

資料

市販殻付き貝類中の腸炎ビブリオ汚染実態調査

長野英俊, 村上光一, 世良暢之, 堀川和美, 高田智

市場に流通している殻付きのアサリ, サザエ, はまぐり, シジミ等の計20検体について, 腸炎ビブリオ血清型 O3:K6及び TDH (耐熱性溶血毒) 産生腸炎ビブリオの汚染実態を調査した. その結果, 20検体中18検体から腸炎ビブリオを分離したがすべて TDH を産生しない非病原性株であった. MPN3管法での菌数測定の結果, シジミから 1.1×10^5 CFU / 10g の菌量を検出した. さらにサザエ, アサリ, トコブシの3検体から PCR で TDH 遺伝子が検出されたが, これらの検体から血清型 O3:K6及びその他の TDH 産生腸炎ビブリオを分離することができなかった.

[キーワード: 腸炎ビブリオ, 耐熱性溶血毒, 殻付き貝類]

1 はじめに

腸炎ビブリオは海水中に広く存在し, 海水温が20を超えると検出される環境細菌であり, この菌の一部が産生する TDH (耐熱性溶血毒) がヒトへの病原性を示し食中毒を引き起こすと考えられている. この菌の生息環境から明らかなように夏期に海域で採取された魚介類はほとんどこの菌の汚染を受けていると考えられている. このことから腸炎ビブリオ食中毒は夏期に多く発生し, 魚介類の生食習慣のある本邦において重要な食中毒細菌であり汚染の実態解明が急務である. 1994年までは食中毒事例から分離される血清型は O4:K8が主流であったが¹⁾, 1996年頃から分離される血清型に変化がみられ, それまでの主流であった O4:K8から O3:K6へと変化した. この分離血清型の変化により1998年には食中毒発生事例がサルモネラを抜き第1位となった.

現在, 腸炎ビブリオ食中毒から分離される主要な原因血清型であるこの O3:K6は遺伝的に近縁の菌が何らかの要因により急速に広がったと考えられているが, その原因は判明していない²⁾. さらに従来からこの O3:K6は患者からは高頻度に分離することができるが, 食品や環境からの分離は極めて低いことが実情である.

今回, 腸炎ビブリオ O3:K6及び食中毒の原因となる TDH 産生腸炎ビブリオの魚介類中の汚染実態を把握するため, 平成13年厚生科学研究「食品中の微生物汚染実態・挙動の解析」において高感度な検出法を用いて国立感染症研究所と共同で調査を行った. なお本資料は福岡県で実施した検査結果について報告する.

2 方法

2・1 検体

平成13年10月16日から30日にかけて, 県生活衛生課を通じ県内3保健所(筑紫, 久留米, 田川)に設置されている食品衛生広域専門監視班に検体の買い上げを依頼し, 県内で市販されている殻付きの貝類を20検体購入した. 検体の種類及び産地海域を表1に示す.

なお検体は, 殻付きの物はむき身として供試した.

表1 検体名及び産地海域

検体名	産地海域
サザエ	豊前海, 響灘, 玄海灘, 県外産
アサリ	豊前海, 有明海, 県外産
マテ貝	豊前海
いも貝	豊前海
生カキ	県外産
はまぐり	県外産
トコブシ	県外産
シジミ	有明海, 県外産
タイラギ	有明海

2・2 検査方法

検査法は研究班で示された検査法で実施した.(図1) 腸炎ビブリオO3:K6及びTDH産生腸炎ビブリオを分離するため免疫磁気ビーズ及び酵素発色基質を利用したクロモアガー・ビブリオを用いた定性法, 菌数測定としてMPNを, TDH産生腸炎ビブリオの菌数測定のためTDH遺伝子をPCRで確認する方法を用いた.

2・2・1 定性法

検体25gにアルカリペプトン水225mlを加え軽く手揉みし(定性原液), 35~37℃で18時間培養した。(1次増菌), 1次増菌液1mlを10mlの食塩ポリミキシンブイオンに加え培養した(2次増菌). 更に, 1mlを食塩ポリミキシンブイオンで6時間培養後(3次増菌), その1mlを腸炎ビブリオ K6に対する免疫磁気ビーズ(デンカ生研)を用いて最終的に0.1mlに濃縮しクロモアガー・ビブリオ(関東化学)に塗抹した. 培養後, 腸炎ビブリオと思われるコロニーを, ブドウ糖及び乳糖, 白糖の分解性, さらに食塩要求性, 耐性を確認後同定した. さらに腸炎ビブリオと同定された株について TDH 遺伝子の保有を PCR で確認した.

2・2・2 MPN法

調整した定性原液を, 10mlのアルカリペプトン水に各10ml, 1ml, 0.1ml, 0.01ml, 0.001ml加えた後(MPN 3管法, 5段階), 定性法と同様に3次増菌までを行い, 各試験管をクロモアガー・ビブリオに塗抹培養後, 定性法と同様に腸炎ビブリオの同定を行い, 10g当たりの菌数を求めた.

2・2・3 TDH産生腸炎ビブリオの検出

定性法の1次増菌液と2次増菌液について各検体2回PCRでTDH遺伝子の検出を行った. TDH遺伝子が検出された検体についてMPN法の3次増菌液でTDH遺伝子の検出を行い検出された本数から10g当たりの菌数を算出し, TDH産生腸炎ビブリオの菌数とした.

