腸炎ビブリオの酸性下における生存に及ぼす 有機酸と食塩の影響

(昭和 60 年 3 月 1 日受理)

能勢 征子^{*1} 風戸 実香^{*1} 坂井 千三^{*2}

Effect of Several Organic Acids and Sodium Chloride on the Viability of *Vibrio parahaemolyticus*

Masako NOSE^{*1}, Mika KAZATO^{*1} and Senzo SAKAI^{*2}

(^{*1}Tachikawa College of Tokyo: 3-6-33, Azuma-cho, Akishima-shi, Tokyo, Japan;

^{*2}Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public
Health: 3-16-25, Shibazaki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo, Japan)

In order to elucidate the mechanism of food poisoning outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, the viability of this bacterium was examined after a one-hour incubation in acidic media (pH 5.0, 5.5 and 6.0) with several organic acids and sodium chloride at 37°C.

The viability hardly decreased even at pH 5.0 in the medium without any organic acid in the presence of 0.5% sodium chloride solution. In the medium with 0.1 M acetate, lactate or succinate the viability decreased markedly, but citrate, malate, tartrate or oxalate had almost no effect. The effects of acetate and lactate decreased with increasing sodium chloride concentration (3%). Among Kanagawa-phenomenon-positive strains, negative strains of *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*, almost no difference was observed in the behavior in acidic media with the various organic acids mentioned above.

(Received March 1, 1985)

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio alginolyticus*; 酢酸 acetic acid; 乳酸 lactic acid; クエン酸 citric acid; 塩化ナトリウム sodium chloride

魚介類を生食する習慣を持つ我が国において腸炎ビブリオは、夏期に多発する食中毒の代表的原因菌¹⁾として知られている。本菌はその増殖に食塩を必要とするいわゆる好塩性細菌²⁾の一つであり、その至適食塩濃度は約3%であると同時に、培地がややアルカリ側 (pH 8.0付近) でおう盛な増殖を示し、酸性側での増殖可能なpHは食品中で約5.8以上³⁾であることから、耐酸性の低い細菌と思われる。

そこで著者らは、酸性条件下での生存、損傷、死滅に着目し、食品中に含まれる有機酸、食塩濃度が酸性条件下における本菌の生存に及ぼす影響を検討したところ、興味ある結果が得られたのでここに報告する。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株は Table 1 に示すごとく、*Vibrio parahaemolyticus* は食中毒患者由来の神奈川現象⁴⁾陽性株2株、アジ由来の神奈川現象陰性株2株、食中毒患者から神奈川現象陽性株と同時に分離された陰性株2株である。*Vibrio alginolyticus*⁵⁾ は、アジ由来の1株で、いずれも東京都立衛生研究所において分離同定された菌株である。

2. 前培養

2% ポリペプトン (大五栄養化学 (株) 製) に、塩化ナトリウムを 0.5% または 3% 加えた液体培地 10 ml (30 ml 容 L-型試験管) に菌を接種し、37°において16~24時間振盪 (往復運動90回/分) 培養を行った。なお、前培養での塩化ナトリウム濃度と後述の酸処理における塩化ナトリウム濃度とは一致させた。

*1 東京都立立川短期大学: 東京都昭島市東町 3-6-33

*2 東京都立衛生研究所多摩支所: 東京都立川市柴崎町 3-16-25

Table 1. List of *Vibrio Parahaemolyticus*

Strain	Serovar	Kanagawa phenomenon	Source
T-81-383	1 58	Positive	Human
T-81-357	4 8	Positive	Human
T-76-49-2	2 28	Negative	Sea food
FP-7	2 UT	Negative	Sea food
T-76-50	2 28	Negative	Human
T-76-77	1 33	Negative	Human

3. 有機酸添加培地中の生菌数の測定

2% ポリペプトンに塩化ナトリウム及び有機酸（酢酸、乳酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、またはシュウ酸）を添加した培地（0.1 M 有機酸またはそのナトリウム塩を含む培地を別々に作り、両者を適当量混合して pH の調整を行った）に前培養菌を $10^7 \sim 10^8$ 個/ml となるように加え、37°において振盪培養を行い、経時的に生菌数を測定した。

