腸炎ビブリオに関する研究(第5報)

都市川水からの腸炎ビブリオの検出例と
その分離操作上の問題

(昭和 42 年 4 月 28 日受理)

安 永 統 男*

Studies on *Vibrio parahaemolyticus* (V)
Further Detections of *Vibrio parahaemolyticus* from City River
Water and Problems on Procedure for Its Isolation

Norio YASUNAGA

(Nagasaki Prefectural Institute of Public Health:
32-31, Nameshi-machi, Nagasaki)

The main purpose of the present work was to detect *Vibrio parahaemolyticus* from river water not mixed with sea water in other area than Nagasaki-city, from river water of which a great number of halophilic bacteria including the vibrio have been isolated in the previous work, in the light of a report that a few attempts to detect the vibrio from river water of other areas basing on the author's report were unsuccessful.

In this work, the samples (river water) were collected from rivers in Sasebo-city (Table 1), and three broth media were employed for enrichment culture of the water samples (Table 2). The isolation of the vibrio were carried out by means of primary or secondary isolation procedures (Fig. 1).

From these experiments, it was shown that the vibrio was isolated from river water in Sasebo-city as was in Nagasaki-city. This indicated that the isolation of the vibrio from city river water might not be unusual. The comparative results by the three broth media revealed that media containing ethylviolet or super teepol, which have been recognized to be highly effective as selective substances for sea water sample, were either incomplete or inhibitory for the isolation of halophilic bacteria including the vibrio from river water samples (Tables 3 and 4). It was also noted that the bacteria of biotype 2 and bacteria closely related to biotype 1 were isolated by means of secondary isolation procedure from their parent cultures which were obtained by primary isolation procedure and could grow in NaCl-not-containing peptone water (Table 5). The latter bacteria are placed in the *V. parahaemolyticus* group in the present paper. It is interesting that all of these bacteria indicated hemolytic activity by the method of Kato et al.

(Received April 28, 1967)

は し が き

著者ら¹⁾ および著者²⁾ はさきに長崎市内の川水から腸炎ビブリオを含む多種類の好塩菌の分離例について報告した。試料として用いた川水は感潮地点よりも上流の全くの淡水であることから、分離菌株のすべてを海洋由来のものとするには疑問がある。

その後は機会を得て海外における腸炎ビブリオの分布調査^{3), 4)}を行ってきたが、その合い間にはまた、川水由来の腸炎ビブリオをはじめ 37° で生育する広塩型の好塩菌群を一括して生態的追求を試みた。そして以上の結果を総合的に判断し、これらの好塩菌群について主として都市川水を介して陸海を結ぶ ecological cycle を提出しておいた⁵⁾。

* 長崎県衛生研究所：長崎市滑石町32の31

Table 1. Characteristics of River Water Samples

Determined value	Temperature (°C)	pH value	Transparency (cm)	Cl ⁻ (ppm)	KMnO ₄ consumed (ppm)	Total count of viable cell per ml	Coliforms per ml
Maximum	33.3	7.39	26	42.9	17.1	22×10 ⁴	73×10 ²
Minimum	29.6	7.08	16	34.7	13.5	14×10 ³	16×10 ²
Mean	31.5	7.20	21	38.9	15.0	53×10 ³	35×10 ²

The ten samples of water were collected at ten stations of three rivers, July 28, 1966

しかしながら他方、著者らの報告に基づく、長崎市以外の地域における川水からの腸炎ビブリオ分離の試みは少なく、しかも東京都における堀江⁶⁾の生物型1の定量的検出を目的とする調査では全くの陰性に終わったという。

著者の経験では、海水試料に対しては有効と認められた選択物質でも種類によっては川水試料の場合、最初に接種する培地中にそれが存在すると一般に好塩菌の分離を顕著に阻害するものようであり、また最初分離した際は食塩無添加ペプトン水でも多少とも増殖を示した不完全な好塩型の菌が再分離操作によって完全な好塩菌として得られるという例にしばしば遭遇している。このような現象は川水やその他類似の環境を対象とする腸炎ビブリオ検索方法に問題点を提供するものであるが、さらに本菌の陸地環境における生態とも関連して興味深いものがある。

