生カキの大腸菌汚染と分離菌株の エンテロトキシン産生性

(昭和 52 年 9 月 27 日受理)

小久保弥太郎^{*1} 松下 秀^{*1} 甲斐明美^{*1}
山田 満^{*2} 小沼博隆^{*3}

Incidence of *Escherichia coli* in Raw Oyster and Enterotoxin Producibility of the Isolates

Yataro KOKUBO^{*1}, Shigeru MATSUSHITA^{*1}, Akemi KAI^{*1},
Mitsuru YAMADA^{*2} and Hirotaka KONUMA^{*3}

(^{*1}Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo; ^{*2}Sanitation Inspection Station of Central Wholesale Market: 2-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo; ^{*3}National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

During the period from October 1976 through March 1977, a total of 405 raw oyster samples mainly obtained at Tokyo Central Wholesale Market were subjected for the presence of *Escherichia coli*. Enumeration of *E. coli* in the specimens was made by a standard simplified multiple tube technique with EC broth.

Of the specimens tested, 229 (56.5%) were found to be contaminated with *E. coli*, and 39 of the positive samples, accounting for 9.6% of the total samples tested, had harbored greater than 230/100 g of the organisms. Among the specimens tested, those originated from Hiroshima Prefecture tended to show more heavy and frequent contamination with *E. coli* than those from the other areas. In addition to this fact, the increase of *E. coli* contamination was observed on oyster samples obtained in December.

Among the 138 isolates tested for their producibility of the enterotoxin, 4 (2.9%) strains were found to be the enterotoxin producers. Of these, strains 1 strain isolated from the oyster originated from Hiroshima Prefecture was a producer of sole heat-labile enterotoxin (LT,) while the other 3 strains isolated from the oyster originated from Iwate and Mie Prefectures were the producers of sole heat-stable enterotoxin (ST). Two ST-producing strains were identified as their serotypes of 025 : H42 and 020 : H-, but the other 1 strain of H- was remained 0 untypable. One LT-producing strain was 0 untypable and H2.

(Received September 27, 1977)

大腸菌はヒトや動物の腸内常在菌の一つであり、本来ヒトに対して非病原性であると考えられていた。ところが、1950年以降、ある特定の血清型に属する大腸菌が、乳幼児や成人の下痢症の起因菌になり得ることが疫学的に明らかにされるにおよび、それらは病原大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*) という呼称のも

とに、一般の大腸菌と区別して考えられるようになってきた。

一方、1967年に Smith ら¹⁾により、エンテロトキシンを産生するいわゆる毒素原性 (enterotoxigenic) 大腸菌の存在が明らかにされ、次いで Sack ら²⁾により、本菌の産生するエンテロトキシンがヒトに下痢を引き起こさせる原因物質であることが確認された。以来、毒素原性大腸菌による下痢症が世界の注目を集めている。我が国においても、Kudoh ら³⁾により、都内で発生した大腸

^{*1} 東京都立衛生研究所：東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*2} 東京都市場衛生検査所：東京都中央区築地 5-2-1

^{*3} 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

菌集団下痢症のかかりのものが、エンテロトキシン産生能を持つ菌に起因するものであったことが報告されている。これらの毒素原性大腸菌は、飲食物を介してヒトに感染するものと考えられるが、本菌の食品中の分布については、わずかに Mehlman ら⁴⁾や Sack ら⁵⁾の報告があるにすぎず、その汚染の実態はほとんど不明である。

本報では、主として東京都中央卸売市場に入荷した生カキの大腸菌汚染状況を EC テストにより調査し、分離された大腸菌についてエンテロトキシン産生能の有無を検査した結果を報告する。

材料および方法

1. 供試生カキ

1976年10月から1977年3月の間に、岩手、宮城県などの三陸地方、三重県、広島県および韓国などから東京都中央卸売市場に入荷した生カキ、ならびに都内の産地直送店舗より採取したから付きのカキ計405検体を供試した。

