

200200972A

厚生科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品中の微生物のリスク評価に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山本 茂貴

平成15（2003）年3月

食品中の微生物のリスク評価に関する研究研究班

平成14年度 研究組織

主任研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

分担研究者 春日文字 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター

武田直和 国立感染症研究所ウイルス第二部

岸本寿男 国立感染症研究所ウイルス第一部

熊谷 進 東京大学大学院

林 志直 東京都立衛生研究所

研究協力者 西淵光昭 京都大学

Varaporn Vuddakul ソンクラ大学 (タイ)

Wilawan Jaroenjiratrakul ソンクラ大学 (タイ)

伊藤嘉典 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

広田雅光 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

宇佐神美孝 実践女子大学

藤井香予子 実践女子大学

西島基弘 実践女子大学

新井麻奈未 (財) 東京顕微鏡院

中川 弘 (財) 東京顕微鏡院

伊藤 武 (財) 東京顕微鏡院

山本昭夫 兵庫県健康環境科学研究センター

岩堀淳一郎 高知医科大学

小坂 健 国立感染症研究所感染症情報センター

重松美加 国立感染症研究所感染症情報センター

豊福 肇 WHO Food Safety Department

食品中の微生物のリスク評価に関する研究

主任研究者 山本茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

腸炎ビブリオのリスクアセスメントに関する研究

タイとの共同研究により赤貝中の腸炎ビブリオの定量調査を収穫、小売りおよび消費時点において行った。その結果、リスクアセスメントに必要な定量データが収集された。そのデータを用いて腸炎ビブリオのリスクアセスメントモデルを構築した。漁獲段階と小売段階における総腸炎ビブリオ濃度は、その分布の形から対数正規分布に従うと仮定し、分布のパラメーターはブートストラップ法により推定した。病原菌株の濃度は非常に低いので、ポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。調理後の総腸炎ビブリオ濃度、病原株の濃度については、双方ともポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。家庭での貝の摂食頻度及び摂食量の推定には、協力大学の学生及び職員を対象として年間の家庭での貝の摂食回数及び1回あたりの摂食個数を聞き取り調査し、それをもとに一人当たりの年間貝の摂食頻度及び一人1回当たりの摂食量の分布をブートストラップ法により推定した。その際、総腸炎ビブリオ数と毒素産生株 (*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性菌株) とを分けて解析した。

また、腸炎ビブリオの熱抵抗性及び低塩濃度耐性について検討した。ポリミキシン培地の場合、10～15分以降に菌は観測されなくなったが、食材との共存により、熱抵抗曲線は菌数が初め急速に減少する前半と、その後緩やかに減少する後半の二相に分かれ、48℃ 60分の加熱でも $\log_{2.14} \sim 3.69$ の菌数が残る場合があった。食材によって菌が温存されると推測でき、加熱処理後の食品を適切に保存する必要があることがわかった。

低張食塩水中での急激な死滅は、低食塩濃度ではなく低浸透圧によって起こること、食塩が存在しなくても浸透圧が海水程度ならば、1時間は生存可能であることが判明した。また、定常期の菌は対数増殖期の菌よりも低浸透圧に対して抵抗性が強いことが認められた。さらに、低浸透圧ストレスによって低浸透圧にたいする耐性を獲得すること、低浸透圧ストレスによって酸耐性も獲得するが、逆は成り立たないことなどが見いだされた。以上、真水による洗浄方法の基礎データおよび汽水域における生存機構に関わる知見が得られた。

Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における *Salmonella* Enteritidis (S.E.) の二次汚染のモデル化に関する研究

調理過程における調理器具を介した二次汚染を定量的に解析するための実験を行い、ボールからスポンジ、スポンジからマグカップさらにスプーンへの菌の移行を追跡

した。スポンジからスープ代替としての生理食塩水への S.E. 移行率は、洗剤無しのパターンが 0.0020 %、洗剤有りのパターンが 0.0003 % であり、マグカップへの S.E. 移行率よりも更に 10 % 程低い数値であった。調理過程における二次汚染はどの病原菌についてもデータが不足している部分であり、定量的な解析のためにデータの蓄積が必要とされている。今回のシミュレーション実験により、調理器具の一つとしてのスポンジが二次汚染経路での *Salmonella* Enteritidis の摂取に関与する程度を推定することができた。

SRSV のリスクプロファイルの作成

SRSV のリスクアナリシスのためには、リスクプロファイルを作成する必要がある。疫学情報を収集し、食品群と病原体の関係を明らかにするとともに経済的影響についても情報を収集した。

