

図3-2. マルチプレックス(2,3plex)増幅時と競合条件下(competitive, -以降は対立遺伝子を表す)増幅時の検量線

*est* (STp, STh)と *elt* の triplex 反応における(e)*est*, (f)*elt*

*est* (STp)と *est* (STh)の duplex 反応における(g)*est* (STp), (h) *est* (STh)

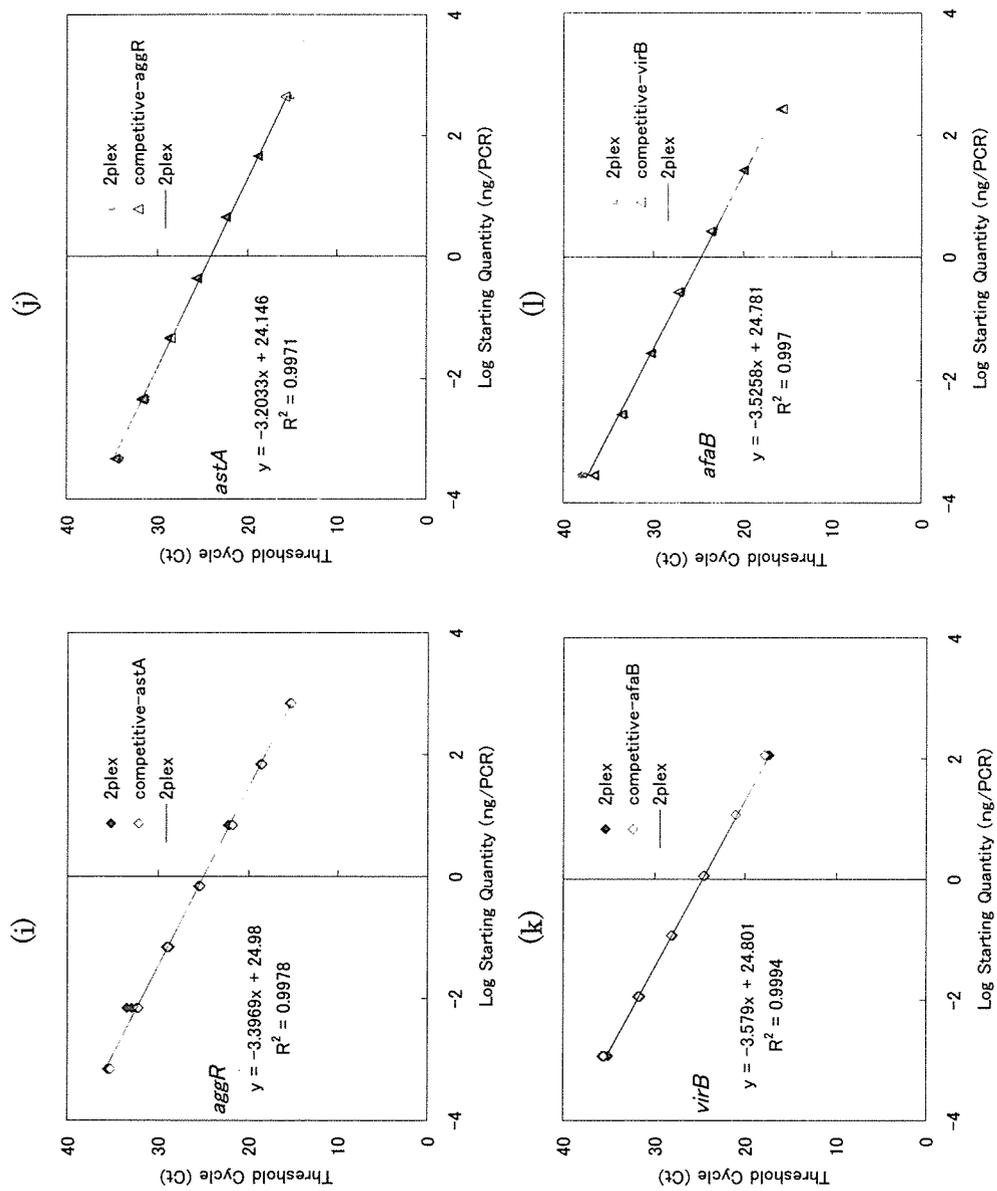


図3-3. マルチプレックス(2,3plex)増幅時と競合条件下(competitive, -以降は対立遺伝子を表す)増幅時の検量線

*aggR*と*astA*のduplex反応における(i)*aggR*, (j)*astA*

*virB*と*afaB*のduplex反応における(k)*virB*, (l)*afaB*

L11241 (GenBank ID ナンバー)

(*Escherichia coli* enteroaggregative heat — stable enterotoxin 1 (astA) gene, complete cds.)

ORIGIN

```
1 ttgggetatc gatgaacgat atcctcatcg cctgtgtgga tggcctgaaa ggcttctcgg
61 atgcatcaa cacagtatat ccgaaggccc gcatccagtt atgcatcgtg catatggtgc
121 acaacagcct gcgcttcgtg tcatggaagg actacaaagc cgtcactcgc gacctgaaag
//
```

囲み文字;リアルタイムPCRプライマー

太字;リアルタイムPCRプローブ

網掛け;PCRプライマー

下線;S81691, AF160995, AF160998, AF161000, AF411067, AY502963 と比較した場合の変異箇所

図4. *astA* の遺伝子配列の比較

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 協力研究報告書

魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

#### 研究要旨

冷凍エビにおけるサルモネラ接種実験の結果、血清型 Weltevreden および Senftenberg は冷凍保存エビにおいて、特に $-30^{\circ}\text{C}$ で菌数が長期間維持されることが確認できた。エビの多くは海外から冷凍された状態で輸入され、以後冷凍流通していることから、サルモネラ汚染があった場合、長期間生存することが考えられる。エビを解凍する時にはサルモネラ汚染を広げないように、解凍したエビや解凍水からの二次汚染の防止、手洗いの励行、調理器具の洗浄消毒等衛生管理を行うことが必要である。

