

表5 魚介類からの耐熱性溶血毒（TDH）産生性腸炎ビブリオ分離調査

No.	採取日	検体名（貝は殻付きで生き物、ウニは剥き身）	産地	平均気温 （℃）	海水温 （℃）	降水量 （mm）	捕獲日	定性の増菌培養別PCR			t d h + 時のMPN3本法	
								PCR1	PCR2	定性3次増菌PCR3	t d h + 時のMPN/10g	総菌数MPN/10g
1	01.6.12	ホタテガイ	A沖	12.9	13.8	0.5	01.6.12	-	・	・	・	・
2	01.6.12	ホタテガイ	A沖	12.9	13.8	0.5	01.6.12	-	・	・	・	・
3	01.6.12	アワビ	B沖	12.9	13.8	0.5	01.6.12	-	・	・	・	・
4	01.6.12	ウニ	C沖	12.9	13.8	0.5	01.6.12	-	・	・	・	・
5	01.6.12	ウニ	C沖	12.9	13.8	0.5	01.6.11	-	・	・	・	・
6	01.7.23	ホタテガイ	C沖	27.5	21.6	0.5	01.7.23	-	・	・	・	・
7	01.7.23	ホタテガイ	C沖	27.5	21.6	0.5	01.7.23	-	・	・	・	・
8	01.7.23	アワビ	B沖	27.5	21.6	0.5	01.7.22	-	・	・	・	・
9	01.7.23	サザエ	B沖	27.5	21.6	0.5	01.7.22	-	・	・	・	・
10	01.7.23	ウニ	C沖	27.5	21.6	0.5	01.7.22	-	・	・	・	・
11	01.7.30	ホタテガイ	C沖	23.8	21.2	41.5	01.7.23	-	-	-	・	・
12	01.8.29	ホタテガイ	C沖	21.0	20.9	1.0	01.8.29	-	-	-	・	・
13	01.8.29	ホタテガイ	C沖	21.0	20.9	1.0	01.8.29	-	-	-	・	・
14	01.8.29	ホタテガイ	C沖	21.0	20.9	1.0	01.8.29	-	-	-	・	・
15	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	<3
16	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
17	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
18	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
19	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
20	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
21	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・
22	01.9.10	ホタテガイ	C沖	23.0	21.0	5.0	01.9.10	-	-	-	・	・

	01.9.11	台風15号	C沖	19.4	21.3	74.0						
	01.9.12	台風15号	C沖	18.6	21.0	14.0						
23	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
24	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
25	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
26	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
27	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
28	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
29	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
30	01.9.13	ホタテガイ	C沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
31	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
32	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
33	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
34	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
35	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
36	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
37	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
38	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
39	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
40	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
41	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
42	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
43	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
44	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・
45	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	380
46	01.9.13	アワビ (小)	B沖	19.5	20.9	0.0 01.9.13	・	—	—	—	・	・

表 6

検査 番号	検体種類 アサリ、ア ジ、アオヤ ギ	検体採取（入手）日 yy/mm/dd	海水温	Vp (MPN) MPN/g	tdh(+) 定性、MPN/g (PCR)	T D H (+) 国検出 O3: K6, 神奈川現 象陽性の分離株数/供 試株数	
1	アサリ	2001.6.25	20.2℃	240	(-)	・	
2	アサリ	2001.6.25	20.2℃	15000	(-)	・	
3	アサリ	2001.6.25	20.2℃	4600	(+)、<0.3	(-)	
4	アジ	2001.6.25	不明	0.36	(-)	・	
5	アジ	2001.6.25	不明	<0.3	(-)	・	
6	アサリ	2001.7.16	28.6℃	430	(+)、0.91	(-)	
7	アサリ	2001.7.16	28.6℃	290	(-)	・	
8	アサリ	2001.7.16	28.6℃	430	(+)、9.3	(+)、4株/31株中	MPN10m I T D H + 国検出
9	アジ	2001.7.16	不明	2.3	(-)	・	
10	アジ	2001.7.16	不明	3.9	(-)	・	
11	アオヤギ	2001.7.17	不明	2.3	(-)	・	
12	アオヤギ	2001.7.17	不明	3.6	(-)	・	
13	アオヤギ	2001.7.17	不明	(-)	(-)	・	
14	アオヤギ	2001.7.17	不明	0.36	(-)	・	
15	アオヤギ	2001.8.7	25.5℃	0.73	(-)	・	
16	アオヤギ	2001.8.7	26.5℃	0.3	(-)	・	
17	アオヤギ	2001.8.7	23.7℃	46	(+)、<0.3	(+)、7株/35株中	
18	アオヤギ	2001.8.7	23.8℃	9.3	(+)、0.91	(-)	
19	アオヤギ	2001.8.7	23.8℃	12	(+)、0.36	(-)	
20	アオヤギ	2001.8.7	不明	(-)	(-)	・	
21	アサリ	2001.8.20	27.2℃	15	(+)、<0.3	(-)	
22	アサリ	2001.8.20	27.2℃	2400	(+)、<0.3	(-)	
23	アサリ	2001.8.20	27.2℃	110	(-)	・	
24	アジ	2001.8.20	不明	<0.3	(-)	・	
25	アジ	2001.8.20	不明	9.1	(-)	・	
26	アサリ	2001.9.17	25.8℃	9300	(-)	・	
27	アサリ	2001.9.17	25.8℃	150	(-)	・	
28	アサリ	2001.9.17	25.8℃	93000	(-)	・	
29	アジ	2001.9.17	不明	20	(-)	・	
30	アジ	2001.9.17	不明	9.3	(-)	・	

検査	検体種類	検体採取 (入手) 日	海水温	Vp (MPN)	tdh(+)	T D H (+) 菌検出
	アサリ、ア ジ、アオヤ ギ	yy/mm/dd		MPN/g	定性、MPN/g (PCR)	O3 : K6, 神奈川現 在菌性の分離株数/供 試株数
31	アオヤギ	2001.9.18	24℃	24	(-)	・
32	アオヤギ	2001.9.18	23.8℃	0.91	(-)	・
33	アオヤギ	2001.9.18	24.4℃	24	(-)	・
34	アオヤギ	2001.9.18	24.4℃	240	(-)	・
35	アオヤギ	2001.9.18	24.3℃	2400	(+)、<0.3	(-)
36	アオヤギ	2001.10.2	不明	(-)	(-)	・
37	アオヤギ	2001.10.2	不明	0.91	(-)	・
38	アオヤギ	2001.10.2	不明	0.73	(-)	・
39	アオヤギ	2001.10.2	不明	0.73	(-)	・
40	アサリ	2001.10.22	22.1℃	1.1	(-)	・
41	アサリ	2001.10.22	22.1℃	7.5	(-)	・
42	アサリ	2001.10.22	22.1℃	0.91	(-)	・
43	アジ	2001.10.22	不明	(-)	(-)	・
44	アジ	2001.10.22	不明	(-)	(-)	・