鶏卵からの *Coxiella burnetii* 検出法の検討および汚染実態に関する研究

Real Time PCR を基盤とした検出法を開発することを目的とした。今回設計した IS 遺伝子に対するプライマーおよびプローブ IS1RT が最も感度が高く、0.01 ~ 0.1 個の菌が検出可能であった。IS2RT に関してもほぼ同等の感度が得られた。また、外膜蛋白質に対するプライマーおよびプローブ omp1RT および omp2RT は 1 ~ 0.1 個の菌が検出可能で、同じ遺伝子を標的とした nested PCR より感度が高かった。

分担研究者

春日文子（国立医薬品食品衛生研究所）、
岡部信彦（国立感染症研究所）、武田直和
（国立感染症研究所）、岸本寿男（国立感
染症研究所）、熊谷進（東京大学大学院）、
林志直（東京都健康安全研究センター）

A. 研究目的

近年、微生物を原因とする食中毒など食品に関連した国際的問題が顕在化しており、その現状把握並びに防除対策の確立が早急に必要状況となっている。また、食品流通の国際化が推進されるなか輸出入国間での食品衛生行政における規制の整合性が問題となっており、食品の微生物危害を防除するための規格基準は微生物学的リスクアナリシスをツールとして策定する必要がある。本研究では、国際的リスクアセスメント手法の有効性を検証しつつ、日本における微生物学的リスクアセスメントの手法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1. タイ南部における赤貝中の腸炎ビブリオの定量調査

タイ南部の bloody clam を対象として、収穫、小売、および消費時点における腸炎ビブリオの定量データを MPN 法と PCR 法を組み合わせることで収集した。また、環境パラメーターおよび貝の摂食データを行った。

2. 腸炎ビブリオのリスクアセスメントに関する確率論モデルの作成

漁獲段階と小売段階における総腸炎ビブリオ濃度は、その分布の形から対数正規分布に従うと仮定し、分布のパラメーターはブートストラップ法により推定した。病原菌株の濃度は非常に低いので、ポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。調理後の総腸炎ビブリオ濃度、病原株の濃度については、双方ともポアソン分布に従うと仮定し、それらの平均濃度をベイズ法により推定した。家庭での貝の摂食頻度及び摂食量の推定には、協力大学の学生及び職員を対象として年間の家庭での貝の摂食回数及び 1 回あた

りの摂食個数を聞き取り調査し、それをもとに一人当たりの年間貝の摂食頻度及び一人1回当たりの摂食量の分布をブートストラップ法により推定した。その際、総腸炎ビブリオ数と毒素産生株 (*tdh* 遺伝子陽性及び *trh* 遺伝子陽性菌株) とを分けて解析した。

3. Exposure Assessment のための基礎知見としての予測微生物学的研究 - *Vibrio parahaemolyticus* の熱抵抗性

保管菌株 *Vibrio parahaemolyticus*B-52 株を、食塩ポリミキシン培地に2回培養 (37℃ overnight)。食品材料を約 5g ずつ入れた袋に、菌液を食塩ポリミキシン培地で、10 培に希釈し、各袋に 0.25ml ずつ加える。袋を water bath (48.0℃) に沈め、この時間を0時とし、後所定の時間ごとに2サンプルずつ取り出し冷した。その後、食材の入った袋に食塩ポリミキシン培地を 50ml 入れ、ストマッキング。そこから液を取り出し、スパイラルプレターを使って、1つのサンプルにつき2枚ずつ TCBS 寒天培地に塗布した。37℃ overnight 培養後、菌数を測定した。

4. 低食塩濃度もしくは低浸透圧下での腸炎ビブリオの挙動に関する研究

低食塩濃度もしくは低浸透圧下での腸炎ビブリオの増殖について検討した。

5. Exposure Assessment のための基礎知見としての、調理過程における *Salmonella* Enteritidis (S.E.) の二次汚染のモデル化に関する研究

調理過程における調理器具を介した二次汚染を定量的に解析するための実験を行い、ボールからスポンジ、スポンジからマグカップさらにスープへの菌の移行を追跡した。S.E.を鶏卵に対し 100000cfu/ml になるように調節したものを、滅菌ストマッカー一袋に割卵した鶏卵に添加し、1分間ストマッキングをして均一にしたものを試供菌

液とした。予め設定した手法で洗浄過程をシミュレーションし、ストマッキングあるいは拭き取り法により菌を回収した。各方法の回収率を別途測定し、測定菌数を補正した。

6. SRSV のリスクアナリシスのためのリスクプロファイルの作成

生産段階から消費に至までのウイルスの汚染実態および発症ウイルス量に関する食中毒事例、経済的損失に関する情報を収集した。

7. 鶏卵からの *Coxiella burnetii* 検出法の検討および汚染実態に関する研究

Real Time PCR を基盤とした検出法を開発することを目的とした。

C. 結果と考察

1. タイ南部の bloody clam を対象として、収穫、小売、および消費時点における腸炎ビブリオの定量データを収集した。また環境パラメーターおよび貝の摂食データを収集した。