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

金子通治 山梨県衛生公害研究所

野田裕之 山梨県衛生公害研究所

#### A. 研究目的

本研究事業の昨年度に実施した輸入魚介類のサルモネラ汚染実態調査の結果、エビのサルモネラ汚染（汚染率 2.4%、このうちブラックタイガーでの汚染率 4.3%）

<sup>1)</sup> が判明した。そこで、エビの海外からの輸入形態が冷凍流通になっていることから、冷凍保存下におけるサルモネラの生残性を明らかにした。保菌部位は体内と体表の2種類を、保存温度は食品の流通冷凍温度を鑑み $-10^{\circ}\text{C}$  から $-30^{\circ}\text{C}$ の3種類を設定し検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 接種菌株

前年度の研究<sup>1)</sup>においてインドネシア産ブラックタイガーから分離された *Salmonella* Weltevreden(以下 SW と略す) および一昨年度の野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究<sup>2)</sup>においてタイ産チリペッパーから分離された *Salmonella* Senftenberg(以下 SS と略す) を使用した。

##### 2. 接種検体

インドネシアで海水飼育された同一ロットのブラックタイガー（冷凍保存、無頭、殻付き、重量 $17.4 \pm 1.6$  g）を仲卸店で購入した。購入後、サルモネラの汚染の有無、一般生菌数および大腸菌群数を以下の方法で

測定した。検体 4 匹を細切、混合後、サルモネラの定性試験は 25g をストマフィルター（クレオス）にとり、BPW(OXOID)を 225ml 加えて 2 分間混和し、35°C 24 時間培養した。BPW 培養液を Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth (RV,OXOID) 10 ml に 0.1 ml、Tetrathionate Broth (TT, OXOID) 10 ml に 1 ml をそれぞれに接種し、ウォーターバスで 42°C 24 時間培養した。RV、TT 培養液をボルテックス後、XLD(OXOID) に画線し、35°C 24 時間培養し、サルモネラの汚染の有無を確認した。一般生菌数および大腸菌群数は、検体 10 g をストマフィルターにとり、リン酸緩衝希釈(PBS) 90 ml を加えて混和後 2 ml を分取し、このうち 1 ml を 9 ml の希釈液で  $10^{-4}$  まで 10 段階希釈した。検体液および段階希釈検体液 1ml を一般生菌数は 20 ml の標準寒天培地（栄研器材）で、大腸菌群数は 20 ml の XM-G 寒天培地（日水）で混和し、重層して、一般性菌数は 35°C 48 時間後、大腸菌群数は 35°C 22 時間後、カウントした。さらに、一般生菌数および大腸菌群数は、殻を取ったエビについても同様に測定した。

### 3. 菌液の作製

TBS で 24 時間培養した菌液を PBS で 100 倍希釈し、それを接種菌液（約  $7.0 \log$  CFU/ml）とした。菌数の測定方法は、接種菌液をさらに  $10^5$  希釈し、その 0.1ml を Trypticase soy agar に塗抹し 37°C にて 18 時間培養し生育したコロニー数から算出した。

### 4. 菌の接種方法

冷凍されたエビを 20°C の温浴中で短時間に解凍し、体表と体内の 2 通りの方法で接種した。体表：殻付きのエビ 1 匹をスト

マフィルターに入れ、体表全体に  $50 \mu\text{l}$  を接種し、冷凍保存した。体内：殻を除いてから注射器で腸管付近の 3 カ所に注射器を用いて計  $50 \mu\text{l}$  接種し、ストマフィルターに入れ、冷凍保存した。

### 5. 冷凍保存温度および保存期間

保存温度は  $-10^\circ\text{C}$  (MIR-253 三洋電機(株))、 $-20^\circ\text{C}$  (MDF-U536D 三洋電機(株))、 $-30^\circ\text{C}$  (MDF-U442 三洋電機(株)) の 3 温度、保存期間は 1、2、4、8、12 週間の 5 期間とした。

### 6. 菌数測定

1 検体は接種部位・保存温度・保存期間ごとに 3 匹を使用した。検体を 20°C の温浴で短期間に解凍し、検体の 9 倍量の PBS を加えた。体表に接種した検体は、ストマッカー袋を 2 分間手もみで混和し、検体原液とした。体内に接種した検体はストマッカーで 1 分間処理し、検体原液とした。検体原液を PBS で 10 倍および 100 倍希釈し、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液の 0.1 ml を XLD に 2 枚ずつコンラージで塗抹し、35°C で 20~24 時間培養後、出現した黒色のコロニー数を測定した。サルモネラの確定は典型コロニーを釣菌し、TSI（栄研器材）および LIM（日水）で性状を確認後、さらに Salmonella Latex test (OXOID) で凝集を確認した。

## C. 結果

### 1. 接種検体の生菌数と大腸菌数

一般生菌数 ( $\log$  CFU/g) は、殻付きのもの 5.77、殻を取ったもの 5.78、大腸菌群数は、殻付きのもの 2.40、殻を取ったもの 2.30 であった。

## 2. 接種菌量

接種した 50  $\mu$ l の菌数 (log CFU/匹) は、SW が平均 5.43、SS が平均 5.49 であった。

## 3. サルモネラ菌数の変化

3 検体の平均値から得られた 1 匹あたりのサルモネラ菌数 (log CFU/匹) の変化を図 1~6 に示した。なお、接種直後の菌数は、SW・体表が 5.78、SW・体内が 6.17、SS・体表が 5.65、SS・体内 6.18 であった。

①  $-10^{\circ}\text{C}$  保存における SW の消長 (図 1) 体表接種は、1 週間後に 4.75 と減少し、8 週間後には 3.65 とさらに減少したが、12 週間後も 3.60 であった。体内接種は 1 週間後に 5.30 と減少し、8 週間後には 4.94 となったが、12 週間後も 4.96 であった。体内接種の方が菌数の低下が少なかった。

