

表4-1. 海水からの血清型O3:K6株の検出

検体 No.	ビーズ法：無		ビーズ法：有	
	供試数	O3:K6(%)	供試数	O3:K6(%)
1	112	0	72	0
2	5	0	NT	.
3	3	0	13	0
4	15	0	9	0
5	85	0	60	0
6	68	18 (26.5)	90	0
7	49	1 (2.0)	7	4 (57.1)
8	29	1 (3.4)	16	1 (6.3)
9	43	6 (14.0)	44	10 (22.7)
10	18	1 (5.6)	60	10 (28.3)
11	12	0	NT	.
12	18	0	30	0

検出されたO3:K6株：KP(-), ウレアーゼ(-),
tdh (-), *trh* (-)

表4-2. 海泥からの血清型O3:K6株の検出

検体 No.	ビーズ法：無		ビーズ法：有	
	供試数	O3:K6(%)	供試数	O3:K6(%)
1	70	0	59	0
2	18	0	NT	.
3	105	0	96	0
4	4	0	NT	.
5	88	0	60	0
6	45	7 (15.6)	35	0
7	237	1 (0.4)	229	6 (2.6)
8	34	4 (11.8)	16	0
9	20	0	NT	.
10	11	0	NT	.
11	48	0	30	18 (60.0)
12	24	0	NT	0

検出されたO3:K6株：KP(-), ウレアーゼ(-),
tdh (-), *trh* (-)

表4-3. 貝(アサリ)からの血清型O3:K6株の検出

検体 No.	ビーズ法：無		ビーズ法：有	
	供試数	O3:K6(%)	供試数	O3:K6(%)
1	72	0	64	0
2	43	0	38	0
3	28	0	30	0
4	7	0	NT	.
5	35	2 (5.7)	NT	.
6	65	0	50	0
7	4	0	NT	.
8	15	1 (6.7)	30	0
9	37	6 (16.2)	NT	.
10	7	1 (14.3)	NT	.
11				
12	26	0	NT	.

検出されたO3:K6株：KP(-), ウレアーゼ(-),
tdh (-), *trh* (-)

表5. 血清型O3:K6の分離を目的とした免疫磁気ビーズ法と増菌培地の比較

検体	検体 No.	ビーズ法：無		ビーズ法：有	
		APW(%)	PB(%)	APW(%)	PB(%)
海水	6	0/36	18/32 (56.3)	0/60	0/30
	7	0/19	1/30 (3.3)	—	4/7 (57.1)
	8	1/16 (6.3)	0/13	0/12	1/4 (25.0)
	9	0/13	6/30 (20.0)	0/15	10/29 (34.5)
	10	0/5	1/13 (7.7)	—	17/60 (28.3)
海泥	6	0/3	7/42 (16.6)	—	0/35
	7	0/131	1/106 (0.9)	6/180 (3.3)	0/49
	8	0/2	4/32 (12.5)	—	0/16
	11	0/15	0/33	—	18/30 (60.0)
貝(アサリ)	5	2/20 (10.0)	0/15	—	—
	8	1/14 (7.1)	0/1	—	—
	9	6/30 (20.0)	0/7	—	—
	10	0/4	1/3 (33.3)	—	—

腸炎ビブリオ汚染実態調査研究

研究協力者 八柳 潤 (秋田県衛生科学研究所)

研究要旨 腸炎ビブリオの感染源や感染ルートに関する知見を得るために、秋田県沿岸の海水と海泥を対象として近年その感染症が多発している腸炎ビブリオ03:K6、および血清型03:K6以外でTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオの汚染実態調査を実施した。海水41検体中6検体、海泥25検体中6検体がPCRによるTDH遺伝子保有株のスクリーニングが陽性となり、また、海水、海泥それぞれ1検体がTRH遺伝子保有株のスクリーニングが陽性となったことから、秋田県沿岸にヒトの下痢症の原因となる腸炎ビブリオが分布していることが示唆されたが、菌は分離し得なかった。今後、03:K6などの腸炎ビブリオの感染予防策を構築するための第一歩として、海水などの環境試料からTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオを特異的に分離する方法を確立することが急務と考えられた。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ03:K6は1996年2月にカルカッタで下痢症患者から分離されて以来、地球規模でその分布を拡大している。秋田県においても1996年8月以降、腸炎ビブリオ03:K6を原因とする散発下痢や食中毒が多発しているが、本菌感染症多発の要因として重要と考えられる感染源や感染ルートに関する知見は非常に少ない。このことから、沿岸海域における本菌の分布状況に関する知見を得るために、秋田県沿岸の海水および海泥を対象として腸炎ビブリオ03:K6、および血清型03:K6以外でTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオの汚染実態調査を実施した。

B. 研究方法

検体採取定点：秋田県沿岸の以下の3箇所を検体採取定点とした。

定点1：秋田県由利郡象潟町漁港（秋田市から約60Km南）

定点2：秋田県本荘市 本荘マリーナ港（秋田市から約40Km南、子吉川河口から約

500m上流）

定点3：秋田港（秋田市、雄物川河口域）

以上の定点から表1に示すように海水、海泥を採取して腸炎ビブリオ03:K6、および血清型03:K6以外でTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオの検索に供した。

海水・海泥からのTDHまたはTRH遺伝子保有腸炎ビブリオの分離：研究班で定めた方法に従い、TDH遺伝子保有腸炎ビブリオの分離・同定を試みた。その概要は以下のとおりである。すなわち、10倍量のPBSを加えて調製した海泥原液、または海水を、アルカリペプトン水を使用してMPN3管法に準じて接種・培養した。検体接種量10mlと1mlの培養管のうち、細菌の発育が認められた培養管それぞれ1本について、PCRによりTDH遺伝子の検索を実施し、陽性反応がみられた培養液について、TCBS培地により分離培養した。生じた腸炎ビブリオ様コロニーのできるだけ多数を我妻培地に面線培養し、神奈川現象を指標としてTDH保有株の分離・同定を試みた。なお、陽性反応がみられた培養液に