なお、海水環境中には加藤⁷⁾の方法により人血に対し溶血反応陽性を示す腸炎ビブリオ生物型1の菌はきわめて低率にしか棲息していない^{6)~8)}が、川水から分離される菌についてはどんなものであろうか、この点にも興味を持たれる。

今回は以上のごとき諸点に注目し、昭和41年7月28日長崎県佐世保市の市街地の川水を試料とし、腸炎ビブリオを含む好塩菌の分離試験を実施したのでその結果につ

Table 2. Enrichment Media for Isolation of *V. parahaemolyticus* and Other Halophilic Bacteria from River Water Samples

Media (pH 9.2)	A	B	C
Peptone	10 g	10 g	10 g
Meat extract	6	6	6
Sodium chloride	60	60	60
Bromothymol blue	0.06	0.06	0.06
Mannit	10	10	10
Ethylviolet	—	0.002	—
Super teepol	—	—	8 ml
Distilled water	1000 ml	1000 ml	1000 ml

The medium was dispensed in 5-ml amounts in test tubes

いて報告する。ただし本文中では腸炎ビブリオとは従来どおり生物型1および2の総称名として用いた。

実験材料ならびに方法

川水試料 上記の期日に佐世保市の市街地を貫流する佐世保川、小佐世保川および名切川の感潮地点よりも上流の計10箇所から100 ml 容ビンに無菌的に採水した。試料水の各種性状は Table 1 に示したとおりである。

増菌培養 採取川水は堀江⁹⁾の考案した培地を基本に作製した3種類の増菌培地5 ml に当量加え1検体につきそれぞれ5本の試験管系列として培養した。これらの培地の組成は Table 2 に示した。培養は選択物質の影響を明確に知る必要上48時間行なった。しかし、採水場所から当研究所までの距離の関係から、最初の24時間は屋内および自動車内に放置した。この場合温度の変動はかなりあったが32~38°に維持されていた。あとの24時間はフ卵器内で37°に保った。

菌株の分離と好塩性の検査 増菌培養を行なった各試験管から TCBS 寒天培地(栄研)に白金耳で塗抹し37°で20時間培養した。ついで各平板上の白糖分解性と非分解性との発育集落からそれぞれ1個ずつ釣菌した。集落は比較の大きなものを選んで、弱小なもののみで占められていた平板からは釣菌しなかった。これらの釣菌株は直ちに厚生省の病原性好塩菌食中毒検査要領¹⁰⁾の記載に従い好塩性の有無を調べた。まず3%食塩加ペプトン水に接種したのち37°で24時間培養を行ない、これから少量の菌を食塩無添加ペプトン水に移植し同じく培養した。その結果、前者では旺盛な増殖を示すが、一方後者では全く増殖の認められなかった場合を好塩菌とした。また以上の1次分離操作のほかに2次分離操作によっても好塩菌の分離を行なった。すなわち、さきの好塩性検査において3%食塩加ペプトン水では良好な増殖を行なうが、また食塩無添加ペプトン水でも多少とも増殖を示す菌株のうち、インドール産生能試験陽性株のみを再度前者の菌培養から TCBS 寒天培地上に画線培養し、発生集落について前記同様に好塩性を検査した。Fig. 1 に以上の好塩菌分離操作の概略を示した。

分離菌株の生物学的ならびに血清学的型別検査 腸炎ビブリオ同定のための生物学的性状検査は上記検査要領¹⁰⁾に基づきこれまでどおりの方法で実施した。ただし、炭水化物分解試験には糖分解試験用半合成基礎培地

