最確数法による生食用むき身貝中の推定腸炎 ビブリオ数の測定

(昭和 50 年 4 月 3 日受理)

村上 一^{*1} 神保勝彦^{*1} 神崎政子^{*1}
小久保弥太郎^{*1} 春田三佐夫^{*1} 山田 満^{*2}

Enumeration of Presumptive *Vibrio Parahaemolyticus* in Edible Shucked Shellfish by the Use of Most Probable Number Technique

Hajime MURAKAMI, Katsuhiko JINBO, Masako KANZAKI, Yataro KOKUBO,
Misao HARUTA and Mitsuru YAMADA

(*¹Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, Hyakunin-cho
3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo; *²Sanitation Inspection Station of Central
Wholesale Market: 2-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo)

Enumeration of presumptive *V. parahaemolyticus* in shucked shellfish was made by a simple multiple tube technique with Arabinose—Colistin—Peptone—Water (ACPW). During the period June 1973~March 1975, *Mactra chinensis* and *Scapharca broughlamii* were obtained at Tokyo Central Wholesale Market. Throughout the surveys conducted on the incidence of the presumptive organism in the shellfish, it was found that when monitored mean MPN of the presumptive organism had exceeded the level of $10^4/g$, a frequent occurrence of parahaemolyticus food poisoning patients was observed in Tokyo.

Although we were unable to prove the presence of Kanagawa positive organism among our isolates, we would like to propose following preventive measures for parahaemolyticus food poisoning; 1) Adoption of a tentative guide line “less than $10^4/g$ ” as an allowable limit of presumptive *V. parahaemolyticus* for marine products which might be consumed in a raw state; and 2) Labeling of “edible in raw” must be on the guaranteed, and prohibition of combined handling with other sort of sea products at retailers.

(Received April 3, 1975)

腸炎ビブリオ(以下腸ビと略す)の生態学的な研究結果によれば、日本の沿岸海中には、毎年晩春から初夏にかけて腸ビが出現し始め、海水温の上昇とともにその数を増すといわれている。しかし、海の生態系を構成している海洋微生物の一つとして、必ずある時期に出現する腸ビと、そこに生育した魚介類の関係、すなわち、どの種の魚介類が、どの時点で、どの程度の腸ビに汚染されていたかを定量的に、長期にわたって調査した報告はこれまでのところ見当たらない。ことに食品衛生の分野に

おけるこの種の調査成績が欠除しているため、具体的な腸ビ食中毒予防対策が立てられないのが現状であろう。

一方、我々日本人には、生魚介類を好む食習慣があり、これが我が国で腸ビ食中毒の発生が跡を断たない大きな原因であろう。そこで我々としては、生食用魚介類の腸ビ汚染安全許容レベル、すなわち可食限界を設定して、そのレベル以上の汚染食品を市場から排除する必要があると考える。このような考え方に基づいて、今回は、四季を通じて“すし種”として消費率の高いむき身のバカ貝およびアカ貝中の腸ビの消長を、長期にわたって定量的には握した。これと都内の腸ビ食中毒患者の発生状況と対比させ、腸ビ汚染の安全許容レベルを作製す

*¹ 東京都立衛生研究所、生活科学部：新宿区百人町3-24-1

*² 東京都市場衛生検査所：中央区築地 5-2-1

る資料にしたいと考えた。

材料および方法

1. 貝とその漬水

1973年6月から1975年3月に至る間、原則として5～10月は毎週1回、その他の月は毎月1回定期的に、東京都中央卸売市場に入荷したバカ貝およびアカ貝のむき身と、その漬水を10件ずつ採取し、検査に供した。

2. 培地

a) 6%食塩加1%ペプトン水; 検体中に存在することの予想される寒冷損傷腸ビを、選択培地中で発育できるよう回復させるための予備培養液として、6%食塩加1%ペプトン水(6%食塩加PW)を用いた。その組成は、食塩 60 g と、ポリペプトン(大五栄養化学) 10 g を、精製水 1,000 ml に溶解し、pH 7.2 に調整したものである。これを 10 ml ずつ中試験管(18×180 mm)に分注し、121°で15分間滅菌した。なお、試料原液および漬水の原液の培養用に、特に2倍濃度の予備培養液も用意した。

b) アラビノース・コリスチン・ペプトン水; 前記予備培養試験管中で、他の海洋細菌などとともに、回復増殖した推定腸ビを選択的に増殖させ、最確数(MPN)を求めるためにアラビノース・コリスチン・ペプトン水(ACPW)を用いた。その組成は、L-アラビノース 10 g, 硫酸コリスチン(コリマイシン) 50万単位、ポリペプトン(大五栄養化学) 10 g, 食塩 70 g, およびフェノールレッド 0.02 g を精製水 1,000 ml に溶解し、pH を7.8