については、免疫磁気ビーズ腸炎ビブリオK6「生研」を使用して腸炎ビブリオ03:K6の分離を試みた。神奈川現象様溶血がみられたコロニーについて、生化学的性状試験とPCRにより同定した。なお、海水については、1000mlを濾過したメンブランフィルターをアルカリペプトン水に接種・培養して得た培養液を対象としてTDH遺伝子保有株の定性的検出も試みた。また、海泥についてはアルカリペプトン水に加えて食塩ポリミキシン培地を選択増菌培地として併用した。一方、TRH遺伝子保有株の検出については、多田らが報告したプライマーを使用したPCRにより培養液のスクリーニングを実施し、陽性となった培養液をTCBS平板により分離培養した。TCBS平板上に生じた腸炎ビブリオ様コロニーについて、ウレアーゼ活性を指標としてTRH遺伝子保有株のスクリーニングを実施した。7月と8月に採取した検体については、上記方法により定量的検査と定性的試験を実施したが、9月以降に採取した検体については定性的試験のみを実施した。

C. 研究結果

腸炎ビブリオ分離成績を表2に示した。7月に採取した海水と海泥それぞれ12検体中5検体、8月に採取した海泥3検体中1検体、および10月に採取した海水10検体中1検体からPCRによるスクリーニングによりTDH遺伝子保有株が検出された。一方、7月に採取した海水と海泥それぞれ12検体中1検体からPCRによるスクリーニングによりTRH遺伝子保有株が検出された。スクリーニング陽性検体について、それぞれの遺伝子を保有する腸炎ビブリオ菌株の分離を試みたが、いずれの検体からもTDHまたはTRH遺伝子保有株を分離することはできなかった。特に、10月にTDH遺伝子保有株のスクリーニングが陽性となっ

た海水1検体はTDH遺伝子増幅断片の輝度も強く、検討した検体の中ではTDH遺伝子保有株が最も多く含まれていると考えられたことから、我妻培地を使用したスクリーニングとK6ダイナビーズ法に加えて、県内で散発患者から検出される頻度が高い血清型であるK6,K68,K56,K9及びK11の市販型別用血清を使用して自家調製したダイナビーズを併用してTDH遺伝子保有株の分離を試みた。これらの方法により、TCBS平板上に生じた腸炎ビブリオ様コロニー総計約500個についてTDH遺伝子の検出を試みたが、TDH遺伝子保有株を分離することはできなかった。なお、スクリーニング陽性となった検体について3管法で求めたTDH遺伝子またはTRH遺伝子保有株のMPNは<3/100 mlから360/100 ml程度であった。

これに対して、7月に採取した海水12検体中7検体と海泥12検体の全て、および8月に採取した海水と海泥それぞれ3検体の全てからTDHとTRHのいずれをも保有しない腸炎ビブリオが分離され、そのMPNは3/100 mlから4600/100 mlであった。分離株の血清型別は、7月に分離された株についてのみ実施したが、下痢患者由来株と同じ血清型はみられなかった。

D. 考察

腸炎ビブリオ食中毒の感染疫学を理解する際に、リザーバーと考えられる海水や海泥の汚染実態を解明することが非常に重要である。従来は、海水などの環境に広く分布している、TDHまたはTRH遺伝子を保有しない腸炎ビブリオの検出状況から腸炎ビブリオの汚染実態が論じられてきた。しかしながら、このような腸炎ビブリオはヒトに下痢を惹起しないと考えられているために、ヒトの下痢症の感染源に関する疫学的研究の指標としては適切でなく、TDHまたはTRHを産生する腸炎ビブリオの検出状況を指標

とすべきであると考えられる。しかし、海水などの環境試料からTDHまたはTRHを産生する腸炎ビブリオを分離することは以前から非常に困難であるとされている。

今回、我々は海水または海泥の培養液についてPCRによりTDHとTRH遺伝子保有株の存在をスクリーニングし、陽性となった培養液を分離培養すると同時に、03:K6を分離するためのビーズ法を併用してTDHまたはTRHを産生する腸炎ビブリオの分離を試みた。その結果、海水、海泥それぞれ6検体がTDH遺伝子保有株のスクリーニング陽性、および海水、海泥それぞれ1検体がTRH遺伝子保有株のスクリーニング陽性となり、秋田県沿岸にTDHまたはTRH遺伝子を保有し、ヒトの下痢症の原因となる腸炎ビブリオが分布していることが示唆された。しかし、スクリーニング陽性検体について繰り返し菌分離を試みたが、実際にTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオを分離することはできなかった。この原因として、今回使用した培養系の腸炎ビブリオに対する選択増菌・選択分離能力が不十分であったことが考えられる。実際、海水や海泥のアルカリ性ペプトン培地培養液をTCBS培地で分離培養した際、*V. alginolyticus*様の黄色コロニーが多数生じ、腸炎ビブリオ様の緑色コロニーが覆い尽くされる場合、また、腸炎ビブリオ様緑色コロニーについても釣菌後に同定を行うと腸炎ビブリオ以外の菌であることが判明するケースが多数経験された。従って、海水などの環境試料からTDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオを効率良く分離するためには、まず第一に環境試料から腸炎ビブリオをより特異的に分離するための選択増菌、選択分離培養法を確立することが必要と考えられる。この点に関しては、本研究班員が①海水などの環境に存在するTDHまたはTRHを産生する腸炎ビブリオは何らかの障害

を受けており、選択増菌培養に先立ち前培養を実施することが有用であること、および②選択増菌培養を繰り返し実施することにより、腸炎ビブリオに対する選択性を向上し得ることを報告しており、今後の検討が必要と考えられる。

腸炎ビブリオ03:K6による感染症が1996年以降、急激に増加したことから、その予防策構築の一貫として環境や食品の汚染実態に興味を持たれるようになったが、03:K6を含む、TDHまたはTRH遺伝子を保有する腸炎ビブリオを特異的に分離する方法が未確立であることが障害となり、その汚染実態の解明は難航しているのが現状と考えられる。今後、03:K6などの下痢起病性腸炎ビブリオが海水などの環境からどのように食品を汚染し、食中毒などの感染症発症に至るのかを解明するために、また、環境や食品由来株とヒト由来株の分子疫学的性状比較を可能とするために、特異的分離方法を確立することが急務と考えられる。

