

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

腸炎ビブリオ食中毒発生予測・予防対策構築に関する研究

分担研究者 玉田 清治 岩手県衛生研究所長

研究要旨 腸炎ビブリオ食中毒の発生予測と予防対策に資するため、感染源調査として海水・海泥の腸炎ビブリオ汚染状況調査、食品汚染状況調査を行った。また、散发患者の発生状況との関連性があるか調査した。

海水・海泥については海水4地点、海泥2地点について6月から1月まで毎月1回、2月は2回検体を採取、食品は6月、7月に合計6検体検査した。散发患者の発生状況は、県内から広く検体を集めている民間の検査機関で検出された腸炎ビブリオの菌株を提供していただく事によって把握した。

海水の腸炎ビブリオは4地点のうちいずれかから6月から12月まで検出された。海泥の腸炎ビブリオは2地点のうちいずれかから全検査期間中検出された。しかし、PCRでは陽性を示したTDH陽性の株は分離できなかった。また、目的とする血清型O3：K6も分離されなかった。食品については6検体とも腸炎ビブリオは分離できず、PCRでも陰性であった。

散发患者から分離され、当所に搬入されたものは187株で、うち152株が血清型O3：K6、4株がO4：K68であった。

A. 研究目的

1996年頃より、腸炎ビブリオによる食中毒のなかで血清型O3：K6によるものが増加してきた。なぜこの血清型のものが増加したのかを追求するため、基礎的な調査を行い、血清型O3：K6腸炎ビブリオ食中毒の発生予測と予防対策構築に資する事を目的とする。

B. 研究方法

感染源調査として海水4地点（山田町織笠川河口、山田町山田魚市場付近、山田町関口川河口、宮古市宮古魚市場付近）、海泥2地点（山田町織笠川河口、山田町織笠川河口、）を定点として6月から2月まで検体採取し、腸炎ビブリオの分離を行った。食品汚染状況調査は、市販している岩手県産の魚介類について買い取り、腸炎ビブリオの分離を行った。腸炎ビブリオの検査は検体を増菌培養後、PCRで腸炎ビブリオのスクリーニングを行い、陽性反応が出た

ものについて重点的に菌の分離を試みた。分離は定法で行った。分離した腸炎ビブリオについてTDH産生性、血清型を調べた。

また、散发患者の発生状況を知るために県内から広く検体を集めている民間の検査機関で検出された腸炎ビブリオの菌株を提供していただき、血清型別を行った。

C. 研究結果

海水・海泥の検査結果は表1～5のとおり。7月から9月にかけてPCRでTDHが陽性の検体があったがTDH陽性の菌の分離はできなかった。TDHは全検体について陰性であった。

検体採取時の水温を表6に、気温を表7に示す。

食品については6検体とも腸炎ビブリオは分離できず、PCRでも陰性であった。8月以降については、店頭から岩手県産のものが消えたため、検査を中断していたが、そのまま腸炎ビブリオの時期がすぎてしま

った。

散発患者について当所に搬入された腸炎ビブリオは187株であった。7月のはじめに搬入されてから、11月まで搬入が続いた。検査機関が搬入した菌は19市町村の医療機関から検査依頼されて分離したものであった。血清型別を行った結果、そのうち81.3%にあたる152株がO3:K6であった。また、最近全国で分離の増えているOK不一致のO4:K68も4株あった。(表8)

#### D. 考察

海水・海泥からO3:K6が分離されなかった事は分離法に問題があったのかもしれない。実際、当県の保健所で定点から50キロほど南の大船渡で食中毒事件を調査した時、海水から違う方法でO3:K6(TDH+)を分離している。しかし、もともと今回選んだ定点にはO3:K6は定着していないのかもしれないとも考えられる。1年だけの調査では断定できないが、ある季節だけTDH+の菌が沿岸に入ってきていると考えたほうが良いのではないかとと思われる。

一方、平成11年の腸炎ビブリオ感染者から分離された菌の血清型は、散発患者、食中毒患者(表9)ともほとんどがO3:K6であり、いかにこの血清型が重要かを示している。今回、検査機関の都合から感染者の情報は多くを得られなかったが、これを詳しく調査できれば、また違ったものも出てくるかもしれない。

#### E. 結論

今回の調査で病原性を持つと思われる腸炎ビブリオは、環境中にはごく少数しか存在しないと思われる。いかにその少数の菌を簡単な方法で見つけるかが今後の課題であろう。また、実態調査も引き続き必要であろう。

表1 Tox-R (PCR) または LDH (PCR。9月から) 結果

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
水	織笠	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	山田魚港	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	宝来橋	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	宮古魚市場	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
泥	織笠	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	宝来橋	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

表2 腸炎ビブリオ分離

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	山田魚港	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	宝来橋	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	宮古魚市場	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
海泥	織笠	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	宝来橋	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

