— 原 著 —

Vibrio cholerae O-1 および *Vibrio cholerae* non O-1 の生態学的研究 特に食品および生貝での消長

春日 武彦

日本医科大学衛生学・公衆衛生学教室 (主任: 南 正康教授)
指導: 柚木 齊教授

An ecological study of *Vibrio cholerae* O-1 and *Vibrio cholerae* non O-1,
with special regard to behavior in foodstuffs and living shellfish

Takehiko Kasuga

Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School

The growth and survival of *Vibrio cholerae* O-1 and *Vibrio cholerae* non O-1 in foodstuffs, especially in shellfish was studied in order to cast some light on the ecology of cholera epidemic.

Alteration in the number of *Vibrio cholerae* O-1 and *Vibrio cholerae* non O-1, stuck to raw fish and raw meat, drinks (cola, alkali ion drink, milk, coffee) and soy sauce was observed in a settled temperature and whether cholera had accumulated in short-necked clams in artificial sea water contaminated with *Vibrio cholerae* O-1 or *Vibrio cholerae* non O-1 was examined. In this study, the same experimental procedure was pursued concerning the different strains of cholera; *Vibrio cholerae* O-1 and *Vibrio cholerae* non O-1.

The following results were obtained:

1) Within 24 hours, the number of *Vibrio cholerae* O-1 or *Vibrio cholerae* non O-1 stuck to raw fish or raw meat was almost invariable at 4°C, 10°C, 16°C and 30°C.

After 48 hours, the number of *Vibrio cholerae* O-1 or *Vibrio cholerae* non O-1 stuck to raw fish was invariable, though the numbers of both strains stuck to raw meat decreased. Regarding the rate of decrease, *Vibrio cholerae* non O-1 was slower than *Vibrio cholerae* O-1.

2) *Vibrio cholerae* O-1 and *Vibrio cholerae* non O-1 ceased to exist within 30 min in soy sauce of high salt concentration and within 30 min in cola and alkali ion drink of high acidity. On the other hand, *Vibrio cholerae* O-1 in coffee ceased to exist within 24 hours at 4°C and 16°C.

3) When short-necked clams were placed in artificial sea water contaminated with *Vibrio cholerae* O-1 or *Vibrio cholerae* non O-1, the organisms survived and accumulated within the short-necked clams.

Key words: *Vibrio cholerae* O-1, *Vibrio cholerae* non O-1, foodstuffs, living shellfish

緒 言

元来コレラはインドをはじめ東南アジアに固有のものであったが、1817年に最初のパンデミーが発生して以来、すでに6回にわたる世界規模の流行が繰り返さ

れ、現在では1961年に始まる第7次パンデミーが進行中である。

第6次までの起因菌はアジア型 (古典型) *Asiatic cholerae vibrio* と呼ばれているが、現在の第7次パンデミーにおいてはそのほとんどがエルトル型 (*El Tor cholerae vibrio*) に由来し、アジア型が検出されることがまれである。両者を臨床症状や疫学的所見から明確に区別をつけることは難しく、生化学的性状も

Present address: Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

ほぼ同一である¹⁾。溶血性、ファージIV感受性、ポリミキシシンB感受性等に基づいて鑑別がなされるが²⁾、Hughの提案により³⁾、今日ではEl Tor *cholerae vibrio*は在来のアジア型の一生物型であるとされている。

Vibrio cholerae (以下 *V. cholerae* と略す)の性状が明らかとなるにつれ、過去において見逃されていたがコレラと非常に関連の深い下痢症の原因として、*Vibrio cholerae* non O-1 (以下 *V. cholerae* non O-1 と略す)が研究の対象として取りあげられるようになった。従来は、下痢は起こすが流行の原因とはなりえないとして、ほとんど注目されることがなかったが、実際にはコレラと区別をつけ難い症状をひき起こして集団発生の原因となったり^{4), 5)}、動物実験による病原性の証明⁶⁾や、毒素の存在の確認例が報告され^{7), 8)}、臨床的に重要視されるようになったからである。生化学的には *V. cholerae* non O-1 はアジア型およびエルトル型コレラ菌と同一性状をもつが、O抗原の違いによって両者と区別される。

エルトル型コレラによるわが国での患者発生は1962年に始まり⁹⁾、1977年フィリピン墓参団によって持ち込まれた有田市での流行^{8), 10)}、1978年池之端文化センターにおける集団発生^{8), 10)} (折詰弁当に使用された輸入ロブスターの菌汚染が示唆されている)等の散発的な発生がみられている。また、鶴見川河口では1978年にエルトル型による環境汚染が発見され^{8), 11), 12)}、神戸検疫所は1980年にタイ国産輸入冷凍エビからエルトル小川型および稲葉型コレラ菌を分離して大きな話題を呼んだ。