2. 実験室内で貝をボイルした条件では、腸炎ビブリオは十分死滅し、患者発生数は非常に低く抑えられることが示された。

3. ポリミキシン培地の場合、10～15分以降に菌は観測されなくなったが、食材との共存により、熱抵抗曲線は菌数が初め急速に減少する前半と、その後緩やかに減少する後半の二相に分かれ、48℃ 60分の加熱でも log₂1.14～3.69の菌数が残る場合があった。食材によって菌が温存されると推測でき、加熱処理後の食品を適切に保存する必要があることがわかった。

4. 低張食塩水中での急激な死滅は、低食塩濃度ではなく低浸透圧によって起こること、食塩が存在しなくても浸透圧が海水程度ならば、1時間は生存可能であることが判明した。また、定常期の菌は対数増殖期の菌よりも低浸透圧に対して抵抗性が強い

ことが認められた。さらに、低浸透圧ストレスによって低浸透圧にたいする耐性を獲得すること、低浸透圧ストレスによって酸耐性も獲得するが、逆は成り立たないことなどが見い出された。以上、真水による洗浄方法の基礎データおよび汽水域における生存機構に関わる知見が得られた。

5. スポンジからスープ代替としての生理食塩水への S.E. 移行率は、洗剤無しのパターンが 0.0020 %, 洗剤有りのパターンが 0.0003 % であり、マグカップへの S.E. 移行率よりも更に 10 % 程低い数値であった。調理過程における二次汚染はどの病原菌についてもデータが不足している部分であり、定量的な解析のためにデータの蓄積が必要とされている。今回のシミュレーション実験により、調理器具の一つとしてのスポンジが二次汚染経路での *Salmonella* Enteritidis の摂取に関与する程度を推定することができた。

6. リスクプロファイルを作成した。

7. 今回設計した IS 遺伝子に対するプライマーおよびプローブ IS1RT が最も感度が高く、0.01 ~ 0.1 個の菌が検出可能であった。IS2RT に関してもほぼ同等の感度が得られた。また、外膜蛋白質に対するプライマーおよびプローブ omp1RT および omp2RT は 1 ~ 0.1 個の菌が検出可能で、同じ遺伝子を標的とした nested PCR より感度が高かった。

D. 結論

1. タイでの bloody clam による腸炎ビブリオの定量的リスクアセスメントにより、十分な加熱により菌が死滅し患者数が減少することが明らかとなった。
2. サルモネラ菌の定量リスクアセスメントに必要なデータが収集された。
3. 腸炎ビブリオの定量リスクアセスメントに必要なデータが収集された。

4. Q 熱リケッチアの定量 PCR 法が確立された。

E. 研究発表

1. タイ南部における赤貝の摂食に伴う腸炎ビブリオ感染の定量的リスクアセスメント : 2002 年. 岩堀淳一郎、山本昭夫、Varaporn Vuddhakul, Sineenart Kalmawakul, Ashurafuzzaman Chawdhury, 重松美加、小坂健、豊福肇、春日文字子、西渕光昭. 2002 年度日本リスク研究学会第 15 回研究発表会講演論文集第 15 巻 (京都. 2002 年 11 月 22-23 日) 220-225 頁
2. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in southern Thailand, 2002. Yamamoto, A., Iwahori, J., Shigematsu, M., Osaka, K., Toyofuku, H., Kasuga, F., and Nishibuchi, M. Abstracts of 37th Joint Conference on Cholerae and Other Bacterial Enteric Infections Panel (Okinawa, Japan. December, 17-19, 2002) 177-179.
3. 食品の微生物学的リスクアセスメントと文化的要因. 2003 年西渕光昭、防菌防黴 31, (4) :218
4. Laohaprerthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infects.* 130:1-12.
5. 広田雅光、伊藤嘉典、春日文字子 冷凍保存時における *Vibrio parahaemolyticus* の致死動態 日本食品衛生学会第 83 回学術講演会、東京、2002 年 5 月 15-17 日
6. Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Tsutsui, T., Fujikawa, H., Yunokawa, T., Hirota M., Kumagai, S., and Yamamoto, S. Risk assessment of *Salmonella* Enteritidis infection associated with raw egg consumption

in Japan. in *Pathogenic Microorganisms and Their Toxins: A Global Perspective of Their Risk, The Ninth International Symposium on Toxic Microorganisms*. pp. 60-68, 2002.

7. 春日文子 微生物学的リスクアセスメントーその現状とマネージメントにおける役割 獣医公衆衛生研究、5.(1),4-7, 2002.

8. 山本茂貴、春日文子、豊福肇 食品の微生物学的リスクアセスメント フードケミカル、2002年11月号 34-35, 2002.