Fig. 1. Procedures for isolation of *V. parahaemolyticus*

(ニッサン) を、アセトイン産生能試験には VP 半流動培地 (栄研) を使用した。なお、これらの性状以外に 0.5% または 6.5% 食塩加ペプトン水を用いて 37°, 24 時間培養後の生育状態をも観察した。溶血能検査は加藤ら⁷⁾ の方法に準じブレインハートインフュージョン (Difco) に指示濃度の寒天、クリスタルバイオレットおよび人保存血液を加えた培地を用いて行なった。また、血清学的型別検査は腸炎ビブリオ診断用家兔免疫血清 (東芝化学) を使用し、さきの検査要領のとおり実施した。

実験結果

ティボールおよびエチルバイオレットの含有されていない増菌培地では、培養 24 時間経過後には酸の産生によ

る黄変と菌の増殖による混濁とがすべて明りょうであったが、これらの物質の添加された培地では黄変も弱く、なかには全く無変化にとどまったものがあり、菌の生育状態も不良であった。しかし 48 時間後にはいずれの培地も黄変し、菌の良好な生育が認められた。

TCBS 寒天培地上の発育集落は全般的に白糖分解性のものが多く、これだけで占有された平板が全体の 1/3 以上も数えられた。この場合ティボール含有の増菌培地から接種した平板での集落の発育は総体的に悪く、他の 2 種類の増菌培地からのものと比較して一見して好塩菌とは思われない貧弱な発育集落が数多くみられ、結果として全試料水のうち 1 検体からは全く釣菌を行なわなかったことになる。

Table 3 に腸炎ビブリオを含む好塩菌の検出状態を、Table 4 には分離腸炎ビブリオの性状を示した。

1 次分離操作で好塩菌として分離された菌株については、腸炎ビブリオ同定のためにまずインドール産生能試験に供したが、64 株のうち 6 株に陽性が認められた。これらの陽性株はその他の特性も腸炎ビブリオに一致し、このうちの 2 株が生物型 1 に、残りの 4 株が生物型 2 に相当した。なおこの場合、生物型の判定には 10% 食塩加ペプトン水での生育状態は基準になかった。これまでの調査に照し合わせて、川水からインドール産生能を有する好塩菌が出たら、大体において腸炎ビブリオもしくはそれに近縁の菌とみなしてもよいようである。その他の好塩菌株の性状については詳しくは調べていないが、既報¹⁾ と同様に雑多な種類のグラム陰性桿菌と思われる。

生物型 1 に属する 2 菌株は既知の K 抗原には類属反応のため明確には型別できなかったが、白糖分解性を有する方の菌株は加藤らの方法によって明らかな溶血能が認められており、川水からもこのような溶血性生物型 1 の菌が検出されることを実証できた。

つぎに、2 次分離操作には 9 株が供されたがそのうちの 5 株を好塩菌として分離できた。残りの 4 株も食塩無添加ペプトン水での生育はきわめて弱かった。2 次分離操作供試前の菌とその後の菌との生物学的性状は Table 5 に示したごとくである。両者間で全株について食塩に

Table 3. Isolation of Halophilic Bacteria Including *V. parahaemolyticus* and Comparisons of Three Enrichment Broths

Enrichment media used	Selective substance contained	No. of halophilic bacteria positive samples	No. of river water samples	No. of isolates examined	No. of halophilic isolates	
					By primary isolation procedure	By secondary isolation procedure
A	No	8/10		52	28 (4)	4 (4)
B	Ethylviolet	8/10		48	31 (2)	1 (1)
C	Super teepol	3/10		46	5 (0)	0 (0)

Numbers in parentheses indicate the number of cultures of *V. parahaemolyticus*

Table 4. Characteristics of Cultures*¹ of Bacteria Classified as *V. parahaemolyticus* Isolated by Means of Primary Isolation Procedure