表 7

検体 No.	採取日	直接 (+/-)	分離2℃-3℃ (+/-)	培養培地 (+/-)	PCR2	MPN(/10g)		Vp+株数/約菌数	
				TCBS→ CHROM→	合計	TCBS	CHROM	TCBS	CHROM
1	6.22	(0/10)	NT	(0/10)	(0/30)	15	NT	3/5	1/5
2	6.22	(0/10)	NT	(0/10)	(0/30)	9	NT	1/5	4/5
3	6.22	(0/10)	NT	(0/10)	(0/30)	930	NT	4/5	3/5
4	6.22	(0/10)	NT	(0/10)	(0/30)	290	NT	3/5	2/5
5	6.22	(0/10)	NT	(0/10)	(0/30)	<3	NT	1/5	3/5
6	7.16	(0/9)	(0/8)	NT	(0/17)	7	NT	2/10	5/7
7	7.16	(0/2)	(0/4)	NT	(0/6)	-	NT	0/6	0/0
8	7.16	(0/0)	(0/6)	NT	(0/6)	-	NT	0/4	0/2
9	7.16	(0/3)	(0/7)	NT	(0/10)	-	NT	0/10	0/0
10	7.25	(0/4)	(0/5)	NT	(0/9)	<3	<3	1/3	7/10
11	7.25	(0/8)	(0/2)	NT	(0/106)	9	4	5/5	5/7
12	7.25	(0/8)	(0/9)	NT	(0/93)	9	460	7/10	10/10
13	7.25	(0/10)	(0/5)	NT	(0/39)	7	43	5/7	10/10
14	7.25	(0/10)	(0/8)	NT	(0/54)	15	21	8/10	10/10
15	8.6	(0/18)	NT	(0/6)	(0/42)	4	4	8/10	10/10
16	8.6	(0/14)	NT	(0/4)	(0/38)	6	6	7/7	7/7
17	8.6	(0/18)	NT	(0/24)	(0/66)	460	240	9/10	9/10
18	8.6	(0/18)	NT	(0/24)	(0/66)	150	150	9/10	9/10
19	8.6	(0/19)	NT	(0/23)	(0/65)	21	93	9/10	10/10
合計		(0/191)	(0/54)	(0/131)	(0/767)	82/137	105/128	59.9%	82.0%

備考) NTは検査未実施。PCR2のwは薄いバンドが認められた。

検体 No.	血清型 (株数)
1	O11:KUT(1), OUT:K17(1), OUT:KUT(2)
2	OUT:K22(2), OUT:KUT(3)
3	O5:KUT(5), OUT:KUT(2)
4	O2:K28(2), OUT:KUT(3)
5	O3:KUT(3), O10:KUT(1)
6	OUT:K22(1), OUT:KUT(6)
7	Vp-
8	Vp-
9	Vp-
10	O2KUT(1), OUT:KUT(7), V.vulnificus(1)
11	O4:K42(3), OUT:KUT(5)
12	O2:K28(1), O9:KUT(1), OUT:K17(1), OUT:KUT(10)
13	O2:K28(6), O2:KUT(1), O4:K42(1), OUT:K28(1), OUT:K47(1), OUT:KUT(5)
14	O1:KUT(1), OUT:K37(1), OUT:KUT(11)
15	O3:KUT(1), O5:K17(6), O8:KUT(1), OUT:K17(10)
16	O2:K28(1), O2:KUT(1), O5:K30(5), OUT:K28(2), OUT:KUT(5)
17	O4:K12(1), OUT:K5(1), OUT:K28(7), OUT:KUT(9)
18	O2:K28(1), O3:KUT(1), O4:KUT(1), O8:KUT(1), O10KUT(4), OUT:K8(1), OUT:K17(2), OUT:KUT(7)
19	O2:KUT(1), O3:KUT(1), O5:K17(1), O5:KUT(3), OUT:KUT(13)
総計	O1:KUT(1), O2:K28(11), O2:KUT(4), O3:KUT(6), O4:K12(1), O4:K42(4), O4:KUT(1), O5:K17(7), O5:K30(5), O5:KUT(8), O8:KUT(2), O9:KUT(1), O10:KUT(5), O11:KUT(1), OUT:K5(1), OUT:K8(1), OUT:K17(14), OUT:K22(3), OUT:K28(10), OUT:K37(1), OUT:K47(1), OUT:KUT(88), V.v(1)

表 8

採取年月日	NO	検体名	PCR 1	PCR 2	分離 2	Vp(TDH+)	MPN (/10g)	tdh-MPN
2005.10.16	1	サザエ	-	-	+	-	26	ND
	2	アサリ	+	+	+	-	930	15
	3	アサリ	-	-	+	-	930	ND
	4	サザエ	-	-	+	-	<3	ND
	5	まで貝	-	-	+	-	43	ND
	6	いも貝	-	-	+	-	240	ND
2005.10.23	7	生カキ (ムキ)	-	-	-	-	<3	ND
	8	サザエ	-	-	-	-	<3	ND
	9	カキ	-	-	+	-	460	ND
	10	サザエ	-	-	+	-	23	ND
	11	アサリ	-	-	+	-	3.6	ND
	12	サザエ	+	+	+	-	750	15
	13	ハマグリ	-	-	+	-	23	ND
	14	サザエ	-	-	+	-	93	ND

2005.10.30	15	トコブシ	+	+	+	-	7500	< 3
	16	シジミ	-	-	+	-	110000	ND
	17	アサリ	-	-	+	-	1100	ND
	18	タイラギ	-	-	+	-	24000	ND
	19	シジミ	-	-	+	-	3.6	ND
	20	ハマグリ	-	-	+	-	7.3	ND

表9 全腸炎ビブリオ MPN/g と tdh 腸炎ビブリオ MPN/g

品名	全腸炎ビブリオ MPN/g	tdh 腸炎ビブリオ MPN/g	比
あおやぎ	110	< 0.3	>366
	43	< 0.3	>143
	46	0.4	115
	46	< 0.3	>153
	9.3	0.91	10
	12	0.36	36
	2400	< 0.3	>8000
とこぶし	750	< 0.3	>2500
あさり	4600	<0.3	>15333
	430	0.91	473
	430	9.3	46
	15	<0.3	>50
	2400	<0.3	>8000
	93	1.5	62

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

腸炎ビブリオの海水中生残に関する研究

分担研究者 熊谷 進 東京大学教授

研究要旨: 腸炎ビブリオ O3K6 とその他の株について、海水、人工海水、10 倍希釈人工海水における生残菌数を 20℃ および 5℃ 下で逐次的に計測した。その結果いずれの株も、低温下における方が死滅しやすいこと、いずれの温度においても O3K6 とその他の株間で顕著な差異は認められなかったことから、近年 O3:K6 株が優勢となったことは、海水中での生残における他株との相違によるものではないものと考えられた

A. 研究目的

1996 年以前は、特定の株による世界的な腸炎ビブリオの流行は知られていなかったが、1996 年以降、世界的に腸炎ビブリオ食中毒の原因菌として O3:K6 株が優勢となった(Obata et al. 2001)。O3:K6 株は増殖と死滅の点において他菌株と違いがあるのか否かについては興味をもたれているが、その相違を示す知見は得られていない。本研究の目的は、海水中での生残において O3:K6 株とその他の株が異なるか否かという点を究明するために、O3:K6 株を含む 6 菌株を用い、海水・汽水域での夏季・冬季の腸炎ビブリオ生残のモデル実験を行った。