9. 春日文子 海外におけるリスクアセスメントの実例紹介ーカキにおける腸ビブリオのリスクアセスメント：FDAー獣医液学会誌、6(2):65-66, 2002

タイ南部におけるアカガイ中の腸炎ビブリオの定量調査

西沢光昭 (京都大学東南アジア研究センター)

Varaporn Vuddakul, Wilawan Jaroenjiratrakul ([タイ]ソクラ大学理学部)

春日文子 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部、

国立感染症研究所感染症情報センター)

山本茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)

研究要旨

魚介類中の病原性腸炎ビブリオのリスクアセスメントを実施するためには、魚介類中の腸炎ビブリオ総菌数と病原性菌株の定量データが必要である。我々は、MPN 法に PCR 法を組み込むことにより、腸炎ビブリオ総菌数のみならず病原性菌株も比較的容易に定量できる方法を確立した。この方法を用いて、タイ南部のアカガイを対象として、収穫、小売、および消費時点における腸炎ビブリオの定量データを収集し、本法の有用性を実証した。また実際のリスクアセスメントに必要な環境パラメーターおよび貝の摂食データを現地で収集した。

A. 研究目的

アジア諸国をはじめ多くの発展途上国から大量の魚介類を輸入・消費している我が国においては、輸出国の汚染魚介類の状況を把握することが重要であり、これは我が国民の健康管理上極めて重要である。さらに、それぞれの輸出国において、国際基準を満たすような安全管理ができる体勢を確立するよう援助・指導することは、特にアジアにおいて我が国に期待される役割の1つである。

腸炎ビブリオは魚介類を汚染して食中毒の原因となる細菌の中で最も重要な病原菌である。最近われわれは、腸炎ビブリオ新型クローンによる感染症の世界的大流行を報告した (Okuda *et al.* 1997; Matsumoto *et al.* 2000)。インドにおいて 1996 年に腸炎ビブリオ感染症が急増した原因が、同一のクローンに属する菌株による感染症であることを明らかにした。その直後、このクローンによる感染症は、バングラデシュ、タイ、台湾、韓国、日本、および米国でも確認された。このクローンは、最初特定の血清型 (O3:K6, O4:K68, O1:KUT など) に属し、病原遺伝子としては、*tdh* を保有し、*trh* を持たないことや、arbitrarily primed PCR 法で特定の DNA フィンガープリントを示すという特徴を有することが示された。後に、*toxRS* オペロン内の新型クローンに特有の塩基を標的とした PCR 法 (GS-PCR) や、溶原ファージのゲノムに特有な塩基配列を検出することによって、比較的容易にこのクローンを検出できるようになった (Matsumoto *et al.* 2000)。われわれは、

このクローンの由来を明らかにするための研究の過程において、特にタイ南部では腸炎ビブリオ感染症が多発していることや、この地域で収穫・市販される二枚貝中に新型クローンが分布し、それがこの地域で感染症の原因となっていることを示唆する分子疫学的証拠を得た。したがってこの地域は、魚介類中の腸炎ビブリオのリスクアセスメント研究に適したフィールドであると思われる。

新型クローンを含めて、病原性腸炎ビブリオ菌株によって汚染した食品中での本菌の動態を明らかにし、正確な定量データを収集して、リスクアセスメントモデルを構築し、それに基づいた食品の安全管理を実施することが理想的である。ただし、様々な要因を盛り込んだ複雑なモデルの構築には膨大なデータを必要とし、モデル構築にも高度に専門的な知識・技術を必要とする。発展途上国において、このようなモデルの構築は当面は無理である。むしろ現時点では、定量データを収集する方法を確立し、ある程度のデータがあれば、それに基づいて比較的シンプルなリスクアセスメントモデルを構築できるということを示すことが肝要である。魚介類中の腸炎ビブリオのリスクアセスメントを実施するためには、病原性菌株を含む魚介類中の腸炎ビブリオ総菌数と病原性菌株の定量データが必要である。本研究では、PCR法を組み込んだMPN法により定量データを収集する方法を確立した。この方法を用いて病原性菌株が分布するタイ南部のアカガイについて収穫時、小売時、および摂食時における腸炎ビブリオ（総菌数および病原性菌株）の定量データを収集した。また、シミュレーション法によるリスクアセスメントに必要な環境パラメーターおよび貝の摂食データを現地で収集した。