Culture No.	Growth in peptone water containing NaCl (%) ^{*2}					Voges-Proskauer reaction	Sucrose fermentation	Hemolysis of human blood ^{*3}	Serological type	Biotype
	0	0.5	3	7	10					
1	—	+	+++	+	—	—	—	—	Not typable	1
2	—	+	+++	+	—	—	+	+	Not typable	1
3	—	+	+++	+	—	+	+	—	—	2
4	—	+	+++	+	—	+	+	—	—	2
5	—	+	+++	+	—	+	+	—	—	2
6	—	+	+++	+	—	+	+	—	—	2

*¹ Gram-negative rods having basic properties for identification of *V. parahaemolyticus* as follows; motility (+), presence of cytochrome oxidase (+), fermentation of glucose (+), gas production from glucose (—), production of indol (+), reduction of nitrate (+), liquefaction of gelatin (+), decomposition of cellobiose (—), production of H₂S (—) and acidification of *d*-tartrate (+)

*² Sign (—~++) represents degree of growth

*³ Test was performed by using the method of Kato et al.

Table 5. Characteristics of Cultures*¹ of Bacteria Classified as *V. parahaemolyticus* Isolated by Means of Secondary Isolation Procedure and Their Parent Cultures*¹ Isolated by Means of Primary Isolation Procedure

Culture No.* ²	Growth in peptone water containing NaCl (%) ^{*3}					Voges-Proskauer reaction	Sucrose fermentation	Hemolysis of human blood ^{*4}		Serological type	Biotype	No. of parent cultures
	0	0.5	3	6.5	7			A	B			
I {P	+	+	+++	++	+	+	+			—	—	} 1
	—	+	+++	++	+	+	+			—	2	
II {P	+	+	+++	+	—	—	—	+	+	Not typable	—	} 1
	—	+	+++	+	—	—	—		+	Not typable	Not typable	
III {P	+	+	+++	+	+	—	+	+	+	Not typable	—	} 1
	—	+	+++	+	—	—	—		+	Not typable	Not typable	
IV {P	+	+	+++	+	+	—	+	+	+	K 9, K 29 ^{*5}	—	} 2
	—	+	+++	+	—	—	+		+	K 9, K 29	Not typable	
V {P	+	+	+++	+	—	—	+	+	+	Not typable	—	} 4
	±	+	+++	+	±	—	+	+	+	Not typable	—	

*¹ Gram-negative rods having basic properties for identification of *V. parahaemolyticus* as indicated in footnote of Table 4

*² P or S indicate the cultures isolated by primary or secondary isolation procedure respectively

*³ Sign (—~++) represents degree of growth

*⁴ Test was performed by using the method of Kato et al., and A or B indicates the cultures in no or 3% NaCl containing peptone water respectively

*⁵ Serological types of the cultures in no NaCl containing peptone water were identical with those of the cultures in 3% NaCl containing peptone water

対する生育態度に相違が認められ、また1株は白糖分解性で差異を示した。

以上の好塩菌として分離できた菌株のうち1株が腸炎ビブリオ生物型2に一致する性状を示し、他の4株も食塩耐容性以外は腸炎ビブリオの特徴的性状を有している。白糖分解性のものも存在するがVP反応は全株陰性であることから、生物型1と非常に近い類縁関係にある

ことが推察される。しかも、このうちの2株は生物型1のK抗原に明りょうに型別できており、さらに興味あることには好塩菌に変換しなかった菌株を含めてすべて強い前記溶血能を有している。この種の好塩菌が過去の川水調査で分離された例はないが、0.5ないしは6.5%食塩含有ペプトン水でも生育がみられるので、宮本ら¹¹⁾の定義するいわゆる狭塩型のものではない。ここでは一応腸

炎ビブリオに包括しておく。なお、上記のK抗原に型別できた2株は、2次分離操作に供する以前の原型菌についても3%食塩添加および食塩無添加の両ペプトン水中の生育菌がともに同一の抗原にそれぞれ型別され、さらにはまた同じく強い溶血性を示した。このことから、食塩無添加ペプトン水中の菌が外部からの混入菌でないことは明白であろう。