2. 使用培地

2.1 EC 培地

大腸菌数測定に用いた培地は栄研化学(株)製の EC 培地で、次の組成である。すなわち、培地 1000 ml 当たり、ペプトン(栄研化学(株)製) 20 g、乳糖 5 g、胆汁酸塩 No. 2 (栄研化学(株)製) 1.5 g、リン酸一水素カリウム 4 g、リン酸二水素カリウム 1.5 g、塩化ナトリウム 5 g から成り、pH 6.9±0.1 である、これを 10 ml ずつダーラム管を入れた中試験管に分注し、121°で15分間滅菌後使用した。

2.2 エンテロトキシン産生試験用培地

Evans ら⁶⁾により報告された大腸菌エンテロトキシン産生試験用培地を用いた。すなわち、その組成は培地 1000 ml 当たり、カザミノ酸 (Difco) 20 g、酵母エキス (Difco) 6 g、リン酸一水素カリウム 8.71 g、塩化ナトリウム 2.5 g、微量塩溶液(硫酸マグネシウム 5 g、塩化マンガン 0.5 g および塩化第二鉄 0.5 g を 0.001 N 硫酸 100 ml に溶解したもの) 1.0 ml から成るもので、pH 8.5 に調整後、これを 50 ml ずつ 500 ml 容の三角フラスコに分注し、121°で15分間高圧蒸気滅菌後使用した。

3. 大腸菌数の測定

生カキ 50 g に滅菌リン酸緩衝希釈水 50 ml を加え、ホモジナイズしたものを試料原液とした。この試料原液 2 ml、それを 5 倍希釈して得た10倍試料希釈液およびこれをさらに10倍希釈した 100 倍試料希釈液 1 ml ずつをそれぞれ 5 本ずつの EC 培地に接種した。44.5°で24時間培養後、ガス産生の認められた試験管を大腸菌発育陽性として、各希釈段階の陽性試験管数から検体 100 g 当たりの最確数 (MPN) を求めた。

4. 大腸菌の分離と同定

前項の試験で陽性を示した最高希釈列の EC 培地試験管から、その一白金耳を EMB 寒天 (栄研化学(株)製) 平板に塗抹接種して菌を分離した後、その生物学的性

状⁷⁾を調べて大腸菌を同定した。

5. エンテロトキシン産生能試験

あらかじめ毒素産生試験用培地で 37°、18 時間前培養した被検菌液を同培地 50 ml に 0.1 ml ずつ接種し、37°で18時間振とう (120回/分) 培養後、4°で 12,000 rpm、20分間遠心沈殿した。得られた上清にストレプトマイシン 50 mcg/ml およびペニシリン 50 μ /ml に加えたものを試験用材料とし、以下に述べる方法により易熱性 (LT) および耐熱性 (ST) エンテロトキシンの検査を実施した。

5.1 LT の検出

Guerrant らの方法⁸⁾に準拠して、Chinese hamster の卵巣腫瘍由来 (CHO-K₁) 細胞の伸張を指標とする方法により実施した。細胞の培養は 5% 透析牛胎児血清 (Gibco) 加 F12 培地 (日本製薬(株)製) を用い、5% 炭酸ガス存在下 37°で行った。

上記培地で約 2×10^4 /ml に希釈した培養細胞液 0.5 ml をチェンバースライド (8 チェンバースライド Lab-Tek) の各チェンバーに分注した。3 時間の前培養後、同培地で 10 倍に希釈した被検材料 0.5 ml と交換し 1 夜培養後、各チェンバー内の細胞を固定・染色し細胞 400 個を観察して、その 15% 以上に細胞伸張の認められた場合を LT 陽性とした。

5.2 ST の検出

Dean らの報告⁹⁾に準拠して、ICR 系 3~4 日令の乳飲みマウス胃内接種法により実施した。すなわち、被検材料 5 ml に 2 滴の 5% ブリリアントブルー 6B (東京化成(株)製) 液を添加したもの 0.1 ml をマウスの胃内に腹壁を通して接種した。3 時間室温に放置後クロロホルムで殺処分して小腸を摘出し、その重量と残りの体重を測定して、その比が 0.090 以上のものを ST 陽性とした。

