

28

Time (h)

菌数 (log, CFU/換体)

表 1.

D 値 (日)

酢酸	pH7.0	O3K6	14.8
	pH7.0	non-O3K6	25.0
	pH6.0	O3K6	4.9
	pH6.0	non-O3K6	7.0
	pH5.6	O3K6	2.3
	pH5.6	non-O3K6	2.3
クエン酸	pH5.6	O3K6	1.8
	pH5.6	non-O3K6	2.1
塩酸	pH5.6	O3K6	2.4
	pH5.6	non-O3K6	3.0

表 2-2

pH4.5の各種酸、ワインピネガー、米酢中での15℃におけるVp03 : K6株以外の株の生存性

時間 菌種	1%NaCl, 100mmM, リン 酸Na, pH7.0			酢酸, pH4.5			クエン酸, pH4.5			塩酸, pH4.5			ワインピネガー, pH4.5			米酢, pH4.5		
	0	5	24	0	5	24	0	5	24	0	5	24	0	5	24	0	5	24
C-3,01 : K56, 新潟, ヒト	7.8	7.0	3.5	4.1			4.2	4.6	3.5	5.3	3.4	1.5	5.4			2.7		
	X	X	X	X	<1	<1	X	X	X	X	X	X	X	<1	<1	X	<1	<1
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>		
C-6, 04 : K8, 新潟, ヒト	1.0	1.0	8.8	7.0			1.0	1.1	1.0	8.0	1.1	1.8	4.5			3.8		
	X	X	X	X	<1	<1	X	X	X	X	X	X	X	<1	<1	X	<1	<1
	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>			10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>		

\* : リン酸緩衝液の作製法 : リン酸-ナトリウム (無水, MW119,98) 24.0を700mlのDWに溶解後, pHメーターを用いて5NのNaOHでpH7.0 (25℃) に調整後全量を1Lとした。本品50m lに各種有機酸等を加えてpH4.5に調整後, DWで100m lに調整した。調整後pH4.5であることを確認後試験に用いた。NaCl濃度は, 1%になるよう調整した。  
 \* : ワインピネガーおよび米酢は, pH調整後に0.45μmのメンブレンフィルターでろ過し, 試験に供した。

表 2-1

pH4.5の各種酸、ワインピネガー、米許中での15℃におけるVp03 : K6の生存性

時間 菌種	1%NaCl, 100mmM, リン酸Na, pH7.0					酢酸, pH4.5					クエン酸, pH4.5					塩酸, pH4.5					ワインピネガー, pH4.5					米許, pH4.5				
	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5		
VPS-00-1, O3 : K6, 静岡, ヒ ト	2.0	1.0	1.2	2.5	8.9	4.9	2.5	1.0	9.7	1.8	2.6	1.8	5.5	4.0	4.5	1.9	1.9	9.3	1.5	3.4	2.8	2.6	5.0	<1	<1	<1	<1			
	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^6$	$10^3$	$10$	$10^4$	$10^4$	$10^6$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^6$	$10^4$	$10$	$10^3$	$10^7$	$10^6$	$10^0$	$10^0$	$10^0$	$10^0$			
C-5, O3 : K6, 新潟, ヒト	1.2	1.5	1.3	2.0	1.7	1.0	<1	1.5	8.6	1.5	4.1	2.5	1.7	1.2	6.0	4.2	5.5	1.9	7.0	5.0	4.7	3.0	1.0	2.2	<1	<1				
	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^7$	$10^4$	<1	$10^2$	$10^6$	$10^6$	$10^8$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^8$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^7$	$10^5$	$10^5$	$10^4$	<1	<1			
B-53, O3 : K6, 秋田, ヒト	1.5	2.1	2.0	1.9	7.1	1.3	<1	4.4	1.7	1.9	1.1	5.1	1.5	3.0	5.0	3.8	1.2	2.3	2.0	<1	6.5	3.5	5.0	1.9	<1	<1				
	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^7$	$10^5$	<1	$10^3$	$10^7$	$10^7$	$10^8$	$10^7$	$10^7$	$10^7$	$10^8$	$10^7$	$10^7$	$10^8$	$10^5$	$10^2$	$10^7$	$10^6$	$10^2$	$10^4$	<1	<1				
						24時間後<1			24時間後7.0×10 <sup>4</sup>				24時間後7.0×10 <sup>4</sup>				24時間後3.0×10 <sup>4</sup>							24時間後<1						
						24時間後<1			24時間後7.0×10 <sup>4</sup>				24時間後2.1×10 <sup>5</sup>				24時間後6.0×10 <sup>6</sup>							24時間後<1						

