

海水および海産魚介の病原ビブリオ汚染について

Contamination of Marine Water and Fish with Pathogenic Vibrios

児 玉 博 英

KODAMA Hirohide

I. はじめに

著者らは前報^{1) 2)}で近年のわが国の微生物による食中毒の発生状況を考察し、一般に細菌による食中毒は、カンピロバクターによるものを除き、夏期の7月から9月までの3ヶ月間に集中して発生し、対照的に、ウイルスによるものは冬期の12月から翌年2月までの3ヶ月間に集中して発生している状況を明らかにした。夏期に多発する細菌による食中毒は、いずれも8月にピークを示しているが、詳細にみると、9月より7月の発生が多い黄色ブドウ球菌やセレウス菌などの盛夏型と、7月より9月の発生が多いサルモネラ、腸炎ビブリオなどの残暑型に分けられる¹⁾。それらの中で、特に腸炎ビブリオは7月から9月までの3ヶ月間に、年間の発生の85%が集中しており、他の細菌による食中毒の同期間内の発生率——例えばサルモネラの60%、病原大腸菌の39%、黄色ブドウ球菌の62%、セレウス菌の62%——と比べて、夏期に極めて

鋭いピークを示していた。

病原ビブリオの中で、腸炎ビブリオ程発生頻度は高くないが、わが国で時折発生するナグビブリオ食中毒 (*Vibrio cholerae* non-01による) についても、著者ら³⁾がその全国の発生状況を調べたところ、90%が7月から9月の3ヶ月間に発生が集中しており、残りも10月の発生であった。

そこで本来、海水性または汽水性の環境細菌である腸炎ビブリオ、ナグビブリオなどの病原ビブリオ食中毒が、何故夏期に集中して発生するのか、その背景を探るために、1998年と1999年の2年間、海水や海産魚介について、これら病原ビブリオによる汚染状況を夏期と冬期で比較検討した。その概要を報告する。

II. 材料と方法

1. 材料

1) 海水：四方漁港と新湊漁港の各4定点を

こだま ひろひで (食物栄養学科)

定め、夏期（1998年8月17日および1999年8月25日）と冬期（1998年12月21日および1999年12月20日）に、それぞれ表層水500mlをポリ容器に採取し、直ちに実験室に搬入した。採水時、現地で水温と、比色法によりpHを測定した（合計32検体）。

2) 海産魚介：県下の鮮魚店10店舗（1998年はA～Eの5店舗、1999年はF～Jの5店舗、表2Aおよび2B）から、富山湾産であることを確認した魚種を各4種選び、検査に必要な最少量を夏期（1998年8月18日および1999年8月26日）と冬期（1998年12月22日および1999年12月21日）に購入し、冷蔵して実験室に搬入した（合計80検体）。

2. 方法

1) 海水からの腸炎ビブリオ（以下 *V.p.*）の分離と定量：海水各200mlを5倍濃度の食塩ポリミキシブイヨン（ニッスイ）50mlおよび5倍濃度のアルカリペプトン水（ニッスイ）50mlにそれぞれ入れ、攪拌し、37℃一夜培養した。次いで、その1白金耳をTCBS寒天平板（栄研）に塗抹し、37℃一夜培養した。*V.p.*を疑うコロニーについては、2%食塩加TSI培地（栄研）および2%食塩加SIM培地（栄研）に37℃一夜確認培養した。*V.p.*の性状に一致した菌株については、食塩を0%、3%、8%および10%それぞれ加えたブイヨン培地（Difco Nutrient Broth）に一夜培養し、耐塩性を確認して、食塩0%および10%加ブイヨン培地に発育せず、食塩3%および8%加ブイヨン培地に発育した菌株を*V.p.*と決定した。

*V.p.*の定量はMPN 3本法により、海水量3段階について行った。即ち、海水10mlは2倍濃度のアルカリペプトン水10ml入り試験管へ、海水1mlは食塩2%加アルカリペプトン水9ml入り試験管へ、海水0.1mlは食塩2%加アルカリ