②  $-20^{\circ}\text{C}$  保存における SW の消長 (図 2) 体表接種は、2 週間後に 4.72 と減少したが、12 週間後も 4.44 を維持していた。体内接種は、1 週間後に 5.46 と減少したが、12 週間後も 5.13 を維持していた。 $-10^{\circ}\text{C}$  と同様に体内接種の方が菌数の低下が少なかった。

③  $-30^{\circ}\text{C}$  保存における SW の消長 (図 3) 体表接種は 1 週間後に 5.01 となり、4 週間後に 4.62 と減少したが、12 週間後も 4.80 であった。体内接種は 1 週間後に 5.69 となったが、以後の変化は少なく、12 週間後も 5.60 を維持していた。 $-30^{\circ}\text{C}$  も他の温度と同様に体内接種の方が菌数の低下が少なく、その程度が顕著であった。

④  $-10^{\circ}\text{C}$  保存における SS の消長 (図 4) 体表接種は、2 週間後に 5.02 となり、8 週間後には 4.59 と減少したが、12 週間後も 4.26 であった。体内接種は 1 週間後に 5.60 となったが、12 週間後も 5.10 であった。4

週間後までは体表接種の方で菌数の低下が少ない場合もみられたが、8 週間後以降は体内接種で菌数の低下が少なかった。

⑤  $-20^{\circ}\text{C}$  保存における SS の消長 (図 5) 体表接種は、1~4 週間まで徐々に減少し、8 週間後に 4.58 となったが、12 週間後も 4.44 であった。体内接種は 1 週間後に 5.60 となったが、12 週間後も 5.19 であった。 $-10^{\circ}\text{C}$  と同様に 8 週間後以降、体内接種で菌数の低下が少なかった。

⑥  $-30^{\circ}\text{C}$  保存における SS の消長 (図 6) 体表接種は 1 週間後に 5.32 となり、徐々に減少したが、12 週間後も 5.00 であった。体内接種は 1 週間後に 5.89 となったが、以後の変化は少なく、12 週間後も 5.76 を維持していた。 $-30^{\circ}\text{C}$ ・SS も体内接種の方が菌数の低下が少なく、その程度も顕著であった。

⑦ 冷凍保存温度による違い 血清型、接種方法の違いに関わりなく、 $-10^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-30^{\circ}\text{C}$  と保存温度が低下するほど残存菌数が多かった。とくに、体内接種で  $-30^{\circ}\text{C}$  保存した場合は、1 週間後に減少してから 12 週間後までほとんど減少はみられなかった。

⑧ 血清型による違い 冷凍保存温度、接種方法が同じ場合の SW と SS の残存菌数を比較すると、SSの方が SW より菌数が多い傾向がみられたが、とくに、体表に接種した検体で差がみられた。

## D. 考察

昨年度の当該研究事業において、輸入魚介類のサルモネラ汚染実態調査を実施したところ、エビでは 2.4% と低率であるがサルモネラに汚染していることが判明し

た<sup>1)</sup>。日本は世界有数のエビ輸入国であり、そのほとんどは東南アジアから冷凍されてわが国に輸入されている。エビを汚染したサルモネラが冷凍保存中にどのような消長を示すかを確認することは、エビの冷凍流通や解凍時における衛生管理を考える上で有用である。そこで、昨年度にブラックタイガー（インドネシア産）から検出された Weltevreden および一昨年度にレッドペッパー（タイ産）から分離された Senftenberg の 2 血清型のサルモネラを使用して、エビにサルモネラを接種し、接種部位、冷凍保存温度、保存期間の違いによるサルモネラの消長を検討した。

明確であったのは、冷凍保存温度による相違であり、温度が低下するほど、残存菌数が多くなった。特に、 $-30^{\circ}\text{C}$ の体内接種では 1 週間後に減少したが、以後は 12 週間までほとんど減少がみられなかった。この結果から、最初の冷凍によるダメージで減少はするものの、 $-30^{\circ}\text{C}$ で体内に保存されたサルモネラは冷凍状態で菌数が維持されることが考えられた。これに対し、 $-10$  および  $-20^{\circ}\text{C}$  保存では、保存期間中でも減少傾向がみられた。

接種部位によって初期の菌数に違いがみられたが、これは菌数測定方法が異なっていたことによると考えられた。すなわち、体表接種の検体は 2 分間手もみで混和して検体原液としたが、体内接種の検体は 1 分間ストマッカー処理して検体原液としたため、体内接種の方が効率よく混和され、菌数も多くなったと考えられた。初期の菌数に違いはあるものの体表接種より体内接種の方が菌数の低下が少ない傾向がみられた。とくに、 $-30^{\circ}\text{C}$  保存の場合に顕著

で、前述したように 1 週間以降は 12 週間まで菌数が維持されていた。腸管などの臓器に保菌されたサルモネラは体表汚染よりも長期間生存することが示唆された。エビ養殖場の原水や養殖池などからサルモネラが分離されており<sup>3)</sup>、養殖環境がサルモネラに汚染した場合、エビの腸内等にサルモネラが保菌されることも考えられる。養殖環境のサルモネラを含めた病原体の汚染防止は、安全なエビを生産する上でとくに重要である。

接種したサルモネラの血清型として、SW と SS を使用したが、これは米国において輸入魚介類（主に東南アジア）から高率に分離されるサルモネラの血清型は、1 位が SW、2 位が SS であったことによった<sup>4)</sup>。とくに、SW はベトナムにおいてエビ、さらにウシ、ブタからも高率に分離されると報告されている<sup>5)</sup>。今回の実験では SW より SS の方が冷凍後の残存菌数が多い傾向がみられたが、血清型本来の冷凍保存に対する抵抗性の違いか、今後さらに例数を増やしての検討が必要である。

## E. 結論

エビでのサルモネラ接種冷凍保存実験の結果、サルモネラはエビで冷凍保存された場合、とくに  $-30^{\circ}\text{C}$  では菌数が長期間維持されることが確認できた。エビの多くは海外から冷凍された状態で輸入され、以後冷凍流通している。サルモネラ汚染があった場合、長期間生存することが考えられる。エビを解凍する時にはサルモネラ汚染を広げないように、解凍したエビや解凍水からの二次汚染の防止、手洗いの励行、調理器具の洗浄消毒等衛生管理を行うことが

必要である。

## F. 発表

### 1. 論文発表

工藤由起子、尾上洋一、中川 弘、高橋淳子、高鳥浩介。小規模液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点とその改善について。日本食品衛生学会誌。47, 119-126, 2006.

Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., Segawa, Y. and Takatori, K. *Salmonella* prevalence, total microbial and spore populations in imported spices to Japan. J. Food Prot. 69:2519-2523, 2006.

Otomo, Y., Abe, K., Odagiri, K., Shiroto, A., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Detection of *Salmonella* in spent hens and eggs associated with food-borne infections. Avian Diseases. In press.

### 2. 学会発表

金子通治、浅井良夫、森田幸雄、大塚佳代子、金子誠二、古川一郎、野田裕之、工藤由起子、高鳥浩介。輸入魚介類におけるサルモネラ汚染に関する研究。第27回日本食品微生物学会学術総会。平成18年9月。大阪。

右井淳子、近藤和雄、工藤由起子。穀物加工品および原料におけるサルモネラおよび黄色ブドウ球菌のカテキンによる増殖および生残抑制効果。第92回日本食品衛生学会学術講演会。平成18年10月。愛知。

## G. 文献

- 1) 工藤由起子ら：魚介類のサルモネラ汚染に関する研究、細菌性食中毒の予防に関する研究（平成17年度 総括・分担研究報告書）73-88 (2006)
- 2) 工藤由起子ら：野菜・香辛料のサルモネラ汚染に関する研究、細菌性食中毒の予防に関する研究（平成16年度 総括・分担研究報告書）61-83 (2005)
- 3) Brett Koonse et al. : *Salmonella* and the Sanitary Quality of Aquacultured Shrimp. J. Food Prot., 68: 2527 - 2532 (2005)
- 4) Maxine L. Heinitz et al. : Incidence of *Salmonella* in Fish and Seafood, J. Food Prot., 63: 579-592 (2000)
- 5) Tran Thi Phan et al. : Contamination of *Salmonella* in Retail Meats and Shrimps in the Mekong Delta, Vietnam, J. Food Prot., 68: 1077 - 1080 (2005)