リン酸緩衝液の作製法：リン酸一ナトリウム（無水, MW119.98）24.0gを700mlのDWに溶解後、pHメーターを用いて5NのNaOHでpH7.0（25℃）に調整後全量を1mlとした。本品50mlに各種有機酸等を加えてpH4.5に調整後、DWで100mlに調整した。調整後pH4.5であることを確認後試験に用いた。

## 魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態

分担研究者：熊谷 進

研究協力者：小沼博隆（国立衛生研究所）

宮原美知子（国立衛生研究所）

工藤由起子（国立感染症研究所）

中川 弘（東京顕微鏡院）

斉藤章暢（埼玉衛生研究所）

杉山寛治（静岡環境衛生科学研究所）

仁科徳啓（東海大学短期大学部）

長谷川順子（東海大学短期大学部）

八柳 潤（秋田衛生科学研究所）

前年度までに、O3K6TDH 産生株が分離された場所において10月に採取した合計72ロット（1ロット約1kg）のアサリのうち、2ロットにおいてtdhの存在が確認でき、かつ我妻培地上で溶血性を示すO3K6株が分離された。国外産アサリ20ロットからは、1ロットからtdhの存在が確認でき我妻培地上で溶血性を示したO3K6株が分離された。アサリ以外の魚介類は、いずれも前年度までにTDH陽性O3K6株が見い出されている水域から採取した29検体で、このうち7検体において腸炎ビブリオが検出されたが、それらの中からはTDH陽性O3K6株は見い出されなかった。アサリ全検体について、TDH産生O3K6コロニーは、腸炎ビブリオコロニーのうち0.094%と、極めて低率で存在することが示された。

### A. 研究目的

近年、腸炎ビブリオ食中毒が急増したことから、それに対する対応策の策定が急がれている。この食中毒急増は、腸炎ビブリオ血清型O3K6が東南アジア諸国及び米国でも増加していることを反映したものであることが判っており

(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.)、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)。また、これら食中毒患者から分離される菌は、大部分が耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌であることが明らかにされていることから、O3K6TDH 陽性菌が急増した食中毒の原因菌と考えられている。したがって、現在必要な対策はこの菌を対象とするべきであると考えられる。

予防方策を構築するためには、水揚げ段階から流通を経て喫食されるまでの過程における魚介類の TDH 産生 O3:K6 株による汚染実態が明らかにされることが望まれる。それによって、食中毒危害である TDH 産生 O3:K6 株の汚染の拡大及び増殖等が起こる過程を推定し、どの段階に対してどういうコントロールを行えば効果的な対策が期待できるかを明確にすることができる。しかし従来より、腸炎ビブリオの病原株である TDH 陽性株は、患者からは高頻度に分離されるにも関わらず、食品や環境からは TDH 陰性株は高頻度で分離されるが、陽性株は極めて低頻度でしか分離されていない。本研究の一環としてすでに、多数の流通魚介

類検体からの O3K6 の病原株を従来の方法で分離することを試みたが検出することはできなかった。しかしその後の検討によって、従来の 1 段階の増菌培養法よりも 2 段階または 3 段階の増菌培養法の方が TDH 産生 O3:K6 株が検出しやすいことが考えられたことから、また、新たに開発中の酵素基質を利用した寒天平板 (CHROMagar) が腸炎ビブリオの集落を判別しやすいことが認められたことから、本年度の汚染実態調査に際して、これらの方法を組み込んだ検出方法を採用することとした。その方法を用いて、これまでの調査において O3K6TDH 陽性菌が分離されたことのある海域由来の魚介類からの、同菌の分離を試みた。