生菌数の測定は、2% 塩化ナトリウムを含む 2% ポリペプトン水（リン酸三カリウムを添加し pH 7.6 に調整）で段階希釈し、塩化ナトリウム濃度を 2% としたブレインハートインフュージョン寒天培地（日水製薬株式会社製）を用い、常法により生菌数を測定した。

本実験培地の pH は、5.0, 5.5, 6.0 の3種類、塩化ナトリウム濃度は、0.5%, 3% の2種類とした。

なお、無機酸である塩酸またはリン酸を添加して pH を調整した培地についても同様に生菌数の測定を行った。

実験結果

1. 各種 pH の酢酸添加培地における生菌数の経時的変化

Fig. 1 は培地中の塩化ナトリウム濃度を腸炎ビブリオとしては増殖可能な下限の 0.5% と低くした場合で、0.1 M 酢酸存在下の各 pH における T-81-383 菌の生菌数の変化を経時的に追ったものである。pH 6.0 では1時間後においても生菌数はあまり減少しないのに比べ、pH 5.5 では30分以内に約 95% が、pH 5.0 では10分以内に約 98% が死滅した。

2. 酸性培地中における生存に及ぼす pH, 有機酸の種類並びに食塩濃度の影響

同一 pH における有機酸の影響を1時間培養後の生菌数の減少で比較した。Table 2 は 0.5% 塩化ナトリウム存在下、Table 3 は 3% 塩化ナトリウム存在下での結果である。

0.5% 塩化ナトリウム存在下では、酢酸、乳酸、コハク酸により pH 5.0 において生菌数は顕著に減少した。pH 5.5 では酢酸のみに生菌数の減少が認められた。一方、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、シュウ酸及び対照として有機酸ではなく、塩酸、リン酸を加えた場合には

Fig. 1. Time course of viability in 0.1 M sodium acetate medium with 0.5% sodium chloride solution

Vibrio parahaemolyticus T-81-383

The medium contained 2% polypeptone, 0.5% sodium chloride and 0.1 M sodium acetate (pH 5.0, 5.5 and 6.0). Incubation was done at 37°C with aeration. Brain heart infusion agar medium with 2% sodium chloride was used for viable counts.

pH 5.0 においても生菌数の減少はほとんど認められなかった。なお、培養1時間終了時の pH は上記のすべての条件下で初発 pH とほとんど変化していないこと、及び顕微鏡下で菌の凝集はほとんど認められないこと、従って凝集のための生菌数の見かけの減少は起こっていないことを確認した。

3% 塩化ナトリウム存在下では、酢酸、乳酸、コハク酸により pH 5.0 においてのみ生菌数は減少した。従って、上記の酢酸、乳酸、コハク酸で認められる生菌数の減少は塩化ナトリウム濃度が低い場合に顕著に現れるといえよう。

3. 酸性培地中での生存に及ぼす有機酸の濃度の影響

生菌数の減少が大きく認められた酸として酢酸を、その効果の認められない酸としてクエン酸を用いて検討した結果が Table 4 である。生菌数の減少は、酢酸の濃度が高いほど顕著で、クエン酸の場合は 0.3 M まではほと

Table 2. Viable Cells after Incubation with 0.1 M Sodium Salt of Organic Acid in the Presence of 0.5% Sodium Chloride

Sodium salt of organic acid	Hour	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
Acetic acid	0	2.2×10^7	1.0×10^7	1.8×10^7
	1	1.9×10^2	9.4×10^3	1.2×10^7
Lactic acid	0	1.0×10^7	1.4×10^7	1.1×10^7
	1	5.0×10^1	3.0×10^6	2.8×10^7
Succinic acid	0	1.5×10^7	1.9×10^7	3.6×10^7
	1	5.0×10^1	1.6×10^7	3.0×10^7
Citric acid	0	4.2×10^7	4.7×10^7	3.5×10^7
	1	3.0×10^7	2.0×10^7	4.9×10^7
Malic acid	0	4.3×10^7	4.5×10^7	2.8×10^7
	1	9.8×10^6	9.2×10^6	1.0×10^7
Oxalic acid	0	2.0×10^7	1.2×10^7	2.1×10^7
	1	1.6×10^7	4.8×10^6	8.6×10^6
Tartaric acid	0	4.8×10^7	4.5×10^7	4.4×10^7
	1	2.8×10^7	1.7×10^7	4.6×10^7
HCl*	0	1.1×10^7	1.3×10^7	1.1×10^7
	1	8.2×10^6	1.1×10^7	9.0×10^6
H ₃ PO ₄ **	0	1.4×10^7	1.1×10^7	2.0×10^7
	1	1.0×10^7	1.3×10^7	1.8×10^7