に調整したものである。これを 3 ml ずつ小試験管(13×96 mm)に分注し、滅菌せずに直ちに使用した。

3. 希釈液

試料原液の調製と希釈には、3%食塩液 800 ml に、あらかじめ準備した pH 7.2 リン酸緩衝液の原液 1 ml を加えた希釈液を用いた。試料原液の調製には 90 ml ずつ、希釈用としては 9 ml ずつをそれぞれ 100 ml 容希釈ビンまたは中試験管(18×180 mm)に分注し、121°で15分間滅菌したものをを用いた。なお、リン酸緩衝液の原液は、リン酸2水素カリウム(KH_2PO_4) 34 g を 500 ml の精製水に溶解し、これに約 1 N の酸化ナトリウム液 175 ml を加え、さらに蒸留水を加えて全量を 1,000 ml とし、pH を7.2に調整後、使用時まで冷暗所に保存した。

4. 推定腸ビ数の測定

貝 10 g に希釈液 90 ml を加え、20,000 rpm で1分間細砕し、これを試料原液とし 10^{-7} まで10段階希釈し、試料原液は 10 ml ずつ、他の希釈試料は 1 ml ずつ、それぞれ3本ずつの6%食塩加PW試験管に接種した。次いで、35°で18時間培養後、菌の増殖が認められたものを ACPW 試験管にそれぞれ1白金耳移植し、35°で24時間培養後、アラビノース分解菌の発育により培地色の黄変したものを推定腸ビ陽性として、各希釈列の陽性試験管数から、検体 1 g 当たりの推定腸ビMPN を求めた。なお、漬水の場合は、検体をそのまま試料原液として、必要に応じてさらに希釈試料を調製

Scheme 1. Schematic presentation of the proposed enumeration technique for presumptive *V. parahaemolyticus*

Table 1. Incidence of Presumptive *V. parahaemolyticus* and of Total Bacteria on Shucked Shellfish, Compared with the Occurrence of Food Poisoning Patients in Tokyo

Date of sampling		Average viable cell count/g		Weekly incidence of food poisoning patients
		Presumptive <i>V. parahaemolyticus</i>	Total bacteria	
June	25, 1973	5.8×10^3	1.1×10^7	9
July	2, 1973	1.1×10^4	4.4×10^6	—
July	9, 1973	6.2×10^4	3.0×10^6	31
July	16, 1973	1.5×10^4	7.3×10^6	179
July	23, 1973	5.4×10^4	9.3×10^6	146
July	30, 1973	1.0×10^5	8.8×10^6	132
Aug.	6, 1973	2.2×10^5	9.8×10^6	58
Aug.	13, 1973	5.9×10^5	4.2×10^6	27
Aug.	20, 1973	1.2×10^6	2.6×10^6	12
Aug.	27, 1973	7.8×10^5	9.4×10^5	100
Sept.	3, 1973	4.1×10^5	7.2×10^5	86
Sept.	10, 1973	9.3×10^4	3.1×10^5	29
Sept.	17, 1973	5.5×10^4	1.9×10^5	47
Sept.	25, 1973	6.6×10^3	5.5×10^4	118
Oct.	1, 1973	2.1×10^4	2.0×10^5	—
Oct.	8, 1973	3.6×10^3	7.4×10^5	—
Oct.	15, 1973	1.9×10^4	2.3×10^5	—
Oct.	22, 1973	7.4×10^3	5.5×10^5	—
Oct.	29, 1973	1.5×10^4	4.1×10^5	—
Nov.	5, 1973	2.8×10^2	8.0×10^5	—
Nov.	12, 1973	1.4×10^2	3.3×10^5	—
Nov.	19, 1973	2.1×10^2	1.6×10^5	—
Nov.	26, 1973	8.0×10^0	1.0×10^5	—
Dec.	17, 1973	$< 0.3 \times 10^0$	6.7×10^5	—
Jan.	21, 1974	$< 0.3 \times 10^0$	9.7×10^3	—
Feb.	18, 1974	$< 0.3 \times 10^0$	2.1×10^5	—
March	18, 1974	$< 0.3 \times 10^0$	4.5×10^5	—
April	22, 1974	7.4×10^0	8.0×10^5	—
May	7, 1974	2.7×10^0	2.0×10^5	—
May	13, 1974	0.9×10^0	6.4×10^5	—
May	20, 1974	1.4×10^1	1.3×10^6	—
May	27, 1974	1.6×10^2	6.0×10^5	—
June	3, 1974	1.7×10^2	1.4×10^6	—
June	10, 1974	5.2×10^2	6.0×10^6	1
June	17, 1974	1.2×10^3	5.3×10^6	—
June	24, 1974	4.9×10^3	5.0×10^6	—
July	1, 1974	2.5×10^3	3.0×10^6	—
July	8, 1974	1.3×10^3	1.9×10^6	—
July	15, 1974	1.6×10^2	2.6×10^6	4
July	22, 1974	1.9×10^3	2.4×10^6	9
July	29, 1974	2.0×10^3	3.2×10^6	10
Aug.	5, 1974	5.3×10^3	1.2×10^7	33