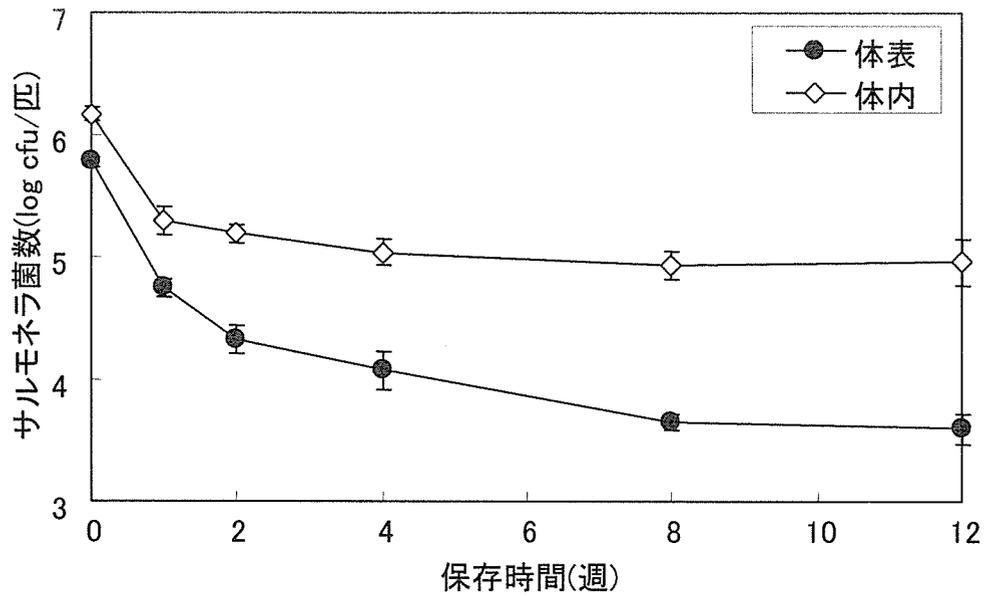


図1 -10°C保存における血清型Weltevredenの消長

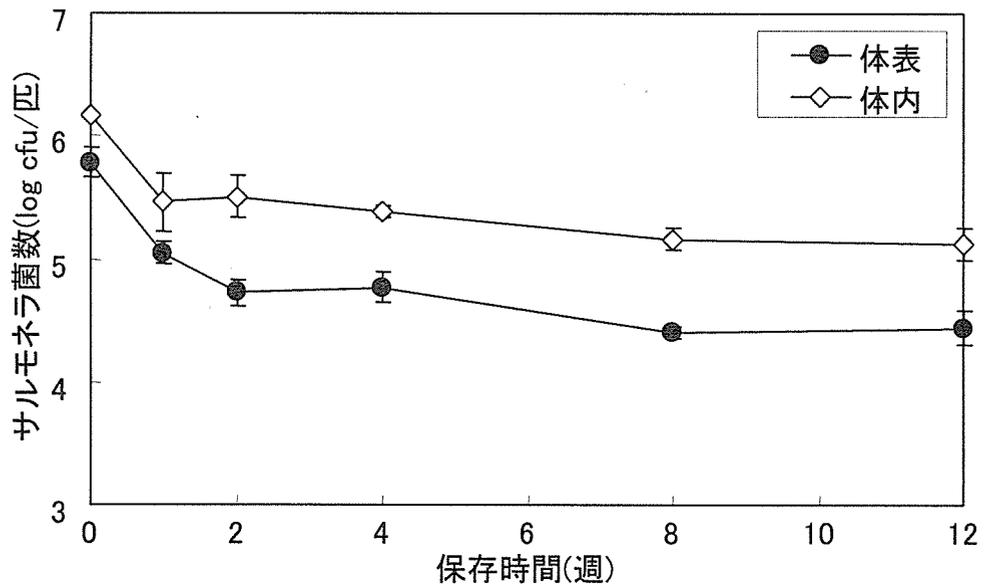


図2 -20°C保存における血清型Weltevredenの消長

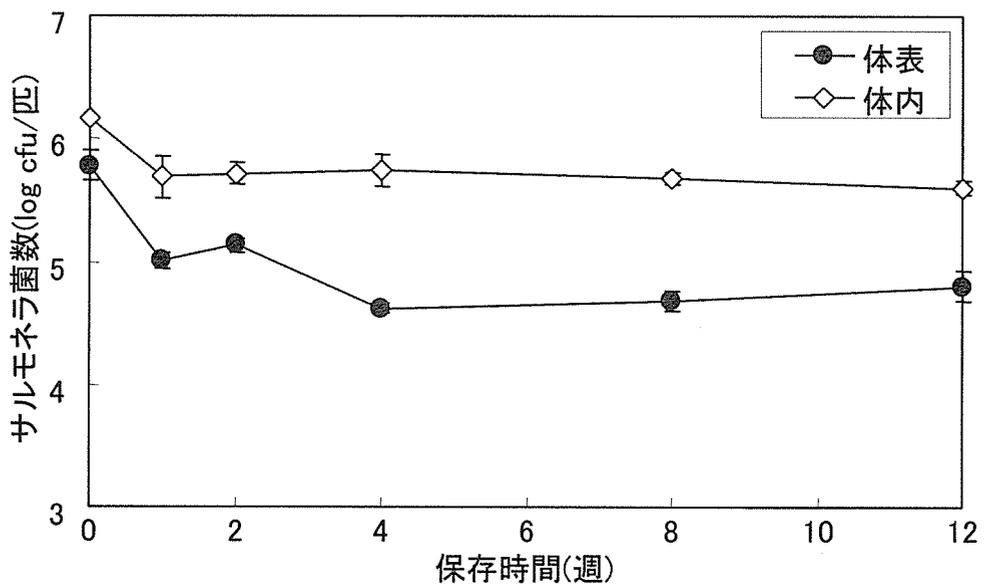


図3 -30°C保存における血清型Weltevredenの消長

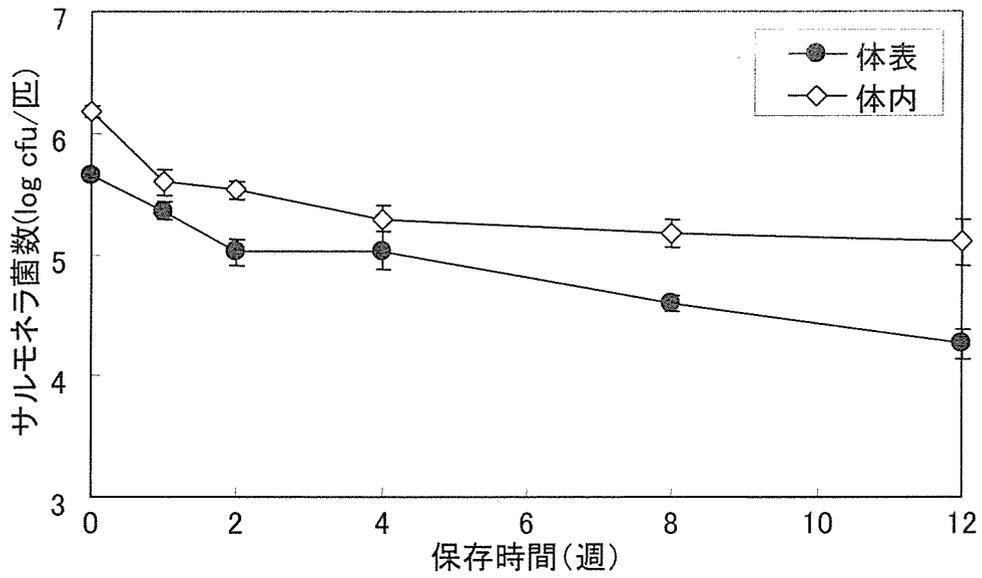


図4 -10°C保存における血清型Senftenbergの消長

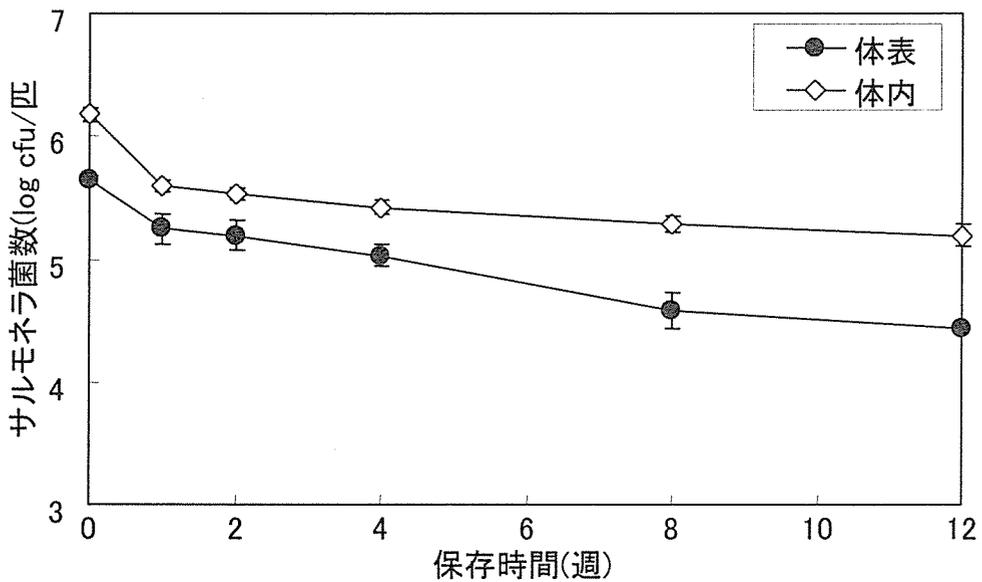


図5 -20°C保存における血清型Senftenbergの消長

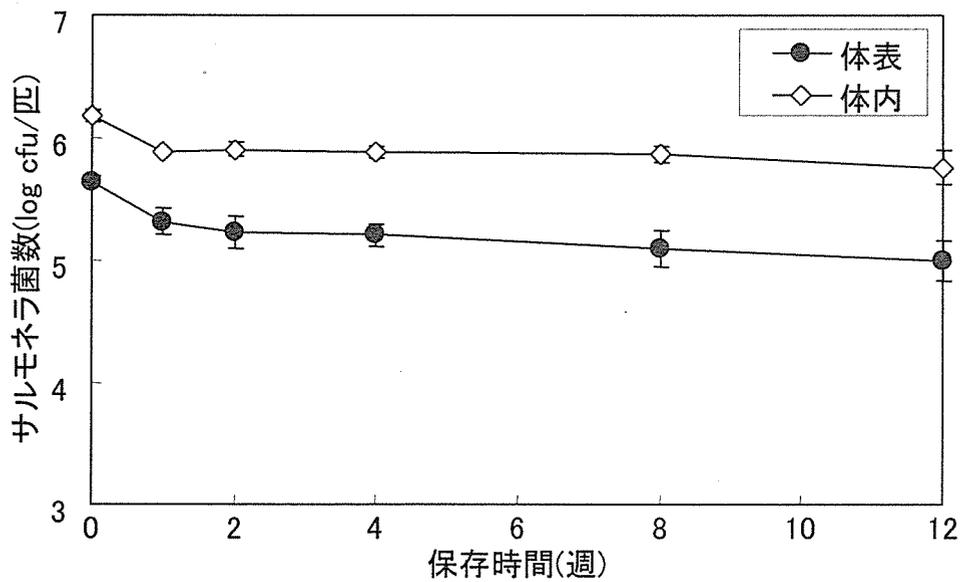


図6 -30°C保存における血清型Senftenbergの消長

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および

サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究報告書

食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

研究要旨

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ 101 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果の得られた事例は 6 件（サルモネラ 5 件および病原性大腸菌（腸管出血性大腸菌） 1 件であった。その結果から、病原物質の推定摂取量は、腸管出血性大腸菌においては 9 cfu 以下、サルモネラ（血清型 Montevideo、Agona、Enteritidis、04:H:eh, NT）においては患者一人当たりについて 330 MPN〜360,000,000 cfu であった。この結果から、非常に少ない摂取量でも感染が成立することが前年度に引き続き示された。

研究協力者

工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所	宮城県	保健環境センター
大分県	衛生環境研究センター	静岡市	衛生研究所
奈良県	福祉部健康安全局		

A. 研究目的

細菌性食中毒の予防対策には近年世界的に普及しているリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が求められている。日本においても取り組みが進みつつあるが、ほとんどが海外のデータを用いたリスクアセスメントであるため、日本にそのまま導

入することは難しい。特に、日本では生食の嗜好が強く、魚介類、卵、肉などは海外の食生活と大きく異なるものもあり、対象食品の日本人の摂食状況として摂食頻度や摂食量などの数値を考慮することが必要である。

