

平成12年度厚生科学研究報告書

動物性加工食品の高度衛生管理に関する研究

主任研究者
熊谷進

目 次

酸性条件下における腸炎ビブリオの死滅 熊谷 進、仁科徳啓、長谷川順子、工藤由起子……………	1
魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態——熊谷 進、小沼博隆、宮原美知子、工藤由起子、 中川 弘、齊藤章暢、杉山寛治、仁科徳啓、長谷川順子、八柳 潤……………	43
病原性 <i>Yersinia enterocolitica</i> の熱抵抗性に関する研究——林谷秀樹……………	63
損傷を受けた <i>Yersinia enterocolitica</i> の免疫磁気ビーズ法による分離——林谷秀樹……………	81
腸炎ビブリオの増殖——小沼博隆、仁科徳啓、長谷川順子、小澤一弘、浅川 豊、 金子孝昌、久保亮一……………	99
卵の日付け表示設定に関する基礎研究——小沼博隆、宮原美知子 ……	117
食品に起因する危害に関するデータベースおよびプレディクティブモデルの開発に 関する研究——難波 江 ……	147
HACCP に基づく衛生管理の評価方法の開発に関する研究——山崎省二 ……	181
マリントキシン等水産食品の安全性確保に関する研究——大島泰克 ……	193
<i>Coxiella burnetii</i> 死滅温度に関する研究——山本茂貴、長岡宏美、春日文子 ……	219
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——池 康嘉、 谷本弘一、小澤良之、野村隆浩、藤本修平、高田治芳……………	225
腸炎ビブリオ汚染実態調査研究——島田俊雄、山井志郎、杉山寛治、細呂木志保、 仲西寿男……………	233

分担研究報告書

酸性条件下における腸炎ビブリオの死滅

分担研究者：熊谷 進（東京大学農学生命科学研究科）

研究協力者：仁科徳啓・長谷川順子（東海大学短期大学部）、

工藤由起子（国立感染症研究所）

O3K6 を含めた腸炎ビブリオについて、塩酸、酢酸、クエン酸、米酢、ワインビネガー等による酸性条件下における死滅を調べた。pH 5.6 では、これら 3 種類の酸のうちクエン酸が最も殺菌効果が大きかったが、pH 4.5 においては酢酸の効果が最大であった。pH 5.6 では O3K6 株と他の血清型株の間に差は認められなかったが、pH 4.5 においては O3K6 株が他よりも耐性の傾向を示した。同じ pH 下で比較した場合、市販醸造酢の米酢とワインビネガーは、塩酸、酢酸、クエン酸より殺菌効果が大きいことが認められた。モデル食品としてのホタテ貝柱上での殺菌効果を調べた結果、食品上では明らかに効果が減弱した。

1. 研究目的

近年、腸炎ビブリオによる食中毒が世界的に増加傾向を示しているが、これは血清型 O3K6 の増加によることが判明している（Center for Disease Control and Prevention. 1998. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections association with eating raw oysters – Pacific Northwest, 1997. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.

47:457-462. Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Hishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Gargo, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.). また、我が国の食中毒患者からも高頻度にこの血清型が分離されている (病原微生物検出情報、1999年、7月号)。従って現在、とくに血清型 O3:K6 に着目した対策が必要とされているが、そのためには同血清型の食品や環境における挙動についての十分な知見が得られていなければならない。しかし、その情報は極めて限られており、とくに O3:K6 が従来の腸炎ビブリオと異なる挙動を示すか否かについては不明である。国内外において魚介類食品は、保存性向上のため、あるいは嗜好上、種々の醸造酢で処理される。こうした条件下での腸炎ビブリオの死滅を予測するためには酸性条件下における死滅についてのデータが必須である。そこで、本研究においては、O3:K6 の酸性条件下における死滅を、その他血清型の腸炎ビブリオとの比較のもとに検討した。

2. 研究方法

供試菌株：O4K8、静岡、患者由来、TDH+、1997

O3K6、秋田、患者由来、TDH+、1998

O3K6、秋田、患者由来、TDH+、1998

O1K56、新潟、患者由来、TDH+、1998
O3K6、青森、患者由来、TDH+、1998
O4K8、新潟、患者由来、TDH+、1997
O3K6、新潟、患者由来、TDH+、1998
O1K56、静岡、患者由来、TDH+、1999
O4K68、静岡、患者由来、TDH+、1999
O3K6、静岡、患者由来、TDH+、1999
O2K28、新潟、食品由来、TDH-、1999
O2K28、新潟、食品由来、TDH-、1999