B. 研究方法

(1) サンプリング

2002年2月14日から4月30日の期間中にタイ南部のパッタニー州で陸揚げされるアカガイ (*Anadara granosa*) を対象とし、合計12回のサンプリングを実施した。1回のサンプリングでは、個数の異なる貝をプールし（最大3セット）のサンプルを対象とし、12回のサンプリングで合計32セットのサンプルを調べた。現地で陸揚げされたアカガイを3群に分け、その場で（正午頃）（「収穫」時サンプル）、その後ハジャイ市のソククラ大学まで輸送し2時間室外に放置（15:00頃）後（「小売り」時サンプル）、およびその後2時間室外放置した後（17:00頃）熱湯で4分程度ボイル後（「消費」時サンプル）にサンプルを処理した。上記3群のサンプル採取時には、各時点における室外（室内）の温度と貝内部の温度および経過時間を測定した。

(2) 細菌学的検査

1) MPN (Most probable number) 法

任意に決定した披検数の貝から、無菌的に肉を採取した後、滅菌済み容器にプールした。プールした肉重量の10倍量のアルカリペプトン水 (pH8.6, 以下APWと略す) を加え十分に攪拌した。5段階濃度の3本試験管MPN法を実施するために、定法に従い

原液以外に4段階希釈 APW 10ml をそれぞれの試験管に3本ずつ調整し、37°Cで一夜培養した。翌日、初日と同様の濃度に5段階希釈した腸炎ビブリオ増菌用食塩ポリミキシンブイヨン（日水、以下 SPB と略す）10ml にそれぞれ対応する希釈濃度の初日の培養液 1 ml を接種し、一夜 37°Cにて培養した（第2日目）。さらに第3日目には、各濃度の培養液 1 ml を対応する希釈濃度の SPB10ml に接種し、37°Cで6時間培養した。第3日目の増菌培養液を用いて、培養液中の腸炎ビブリオの遺伝子(*toxR* 遺伝子[菌種同定用マーカー; すべての腸炎ビブリオ菌株検出用]、*tdh* 遺伝子[病原性菌株マーカー]、および *trh* 遺伝子[病原性菌株マーカー])を以下の2方法によって検査し、肉 10 g あたりそれぞれの遺伝子を有する菌株についての MPN を定法に従い決定した。

- 2) 直接 PCR 法：増菌培養液 1 ml 中の菌を遠心分離によって集め、1 ml の蒸留水に懸濁させた。これを 100°C5 分間加熱後、再び遠心分離して上清を採取した。上清を DWにて 10 倍希釈したものを PCR 材料とし、過去に報告された *toxR* 遺伝子を検出する Kim らの PCR 法(1999)、*tdh*、*trh* 遺伝子を検出する Tada らの PCR 法(1992)に従い実施した。
- 3) 分離培養 PCR 法：増菌培養液を CHROMagar Vibrio (CHROMagar Microbiology, Paris) 培地に接種し、37°Cにて一夜培養後、藤色の集落 2 個を選んだ。それぞれの集落を SPB 培地に接種し一夜培養後、上記の直接 PCR 法と同様に遠心分離・加熱後、上清の 10 倍希釈液を作成し、*toxR* 遺伝子および *tdh* 遺伝子、*trh* 遺伝子検出のための PCR 法を実施した。判定方法は、検査した 2 集落のうち少なくとも 1 集落が陽性結果を示した場合、その培養液はそれぞれの遺伝子について陽性であるとした。

(3) その他のデータ

ソクラ大学の大学院生、大学病院職員 14 人を対象に貝の摂食に関する聞き取り調査を実施した。なお、対象者には本研究における解析の際に必要な要素であること、調査に答えた人の個人名は公表しないこと、などを説明し理解を得たうえで回答の協力を得た。

Kim, Y. B., C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto, and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* 37:1173-1177.

Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H.-C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J. Clin. Microbiol.* 38:578-585

Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, 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 in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.

- Tada, J., T. Ohashi, N. Nishimura, Y. Shirasaki, H. Ozaki, S. Fukushima, J. Takano, M. Nishibuchi, and Y. Takeda. 1992. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 6:477-487.
- Vuddhakul, V., A. Chowdhury, V. Laohaprerthisan, P. Pungrasamee, N. Patararungrong, P. Thianmontri, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2000. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* strains belonging to a pandemic O3:K6 clone from environmental and clinical sources in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2685-2689.

C. 研究結果および考察

各サンプリング時点（収穫、小売、および消費）における貝の内部温度、およびサンプリング時点間の室温とその間の輸送時間を表 1 にまとめた。消費時の貝の温度が変動しているのは、加熱処理する貝の個体数の多少によるところが大きい。調査期間（2ヶ月半）内の室温の変動は最大 10℃もあった。