一方、*V. cholerae* non O-1 については、まず注目すべき例として1968年スーダンでの流行をあげなくてはならない^{13), 14)}。この際にはステップ地帯に掘られた噴泉へ集まった巡礼者たちの間からコレラ様症状の患者が国内に広まり、最終的には600名以上の患者と100名を越える死者を出した。分離された菌は *V. cholerae* non O-1 のみであった。わが国では1978年長野県で集団下痢症の患者18名から同菌が検出され、刺身が原因であると推察された¹⁵⁾。また前述の池之端文化センターでのコレラ発生に際しては、数名の *V. cholerae* non O-1 による下痢患者がみられている¹⁶⁾。

Chatterjee ら¹⁷⁾、Sakazaki ら¹⁸⁾の報告等でも明らかのように、*V. cholerae* non O-1 患者はコレラ流行に伴って発生している場合が多い。また症状そのもの

がコレラと酷似している場合もみられる。このような事実から、以前は軽視されていた *V. cholerae* non O-1 に関して *V. cholerae* O-1 と同様の詳細な考察や、両者の比較を行う必要が生じてこよう。いわゆる旅行者の下痢 (traveller's diarrhea) の原因として、高頻度に *V. cholerae* non O-1 が分離されていることや^{20), 21)}、コレラ流行地以外ではみられることの少なかつた同菌が環境中より検出されたとの報告が近年つぎつぎとなされ^{5), 22), 23)}、この菌による環境の汚染²⁴⁾と患者の増加が世界的な傾向であるといわれていることも、*V. cholerae* non O-1 の重要性を裏付けていよう。

さて、コレラ予防の見地から、現在主流を占めているエルトル型および *V. cholerae* non O-1 の両コレラ菌について検討する場合、その生態学的研究については、他の分野に比べてまだ十分な成果があげられていないようである。最近の報告例では、1982年に当教室の矢嶋²⁵⁾がエルトル型を使って海水・河川水・生活水中での動態について観察を行い、1983年には同じく当教室の汲田²⁶⁾が、やはりエルトル型を使って飲食品・生鮮食品 (牛肉・魚肉・アサリ生貝) 中での菌の消長に関して考察している。

今回著者は「感染伝播の基礎的研究」の一環として、食品中のコレラ菌の動態を知るために、汲田の実験手法に加えて幾つかの条件を付加し、*V. cholerae* O-1 のみならず *V. cholerae* non O-1 に対しても検討を加え、より広い視野での生態学的な追求を試みた次第である。

研究材料および方法

(1) 実験材料

1) 使用菌株

Vibrio cholerae O-1 として、都立衛生研究所微生物部の松下秀博士より分与をうけた569B株、*Vibrio cholerae* non O-1 としてN40株を使用した。保存は半流動寒天培地によって行い、実験に際しては新鮮培養菌液を用いた。

2) 実験に使用した生鮮材料

- (i) 牛肉：精肉店より購入した牛ひき肉を使用した。
- (ii) 魚肉：鮮魚店より購入したメバチマグロ刺身を使用した。
- (iii) 生貝：鮮魚店より購入した入荷直後の東京湾産アサリを使用した。いわゆる「砂抜き」はしていない。

Table 1 Ingredient composition of artificial sea water and natural sea water

	Artificial	Natural
Ca	24.2 mEq/l	20.0 mEq/l
Mg	206.0 mEq/l	110.0 mEq/l
Na	469.0 mEq/l	460.0 mEq/l
K	6.9 mEq/l	9.7 mEq/l
Cl	595.5 mEq/l	536.4 mEq/l
Osmotic pressure	1139 mOsm	

3) 人工海水

クロシオ（山本海水養魚研究所製）を蒸留水で希釈して比重 1.025 に調整し、生貝の飼育に供した。クロシオの組成については **Table 1** に示してある。

4) 実験に使用した液性材料

- (i) コーラ（コカコーラ）
- (ii) ミルク入り缶コーヒー（ポッカ・コーヒー）
- (iii) アルカリイオン飲料（ポカリ・スイート）
- (iv) 牛乳（明治乳業・紙パック入り）
- (v) 醤油（キッコーマン）
- (vi) control (0.1% ペプトン水 Difco・Bacto peptone)

上記それぞれの pH、塩分濃度、浸透圧は **Table 2** に示してある。塩分濃度は NaCl の重量 % として表示し、その測定には、Na では吸光度法、Cl ではクロム酸カリ滴定法を採用した。pH 測定には硝子電極 pH 測定器または水素イオン濃度試験紙を使用し、浸透圧測定は氷点降下法・Fiske Osmometer で行った。

(2) 実験方法

1) 生鮮実験材料（牛肉・魚肉）

(i) 菌接種：半流動保存培地から普通寒天培地へ菌を移しかえて 24 時間培養を行い、純培養であることを確認してから、白金耳で 10 ml ペプトン水に菌を接種、24 時間後生理食塩水で 10%/ml に菌液を調整した。そしてその 0.01 ml を約 1 cm 角の立方体状に切

