

平成 12 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)

研究要旨 国内 3 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、群馬それぞれ鶏肉 30、37、34 検体 (計 101 検体)、豚肉 15、18、16 検体 (計 49 検体) である。横浜、神戸検疫所由来外国産鶏肉はそれぞれ 105、80 検体 (計 185 検体) 豚肉はそれぞれ 50、36 検体 (計 86 検体) である。検査した検体の中でタイ産鶏肉 65 検体中 2 検体 (3.1%) から VanA 型高度バンコマイシン耐性 VRE が分離された。タイ国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。特にアメリカ合衆国(米国)においては 1989 年の最初の報告以来予期せぬ速さで医療環境に VRE が広がったとされている。1999 年の米国の Center for Disease Control and Prevention (CDC) の報告では、ICU における VRE

の分離率は 25.3%、MRSA の分離率は 52.3% であるが、1994 年から 1998 年の増加率は VRE 43%、MRSA 37% と VRE が急速に増加している。VRE 感染による死亡率は ICU で 23.2%、ICU 以外では 15.4% である。さらに米国の大学病院規模の病院では年間約 200~300 例の患者から VRE (VanA 型) が分離されている。腸球菌はグラム陽性菌の中で最も多剤耐性が存在することが特徴である。これらの中でも特に高度バンコマイシン耐性 (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。VREが増加した原因は欧米において異なる。米国ではバンコマイシンが医療界で長期に多量に使用されたためにVREが人腸管で選択的に増加し、医療界に広がったとされている。欧州においては、バンコマイシン類似体のアポバルシンが特にトり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耐性腸球菌(VanA型)であったことが最初に報告された。以来国内で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、アポバ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平成12年度(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て結果を報告する。

B. 材料及び方法

腸球菌分離施設；2001年1月から2月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37検体、豚肉18検体)、群馬(鶏肉34検体、豚肉16検体)、横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター(横浜)(鶏肉105検体、豚肉50検体)、神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター(神戸)(鶏肉80検体、豚肉36検体)。

用いた培地；腸球菌分離にはEnterococcosel Broth (BBL)、Bile esculin azide agar (Difco) 及び Brain Heart Infusion agar (Difco)を使用。薬剤耐性検査はミューラーヒントンS寒天培地(栄研)及び感受性ブイヨン培地(栄研)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 μ g/ml)、エリスロマイシン(Em) (12.5 μ g/ml)、ゲンタマイシン(Gm) (500 μ g/ml)、カナマイシン(Km) (1000 μ g/ml)、ストレプトマイシン(Sm) (1000 μ g/ml)、テトラサイクリン(Tc) (6 μ 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を、バンコマイシン 6.0 μ g/ml 加 Enterococcosel Broth で 48 時間

選択的増菌後、バンコマイシン 12.5 µg/ml 加 Bile esculin azide agar 選択培地にまき、得られたコロニーをバンコマイシン 6.0 µg/ml 加 Brain Heart Infusion agar 上で単集落分離を行う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°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 x100 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 185 検体のうち 2 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 2 検体はいずれもタイ産鶏肉であった。横浜検疫所におけるタイ産鶏肉 35 検体中の 2 検体である。腸球菌の菌種は *E. durans*, 及び *E. faecalis* 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 VanA 型耐性遺伝子の存在を確認した。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、及び臨床最上最も問題となる VRE は VanA 型である。今回の調査では、過去 3 年間の調査と同様 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 65 検体中 2 検体（3.1%）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ポバ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 月にアポバルシン使用を法的に禁止されたところであるが、アポバ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。平成 10 年、平成 11 年の調査ではタイ産鶏肉から検査検体当りそれぞれ 21%、12% の頻度で VRE が分離されていたが今回 VRE の分離頻度は 3.1% と低下した。現時点では断定できないがタイにおけるアポバルシン禁止により 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。

しかしながら今回の調査では横浜及び神戸検疫所での検体のふき取りに用いたガーゼが前回まで用いたいわゆる普通のガーゼとは異なり加工されたガーゼが用いられたため、前回までとは条件が異なっ

たためふき取りによる菌の採取が不十分であったり用いたガーゼに含まれる抗菌物質によって殺菌されている可能性も考えられる。

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り現在検体が由来した養鶏場を調査中である。

平成 10 年の調査では検査鶏肉当り 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平成 11 年度に続いて今回も分離されなかった。しかしながら、今回の調査においても前回の調査と同様に検査を行ったフランス産鶏肉は 8 検体(前回は 1 検体)と少なく、VRE 汚染がなくなっているか否かは解らない。豚肉について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も分離されなかった。しかしながら豚肉の総検査検体数は 86 検体で 6 カ国から輸入されたもので、その内ヨーロッパは 3 カ国 35 検体であり VRE 汚染の有無を決断するにはもう少し検体数が必要ではないかと思われる。