ペプトン水10ml入り試験管へ、それぞれ入れ、37℃一夜培養した。各試験管の培養液1白金耳をTCBS寒天平板に塗抹し、再び37℃一夜培養後、*V.p.*特有のコロニーの存否を確認し、MPN 3本法の最確数表から、海水100mlあたりの*V.p.*の菌数を算出した。

2) 海水からのナグビブリオ（以下 *V.c. non-01*）の分離：海水200mlを5倍濃度のアルカリペプトン水50mlに入れ、37℃、15時間一次増菌し、次いでその培養液1白金耳を10mlのアルカリペプトン水に入れ、37℃、6時間二次増菌した。この二次増菌培養液1白金耳をTCBS寒天平板とCL-TCBS寒天平板（コリスチンを最終濃度1μg/ml加えたTCBS）を併用して塗抹し、37℃、一夜分離培養した。

*V.c. non-01*を疑うコロニー（コレラ菌と全く同一）については、TSI培地およびSIM培地に37℃、一夜確認培養し、*V.c. non-01*の性状に一致した菌株については、コレラ菌O-1血清とのスライド凝集反応により、O-1でないことを確認した上で、*V.c. non-01*と同定した。

3) 海産魚介からの*V.p.*の分離と定量：魚の頭部各20gを、食塩ポリミキシブイヨン80mlとアルカリペプトン水80mlにそれぞれ投入し、よく攪拌後、37℃、一夜培養した。その後の*V.p.*の分離および同定の手順は前述の海水に準じて行った。

*V.p.*の定量は次のようにして行った。魚の表皮10gを食塩ポリミキシブイヨン90mlに入れ、ストマッカーで60秒処理して10倍希釈の懸濁液を作成し、その10ml、1mlおよび0.1mlの3段階について、海水と同様MPN 3本法により行い、表皮100gあたりの*V.p.*菌数を最確数表から算出した。

4) 海産魚介からの*V.c. non-01*の分離：魚の頭部20gをアルカリペプトン水80mlに投入し、

よく攪拌後、37℃、15時間一次増菌した。二次増菌以後の分離、同定の手順は、前述の海水に準じて行った。

Ⅲ. 結果と考察

1. 海水について (表1)

1) 腸炎ビブリオ (*V.p.*) 汚染：夏期の検査では、1998年、1999年ともに8定点中7定点から *V.p.* が分離された。四方漁港では4定点総てから、新湊漁港では4定点中3定点から分離されたが、1998年には定点S-3が、1999年には定点S-1が陰性であった。しかしながら、各年で陽性を示した各7定点での *V.p.* の菌数は極めて少なく、海水100mlあたり、4またはそれ以下であった。採水時の水温は1998年が25~26℃、1999年は29~30℃であり、pHは1998年が7.8~8.2、1999年が8.2~8.4の範囲であった。夏期の漁港海水のこのような環境は、栄養分さえ豊富であれば、*V.p.* の増殖にとって理想的な環境条件であり、夏期に海水の *V.p.* 汚染率が高くなるのは自然現象として当然のことと考えられる。

冬期の検査では、1998年が8定点中6定点から *V.p.* が分離され、四方漁港、新湊漁港ともに4定点中3定点が陽性であった。しかしながら1999年には、8定点総てが陰性であった。*V.p.* が分離された1998年の6定点での *V.p.* の菌数は総て海水100mlあたり、4かそれ以下であった。採水時の水温は1998年が13~14℃、1999年が8~11℃であり、pHは両年とも8.2~8.4であった。1998年と1999年の冬期の *V.p.* 分離率の違いは、少なくとも一部はこの水温の差に起因しているように思われる。

2年間の *V.p.* の分離率の集計を表1の下欄に示した。夏期には16定点中14定点から *V.p.* が分離され、陽性率は87.5%であったが、冬期には16定点中6定点のみからの分離で、陽性率は