Vibrio parahaemolyticus T-81-383

Incubation mixture contained 2% polypeptone and 0.1 M sodium salt of organic acid in the presence of 0.5% sodium chloride (pH was adjusted to 5.0, 5.5 or 6.0 by mixing an appropriate ratio of each organic acid and its sodium salt. In the case of HCl* or H₃PO₄**, pH was adjusted by adding HCl or H₃PO₄).

Incubation was done at 37°C with aeration. Brain heart infusion agar medium with 2% sodium chloride (pH 8.0) was used for viable counts.

Table 3. Viable Cells after Incubation with 0.1 M Sodium Salt of Organic Acid in the Presence of 3% Sodium Chloride

Sodium salt of organic acid	Hour	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
Acetic acid	0	7.9×10^7	2.2×10^7	3.0×10^7
	1	1.4×10^4	1.2×10^7	3.2×10^7
Lactic acid	0	2.8×10^7	3.1×10^7	2.8×10^7
	1	1.0×10^6	3.7×10^7	2.1×10^7
Succinic acid	0	3.3×10^7	2.1×10^7	2.0×10^7
	1	6.5×10^4	2.4×10^7	2.4×10^7
Citric acid	0	5.4×10^7	4.1×10^7	3.2×10^7
	1	5.8×10^7	5.2×10^7	5.2×10^7
Malic acid	0	1.8×10^7	1.6×10^7	1.4×10^7
	1	2.0×10^7	1.2×10^7	3.0×10^7
Oxalic acid	0	5.2×10^7	4.6×10^7	4.8×10^7
	1	5.8×10^7	6.0×10^7	5.6×10^7
Tartaric acid	0	2.1×10^7	2.0×10^7	1.6×10^7
	1	1.6×10^7	1.1×10^7	1.4×10^7
HCl*	0	2.6×10^7	1.6×10^7	1.8×10^7
	1	1.1×10^7	1.0×10^7	2.0×10^7
H ₃ PO ₄ **	0	3.0×10^7	2.1×10^7	1.9×10^7
	1	2.1×10^7	2.6×10^7	3.1×10^7

Vibrio parahaemolyticus T-81-383

Incubation mixture and others are the same as in Table 2 except the concentration of sodium chloride.

Table 4. Effect of the Concentration of Sodium Acetate and Citrate on Viability at pH 5.5

Sodium salt of organic acid	min.	Viable cells/ml		
		Concentration (M)		
		0.03	0.1	0.3
Acetic acid	0	2.6×10^7	1.0×10^7	2.0×10^7
	30	8.5×10^6	4.5×10^5	5.0×10^1
Citric acid	0		5.0×10^7	4.1×10^7
	30		4.6×10^7	3.6×10^7

Vibrio parahaemolyticus T-81-383

Incubation mixture contained 2% polypeptone, 0.5% sodium chloride and sodium salt of organic acid (pH 5.5).

Incubation was carried at 37°C with aeration. Brain heart infusion agar medium with 2% sodium chloride (pH 8.0) was used for viable counts.

Table 5. Viable Cells of Some Strains of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* after Incubation with 0.1 M Sodium Salt of Organic Acid at pH 5.0 in the Presence of 0.5% Sodium Chloride

Strain	Hour	Na-acetate	Na-lactate	Na-citrate
T-81-383	0	2.2×10^7	1.0×10^7	4.2×10^7
	1	1.9×10^2	5.0×10^1	3.0×10^7
T-81-357	0	2.0×10^7	1.4×10^7	2.8×10^7
	1	5.0×10^1	5.1×10^2	5.1×10^7
T-76-49-2	0	2.8×10^7	3.2×10^7	3.6×10^7
	1	9.6×10^2	6.9×10^2	3.3×10^7
FP-7	0	5.4×10^7	2.5×10^7	4.0×10^7
	1	$< 5.0 \times 10^1$	$< 5.0 \times 10^1$	6.5×10^5
T-76-50	0	2.8×10^7	3.2×10^7	3.6×10^7
	1	7.5×10^2	4.5×10^2	3.0×10^7
T-76-77	0	1.9×10^7	9.6×10^6	1.2×10^7
	1	5.0×10^1	1.2×10^2	1.6×10^7
<i>Vibrio alginolyticus</i> TB-84-68				
	0	5.6×10^7	2.6×10^7	6.0×10^6
	1	1.1×10^3	6.0×10^2	1.0×10^3