B. 研究方法

供試菌株

表 1-1 に示した菌株を実験に供した。

菌液の調整

各菌株は食塩ポリミキシンブイオン(日水製薬)で 37℃ 一晚培養した後に、食塩加ブイオン(1% Bacto® peptone(Difco USA)、0.3% 酵母エキス、2% NaCl)に継代し、37℃ で 1 晩培養後、室温で 15 分間遠心(3000rpm)し、集菌した。

逗子市子坪湾で採取した海水、人工海水(表 1-2)、汽水域を想定した 1/10 濃度の人工海水(以下 1/10 人工海水)、栄養分に富む海底などの局地的海水を想定し 0.5% ペプトン(Bacto® peptone(Difco USA))を加えた人工海水(以下 0.5% ペプトン加人工海水)を調整し、それぞれ 121℃、15 分間オートクレーブで滅菌した後に使用した。遠心により集菌した菌に各海水 10ml を加えて攪拌した後に、室温に 15 分間静置した。この菌懸濁液 0.4ml を海水、人工海水、1/10 人工海水、または 0.5% ペプトン加人工海水各 40ml に加え、転倒混和した。混和直後、この菌液の一部を採取し菌数を計測してから、20℃ または 5℃ に保存した。さらに各菌液の一部を、1 週間または 2 週間毎に一回採取し、生存菌数を計測した。

菌数の計測

1%食塩加普通寒天培地または TCBS 寒天培地 (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose 寒天培地:Oxoid USA) 上に、1%食塩加PBSで10倍階段希釈した菌液を100 μ l 塗抹し、37℃で一晩培養後、発育したコロニー数を計測した。菌数は、菌液1ml中の菌数を対数で表示した。検出限界は10 CFU/mlである。

C. 研究結果

菌株により生存菌数にはばらつきがあったが、6菌株での死滅には共通の傾向が見られた(図1-1～1-6)。

20℃では、栄養分に富む海水を想定した0.5%ペプトン加人工海水中で、測定開始後生存菌数が約10～100倍に増加した後に、2ヶ月後においても 10^8 CFU/mlが生存し、他の条件に比して生存菌数が最も高かった。人工海水、および海水中においては測定開始時の菌数がほぼそのまま2ヶ月後も維持されていた。汽水域を想定した1/10人工海水中では生存菌数が徐々に減少し、ある程度減少してからは、TCBSで計測した生菌数と1%食塩加普通寒天培地で計測した生菌数に差が見られ、1%食塩加普通寒天培地での生菌数の方が10～100倍多かった。

菌株による差異に着目すると、20℃において、Vp112、Vp316については人工海水に比べ、海水での生菌数が2ヵ月後には1/10であり(図1-5, 1-6)、Vp9については海水での生菌数が29日後には検出限界以下となった(図1-1)。これに対し、他の3菌株では人工海水中と海水中ではほぼ同様に菌数が推移し2ヶ月後にも 10^6 CFU/mlが生残した。また、Vp9については20℃における

1/10人工海水中での1%食塩加普通寒天培地で計測した生菌数が、他の菌株に比べ1/100程度の菌数で推移した(図1-1)。

5℃では、全ての条件で20℃よりも生存菌数が減少した。生存菌数をもっとも高く維持されたのは海水中で、次いで人工海水中、1/10人工海水中であった。20℃の場合とは異なり、いずれの菌株でも、栄養分に富む0.5%ペプトン加人工海水中の方が他よりも菌数が速やかに減少した。また、TCBS寒天培地を用いて計測した菌数よりも1%食塩加普通寒天培地を用いて計測した菌数の方が10倍程度高いことが認められた。

D. 考察

タイで分離された腸炎ビブリオ O3:K6 株は、散发事例からの分離株と、集団感染事例からの分離株とは、病原因子のレギュレーターであるtoxRをターゲットとしたプライマーを用いたPCR法では区別がつかないという報告がある(Vuddhakul et al. 2000)。また、日本、インド、東南アジア、米国において1996年以降に発生した食中毒事例から分離されたO3:K6株はいずれもパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)で同型を示すという報告もある(Wong et al. 2000, Arakawa et al. 1999)。したがって、1996年以降優勢となったO3:K6株は、いずれも同一株から派生した遺伝的に極めて近い菌であり、これらのO3:K6株は生存または病原性に、他の血清型よりも何らかの有利な特徴があると考えられている。しかし、TDH産生能、抗生物質感受性、環境ストレスに対する抵抗性には1996年以前の腸炎ビブリオ O3:K6 株、および他血清型株と比較して、大きな差異は認められないということが報告されている(Wong

et al. 2000)。

本実験では O3:K6、TDH 非産生株である Vp9 は 5℃でほかの菌株よりも死滅しやすく、20℃では海水で他の菌株よりも死滅しやすい、という特徴があったが、O3:K6、TDH 産生株である Vp15 では、他の菌株と顕著な差は見られなかった。O3:K6 株の特徴であるか否かの詳しい検討には菌株をさらに増やす必要があるが、本実験での結果からは、O3:K6 株が優勢となった理由を海水中での生残しやすさに求めることはできない。

O3:K6 株の特徴として、Nasu ら(2000)は 1996 年以降の食中毒事例から分離された O3:K6 株から filamentous phage が分離され、このファージを 1996 年以降優勢となった O3:K6 株が共通に保有していることを示した。また、DNA シークエンスによって、このファージが遺伝的に近縁なファージと比較して特有の Open Reading Frame (ORF)を持っていることが報告されている。この ORF を流行株のマーカーとして利用するだけではなく、どのような機能に関わる遺伝子であるかの究明が今後期待される。

本実験の結果から、生菌数が減少し始めると、TCBS 寒天培地を用いて計測した菌数の方が 1%食塩加普通寒天培地を用いて計測した菌数の 1/10～1/100 であった。TCBS 寒天培地は食品・糞便サンプルからのビブリオ分離用の選択培地であり、胆汁、胆汁酸塩、チオ硫酸ナトリウム、クエン酸鉄でグラム陽性菌、糞便内常在菌の発育を抑制している。生存に好適ではない環境に存在した菌は、選択性のある培地では検出できない場合があることが知られており(宮島 2000)、食品衛生法施行規則および食品・添加物等の規格基準でも、平成 13 年 6 月から一部が

改正され、魚介類の腸炎ビブリオ検出法が、従来の強い選択性がある 2%食塩加ポリミキシムブイオンに代えて、選択性の低いアルカリペプトン水を増菌培地とした。これは、損傷を受けた腸炎ビブリオの検出に配慮したものである。損傷を受けている菌が選択培地では増殖し難いことは、非選択ブイオンで培養した後に食塩ポリミキシムブイオンまたはアルカリペプトン水で培養したほうが、前培養なしで培養した場合よりも検出しやすくなる(Kudo et al. in press)ことから示唆される。今回の実験でも、選択性の低い 1%食塩加普通寒天培地と、TCBS 寒天培地での生存菌数に差がみられたのは、選択性の強い TCBS 寒天培地で損傷菌が検出できなかったためと考えられる。