表2 海水・海泥からの腸炎ビブリオ分離状況(平成11年 秋田県)

月	検体種	検体数	PCRスクリーニング		VP分離陽性検体数(株数)				分離株内訳		VPのMPN 最低-最高
			TDH陽性 検体数	TDH-MPN (検体数)	TRH陽性 検体数	TRH-MPN (検体数)	TDH/TRH 陽性	TDH/TRH 陰性	血清型(株数)	血清型(株数)	
7	海水	12	5	<3 (3)	1	<3 (1)	0	7 (7)	011:Kut (3), 05:Kut (1)	011:Kut (3), 05:Kut (1)	7-38
				4 (1)					04:Kut (1), 010:Kut (1)	04:Kut (1), 010:Kut (1)	
				6 (1)					011:K22 (1)	011:K22 (1)	
	海泥								011:Kut (4), 04:Kut (2)	011:Kut (4), 04:Kut (2)	
		12	5	<30 (5)	1	<30 (1)	0	12 (14)	Out:Kut (2), 01:Kut (1)	Out:Kut (2), 01:Kut (1)	<30-930
									05:Kut (1), 06:K22 (1)	05:Kut (1), 06:K22 (1)	
									06:Kut (1), 011:K68 (1)	06:Kut (1), 011:K68 (1)	
							Out:K34 (1)	Out:K34 (1)			
8	海水	3	0	.	0	.	3 (3)	NT (3)	NT (3)	3-43	
	海泥	3	1	360 (1)	0	.	3 (3)	NT (3)	NT (3)	1200-4600	
9	海水	9	0	.	0	.	NT	.	.	.	
	海泥	4	0	.	0	.	NT	.	.	.	
10	海水	10	1	NT	0	.	0	NT	.	.	
	海泥	3	0	.	0	.	NT	.	.	.	
11	海水	3	0	.	0	.	NT	.	.	.	
	海泥	3	0	.	0	.	NT	.	.	.	
12	海水	4	0	.	0	.	NT	.	.	.	
	海泥	0	0	.	0	.	NT	.	.	.	

表1 腸炎ビブリオ汚染実態調査月別検体採取内訳

	定点 1		定点 2		定点 3		その他		計		
	海水	泥	海水	泥	海水	泥	海水	泥	海水	泥	合計
7月	4	4	4	4	4	4			12	12	24
8月	1	1	1	1	1	1			3	3	6
9月	1	1	1	1	2	2	5 ¹⁾		9	4	13
10月	1	1	5	1	1	1	3 ¹⁾		10	3	13
11月	1	1	1	1	1	1			3	3	6
12月	0	0	2	0	2	0			4	0	4
									41	25	66

1) : 子吉川河口から定点2の間の汽水域

表2 海水・海泥からの腸炎ビブリオ分離状況（平成11年 秋田県）

月	検体種	検体数	PCRスクリーニング		VP分離陽性検体数(株数)		分離株内訳		VPのMPN 最低-最高
			TDH陽性 検体数	TRH陽性 検体数	TRH-MPN (検体数)	TDH/TRH 陽性	TDH/TRH 陰性	血清型 (株数)	
7	海水	12	5	1	<3 (1)	0	7(7)	011:Kut(3),05:Kut(1) 04:Kut(1),010:Kut(1) 011:K22(1)	7-38
								011:Kut(4),04:Kut(2) 00t:Kut(2),01:Kut(1) 05:Kut(1),06:K22(1) 06:Kut(1),011:K68(1) 00t:K34(1)	<30-930
8	海水	3	0	0	・	・	3(3)	NT(3)	3-43
		3	1	360 (1)	0	3(3)	0	NT(3)	1200-4600
9	海水	9	0	0	・	・	NT	・	・
		4	0	・	・	・	・	・	・
10	海水	10	1	0	NT	0	NT	・	・
		3	0	・	・	・	・	・	・
11	海水	3	0	0	・	・	NT	・	・
		3	0	・	・	・	・	・	・
12	海水	4	0	0	・	・	NT	・	・
		0	0	・	・	・	・	・	・

研究協力者 研究報告書
宮城県内沿岸環境における腸炎ビブリオ生息調査

研究協力者 齋藤紀行 山口友美 畠山敬 秋山和夫 白石広行
(宮城県保健環境センター)

研究要旨 海産物食品の腸炎ビブリオによる汚染予防の目的で、腸炎ビブリオの生息状況調査を宮城県内の2カ所の湾内と魚市場処理水について、また県内産海産物の汚染実態調査を平成11年7～8月に実施した。その結果、調査対象検体全てから腸炎ビブリオが検出されたがtdh陽性株は検出されなかった。海水検体の1件がPCR法でtdh陽性となったが、tdh陽性株は検出されなかったことから、分離方法等の検討が必要であると思われた。一方、海泥からの腸炎ビブリオの増菌用としてAPWがSPBよりも菌の分離が良好である結果が得られた。また、海泥の1検体からtrh陽性の腸炎ビブリオが検出された。

A. 研究目的

耐熱性溶血毒(TDH)産生腸炎ビブリオO3:K6は1996年カルカッタで始めて確認されてから短期間で全世界に広がり、特に日本では海産物食品を介した食中毒の原因菌として社会的な問題となっている。宮城県においても1996年にO3:K6(TDH陽性)が食中毒事例患者から検出されその後、急速にこれによる食中毒発生が増加している。1998年、ホタテを原因食品とする食中毒が東北で多発し、同年末河川、海からTDH陽性のO3:K6が検出されたため近海の魚介類のO3:K6汚染が懸念された。国内海産物の安全性を確保し、腸炎ビブリオ食中毒の予防策を構築するために、河川あるいは沿岸環境等の腸炎ビブリオー特にTDH産生O3:K6ーの生息状況及び海産物の汚染実態把握が重要であると考えられた。

