥及び貝の本菌汚染状況を調べることを目的とした。また、腸炎ビブリオ食中毒の異常な増加に大きく関与していると推定される血清型O3:K6株の検出を試みた。

更に、血清型O3:K6株を効率的に検出するための免疫磁気ビーズ法についても検討した。

一方、腸炎ビブリオの病原因子としては、耐熱性溶血毒(Thermostable direct hemolysin: TDH)が知られている。しかし従来から、腸炎ビブリオ食中毒患者から分離される菌株はTDH産生株であるが、食品や海水から検出される腸炎ビブリオ株はすべてTDH非産生株ばかりで、TDH産生株は分離できないと言われている。そこで、TDH産生株を海水等から分離するために、新しい手法であるPCR(Polymerase chain reaction)法を応用して検出を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 供試材料

東京湾岸の6地点、すなわち木更津、船橋、羽田、三枚洲、金沢八景および富津で、7~9月の間に各2回、海水、海泥および貝を採取し検査対象とした。採取場所と採取日は表1の通りである。

#### 2. 検査方法

腸炎ビブリオの分離・同定: 増菌培地としては、アルカリペプトン水(APW, 日水)および食塩ポリミキシンブイオン(PB, 日水)を、分離にはTCBS寒天培地を用い、常法に従って同定した。

腸炎ビブリオ菌数の測定: APWおよびPBを用いて最確数(most probable number; MPN)3本法によって算定した。

腸炎ビブリオ血清型O3:K6株の分離: PCR法で、*tdh*遺伝子陽性となった培養液について、免疫磁気ビーズ腸炎ビブリオK6(デンカ生研)を用いて、手順書に従い血清型O3:K6菌の濃縮分離を試みた。

腸炎ビブリオのTDH産生性試験: PCR法による*tdh*遺伝子の検出、および逆受身ラテックス凝集法によってTDH産生性を調べた。

## C. 研究結果

### 1) 病原ビブリオの検出

1999年7~9月の3ヶ月間に調査した東京湾岸6地点各2回の海水、海泥および貝のすべてから腸炎ビブリオが検出された。更に、NAGビブリオ、*V. fluvialis*等の病原ビブリオも大部分の検体から検出された(表1)。

### 2) 腸炎ビブリオ菌量の測定

腸炎ビブリオ菌量は、7月より8~9月の方が多く、8月にはMPN法で、海水100ml当たり $10^2$ 個であった。海泥では海水より多く $10^3$ 個、貝では一般的に海水や海泥と比較するとその菌数は少なかった。また、APWを用いてMPNを算出した方が、PBの場合より高い値であった(表2)。

### 3) 腸炎ビブリオTDH産生株の検出

TDH産生株を検出するためにAPWやPB等の増菌培養液を対象にPCR法でスクリーニングし、陽性になった培養液から出来る限り多くの腸炎ビブリオ集落(数10~数100個)を分離した。そして、その菌についてTDH産生性を調べた結果、培養液から*tdh*遺伝子は検出されたが、TDH産生株を分離することはできなかった(表3-1, 3-2, 3-3)。

### 4) 腸炎ビブリオ血清型O3:K6株の検出

海水等から血清型O3:K6株を分離するために、各検体のPCR法で*tdh*遺伝子陽性となった試験管の培養液について免疫磁気ビーズ法を用いてO3:K6株の検出を行った(表4-1, 4-2, 4-3, 表5)。比較のために免疫磁気ビーズ法を行わない場合のO3:K6株の分離も試みた。海水12検体について検討した結果、O3:K6株が分離された検体は「ビーズ法無し」では5検体、「ビーズ法有り」では4検体であった。海泥や貝でも、ほぼ同様な成績であった。

血清型O3:K6に該当した菌株は、分離した菌株の0.4~60%であった。O3:K6株が検出された検体数は「ビーズ法無し」の方が多かったが、同一検体では「ビーズ法有り」の方がO3:K6株が高頻度(容易)に検出された。増菌培地としては、海水と海泥ではAPWが、貝ではPBの方が優れていた。しかし、分離された菌株はすべてTDH非産生株であった。