各菌株を、食塩濃度1%の緩衝ペプトン水（OXOID）中で35℃下18時間静置培養した後に、培養菌体を新鮮な同ペプトン水でさらに同条件下で18時間培養した。ついで培養菌液を1%NaCl加リン酸緩衝液（pH7）で洗浄してから、各酸液に懸濁した後に15℃下で静置した。逐次菌液を採取し、ペプトン水で希釈倍列を作成し、それらの100 μ lを2枚のTCBS寒天平板培地上へコンラージを用いて塗抹してから37℃下で一晩培養し、発育した集落数を計測することによって、ml当たりの菌数を求めた。各酸液としては、リン酸緩衝液（pH7）に、クエン酸、酢酸、塩酸を加えることによって所定のpHに調整し、NaClを1%になるように加えたものを用いた。また、市販のワインピネガーまたは酢を、所定のpHになるように1%NaCl加リン酸緩衝液（pH7）に添加した液も酸液として用いた。

3. 研究結果と考察

pH 7.0 においては、いずれの菌株も 3 4 日目まで生残し、O3K6 の一菌株以外は、 10^6 /ml 以上の菌数を維持した (図 1、2)。しかし、酢酸 pH 6.0 においては、O3K6 の 5 株中 4 株、および O3K6 以外の血清型 7 株中 4 株が、3 4 日目までに検出限界未満まで、すなわち 7 桁以上減少した (図 3、4)。他の 4 株についても 3 桁以上の減少が見られた。酢酸 pH 5.6 では、20 日目までには大部分の株が検出限界未満まで減少、クエン酸と塩酸 pH 5.6 についても、21 日目までに大部分の株が検出限界未満まで減少した (図 5、6、7、8、9、10)。

それぞれの条件において O3K6 株全体とそれ以外の血清型の株全体について回帰直線を求め (図 11~20)、傾きを比較したところ、両血清型間で有意差は認められなかったが、すべての株の回帰直線の傾きを酸の種類間で比較したところ、クエン酸と塩酸との間およびクエン酸と酢酸との間に有意差 (分散分析、 $p < 0.05$) が認められた。D 値 (表 1) はクエン酸、酢酸、塩酸の順に小さいことが認められたことから、pH 5.6 では、これら 3 種類の酸のうちクエン酸が最も殺菌効果がおおきいことが判明した。

pH 4.5 においては、pH 5.6 の場合とは異なり、酢酸の効果が最大であった。すなわち、酢酸によりすべての菌株の菌数が 2 4 時間以内に検出限界未満まで減少するのに対し、塩酸の場合は一菌株のみが 2 4 時間以内に検出限界未満まで減少、またクエン酸の場合は 2 4 時間目に全菌株が 10^7 /ml 以上の菌数を維持した (図 21~23)。この pH においては、O3K6 株の方が他の血清型よりも酸に耐性である傾向が見られたが、使用株数が少ない

ため、これら血清型による差異が、血清型とリンクした現象なのか、株による差異を反映したものか不明である。

モデル醸造酢としてワインビネガーと米酢を用い、pH 5.6 と pH 4.5 における菌の死滅を調べた。PH 5.6 では、いずれの醸造酢においても12菌株すべてが20日目までに検出限界未満まで減少したことから、これら醸造酢は酢酸やクエン酸のみよりも若干死滅させる効果が大きいものと考えられる(図24、25)。PH 4.5 でも醸造酢の方が酢酸やクエン酸よりも効果が大きい傾向が認められた(図26、27、表2-1、2-2)。

実際の食品を酢で処理する場合を想定し、モデル食品としてのホタテ貝柱に菌を接種してから pH 4.0~5.0 に調整したワインビネガーと米酢で浸漬した後に菌数を計測した結果、両醸造酢とも pH 4.5 で6時間目まで、1~2桁程度の菌の減少が認められたにすぎず、菌を直接酸液に浸潤させた場合よりも明らかに効果が小さかった。PH 4.0 では3時間目には検出限界未満まで菌数が減少していた(図28)。これらの成績から、食品を醸造酢で処理する場合には、食品の影響を受けて殺菌効果が減少すること、したがって酢単独による効果を食品上で得るためには、pH のより低い条件を付与する必要があることがわかった。

既によく認められているように、PH 4.5 では、3種類の酸のうち酢酸がもっとも殺菌効果が高かった。しかし、pH 5.6 においては、クエン酸が最も殺菌効果がおおきいことが見いだされた。pH によって酸の効果が異なることは、これまでに報告されていなかった現象であり、その機序についての検討が望まれる。腸炎ビブリオについても、その他一部細菌で知られているように、

酸性条件によって酸耐性の性質が付与されることが認められており (H-C Wong et al., Infection and Immunity, Vol.66,3066-3071, 1998)、こうした酸耐性の付与が pH による酸の効果の相違の要因である可能性が考えられるが、この点についての検討も今後必要であろう。