表3 腸炎ビブリオMPN (海水100mlあたり、海泥10gあたり)

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	<3	<3	<3	3.0	9.2	9.2	<3	<3	<3	<3
	山田魚港	<3	3.0	<3	9.2	<3	3.6	<3	<3	<3	<3
	宝来橋	3.6	<3	<3	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	宮古魚市場	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
海泥	織笠	<3	<3	3.0	<3	15	43	9.2	<3	<3	<3
	宝来橋	<3	3.0	6.1	3.0	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表4 TDH (PCR) 結果

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	山田魚港	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	宝来橋	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	宮古魚市場	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
海泥	織笠	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	宝来橋	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

表5 TRH (PCR) 結果

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	山田魚港	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	宝来橋	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	宮古魚市場	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
海泥	織笠	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	宝来橋	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表6 採水時水温

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	17.0	24.7	23.0	22.4	19.0	16.0	13.0	8.0	8.5	8.2
	山田魚港	17.0	24.5	22.5	23.0	19.0	16.5	13.0	10.0	9.5	7.1
	宝来橋	17.5	19.4	22.0	20.6	19.0	17.0	13.0	9.0	10.0	8.4
	宮古魚市場	17.5	23.7	22.0	22.4	19.5	15.8	13.3	10.5	8.0	7.0

表7 採水時気温

採取月日		6.29	7.27	8.24	9.8	10.13	11.9	12.7	1.11	2.1	2.29
海水	織笠	17.0	28.0	21.0	23.6	19.0	12.0	5.0	5.0	6.5	4.5
	山田魚港	17.0	25.8	22.0	24.0	20.0	13.8	5.5	5.5	6.0	4.2
	宝来橋	17.5	26.5	22.0	23.2	21.5	14.7	7.0	4.5	7.0	4.5
	宮古魚市場	24.5	30.0	22.0	26.2	19.0	13.0	6.0	4.5	6.0	7.0

表8 月別搬入腸炎ビブリオ散発菌株数

搬入月	6	7	8	9	10	11
搬入菌株数	0	12	137	31	5	1
血清型 O3: K6	0	10	115	21	5	1
O4: K68	0	1	3	0	0	0
その他	0	1	19	10	0	0

表9 平成11年腸炎ビブリオ食中毒(岩手県)

発生日	発生市町村	患者数	原因施設	原因食品	血清型
7月25日	久慈市など	122	家庭	自家用処理ウニ	O3: K6
8月4日	山田町	4	民宿	民宿の食事	O3: K6
8月7日	陸前高田市	10	民宿	民宿の食事	O3: K6
8月7日	花巻市	10	仕出し店	仕出し店の料理	O3: K6
8月8日	大船渡市	29	民宿	民宿の料理	O3: K6
8月9日	久慈市など	30	家庭	自家用処理ウニ	O3: K6
8月14日	遠野市	11	スーパーマーケット	寿司弁当	O3: K6
8月17日	盛岡市	7	飲食店	ちらし寿司弁当	O1: K56
8月17日	山田町	5	旅館	旅館の食事	O3: K6
8月18日	釜石市	27	商店	当該商店のウニ	O3: K6
8月22日	大槌町	33	ホテル	ホテルの食事	O3: K6

# 分 担 研 究 報 告 書

分担研究者 小笠原 久夫

宮城県保健環境センター所長

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）分担研究報告書

腸炎ビブリオ食中毒発生予測・予防対策構築に関する研究

分担研究者 小笠原 久夫（宮城県保健環境センター）

研究要旨：腸炎ビブリオによる食中毒発生の現状とその発生疫学的な把握を目的として本研究を行った。その結果、遺伝子学的手法を用いた検索により、環境中に腸炎ビブリオ毒素遺伝子が存在すること、及び腸炎ビブリオが海泥を温床として増殖している可能性が示唆された。また、患者発生数と海水温度は同調して推移することから両者には高い相関があるものと推定された。

A. 研究目的

夏期に集中して発生する腸炎ビブリオ食中毒は、他の原因菌による食中毒と比較し発生件数・患者数とも群を抜いて多い。腸炎ビブリオ食中毒においては患者からの菌の分離率がきわめて高いにもかかわらず、食材や環境等からはほとんど分離されないことや、1996年を境として患者から分離される腸炎ビブリオ血清型が O4:K8 から O3:K6 に急変するなど疫学的にも不明な点が多い。

そこで、宮城県内の沿岸部海水・海泥などの海辺環境と市販魚介類における腸炎ビブリオ検出による食中毒発生の背景調査、及び協力医療機関における散发患者発生動向の把握、患者分離株の病原・血清学的解析により腸炎ビブリオ食中毒発生予測・予防対策構築の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 調査定点及び検査食材