(continued)

Date of sampling		Average viable cell count/g		Weekly incidence of food poisoning patients
		Presumptive <i>V. parahaemolyticus</i>	Total bacteria	
Aug.	12, 1974	4.3×10^4	1.8×10^7	15
Aug.	19, 1974	5.1×10^2	2.3×10^8	18
Aug.	26, 1974	1.4×10^4	4.7×10^6	15
Sept.	2, 1974	1.3×10^4	1.0×10^8	17
Sept.	9, 1974	1.2×10^4	3.0×10^6	4
Sept.	17, 1974	1.9×10^3	5.6×10^5	4
Sept.	24, 1974	1.3×10^3	3.1×10^5	—
Sept.	30, 1974	7.6×10^2	5.3×10^6	18
Oct.	7, 1974	6.3×10^1	6.2×10^5	5
Oct.	14, 1974	3.0×10^1	2.3×10^5	—
Oct.	21, 1974	1.1×10^1	1.6×10^6	—
Oct.	28, 1974	5.0×10^0	4.6×10^5	—
Nov.	5, 1974	0.3×10^0	7.8×10^4	—
Dec.	9, 1974	$<0.3 \times 10^0$	1.1×10^5	—
Jan.	20, 1975	$<0.3 \times 10^0$	1.6×10^5	—
Feb.	24, 1975	$<0.3 \times 10^0$	5.5×10^4	—
March	17, 1975	$<0.3 \times 10^0$	4.8×10^5	—

し、貝の場合と同様に検査した (Scheme 1).

5. 一般細菌数の測定

試料原液および希釈試料の 0.1 ml をそれぞれ、3 % 食塩加普通寒天 (ニッスイ) 平板上にコンラージ棒で塗抹し、25°で72時間培養し、出現したコロニー数を算定して一般細菌数とした。

成 績

1. むき身貝中の推定腸ビ数、一般細菌数の消長と都内腸ビ食中毒患者発生との関係

1973年6月から1975年3月までの22ヵ月間に、東京都中央卸売市場に入荷した、むき身貝の推定腸ビ菌数と一般細菌数を経時的には握し、同時期に発生した確認腸ビ食中毒患者数と対比させてみた (Table 1).

1973年6月25日の時点で、 $10^3/g$ レベルにあった平均推定腸ビ数は、日数の経過に伴い急速に増加し、8月20日には $10^6/g$ レベルとその最高値に達した。以後徐々にその菌数の減少をみせ、11月5日には $10^2/g$ レベルまで低下し、12月17日には全く検出できなくなった。その後、貝の中から推定腸ビが検出できなかった期間は、1974年3月18日までにはわたっていた。

推定腸ビが再び貝の中に出現し始めたのは、1974年4月22日からで、以後その数は徐々に増加し、6月中旬には前年同様 $10^3/g$ レベルに到達した。しかし、以後8月上旬まで $10^3/g$ レベルの菌数を維持し、わずかに8月中旬から9月上旬までの間、 $10^4/g$ を越える時期があった

が、再び急激に減少し、12月上旬には全く検出できなくなった。

以上、両年の検査結果から、むき身貝中の推定腸ビ数は、季節の変化とともに顕著な変動を示し、しかも平均推定腸ビ数が $10^4/g$ レベルを越えた時期に、腸ビ食中毒患者の発生頻度が高くなることが分かった。一方、検体中の一般細菌数は、年間を通じて $10^6/g$ 前後を示し、海水温が最も低下すると考えられる1～2月の時点でも、大きな変動は認められなかった。