Table 2 Characteristics of liquid sample

	pH	Salt density (weight % of NaCl)	Osmotic pressure
Cola	2.48	under 0.1%	720 mOsm
Alkali ion drink	3.64	under 0.1%	430 mOsm
Soy sauce	4.64	17%	6980 mOsm
0.1% peptone solution	7.31	under 0.1%	33 mOsm
Milk	6.70	under 0.1%	274 mOsm
Coffee	6.08	under 0.1%	340 mOsm

り出した検体 1 g に滴下し、自然拡散にまかせて菌を食品中に浸透させた。

(ii) 温度設定：4°C、10°C、16°C、30°C および -22°C で行った。-22°C については、既凍結食品に菌接種を行ったものと、菌接種後に生鮮状態から凍結させたものの二通りについて行った。

(iii) 菌数測定：菌接種後 1, 4, 12, 24, 48, 72 時間、1 週間（-22°C に対してのみ）の各時点にて、試料 1 g を 9 ml 生理食塩水中にて十分攪拌して原液とし、10 倍段階希釈法を行い各希釈液 0.1 ml ずつを Heart Infusion (HI) 寒天培地（榮研）上に拡散接種し、37°C、48 時間培養後、colony count を行った。

colony count のための培地については、ビブリオの選択培地である TCBS 寒天培地では経験的に菌数がかかり不確実に表示されるようなので、HI 寒天培地を採用した。雑菌混入が疑われた場合には、スタンプ法で PMT 寒天培地へ colony を移し変えることによって確認を行った。

なお、すべての種類の実験材料に対して、実験開始時点における菌数確認のため、接種菌液そのものにも菌数測定を施行した。

2) 人工海水

牛肉・魚肉の場合と同様にして菌液を調整し、検体 10 ml に対し菌液 0.1 ml ずつを接種した。しかる後、10°C と 16°C の両者にて 24 時間、48 時間における菌数測定を、10 倍段階希釈法に基づく colony count で施行した。

3) 生鮮実験材料（アサリ生貝）

(i) 菌接種：上記のごとく菌を接種した人工海水 100 ml 中へ、生貝 5 個を投入して一群とした。

(ii) 温度設定：人工海水と同じく 10°C と 16°C とした。

(iii) 菌数測定：菌接種後、① 24 時間経過したのち、貝 5 個全部を無菌の人工海水中へ移し変える。② そのまま移し変えずにおく。

以上の二つの群を設定し、それぞれ 24 時間、48 時間における人工海水中および貝肉中の菌数を測定した。手技としては、アサリの生存を確かめた後、貝殻をはずし貝肉を homogenize し、10 倍段階希釈法に基づく colony count で検体 1 g 当たりの菌数を求めた。

4) 液性実験材料

(i) 菌接種：人工海水の場合と同様に行った。

(ii) 温度設定：4°C と 16°C で行った。

(iii) 菌数測定：菌接種した検体を各温度に保持したまま、実験開始後 5, 10, 15, 30, 60 分, 24 時間の各時点においてそれぞれ試料 1 ml を採取し, 10 倍段階希釈法に基づく colony count を行った。

結 果

1. 牛肉・魚肉における *V. cholerae* O-1, non O-1 の経時的变化

Fig. 1~4 に示したように, -22°C (既凍結食品に菌接種を行ったもの, 接種後に生鮮状態から凍結したもの) の両者) では若干の菌数減少傾向がみられるもの

Fig. 1 Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in raw meat at -22°C and in the already frozen raw meat

Fig. 2 Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in raw fish at -22°C and in the already frozen raw fish

Fig. 3 Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in raw meat at -22°C and in the already frozen raw meat

Fig. 4 Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in raw fish at -22°C and in the already frozen raw fish

の, 両菌株ともおおむね著明な菌数の変化は認められなかった。

温度別にみると, Fig. 5~8 に示したとおり, 4°C 以上では温度が高くなるほど菌数は多くなる。しかし 4°C と 30°C で比較を行っても, 実験開始後 48 時間程度では, 菌数の対数値に 1 以上の差は認めなかった。そして 4°C において菌数に大きな変化は生じていない。

同じ菌株において牛肉と魚肉とを比較すると, 4°C 以上では 48 時間まではほとんど菌数に変化がない。

Fig. 5 Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in raw meat at 4°C , 10°C , 16°C and 30°C

Fig. 6 Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in raw fish at 4°C , 10°C , 16°C and 30°C

Fig. 7 Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in raw meat at 4°, 10°, 16° and 30°C

Fig. 8 Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in raw fish at -22°C and in the already frozen raw fish

しかし 72 時間を経過すると、牛肉では菌数の減少が目につくにもかかわらず、魚肉ではほぼ菌数が変わらない。すなわち、牛肉と魚肉では、72 時間においてはじめて菌数の推移に差異を認めることができた。