調査地点は周辺環境と海流・海底の状態を考慮して宮城県沿岸部の石巻・塩釜に観測定点を設定し、海水（4定点）と海泥（2定点）を平成11年5月から平成11年12月まで毎月1回採取した。

検査食材は仙台市内の量販店（冷蔵ケース内販売）及び塩釜の海水・海泥調査定点の魚介類販売所（環流海水内販売）を定点

として県内産魚介類を定期的に購入した（表1）。

2) 検査方法

海水は100mlを食塩がリミットアゲン(SPB)培地粉末3.3g入りの培養瓶に分注し、海泥は20gを180mlのSPBに懸濁した。(定性試験用培養液)さらに、両検体をMPN管(各濃度3本ずつ使用)に10ml、1ml、0.1ml接種し(MPN算定用培養液)培養した。37℃で18時間培養後、定性試験用培養液1mlについてPCR法でビブリオ特異遺伝子(ToxR)、耐熱性溶血毒(TDH)、TDH様毒素(TRH)の各遺伝子の検索を行った(定性PCR)。TDH,TRHが陽性の場合、各MPN管で再度PCR法を実施し、当該遺伝子保有株のMPNを算定した。また、TDH,TRH陽性株を分離するために、培養液を適宜希釈しTCBS培地に接種培養後、疑わしいコロニーについてTDHは我妻培地でTRHはクリステンセンの尿素培地で確認した。

定性試験でToxRが陽性の場合には各MPN管についてPCR法で再確認し、定性培養液と陽性MPN管から腸炎ビブリオの分離を試みた。

食材は、20gを180mlのSPBに添加しホモジナイズ後、海水・海泥の場合と同様に菌の検索を実施した。

3) 腸炎ビブリオの確認

検体からTCBS培地で分離した菌株は

TSI、LIM 及び食塩加ペプトン水で生化学性状試験を実施した後、ビブリオ型別抗血清で O、K 血清型を決定した。TDH は逆受身ラテックス凝集法で確認した。

#### 4) 散发患者発生動向調査と患者分離菌株

平成11年6月から12月まで、県内の協力医療機関から腸炎ビブリオ散发発生患者由来菌株の提供を受け、当該菌株の血清型と TDH の確認及び患者発生状況を医療機関での受付月日ごとに集計して動向調査を行った。なお、1菌株は1患者由来であった。

#### 5) 海水温度

海水温は、宮城県水産試験所が毎日定刻に測定している石巻湾の海水温を5月から10月まで週平均して算出した。

### C. 研究結果

#### 1) 海水・海泥及び食材の ToxR を指標とした MPN 値の変動

ToxR 遺伝子を腸炎ビブリオの指標として4定点の MPN 値を求め、各定点の気温・海水温の変動とともに表2に示した。海水中の ToxR は、潮の動きの早い石巻 A 定点では8月から確認され、MPN 値は9月以降に上昇した。しかし、潮の動きの比較的遅い石巻 B・塩釜 B の各定点では、6月から遺伝子が確認されるとほぼ同時に MPN も高い値を示した。また、潮の動きがほとんどない塩釜 A 定点では、11月を除き調査した5月から12月までのすべての期間で ToxR が検出され、しかも、MPN 値は5月時点で 240 と他の地点と比べ高く、特に6月から10月までは 1100 以上の高値が継続した。

海泥の ToxR は、塩釜 A 定点で5月から12月まで毎月確認された。MPN 値は7月以降急激に上昇し、7月から9月は海水の10倍以上の値を示した。石巻 A 定点での MPN 値の上昇は7月以降であり、上昇

の程度も塩釜 A 定点に比較して緩やかであった。

一方、食材についての結果を表3に示した。仙台市の量販店から購入した宮城県産の食材の ToxR は陰性か、あるいは陽性であっても MPN 値は 30 以下と低値であったが、塩釜 A 定点の販売所で購入した魚介類は6月に遺伝子が確認され MPN 値は7月以降急激に上昇し10月調査の時点でも高い値を示した。

#### 3) 分離菌株とその血清型別

各検体について MPN の測定と同時に腸炎ビブリオの分離培養を行い、PCR 法で ToxR が陽性を示した検体から腸炎ビブリオを分離した。分離菌株についての血清型別試験の結果、血清型別不能菌株も多く認められたが最終的に 45 種類の血清型を分離した。O あるいは K 抗原型不明の血清型を除き、検出頻度の高い血清型は調査した72件のうち O4:K34 が10件、O1:K25 及び O3:K33 が各4件検出された(表4)。定点別では塩釜 A 定点の海水・海泥及び同地点の販売所から購入した食材からの検出頻度が高く、特に同定点の海泥からは多種類の血清型が検出された(表5)。