このため、本研究では平成 16 年度から

の2年間に引き続き、日本で問題になっている主要な食中毒原因菌による実際の食中毒事例を調査し摂食状況や発症菌量を明確にすることを目的として各自治体の協力により事業を進めることとした。

## B. 研究方法

平成18年度の食中毒事例における原因食品中の食中毒菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ101自治体から承諾を得た。依頼項目として、原因物質名、発生年月日、患者数(人)、摂食者数(人)、原因食品名、原因食品中の菌数、原因食品の推定摂食量、病因物質の推定摂取量、検査までの検体の保管状況、検査方法などについて指定した報告方法に沿って詳細な情報を取りまとめた。

## C. 研究結果

調査依頼による協力自治体は101自治体であったが、実際に測定結果の得られた事例は6件(前年度の未報告を1件含む)であった。内訳は、サルモネラ5件および病原性大腸菌(腸管出血性大腸菌)1件であった(表1)。その結果から、病原物質の推定摂取量は、サルモネラにおいては患者一人当たりについて330 MPN(血清型Montevideo)、1500 cfu未満(血清型Agona)、259,000 cfu(血清型04:H:eh, NT)、72,000,000-360,000,000(血清型Enteritidis)、腸管出血性大腸菌においては259,000 cfuの摂取が推定された。この結果から、非常に少ない菌

数の摂取でも発症した事例があった。

## D. 考察

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまでEnteritidisやTyphimuriumについては比較的知見が多く昨年までも結果が得られているが、今年度は異なる血清型による3事例の事例が報告された。少数の感染菌数であることが報告された。

事例1(血清型Montevideo)では、介護老人保健施設にて提供されたグリーンサラダ(一食55g、このうちカイワレ大根10g)において摂食者96人中12人が発症した。汚染菌数は6.6 MPN/gであり、特に、その中の材料であるカイワレ大根において960 MPN/gの汚染が検出された。カイワレ大根が高濃度汚染であったことから、これが原因食材であった可能性が高いと考えられる。一人当たりの摂取菌量が330 MPNであることが推測されているが、原因食品中での汚染の偏りが存在したことも考えられた。

事例2(血清型Enteritidis)では、保育園で給食を介して摂食者83人中39人が発症した。給食残品からは検出されなかったため、原因食品が不明であったものの、果実や野菜の切りくず残品からEnteritidisが検出され、その菌数は30 cfu/gであった。しかし、皮などの切りくずのため実際の給食に使われた材料の汚染量が不明であり摂取菌数は推定できなかった。推測ではあるが、給食残品から