12回のサンプリングにおいて処理した 32セットのサンプルについて各サンプリング時点での腸炎ビブリオの MPN/(貝 10 g)を直接 PCR 法と分離培養 PCR 法で決定した結果を表 2 にまとめた。腸炎ビブリオ総菌数については、直接 PCR 法と分離培養 PCR 法で得た結果は、ほぼ一致していた。しかし、*tdh*⁺菌株および *trh*⁺菌株については、2つの方法で得た結果は、同一サンプルについてはあまり一致しなかった。*tdh*⁺菌株は直接 PCR 法では、収穫時の 4 サンプルに検出できたが、分離培養 PCR 法では 2 サンプルにしか検出できず、両方法で検出できたのは 1 サンプルのみであった。*trh*⁺菌株については、すべてのサンプリング時点をとおして、直接 PCR 法では 3 サンプル、分離培養 PCR 法では 5 サンプルが陽性となったが、両方法で陽性となったのは、1 サンプルのみであった。*tdh*⁺菌株および *trh*⁺菌株について 2つの方法で得た結果が一致しなかったのは、*tdh*⁺菌株と *trh*⁺菌株の絶対菌数が少なく（検出限界に近く）検査結果がばらついたからであると考えられる。*tdh*⁺菌株または *trh*⁺菌株を検出できた結果を総合すると、どちらの検出法でも、合計 7 サンプルが陽性であったことから、直接 PCR 法と分離培養 PCR 法の *tdh*⁺菌株または *trh*⁺菌株を検出する感度はほぼ同じであろうと判断された。したがって、どちらか一方の方法を採用する場合、より簡便な直接 PCR 法が適していると言える。*tdh*⁺菌株または *trh*⁺菌株が陽性であった 7 サンプルのうち、5 サンプルは、12 ~ 15 個体の貝をプールしたものであった。*tdh*⁺菌株または *trh*⁺菌株を検出するためには、12 個以上の個体をプールするほうが良いと考えられる。

貝の摂食に関する聞き取り調査の結果は表 3 にまとめた。一度に食べる貝の数は、19.1 ± 7.9 個、1年に貝を食べる回数は 5.0 ± 2.9 回で、あまり大きな個人差がないことが判明した (N = 14)。

D. 結論

MPN 法に PCR 法を組み込むことにより、腸炎ビブリオ総菌数のみならず病原性菌株も比較的容易に定量できる方法を確立した。腸炎ビブリオ病原性菌株が分布するタイのアカガイを対象として検査することにより、有用性を実証できた。APW と SPB を用いた増菌培養後に、直接 PCR 法と新しい分離培地 (CHROMagar Vibrio) を使用する分離培養 PCR 法を比較したが、腸炎ビブリオ総菌数と *tdh*⁺ 菌株と *trh*⁺ 菌株に関して、いずれの方法でも同程度の検出感度が達成できると言える。したがって今後大規模な調査には、より簡便な直接 PCR 法のみを採用することにより、効率の良い調査・研究が実施できと期待できる。

E. 研究発表

タイ南部における赤貝の摂食に伴う腸炎ビブリオ感染の定量的リスクアセスメント：微生物学的リスクアセスメントにおける国際協力。2002年。岩堀淳一郎、山本昭夫、Varaporn Vuddhakul, Sineenart Kalnawakul, Ashurafuzzaman Chowdhury, 重松美加、小坂健、豊福肇、春日文字、山本茂貴、西渕光昭。2002年度日本リスク研究学会第15回研究発表会講演論文集第15巻（京都。2002年11月22-23日）。220-225頁。

Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in southern Thailand. 2002年。Yamamoto, A., J. Iwahori, M. Shigematsu, K. Osaka, H. Toyofuku, F. Kasuga, and M. Nishibuchi. Abstracts of 37th Joint Conference on Cholerae and Other Bacterial Enteric Infections Panel (Okinawa, Japan. December 17-19, 2002)。177-179頁。

食品の微生物学的リスクアセスメントと文化的要因。2003年。西渕光昭。防菌防黴 31(4):218.

Laohaprertthisan, V., A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, and M. Nishibuchi. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. Epidemiol. Infect. 130:1-12.

表1. 収穫時、小売時、および消費時における貝内部温度および輸送中の所用時間と室温

サンプル名	採集日	貝の内部温度(°C)		消費	収穫時から小売時まで		小売時から消費時まで	
		収穫	小売		時間(h)	温度(°C)	時間(h)	温度(°C)
1	2002/2/14	25.5	26	55.5	5	32.5	1	32.5
2	2002/2/14	25.5	26	55.5	5	32.5	1	32.5
3-1, -2, -3	2002/2/20	26	27	50.5	5	26	1	26
4-1, -2, -3	2002/3/5	27	27.5	48.5	5	29	1	29
5-1, -2, -3	2002/3/12	27.5	27	50	5	27	1	27
6-1, -2, -3	2002/3/12	27	28	46	5	27	1	27
7-1, -2, -3	2002/4/1	29	30	44	5	36	1	36
8-1, -2, -3	2002/4/1	31	31	50.5	5	37	1	37
9-1, -2, -3	2002/4/17	29.5	28	51.5	5	32	1	32
10-1, -2, -3	2002/4/17	29	28	50	5	32	1	32
11-1, -2, -3	2002/4/30	29	28.5	49.5	5	32	1	32
12-1, -2, -3	2002/4/30	29	28	50	5	32	1	32