4. 結論

O3K6 を含めた腸炎ビブリオの酸性条件下における死滅を調べた。pH 5.6 では、これら 3 種類の酸のうちクエン酸が最も殺菌効果が大きかったが、pH 4.5 においては酢酸の効果が最大であった。pH 5.6 では O3K6 株と他の血清型株の間に差は認められなかったが、pH 4.5 においては O3K6 株が他よりも耐性の傾向を示した。同じ pH 下で比較した場合、市販醸造酢の米酢とワインピネガーは、塩酸、酢酸、クエン酸より殺菌効果が大きいことが認められた。モデル食品としてのホタテ貝柱上での殺菌効果を調べた結果、食品上では明らかに効果が減弱した。

5. 発表

長谷川順子、仁科徳啓、工藤由起子、小沼博隆、熊谷 進：酸性下における *Vibrio parahaemolyticus* の消長。第 21 回日本食品微生物学会、平成 12 年 10 月、東京。

堀坂知子、工藤由起子、川澄俊之、熊谷 進：食品からの PCR 法による腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の検出法の検討。第 21 回日本食品微生物学会、平成 12 年 10 月、東京。

図 1. 緩衝液 pH7.0 による死滅。

- B : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- C : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- D : O3K6、青森、患者由来、TDH+
- E : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
- F : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図 2. 緩衝液 pH7.0 による死滅。

- B : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
- C : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
- D : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
- E : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
- F : O4K68、静岡、患者由来、TDH+
- G : O3K6、静岡、患者由来、TDH+
- H : O2K28、新潟、食品由来、TDH-
- I : O2K28、新潟、食品由来、TDH-

図 3. 酢酸 pH6.0 による死滅。

- B : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- C : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
- D : O3K6、青森、患者由来、TDH+
- E : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
- F : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図 4. 酢酸 pH6.0 による死滅。

- B : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
- C : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
- D : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
- E : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
- F : O4K68、静岡、患者由来、TDH+
- G : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

H : O2K28、新潟、食品由来、TDH-
I : O2K28、新潟、食品由来、TDH

図5. 酢酸 pH5.6 による死滅。

B : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
C : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
D : O3K6、青森、患者由来、TDH+
E : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
F : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図6. 酢酸 pH5.6 による死滅。

B : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
C : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
D : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
E : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
F : O4K68、静岡、患者由来、TDH
G : O3K6、静岡、患者由来、TDH+
H : O2K28、新潟、食品由来、TDH-
I : O2K28、新潟、食品由来、TDH

図7. クエン酸 pH5.6 による死滅。

B : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
C : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
D : O3K6、青森、患者由来、TDH+
E : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
F : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図8. クエン酸 pH5.6 による死滅。

B : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
C : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
D : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
E : O1K56、静岡、患者由来、TDH+

F : O4K68、静岡、患者由来、TDH+
G : O3K6、静岡、患者由来、TDH+
H : O2K28、新潟、食品由来、TDH-
I : O2K28、新潟、食品由来、TDH

図 9. 塩酸 pH5.6 による死滅。

B : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
C : O3K6、秋田、患者由来、TDH+
D : O3K6、青森、患者由来、TDH+
E : O3K6、新潟、患者由来、TDH+
F : O3K6、静岡、患者由来、TDH+

図 10. 塩酸 pH5.6 による死滅。

B : O4K8、静岡、患者由来、TDH+
C : O1K56、新潟、患者由来、TDH+
D : O4K8、新潟、患者由来、TDH+
E : O1K56、静岡、患者由来、TDH+
F : O4K68、静岡、患者由来、TDH+
G : O3K6、静岡、患者由来、TDH+
H : O2K28、新潟、食品由来、TDH-
I : O2K28、新潟、食品由来、TDH