菌株の違いについてみると、72 時間における牛肉で N 40 のほうがやや生残性が高かった。魚肉では差異がほとんどみられなかった。

2. 人工海水における *V. cholerae* O-1, non O-1 の経時的変化

Fig. 9, 10 に示したように菌数の減少がみられた。16°C に比して 10°C のほうが減少傾向は大である。569 B と N 40 との間に、差異はほとんど認められない。

3. 生貝における *V. cholerae* O-1, non O-1 の経時的変化

Table 3 に示したように、温度と菌株の組み合わせで四つの群に分けてある。各群それぞれ、実験開始後 24 時間で貝 5 個全部を無菌の人工海水中へ移し変える場合、そのまま移し変えない場合の双方で海水およ

Fig. 9 and Fig. 10

Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B), *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in artificial sea water at 10°C, 16°C

び貝肉中の菌数測定を行った。

貝を移し変えない場合についてみると、10°C では各菌株とも人工海水中の菌数は減少を続ける。一方貝肉中では菌が増加して 24 時間でほぼ海水中の菌数と等しくなるが、48 時間では菌がやや減少する。しかしその時点では、貝肉中の菌数は海水中のそれを上回っている。16°C では、24 時間において海水と貝肉での菌数がほぼ等しくなった後、両者とも菌数は増加を続ける。そしてこの場合も、48 時間において貝肉中の菌数は海水中のそれを上回っている。

貝を移し変える場合についてみると、各菌株とも、24 時間（貝を移し変える時点）において、10°C では菌接種を行った人工海水中の菌数と貝肉中の菌数はほぼ等しくなっている。移し変えた後、無菌であった新しい人工海水中からは菌が検出され、しかしその菌数は貝肉中におけるよりも少ない。貝肉中の菌数は 24 時間よりも 48 時間のほうが減少している。16°C でも同様の傾向がみられるが、48 時間における貝肉中の菌数が 24 時間のそれよりも増加していることが特筆される。

4. 液性実験材料における *V. cholerae* O-1, non O-1 の経時的変化

Fig. 11, 13, 15, 17 に示したように、コーラ、アルカリイオン飲料、醤油では菌株・温度に関係なく急速に菌数が減少し、いずれも 30 分以内には全く菌が検出されなくなった。

牛乳、コーヒー、ペプトン水 (control) については、Fig. 12, 14, 16, 18 に示した。牛乳では 4°C でほとんど菌数が変化せず、16°C でやや増加がみられた。菌株による差異はみられなかった。コーヒーでは緩やかな菌の減少傾向が認められた。実験開始後 24 時間め

Table 3 Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1, non O-1 in short-necked clam and artificial sea water after 24 h, 48 h

Group A				Group B			
	start	24 h	48 h		start	24 h	48 h
sea water	7.6→	4.7→	2.8	sea water	6.9→	4.5→	2.5
shellfish	0 →	4.6→	4.0	shellfish	0 →	4.1→	3.0
sea water	7.6→	4.6		sea water	6.9→	4.5	
		0 →	1.5			0 →	1.9
shellfish	0 →	4.6→	3.3	shellfish	0 →	4.2→	3.4
Group C				Group D			
	start	24 h	48 h		start	24 h	48 h
sea water	7.6→	3.8→	4.8	sea water	6.9→	3.6→	4.5
shellfish	0 →	4.3→	5.0	shellfish	0 →	3.7→	4.7
sea water	7.6→	4.0		sea water	6.9→	3.0	
		0 →	4.5			0 →	4.4
shellfish	0 →	4.6→	4.8	shellfish	0 →	3.5→	4.5

Group A : 569 B (*Vibrio cholerae* O-1) at 10°CGroup B : N-40 (*Vibrio cholerae* non O-1) at 10°C

Group C : 569 B at 16°C

Group D : N-40 at 16°C

* Viable cells are indicated by Log 10 No./ml (sea water) or Log 10 No./g (shellfish). But, zero means "no viable cell".

** In every Group, upper section means "short-necked clams were kept in sea water containing *V. cholerae* for 48 h".Lower section means "After 24 h, short-necked clams were removed into sea water not containing *V. cholerae*".

Fig. 11 and 12

Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in each liquid sample at 4°C

には各温度で 569 B が検出されなくなったにもかかわらず、N 40 では 24 時間における菌数の対数値が 4°C, 16°C とも実験開始時の半分程度の減少にとどまり、コーヒーに関しては 569 B に比べ N 40 の生残性が大であることを示している。ペプトン水では温度、菌株にかかわらず菌数にほぼ変化がみられなかった。

考 察

第 6 次パンデミーにおいて発見されたエルトル型

コレラ菌が、病原性は弱いと考えられていたにもかかわらず、1961 年以降、アジア型に代わって流行の主役となった背景には不明の点が多い。第 7 次パンデミーに際して、在来のエルトル型の病原性に変異が起こったのか、それともエルトル型にもともと病原性の強いものと弱いものの 2 種類があったのか、現在のところ明確な解答は得られていない。