E. 参考文献

- 1 Bates J, Jordens JZ, Selkon JB. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993; **342**: 490-1.
- 2 Carlier C, Couvalin P. Emergence of 4', 4''-aminoglycoside nucleotidyltransferase in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 1565-9.
- 3 Clewell DB, Tomich PK, Gawron-Burke MC, Franke AE, Yagi Y, An FY. Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition of Tn917. *J Bacteriol* 1982; **152**: 1220-30.
- 4 Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993; **73**: 9-12.
- 5 Clewell DB. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. 1993; **349-67**. In Clewell DB (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N. Y.
- 6 Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 2605-9.
- 7 Clifford McDonald L, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerging Infectious Diseases* 1997; **3**: 311-7.
- 8 Dutka-Malen S, Leclercq SR, Coutant V, Doval J, Courvalin P. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive

- bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 1875-9.
- 9 Dunny GM, Brown L, Clewell DB. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 3479-83.
 - 10 Dunny GM, Leonard BAB, Hedberg PJ. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. J Bacteriol 1995; 177: 871-6.
 - 11 Evans RP, Macrina FL. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. J Bacteriol 1983; 154: 1347-55.
 - 12 Horodniceanu T, Bouanchaud D, Bieth G, Chabbert Y. R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). Antimicrob Agents Chemother 1976; 10: 795-801.
 - 13 Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerging Infectious Diseases 1998; 4: 239-49.
 - 14 Ike Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Nomura T, Fujimoto S, Tomita T. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. Lancet 1999; 353: 1854.
 - 15 Ike Y, Tanimoto K, Tomita H, Takeuchi K, Fujimoto S. Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm') (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth mating. J Bacteriol 1998; 180: 4886-92.
 - 16 Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clinical Microb Review 1994; 7: 462-78.
 - 17 Leclercq R, Deriot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988; 319: 157-61.
 - 18 Leblanc DL, Lee LN. Physical and genetic analysis of streptococcal plasmid pAM β 1 and cloning of its replication region. J Bacteriol 1984; 157: 445-53.
 - 19 Martone WJ. Spread of vancomycin resistant enterococci: why did it happen in the United States? Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19: 539-45.
 - 20 Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1588-91.
 - 21 Schouten MA, Voss A, Hoogkampkorstanje JAA. VRE and meat. Lancet 1997; 349: 1258.
 - 22 Schaberg DR, Zervos MJ. Intergenic and interspecies gene exchange in gram-

- positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**: 817-22.
- 23 Tomich PK, An FY, Clewell DB. Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1980; **141**: 1366-74.
- 24 Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; **i** :57-8.
- (Letter.)
- 25 van den Bogaard AE, Jensen LB, Stobberingh EE. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *N Engl J Med* 1997; **337**: 1558-9.
- 26 Witte W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 1998; **279**: 996-7.

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)		VRE 株数 (分離頻度%)
					Vancomycin	Teicoplanin	
タイ	横浜	35	CT11	<i>E. durans</i>	512	0.5	
			CT29	<i>E. faecalis</i>	256	4	
	神戸	30					
		65					2/65 (3.1)
フランス	横浜	7					
	神戸	1					
		8					0
ブラジル	横浜	10					
	神戸	8					
		18					0
アメリカ 合衆国	横浜	12					
	神戸	7					
		19					0
中国	横浜	41					
	神戸	34					
		75					0
日本	鹿児島	30					
	宮崎	37					
	群馬	34					
		101					0

表 2 豚肉検体数

国名	検体取扱い 検疫所	検体件数	type A VRE が分離され た検体番号
		合計	
フランス	横浜	5	0
	神戸	3	0
		8	0
アメリカ 合衆国	横浜	18	0
	神戸	12	0
		30	0
メキシコ	横浜	7	0
	神戸	3	0
		10	0
デンマーク	横浜	11	0
	神戸	10	0
		21	0
オランダ	横浜	3	0
	神戸	3	0
		6	0
カナダ	横浜	6	0
	神戸	5	0
		11	0
日本	鹿児島	15	0
	宮崎	18	0
	群馬	16	0
		49	0

分担研究報告書

平成12年度厚生科学研究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

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）

細呂木志保（富山県衛生研究所）

仲西寿男（神戸市環境保健研究所）

研究要旨

今年度は市場で使用している海水や処理水について、腸炎ビブリオ汚染状況の把握、さらに耐熱性溶血毒（TDH）産生菌の汚染実態を調査した。調査期間は水温の低い時期も含めて、7月から11月および1月の6か月間とした。