2. 貝と漬水中の推定腸ビ数の比較

貝とその漬水それぞれ177件の推定腸ビ数を比較したところ (Table 2)、そのうち150件 (84.7%) について、1オーダー以内の差で、ほぼ似通った測定値が得られた。しかし、この表から明らかのように、一般に貝の推定腸ビ数が漬水のそれよりもわずかに高くでる傾向が認められた。その原因を明らかにするため、“舌切り”および“さき赤”という商品名を付されている加工バカ貝およびアカ貝の漬水140件の塩分濃度を調べてみたところ、そのうち133件 (95%) が塩分濃度1%以下で、明らかにむき身貝の加工業者が商品を水増しする目的で、貝の漬水に水道水を用いていることが判明した。

3. 分離腸ビ株の性状

検体の MPN 測定に用いた ACPW で、陽性を示した最高希釈列の試験管から、その1白金耳を TCBS (栄研化学(株)製) 平板に接種し、菌を分離した後、その生

Table 2. Simultaneous Detection of Presumptive *V. parahaemolyticus* from Shucked Shellfish and Its Immersed Water

		MPN on shellfish (per gram)						Total
		<10 ²	10 ² ~10 ³	10 ³ ~10 ⁴	10 ⁴ ~10 ⁵	10 ⁵ ~10 ⁶	>10 ⁶	
MPN on immersed water (per ml.)	<10 ²	13	2	4	3	1		23
	10 ² ~10 ³		7	21	8			36
	10 ³ ~10 ⁴	2	4	23	15	4	1	49
	10 ⁴ ~10 ⁵		1	3	11	15	2	32
	10 ⁵ ~10 ⁶			1	3	27	3	34
	>10 ⁶						3	3
Total		15	14	52	40	47	9	177

Note: Figures in the Table indicate the number of specimens.

Table 3. Results of Serological Typing Made on the Isolates

O Group	K Types												Total
	18	29	30	32	33	34	37	39	42	51	56	KUT	
1				2	7						4	2	15
2												2	2
3							4				2 ^{a)}	13	19
4		1 ^{a)}				1			16			5	23
5			1										1
6	1												1
7													0
8								1				5	6
9													0
10												5	5
11										1			1
12													0
Total	1	1	1	2	7	1	4	1	16	1	6	32	73

^{a)} Indicates the number of strains showed new O—K antigenic combination, and KUT indicates K untypable.

物学的性状¹⁾を調べたところ、分離株のすべてが神奈川現象²⁾陰性であった点を除いて、患者分離標準株の示す性状を満足し、腸ビと同定された。なお、分離株のうち代表的とおもわれる73株について、その抗原型を調べたところ (Table 3), 41株 (56.2%) が既知のK抗原型に型別された。しかし、そのうちの3株はこれまで知られていなかったO—K抗原型であった。残りの32株 (43.8%) についてはK抗原による型別は不能であった。

考 察

鮮魚介類など食品からの腸ビ分離に際して、常に次の

点が考慮されなければならない。1) 菌分離の方法として、通常食中毒患者糞便から腸ビを分離する方法に準じて TCBS 平板上に直接試料原液を塗抹接種する方法では、白糖非分解の海水由来類縁ビブリオが、同時に腸ビに類似の集落を形成するため、腸ビ集落との判別が困難であり、しかも検体中 10²/g 以下の腸ビ数を測定できない。2) 低温保存検体にあつては、汚染腸ビが寒冷傷害を受けており、選択培地上での増殖が抑制されるため、実際よりかなり低い数値しか得られない。

最近、これらの難点を克服するために、MPN 法によ

る鮮魚介類中の腸ビ数測定法が、Fishbein ら⁴⁾および仲西ら⁵⁾によって報告されているが、菌の分離同定を含めて最終的な MPN 値を得るまでの手技が複雑であるなど、なお多くの難点がある。今回の調査で我々が採用した方法は、検体中に存在の予想される損傷腸ビの回復を計るとともに、ある程度類縁ビブリオの増殖を抑制するため、まず6%食塩加 PW で予備培養をした後、これを ACPW 培地に移植して、培地中に含まれる L-アラビノースの分解の有無を鍵として推定腸ビ数を得ようとする簡易法である。