本研究の結果では、20℃ではすべての条件で 2 ヶ月間は腸炎ビブリオが生残した。1/10 人工海水でも 2 ヶ月間は腸炎ビブリオが生残することが示され、夏季には汽水域が一度病原性を持つ腸炎ビブリオに汚染されると汚染が持続し、海水からの汚染が継続的にはなくても食中毒発生の可能性があることが明らかになった。また、1/10 人工海水はどの菌株でも人工海水と比較し、生存菌数が少なかった。腸炎ビブリオの TDH 産生株がむしろ汽水域から高率に分離されるという報告があるが(Kumazawa & Kato 1985)、本実験では TDH 産生株も非産生株と同様の菌数の減少がみられた。以上から、汽水域で TDH 産生株が多く分離される理由を、低浸透圧または低食塩濃度のみに帰すことはできない。汽水域で分離される際に腸炎ビブリオが付着している魚貝類や藻類の関与などを考慮する必要があるであろう。

一方、冬季の海水・汽水のモデルとして

行った 5℃での実験では、いずれの条件でも生存菌数は徐々に減少した。地球上の 70%以上を占める海面の 90%程度は 5℃以下であるとされている。しかし地域的な分布を見ると、東京湾の海水表面温は 3 月から 8 月までは気温と一致し 25℃まで上昇するが、温度が下がる 9 月から 2 月には、暖かい下層水との対流がおこり、冬季の海水表面温は気温より 5℃程度高く、最も低下する 1、2 月で 9℃であり、下層水は 10℃程度である(堀部 1977)。したがって、内湾等、冬季の水温が低下し難い海域が冬季の腸炎ビブリオの生存場所である可能性があるが、海面の大部分の場所では腸炎ビブリオは長期には生存できないことが明らかとなった。また、20℃の場合とは逆に、海泥や地形によって局地的に栄養分に富む海水を想定した 0.5%ペプトン加人工海水の条件では、5℃では他の条件よりも菌数の減少が早かった。したがって腸炎ビブリオが冬季に生存している場所として、海泥も調査されているが(宮島 2000)、本実験からは 5℃のような低温下で海泥にはむしろ生残し難い可能性が示唆された。

E. 結論

腸炎ビブリオ O3K6 とその他の株について、海水、人工海水、10倍希釈人工海水における生残菌数を 20℃および 5℃下で逐次的に計測した。その結果いずれの株も、低温下における方が死滅しやすいこと、いずれの温度においても O3K6 とその他の株間で顕著な差異は認められなかったことから、近年 O3:K6 株が優勢となったことは、海水中での生残における他株との相違によるものではないものと考えられた。

F. 発表

学会発表

第22回日本食品微生物学会、腸炎ビブリオの低浸透圧抵抗性、大河内美穂・熊谷進・その他、平成13年10月

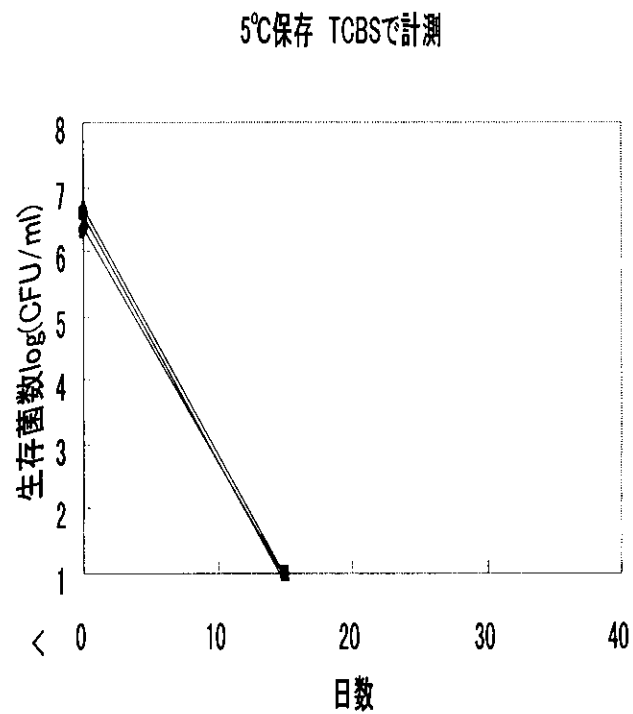
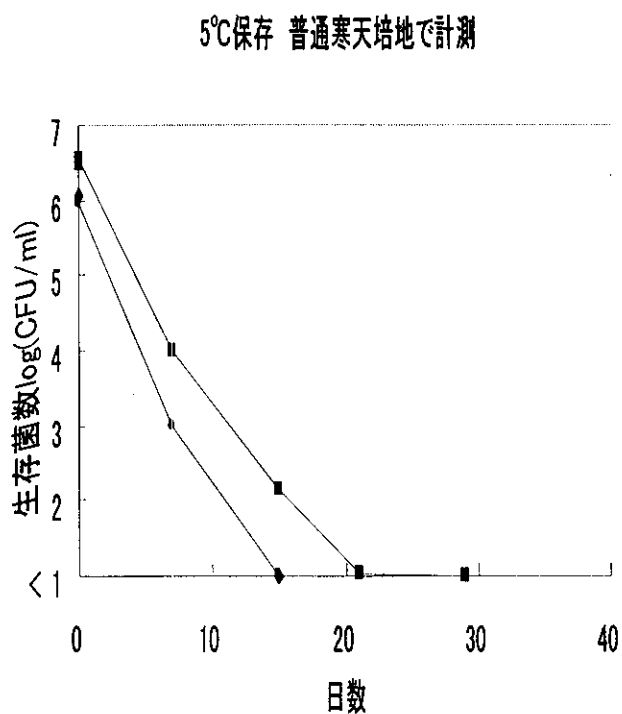
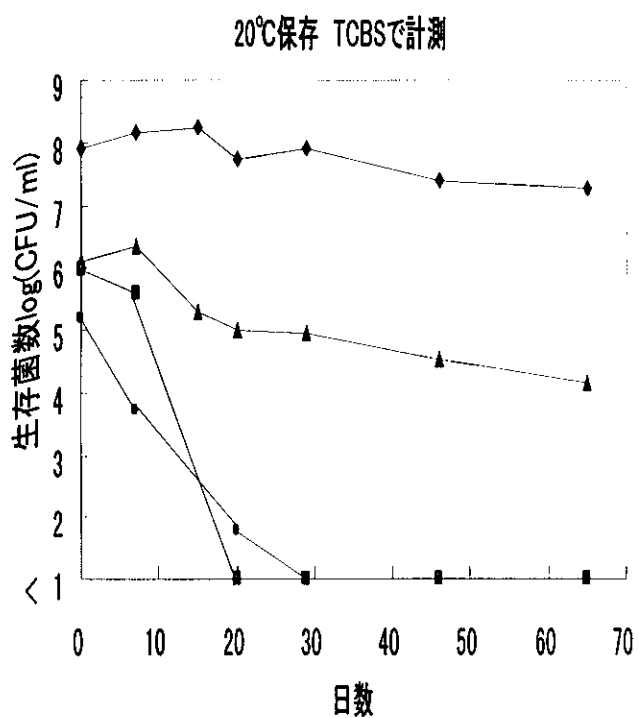
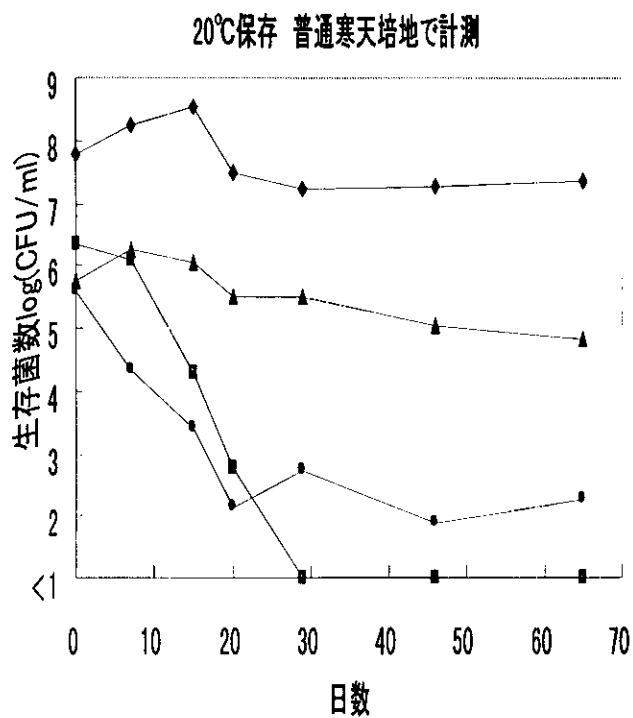