37.5%と、かなり低かった。このような季節による海水の *V.p.* 汚染率の違いが、海産魚介の季節による汚染率の違いに反映されるものと思われる。

2) ナグビブリオ (*V.c. non-01*) 汚染：夏期の検査では、1998年に8定点中4定点から、1999年には8定点中1定点から *V.c. non-01* が分離された。合計して5定点の陽性例のうち、四方漁港は1998年のY-4の1定点のみで、他の4定点は新湊漁港であり、特に定点S-1は両年とも陽性であった。*V.c. non-01* の生息環境としては、夏期のこれら漁港の海水はpHが本菌に最適とされる8.6~8.8よりやや低いので、*V.p.* に対する程、最適とはいえないまでも、やはり増殖には良好な環境を提供している。

冬期の検査では、2年間を通じて1999年に新湊漁港の1定点 (S-1) から *V.c. non-01* が分離されたのみであった。

V.c. non-01 の分離率の2年間の集計を表1の下欄に示した。夏期には16定点中5定点から *V.c. non-01* が分離され、陽性率は31.3%であったが、冬期には16定点中1定点のみで、陽性率は6.3%であった。*V.p.* の分離率に比べると、夏期、冬期ともに著しく低い、季節による違いは明瞭であった。

このように、海水の *V.p.* や *V.c. non-01* などの病原ビブリオによる汚染率には明瞭に季節による違いが認められ、*V.p.*、*V.c. non-01* ともに明らかに夏期に高い汚染率を示していた。

2. 海産魚介について (表2A, 2B)

1) 腸炎ビブリオ (*V.p.*) 汚染：夏期の検査では、1998年には店舗A~Eから購入した魚20検体中10件から、1999年には店舗F~Jから購入した魚20検体中13件から、*V.p.* が分離された。特に、1998年のB店と1999年のF店では購入した各4魚種総てから *V.p.* が分離された。魚の定

表 1. 漁港海水からの病原ビブリオの分離

採水地点	夏 期							
	1998. 8. 17				1999. 8. 25			
	水温	pH	V. p.	V. c. non-01	水温	pH	V. p.	V. c. non-01
四方漁港								
Y-1	26	8.2	+(4)	-	29	8.4	+(<4)	-
Y-2	26	8.2	+(<4)	-	29	8.4	+(<4)	-
Y-3	26	7.8	+(<4)	-	29	8.4	+(<4)	-
Y-4	26	7.8	+(<4)	+	29	8.2	+(<4)	-
新湊漁港								
S-1	26	8.0	-(<4)	+	30	8.2	+(<4)	+
S-2	25	8.0	+(4)	+	30	8.2	+(<4)	-
S-3	25	8.0	+(4)	-	30	8.2	-(<4)	-
S-4	25	7.8	+(4)	+	30	8.4	+(<4)	-
分 離 率	7/8(87.5%) 4/8(50.0%)				7/8(87.5%) 1/8(12.5%)			
2年間の分離率 の集計	夏期 V. p. 14/16(87.5%)				V. c. non-01 5/16(31.3%)			

注, V. p.: 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*), () 内の数値は定量値M

量培養では, 1998年の *V. p.* 陽性10検体中7件が表皮100gあたり30~150の *V. p.* 菌数を示しており, 1999年の *V. p.* 陽性13検体中4件が表皮100gあたり40~2,400の *V. p.* 菌数を示していた。他の *V. p.* 陽性検体については, 表皮100gあたりの *V. p.* 菌数はいずれも40以下と少なかった。

冬期の検査では, 1998年には店舗A~Eから購入した魚20検体中1件のみ, 1999年には店舗F~Jから購入した魚20検体中3件のみから *V. p.* が分離された。これら *V. p.* 陽性の4検体とも, 定量培養では, *V. p.* の菌数は表皮100gあたりいずれも40以下であった。

2年間の海産魚介からの *V. p.* 分離率の集計を表2 A (夏期) および表2 B (冬期) の下欄左側に示した。夏期には合計40検体中23件が *V. p.* 陽性で, 分離率は57.5%であったが, 冬期には同一店舗からの合計40検体中 *V. p.* 陽性は4件のみで, 分離率は10%にとどまっていた。このこ