1973年に、この方法で調べた貝中の平均推定腸ビ数が、 10^4 から 10^6 /g と急上昇すると同時に、都内に腸ビ食中毒患者が多発したことから、1974年は、市場に出回る貝の中の推定腸ビ数を 10^3 /g 以下に抑えるという目標を設定してみた。まず、市場に大量にむき身貝を出荷している千葉県浦安の加工業者に対する指導を7月から9月まで重点的に行い、従来、48時間を要した産地→輸送→むき身加工→輸送→市場の所要時間を24時間に短縮させた。同時に、むき身加工後の低温流通の徹底を計り、市場内での貝と他の魚介類との混売を禁止し、両者間の交叉汚染の防止を計った。その結果、7月中の貝の推定腸ビ数は、一応期待通り 10^3 /g レベルを維持し続け、わずかに8月中旬以後9月初旬まで 10^4 /g レベルを示したのみで、以後急速な下降を示した。一方、都内の腸ビ食中毒患者数も、1974年には大幅な減少を示し、しかも貝類に起因するものは皆無という好成績を得た。そこで「生食用海産魚介類中の推定腸ビ数は 10^3 /g レベル以下でなければならない」という暫定許容限界を設け、生産から消費にいたる間、一貫した低温流通を計るとともに、小売店での販売に際しては、生食用の標示を付し、その他一般の鮮魚介類との混売を禁止すべきであると考えた。なお、Table 2 から明らかなように、漬水の推定腸ビ数は、貝のそれとおおむね一致するので、末端小売店舗での調査の際には、経済的損害を与えない意味で、漬水のみを検査対象として汚染度調査を行うことも意義のあることと思われる。

腸ビのヒトに対する病原性については、宮本ら²⁾の述べた神奈川現象の有無と、滝川⁶⁾および坂崎ら⁷⁾の行った実験の結果から、海産物由来の腸ビのほとんどは、非病原性株であると考えられている。ところが、我妻⁸⁾は、海洋由来株748株中1株が、神奈川現象陽性であったとし、善養寺ら⁹⁾も、食中毒の原因食として疑われた魚介類から得た、167株の腸ビ株中6株(3.6%)が神奈川現象陽性であったと述べている。現在まで、我々は、本調査で神奈川現象陽性株を得ていないし、また我々の分離株の抗原型が、食中毒に関与した流行菌型と関係がなかったことから、我々が測定している推定腸ビ数が、神奈

川現象陽性腸ビの存在と、どのような関係にあるかについては論及できない。しかし、市場に出回る生食用魚介類が、ヒトに病原性を示す腸ビに汚染されている恐れの場合を、この推定腸ビを指標菌として推測することは可能と思われる。また、汚染状況の追跡の対象海産物として、バカ貝などは、四季を通じて市場に出回る食品であるので、これらが生産された日本の沿岸海域の、腸ビ汚染状況をも併せて推測できるなど、この種の調査に最も適した検査対象の一つと考える。

要 約

1973年6月から1975年3月まで、生食用むき身バカ貝およびアカ貝を対象とした腸ビ汚染の追跡を行ったところ、推定腸ビ数が 10^4 /g レベルを越えた時期に、腸ビ食中毒患者が多発する傾向が認められた。漬水についてもこれと同様な傾向がみられた。一方、検体中の一般海洋細菌数は、年間を通じて大きな変動は認められず、 10^6 /g 前後を示した。

陽性反応を示した最高希釈列の ACPW から、TCBS 平板で分離した分離株はすべて神奈川現象陰性であったが、生物学的性状から腸ビと同定された。また、その抗原型を調べたところ、分離株の56.2%が既知の血清型に型別された。しかし、これら分離株の抗原型は、食中毒に関与した流行菌型と関係がなかった。

なお、今回の調査で採用した検査法ならびに成績の一部は、第27回日本食品衛生学会(昭和49年5月、東京)において発表した。

文 献

- 1) LeClair, R., Zen-Yoji, H., Sakai, S.: J. Conference of Public Health Laboratory Directors, 28, 82 (1970).
- 2) Miyamoto, Y., Kato, T., Ohara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K., Yamai, S.: J. Bacteriol., 100, 1147 (1969).
- 3) Zen-Yoji, H., Sakai, S., Kudoh, Y., Itoh, T., Terayama, T.: Health Laboratory Service, 7, 100 (1970).
- 4) Fishbein, M., Wentz, B.: J. Milk Food Technol., 36, 118 (1973).
- 5) Nakanishi, H., Murase, M.: Proc. International Symposium on *V. parahaemolyticus*, p. 117 (1974) Saikon Publishing Co.
- 6) Takikawa, I.: Yokohama Medical Bulletin, 9, 313 (1958).
- 7) 坂崎利一, 田村和満, 加藤貞治, 小原 寧: メディヤサークル, 13, 159 (1968).
- 8) 我妻正三郎: 同上, 13, 159 (1968).