図1-1 : Vp9の20℃, 5℃における生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加人工海水

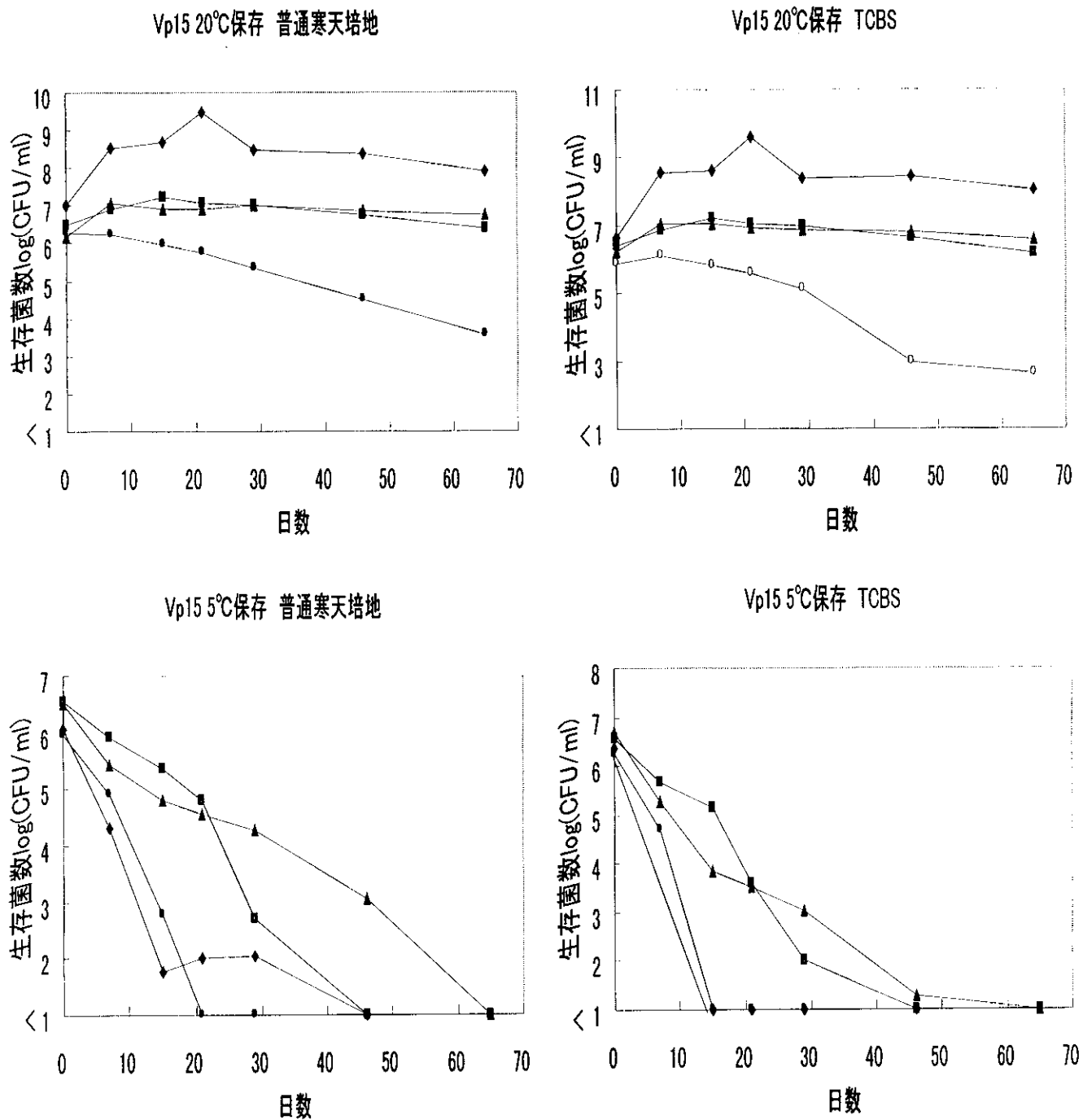


図1-2 : Vp15の20°C, 5°Cにおける生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加人工海水