Bart ら²⁷⁾によれば、アジア型とエルトル型とを比較した場合、健康保菌者数と発症者数の比が前者では 1.7:1、後者では 4:1、発症者における軽症と重症の比はアジア型で 1:1、エルトル型で 7:1 と報告している。Gangarosa ら²⁸⁾の報告でも、同様の統計において健康保菌者数と発症者数がそれぞれ 1.5:1 と 4:1、軽症と重症の比が 1.5:1 と 9:1 と近似した結果を算出している。海外交流の機会が増加する一方、薬剤による対症療法が発達している現今においては、アジア型に比べ、健康保菌者や軽症患者によるエルトル型の食物・環境汚染が、より一層重要視されるわけである。

他方、*V. cholerae* non O-1 の汚染状況については

Fig. 13 and 14
Viable cells of *Vibrio cholerae* O-1 (569 B) in each liquid sample at 16°C

Fig. 15 and 16
Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 (N-40) in each liquid sample at 4°C

Fig. 17 and 18
Viable cells of *Vibrio cholerae* non O-1 [(N-40) in each liquid sample at 16°C

Table 4 に示した²⁹⁾。近年、*V. cholerae* O-1 をはるかに上回る食品・環境の汚染がみられる。また **Table 5** に示した海外旅行者からの下痢原因菌検索成績¹⁰⁾からも分かるように、かなりの頻度で *V. cholerae* non O-1 が検出されている。発熱や腹痛を伴う下痢を起こしたり、腸管系以外の炎症症状（中耳炎など）の起因为菌となったり、あるいは全く症状を示さなかったり、その多様性がかえって注意を集めることなく広く伝播していく一因と思われる。

従来コレラ菌は、免疫学的研究や抗生剤との関連、エンテロトキシン、病理学的研究などに多彩な報告がなされているが、緒言にも述べたように、菌の生態学的研究に関する報告は少ない。重要な研究課題であるにもかかわらず、検体それぞれの品質のばらつき、手技手法や条件設定の妥当性など、実施するには不確定要因が少なからず介入してくるため、客観的な結論を得ることが難かしいためであろう。特に食品中での菌の動態に関しては、各食品が単一な成分で構成されている訳ではなく、また保存状態にも様々な状況が考えられるため、個々の食品に対してそれぞれ条件を設定して実験を行うほかはなく、その実験結果から一般論を導き出すことは困難となる。

今回著者は、当教室の汲田が試みた食品中での菌の生態観察を、ほぼ同じ条件設定のもとで行い、また繰り返し実験を行って性状・傾向の一致を確認することで、少しでも不確定要因の介入を防ぐこととした。

1. 牛肉・魚肉について

実験開始後 48 時間までの範囲では、温度（-22°Cを除く）、牛肉・魚肉の違い、*V. cholerae* O-1, non O-1 の違いにかかわらず菌数にほとんど変化を生じていない。しかし 72 時間後における測定では、魚肉よりも牛肉のほうが

Table 4 The unnumber of cases found out *Vibrio cholerae* O-1 or non O-1 in Japan

Year	from human beings		from foodstuff		from environment	
	O-1	non O-1	O-1	non O-1	O-1	non O-1
1979	21	65	—	9	—	660
1980	35	107	—	109	—	1141
Total	56	172	—	118	—	1801

Table 5 The number of cases and sort of Bacteria caused for "traveller's diarrhea" (1977-78)

Staying country	Enterotoxi- genetic <i>E. coli</i>	<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> O-1	<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> non O-1	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	Dysentery bacillus	Salmonella enteritidis
Asia	69	3	37	145	55	214
Formosa, Korea	13	—	—	10	5	8
Philippines	10	2	19	78	7	98
Thailand	3	—	3	15	1	21
Indonesia	10	—	—	1	4	10
India	15	—	6	1	25	19
Others	18	1	9	40	13	58
Africa	1	—	—	—	1	—
Europe	1	—	—	—	—	3
Others	5	—	2	7	2	10
Total	76	3	39	151	58	227

各菌株とも生残性が低いことが分かった。すなわち、コレラ菌にとっては魚肉よりも牛肉のほうが、環境条件としては劣っていると考えられる。また魚肉においては各菌株とも菌数変化はほぼみられなかったが、牛肉においては *V. cholerae* O-1 に比べ non O-1 のほうが生残性が高いことが分かった。こうした結果から、*V. cholerae* O-1 と non O-1 とを対比すると、実験開始後 48 時間までは差異がほぼ認められないが、72 時間を経過した時点で比較すると non O-1 のほうが、環境に対する生残性が高いと考えられる。

−22°C については、汚染された食品を凍結させて保存する場合と、冷凍庫においてすでに凍結している食品が庫内へ持ち込まれた菌によって汚染をうける場合の双方を想定したが、どちらも牛肉・魚肉の違い、*V. cholerae* O-1, non O-1 の違いにかかわらず大きな菌数変化はみられなかった。汚染をうけてから 72 時間を経過した時点で、4°C 以上では牛肉において菌の減少傾向がみられたが、−22°C では菌数はそのまま保持されている。