とは, 海水の *V. p.* 汚染率の季節による違いをよく反映しているように思われる。

2) ナグビブリオ (*V. c. non-01*) 汚染: 夏期の検査では, 1998年の店舗A~Eからの魚20検体中7件から, 1999年の店舗F~Jの魚20検体中同じく7件から, *V. c. non-01*が分離された。海産魚介の *V. c. non-01*については, 著者ら⁴⁾の以前の研究から, 仮に汚染魚であっても, その菌数は夏期でも極めて少ないことが判明している。今回は *V. c. non-01*についての定量は行わなかった。

冬期の検査では, 1998年, 1999年の魚各20検体総てから *V. c. non-01*を分離することはできなかった。

2年間の海産魚介からの *V. c. non-01*の分離率の集計を表2 A (夏期) および表2 B (冬期) の下欄右側に示した。夏期には合計40検体中14件が *V. c. non-01*陽性で, 分離率は35%であった

時 期		冬 期					
		1998. 12. 21			1999. 12. 20		
水温	pH	V. <i>p.</i>	V. <i>c. non-01</i>	水温	pH	V. <i>p.</i>	V. <i>c. non-01</i>
14	8.2	-(<4)	-	10	8.2	-(<4)	-
13	8.2	+(<4)	-	10	8.2	-(<4)	-
14	8.2	+(4)	-	11	8.4	-(<4)	-
13	8.2	+(4)	-	9	8.4	-(<4)	-
14	8.2	-(<4)	-	9	8.2	-(<4)	+
13	8.2	+(<4)	-	8	8.2	-(<4)	-
13	8.2	+(<4)	-	10	8.2	-(<4)	-
13	8.2	+(<4)	-	9	8.2	-(<4)	-
6/8(75.0%)			0/8(0%)	0/8(0%)			1/8(12.5%)
冬期 V. <i>p.</i> 6/16(37.5%) V. <i>c. non-01</i> 1/16(6.3%)							

P.N. V. *c. non-01* : ナグビブリオ (*Vibrio cholerae non-01*)

表 2 A. 市販魚介からの病原ビブリオの分離 —— 夏期 ——

1998. 8. 18					1999. 8. 26				
店舗	番号	魚種	V. <i>p.</i>	V. <i>c. non-01</i>	店舗	番号	魚種	V. <i>p.</i>	V. <i>c. non-01</i>
A	1	とびうお	-(<40)	+	F	2 1	さば	+(<40)	-
	2	あかだい	-(<40)	+		2 2	いわし	+(<40)	-
	3	きす	+(40)	-		2 3	かわはぎ	+(40)	-
	4	あじ	+(30)	-		2 4	あじ	+(<40)	+
B	5	かます	+(150)	-	G	2 5	つばいそ	-(<40)	+
	6	しまだい	+(70)	-		2 6	きす	+(2,400)	-
	7	このしろ	+(40)	+		2 7	あまだい	-(<40)	-
	8	あじ	+(<40)	-		2 8	かれい	+(<40)	+
C	9	かれい	+(150)	-	H	2 9	つばいそ	+(<40)	-
	1 0	いか	-(<40)	-		3 0	あじ	+(<40)	-
	1 1	つばいそ	-(<40)	-		3 1	いわし	+(<40)	-
D	1 2	かます	-(<40)	+	I	3 2	はちめ	-(<40)	-
	1 3	つばいそ	-(<40)	+		3 3	つばいそ	+(70)	+
	1 4	かます	-(<40)	+		3 4	かます	+(40)	-
	1 5	あじ	-(<40)	-		3 5	たら	-(<40)	-
E	1 6	いわし	-(<40)	-	J	3 6	あじ	+(<40)	-
	1 7	きす	+(<40)	-		3 7	ふくらぎ	-(<40)	+
	1 8	いわし	+(40)	+		3 8	まだい	-(<40)	+
	1 9	つばいそ	-(<40)	-		3 9	つばいそ	-(<40)	-
	2 0	あじ	+(<40)	-		4 0	ひらめ	+(<40)	+
分離率			10/20(50%)	7/20(35%)	13/20(65%)			7/20(35%)	
2年間の分離率の集計			V. <i>p.</i> 23/40(57.5%)		V. <i>c. non-01</i> 14/40(35%)				