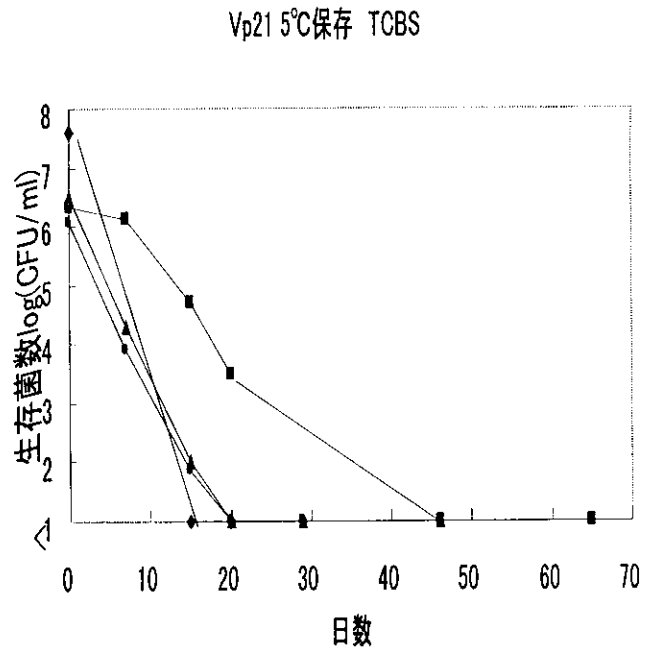
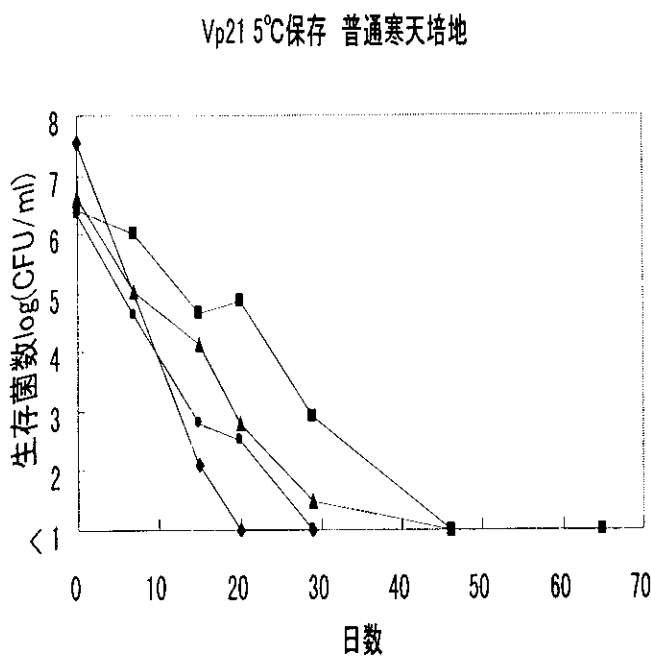
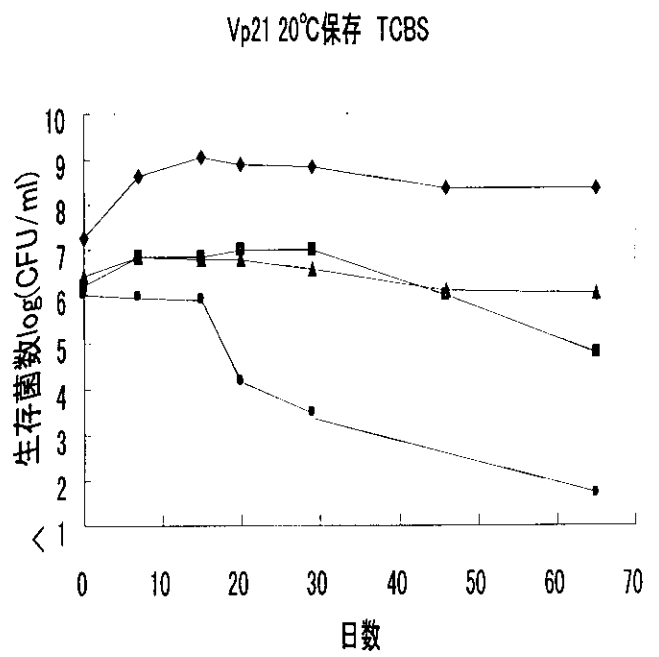
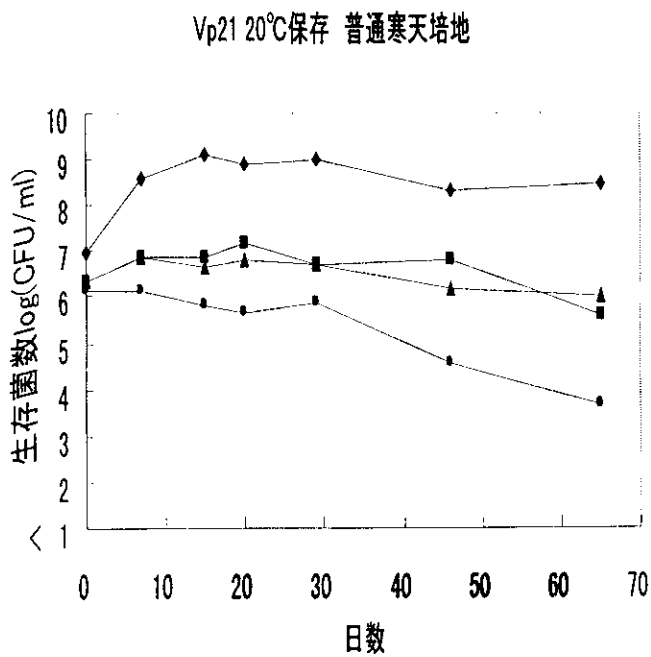


図1-3 : Vp21の20℃, 5℃における生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加人工海水