そこで、我々は夏季の宮城県内沿岸部の海水・海泥における腸炎ビブリオの生息状況、また県内産海産物の腸炎ビブリオ汚染実態を市販品について調査した。また、海水についてはフィルター法と直説法、海泥については食塩ポリミキシングイオン(SPB)とアルカリ性ペプトン水(APW)

を用い腸炎ビブリオの分離効率の検討も加えて実施した。

B. 研究方法

1. 検体採取定点及び採取時期

宮城県内における腸炎ビブリオ調査の検体採取定点は、ホタテ等の養殖地の石巻市A定点、松島湾に面した塩釜市B定点、魚市場の3カ所(表1)とし、各定点で採取した海水2リットル、海泥50g及び処理水2リットルを検査材料とした。検体採取は平成11年7月13日、7月28日、8月9日及び8月30日の計4回実施した。表1に検体採取の場所の環境状況等を示した。

2. 検査方法

(1) 海水(A法):採取した海水を2倍濃度アルカリ性ペプトン水(2APW)10ml分注された試験管3本に各々10ml分注、またAPW10ml分注された試験管3本に1ml、更に0.1mlを3本に分注し、37℃で1晩培養した。翌日、懸濁した試験管(発育管)についてPCR法によってToxR(toxR)、TDH遺伝子(tdh)およびTRH遺伝子(trh)の確認を行い、遺伝子が検出された発育管から希釈法を用いTCBS培地で腸炎ビブリオの分離を実施した。MPN

値は遺伝子検索の結果から求めた。

(2) 海水 (B法) : 採取した海水 1000 ml をメンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過し、フィルターを APW100ml 入りの瓶に入れ 37°C で 1 晩培養した。培養液について ToxR、TDH および TRH 遺伝子の検索を PCR 法で実施し、陽性となったものから腸炎ビブリオの分離を行った。

(3) 海泥 : 採取した海泥 25 g に PBS225ml を加え、強く振とう懸濁したものを検査材料とし、APW と SPB を増菌用として海水の A 法と同様の手順で腸炎ビブリオの検索を実施した。

(4) 海産物食品 : 塩釜市 B 定点に隣接する海産物販売店から購入した食品を海泥の場合同様に SPB を用いた方法で腸炎ビブリオの検索を行った。

(5) PCR 法による tdh、trh、toxR、の確認 : tdh のプライマーとして TDF-1、TDF-2 を、trh のプライマーとして R-2、R-6 (多田ら : 1992) を、toxR のプライマーとして ToxR-1、ToxR-2 (Kim et.al:1999) をそれぞれの条件で PCR を行い ToxR、TDH、TRH 遺伝子の検索に使用した。

(6) 神奈川現象、ウレアーゼの確認と TDH、TRH の確認 : PCR 法で TDH あるいは TRH 遺伝子が確認された増菌培地あるいは MPN 発育管から TCBS 培地で腸炎ビブリオの分離を行い、培地上に発育した緑色のコロニーを釣菌しヒト血液寒天培地とクリステンセン尿素培地に穿刺した。溶血性を示したものを神奈川現象陽性株、尿素培地でコロニーの周囲の培地が桃色になったものをウレアーゼ陽性株とした。神奈川現象陽性株は逆受身ラテックス凝集

(RPLA) 法で TDH 産生性をまた PCR 法で tdh を確認した。ウレアーゼ陽性株は PCR 法で trh を確認した。

C. 研究結果

(1) 海水からの腸炎ビブリオ分離

各定点および魚市場処理水検体についてフィルター法 (A 法) と直説法 (B 法) で増菌を行い PCR 法で tdh を検索した結果、MPN 発育管からの腸炎ビブリオの MPN 値及び分離菌株の血清型別の結果を表 2 に示した。A 法及び B 法とでは tdh の検出と腸炎ビブリオ検出に関して差は認められなかった。調査期間中の各定点からの海水の MPN 値は全て 1,100 以上と高い値を示し、しかも全検体から腸炎ビブリオが分離された。石巻市 A 定点の 8/30 検体の増菌及び MPN 管から tdh が検出されたが前述の分離法では TDH 陽性株は分離されなかった。一方、分離された菌株は全てが tdh、trh 陰性で、血清型が判明した菌株のうち O2:K28 が全定点から、O4:K34 が 2 定点から検出された。

(2) 海泥からの腸炎ビブリオ分離

海泥の検体を APW あるいは SPB で増菌後、MPN 値および菌分離・血清型別試験の結果を表 3 に示した。APW を使用した場合の MPN 値は全てが 11,000 以上であったが、SPB 使用での MPN 値は 2 検体が 2,400 と他の約 5 分の 1 以下で、しかも腸炎ビブリオは分離されなかった。海泥検体の増菌培地および MPN 管において tdh はどの検体からも検出されなかったが、塩釜市 B 定点の 7/28 検体から分離された OUT:KUT 株はウレアーゼ陽性の trh 保有菌株であった。全調査定点の海水・処理水から検出された血清型 O2:K28 が海泥でも同様に検出された。

(3) 食品からの腸炎ビブリオ分離

販売店から購入した地元産の 3 種類の食品について、腸炎ビブリオの MPN 値と分離菌株の血清型を調査した結果を表 4 に示した。MPN 値は 23 ~ 290 と高い値ではなかったが、いずれの食品からも TDH 陰性の腸炎ビブリオが検出された。

D. 考察

海水からの腸炎ビブリオの分離に直接法及びメンブレンフィルター法のそれぞれを用いたが両者に差異が認められなかった。一方、海泥の増菌に SPB と APW を用いたが、APW が腸炎ビブリオの分離に適していた。海産物の養殖地となっている石巻市 A 定点から採取した海水の増菌培地 1 件から PCR 法で tdh が確認されたが、tdh 陽性株が分離できなかった。今後は、APW-SPB-ビーズ法を組み合わせた方法を用いるなど分離法に工夫が必要であったと思われた。また、海産物食品、沿岸環境および魚処理水から TDH 陽性 O3:K6 株が分離されなかったことは検体採取場所、検体が適切でなかったとも考えられるが、分離法の検討も含めて今後の課題と考えている。