注. V. *p.* : 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*), () 内の数値は表皮100g中の腸炎ビブリオ定量値.
V. *c. non-01* : ナグビブリオ (*Vibrio cholerae non-01*)

が、冬期には同一店舗からの40検体総てが *V.c. non-01* 陰性であり、分離率は0%であった。
*V.c. non-01*の場合、夏期でも分離率は *V.p.* のそれに比べるとかなり低い、それでも夏期と冬期の分離率の違いは明瞭であった。

このように、*V.p.* や *V.c. non-01* のような病原ビブリオによる海産魚介の汚染率が、海水温の上昇する夏期、特に残暑期に著しく高まること、はじめに述べたように、腸炎ビブリオやナグビブリオの食中毒が、一般に夏期に多発する他の細菌による食中毒と比べても、特に残暑期に鋭い発生のピークを示すことの背景になっていることが理解されるであろう。また、夏期の海産魚介からの *V.p.* の分離率が *V.c. non-01* のそれに比べて著しく高いことは、両菌による実際の食中毒発生頻度の違い——腸炎ビブリオによる食中毒がナグビブリオのそれより著しく高頻度である——をよく説明しているように思われる。

なお、海水や海産魚介からの *V.c. non-01* の分離条件に関して、アルカリペプトン水での二次増菌の方式は極めて重要なことであるが、その後の分離培養法として、TCBS寒天平板とともに、TCBSにコリスチンを最終濃度 1 μg/ml 加えた CL-TCBS 寒天平板培地を併用することは極めて有用かつ必須であった。実際に、TCBS寒天平板では、夏期に海水や海産魚介中に多数存在する非病原性の *Vibrio alginolyticus* もまた、*V.c. non-01* と同様に白糖を分解して黄色のコロニーを形成する。本菌は増殖速度が速く、TCBS寒天平板では *V.c. non-01* の発育増殖を著しく妨害した。CL-TCBS寒天平板では、この *Vibrio alginolyticus* の発育が著しく抑制されるために、*V.c. non-01* の分離には極めて好都合であった。逆に、*V.p.* の分離の場合には、CL-TCBS寒天平板は *V.p.* の増殖を著しく抑制するので不都合であった。また海産魚介からの *V.p.* の分離に関しては、増菌法と

表2 B. 市販魚介からの病原ビブリオの分離 —— 冬期 ——

店舗	番号	1998. 12. 22			店舗	番号	1999. 12. 21		
		魚種	<i>V.p.</i>	<i>V.c. non-01</i>			魚種	<i>V.p.</i>	<i>V.c. non-01</i>
A	1	かわはぎ	-(<40)	-	F	2 1	さば	-(<40)	-
	2	あじ	-(<40)	-		2 2	いわし	-(<40)	-
	3	かます	-(<40)	-		2 3	かわはぎ	-(<40)	-
	4	ふぐ	-(<40)	-		2 4	あじ	-(<40)	-
B	5	かわはぎ	-(<40)	-	G	2 5	かれい	-(<40)	-
	6	こだい	-(<40)	-		2 6	はたはた	-(<40)	-
	7	かつお	-(<40)	-		2 7	かます	+(<40)	-
C	8	いわし	+(<40)	-	H	2 8	ふくらぎ	-(<40)	-
	9	ぶり	-(<40)	-		2 9	あじ	-(<40)	-
	10	ふくらぎ	-(<40)	-		3 0	にしん	-(<40)	-
D	11	あじ	-(<40)	-	I	3 1	たい	-(<40)	-
	12	さば	-(<40)	-		3 2	かつお	-(<40)	-
	13	あじ	-(<40)	-		3 3	あじ	-(<40)	-
	14	さんま	-(<40)	-		3 4	たい	+(<40)	-
	15	いわし	-(<40)	-		3 5	かわはぎ	-(<40)	-
E	16	めぎす	-(<40)	-	J	3 6	ふくらぎ	-(<40)	-
	17	めぎす	-(<40)	-		3 7	ふぐ	-(<40)	-
	18	あじ	-(<40)	-		3 8	かわはぎ	-(<40)	-
	19	ふくらぎ	-(<40)	-		3 9	かます	-(<40)	-
	20	きじはた	-(<40)	-		4 0	つかいだい	+(<40)	-
分離率			1/20(5%)	0/20(0%)			3/20(15%)	0/20(0%)	
2年間の分離率の集計			<i>V.p.</i> 4/40(10.0%)	<i>V.c. non-01</i> 0/40(0%)					