こうした事実を食品衛生の立場からみた場合、汚染をうけた生鮮食品が 4°C 以上の保存で、あるいは解凍されてから口に入るまでの常識的な時間範囲では、菌数は汚染時とほぼ変化なく保たれていると考えるべきである。しかもわが国においては、汚染状況として、すでに菌で汚染された食品が冷凍されて輸入されるケースが最も考えやすいと思われるが、−22°C において菌数に変化のみられないことは重大である。保存方法によって菌が激増することはないものの、菌の自然減少や死滅は期待できない。池之端文化センターでのコ

レラ発生を契機として、コレラ汚染地域から輸入される冷凍魚介類は、これに添付される輸出国の公的機関発行の衛生証明書の有無にかかわらず、検疫の時点でコレラ菌検査が実施されることになったが³¹⁾、今回の実験で明らかのように、このような措置は適切なものといえよう。

菌とよっての牛肉と魚肉の差異（含水量、栄養分など）、検体のばらつきによって大きな違いを生じうるか等については今後の研究を待ちたい。

2. 生貝（アサリ）について

コレラ菌の至適 pH、至適塩分濃度は、自然環境において河口を中心とした水域に相当するといわれる。したがって魚介類のうちでも、生棲場所・採取場所の関係から、貝類は汚染をうける率が高いといえる。また、コレラ菌はキチン質を分解するため、菌にとって動物プランクトンやカニ、エビ等の甲殻類は栄養源となりやすい³²⁾。こうしたことから、貝類と甲殻類に対する海水汚染の影響は、食品衛生上きわめて興味深い。今回の実験でアサリを対象としたのは、すでに同様の観察を行っている当教室の汲田のデータと比較することで、不確定要因の多い生物実験に一定の傾向を見出したいと考えたからである。

人工海水における *V. cholerae* O-1 および non O-1 の消長を観察すると、いずれの菌も海水中から貝の体内へ取り込まれ、10°C では増殖こそしないものの、海水中での菌の減少に比して温存される傾向にある。そして 16°C では貝の体内で増殖がみられ、増殖した菌は逆に海水中へ放出される。そのため海水中の

Fig. 19 Correlation between artificial sea water and short-necked clam about bionomics of *Vibrio cholerae*

菌数は、減少傾向から増加傾向へと転ずる。こうした事实は、生貝におけるコレラ菌の蓄積を示唆していると考えられる (Fig. 19)。

3. 液性実験材料について

実際問題として、缶入り・紙パック入りの飲食品や醤油へコレラ菌の混入する可能性はきわめて低い。しかしこのような液性実験材料は生鮮食品に比べて成分の質・量が一定しており、コレラの動態と pH や塩分濃度、浸透圧等に関連させて考える際の目安とすることができる。こうした理由から一つのモデルケースとして、液性材料についても生鮮食品と同様の実験を行った次第である。

菌数の推移について、液性材料は大きく二つのタイプに分けられる。コーラ、アルカリイオン飲料、醤油においては、菌株・温度にかかわらず急速な減少がみられ、30 分以内に菌が検出されなくなった。Table 2 に示したように、コーラとアルカリイオン飲料では pH が 4 以下、醤油は塩分濃度 17%・浸透圧 6,980 mOsm と、いずれもコレラ菌にとって pH や塩分濃度、浸透圧が極端な環境であることが、速やかな菌の減少の理由であろう。コレラ菌の発育 pH 域は 6.0~9.4 (至適 pH は 7.6~8.2) といわれ、今回の実験もその報告を裏付けている。コレラの汚染地域で飲食品を摂取するとすれば、一般に酸性度の強いもの (発育 pH 域外) ほど安全であると考えられる。

V. cholerae の至適塩分濃度は 1.0~1.5% といわれる³²⁾。矢嶋³³⁾によれば、エルトル型は塩分濃度が 4% 以上で急激に発育が悪くなるとしている。Colwell らが Chesapeake 湾一帯でビブリオの生態を調査した報告^{5,22,33)}によれば、*V. cholerae* non O-1 は塩分濃度が 1.7% 以上ないし 0.4% 以下の場所からは分離されず、季節的変動もみられなかったという。また、当教室の金谷ら³⁴⁾によれば、*V. cholerae* O-1 および non O-1 を pH 8・塩分濃度 0%, 2%, 4% のペプトン水中で 4°C, 37°C それぞれにおいて培養したところ、いずれの菌株・温度においても塩分が 0%, 4%,

2% の順に生存期間が短く、最も早い場合で 11 日めに菌が死滅したという (4°C, 0% における 569 B 株)。飲食品として考えた場合、塩分濃度の高いものをそのままにすることはありえないし、反対に 0% であっても安全とは限らない。塩分濃度は、pH ほどには安全性の指標にならないといえよう。