## B. 研究方法 (図 1 参照)

O3K6TDH 陽性菌が分離されたことのある海域由来であることが判っているアジ、カレイ、キス、ホウボウ、メバル、サザエ、アサリ、メヒカリ、ハッカク、ヒラメ、サザエを市場において購入し検体とした。複数の機関において検査を行ったため、一部の検体については入手した日に宅急便 (冷蔵) で送付した。アサリとサザエは殻をはずして剥き身としたものを、その他魚についてはエラと皮を含めた部位を、それぞれ 25g を採材してストマッカー袋に入れ、増菌培地 225ml を加えた。なお、アサリ 1 ロットからは、25g 検体を 1 または 2 検体採取し検査に供した。

非選択増菌培地で 6 時間培養した後に、さらに選択増菌培地で培養する 2 段階増菌培養を行ってから、K6 磁気ビーズで処理し、または処理せずに TCBS と Cromagar に塗抹し、腸炎ビブリオと推定されるコロニーをさらに我妻培地で培養し、溶血性の有無を調べた。

溶血性を示したコロニーについては、PCR で tdh の有無を検査し、tdh が確認されたコロニーについては血清型別を行った。

### C. 研究結果と考察

前年度までに、O3K6TDH+株が海水またはアサリから分離された場所において10月に採取した合計72ロット（1ロット約1kg）のアサリのうち、2ロットにおいてtdhの存在が確認でき我妻培地上で溶血性を示すO3K6株が分離された（表1-7、各研究機関ごとの成績）。国外産アサリ20ロットからは、1ロットからtdhの存在が確認でき我妻培地上で溶血性を示したO3K6株が分離された（表8）。残余のロットについては、tdh、溶血性、TDH産生性（ラテックス凝集反応）等のいずれかが陰性を示す株のみしか分離されなかった（表1-7）。

国内外産アサリ17検体については、増菌培養後にPCRによってtdhの存在を調べたが、10検体についてtdhの存在が確認できた（表8）。これらロットの増菌培養物を塗抹した平板から、各検体について腸炎ビブリオと推定される12から103個のコロニーを釣菌し、我妻培地に接種した。我妻培地上で溶血反応を示し、血清型別反応によりO3K6であることが判明した国外産検体については、20コロニー中3コロニーがTDH陽性O3K6株であることが認められた。

アサリ以外の魚介類は、いずれも前年度までにTDH陽性O3K6株が見い出されている水域から採取した29検体で、このうち7検体において腸炎ビブリオが検出されたが、それらの中からはTDH陽性O3K6株は見い出されなかった（表5、6）。

アサリ全検体から、合計4265コロニーについて我妻培地とPCR等により、



TDH 陽性 O3K6 株 4 コロニーを分離した。各検体について調べたコロニー数は 1 から 184 個であったが、それらのうち 5 個以上のコロニーについては、コロニー数（10 個ごと）と検体数との関係を図 2 に示した。TDH 陽性 O3K6 株は、一検体当たり 20、20、10 個のコロニーを調べた検体から分離された。したがって、残余の 4215 コロニーからは、TDH 陽性 O3K6 株がひとつもみいだされなかったことになる。

国内産アサリは、限定された一水域において生息していたもので、72 ロット中 2 ロットから TDH 陽性 O3K6 株が分離され、それぞれ 20 と 10 コロニーのうち一コロニーが TDH 陽性 O3K6 株であったこと、100 コロニー以上を調べて見つからなかった検体が約 10 検体あったことなどから、不均一に汚染されていた可能性が考えられる。しかし、増菌培養後に PCR で *tdh* を調べた検体については、それらの多くが *tdh* 陽性であったにもかかわらず、とくに 100 コロニー以上のコロニーを調べても我妻培地陽性株が分離できなかった検体があったことから、アサリは TDH 陽性株にほぼ均一に汚染されているけれども、その菌数が陰性株に比して極めて少ないがために分離できなかった可能性も考えられる。