注. *V.p.* : 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*), () 内の数値は表皮100g中の腸炎ビブリオ定量値,
V.c. non-01 : ナグビブリオ (*Vibrio cholerae non-01*), 表2 Aと2 Bの店舗の記号は同一店舗を意味する。

して、2%食塩加アルカリペプトン水と食塩ポリミキシブイオンを併用したが、前者の方が分離率がよい傾向が見られた。

IV. まとめ

1. 漁港海水について、1998年～1999年の2年間の調査から、腸炎ビブリオの分離率は、夏期には16定点中14定点陽性（87.5%）と著しく高かったが、冬期には16定点中6定点陽性（37.5%）と低かった。ナグビブリオについては、一般に腸炎ビブリオ程分離率は高くはなかったが、それでも夏期は16定点中5定点陽性（31.3%）と、冬期の16定点中1定点陽性（6.3%）に比べて分離率が高く、季節による分離率の違いは明瞭であった。

2. 市販の海産魚介についても、2年間の調査で腸炎ビブリオの分離率は、夏期には40検体中23件陽性（57.5%）と高かったが、冬期には40検体中わずか4件陽性（10%）と著しく低かった。ナグビブリオについては、漁港海水と同様に、分離率は腸炎ビブリオ程高くなく、夏期には40検体中14件陽性（35%）であったものが、冬期には全く分離されず、夏期に分離率が高いという季節消長は明瞭であった。

3. 漁港海水や市販海産魚介の腸炎ビブリオ、ナグビブリオによる汚染率が夏期に著しく高いという事実は、わが国において、これら病原ビブリオによる食中毒の発生が夏期、特に残暑期に極めて鋭いピークを示していること背景になっているものと思われる。なお、腸炎ビブリオの分離率が一般にナグビブリオのそれより高いことは、実際のわが国の食中毒の発生頻度の違い——前者が後者よりはるかに高頻度である——によく反映されているように思われる。

4. 菌の分離条件に関して、海産魚介からの腸炎ビブリオの増菌培地としては、2%食塩加

アルカリペプトン水の方が食塩ポリミキシブイオンよりも適しているように思われ、海水や海産魚介からのナグビブリオの分離培地としては、コリスチンを最終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ TCBS に加えた培地（CL-TCBS寒天平板）をTCBSと併用することが極めて有用であった。

謝辞

海水の採取、魚の購入と実験にご協力頂いた平成10年度卒業生（赤井、天野、大蔵、倉田、塩谷、宮島、山本）と平成11年度卒業生（伊藤、式部、土肥、西田、牧野、水井、室井、山ノ下）の諸氏に感謝します。また原稿作成にご協力を頂いた本学食物栄養学科 佐賀雅代さんに深謝します。

文献

- 1) 児玉博英, 富山女子短期大学紀要, 30, 115 (1995)
- 2) 児玉博英, 佐賀雅代, 富山女子短期大学紀要, 35, 145 (2000)
- 3) 児玉博英, 林美千代, 刑部陽宅, 感染症学雑誌, 65, 193 (1991)
- 4) Hirohide KODAMA, Yotaku GYOBU, Naoko TOKUMAN, Hisao UETAKE, Toshio SHIMADA and Riichi SAKAZAKI, *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas*, 6 eds., 1988 by KTK Scientific Publishers Tokyo.