#### 4) TDH・TRH 遺伝子の検出及び分離菌株

塩釜 B 定点海水(8, 9月)及び塩釜 A 定点海泥(9月)の増菌培養液から PCR 法で TDH と TRH 遺伝子を確認したが、TDH 陽性株は分離できなかった。しかし、塩釜 A 定点海泥から O3:KUT の TRH 陽性株を分離した(表2・5)。

#### 5) 散发患者発生動向

6月から11月までの調査期間に、協力医療機関より供与された腸炎ビブリオは合計 267 株であった。血清型の内訳は O3:K6 が 79%、O4:K68 が 6.4%、O1:K56 が 3.7%で、これら3血清型で発生原因の約 90%を占めていた(表6)。また、患者を年齢別に分類すると40代から50代が多

く、この年齢層の患者数の全体に占める割合は45%であった(表7)。腸炎ビブリオ患者の散発発生は6月に始まり11月まで継続した。患者のピークは8月に認められたことから、海水温との関係に着目し、腸炎ビブリオ患者発生数を一週間ごとにまとめて県海水温観測地点での週平均の海水温度と比較した(図1)。その結果、週平均海水温度の上昇に伴い散発患者数が増加し、海水温の下降とともに患者数が減少した。

#### D. 考察

腸炎ビブリオ食中毒は、自然環境に生息する腸炎ビブリオに汚染された海産物によって引き起こされると考えられている。腸炎ビブリオは特に海泥中に多く生息していると思われることから、本調査において海泥の状況を考慮して調査定点を設定した。

調査の結果、海泥のない埠頭あるいは漁港近辺の海水(石巻B・塩釜B定点)では腸炎ビブリオが6月、7月から10月まで検出されたが11月以降は検出されなかった。腸炎ビブリオが検出されはじめる時期と検出されなくなる時期の海水温度は、ともに15℃から20℃の間であることからこの温度が腸炎ビブリオの海水中での増殖限界温度であると考えられた。

一方、海泥のある遠浅海岸では、海流の少ない淀んだ塩釜A定点が潮の流れの速い石巻A定点に比べて海水・海泥ともに腸炎ビブリオが早期に検出された。さらに、塩釜A定点の海泥からは腸炎ビブリオが長期間高い頻度で検出されたが、この定点の海泥は泥状で、調査期間中の周辺海水も富栄養化と思われる状態が観察された。

以上のことから、海泥が腸炎ビブリオの生息環境として重要で、淀んだ海水と海泥の相互関係が腸炎ビブリオ増殖の温床を形成していることを示すものと考えられ、海

泥が近接する遠浅海岸では特に潮の流れが腸炎ビブリオの増殖に大きく影響するものと思われた。

食材についての調査では、当初、販売方法による腸炎ビブリオ分離割合の相違を期待して調査を開始したが、量販店での食材に生産地の共通性がないことから中断せざるを得なかった。しかし、塩釜A定点の販売所で、地元海水を用いた環流水中に保存した状態で販売される魚介類について継続的に調査したところ、魚介類の腸炎ビブリオは、同じ定点の海泥の菌量が急激に増加する時期と同じ時期から検出され、以降は海泥の菌量の推移と同調して変化していることが示された。

今回の調査では、沿岸環境及び食材からO3:K6をはじめ多数の血清型の腸炎ビブリオが検出されたが、病原性遺伝子を保有する株はTRH陽性株1株のみであり、食中毒患者から検出されるTDH陽性株は分離されなかった。しかし、海泥や海水からPCR法でTDH遺伝子が確認されていることから、陽性菌を分離する方法を検討し、再度詳細な調査を行う必要があると思われた。

また、協力医療機関からの腸炎ビブリオ散発患者発生動向調査の結果と石巻湾内の海水温度測定定点(県水産試験場)での海水温の推移に相関関係が認められたことから、宮城県で従来から、海水温度測定定点での10日間平均水温が19℃を越えた時点で「腸炎ビブリオ食中毒注意報」を発令していることの実証的根拠となり得るものと考えられた。

#### 結論

(1) 海泥のない海水から腸炎ビブリオが分離可能な期間は6月から10月であったが、潮の動きの少ない沿岸海水及び海泥ではさらに長期間腸炎ビブリオが分離され、

血清型の種類も多かった。

(2) 環境から分離した菌株の中に O3:K6 等の食中毒起因血清型株が存在したが、病原性遺伝子を保有していたのは O3:KUT (*trh*) のみであった。また、PCR 法により 8 月と 9 月の海水及び海泥から病原性遺伝子保有菌の存在が確認されたが、その分離は困難であった。