Incubation mixture contained 2% polypeptone and 0.5% sodium chloride in the presence of 0.1 M sodium acetate, lactate or citrate. Incubation was carried out at 37°C with aeration. Brain heart infusion agar medium with 2% sodium chloride (pH. 8.0) was used for viable counts.

んど認められなかった。

4. *Vibrio parahaemolyticus* と *Vibrio alginolyticus* の酸性下生存に及ぼす有機酸並びに食塩濃度の影響

以上, Table 2 から Table 4 までの実験結果は, T-81-383 菌について得られたものである。同様な現象が腸炎ビブリオに共通してみられるのか, さらには類似菌である *Vibrio alginolyticus* はどうなのかについて検討した。

Table 1 に示した各菌株及び *Vibrio alginolyticus* 1 株について, pH 5.0, 0.1 M 酢酸, 乳酸, またはクエン酸存在下における 1 時間培養後の生菌数の変化を調べた。0.5% 塩化ナトリウム存在下の結果は Table 5 に, 3% 塩化ナトリウム存在下のそれは Table 6 に示した。

生菌数減少率の差異は若干菌株間に認められるものの, 供試したすべての *Vibrio parahaemolyticus* 及び *Vibrio alginolyticus* は 0.5% 塩化ナトリウム存在下において, 酢酸, 乳酸による顕著な生菌数の減少を示した。クエン酸では, FP-7 株において生菌数の減少が認められたものの, 他の菌株では生菌数の減少はほとんど観察されなかった。

考 察

本実験で腸炎ビブリオは pH 5.0~5.5 の比較的弱い酸性下においても, ある条件下では損傷を受け死滅に至ることが示された。すなわち, 存在する有機酸の種類, 濃度により, あるいは食塩濃度により損傷死滅する程度が大きく異なる点である。例えば, 酢酸, 乳酸, またはコハク酸の存在による損傷死滅の割合は顕著であるが,

Table 6. Viable Cells of Some Strains of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* after Incubation with 0.1 M Sodium Salt of Organic Acid at pH 5.0 in the Presence of 3% Sodium Chloride

Strain	Hour	Na-acetate	Na-lactate	Na-citrate
T-81-383	0	7.9×10^7	2.8×10^7	5.4×10^7
	1	7.4×10^4	1.0×10^6	5.8×10^7
T-81-357	0	4.5×10^7	4.0×10^7	5.0×10^7
	1	2.6×10^3	2.8×10^7	3.9×10^7
T-76-49-2	0	4.0×10^7	3.6×10^7	5.4×10^7
	1	1.6×10^5	2.7×10^6	4.8×10^7
FP-7	0	2.9×10^7	3.1×10^7	3.0×10^7
	1	1.0×10^3	1.0×10^3	8.8×10^6
T-76-50	0	2.5×10^7	4.1×10^7	4.9×10^7
	1	4.9×10^5	6.2×10^5	3.6×10^7
T-76-77	0	3.1×10^7	2.9×10^7	3.6×10^7
	1	2.5×10^4	1.3×10^6	9.4×10^6
<i>Vibrio alginolyticus</i> TB-84-68				
	0	3.7×10^7	4.1×10^7	3.8×10^7
	1	1.8×10^4	3.3×10^5	2.8×10^7

Incubation mixture and others are the same as in Table 5 except the concentration of sodium chloride.