図 11. 緩衝液 pH7.0 における O3K6 株の死滅回帰直線。

図 12. 緩衝液 pH7.0 における O3K6 以外の株の死滅回帰直線。

図 13. 酢酸 pH6.0 における O3K6 株の死滅回帰直線。

図 14. 酢酸 pH6.0 における O3K6 以外の株の死滅回帰直線。

図 15. 酢酸 pH5.6 における O3K6 株の死滅回帰直線。

図16. 酢酸 pH5.6における O3K6 以外の株の死滅回帰直線。

図17. クエン酸 pH5.6における O3K6 株の死滅回帰直線。

図18. クエン酸 pH5.6における O3K6 以外の株の死滅回帰直線。

図19. 塩酸 pH5.6における O3K6 株の死滅回帰直線。

図20. 塩酸 pH5.6における O3K6 以外の株の死滅回帰直線。

図21. 酢酸 pH4.5における死滅。B、C、D：表2-1の O3K6 株。E、F：表2-2の株。

図22. クエン酸 pH4.5における死滅。B、C、D：表2-1の O3K6 株。E、F：表2-2の株。

図23. 塩酸 pH4.5における死滅。実線：表2-1の O3K6 株。破線：表2-2の株。

図24. 米酢 pH5.6における死滅。

1：O4K8、静岡、患者由来、TDH+。2：O3K6、秋田、患者由来、TDH+。
3：O3K6、秋田、患者由来、TDH+。4：O1K56、新潟、患者由来、TDH+。
5：O3K6、青森、患者由来、TDH+。6：O3K6、新潟、患者由来、TDH+。7：
O4K8、新潟、患者由来、TDH+。8：O1K56、静岡、患者由来、TDH+。9：O3K6、
静岡、患者由来、TDH+。10：O4K68、静岡、患者由来、TDH+。11：O2K28、
新潟、食品由来、TDH-。12：O2K28、新潟、食品由来、TDH-。

図 25. ワインピネガー pH 5.6 における死滅。

1～12 : 図 24 参照。

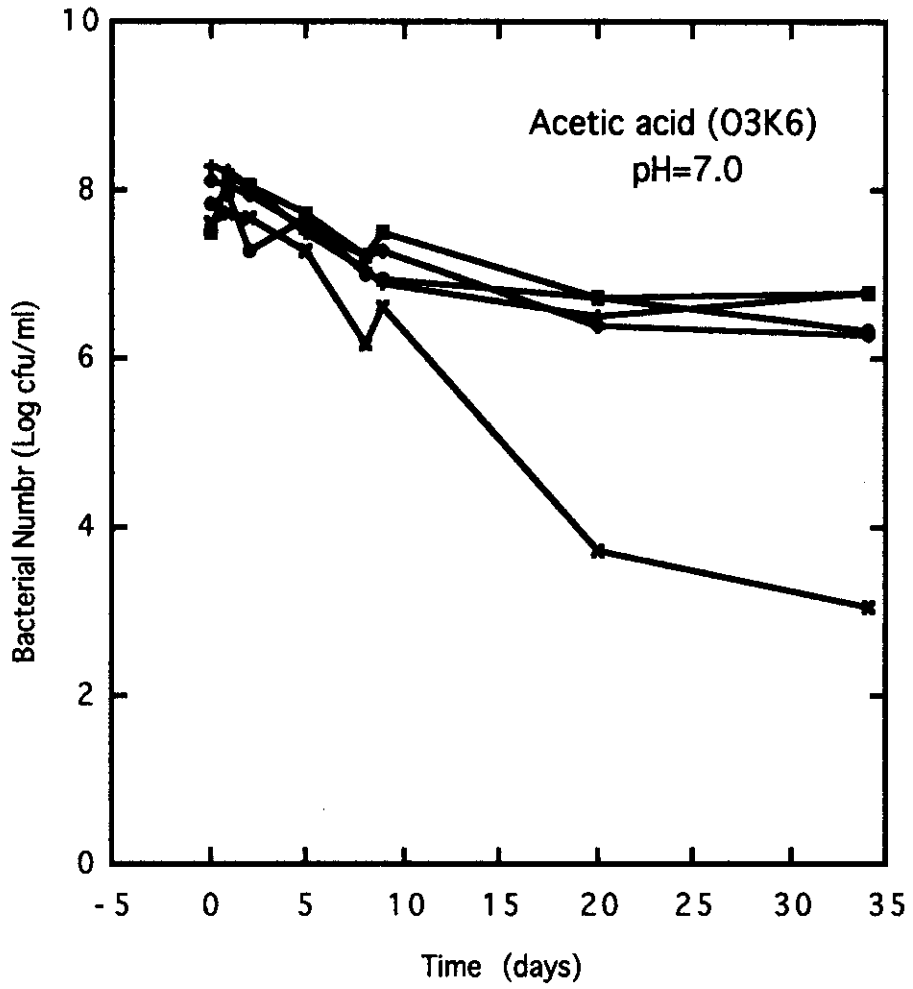
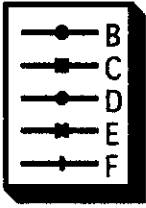
図 26. 米酢 pH 4.5 における死滅。