(3) 環流海水中で販売されている魚介類からは、7 月以降腸炎ビブリオが高頻度に分離された。

(4) 県内医療機関を受診した散発下痢症患者より分離された腸炎ビブリオの血清型は O3:K6, O4:K68, O1:K25 が主流で、この 3 血清型で散発発生患者分離株の 90% を占めていた。また、散発下痢症患者の発生は 6 月から 11 月まで確認され 8 月がピークで、患者発生動向と石巻湾（県海水温度測定定点）の海水温度の変化には高い相関が認められた。

表1 海水・海泥及び魚介類の採材環境

採材定点	採材対象	採材環境	海流の状態	海泥の状況
石巻A	海水・海泥	太平洋に面した大きな遠浅海岸	早い	砂状
石巻B	海水	埠頭奥の岸壁	遅い	なし
塩釜A	海水・海泥	砂地のある松島湾内の小湾	ほとんどなし	泥状
塩釜B	海水	太平洋に面した漁港岸壁	遅い	なし
仙台市	魚介類	冷蔵ショーケース内で販売		
塩釜A	魚介類	環流海水中で魚介類を陳列販売		

表2 各採材定点の気温・海水温とToxRを指標としたMPN値の変化

		5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
石巻A定点	気温	20	27	24	23	25	16	13.5	3
	海水温	19	22	25	24	24	18	15	10
	海水MPN	—	—	—	<3	460	460	<3	<3
	定性PCR <sup>※1</sup>	—	—	—	T	T	—	T	T
	海泥MPN	<30	—	380	380	460	<30	—	<30
	定性PCR	T	—	T	T	T	T	—	T
塩釜A定点	気温	21.5	21	24	23	25	14	11.5	4
	海水温	16	19	24	23	22	19	15	10
	海水MPN	240	>1100	>1100	>1100	>1100	>1100	23	<3
	定性PCR	T	T	T	T	T	T	—	T
	海泥MPN	2400	2400	>11000	>11000	>11000	2400	230	230
	定性PCR	T	T	T	T	T,D <sup>※2</sup>	T	T	T
石巻B定点	気温	21.5	21	24	23	25	14	11.5	4
	海水温	16	19	24	23	22	19	15	10
	海水MPN	—	>1100	64	64	460	460	—	—
	定性PCR	—	T	T	T	T	T	—	—
塩釜B定点	気温	22	28	24	22	28	18	11.5	5.5
	海水温	14.5	21	24	25	22	18	13	8
	海水MPN	—	<3	>1100	>1100	460	240	—	—
	定性PCR	—	T	T	T,D	T,R	T	—	—

※1 T: ToxR遺伝子 D: TDH遺伝子 R: TRH遺伝子

※2 TRH陽性株分離

表3 各食材のToxRを指標としたMPN値

a) 塩釜市越の浦湾で購入した食材のMPN値						
	5月	6月	7月	8月	9月	10月
ほや	ND	<30	>11000	>11000	>11000	3500
あさり1	ND	<30	2400	4600	>11000	2100
あさり2			230			
あさり3			2400			
あさり4			640			
ほっき貝				11000		3500
つぶ貝					11000	

b) 仙台市内量販店で購入した食材のMPN値						
	5月	6月	7月	8月	9月	10月
あさり1	ND	ND				
あさり2	<30	ND				
あさり3	※	ND				

※: 定性でToxRが陰性であったが塗抹により腸炎ビブリオが検出された食材  
 ND: 塗抹から腸炎ビブリオが検出されなかった食材

表4 環境から分離された腸炎ビブリオ血清型

血清型	環境からの検出回数 (延べ48件調査)	食材からの検出回数 (延べ24件調査)	合計 (72件)
OUT:KUT	14	3	17
O11:KUT	11	4	15
O3:KUT	9	2	12
O4:K34	7	3	10
O4:KUT	5	3	8
O1:K25	4		4
O3:K33	2	2	4
その他(39種)	31	19	49

表5-1 各定点で分離された腸炎ビブリオ血清型

定点	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	分離血清型数 <sup>1)</sup>
石巻A定点海水	- <sup>2)</sup>	-	-	O4:K34 O4:K37 O11:K68 O11:KUT	O4:K34	-	-	-	4血清型
" 海泥	O10:KUT	-	-	-	O2:K28 O4:K34	-	O3:KUT OUT:KUT	-	4血清型
石巻B定点海泥	-	O1:KUT O10:K22	O3:KUT O4:K29 O4:KUT	O1:K25 O4:KUT	O1:K25 O11:KUT OUT:K46 OUT:KUT	O2:K28 O6:KUT OUT:KUT	O3:K48 O11:KUT	-	11血清型
塩釜A定点海水	O11:K19	O1:K25 O3:K57 O3:KUT O11:KUT	OUT:KUT	O4:K32 O4:KUT	O3:K57 O3:KUT O4:K34 O11:K20	O3:K5 O3:KUT O11:KUT OUT:KUT	O3:K42 O11:KUT OUT:KUT	OUT:K3	11血清型
" 海泥	O11:K19	O1:K25 O3:KUT O5:K30 O6:KUT O11:K25 O11:KUT	O5:KUT OUT:KUT	O4:K34	O2:KUT O3:K6 O3:KUT* O4:K34 O4:K37	O3:K33 O3:KUT O4:K53 O4:KUT OUT:K12 OUT:KUT	O2:K30 O3:K6 O3:KUT O11:KUT OUT:KUT	O3:K37 OUT:KUT	18血清型
塩釜B定点海水	-	O11:KUT OUT:KUT	O4:K34	-	O3:K31 O3:K33 O5:K20 O11:KUT	OUT:KUT	-	-	5血清型