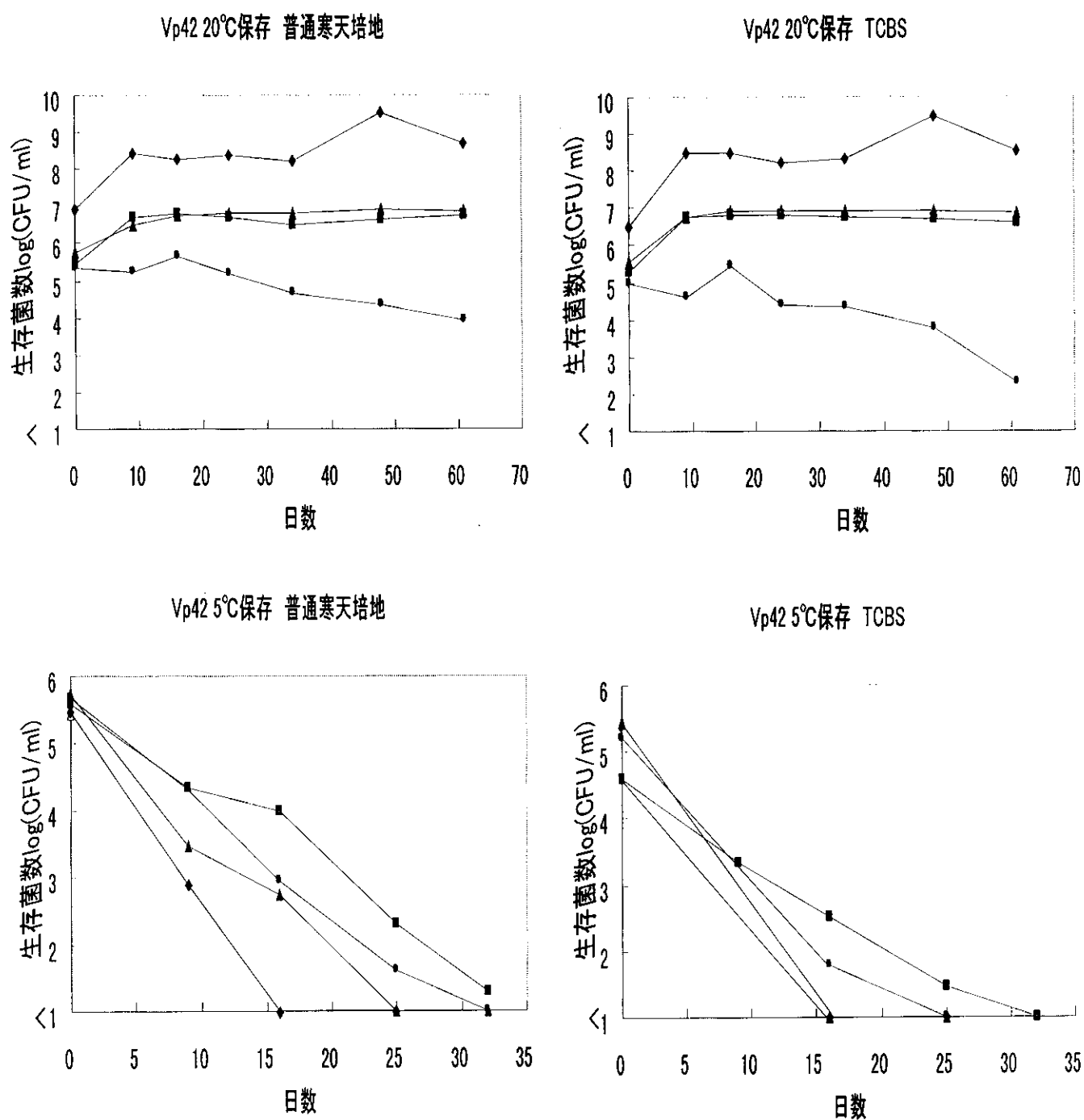


図1-4 : Vp42の20°C, 5°Cにおける生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加人工海水

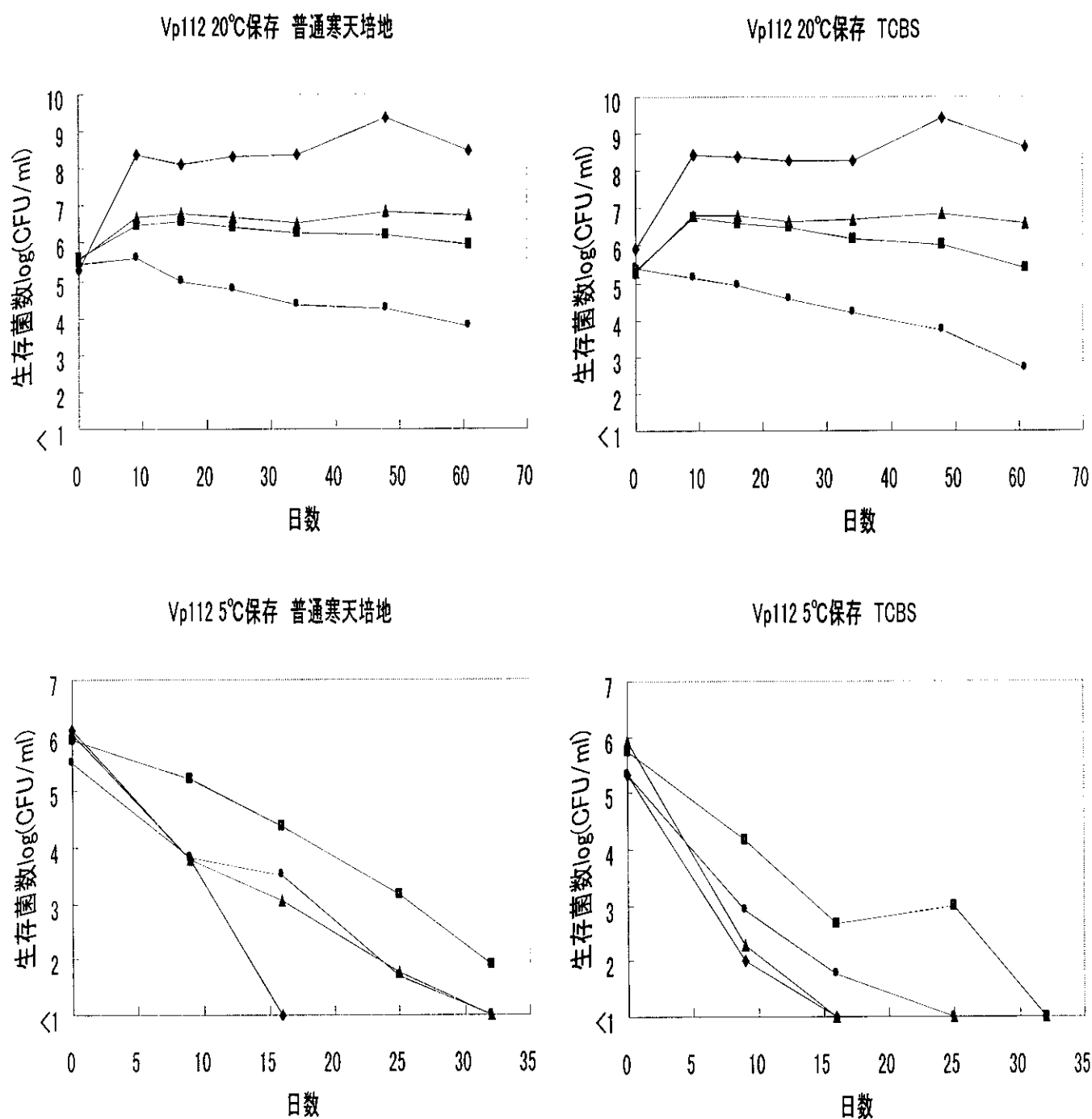
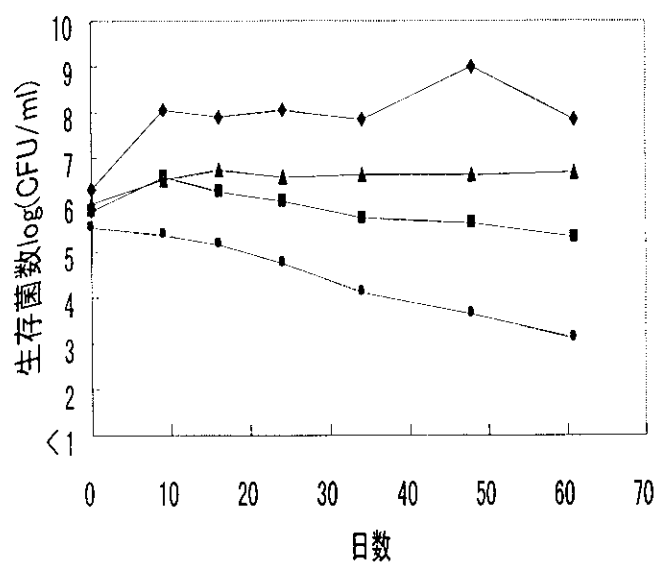