表 3. 海泥の腸炎ビブリオ MPN 値と分離菌株の血清型別

採取地 (採取日)	増菌 tdh		MPN 管			
	培地	tdh	tdh	MPN 値	分離菌株の血清型	
石巻市 A 定点	7/13	APW	—	—	> 11,000	O11:KUT OUT:K32 OUT:KUT
		SPB	—	—	> 11,000	ND
	7/28	APW	—	—	> 11,000	O2:K28 O7:KUT OUT:KUT
		SPB	—	—	2,400	ND
	8/9	APW	—	—	> 11,000	O3:KUT OUT:K32 OUT:KUT
		SPB	—	—	> 11,000	ND
	8/30	APW	—	—	> 11,000	OUT:KUT
		SPB	—	—	> 11,000	ND
塩釜市 B 定点	7/13	APW	—	—	> 11,000	O6:K8
		SPW	—	—	2,400	ND
	7/28	APW	—	—	> 11,000	O1:KUT O4:KUT O11:KUT OUT:KUT (trh+)
		SPB	—	—	> 11,000	ND
	7/9	APW	—	—	> 11,000	OUT:KUT
		SPB	—	—	> 11,000	ND
	8/30	APW	—	—	> 11,000	O2:K28 O3:K57 OUT:KUT
		SPB	—	—	> 11,000	ND

— : PCR 法で遺伝子検出されず

ND : 分離されず

表 4. 食品の腸炎ビブリオ MPN 値と分離菌株の血清型別

食品	MPN 値	分離菌の血清型
あさり	290	OUT:KUT O2:KUT
ホヤ	23	O4:KUT OUT:KUT
ホッキ貝	23	OUT:KUT

表 1. 検体採取定点の周辺環境

採取定点	採取材料	定点の環境状況等	海流
石巻市 A	海水・海泥	石巻湾に面した湾で好養殖地	停滞
塩釜市 B	海水・海泥	松島湾内の小さい湾で泥状砂地	停滞
魚市場	処理水	魚等を洗浄後の貯留水	

表 2. 海水の腸炎ビブリオ分離 MPN 値と分離菌株の血清型別

採取地 (採取日)	増菌 tdh		MPN 管			備考 水温 (気温) 等	
	A 法	B 法	tdh	MPN 値	分離菌の血清型		
石巻市 A 定点	7/13	-	-	-	> 1,100	O3:KUT	23.0 (23.0)
	7/28	-	-	-	> 1,100	O2:K28 O4:K34 O1:KUT O2:KUT O4:KUT	28.0 (29.0)
	8/9	-	-	-	> 1,100	O4:KUT OUT:KUT	30.0 (31.5)
	8/30	+	+	+	> 1,100	O3:K30 O1:KUT OUT:KUT	24.0 (22.0) tdhMPN: 4
塩釜市 B 定点	7/13	-	-	-	> 1,100	O1:K32 O5:K17 O11:K22	23.0 (24.0)
	7/28	-	-	-	> 1,100	O2:K28 O5:K30 O8:K20 O1:KUT O4:KUT O11:KUT OUT:KUT	31.0 (32.0)
	8/9	-	-	-	> 1,100	O1:K25 O4:K34	34.0 (29.0)
	8/30	-	-	-	> 1,100	O2:KUT	24.0 (22.0)
魚市場 処理水	7/13	-	-	-	> 1,100	O2:K28 O5:K20 O8:KUT OUT:KUT	
	7/28	-	-	-	> 1,100	O2:K28 O1:KUT O2:KUT	
	8/9	-	-	-	> 1,100	O1:K56 O1:KUT	
	8/30	-	-	-	> 1,100	O3:K5 OUT:KUT	

- : PCR 法で遺伝子検出されず

+ : PCR 法で遺伝子検出

腸炎ビブリオ汚染実態調査研究

研究協力者 山井志朗（神奈川県衛生研究所）

研究要旨 海水、海泥、魚類中における腸炎ビブリオの汚染実態を調査し、腸炎ビブリオの汚染菌量を MPN3 本法で測定した。海水中の腸炎ビブリオの MPN 値は $10^1 \sim 10^2/100\text{ml}$ 、海泥および魚類中のそれは各々 $10^2 \sim 10^3/100\text{ml}$ であった。これらの MPN 値は、増菌培地にアルカリペプトン水を用いた場合の結果で、食塩ポリミキシン培地ではこれより低値を示した。

検体の増菌培養液 27 検体から *tdh* が検出されたが、*tdh* の検出と腸炎ビブリオの MPN 値との間に相関は認められなかった。*tdh* が検出された増菌培養液から、神奈川現象陽性腸炎ビブリオの検索および免疫磁気ビーズによる O3:K6 菌の検索を行ったが、いずれも検出できなかった。

腸炎ビブリオ分離株のうち、神奈川現象陰性ではあるが分離頻度の高い O 群は O1 ~ O5 群で、海水、海泥および魚類由来株に占める割合はそれぞれ 78%、69.2%、95.2% であった。

A. 研究目的

近年減少傾向にあった腸炎ビブリオ食中毒が 1994 年頃から再び増加傾向を示している。さらに 1996 年以降、本食中毒原因菌の主要血清型は O3:K6 に変換し、本菌型による食中毒事件の増加が腸炎ビブリオ食中毒再増加の原因となっている。そこで、腸炎ビブリオの生態学的特徴から、その汚染が最も顕著と考えられる海水、海泥および魚類における本菌の汚染実態を把握することとした。また、本菌食中毒の原因菌として重要な神奈川現象陽性菌および血清型 O3:K6 型菌の汚染状況を詳細に調査し、腸炎ビブリオ食中毒の減少に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1 調査材料

相模湾沿岸の 3 漁港定点から、1999 年 7 月～8 月の期間に採取した海水および海泥、ならびに相模湾産の魚類を用いた。すなわち、三崎漁港 3 地点から 4 回、腰越漁港 2 地点から 4 回、小田原漁