検体は、厚生労働省から依頼を受けた全国26機関によって採水された市場活魚水槽水、処理水等である。これらの26機関で採取され、宅急便で輸送されてきた検体を研究協力機関において検査した。

検査方法は、検体10mlを2倍濃度のアルカリペプトン水（APW）3本に、また1mlおよび0.1mlをそれぞれAPW3本ずつに接種し、MPN法で菌数を求めた。また、検体1,000mlをメンブランフィルターで濾過し、このフィルターをAPW100mlに接種し、37℃で18-24時間培養後、PCR法でTDH遺伝子の存在を調べ、陽性の場合には引き続いて免疫磁気ビーズ法と神奈川現象培地（我妻培地）を組み合わせた方法で、TDH産生病原菌株の検出を試みた。

殆どの市場使用海水から腸炎ビブリオが検出（ $3 \cdot 10^5/100\text{ml}$ ）され、特に7月から10月は汚染率、菌数ともに高かった。なお、無処理の海水は浄化処理海水よりも汚染菌数が高く、殺菌処理海水ではその殆どが腸炎ビブリオのMPN値は3.0以下/100mlであった。

海水1,000mlの培養液についてPCR法でTDH遺伝子の検出を試みたところ、272検体中83件（30.5%）が陽性を示したが、これらの陽性検体からTDH産生性腸炎ビブリオが分離されたのは6株（血清型O3:K6-2株、O4:K11-2株、O1:K1-1株、O11:K22-1株）のみであった。このようにPCR法によるTDH遺伝子保有株のスクリーニングで陽性反応が認められたのにも拘わらず、TDH陽性菌株が分離されないことが多くみられ、今後この原因の解明が急がれる。

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 市場で使用している海水の腸炎ビブリオ汚染実態を調査し、腸炎ビブリオの汚染菌量を MPN 3 本法で測定した。無処理の海水中の菌量は $10^3 \sim 10^5$ MPN/100ml を示した検体が 37.8%、浄化処理海水では、 $10 \sim 10^2$ MPN/100ml の検体が 42.9%、殺菌処理海水では <3.0 MPN/100ml の検体が 91.7% を占め、腸炎ビブリオの菌量増加抑制に殺菌処理効果の有効性が示唆された。

検体の増菌培養液 22 検体から *tdh* が検出され、*tdh* 陽性培養液のうち 1 検体から O1:K1 (*tdh*、*trh* 陽性) 1 株、O4:K11 (*tdh* 陽性) 2 株の神奈川現象陽性菌を分離した。しかし、K6 磁気ビーズ処理による O3:K6 菌は検出できなかった。また、増菌培養液からの *tdh* の検出と腸炎ビブリオの菌量との間に相関は認められなかった。*trh* 陽性培養液 2 検体から O4:KUT の *trh* 陽性腸炎ビブリオを検出した。

A. 研究目的

前年度の腸炎ビブリオ汚染実態調査研究において、海水、海泥、魚類等における腸炎ビブリオの汚染実態を調査するとともに、増菌培地の検討を行った。さらに本研究を補強するために、市場で使用している海水の腸炎ビブリオ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広範な流行が継続している血清型 O3:K6 型菌の汚染状況も併せて調査し、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 調査試料

試料は市場使用水とし、せり場使用水、活魚水槽水および活魚輸送用水等の市場で使用されている海水で、無処理の海水 45 検体、砂濾過後、PAC 凝集、再度砂濾過の浄化処理を行った海水 7 検体、塩素または紫外線による殺菌処理を行った海水

12 検体、浄化処理したのち活魚を飼育していない海水 5 検体の計 69 検体について調査を行った。

2000 年 7 月～11 月および 2001 年 1 月までの期間に、協力 8 機関が毎月 1 回、各市場使用水を 2,000ml 採取し、採取翌日午前中にクール宅急便にて当所に搬入された試料を供試した。

2 調査方法

1) 定量培養

市場使用水の定量培養検査には、アルカリペプトン水を増菌培地に用いて MPN3 本法で行った。試料は 10^{-5} まで PBS で段階希釈し、10ml からの 7 系列とした。試料 10ml は 2 倍濃度の増菌培地 10ml 各 3 本に、試料 1ml および $10^{-1} \sim 10^{-5}$ の希釈試料は増菌培地 10ml 各 3 本にそれぞれ 1ml ずつ接種し、37 °C 18 時間培養した。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。