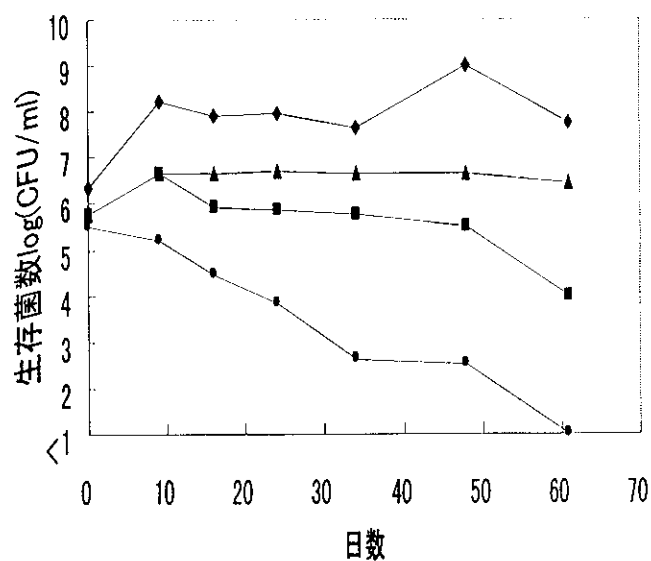
図1-5 : Vp112の20°C, 5°Cにおける生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加入人工海水

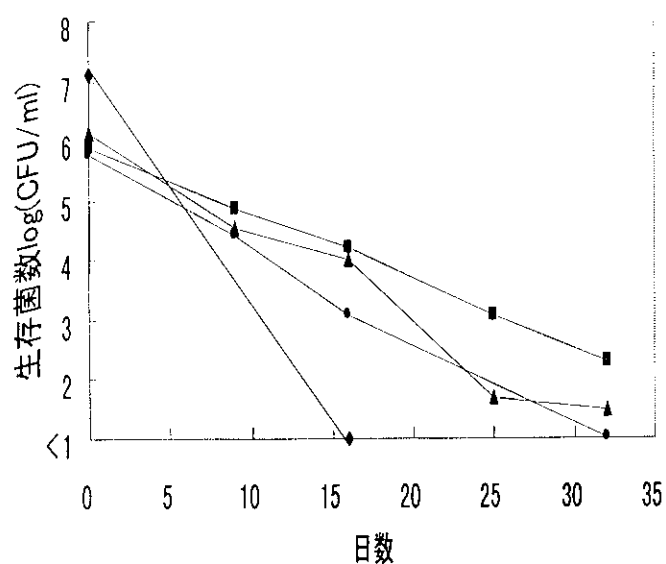
Vp316 20℃保存 普通寒天培地



Vp316 20℃保存 TCBS



Vp316 5℃保存 普通寒天培地



Vp316 5℃保存 TCBS

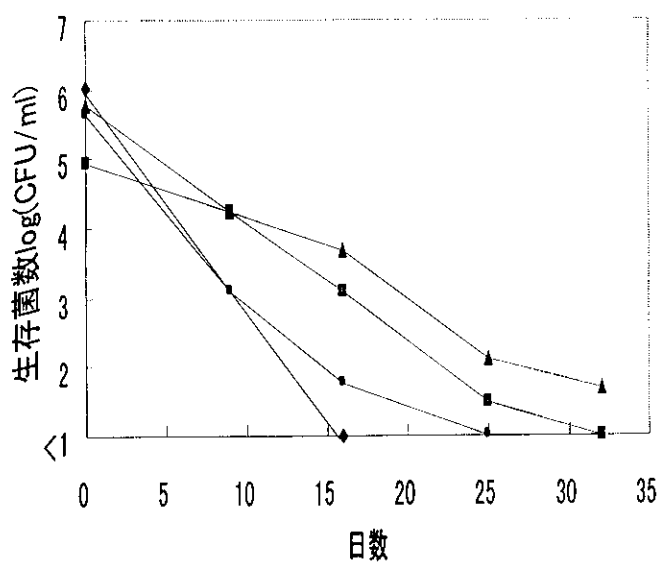


図1-6 : Vp316の20℃, 5℃における生存菌数の推移

—■— 海水 —▲— 人工海水 —●— 1/10人工海水 —◆— 0.5%ペプトン加人工海水

タイ南部の市販海産魚介類における腸炎ビブリオ新クローンによる汚染状況と現地の臨床分離株との関連性

京都大学 東南アジア研究センター 人間生態相関研究分野 教授 西渕光昭

大阪府立公衆衛生研究所 食品衛生部食品細菌課 主任研究員 石橋正憲

プリンス・オブ・ソンクラ大学 (タイ) 理学部 助教授 Varaporn Vuddhakul

医学部 助教授 Sineenart Kalnauwakul

研究要旨

世界的な大流行を起こしている腸炎ビブリオの新型クローンによる感染症発生状況、魚介類の汚染状況、および両者の相関関係を明らかにするための研究を実施した。本クローンによる感染症が多発するタイ南部ソンクラ地区の 2 つの市中病院で下痢患者糞便を検査したところ、1 年間で 317 検体から腸炎ビブリオを分離できた。そのうち 242 検体 (76%) に由来する菌株が新型クローン(*toxR* 遺伝子中の新型クローン特異的塩基を標的とした GS-PCR 法により同定) に属しており、この地域では新型クローンによる感染症が多発していることが明らかになった。新型クローンの血清型は O3:K6 型 (80%)、O4:K68 型 (8.4%)、O1:K25 型 (6.9%)、O1:KUT 型 (1.8%)、O1:K41 型 (0.32%)、O4:K12 型 (0.32%) であり、従来報告されていた血清型分布より多様であることが明らかになった。一方同地域で市販されている新鮮魚介類中の新型腸炎ビブリオの分布を検査した。検査は免疫磁気ビーズ法を取り入れた高感度・特異的な方法で、1998 年から継続して実施している。2000 年度までの検査では、魚介類のうち貝類からのみ目的の新型クローンが分離できた (検査総数 284 検体のうち貝類 136 検体、陽性貝類 4 検体) ので、2001 年度は、貝類を中心に検査した (検査総数 132 検体のうち貝類 136 検体)。その結果 7 検体 (二枚貝 *Perna viridis* および *Meretrix lusoria*) が陽性であった。したがって、タイ南部ソンクラ地区の海洋環境中には高頻度で新クローンが分布していると考えられる。また 2001 年度に分離した新型クローン菌株の血清型は、O3:K6 型 5 株、O3:KUT 型 (O3:K6 型の変異型と考えられる) 1 株、および O1:K25 型 1 株であった。これらの血清型分布は患者分離新型クローン菌株の血清型分布と強い相関関係を示しており、現地で漁獲・販売されている貝類が感染症の原因食品であることを示唆していると言える。

1. 目的

研究協力者 (西渕) らのグループは 1995 年頃に出現したと思われる腸炎ビブリオ新型クローンによる腸炎ビブリオ感染症の研究を実施してきた。最初は、O3:K6 血清型に属し、*tdh* (耐熱性溶血毒) 遺伝子を保有するが *trh* (耐熱性溶血毒類似毒) 遺伝子を保持しないことおよび特異的な arbitrarily primed PCR プロフィールを示すことを新クローンの特徴としてあげた (Okuda et al. 1997)。その後、*toxR* 遺伝子を標的とした新しい PCR 法に