港 3 地点から 3 回採取した海水および海泥各々 29 検体、また平塚地区で採取された魚類 14 検体、合計 72 検体とした。

海水は、ハイロート採水器(1,000ml)を用いて、海面下 1m の地点の海水を採取し、滅菌ポリ容器(2,000ml)に入れアイスボックスで搬入した。

海泥は、海水の採取地点からエクマンバージ採泥器で採取し、その 50g 相当を滅菌カップに入れ海水と同様に搬入した。

魚類は、漁業組合の組合員が採取したものを、アイスボックスにて搬入した。

2 調査方法

1) 海水温の測定

採水器に装着した温度計により海水温を測定した。

2) 定性培養

海水 1,000ml を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターで濾過し、フィルターをアルカリペプトン水 100ml で 37°C 18 ~ 24 時間培養後、その一

白金耳量を TCBS 寒天培地で分離培養した。

3) 定量培養

海水の検査にはアルカリペプトン水、海泥の検査にはアルカリペプトン水と食塩ポリミキシン培地を増菌培地に用いて、MPN3 本法で行った。

試料は 10ml、1ml、0.1ml の 3 系列とし、海水はそのままを、海泥は 25g を 225ml の PBS に加え攪拌した 10 倍液を各々試料として供試した。それぞれの試料 1ml、0.1ml は増菌培地 10ml に、試料 10ml は 2 倍濃度の増菌培地 10ml 各 3 本に接種し 37℃ 18～24 時間培養した。

魚類については、エラおよび腸管をとり、各々海泥の方法に準じて培養した。

各増菌培養液についてその一白金耳量を TCBS 寒天培地で分離培養を行い、腸炎ビブリオが分離された培養液の試験管数から MPN 値を求めた。MPN 換算表は衛生試験法・注解によった。

4) 増菌培養液からの PCR 法による *tdh* の検索

海水、海泥、魚類ともに、それらの腸炎ビブリオ定性培養に供した増菌培養液と、定量培養に供した増菌培養液のうち試料 10ml、1ml を接種した培養液について、腸炎ビブリオが分離されたものをテンプレートとして試験した。但し、各試料系列の定量培養液で 2 本以上から腸炎ビブリオが分離されたときは、任意に選んだ培養液各 1 本を供試した。

テンプレート DNA は、培養液の 1ml を PBS で 2 回遠心洗浄したのち、沈査を 100 μ l の精製水に浮遊させ、煮沸法で調製した。テンプレート DNA 量 10 μ l、プライマーに TDF-1、TDF-2 を用い所定の条件で PCR を行った。

tdh 陽性であった培養液は精製水で 10 倍段階希釈し、各希釈液について同様の PCR を行い *tdh* 検出感度を調べた。

5) 磁気ビーズによる腸炎ビブリオ O3:K6 の検索

PCR 法で *tdh* が検出された増菌培養液について、腸炎ビブリオ O3:K6 の濃縮用磁気ビーズ（デンカ生研）による O3:K6 の分離を行った。

6) 神奈川現象陽性腸炎ビブリオの検索

PCR 法で *tdh* が検出された増菌培養液の一白金耳量を TCBS 寒天培地に塗抹培養し、腸炎ビブリオと思われる集落を我妻培地（自家製）に移植して神奈川現象陽性菌を検索した。溶血を認めた菌株は、生化学的性状試験および *tdh* の保有を確認したのち血清型別を行うこととした。

同様の検索を、磁気ビーズによる腸炎ビブリオ O3:K6 の検索に供試した分離培地上の集落についても実施した。

7) 腸炎ビブリオ分離株の血清型別

任意に選んだ、海水、海泥および魚類由来の腸炎ビブリオ分離株各々 50 株、52 株および 42 株、計 144 株について血清型別を実施した。なお分離株の神奈川現象はすべて陰性であった。

C. 研究結果

1) 海水温の測定結果

7月の海水温は 21～28℃、8月は 26～31℃であった。

2) 腸炎ビブリオの定量結果（表 1）

海水 29 検体における腸炎ビブリオの MPN 値および検体数は、<3～9.3/100ml（9 検体）、11～36/100ml（12 検体）、460/100ml（2 検体）、1,100～>1,400/100ml（6 検体）であった。

海泥 29 検体では、増菌培地にアルカリペプトン水を用いたとき、6.2/100ml（1 検体）、15～44/100ml（9 検体）、53～93/100ml（3 検体）、160～460/100ml（4 検体）、1,100～>1,400/100ml（12 検体）であり、MPN 値の高い検体数が海水の 2 倍を示した。一方、増菌培地に食塩ポリミキシン培地を用いたときは、<3.0/100ml（6 検体）、3.6～9.1/100ml（12 検体）、11～43/100ml（8 検体）で、MPN 値 50/100ml 未満が 26 検体であった。アルカリペプトン水で 12 検体が 1,100～>1,400/100ml であったのに対し、食塩ポリミキシン培地では >1,400/100ml が 1 検体のみで、両者にかかなりの差が認められた。

魚類 14 検体では、増菌培地にアルカリペプトン水を用いたとき、エラ材料では 19～42/100ml（8 検体）、160/100ml（1 検体）、1,100～>

1,400/100ml (5 検体)、腸管材料では<3.0/100ml (1 検体)、9.1 および 11 ~ 44/100ml (各 4 検体)、53 ~ 93/100ml (3 検体)、240 および> 1,400/100ml (各 1 検体)であった。一方、増菌培地に食塩ポリミキシン培地を用いたとき、エラ材料では<3.0/100ml (2 検体)、23 ~ 39/100ml (4 検体)、64、150 および 240/100ml (各 1 検体)で、腸管材料では 3.6/100ml (1 検体)、9.1/100ml (2 検体)、15、23、43 および 93/100ml (各 1 検体)、150/100ml (2 検体)であった。海泥における結果と同様に、MPN 値は食塩ポリミキシン培地を用いたとき低値(エラおよび腸管材料とも 500/100ml 未満)を示した。