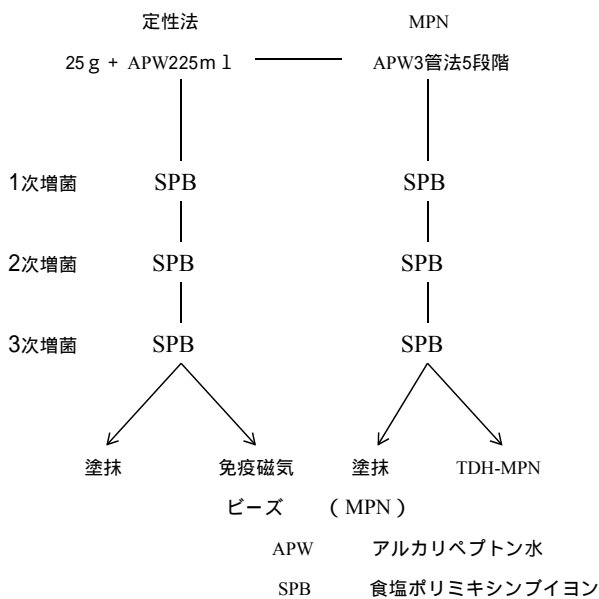


図1 検査方法

3 結果

調査した20検体のMPN法での腸炎ビブリオ菌数, TDH産生腸炎ビブリオの菌数(TDH-MPN)を表2に, TDH遺伝子の確認された3検体の生産海域及び結果を表3に示す.

表2 腸炎ビブリオ検出結果

	検体数	腸炎ビブリオ菌数 (/10g)	TDH-MPN (/10g)
サザエ	6	3未満~750	ND ~ 15
アサリ	4	3.6~1100	ND ~ 15
マテ貝	1	43	ND
いも貝	1	240	ND
生カキ	2	3未満~460	ND
はまぐり	2	7.3~23	ND
トコブシ	1	7500	3未満
シジミ	2	3.6~1.1 × 10 ⁵	ND
タイラギ	1	24000	ND

ND 不検出

表3 TDH 遺伝子検出検体

	海域	菌数	TDH-MPN (/10g)
アサリ	県外産	930/10g	15/10g
サザエ	玄海灘	750/10g	15/10g
トコブシ	県外産	7500/10g	3/10g 未満

今回の調査でサザエ6検体中5検体から腸炎ビブリオが検出され, アサリは4検体すべてから検出された. さらに生カキ1検体, はまぐり2検体, シジミ2検体その他の貝類4検体からも検出され20検体中18検体から腸炎ビブリオが検出された. 菌数はシジミから1.1 × 10⁵/10gが検出された.

TDH産生腸炎ビブリオはアサリ, サザエ, トコブシの各1検体からTDH遺伝子が検出され, 菌数は3~15/10gであった(表3). それぞれの検体から腸炎ビブリオ O3:K6及びTDH産生腸炎ビブリオを分離するため各200株鈹菌し確認を行ったがTDH産生腸炎ビブリオは検出できなかった.

4 考察

高感度な検出法として用いた免疫磁気ビーズは腸管出血性大腸菌 O157等の病原細菌や原虫類の濃縮に用いられ分離率の向上が確認されている. 今回の調査で腸炎ビブリオのK6抗原に対する抗体を感作させたビーズを用いて濃縮を行い, さらに分離培地には酵素発色基質を利用したクロモアガー・ビブリオを用いたがO3:K6及びTDH産生腸炎ビブリオを分離できなかった.

工藤ら³⁾によると今回の調査と同様に免疫磁気ビーズ

法及び酵素発色基質を用いた培地を使用しアサリ貝について調査を行った結果、分離培地では従来から使用されている TCBS 培地よりも腸炎ビブリオの分離率が向上し、腸炎ビブリオ O3:K6の分離率も向上したと報告しているが、分離した全腸炎ビブリオからの O3:K6の割合はわずか0.14%であり、さらなる検出法の検討の必要性が報告されている。

今回の調査においては、PCR で TDH 遺伝子が検出されたが TDH 産生腸炎ビブリオは分離できなかった。このことは O3:K6以外の TDH 産生腸炎ビブリオの存在の可能性とすべての TDH 産生腸炎ビブリオの分離法の検討の必要性が示唆される。

腸炎ビブリオ食中毒の発生は6月から9月にかけて多発し、調査を行った10月においても貝類中には食中毒原因となる TDH 産生腸炎ビブリオが低菌量であるが存在することが確認された。腸炎ビブリオの特徴として温度が 20 を超えると非常に早く増殖することが知られており、平成13年6月には腸炎ビブリオ食中毒の予防対策のため食品衛生法施行規則、食品、添加物等の規格基準が改正され水産食品に腸炎ビブリオの基準が設定されたことから食中毒対策の重要性が認識された結果であり、海域で採取された魚介類の流通から家庭までの低温での保存などに十分な注意を払うことが重要で、飲食店などの食品取扱い施設においては二次汚染と考えられる他食品での食中毒の発生報告もあることから食品の取扱い、保存温度等に十分な注意が必要である。さらに家庭内においても食中毒予防のための同様な注意が必要で腸炎ビブリオ食中毒予防のための啓発を行う必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課：1996，(特集)腸炎ビブリオ1994~1995，病原微生物検出情報， Vol 17，1-2
- 2) 国立感染症研究所 厚生省保健医療局結核感染症課：1999，(特集)腸炎ビブリオ1996~1998，病原微生物検出情報，Vol 20，1-9
- 3) 工藤由起ら：免疫磁気ビーズ法及び酵素発色基質培地を用いた TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6の自然汚染貝からの検出。感染症誌，2001；75：955-960。