1): OUT:KUTは数より除く 2)分離されず ※: TRH遺伝子保有株

表5-2 各食材で分離された腸炎ビブリオ血清型

	5月	6月	7月	8月	9月	10月	分離血清型数 <sup>1)</sup>
塩釜A定点食材							
ほや	- <sup>2)</sup>	-	O8:K41	O3:K33 O3:KUT	-	-	3血清型
アサリ1	-	O10:KUT O11:K63	O4:K29 O4:K42 O4:KUT	O10:KUT O4:KUT	O3:K57 O8:KUT O11:KUT	-	8血清型
アサリ2			O6:KUT O3:K42				2血清型
アサリ3			O4:K34 OUT:K33				2血清型
アサリ4			-				
ほっき貝				O3:KUT O4:K34 O11:KUT OUT:KUT		O3:K33 O9:K39 OUT:K39	6血清型
つぶ貝					O11:KUT OUT:K24 OUT:KUT		2血清型
仙台市内量販店食材							
アサリ1	-	-					
アサリ2	O11:K19 O11:KUT OUT:K32	-					3血清型
アサリ3	O4:K34 O4:KUT	-					2血清型

1): OUT:KUTは数より除く 2): 分離されず

表6 協力医療機関から供与された菌株の血清型別とTDH保有状況

血清型	TDH保有状況			割合(%)
	+	-	不明	
O1:K25	1			0.4
O1:K56	10			3.7
O1:K58	1			0.4
O1:K60	1			0.4
O1:KUT	4	1		1.9
O3:K29	1			0.4
O3:K4	1			0.4
O3:K57	1			0.4
O3:K6	211			79.0
O4:K4	3			1.1
O4:K6	1			0.4
O4:K68	17			6.4
O4:K8	5			1.9
O4:K9	1			0.4
O5:KUT	1			0.4
OUT:K57		1		0.4
OUT:K6	1			0.4
OUT:KUT	1	2		1.1
NT			2	0.7
合計	261株	4株	2株	100.0

NT:血清検査せず

表7 罹患年齢階層と血清型別の関係

血清型	20未満	20代	30代	40代	50代	60代	70以上	不明	合計
O1:K25					1				1
O1:K56				1	3	4	2		10
O1:K58			1						1
O1:K60					1				1
O1:KUT					2	1	1	1	5
O3:K29								1	1
O3:K4					1				1
O3:K57					1				1
O3:K6	13	17	23	45	48	28	13	24	211
O4:K4				1	1			1	3
O4:K6								1	1
O4:K68	1	1	1	5	2	3		4	17
O4:K8				2	3				5
O4:K9						1			1
O5:KUT								1	1
OUT:K57							1		1
OUT:K6			1						1
OUT:KUT				1	1		1		3
不明				1	1				2
合計罹患数	14	18	26	56	65	37	18	33	267人
(%)	5	7	10	21	24	14	7	12	100