は検出されず皮などの果実や野菜くずからは検出されたことから、摂取菌数は低いことが考えられる。

事例3（血清型 Enteritidis）では、無許可施設の飲食店において販売されたいなり寿司を摂食した59人中29人が発症した。汚染菌数は1,800,000cfu/gであり、いなり寿司1個が40gであり一人当たり1から5個を摂食したことから、摂取菌数は72,000,000から360,000,000cfuと推測された。

事例4（血清型 04:H:eh,NT）では、家庭で作ったちらし寿司を摂食した9人中8人が発症した。材料には手巻き寿司用ウナギ蒲焼き（中国産冷凍）と自家製の錦糸卵が含まれ、その他にご飯と市販の寿司ネタ（袋入り）が使用された。汚染菌数は700cfu/gであり、370gを一人が摂食したことから259,000cfuが一人当たりの摂取菌数と推定された。

事例5（血清型 Agona）では、福祉施設で提供したおからの入り煮を摂食した72人中12人が発症した。汚染菌数は30cfu/gであり、摂食食品量は50gであることから一人当たり1,500cfuの摂取であると推測された。

腸管出血性大腸菌の事例（事例6）では、精肉店で販売された牛レバー刺しを摂食した3人の全員が発症した。汚染菌数は0.18-0.04cfu/gであり、一人当たり50g以下を摂食したことから、2-9cfuが摂取菌数であった。しかし、試験までの検体の冷凍保管の影響について考慮

する必要がある。

事例3では、冷蔵で5日間の保存後に食品が検査されたことから、冷蔵温度がそれほど低くない場合はその間にサルモネラが増殖した可能性も考えられる。一方、他の事例では冷凍保存された検体を試験しているため菌が増殖しなかったが、逆に一部死滅した可能性がある。菌数の計測結果には原因菌の低温での生残性や増殖性が影響しているため、検体の保存状況を考慮して考察する必要がある。

本事業は、食中毒発生現場に最も近い地方自治体の協力のもとで実施してきたが、各自治体の積極的な参加ではあったが、実際細菌性食中毒事例として調査できたのは3年目である今年度も例年とほぼ同様に6件にすぎなかった。食中毒発生予防のためには、病因物質の解析に限らず病因物質の推定摂取量の把握も重要な要因であり、さらに継続的な事業による重要性の広い理解とデータの蓄積が必要ではないか考える。

## E. 結論

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌数の測定を全国の地方自治体に依頼したところ101自治体から承諾を得たが、実際に測定結果を得られた事例はサルモネラ5件、腸管出血性大腸菌1件の計6件であった。

病原物質の推定摂取量は、腸管出血性大腸菌においては9cfu以下、サルモネラ（血清型 Montevideo、Agona、Enteritidis、

04:H:eh, NT)においては患者一人当たりについて 330 MPN〜360, 000, 000 cfu であった。この結果から、非常に少ない摂取量でも感染が成立することが前年度に引き続き示された。

食中毒事例の原因食品中の菌数について得られた調査データには限りがあるが、リスクアセスメントに必要な貴重なものである。今後もさらに蓄積する必要があると思われる。

#### 謝 辞

本事業に関して、該当事例の有無にかかわらず積極的に調査協力を承諾していただいた 101 地方自治体の関係部局各位に深謝致します。

表 1. 事例の詳細

事例番号	1	2	3
原因物質	サルモネラ (血清型: Montevideo (07:H, g, m, s))	サルモネラ (血清型: Enteritidis (09:g, m:-))	サルモネラ (血清型: Enteritidis (09:g, m:-))
発生年月	2005年8月	2006年6月	2006年8月
患者数(人)	12	39	29
摂食者数(人)	96	83	59
原因食品名	グリーンサラダ (カイワレ大根含む)	給食(野菜、果物等)	いなり寿司
原因食品中の菌数	グリーンサラダ: 6.6 MPN/g (カイワレ大根: 960 MPN/g)	30 cfu/g	$1.8 \times 10^6$ cfu/g
原因食品の推定摂取量	グリーンサラダ: 55 g (うちカイワレ大根: 10 g)	不明	40 から 200g
病因物質の推定摂取量	330 MPN (ただし、カイワレ大根量で換算: 9,600 MPM)	不明	$7.2 \times 10^7$ - $3.6 \times 10^8$ cfu
検査までの検体の保管状況	-20℃にて 96 時間	冷凍 約 6 日間	冷蔵 約 5 日間

(次項につづく)

表 1. 事例の詳細 (続き)

事例番号	4	5	6
原因物質	サルモネラ (血清型 : 04:H:eh, NT)	サルモネラ (血清型 : Agona (04:g, f, s:-))	病原性大腸菌 (腸管出血性大腸菌 : VT2 産生)
発生年月	2006 年 9 月	2006 年 9 月	2006 年 10 月
患者数 (人)	8	17	3
摂食者数 (人)	9	72	3
原因食品名	自家製ちらし寿司	おからの炒り煮	牛レバ刺し
原因食品中の 菌数	700 cfu/g	30 cfu/g 未満	0.04~0.18 cfu/g
原因食品の 推定摂取量	約 370 g	50 g	50g 以下
病因物質の 推定摂取量	259,000 cfu	1,500 cfu 未満	2~9 cfu 以下
検査までの検 体の保管状況	-20℃以下 360 時間	冷凍保存 約 3 日間	-18℃ 12 日間

# 分 担 研 究 報 告 書

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

工藤由起子

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究要旨

*Vibrio vulnificus* は、ビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こすことが知られており、日本では毎年感染者が報告されている。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要が求められている。また、魚介類や海水中の汚染について把握する必要がある。さらに、腸炎ビブリオについても海水中の汚染菌数の把握を行うと共に魚類での汚染制御の方法を検証する必要がある。そこで、本研究では以下の 3 つの課題について検討を行った。