2) *tdh*、*trh* 陽性腸炎ビブリオの検索

孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターで試料 1,000ml を吸引濾過したフィルターをアルカリペプトン水 100ml で 37 °C 18 時間培養し、その増菌培養液から PCR 法により *tdh*、*trh* を検索した。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、テンプレート DNA 量 10 μ l、プライマーに TDF-1、TDF-2 を用いて所定の条件で PCR を行った。

tdh、*trh* の両方あるいはいずれか一方の遺伝子が検出された増菌培養液 1ml を、食塩ポリミキシンブイオン 10ml に接種して 37 °C 18 時間培養後、さらに食塩ポリミキシンブイオン 10ml にその培養液 0.5ml を接種し 37 °C 6 時間、腸炎ビブリオの純化を目的に培養した。その後、一培養液あたり TCBS 寒天培地 5 枚で分離培養を行い腸炎ビブリオと思われる単独集落について、培養液で *tdh* が検出された平板の集落は我妻培地（自家製）に、*trh* が検出された平板の集落は尿素培地にそれぞれ移植し、*tdh*、*trh* 保有株を検索した。溶血を認めた菌株や尿素分解陽性菌株は、生化学的性状試験を行うとともに PCR 法で *tdh*、*trh* の保有を確認したのち血清型別を行った。

3) 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 K6 の濃縮用磁気ビーズ（デンカ生研）により O3:K6 の分離を行った。

C. 研究結果

1) 腸炎ビブリオの定量結果

市場使用水として無処理の海水、砂濾過後、PAC 凝集、再度砂濾過による浄化処理の海水および塩素あるいは紫外線による殺菌処理の海水とに区分して、月別および海水由来地別にみた腸炎ビブリオの菌量 (MPN/100ml) と検体数は以下のとおりであった。

無処理の海水の 7 月 (7 検体) では <3.0 ~ 3.6

(3 検体)、36 ~ 290 (2 検体)、4,300 ~ 46,000 (2 検体)、8 月 (8 検体) では <3.0 (2 検体)、2,000 ~ 16,000 (6 検体)、9 月 (8 検体) では 7.2 ~ 7.3 (2 検体)、72 ~ 430 (3 検体)、9,300 ~ 93,000 (3 検体)、10 月 (8 検体) では <3.0 ~ 3.6 (2 検体)、61 (1 検体)、930 (1 検体)、24,000 ~ 150,000 (4 検体)、11 月 (8 検体) では <3.0 (4 検体)、360 ~ 750 (2 検体)、1,500 ~ 93,000 (2 検体)、1 月 (6 検体) では <3.0 (4 検体)、21 ~ 240 (2 検体) で、8 月 ~ 10 月に高い MPN 値を示す検体が多くみられた。

浄化あるいは殺菌処理の海水の 7 月 (4 検体) では <3.0 (3 検体)、36 (1 検体)、8 月 (3 検体) では <3.0 ~ 7.3 (3 検体)、9 月 (3 検体) では <3.0 ~ 3.6 (2 検体)、460 (1 検体)、10 月 (3 検体) では <3.0 (2 検体)、730 (1 検体)、11 月 (3 検体) では <3.0 (3 検体)、1 月 (3 検体) では <3.0 ~ 3.6 (3 検体) で、浄化処理の海水（神奈川県由来）が 9 月、10 月に 10²/100ml 台の高い MPN 値を示したが、殺菌処理の海水（宮城県、神奈川県由来）は 9 月に 3.6 を示した他はすべて <3.0 であった。

砂濾過後、PAC 凝集、再度砂濾過の浄化処理を行い、活魚を飼育する前の処理水の MPN 値は、8 月と 9 月にそれぞれ 3.0、62 を示し、10 月、11 月、1 月には <3.0 であった。この処理水を使用して活魚を飼育した水槽水の MPN 値は、8 月 7.3、9 月 460、10 月 730、11 月 <3.0、1 月 3.6 であった。

2) *tdh*、*trh* 陽性腸炎ビブリオの検索結果

PCR 法による *tdh* 検出検体は、7 月 3 検体、8 月 5 検体、9 月 10 検体、10 月 2 検体、11 月 2 検体の計 22 検体であった。このうち TCBS 寒天培地で分離培養を行い、我妻培地で神奈川県現象陽性菌を分離できた検体は、7 月の 1 検体由来の 3 株のみで、血清型は O1:K1 (*tdh*、*trh* 陽性) 1 株、O4:K11 (*tdh* 陽性) 2 株であった。これら 3 株は RPLA で TDH 産生が確認された。その他の 21 検体からは神奈川県現象陽性菌を分離することはできなかったが、分離された腸炎ビブリオの血清型の主なものは、O1:KUT、O4:K12、O4:KUT、O5:K17、