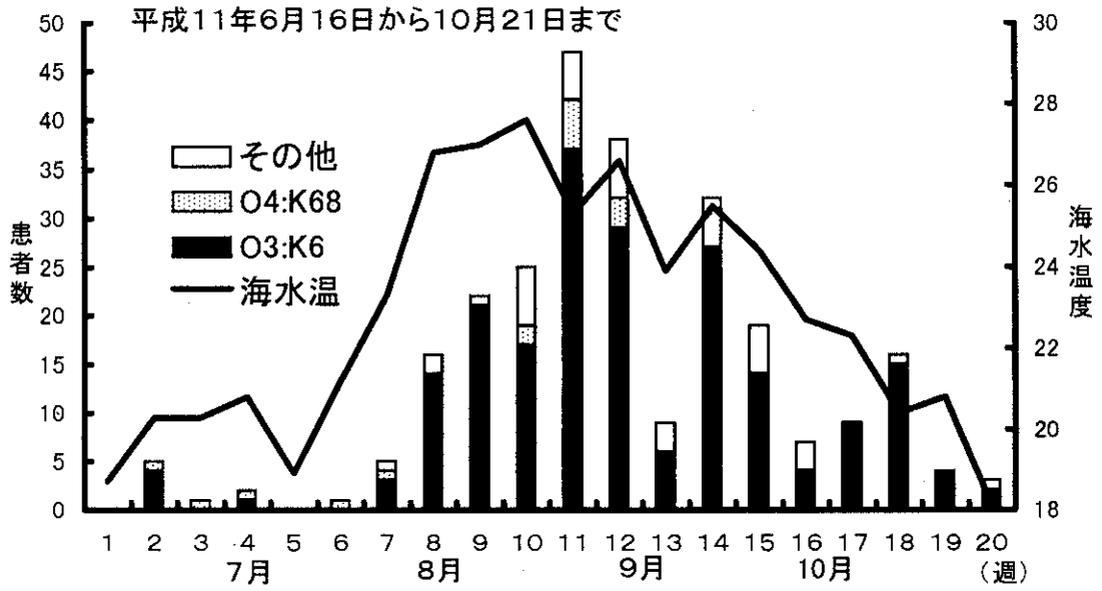


図1 腸炎ビブリオ散発患者発生数と海水温度の関係

# 分 担 研 究 報 告 書

分担研究者 横山 新吉

横山小児科医院長

(元仙台市衛生研究所長)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

腸炎ビブリオ食中毒発生予測・予防構築に関する研究

分担研究者 横山新吉 仙台市衛生研究所（現所属：横山小児科医院院長）

研究要旨 腸炎ビブリオ食中毒の発生予測と予防対策構築に資するため、当所では感染源調査として、食品の腸炎ビブリオ汚染状況検査を実施した。

A. 研究目的

ここ数年国内における腸炎ビブリオは食中毒の首位を占める。患者から分離される菌の血清型は1996年を境に O3:K6 (TDH+)が主流である。今回我々は、食品の汚染状況の一つ調査として、地域のホタテ貝について腸炎ビブリオの検査を半年にわたり試みた。これまでも、7～9月に多数の発生報告はあるが、その直前や直後の時期の実態を知ることが目的とした。

B. 研究方法

検体の採取：仙台市中央卸売市場より宮城県雄勝湾産のホタテ貝（殻付1枚当たり200g前後）を購入、当日検査に供した。

検査期間：平成11年5月、6月、8月、10月、11月、12月 計6回。

検体数：月5件（8月のみ7件）計32件。

検査方法：殻付ホタテ貝をスーパーテルとハサミを用いて細砕し、25g採取した。食塩ポリミキシンブイヨン（以下SPB）（日水製薬）225gと併せて30秒間ストマッカーで処理した。定性試験は、35℃18時間培養した後、TDH、TRH、Tox R（またはldh）のプライマーを用いてPCRを行った。さらに培養液を $10^4$ ～ $10^8$ まで希釈し各濃度ごとに100 $\mu$ lをコンラージ棒でTCBS寒天培地に3枚ずつ塗抹した。

定量試験は定性試験用検体を、SPBで希釈し、10ml 3本、1ml 3本、0.1ml 3本（MPN

3本法）で実施した。35℃18時間培養したのちTCBS寒天培地に1エーゼ塗抹した。腸炎ビブリオ様のコロニーが出現した場合、2%NaCl加TSIおよびLIM,Oxidase試験、耐塩性試験(NaCl 0%・3%・8%・10%)、バイオテスト1号（栄研化学）等で性状確認を行った。血清型別については、今回の菌はすべてTDH、TRHが検出できなかったため行っていない。

C. 研究結果

結果は表のとおり。定性試験としてPCRスクリーニングを行った結果32件中18件がTox-Rまたはldh陽性(56.3%)となった。TDH、TRHは全て陰性だった。さらにldh陽性となった10件のうち、MPN管よりPCRを行った結果5件のみ陽性であった(50.0%)。腸炎ビブリオの分離についてはPCRでTox-Rまたはldh陽性の18件中7件から分離(38.9%)、Tox-Rまたはldh、TDH、TRH全て陰性の14件中9件から分離(64.3%)された。

D. 考察

PCR法でははじめは、Tox-Rで行う予定であったが反応条件が不安定で、8月からldhに替えて実施した。さらに当初使用していたTicTacの酵素が10月から入手不可能となりAmpliTaq DNA Polymeraseに替わったなど、PCR法検査については、実験系の変更があったために一貫性のあるデータとならなかった。

ldh陽性の腸炎ビブリオは8月の検体で検出された。やはり夏場に多いことが確認

された。今回、食品からの腸炎ビブリオの検出を SPB を用いて試みたが、当所では、これまでアルカリペプトン水を用いてきて良い成績を得ている。従って、本菌の培養法および同定法について、SPB とペプトン水の差であるかどうか、再検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