表2. 収穫時、小売時、および消費時における腸炎ビブリオ総菌数および病原性株 (*tdh+* or *trh+*) のMPN

サンプル名	サンプリング時期	貝		MPN / 貝10 g					
		プールした個数	総重量 (g)	腸炎ビブリオ総菌数		<i>tdh+</i> 腸炎ビブリオ		<i>trh+</i> 腸炎ビブリオ	
				直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法
1	収穫	1	3.5	23	23	<3	<3	<3	<3
	小売	1	3.5	43	43	<3	<3	<3	<3
	消費	1	3.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
2	収穫	1	3.5	75	75	<3	<3	<3	<3
	小売	1	3.5	750	750	<3	<3	<3	<3
	消費	1	3.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3-1	収穫	3	10.5	240	240	<3	<3	<3	<3
	小売	3	10.5	460	460	<3	<3	<3	<3
	消費	3	10.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3-2	収穫	6	21	1,100	1,100	<3	<3	<3	<3
	小売	6	21	93	240	<3	<3	<3	<3
	消費	6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3-3	収穫	9	31.5	460	93	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	460	2,400	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
4-1	収穫	3	10.5	460	460	<3	<3	<3	<3
	小売	3	10.5	4,600	750	<3	<3	<3	<3
	消費	3	10.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
4-2	収穫	6	21	460	1,100	<3	<3	<3	<3
	小売	6	21	2,100	1,500	<3	<3	<3	<3
	消費	6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表2. 収穫時、小売時、および消費時における腸炎ビブリオ総菌数および病原性株 (*tdh+* or *trh+*) のMPN

サンプル名	サンプリング時期	貝		MPN / 貝10g							
		プールした個数	総重量 (g)	腸炎ビブリオ総菌数		<i>tdh+</i> 腸炎ビブリオ		<i>trh+</i> 腸炎ビブリオ			
				直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法		
4-3	収穫	9	31.5	15	43	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	2,400	2,400	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
5-1	収穫	3	10.5	150	150	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	3	10.5	24,000	9,300	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	3	10.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
5-2	収穫	6	21	930	1,100	3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	6	21	15,000	46,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
5-3	収穫	9	31.5	1,100	1,100	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	110,000	9,300	<3	<3	<3	<3	<3	3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
6-1	収穫	6	21	9,300	24,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	6	21	110,000	110,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
6-2	収穫	9	31.5	46,000	110,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	15,000	46,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
6-3	収穫	12	42	24,000	110,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	小売	12	42	110,000	110,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	消費	12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表2. 収穫時、小売時、および消費時における腸炎ビブリオ総菌数および病原性株 (*tdh+* or *trh+*) のMPN

サンプル名	サンプリング時期	貝		MPN / 貝10 g							
		プルした個数	総重量 (g)	腸炎ビブリオ総菌数		<i>tdh+</i> 腸炎ビブリオ		<i>trh+</i> 腸炎ビブリオ			
				直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法		
7-1	収穫 小売 消費	6	21	230	240	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		6	21	7,500	3,900	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		6	21	9	9,300	<3	<3	<3	<3	<3	<3
7-2	収穫 小売 消費	9	31.5	150	150	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		9	31.5	1,500	390	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
7-3	収穫 小売 消費	12	42	93	43	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		12	42	460	460	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		12	42	<3	4	<3	<3	<3	<3	<3	<3
8-1	収穫 小売 消費	6	21	15,000	15,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		6	21	43,000	4,300	<3	<3	<3	<3	<3	30
		6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
8-2	収穫 小売 消費	9	31.5	24,000	2,100	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		9	31.5	24,000	9,300	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
8-3	収穫 小売 消費	12	42	2,100	21,000	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		12	42	15,000	7,500	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
9-1	収穫 小売 消費	6	21	15,000	15,000	<3	<3	<3	<3	3	3
		6	21	15,000	7,500	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		6	21	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表2. 収穫時、小売時、および消費時における腸炎ビブリオ総菌数および病原性株 (tdh+ or trh+) のMPN