考 察

さきの長崎市内の川水からの腸炎ビブリオの分離例²⁾から予想されていたように、佐世保市内の川水からも腸炎ビブリオを検出できた。1回限りの調査であったので生物型1の菌はわずか2株の分離に終わったが、川水という好塩菌にとっては特異な環境であるだけに低率でも検出できたことの意義は大きいと思われる。これによって夏季の本邦沿岸都市の川水中には本菌が常在していることがほぼ推定できる。したがって、都市川水の本菌食中毒発生時における感染源としての重要性はもとより、都会の川口周辺を中心とした沿岸海域一帯に夏季になると見られる本菌の濃密な分布を形成するための役割はきわめて大きいことが考えられる。

しかし、腸炎ビブリオが川水から分離される現象それ自体と川水の汚染度とはなんらかの関係があるらしい³⁾ので、都市の地形的な要素もかなり分離に影響しうである。佐世保市の地形は長崎市のそれと類似しており中心街の周囲に山が迫っていることが特徴で、そのため川口から感潮線までの距離はそれほど長くはない。よって感潮線よりも上流川水の生活廃水による汚染は平坦地の都会に比べて相当にひどいことが考えられ腸炎ビブリオの検出は比較的容易と思われるが、感潮地点が市街地のはずれにある平野部の都市では淡水性川水からの本菌検出はかなり困難なことが推察される。この点において内陸部の都市の川水についてはどんなものであろうか、興味深いものがある。

以上のごとく川水採取場所の周辺の地形的条件が適当な環境であれば腸炎ビブリオの検出は可能であるとみなしうが、今回の3種類の増菌培地を用いた比較試験からは、川水の場合必ずしも従来の海水に適用された本菌検索方法の常識は当てはめえないことがわかった。

本研究で確認されたティボールおよびエチルバイオレットが川水からの好塩菌の分離を阻止する現象や腸炎ビブリオに対する非選択性は、胆汁酸塩、亜硫酸ビスマスについても同様なことが実験的にすでに推定されている³⁾ので、川水を対象とする腸炎ビブリオ分布調査には現在使用されている増菌培地中の選択物質の種類ならびに含有量に関しては十分な注意を要するものがある。もちろんミリポアフィルター等による川水の直接培養法も、寒天培地中に以上のような物質が添加された際には含有量いかんでは腸炎ビブリオの生育は阻止されるであろうから成功は期しがたい。

このような選択物質の好塩菌分離阻止作用がいかなる機序によって起こるものなのかは明らかでない。川水中に混入させた腸炎ビブリオの回収試験³⁾では、川水中においては菌細胞の供試選択物質に対する抵抗力がただちに減弱する現象を観察している。そして、選択物質不含培地で培養中またはその後の菌は抵抗性が以前のままであることから、川水から腸炎ビブリオを分離するためには、あらかじめ選択物質無添加の培地を用いての培養過程が必須となるものと考えられる。しかし、川水由来の腸炎ビブリオを含む好塩菌は元来が非好塩菌であり、分離培養経過で一定濃度の食塩と接触することにより好塩性を獲得するもの⁴⁾との見方⁵⁾からすれば、選択物質による分離阻止作用はそれほど単純なものではないであろう。

川水からの腸炎ビブリオの分離に際してさらに問題となる点は2次分離操作の結果得られる好塩菌の存在である。1次分離培養で平板培地から釣菌した菌が、たとえ食塩無添加ペプトン水で増殖可能でも食塩嗜好性のものであれば、その他の性状検査とともに2次分離培養を試みみる必要がある。