A : O3K6、秋田、患者由来、TDH+。 B : O1K56、静岡、患者由来、TDH+。 C : O4K68、静岡、患者由来、TDH+。

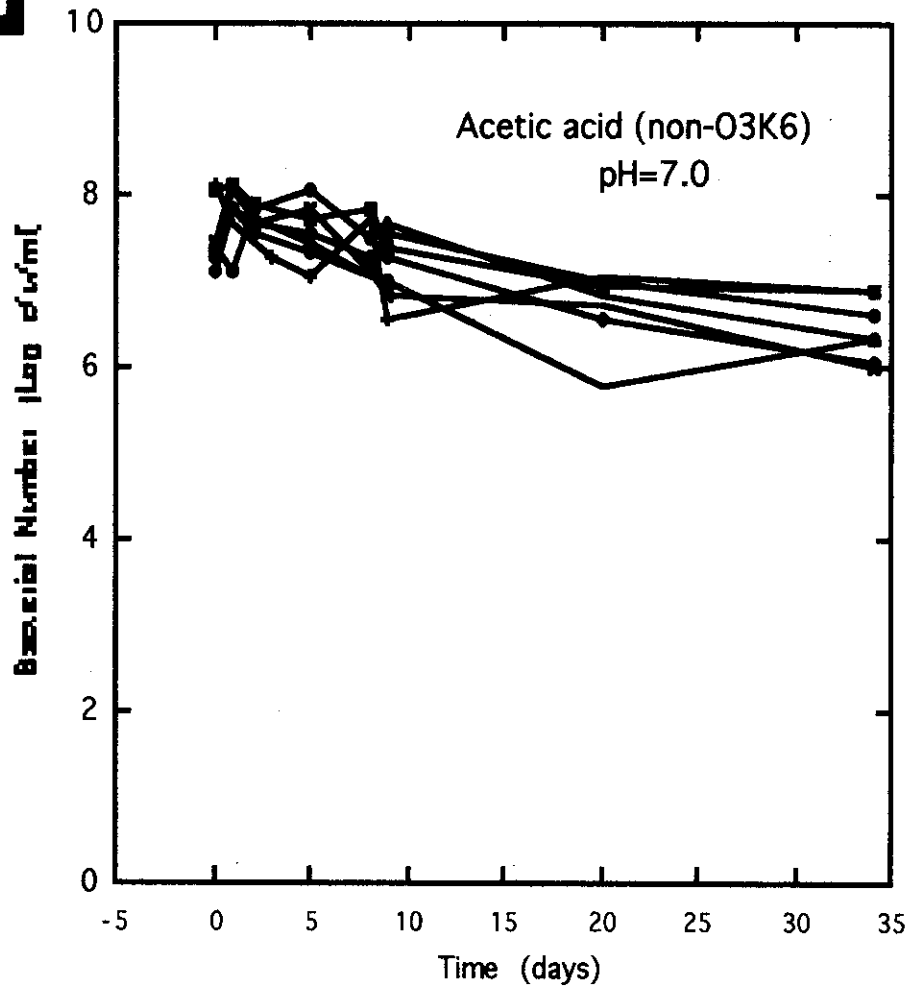
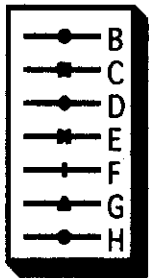
図 27. 米酢 pH 4.5 における死滅。

A : O3K6、秋田、患者由来、TDH+。 B : O1K56、静岡、患者由来、TDH+。 C : O4K68、静岡、患者由来、TDH+。

図 28. ホタテ貝柱上での醸造酢による死滅。使用菌株 : O3K6、秋田、患者由来、TDH+。



1.



⊗ 2.