6. 血清型別

エンテロトキシン産生株についてのみ実施した。その方法は、標準菌株を用いて自家作成した O1~163 の抗 O 因子血清、H1~56 の抗 H 因子血清で凝集反応を行った。O 抗原としては、121°、2 時間半加熱菌液を用い、抗 O 因子血清でスライド凝集反応を行い、唯一の血清のみに凝集する場合に、その対応する O 抗原型と決定した。H 抗原型は、クレーギー管を用いて選択した運動性の強い菌を H Broth (Difco) で 37°、6~8 時間培養後ホルマリン死菌とし、抗 H 因子血清で 50°、1 時間試験管内凝集反応を行って決定した。

試験成績

1. 生カキの大腸菌汚染状況

産地別生カキの大腸菌による汚染状況を Table 1 に示した。すなわち、405 検体中 229 検体 (56.5%) から大腸菌が検出され、国内産のものでは、産地の別なくいずれも 50% 以上の陽性率を示した。なかでも広島県産カキ

Table 1. Incidence of *E. coli* in Raw Oysters Arrived from Different Districts

Place of landed	No. of tested	No. of <i>E. coli</i> /100 g				
		≤10	11~100	101~1,000	1,001~10,000	≥10,001
Iwate and Miyagi Prefectures	142	65 (45.7)	59 (41.5)	14 (10.0)	4 (2.8)	—
Mie Prefecture	52	24 (46.1)	17 (32.7)	11 (21.2)	—	—
Hiroshima Prefecture	194	76 (39.2)	85 (43.8)	25 (12.9)	5 (2.6)	3 (1.5)
Korea	17	11 (64.7)	5 (29.4)	1 (5.9)	—	—
Total	405	176 (43.5)	166 (41.0)	51 (12.6)	9 (2.2)	3 (0.7)

Note: Figures in the table indicate the number of samples, and parentheses indicate per cent occupied.

Fig. 1. Monthly incidence of *E. coli* in raw oysters

* Number of samples tested

は194検体中118検体(60.8%)陽性と最も検出率が高く、 $10^4/100$ g と汚染の著しいものも認められた。また、食品衛生法に基づく食品添加物などの規格基準に定められた生食用カキ成分規格の大腸菌数 $230/100$ g 以上の汚染が認められたものが、405検体中39検体(9.6%)あり、このなかから付きで生食用と標示されたカキも数例含まれていた。これに対して、韓国産カキは17検体中6検体(35.3%)が陽性であったが、 $230/100$ g 以上の菌数値を示したものはなかった。

これらの生カキの入荷月別の大腸菌汚染状況を見ると、Fig. 1 に示したように入荷月に関係なくいずれも40%以上の陽性率であった。特に12月に入荷した生カキは最も汚染度が高く、92検体中61検体(66.4%)から大腸菌が検出され、そのうち15検体(16.3%)が、 $230/100$

g 以上の菌数値を示した。

2. 分離大腸菌のエンテロトキシン産生能

大腸菌と同定された菌株のうち138株を無作為に選び、それらの LT および ST 産生能を調べた。その結果を Table 2 に示した。

138株中4株(2.9%)がエンテロトキシン産生株であった。このうち1株はLT単独産生株で広島県産カキから分離されたものであり、他の3株はいずれもST単独産生株で、そのうち2株は岩手県産、1株は三重県産カキからの分離株であった。

エンテロトキシン産生性の4株の血清型は Table 3 に示したとおりである。すなわち、LT産生株はO型別不能Hが2と型別された。また、ST産生株のうち1株はO25:H42に型別されたが、他の2株はO20およびO型別

Table 2. Enterotoxin Producibility of *E. coli* Isolates Obtained from Raw Oysters