アサリ以外の魚介類については TDH 陽性 O3K6 株が検出されなかった。国内産アサリについては、ここで用いた方法では、72 ロット中 2 ロットのみ、2.8% に TDH 陽性 O3K6 株が認められたことになる。アサリ全検体について、TDH 陽性 O3K6 コロニーは、腸炎ピブリオコロニーのうち 0.094% と、極めて低率に存在することが示された。

方法の性能を究明するために、方法別に検出率を集計整理した。K6 抗体免疫磁気ビーズによって集菌した培養液を平板に塗抹した場合に、全体として直接塗

沫の場合よりも若干 O3:K6 株の検出率が高くなる傾向が見られた(表9)。さらに、TCBS と GHROMagar を比較すると、後者の方が検出率が高くなることが認められた(表9-11)ことから、免疫磁気ビーズと GHROMagar を組み合わせる方法が O3:K6 株を最も分離しやすい方法であるものと考えられた。

#### D. 結論

前年度までに、O3K6TDH 産生株が分離された場所において10月に採取した合計72ロット(1ロット約1kg)のアサリのうち、2ロットにおいて tdh の存在が確認でき我妻培地上で溶血性を示す O3K6 株が分離された。国外産アサリ20ロットからは、1ロットから tdh の存在が確認でき我妻培地上で溶血性を示した O3K6 株が分離された。

アサリ以外の魚介類は、いづれも前年度までに TDH 陽性 O3K6 株が見い出されている水域から採取した29検体で、このうち7検体において腸炎ビブリオが検出されたが、それらの中からは TDH 陽性 O3K6 株は見い出されなかった。