O5:K30、O5:KUT、OUT 等で、いずれも *tdh* を保有しない神奈川現象陰性菌であった。

trh 検出検体は、7月2検体、10月1検体、11月2検体の計5検体で、TCBS 寒天培地上の集落を尿素培地に移植し、尿素加水分解を指標として検索した結果、11月の2検体から *trh* 陽性腸炎ビブリオを検出した。その血清型はいずれも OUT:KUT で型別不能株であった。

3) 磁気ビーズによる腸炎ビブリオ O3:K6 の検索結果

所定の方法により 22 検体の *tdh* 陽性培養液から K6 磁気ビーズ処理を行い、O3:K6 菌の検索を行ったが、いずれの検体からも当該菌は検出されなかった。

D. 考察

(1) 市場使用水の腸炎ビブリオ汚染菌量

無処理の海水 45 検体の腸炎ビブリオの菌量 (MPN/100ml) は、 <3.0 が 12 検体 (26.7%)、 $3 \sim <10$ が 5 検体 (11.1%)、 $10 \sim 10^2$ が 11 検体 (24.4%)、 $10^3 \sim 10^5$ が 17 検体 (37.8%) を占めた。

浄化処理の海水 7 検体では、 <3.0 が 2 検体 (28.6%)、 $3 \sim <10$ が 2 検体 (28.6%)、 $10 \sim 10^2$ が 3 検体 (42.9%) であった。

殺菌処理の海水 12 検体では、 <3.0 が 11 検体 (91.7%)、 $3 \sim <10$ が 1 検体 (8.3%) であった。

無処理の海水では MPN 値が $10^3 \sim 10^5$ を示した検体が 37.8% に認められたが、浄化処理を行った海水では多くても 10^2 台、殺菌処理海水では <3.0 の検体が 91.7% と MPN 値の顕著な上昇はみられなかったことから、市場使用水の浄化あるいは殺菌処理は、腸炎ビブリオの菌量増加抑制に有効な手段と思われた。特に、殺菌処理はその効果が顕著であることが示唆された。

活魚を飼育しない浄化処理海水の MPN 値は低値であったが、その処理水で活魚を飼育することにより MPN 値の上昇が認められたことは、魚類の腸炎ビブリオ汚染を裏付ける結果であった。

各海水由来地別にみると、神奈川県 (相模湾)、

千葉県 (東京湾) 由来の海水に高い MPN 値を示す傾向が認められ、これら海域水の腸炎ビブリオ汚染が著しいことが推察された。

(2) *tdh*、*trh* 陽性腸炎ビブリオと磁気ビーズによる O3:K6 の検索

増菌培養液における *tdh* 陽性検体の 81.8% (18/22 検体) が 7月～9月に検出され、腸炎ビブリオの食中毒多発時期と符合していたが、*tdh* の検出と腸炎ビブリオの汚染菌量 (MPN 値) との間に相関は認められなかった。今回の調査において、神奈川現象陽性菌を分離できたのは 1 検体のみで、その血清型は O1:K1 および O4:K11 であった。*tdh* を保有していない腸炎ビブリオの O 群は O1、O4、O5、OUT で、前年度調査における海水由来株から多く分離された O 群と同様な傾向を示した。

同様の *trh* 陽性検体は、検出傾向に *tdh* 陽性検体のような時期的な偏りはみられなかった。また、陽性検体数も 5 検体のみで、*trh* 陽性菌の汚染は *tdh* 陽性菌に比べて少なく、2 検体から *trh* 陽性腸炎ビブリオを検出したが、その血清型はいずれも OUT:KUT であった。

K6 磁気ビーズで O3:K6 菌が検出されなかったが、培養条件、分離培地、K6 ビーズの感度、特異性等の諸条件の検討が必要と思われた。

E. 結論

市場使用水の腸炎ビブリオ汚染菌量 (MPN 値) は、無処理の海水では $10^3 \sim 10^5$ /100ml を示した検体が 17 検体 (37.8%) に認められた。浄化処理を行った海水では、 $10 \sim 10^2$ /100ml の検体が 3 検体 (42.9%) にみられ、殺菌処理海水では <3.0 /100ml が 11 検体 (91.7%) を占め腸炎ビブリオの菌量増加抑制に殺菌処理効果の有効性が示唆された。