牛乳、コーヒー、ペプトン水についてみると、牛乳とペプトン水においては菌数が不変ないしやや増加を示している。他方、コーヒー (ミルクを含む) では、牛乳、ペプトン水に比べ緩やかな菌の減少傾向がみられ、また *V. cholerae* O-1 よりも non O-1 のほうが減少傾向の程度は小さかった。すなわちコーヒーに関しては菌株によって生残性の違いが認められ、しかしそれは実験開始後 24 時間を経なければ明らかにならない。牛乳、コーヒー、ペプトン水はそれぞれ pH、塩分濃度とも大きな隔りはなかった。浸透圧については特に関連が見出されなかったが、タンパクをはじめとする各種成分の違いが菌の動態に反映していると思われる。ちなみに、前出の金谷らによれば、*V. cholerae* O-1, non O-1 とも滅菌蒸留水で培養するよりも、ペプトンを加えたほうが生存日数が長かったとしている。今後、飲食品について実験を進めるとすれば、菌に対する栄養素として、タンパクその他の成分を菌の消長と関連付けて考察していくことが必要となろう。

結 論

V. cholerae O-1・569 B 株および *V. cholerae* non O-1・N 40 株を生鮮食品 (牛肉、魚肉、アサリ生貝) および人工海水、飲食品 (コーラ、アルカリイオン飲料、缶入りコーヒー、牛乳、醤油) に接種して、コレラ菌の消長を観察した。その結果は次のとおりである。

1) 牛肉・魚肉はいったん汚染された場合、常識的な保存方法 (4°C~30°C)・保存期間 (48 時間程度) の範囲では、菌数は大きな変化なく保たれている。72 時間を経過すると、牛肉では各菌株・各温度ともやや菌

数が減少したが、魚肉ではほとんど変化がみられない。冷凍保存においては、1週間程度では牛肉、魚肉の違い、菌株の違いにかかわらず大きな菌数変化は生じない。

2) 生貝では、海水の汚染によって菌が貝の中へ蓄積される傾向にある。人工海水中では 10°C、16°C の各温度において *V. cholerae* O-1 および non O-1 は減少傾向を示すが、海水中に生貝を入れると、10°C では貝肉中でコレラ菌 (569 B 株および N 40 株) の増殖こそみられないものの、海水中での菌の減少に比して温存される傾向にある。16°C では貝肉中でコレラ菌の増殖がみられ、増殖した菌が逆に海水中へ放出されるため、海水中の菌数は減少傾向から増加傾向へと転ずる。

3) コーラ、アルカリイオン飲料、醤油では菌株・温度にかかわらず急激に菌数が減少し、いずれも 30 分以内に菌が全く検出されなくなった。牛乳では 4°C でほとんど菌数が変化せず、16°C でやや増加がみられた。菌株による違いはなかった。コーヒーでは各温度で緩やかな菌の減少傾向が認められ、しかし 24 時間を経過すると *V. cholerae* O-1 は検出されなくなったにもかかわらず、一方 non O-1 では菌数の対数値が、実験開始時におけるその半分程度にとどまった。

飲食品では一般に酸性度の強いものほどコレラ菌は生残し難い。塩分濃度については、醤油のように高い塩分の存在に対しては生残し難いものの、通常の飲食品ではあまり影響がみられない。

4) *V. cholerae* O-1 に比べ、*V. cholerae* non O-1 のほうがやや生残性が高い。しかしコーヒーにおいては汚染後 24 時間、牛乳においては汚染後 72 時間を経なければ生残性の違いは明らかにならない。食品が汚染されてから摂取されるまでの時間を考えた場合、常識的な時間範囲では *V. cholerae* O-1 および non O-1 の菌数の推移には、ほぼ差異がないといえよう。