アサリ全検体について、TDH 産生 O3K6 コロニーは、腸炎ビブリオコロニーのうち0.094%と、極めて低率で存在することが示された。



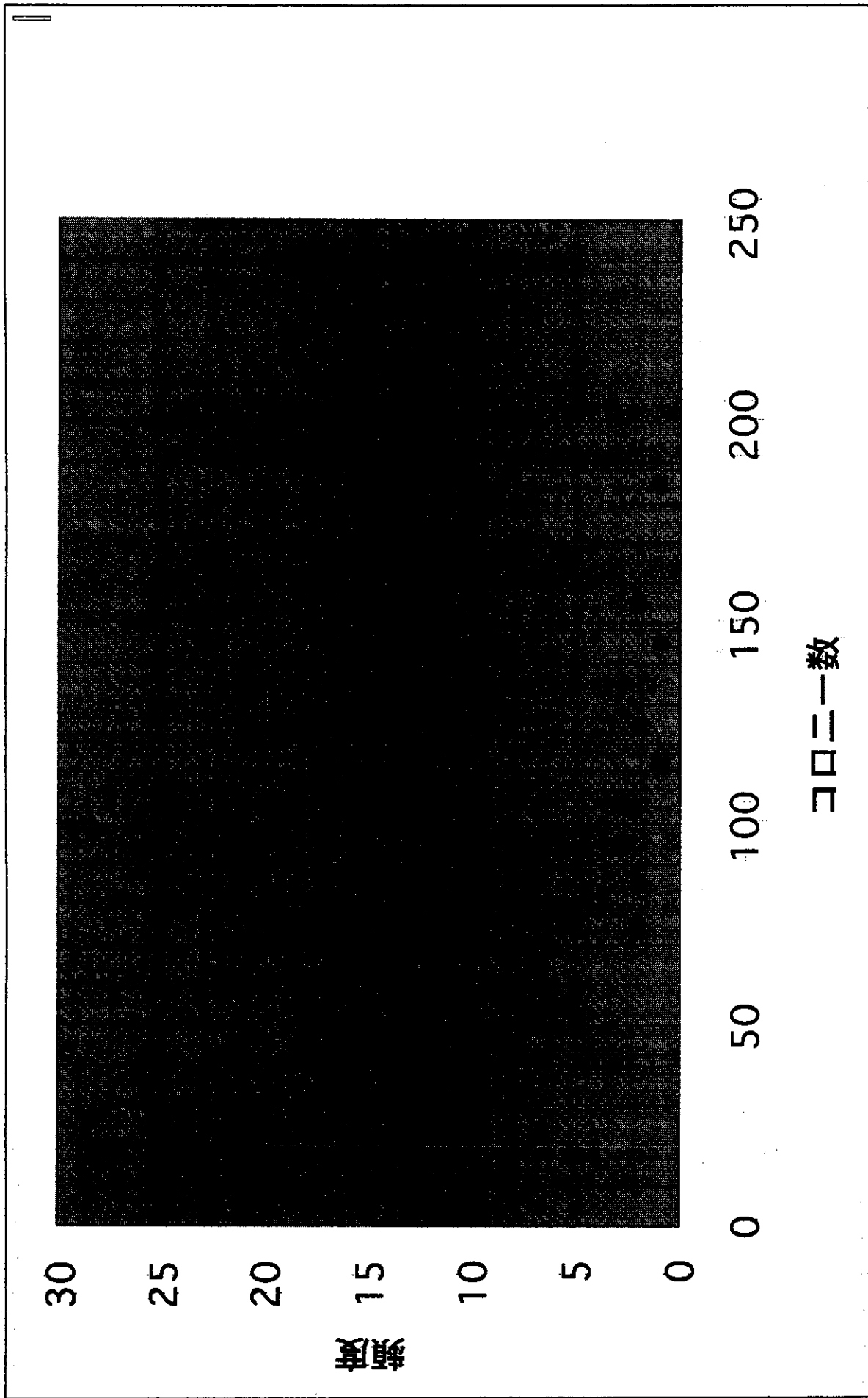


表 1

アサリからの O3:K6 腸炎ビブリオの検出

試料入手日	採取地	TCBS			Chromagar			我妻 陽性
		Direct	Beads	Dilute-beads	Direct	Beads	Dilute-beads	
10/3	A	0/1*	0/2	0/5	0/3	0/3	1/3	
	B	0/1	0/3	0/5	0/3	0/3	0/3	
	C	0/3	0/2	0/5	0/3	0/3	0/1	
10/17	A	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	2/3	
	B	0/3	0/3	1/3	0/3	1/3	3/3	
	C	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3	
	D	0/3	1/3	0/3	2/3	3/3	0/3	
10/24	A	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	
	B	1/3	0/3	0/3	1/3	2/3	3/3	
	C	0/3	1/3	0/3	1/3	1/3	0/3	
	D	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	
10/31	A	0/3	2/3	1/3	2/3	3/3	3/3	
	B	0/3	1/3	2/3	2/3	3/3	2/3	
	C	2/3	2/3	2/3	3/3	1/3	0/3	
	D	2/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	
合計		8/41	11/43	10/51	16/45	18/45	18/43	0/79**

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\* : O3K6 株 / 釣菌数

\*\* : 我妻陽性数 / 釣菌数

表2 アサリからの腸炎ビブリオの検出

試料入手日	採取地	神奈川現象陽性株		PCR 陽性 tdh*	TDH+O3K6+
		TCBS	Chromagar		
10/2	A	0/2**	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	2/2	0/2
10/16	A	0/2	0/2	2/2	0/2
	B	0/2	0/2	2/2	0/2
	C	0/2	0/2	2/2	0/2
	D	1/1	1/1	1/2	1/1
10/23	A	0/1	0/1	2/1	0/1
	B			0/2	
	C	0/2	0/2	2/2	0/2
	D	0/2	0/2	2/2	0/2
10/30	A			0/2	
	B			0/2	
	C	0/1	0/1	1/2	0/1
	D			0/2	

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\* : 増菌培養液

\*\* : 分母はサンプル数 (1ロット中)

表3 アサリからの腸炎ビブリオの検出

試料入手日	採取地	神奈川現象陽性株		TDH+O3K6+
		TCBS	Chromagar	
10/2	A	0/2**	0/2	0/2
	B	0/2	1/2	1/2
	C	0/2	0/2	0/2
10/16	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2
10/23	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2
10/30	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\*\* : 分母は試料数 (1ロット中)

表4 アサリからの腸炎ビブリオの検出

試料入手日	採取地	神奈川現象陽性株		TDH+O3K6+
		TCBS	Chromagar	
10/16	A	1/2**	0/2	1/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2
10/23	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2
10/30	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/2	0/2	0/2
	D	0/2	0/2	0/2
10/30	A	0/2	0/2	0/2
	B	0/2	0/2	0/2
	C	0/1	0/2	0/2
	D		0/2	0/2