3) 増菌培養液からの *tdh* 検出結果(表1、2、3)

海水の腸炎ビブリオ定性培養に用いた培養液 16 件、定量培養に用いた培養液のうち 10ml 培養液 4 件、1ml 培養液 3 件、延べ 23 件の増菌培養液から *tdh* が検出され、陽性検体数は 29 検体中 17 検体であった。

海泥では、アルカリペプトン水定量培養液 10ml から 6 件、1ml から 3 件、食塩ポリミキシン定量培養液 10ml から 1 件、延べ 10 件から *tdh* が検出され、陽性検体数は 29 検体中 8 検体であった。なお *tdh* 陽性検体中アルカリペプトン水培養液で陽性であったものが 7 検体、食塩ポリミキシン培養液での陽性が 1 検体のみであった。

魚類では、エラ材料からの食塩ポリミキシン定量培養液 10ml から 1 件、腸管材料からの同培養液 1ml から 1 件それぞれ *tdh* が検出され、陽性検体数はエラおよび腸管材料ともに 9 検体中 1 検体であったが、各々は異なる魚類検体であった。なお、魚類のアルカリペプトン水培養液は全て *tdh* 陰性であった。

4) 増菌培養液からの PCR 法による *tdh* の検出限界

tdh が検出された各増菌培養液を PBS で 10 段階希釈し、前述の方法に従い PCR 法で *tdh* の検出限界を調べた。*tdh* が検出された培養液、海水 7 件 (5 検体)、海泥 10 件 (8 検体)、魚類 2 件 (2 検体) の計 19 件について実施した結果を

示した(表 4)。希釈液で *tdh* 陽性であった検体は海泥 6 件 (4 検体) で、いずれも 100 倍希釈まで陽性であった。

5) 磁気ビーズによる O3:K6 の検索結果

tdh 陽性培養液から磁気ビーズ処理を行い、O3:K6 の検索を行ったがいずれからも検出されなかった。

6) 神奈川現象陽性腸炎ビブリオの検索結果

TCBS 寒天培地上で腸炎ビブリオと思われる集落を我妻培地に移植し培養したが、溶血を示す菌株は見いだせなかった。

7) 腸炎ビブリオ分離株(神奈川現象陰性)の血清型(表 5)

海水、海泥および魚類由来の腸炎ビブリオ分離株各々 50 株、52 株および 42 株、計 144 株について血清型別を実施した。

海水由来株では O1:KUT (13 株)、O2:KUT (8 株)、O4:KUT (6 株)、O5:KUT (4 株)、O1:K32 (3 株)、OUT:K28 (3 株)、O8:KUT (2 株)、O10:KUT (2 株)、その他 (9 株) であった。

海泥由来株では O5:KUT (9 株)、O3:KUT (8 株)、O1:KUT (7 株)、O10:KUT (5 株)、O4:KUT (4 株)、OUT:K28 (4 株)、O2:K28 (3 株)、O2:KUT (2 株)、O8:KUT (2 株)、O11:KUT (2 株)、その他 (6 株) であった。型別不明株を除いて、O 抗原は海水由来株で 8 種、海泥由来株で 9 種に、K 抗原は同様に 6 種と 5 種に型別された。

魚類由来株 42 株(エラ由来 20 株、腸管由来 22 株)は、エラ由来株で O2:KUT (5 株)、O4:KUT (5 株)、O3:KUT (4 株)、O5:K30 (2 株)、その他 (4 株)、腸管由来株では O2:KUT (6 株)、O3:KUT (4 株)、O4:KUT (4 株)、O1:KUT (3 株)、O2:K28 (2 株)、その他 (3 株) であった。O 抗原は 6 種、K 抗原は 4 種に型別された。

D. 考察

(1) 腸炎ビブリオ汚染菌量

海水における腸炎ビブリオの MPN 値は、 $10^1 \sim 10^2/100\text{ml}$ (79%)、海泥ではアルカリペプトン水培養で $10^2 \sim 10^3/100\text{ml}$ (55%)、食塩ポリミキシン培養で $10^1 \sim 10^2/100\text{ml}$ (96%)を示し、食塩ポリミキシン培養はアルカリペプトン水培養より 1～2段階低い値であった。

魚類のエラ材料の MPN 値は $10^2 \sim 10^3/100\text{ml}$ (42.9%)を示し、その検体数は腸管材料の 3 倍でエラ材料が高い MPN 値を示した。食塩ポリミキシン培養では海泥の結果と同様に MPN 値は低い値を示した。

(2) *tdh* の検出と検出限界および神奈川現象陽性腸炎ビブリオの検索

海水で延べ 23 件(17 検体)、海泥 10 件(8 検体)、魚類 2 件(2 検体)の培養液計 35 件(27 検体)から *tdh* が検出されたが、腸炎ビブリオ MPN 値と *tdh* 検出検体との間に相関は認められなかった。このうち定量培養液の海水 7 件(5 検体)、海泥 10 件および魚類 2 件の計 19 件(15 検体)について *tdh* の検出限界を調べた結果、海泥 6 件(4 検体)で 100 倍希釈まで *tdh* が検出され、他の 13 件は全て希釈液では検出できなかった。

tdh 検出培養液から神奈川現象陽性腸炎ビブリオの分離および免疫磁気ビーズによる O3:K6 菌の検索を行ったが、いずれの検体からも神奈川現象陽性菌および O3:K6 菌ともに検出できなかった。今回実施した *tdh* 検出 PCR 法の検出限界から推測して、 $10^8/\text{ml}$ 以上の増殖菌の中から $10^3 \sim 10^5/\text{ml}$ の *tdh* 陽性腸炎ビブリオを釣菌することになり、神奈川現象陽性菌が分離できる確率は低いと思われる。今回の方法による釣菌数では陽性株を分離することは困難であると考えられ、培養条件、分離方法等の諸条件の検討が必要と思われる。

(3) 腸炎ビブリオ分離株(神奈川現象陰性)の血清型

分離した 144 株の主な血清型は海水、海泥由来株で O1:KUT、O5:KUT、O2:KUT、O4:KUT、O3:KUT で、魚類由来株では O2:KUT、O4:KUT、O3:KUT、O1:KUT であった。分離頻度の高い O