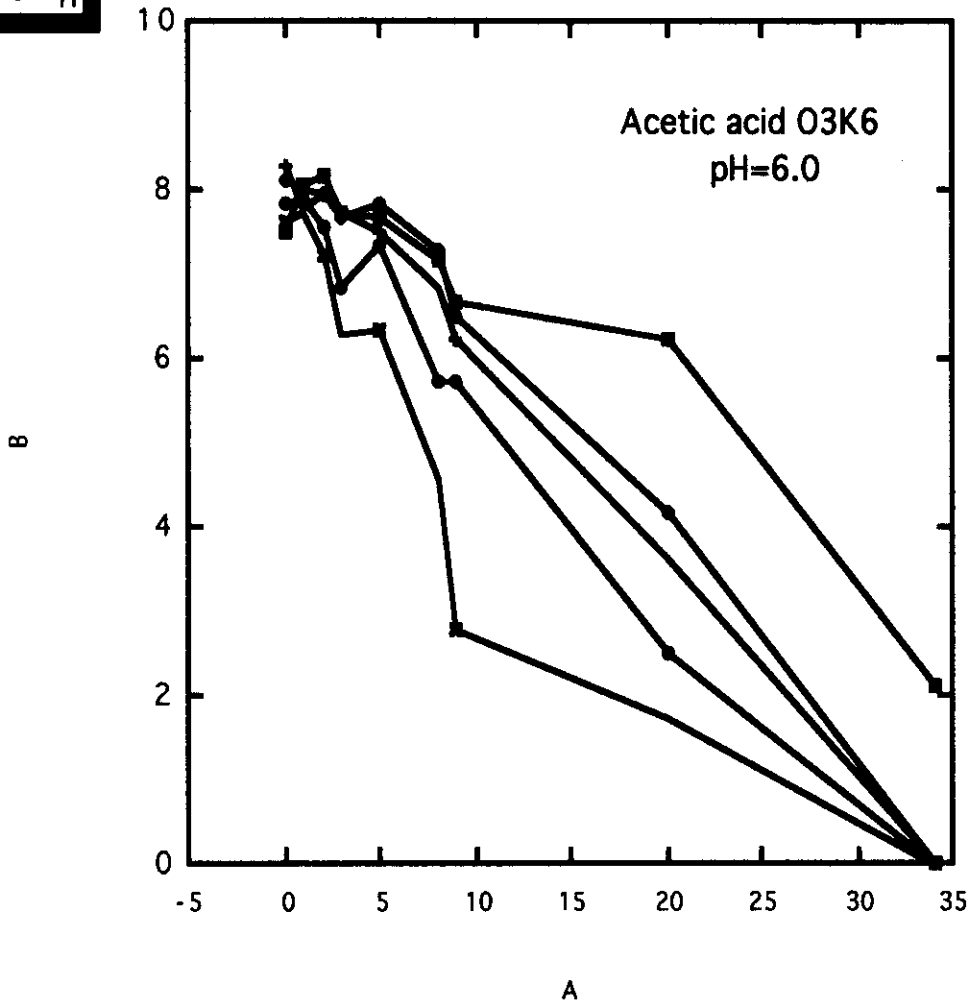
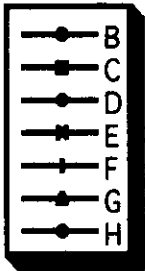
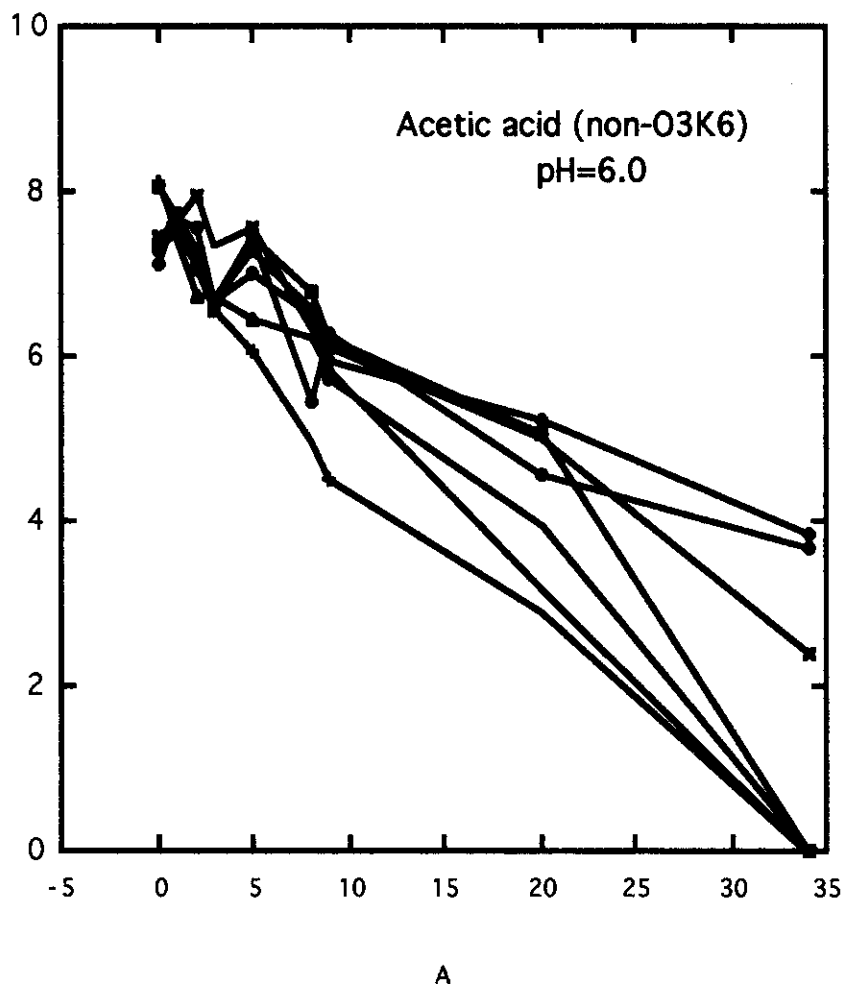
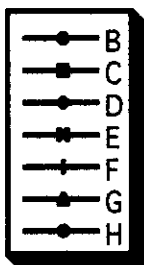
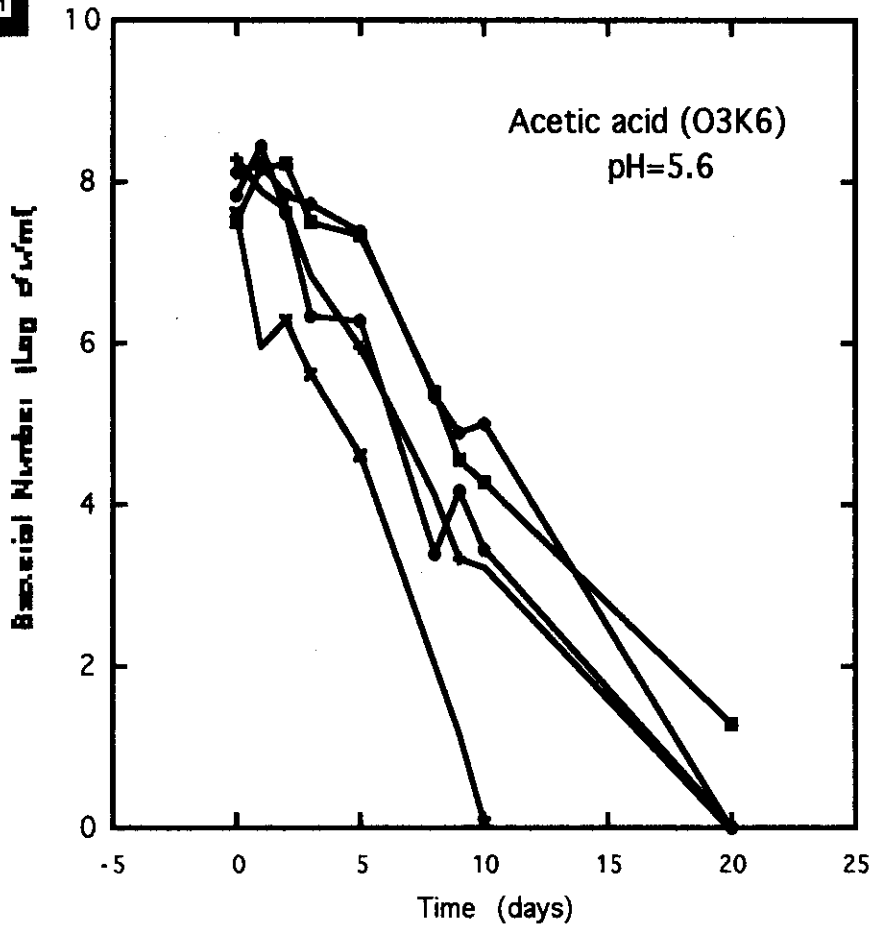
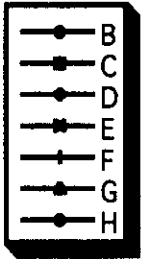