Source of the isolates	No. of isolates tested	No. of isolates produced enterotoxin	
		LT	ST
Oyster from Iwate and Miyagi Prefectures	50	—	2
Oyster from Mie Prefecture	28	—	1
Oyster from Hiroshima Prefecture	53	1	—
Oyster from Korea	7	—	—
Total	138	1	3

Table 3. Serotypes of Enterotoxigenic *E. coli* Isolated from Raw Oyster

Type of enterotoxin found	O : H serotype of the isolates	Coli index ^{a)}	Source of the isolates
ST	O 20 : H—	68	Oyster from Iwate Prefecture
ST	O UT : H—	790	Oyster from Iwate Prefecture
ST	O 25 : H42	240	Oyster from Mie Prefecture
LT	O UT : H2	5400	Oyster from Hiroshima Prefecture

Note: UT indicates untypable

^{a)} Numbers of *E. coli* found in 100 g of oyster

不能で、共に運動性はなかった。

これら4株中3株はいずれも230/100g以上の大腸菌汚染を示した岩手、三重および広島県産カキから分離されたものであった。そのうち三重県産カキはから付きで生食用と標示されていた。他の1株は岩手県産のカキから分離されたもので、この検体の大腸菌数は68/100gであった。

考 察

カキは河川の汚染を受けやすい海域で養殖される点、およびその食性から、ヒトおよび動物の腸管系病原菌の汚染を受けやすい。また肉の部分とともに内臓もいっしょに生食されることが多いため、古くから胃腸炎や食中毒の原因食となりやすい食品として注目されている。我が国では、食品衛生法によって生食用カキの大腸菌数は230/100g以下でなければならないとされている。今回調査した生カキをこの基準に照してみると、その90%以上が生食用として合格であった。しかし、大腸菌数230/100g以上で不合格となったカキの中に、産地直送のから付きカキで生食用と標示されていたものが含まれており、それらは需要が急上昇する12～1月の時期に主として認められた。

これらの生カキから、その産地には関係なく数こそ少ないがエンテロトキシン産生性の大腸菌が検出されたことは興味深い。このことは毒素原性大腸菌が、我が国のカキ養殖海域に広く分布していることを物語っている。毒素原性大腸菌がカキ食中毒の起因菌になったという報

告はまだ見当たらないが、本菌が生カキを通じてヒトの口に直接进入の可能性が多分にあることは、カキの食品衛生を論ずるに当たって注目すべきことである。

食品の毒素原性大腸菌による汚染に関しては、Sackら⁹⁾がチーズ、ハンバーグおよびソーセージなどについて、またMehlmanら⁴⁾は主としてチーズについて報告しているが、彼らはいずれもその汚染源として動物を示唆している。それにひきかえ、今回我々が明らかにし得た生カキの汚染では、河川によるカキ養殖海域の汚染要因から考えて、ヒト由来の汚染である可能性が高い。

今回の調査で得られた4株の毒素原性大腸菌の血清型は、ST産生の3株はそれぞれO20:H—、O25:H42およびOUT:H—であり、他のLT産生の1株はOUT:H2であり、従来毒素産生性が知られている型としてはO25:H421株のみであった。この型の菌はSackら¹⁰⁾がヒトのコレラ様下痢症患者から分離したものであるが、LT産生株であり、今回得られた株はST単独産生株であったのと一致しない。大腸菌のエンテロトキシン産生能が必ずしも特定の血清型の菌にのみ認められるのではないことを示す例として興味あるところである。

生カキの食品衛生上、毒素原性大腸菌による汚染の実態を知ることは、毒素産生性が必ずしも特定の血清型に集積せず、しかも現行の毒素原性検査の方法がかなり煩雑な手技を必要とすることを考え合わせると容易なことではない。早急に簡易な毒素原性大腸菌の検査法の開発