群を由来別にみると、海水由来株では O1 群(32%)が最も高く、次いで O2、O4 群(16%)、O5、O8 群(8%)の順であった。

海泥由来株では O5 群(19.2%)、次いで O1 群(17.3%)、O3 群(15.4%)、O2、O10 群(9.6%)の順であった。O1～O5 群で海水由来株の 78% (39/50)、海泥由来株の 69.2%(36/52)を占めていた。

エラ由来株では O2 群(30%)、O4 群(25%)、O3 群(20%)、O5 群(15%)で、腸管由来株では O2 群(36.4%)、O3 群(22.7%)、O4 群(18.2%)、O1 群(13.6%)であった。O1 群～O5 群で 95.2% (40/42)を占め、当然ながら海水、海泥における腸炎ビブリオの O 群分布と同様の傾向であった。

E. 結論

海水、海泥、魚類中の腸炎ビブリオ汚染菌量(MPN 値)は、各々 $10^1 \sim 10^2$ 、 $10^2 \sim 10^3$ 、 $10^2 \sim 10^3/100\text{ml}$ であった。増菌培地間の MPN 値を比較すると、食塩ポリミキシン培養はアルカリペプトン水培養より 1～2段階低い値を示し、環境材料中の腸炎ビブリオ初代増菌培養には強い選択剤を含まない培地の使用が望ましいことが示唆された。これら検体の増菌培養液 27 検体から *tdh* が検出されたが、*tdh* の検出と腸炎ビブリオの MPN 値との間に相関は認められなかった。*tdh* が検出された増菌培養液から、腸炎ビブリオの神奈川現象陽性菌および O3:K6 菌はともに検出できなかった。PCR 法で *tdh* が検出されたにもかかわらず神奈川現象陽性菌が検出できなかった理由は、PCR 法の検出限界に比較して釣菌数が不足した結果によると思われる。一方、免疫磁気ビーズで O3:K6 菌が検出できなかった理由は明確でないが、その感度または特異性等に問題があったものと考えられる。

研究協力者

浅井 良夫 神奈川県衛生研究所臨床血清科長
沖津 忠行 神奈川県衛生研究所細菌科専門研究員
鈴木理恵子 神奈川県衛生研究所細菌科主任研究員
佐多 辰 神奈川県衛生研究所細菌科技師

表1 腸炎ビブリオ定量結果

検体	地点	MPN値(/100ml)					計
		≤10	>10~≤50	>50~≤100	>100~≤500	>500~≤1400	
海水 (APW)	三崎	6	4 (1)		1	1 (1)	12 (2)
	腰越	2	2		1	3	8
	小田原	1	6 (2)			2 (1)	9 (3)
海泥 (APW)	三崎	1	6 (1)	2	2	1 (1)	12 (2)
	腰越		1		1 (1)	6 (1)	8 (2)
	小田原		2 (1)	1	1	5 (2)	9 (3)
海泥 (Poly)	三崎	8	3 (1)			1	12 (1)
	腰越	2	4	1	1		8
	小田原	8	1				9
魚(APW)	エラ		8		1	5	14
	腸管	5	4	3	1	1	14
魚(Poly)	エラ		4	1	2 (1)		9 (1)
	腸管	3	3	1	2 (1)		9 (1)

()は増菌培養液における tch 検出検体数

表2 増菌培養液における tch 検出検体数

検体	地点			計
	三崎	腰越	小田原	
海水	6/12	3/8	8/9	17/29
海泥	3/12	2/8	3/9	8/29

検出数/検体数

表3 *tdh* 検出増菌培養液の内訳

検体	地点					計	
		三崎	腰越	小田原	平塚		
海水 (23)	1L	5	3	8	-	16	
	10ml	2	0	2	-	4	
	1ml	0	0	3	-	3	
海泥 (10)	10ml	3	1	3	-	7	
	1ml	1	1	1	-	3	
魚 (2)	エラ	10ml	-	-	-	1	1
		1ml	-	-	-	0	0
	腸管	10ml	-	-	-	0	0
		1ml	-	-	-	1	1

表4 増菌培養液の希釈液における*tdh* 検出結果

検体	培養液	×10	×100	×1000
海泥(三崎)	10ml	+	-	-
海泥(三崎)	10ml	+	-	-
海泥(三崎)	10ml	+	-	-
海泥(三崎)	10ml	+	+	+
海泥(三崎)	1ml	+	+	+
海泥(腰越)	10ml	+	+	+
海泥(腰越)	1ml	+	+	+
海泥(小田原)	10ml	+	+	+
海泥(小田原)	1ml	+	+	+
海泥(小田原)	1ml	+	-	-
海水(三崎)	10ml	+	-	-
海水(三崎)	1ml	+	-	-
海水(小田原)	10ml	+	-	-
海水(小田原)	10ml	+	-	-
海水(小田原)	10ml	+	-	-
海水(小田原)	1ml	+	-	-
海水(小田原)	1ml	+	-	-
魚(エラ)	10ml	+	-	-
魚(腸管)	10ml	+	-	-

表5 腸炎ビブリオ分離株(神奈川現象陰性)の血清型

血清型	海水	海泥	魚	
			エラ	腸管
O1:K32	3	1		
O1:K34		1		
O1:KUT	13	7	1	3
O2:K28		3	1	2
O2:KUT	8	2	5	6
O3:K20	1			
O3:K29				1
O3:K30	1			
O3:KUT	1	8	4	4
O4:K34	1			
O4:K42	1			
O4:KUT	6	4	5	4
O5:K17		1		1
O5:K30			2	
O5:KUT	4	9	1	
O6:KUT		1		
O8:K20	1			
O8:K28	1			
O8:KUT	2	2	1	
O10:KUT	2	5		1
O11:KUT	1	2		
OUT:K3		1		
OUT:K17		1		
OUT:K28	3	4		
OUT:KUT	1			
計	50	52	20	22