日本では、生食用魚介類を喫食するという国民的嗜好・習慣から、腸炎ビブリオ食中毒と向かい合わなければならない。それゆえ腸炎ビブリオの検出率を上げることが、発生要因や感染源等を十分解明し、予防対策を講ずるため必要であると考えられる。

表 腸炎ビブリオ検査成績一覧

ホタテ購入 検査年月日	検体 番号	定 性		定性培養液から の V.p の分離	定性で Tox-R(ldh)陽性 MPN 管について			
		P C R	スクリーニング		PCR 結果	MPN 値 (/100g)	V.p 分離	
'990525	1	Tox-R	TDH	TRH	-	-	< 30	-
	2	Tox-R	TDH	TRH	⊖			
	3	Tox-R	TDH	TRH	⊖			
	4	Tox-R	TDH	TRH	-	-	< 30	-
	5	Tox-R	TDH	TRH	-	-	< 30	-
'990622	6	Tox-R	TDH	TRH	-			
	7	Tox-R	TDH	TRH	-			
	8	Tox-R	TDH	TRH	-			
	9	Tox-R	TDH	TRH	-			
	10	Tox-R	TDH	TRH	-			
'990824	11	l(d)h	TDH	TRH	-	+	92	+
	12	l(d)h	TDH	TRH	-	+	93	+
	13	l(d)h	TDH	TRH	-	+	210	+
	14	l d h	TDH	TRH	⊖			
	15	l(d)h	TDH	TRH	-	+	30	+
	16	l(d)h	TDH	TRH	-	+	30	+
	17	l d h	TDH	TRH	⊖			
'991026	18	l(d)h	TDH	TRH	-	+	< 30	-
	19	l(d)h	TDH	TRH	-	-	< 30	-
	20	l(d)h	TDH	TRH	-	+	< 30	-
	21	l(d)h	TDH	TRH	-	-	< 30	-
	22	l(d)h	TDH	TRH	-	-	< 30	-
'991129	23	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	24	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	25	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	26	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	27	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
'991214	28	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	29	l d h	TDH	TRH	⊖	-		
	30	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	31	l d h	TDH	TRH	⊖	+		
	32	l d h	TDH	TRH	⊖	+		

# 分 担 研 究 報 告 書

分担研究者 加藤 一夫

福島県衛生公害研究所長

厚生科学研究補助金(生活安全総合研究事業)  
分担研究報告書

腸炎ビブリオ食中毒発生予測・予防対策構築に関する研究

分担研究者 加藤 一夫 福島県衛生公害研究所

研究要旨

腸炎ビブリオ発生予測と予防対策構築に資するために散发患者発生状況と感染源としての海水、海泥および食品の汚染状況を調査した結果、海水および海泥では調査月全てにおいて腸炎ビブリオを検出したが、TDH 陽性菌の O3:K6 が分離されたのは 12 月の海泥のみであった。食品の汚染状況は 8 月の魚、6、11、12 月のホッキからは本菌は検出されなかった。

散发患者は 7 月から 11 月まで発生し、報告のあった本菌の 75 % が O3:K6 であった。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ食中毒は、毎夏発生するにもかかわらず、感染経路が不明確であったり、原因食材からの分離が難しいなどの問題が今だに残されている。そこで、1996 年以降急増した O3:K6 をはじめとする腸炎ビブリオの感染源、散发患者の発生動向調査と集団発生との関連および食品汚染状況を明らかにすることにより腸炎ビブリオ食中毒発生予測および予防対策の構築に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検査材料

対象検体は海水、海泥および食品とし、海水、海泥については相馬市岩の子地区(宇多川河口)、原釜地区(鵜の尾岬)、両地点から採取するとともに、食品については同市小浜地区の鮮魚店より地元近海で採取される魚介類を購入し検体とした。なお、TDH 陽性の腸炎ビブリオが検出された岩の子地区については平成 12 年 2 月に周辺地区 5 ケ所の

海泥を定性法で腸炎ビブリオ調査を行った。

2. 散发患者発生状況調査

県内 6 方部の次の 7 医療機関に散发患者発生状況について調査協力を依頼した。なお、報告のあった患者から分離された腸炎ビブリオの毒素は PCR 法によって行った。

- 1) 日本赤十字福島病院
- 2) 星総合病院
- 3) 公立岩瀬病院
- 4) 白河厚生病院
- 5) 竹田総合病院
- 6) 公立相馬病院
- 7) 呉羽総合病院

3. 調査対象年月

平成 11 年 6 月から 12 月までの 7 ヶ月間および平成 12 年 2 月を対象とした。

4. 検査方法

腸炎ビブリオの定性および定量(MPN 法)は増菌培地に食塩ポリミキシンブイヨン、分離培地には T C B S 培地を用いて東北食中毒研究会において提示された検査方