活魚を浄化処理海水で飼育することにより MPN 値の上昇がみられたことから、魚類の腸炎ビブリオ汚染が裏付けられた。

相模湾、東京湾由来の海水に腸炎ビブリオ汚染が高い傾向が認められた。

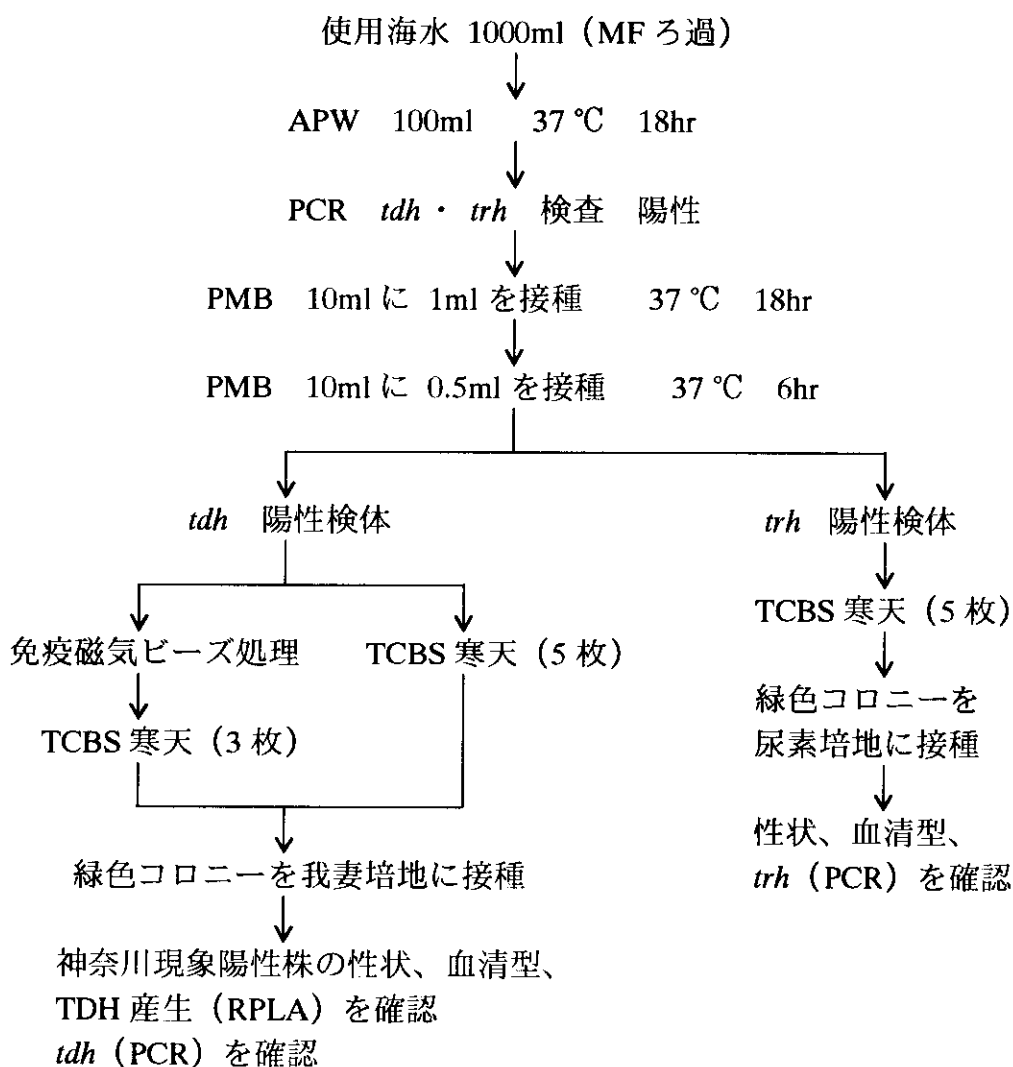
増菌培養液 22 検体から *tdh* が検出され、*tdh* 陽性培養液のうち 1 検体から O1:K1 (*tdh*、*trh* 陽性) 1 株、O4:K11 (*tdh* 陽性) 2 株の神奈川現象陽性菌を分離した。しかし、K6 磁気ビーズ処理による O3:K6 菌は、*tdh* 陽性培養液のいずれの検体からも検出されず、諸条件の検討が必要であった。また、増菌培養液からの *tdh* の検出とその検体の腸炎ビブリオ MPN 値との間に相関は認められなかった。*trh* 陽性培養液 5 検体のうち 2 検体から