が望まれるところである。生食用カキ中のあるいはカキ養殖場およびその加工場の環境中での毒素原性大腸菌の出現頻度を数量的には握しない限り、これがどの程度下痢症の原因と直結し得るかどうかを知ることは困難であるが、少なくとも今後カキが原因と推定される集団下痢症に遭遇した場合、起因菌として毒素原性大腸菌にも注目する必要があるであろう。しかし、一方毒素原性大腸菌下痢症の発病機転から考えると、発病にはおそらく 10^6 個以上の菌が小腸に到達する必要がある¹¹⁾と思われ、また、今回の調査結果からすると、このような菌の検出される頻度は必ずしも高くないので、毒素原性大腸菌が検出された事実を直ちに下痢症発生の危険性と結びつけて恐れる必要はない。従来行政的に規定されている菌数230/100 g 以下であれば、そこに少数の毒素原性大腸菌が存在したとしても、これが直ちに食中毒の発症につながる可能性はほとんどないであろう。ただし、大腸菌の毒素産生性は伝達性のプラスミッド支配を受けていることが知られている¹²⁾ことから、生カキの輸送中、保存中の鮮度低下に伴うこの種の大腸菌の増殖は防止されなければならない。生食用と標示された生カキ中に規準値を上回る数の大腸菌で汚染されているものが存在する事実からすると、今後もカキの汚染防止について、強力な監視・指導が必要と考えられる。

要 約

1976年10月～1977年3月の間に、主として東京都中央卸売市場に入荷した生カキ405検体を対象に、それらの大腸菌による汚染状況をECテストにより調査した。その結果、三陸地方、三重および広島県産カキはともに検体の50%以上から大腸菌が検出され、そのうち39検体(9.6%)は230/100 g 以上の大腸菌による汚染を示し、中でも広島県産カキの汚染が高かった。また、12月に入荷したカキは、他の月のものに比較して高い汚染が認められた。

分離した大腸菌138株のエンテロトキシン産生能を試験したところ、4株に毒素原性が認められた。そのうち1株はLT産生株で広島県産カキから、他の3株はST産生株で岩手および三重県産のカキから分離されたものであった。これらの血清型は、LT産生株はO型別不能

H2, ST産生株は1株がO25:H42, 他の2株は運動性を欠きO20およびO型別不能であった。

文 献

- 1) Smith, H. W., Halls, S.: *J. Path. Bact.*, **93**, 531 (1967).
- 2) Sack, R. B., Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Jacobs, B., Chatterjee, B. D., Mitra, R. C.: *J. Infect. Diseases*, **123**, 378 (1971).
- 3) Kudoh, Y., Zen-yoji, H., Matsushita, S., Sakai, S., Maruyama, T.: *Microbiol. Immunol.*, **21**, 175 (1977).
- 4) Mehlman, I. J., Fishbein, M., Gorbach, S. L., Sanders, A. C., Eide, E. L., Olson, J. C., Jr.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **56**, 67 (1976).
- 5) Sack, R. B., Sack, D. A., Mehlman, I. J., Orskov, F., Orskov, I.: *J. Infect. Diseases*, **135**, 313 (1977).
- 6) Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., Gorbach, S. L.: *Infect. Immunity*, **8**, 725 (1973).
- 7) Cowan, S. T., Steel, K. J.: "Manual for the Identification of Medical Bacteria," 2nd ed. p. 108 (1974), Cambridge University Press (London).
- 8) Guerrant, R. L., Brunton, L. L., Schnaitman, T. C., Rebhun, L. I., Gilman, A. G.: *Infect. Immunity*, **10**, 320 (1974).
- 9) Dean, A. G., Ching, Yi-C., Williams, R. G., Harden, L. B.: *J. Infect. Diseases*, **125**, 407 (1972).
- 10) Sack, R. B., Jacobs, B., Mitra, R.: *ibid.*, **129**, 330 (1972).
- 11) DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheahan, D. G., LaBrec, E. H., Kalas, J. P.: *New Engl. J. Med.*, **285**, 1 (1971).
- 12) Gyles, C., So, M., Falkow, S.: *J. Infect. Diseases*, **130**, 40 (1974).