## D. 考察

腸炎ビブリオは主に汽水域の海水、プランクトンおよび海底の泥に分布している。その検出時期は5~10月で、夏季の検出率は

100%に近いが、冬季では海水からは検出されない。本調査では、夏季に東京湾岸6地点で、病原ビブリオ分布状況を調べた結果、そのいずれからも腸炎ビブリオが検出された。すなわち、腸炎ビブリオが東京湾にも広く分布していることが確認された。

夏季の沿岸海水中の腸炎ビブリオ菌量は100mlあたり $10^2$ ~ $10^3$ 個程度で、その多くは $10^2$ 個以下であると報告されている。本調査においても東京湾岸6地点の腸炎ビブリオ菌量は海水で $10$ ~ $10^2$ 個/100mlであり、海泥では海水より多く $10^3$ 個、貝では一般的に海水や海泥と比較するとその菌数は少なかった。本菌食中毒の増加に伴って、腸炎ビブリオ菌数が増加しているような傾向は認められなかった。

海水中の腸炎ビブリオ菌数には水温が大きく関わり、水温が $15^{\circ}\text{C}$ 以下になると増殖が抑制されるが、 $20^{\circ}\text{C}$ 以上では増殖が顕著であると報告されている。本調査では水温の測定を行っていないが、7月の海水よりも8~9月の水温の方が高く、腸炎ビブリオの増殖至適温度( $30$ ~ $37^{\circ}\text{C}$ )により近かったため、2回目の検体の方が菌数が多かったものと推定された。

腸炎ビブリオ食中毒患者から検出された菌株は、その大部分がTDH産生性であるが、海水、魚介類などから検出される株は通常TDHを産生しない。本研究では、TDH産生株を海水等から分離するためにPCR法を応用し、その検出を試みた。PCR法で陽性となった培養液から分離した可能な限り多くの菌株についてTDH産生性を検討したが、TDH産生株は検出されなかった。

今回の調査で検出されたO3:K6株は、いずれもTDH非産生性であったが、1995年以降急増している腸炎ビブリオ食中毒の原因菌である血清型O3:K6は8~9月の海水に広く分布することが確認された。しかし、検出された菌株はすべてTDH非産生性であり、食中毒患者から検出されるTDH産生株とは異なっていた。これらの菌株間の異同については、更に検討が必要である。

腸炎ビブリオ食中毒が急増し続けている原因については、血清型O3:K6株の急増以外未だ不明である。この原因を解明するためには、さらに検査法の開発や血清型O3:K6株の自然界での生存性などの生態学的な研究が必要である。

## F. 研究発表

1. 最近10年間の東京都における腸炎ビブリオ食中毒の発生動向とその特徴について(第20回日本食品微生物学会総会、



- 1999, 10, 盛岡)
2. P C R法を用いた海水からのT D HおよびT R H産生腸炎ビブリオの検出(第33回腸炎ビブリオシンポジウム, 1999, 11, 沖縄)
  3. Emergence of *Vibrio parahaemolyticus* as the foodborne outbreaks in Japan (International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2000, 7, Atlanta)

表1. 海水・海泥・貝(アサリ)の病原ビブリオ検査結果

採取地	採取日	海水	海泥	貝(アサリ)
1 木更津	7.12	Vp, NAG	Vp	Vp, Vf1, Vfu
2 船橋	7.13	Vp, NAG	Vp	Vp, Vc, Vfu
3 羽田	7.15	Vp, NAG, Vf1	Vp, NAG	Vp
4 三枚洲	7.15	Vp, NAG	Vp, NAG	Vp, NAG, Vm
5 金沢八景	7.28	Vp, NAG	Vp, Vf1	Vp
6 富津	7.28	Vp, NAG	Vp	Vp, Vf1
7 木更津	8.24	Vp, NAG	Vp	Vp, NAG
8 船橋	8.24	Vp, NAG, Vf1	Vp, Vc, NAG, Vf1, Vm	Vp, NAG, Vm
9 富津	8.26	Vp, NAG	Vp, NAG	Vp
10 羽田	8.27	Vp, NAG, Vf1	Vp, NAG, Vf1	Vp, Vf1
11 三枚洲	9. 9	Vp, NAG	Vp	NT
12 金沢八景	9.10	Vp, NAG	Vp, Vf1	Vp