OUT:KUT の *trh* 陽性腸炎ビブリオを検出した。

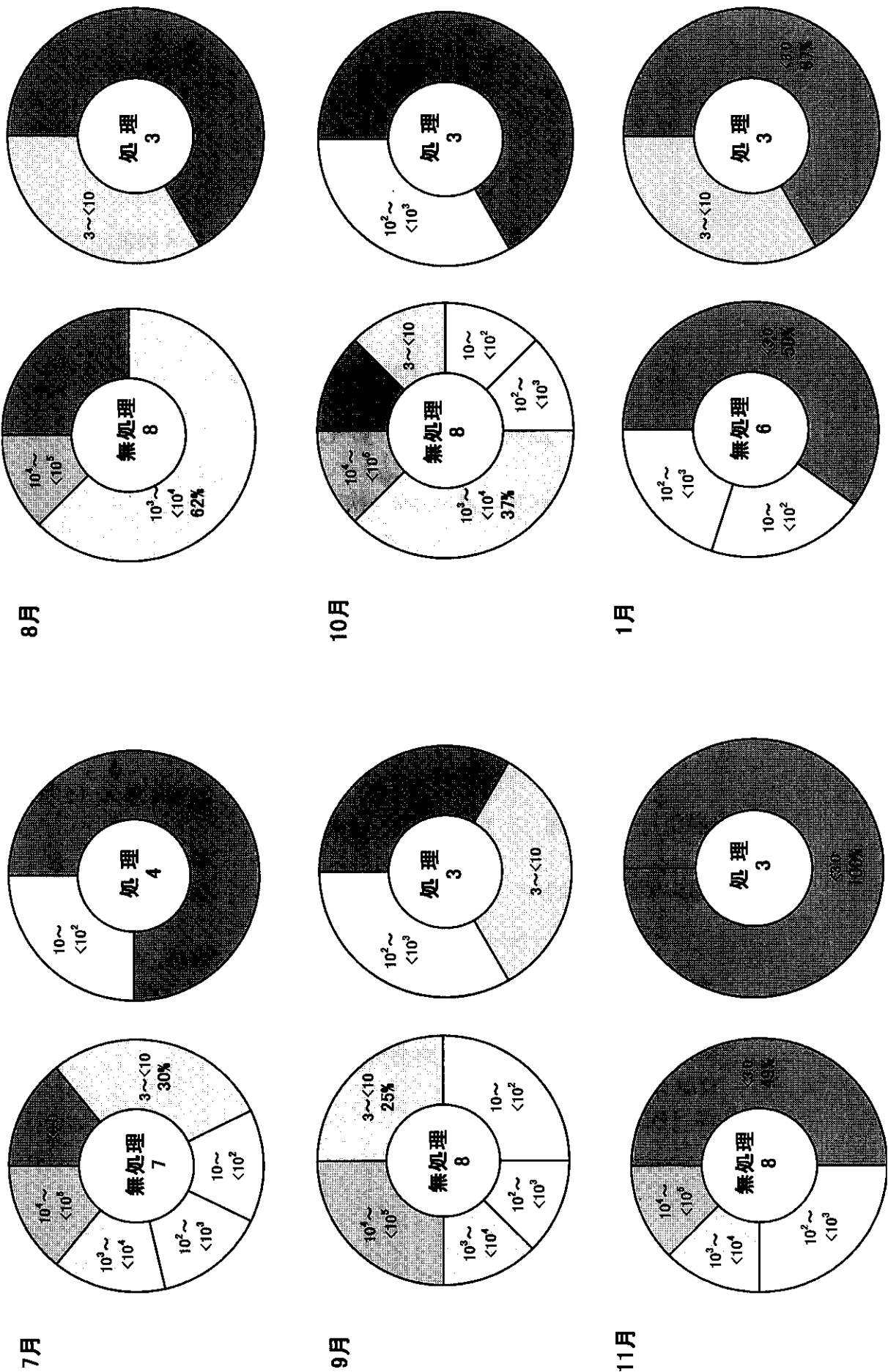
研究協力者

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

市場使用海水からの TDH、TRH 産生腸炎ビブリオの検出方法



市場使用水の月別、処理場別、由来地別の腸炎ビブリオMPN値の分布



第1回採水分(7月)