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\*\* : 分母は試料数 (1ロット中)



表5 魚介類からの腸炎ビブリオの検出

検体	入手日	腸炎ビブリオ陽性		神奈川現象陽性	TDH+O3K6+
		TCBS	Chromagar		
アジ	9/18	1/3	1/3	0/3	
カレイ	9/18	0/3	0/3		
キス	9/18	1/3	1/3	1/3	0/3
ホウボウ	9/18	0/2	0/2		
メバル	9/18	0/2	0/2		
サザエ	9/18	1/2	1/2	1/2	0/2
アサリ A	10/17	2/2**	2/2	2/2	0/2
アサリ B	10/17	2/2	2/2	1/2	0/2
アサリ C	10/17	2/2	2/2	0/2	0/2
アサリ D	10/17	2/2	2/2	0/2	0/2
アサリ A	10/24	2/2*	2/2*	2/2	0/2
アサリ B	10/24	2/2*	2/2*	2/2	0/2
アサリ C	10/24	2/2*	2/2*	2/2	0/2
アサリ D	10/24	0/2*	0/2*		
アサリ A	10/31	2/2	2/2	2/2	0/2
アサリ B	10/31	2/2	2/2	1/2	0/2
アサリ C	10/31	2/2	2/2	2/2	0/2
アサリ D	10/31	2/2	2/2	0/2	0/2

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\* : TSB 増菌一段階

\*\* : 分母は試料数 (1 ロット中)

表6 魚介類からの腸炎ビブリオの検出

検体	入手日	腸炎ビブリオ陽性		神奈川現象陽性
		TCBS	Chromagar	
メヒカリ	9/17	3/3	0/3	0/3
ハッカク	9/17	0/2	1/2	0/2
アジ	9/17	1/3	2/3	0/3
メバル	9/17	1/2	1/2	0/2
ヒラメ	9/17	0/3	0/3	0/3
サザエ	9/17	1/1	1/1	0/2
		<u>TCBS または Chromagar</u>		
アサリ A	10/16		1/1	0/1
アサリ B	10/16		0/1	
アサリ C	10/16		1/1	0/1
アサリ D	10/16		0/1	
アサリ A	10/23		1/1	0/1

A, B, C : 国内産

D : 国外産

表7 魚介類からの腸炎ビブリオの検出

検体	入手日	腸炎ビブリオ陽性		神奈川現象陽性	TDH+O3K6+
		TCBS	Chromagar		
アサリ A	10/16	2/2**	2/2	0/2	
アサリ B	10/16	2/2	2/2	0/2	
アサリ C	10/16	2/2	2/2	1/2	0/1
アサリ D	10/16	2/2	2/2	1/2	0/1
アサリ A	10/23	1/2	2/2	0/1	
アサリ B	10/23	2/2	2/2	0/1	
アサリ C	10/23	2/2	2/2	0/1	
アサリ D	10/23	2/2	2/2		
アサリ A	10/31	2/2	2/2	2/2	0/2
アサリ B	10/31	2/2	2/2	1/2	0/1
アサリ C	10/31	1/2	2/2	0/2	
アサリ D	10/31	1/2	2/2	1/2	0/1

A, B, C : 国内産

D : 国外産

\*\* : 分母は試料数 (1 ロット中)

表8. アサリ増菌培養後 PCR 検体の TDH+O3K6 コロニー数

	入手日	PCR	TDH+O3K6	
国内産	10/2	-	0/24*	
		-	0/35	
	10/16	-	0/17	
		-	0/14	
		+	0/34	
		+	0/25	
		+	0/32	
		+	0/25	
		+	0/23	
		+	0/21	
		+	0/26	
		+	0/12	
		10/23	?	0/55
		+	0/61	
		+	0/32	
10/30	+	0/103		
国外産	10/16	+	3/20	
	10/23	+	0/112	
		+	0/82	

\*: TDH+O3K6 コロニー数 / 全腸炎ビブリオコロニー数