- (1) *Vibrio vulnificus* の検査法の検討と海水および魚介類からの検出
- (2) *Vibrio vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討
- (3) 蓄養前後におけるアサリのビブリオ属細菌数の変化

研究協力者

宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
中島 龍一	熊本県保健環境科学研究所	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
右田 雄二	長崎県衛生公害研究所	中村まき子	長崎県衛生公害研究所
小沼 博隆	東海大学海洋学部	神尾 暁	東海大学海洋学部
瀬川 優子	国立医薬品食品衛生研究所		

A. 研究目的

*Vibrio vulnificus* はビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こす。日本では有明海近県の 4 県で発生が多く、1998 年から 2003 年の 5 年間には患者数 94 人（このうち死者 68 人）が報告されている。しかし、原因食品や

汚染源の解明のために海水や生物または食品等からの分離は、競合するほかの海洋細菌によって困難な場合が多い。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要があり、昨年度に続き、海産物からの検出のための増菌及び分離方法を含む培

養方法を中心に検討した。また、東海および九州の海水および海産物について季節に分けて *Vibrio vulnificus* および腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の菌数を調査した。さらに、*V. vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討、加えてアサリの蓄養による浄化効果について検討した。

## B. 研究方法

### 1. *Vibrio vulnificus* の検査法の検討と海水および魚介類からの検出

2006年7月から9月に、熊本県及び静岡県にて海水を採水し *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の増菌培養における問題点を解明するために菌数の増加について培養法および real-time PCR 法で定量した。9倍量の Alkaline Peptone Water (APW) に海水検体を加え 35℃にて増菌培養し、経時的にクロモアガービブリオ培地に塗抹培養し、生育したコロニーを *V. vulnificus*、*V. parahaemolyticus* およびその他の菌に分けそれぞれの菌数を計測した。また、*V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の real-time PCR 法での定量も同一の培養液で行った。また、熊本県の検体では MPN-分離培養法でも測定を行った。さらに、季節消長の測定のために、熊本県および長崎県の沿岸海水を採取し *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の菌数を計測した。静岡県内の海水および市場等で購入した魚介類について *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の検出を試みた。

### 2. *V. vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

当感染症発生の家庭で冷蔵保存されていた「アナジャコ醤油漬け」から *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の検出を行った。APW で増菌しクロモアガービブリオ培地を用いて MPN3 本法による定量法で行った。分離株の血清型別や PFGE 解析を行った。また、当該食品を実験的に作製し *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の生存試験を行った。

### 3. 蓄養前後におけるアサリのビブリオ属細菌数の変化

蓄養は水温約 20℃に保った人工海水で行った。菌数の測定は APW で増菌しクロモアガービブリオ培地を用いた MPN 法で測定した。

## C. 結果

### 1. *Vibrio vulnificus* の検査法の検討と海水および魚介類からの検出

海水検体からの *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の検出では *V. vulnificus* は、7月の検体では培養法で検出されたが、8月以降の検体ではリアルタイム PCR 法では検出されたにもかかわらず、培養法ではほとんど検出されなかった。このリアルタイム PCR 法で得られた *V. vulnificus* の菌数は *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* 以外のその他の菌の菌数の約 1/100 であった。また、*V. parahaemolyticus* は、*V. vulnificus* とは異なり、いずれの検体も

培養法で測定でき、多くの検体でリアルタイム PCR 法と近い定量値であった。さらに、増菌前の検体でのその他の菌は、7月の検体よりも8月以降の検体で10~100倍高い菌数であった。また、APWによる増菌は10~16時間が最適であることがわかった。また、熊本内の同一地点で *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の詳細な季節消長のデータを得ることができ、降水量、海水水温、海水塩分、DO、*V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* 菌数と相関が認められた。さらに、静岡県内ではアサリ及びアオヤギ各1検体計2検体(2.6%)からTDH産生 *V. parahaemolyticus* が検出され、20検体(26.3%)の魚介類から *V. vulnificus* が検出され、その汚染菌量は0.36/gから2,000/gで、特に二枚貝であるアサリやアオヤギからは高頻度に検出された。海水からの *V. parahaemolyticus* (非病原株)と *V. vulnificus* の検出においては、採水定点による差が見られた。また両菌の検出にはほぼ同様の傾向があり、それらの検出と海水温には関連性が認められた。

## 2. *V. vulnificus* 感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

感染症原因食材である塩分濃度17%の「アナジャコ醤油漬け」から高い数値の *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* を検出した。しかし、分離した *V. vulnificus* 株と臨床由来株(01~07抗血清には凝集しないUT株)とのPFGEによる解析では泳動パターンは一致しなかった。また、「アナジャコ醤油漬け」に

関する *V. vulnificus* 及び *V. parahaemolyticus* の生存試験では4°C条件でそれぞれ48~96時間までの生存を確認した。

## 3. 蓄養前後におけるアサリのビブリオ属細菌数の変化

検体採取日に試験を開始しTDH遺伝子が検出された2検体は、ともに蓄養後TDH遺伝子が検出されなくなった。

## D. 考察

### 1. *Vibrio vulnificus* の検査法の検討と海水および魚介類からの検出

APWにて35°Cで増菌し分離する方法は、*V. parahaemolyticus* には適しているが、*V. vulnificus* には不十分であると思われる。また、*V. vulnificus* が培養法で検出されなかったのは、*V. parahaemolyticus* やその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、*V. vulnificus* の効果的な選択増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると思われる。現時点では、リアルタイムPCR法などの遺伝子検出法を取り入れることによって正確に菌数を把握できると考えられた。海水中の *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* の菌数の増減には水温、塩分濃度、降雨量が深くかかわっていることが改めて確認された。しかし、ひとつの環境要因だけでなく、様々な要因が重なって菌数が増えていることが推測された。海水などの環境は複雑な係わり合いがあるため、今後、環境因子のスト