サンプル名	サンプリング時期	貝		MPN / 貝10 g			MPN / 貝10 g		
		パールした個数	総重量 (g)	腸炎ビブリオ総菌数		tdh+ 腸炎ビブリオ		trh+ 腸炎ビブリオ	
				直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法
9-2	収穫	9	31.5	7,500	7,500	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	24,000	24,000	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
9-3	収穫	12	42	4,300	4,300	<3	<3	<3	30
	小売	12	42	46,000	46,000	<3	<3	<3	<3
	消費	12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3
10-1	収穫	9	31.5	15,000	9,300	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	46,000	46,000	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
10-2	収穫	12	42	46,000	3,900	<3	<3	3	3
	小売	12	42	4,300	4,300	<3	<3	3	<3
	消費	12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3
10-3	収穫	15	52.5	24,000	9,300	<3	<3	<3	<3
	小売	15	52.5	9,300	9,300	<3	<3	<3	<3
	消費	15	52.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
11-1	収穫	9	31.5	12,000	12,000	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	7,500	1,500	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
11-2	収穫	12	42	4,300	4,300	3	<3	<3	<3
	小売	12	42	15,000	9,300	<3	<3	<3	<3
	消費	12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表2. 収穫時、小売時、および消費時における腸炎ビブリオ総菌数および病原性株 (*tdh*+ or *trh*+) のMPN

サンプル名	サンプリング時期	貝		MPN / 貝10 g					
		プールした個数	総重量 (g)	腸炎ビブリオ総菌数		<i>tdh</i> + 腸炎ビブリオ		<i>trh</i> + 腸炎ビブリオ	
				直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法	直接PCR法	分離培養PCR法
11-3	収穫	15	52.5	2,300	2,300	3	3	<3	<3
	小売	15	52.5	7,500	4,300	<3	<3	<3	<3
	消費	15	52.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
12-1	収穫	9	31.5	7,500	2,300	<3	<3	<3	<3
	小売	9	31.5	46,000	46,000	<3	<3	<3	<3
	消費	9	31.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3
12-2	収穫	12	42	3,900	2,300	3	3	<3	<3
	小売	12	42	2,100	930	<3	<3	<3	<3
	消費	12	42	<3	<3	<3	<3	<3	<3
12-3	収穫	15	52.5	24,000	24,000	<3	<3	<3	<3
	小売	15	52.5	2,100	2,100	<3	<3	<3	<3
	消費	15	52.5	<3	<3	<3	<3	<3	<3

表3. 貝の摂食に関する聞き取り調査の結果

被質問者番号	質問/回答		
	貝を食べるか否か	一度に何個食べるか	1年に何度食べるか
1	はい	20	2 - 3
2	はい	12 - 20	5
3	はい	15 - 20	6
4	はい	10	12
5	はい	20 - 30	10
6	はい	10	6
7	はい	3 - 5	3
8	はい	30	2
9	はい	20	4
10	はい	30	3
11	はい	15	3
12	はい	30	5
13	はい	20	3 - 4
14	はい	20	5

分担研究報告
腸炎ビブリオの低浸透圧における死滅様式

熊谷 進 (東京大学)

要旨

低食塩濃度と低浸透圧の死滅に及ぼす影響を調べた結果 (図 2・3, 4) から、真水で洗浄した際に腸炎ビブリオが急速に死滅するのは、食塩濃度が低いためではなく、低浸透圧にさらされたためであり、浸透圧が海水程度であれば低食塩濃度でも 1 時間は腸炎ビブリオが生残できることが明らかとなった。低浸透圧での死滅とイオンの関係を調べた結果、同じ低浸透圧下での死滅は、NaCl のみよりも、Mg²⁺、Ca²⁺も存在する場合の方が死滅し難いことが示された。増殖時期と、低浸透圧での死滅の関係を検討した結果、対数増殖期の菌に比べ、定常期初期および定常期の菌は低透圧ストレスに対して抵抗性が高く、死滅し難かった。

A. 研究目的

菌の生残に関わる要因は数多くあるが、本実験では、食品の取り扱い過程における菌の制御および、汽水域を含む沿岸海域での生態の解明のために有用な知見を得る目的で、低浸透圧での腸炎ビブリオの死滅を詳細に検討した。

腸炎ビブリオは 3%~3.7%の塩濃度である海水中に常在し、生存・増殖に食塩を必要とすることが知られている。そのため、腸炎ビブリオ食中毒の予防法として、魚介類を真水で洗浄することが推奨されてきた。また、沿岸海水中等の環境に生息している菌は、降雨や河川の流入等の要因により塩分濃度の低い状況、または塩分を欠く状況に曝露されることが多いものと考えられる。しかし、食塩の存在しない環境中において、腸炎ビブリオが死滅するのは、食塩濃度が低いことによるのか、浸透圧が低いことによるのかは不明である。本実験ではこのことについて検討した。あわせて、海洋環境中には NaCl のほかにも Mg²⁺等のイオンが存在し、ビブリオ属

菌の代謝上での重要性が報告されている (Lohia et al . 1995, Bhattacharya et al. 2000)。低浸透圧にさらされた場合の死滅に、陽イオンの種類が関与しているかどうかを検討した。また、多くの菌種で対数増殖期から定常期になる