自治体名	岩手県	宮城県	宇都宮市	茨城県	茨城県	千葉市	千葉市	千葉市	神奈川県	神奈川県	神奈川県	静岡県	川崎市	川崎市
市場名	釜石漁連 地方卸売 市場	塩釜市 魚市場	宇都宮市 中央卸売 市場	水戸市公設 地方卸売 市場	水戸市公設 地方卸売 市場	千葉市中央 卸売市場	千葉市中央 卸売市場	千葉市中央 卸売市場	神奈川県 小田原市 公設水産 地方卸売 市場	神奈川県 横浜市中央 卸売市場 南部市場	神奈川県 横浜市中央 卸売市場 北部市場	静岡県 川崎市中央 卸売市場 北部市場	川崎市 川崎市中央 卸売市場 北部市場	川崎市
採水場所	セリ場 使用水	セリ場 使用水	トラック 輸送車	セリ場 活魚水槽	市場内 ポリタンク	トラック輸送	トラック輸送	トラック輸送	使用水蛇口	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽
海水の由来														
県名	岩手県	宮城県	神奈川県	茨城県	神奈川県	千葉県	千葉県	千葉県	神奈川県	神奈川県	神奈川県	静岡県	神奈川県	神奈川県
海域	釜石湾	松島湾	相模湾	大洗	三崎	東京湾	太平洋	東京湾	相模湾	相模湾	根岸湾	網代	神奈川県	佐島
海水の処理内容														
殺菌処理 (方法)	無	有 塩素	無	無	無	無	無	無	有 紫外線	無	有 砂ろ過 PAC凝集	無	無	無
浄化処理 (方法)	無	有	無	有 ろ過	無	無	無	無	無	無	無	無	無	無
採水月日	7月10日	7月10日	7月9日	7月10日	7月10日	7月9日	7月9日	7月9日	7月10日	7月10日	7月10日	7月10日	7月10日	7月10日
検査月日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日	7月11日
海水温度(°C)	16.0	19.0	18.5	16.0	20.0	6.0	11.0	23.0	16.0	16.6	18.6			
残留塩素(ppm)		0.1												
結果														
MPN/100ml	<3.0	<3.0	46,000	<3.0	290	3.6	36	<3.0	36	3.6	4,300			
1L培養液PCR (tdh, trh)	検出せず	検出せず	tdh(+)	trh(+)	tdh(+)	検出せず	検出せず	trh(+)	検出せず	検出せず	tdh(+)	検出せず	tdh(+)	検出せず
tdh, trh 陽性 腸炎びブリオの 血清型			O1:K1 (tdh, trh) O4:K11 (tdh)	検出せず	検出せず			検出せず	検出せず					検出せず

第3回採水分(9月)

自治体名	岩手県	宮城県	宇都宮市	茨城県	茨城県	千葉市	千葉市	神奈川県	横浜市	川崎市	川崎市	川崎市	横浜市
市場名	釜石漁連 地方卸売 市場	塩釜市 魚市場	宇都宮市 中央卸売 市場	水戸市公設 地方卸売 市場	水戸市公設 地方卸売 市場	千葉市中央 卸売市場	千葉市中央 卸売市場	小田原市 公設水産 地方卸売 市場	横浜市中央 卸売市場 南部市場	川崎市中央 卸売市場 北部市場	川崎市中央 卸売市場 北部市場	川崎市中央 卸売市場 北部市場	横浜市中央 卸売市場 南部市場
採水場所	セリ場 使用水	セリ場 使用水	トラック 輸送車	海水輸送用 ポリタンク	市場内 ポリタンク	セリ場 活魚水槽	トラック輸送	使用水蛇口	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	セリ場 活魚水槽	ろ過処理水
海水の由来													
県名	岩手県	宮城県	神奈川県	茨城県	神奈川県	千葉県	千葉県	神奈川県	神奈川県	神奈川県	神奈川県	神奈川県	静岡県
海域	釜石湾	松島湾	相模湾	久慈浜港	三崎	東京湾	東京湾	相模湾	根岸湾	佐島	佐島	佐島	網代
海水の処理内容													
殺菌処理 (方法)	無	有 塩素	無	無	無	無	無	有 紫外線	無	無	無	無	無
浄化処理 (方法)	無	有	無	無	無	無	無	無	有 砂ろ過 PAC凝集	無	無	無	有 砂ろ過 PAC凝集
採水月日	9月4日	9月18日	9月4日	9月4日	9月4日	9月3日	9月3日	9月4日	9月4日	9月4日	9月4日	9月4日	9月4日
検査月日	9月5日	9月19日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日	9月5日
海水温度(°C)	20.9	23.7	18.0	15.0	20.5	1.0	19.0	25.7	16.0	17.1	16.9	16.9	25.0
残留塩素(ppm)		0											
結果													
MPN/100ml	7.2	<3.0	15,000	73	9,300	430	72	3.6	460	7.3	93,000	62	
1L培養液PCR (tdh、trh)	tdh(+)	検出せず	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)	検出せず	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)	tdh(+)
tdh、trh陽性 腸炎ビブリオの 血清型	検出せず		検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず		検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