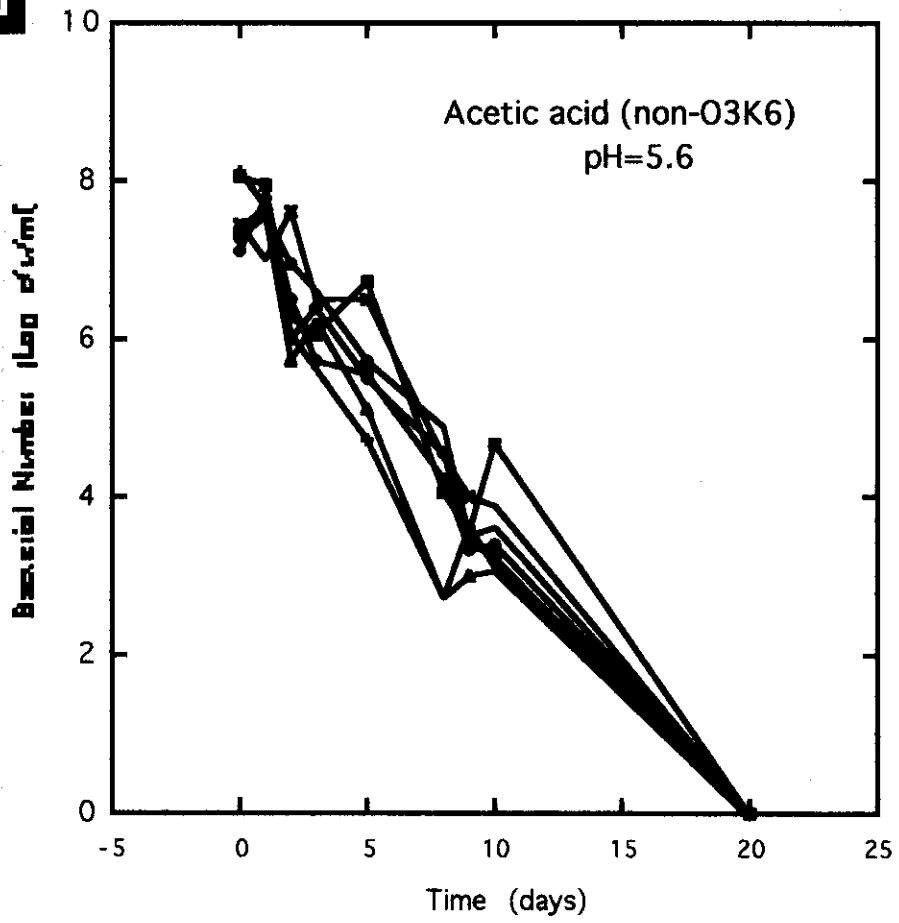
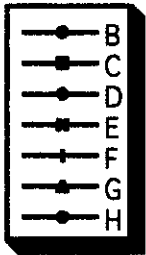
图 3