文 献

- Hugh, R. : A comparison of *Vibrio cholerae* Pacini and *Vibrio eltor* Pribram. Internat. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxonomy, **15**, 61~68, 1965.
- 竹田美文, 三輪谷俊夫 : ビブリオ感染症. p. 117~123, 医歯薬出版, 東京, 1982.
- McIntyre, O.R. and Feely, J.C. : Characteristics of non-cholera vibrios isolated from cases of human diarrhea. Bull. WHO, **32**, 627~632, 1965.
- McIntyre, O.R., Feely, J.C., Greenough, W.B., Benson, A.S., Hassan, S.I. and Saad, A. : Diarrhea caused by non-cholera vibrios. Am. J. Trop. Med. Hyg., **14**, 412~418, 1965.
- Kaper, J., Lockman, H., Colwell, R.R. and Joseph, S.W. : Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol., **37**, 91~103, 1979.
- Ohashi, M., Shimada, T. and Fukumi, H. : In-vitro production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *Vibrio cholerae*, NAG. Japan. J. Med. Sci. Biol., **25**, 179~194, 1972.
- Zinnaka, Y. and Carpenter, C.C.J. : An enterotoxin produced by noncholera vibrios. Johns Hopkins Med. J., **131**, 403~411, 1972.
- 大橋誠 : 最近のコレラ情勢. 臨と細菌, **6**, 8~20, 1979.
- 厚生省公衆衛生局保健情報課 : コレラ防疫の記録 ; 有田市を中心とした集団発生. p. 3~41, 日本公衆衛生協会, 東京, 1978.
- 福見秀雄 : 池之端文化センターのコレラ事件に思う. 日医新報, No. 2866, 12~18, 1979.
- 福見秀雄 : 鶴見川のコレラ菌汚染事件. 日医新報, No. 2822, 12~17, 1978.
- Fukumi, H. : Brief summary report of cholera happening in Tsurumi river, Kanagawa, Japan. "Proceedings 14th Joint Conf. US-Jap. cooperat. Med. Sci. Prog. cholera Panel", p. 18~22, Toho Univ., Tokyo, 1979.
- 武藤哲典 : 鶴見川水系河川水および底泥中のコレラ菌. 日公衛誌, **27**, 306~311, 1980.
- Kamal, A.M. : Outbreak of gastroenteritis by NAG vibrios in the Republic of the Sudan, Oct.-Nov. J. Egypt. Publ. Hlth. Assoc., **46**, 125~152, 1971.
- World Health Org. : Outbreak of gastroenteritis by NAG vibrios. Wkly. Epid. Rec., **44**, 10, 1969.
- Zinnaka, Y. : Characterization of vibrios isolated from the cases of cholera-like diarrheal disease in the Sudan. J. Egypt. Publ. Hlth. Assoc., **46**, 161~174, 1971.
- 村松紘一 : *Vibrio cholerae* serovar 6 による食中毒事例について. 日感染学誌, **53**, 485, 1979.
- Chatterjee, B.D., Gorbach, S.L. and Neogy, K.N. : Characteristics of non-cholera vibrios isolated from patients with diarrhoea. J. Med. Microbiol., **3**, 677~682, 1970.
- Sakazaki, R., Tamura, K., Prescott, L.M., Bencic, Z., Sanyal, S.C. and Sinha, R. : Bacteriological examination of diarrheal stools in Calcutta. Indian J. Med. Res., **59**, 1025~1034, 1971.
- Bader, R.E. : Isolierung von Vibrionen der Heiberg-Gruppe bei einer Durchfallerkrankung. Münch. Med. Wschr., **114**, 914~918, 1972.
- 工藤泰雄 : 輸入感染性腸炎の実態とその検査. 臨と細菌, **6**, 46~56, 1979.
- Kaneko, T. and Colwell, R.R. : Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. J. Bacteriol., **113**, 24~32, 1973.
- 小川正之 : 川崎市内における河川水の病原菌汚染に関

- する研究. 1. *Vibrio cholerae*, NAG について. 日感染学誌, **53**, 484, 1979.
- 24) 坂崎利一: いわゆる “NAG ビブリオ” について. 臨と細菌, **6**, 57~60, 1979.
- 25) 矢嶋博己: エルトール型コレラ菌の環境における動態について; 特に海水・河川水および都市排水中での消長. 日医大誌, **49**, 791~798, 1982.
- 26) 汲田元: エルトール型コレラ菌の環境における動態について; 特に飲食品および生貝での消長. 日医大誌, **50**, 804~810, 1983.
- 27) Bart, K.J., Huq, Z., Khan, M. and Mosley, W.H. : Seroepidemiological studies during a simultaneous epidemic of infection with El Tor Ogawa and classical Inaba *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis., **121**, 17~24, 1970.
- 28) Gangarosa, E.J. and Mosley, W.H. : Epidemiology and surveillance of cholera. “Cholera” (Barua, D. and Burrow, W. eds.), p. 381, W.B. Sanders Co., Philadelphia, 1974.
- 29) 清水長世: 腸管感染症. (斉藤誠, 中谷林太郎, 橋本博, 松原義雄編), p. 143, 医典社, 東京, 1984.
- 30) 工藤泰雄: 輸入感染性腸炎の実態とその検査. 臨と細菌, **8**, 46~56, 1979.
- 31) 厚生省保健情報課: 防疫情報. 日医新報, No. 2930, 114, 1980.
- 32) 清水長世: 腸管感染症. (斉藤誠, 中谷林太郎, 橋本博, 松原義雄編), p. 139, 医典社, 東京, 1984.
- 33) Colwell, R.R. and Kaper, J. : *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other Vibrios; Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, **198**, 394~396, 1977.
- 34) 金谷通: *Vibrio cholerae* および Non O-1 *Vibrio cholerae* の水系環境適応性についての検討. 日公衛誌, **32**, 524, 1985.

(受付: 1986 年 1 月 10 日)