クエン酸, リンゴ酸, シュウ酸, 酒石酸, あるいはこれら有機酸が存在せず塩酸又はリン酸のみの場合は pH 5.0 以上の酸性培地中ではほとんど死滅せず生存している。

今回の実験に用いた有機酸は, 果物, 醃酵食品をはじめ日常摂取する食物中に含まれている。例えば, これら有機酸含有量の高い食品としては, 調理された酢のもの (0.07~0.1 M), ヨーグルト (約 1 M 乳酸), 梅干し, レモン, ミカン等のかんきつ類 (0.1~0.3 M, 主としてクエン酸) などがあげられる。もっともこれら有機酸含有量の高い食品の pH は, 5.0 より低い場合が多い。また, 食物には緩衝作用があるといわれているが, 本実験の有機酸を含む酸性培地は緩衝作用を有し, 1 時間培養後の pH は初発 pH とほぼ同じで変化はなかった。従って, 我々の得た実験結果は, 実用的な観点からは, 食品の加工貯蔵の際の有機酸の有用性に一つの根拠を加えるものと思われる。と同時に, 食品衛生の立場からは, 腸炎ビブリオ食中毒の原因食品となりうる魚介類などを摂取する際には, 酢酸, 乳酸を多く含む食品の摂取も同時に心がけることが望ましいといえよう。

食品腐敗菌に及ぼす有機酸の抗菌力については, 最近, 酢酸, 乳酸, コハク酸が pH 5 以下で *Pseudomonas* や *E. coli* に強い生育阻止作用を持つことが報告され, 同じグラム陰性桿菌である腸炎ビブリオについての我々の本実験結果も同じ現象と思われ興味深い。

ところで, 腸炎ビブリオの食中毒起因性と菌株間の耐酸性についてであるが, Table 5, Table 6 で示したごとく, 本菌の神奈川現象陽性株, 陰性株並びに自然界に

おいて腸炎ビブリオより優勢に存在しながらも腸炎起病性がないとされる *Vibrio alginolyticus* との間には, 本実験の耐酸性についての差異はなく, 耐酸性と食中毒起因性との関連性は認められなかった。

要 約

酸性条件下における *Vibrio parahaemolyticus* の生存に及ぼす有機酸並びに食塩濃度の影響を検討した。

1. 塩酸添加により pH 5.0 または 5.5 に調整した 0.5% 塩化ナトリウム培地 (ペプトン, 2%) では, 37°, 1 時間培養後も菌はほとんど死滅しなかった。
2. 同条件下で, 0.1 M 酢酸, 乳酸またはコハク酸の添加により菌は急速に死滅する。しかし, クエン酸, リンゴ酸, 酒石酸, シュウ酸にはそのような作用はなかった。
3. 酢酸, 乳酸の殺菌作用は, 食塩濃度を 3% に上げることにより減少した。
4. 神奈川現象陽性株と陰性株及び *Vibrio alginolyticus* への有機酸と食塩の影響は, すべての菌にほぼ同じ挙動がみられ, *Vibrio parahaemolyticus* の病原性と酢酸, 乳酸感受性との間の相関性は認められなかった。

本実験に御協力頂いた杉本泰子, 田中裕子, 中園周子, 野村由紀子の諸姉に深く謝意を表す。なお, 本研究の一部は, 日本食品衛生学会第47回学術講演会 (東京) で発表した。

文 献

- 1) 竹田美文, 三輪谷俊夫編: “ビブリオ感染症——腸炎ビブリオ, コレラ菌, 毒素原性大腸菌” p. 25 ~27 (1982) 医歯薬出版。

- 2) Beuchat, L. R.: Appl. Microbiol. **25**, 844~846 (1973).
- 3) 藤野恒三郎, 福見秀雄: “腸炎 ビブリオ II” p. 351 (1967) 納谷書店.
- 4) 小原 寧: 感染症学雑誌 **45**, 392~398 (1971).
- 5) 坂崎利一編: “食中毒” p. 76 (1981) 中央法規出版.
- 6) Levine, A. S., Fellers, C. R.: J. Bacteriol. **39**, 499~515 (1940).
- 7) Goepfert, J. M., Hicks, R.: *ibid.* **97**, 956~958 (1969).
- 8) Chung, K. C., Goepfert, J. M.: J. Food Sci. **35**, 326~328 (1970).
- 9) 山本 泰, 東 和男, 好井久雄: 日食工誌. **31**, 525~530 (1984).
- 10) Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S., Hobo, K.: Japan J. Med. Sci. Biol. **21**, 325~331 (1968).