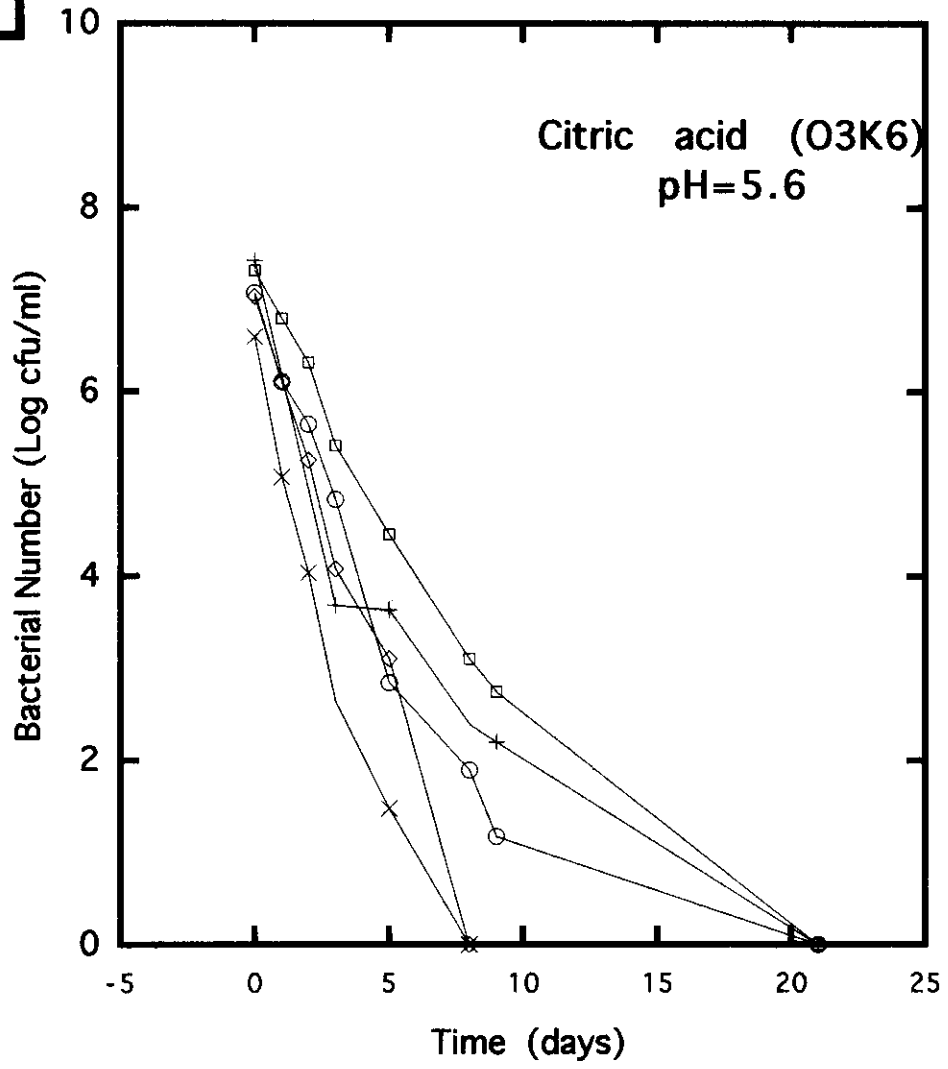
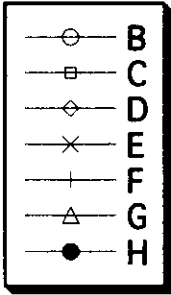
⊗ 4



☒ 5



⊗ 6



☒ 7.