検査対象 : *V. cholerae* O1 (Vc), *V. cholerae* non-O1 (NAG),  
*V. parahaemolyticus* (Vp), *V. fluvialis* (Vf1),  
*V. furnissii* (Vfu) , *V. mimicus* (Vm)



検体採取地点

表 2. 海水・海泥・貝(アサリ)の腸炎ビブリオ菌数 (MPN/100ml)

No.	採取日	場 所	海 水	海 泥		貝(アサリ)	
			A P W*	A P W	P B**	A P W	P B
1	7.12	木更津	93	9	9	20	11
2	7.13	船 橋	11	1100	3	28	4
3	7.15	羽 田	6	7	11	<3	6
4	7.15	三枚洲	15	9	<3	28	<3
5	7.28	金沢八景	240	530	7	930	2400
6	7.28	富 津	64	90	150	43	4
7	8.24	木更津	150	150	20	21	<3
8	8.24	船 橋	<3	60	7	9	<3
9	8.26	富 津	210	11000	9	380	930
10	8.27	羽 田	140	240	7	150	150
11	9. 9	三枚洲	200	1200	4	NT	NT
12	9.10	金沢八景	230	1500	43	11000	3

\* : アルカリペプトン水

\*\* : 食塩加ポリミキシムイオン

表3-1. 海水からのTDH産生腸炎ビブリオの検出

検体 No.	tdh (PCR法)			分離菌株		
	A P W		P B		供試数	T D H 陽性数
	MPN*	ろ過法	ろ過法			
1	-	+	+		187	0
2	-	-	-		NT	0
3	-	-	+		26	0
4	-	+	-		24	0
5	-	+	+		146	0
6	-	-	+		159	0
7	-	+	+		57	0
8	-	+	-		46	0
9	-	+	+		88	0
10	-	-	+		78	0
11	-	-	-		NT	0
12	-	-	-		NT	0
	0	6	7			0

\* - : < 3 / 100ml

表3-2. 海泥からのTDH産生腸炎ビブリオの検出

検体 No.	tdh (PCR法)				分離菌株	
	A P W		P B		供試数	T D H 陽性数
	MPN*	大量	MPN*	大量		
1	-	+	-	+	133	0
2	-	-	-	-	NT	0
3	-	+	-	-	202	0
4	-	-	-	-	NT	0
5	-	-	-	+	152	0
6	-	-	4	+	81	0
7	-	-	3	+	473	0
8	-	-	-	-	NT	0
9	-	-	-	-	NT	0
10	-	-	-	-	NT	0
11	-	-	-	-	NT	0
12	-	-	-	-	NT	0
	0	2	2	4		0

\* - : < 3 / 100ml

表3-3. 貝(アサリ)からのTDH産生腸炎ビブリオの検出

検体 No.	tdh (PCR法)				分離菌株	
	A P W		P B		供試数	T D H 陽性数
	MPN*	大量	MPN*	大量		
1	-	+	-	+	136	0
2	-	-	1100	-	81	0
3	-	+	-	-	58	0
4	-	-	-	-	NT	0
5	-	-	3	-	36	0
6	-	+	4	-	115	0
7	-	-	-	-	NT	0
8	-	-	3	-	45	0
9	-	-	-	-	NT	0
10	-	-	-	-	NT	0
11	NT	NT	NT	NT	NT	NT
12	-	-	60	-	26	0
	0	3	5	1		0

\* - : < 3 / 100ml