これらの2次分離好塩菌の母体となった原菌株も食塩嗜好性を有することにおいて、定義によっては好塩菌に帰属せしめられようが、食塩無添加ペプトン水でも弱いながらも明らかに増殖しうるので、厳密には好塩菌の範ちゅうにははまらない菌群である。この性状は川水中でも十分に生活を維持できることを意味するもので、川水中における腸炎ビブリオの生存形態を推考する上で興味あるものがあるが、このような性質の菌が本来の腸炎ビブリオの原型なのか、あるいはまた川水中で非好塩型であったものが分離培養経過中になんらかの原因によってこのようになったのか、今のところ判断できない。いずれにせよ、腸炎ビブリオを陸棲細菌とみなす考え方にとってはきわめて示唆的なものがある。

腸炎ビブリオ生物型1のうち前記溶血性を有する菌の川水中における分布に関しては、今回の調査成績のみで論ずるのは早計にすぎようが、1株でも検出できた事実から溶血性菌株の由来源としての川水の存在は無視できないものがある。さらにはまた、2次分離操作によってのみ分離されるところの強い溶血性を示す生物型1近縁菌が、生物型1の菌となんらかの遺伝的関連を有するものであれば川水の意義は一層重要性を帯びてくる。

ただし、これまで著者の持論として再三言及してきたように、腸炎ビブリオの海洋分布が主として都市川水からの混入菌によって支配されるものであれば、海水中に溶血性菌の少ない理由はなにに基づくものであろうか。あるいは溶血株と非溶血株との間で海水環境に対する適応能力に差異があるのかもしれない。この辺の実情は今後の検討にまきたい。

ま と め

1) 昭和41年7月28日、佐世保市内の3河三の感潮地

点よりも上流の10個所で川水10検体を採取し、主として腸炎ビブリオの検出を目標とする試験およびその分離操作上の問題点について若干の検討を行なった。

2) さきの長崎市内における調査結果と同様に、佐世保市内の川水からも腸炎ビブリオが検出された。分離菌株のうち常法どおりの1次分離操作で得られたものは、生物型1が2株、生物型2が4株であった。両市はともに山が市街地の周囲に迫っており、感潮地点よりも上流川水の汚染度の高いことが腸炎ビブリオを比較的容易に分離できた原因の一つと思われる。

3) 1次分離操作では食塩無添加ペプトン水でも増殖可能な腸炎ビブリオ類似菌が9株得られたが、2次分離操作によって5株が完全な好塩菌として分離された。1株が生物型2に属し、4株が生物型1にごく近縁の菌で一応腸炎ビブリオに含ませておいた。原菌株は川水中でも十分に生活できることを示しており、腸炎ビブリオを陸棲細菌とみなす考え方にとって示唆的なものがある。

4) エチルバイオレットまたはティモール含有の増菌培地と無添加の増菌培地との効果を腸炎ビブリオを含む好塩菌の分離状態から比較したところ、前二者の培地ではこれらの物質の選択性は認められず、とくにティモールは好塩菌そのものの分離を著しく阻止することがわかった。阻害作用の本態は不明であるが、川水からの腸炎ビブリオの分離に際しては最初に培養を行なう培地中に含まれる選択物質の種類と含有量とは十分に留意すべきことが認められた。

5) 今回分離された生物型1の2株のうち1株は加藤ら

の方法により溶血性を示した。また2次分離の生物型1近縁菌もすべて強い溶血能を有していた。これらの事実から、溶血性生物型1の由来源としての川水の存在は無視できないことが知られた。

終わりに、本文のご校閲を賜った富安行雄九州大学名誉教授および九州大学農学部 豊水正道教授に謹んで深謝の意を表する。また、本研究を通じ種々ご教示をいただいた当研究所 高橋克巳所長ならびに検体採取と水質検査にご協力をいただいた当研究所 山口道雄技師に厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) 安永統男, 銭谷武平: 長崎大水産, (14), 35 (1963).
- 2) 安永統男: 食衛誌, 5, 112 (1964).
- 3) 安永統男: 長崎大風土病紀要, 6 (4), 201 (1964).
- 4) 安永統男: 同上, 7 (4), 272 (1965).
- 5) 安永統男: 長崎衛研所報, 7, 38 (1966).
- 6) 堀江進, 佐伯和昭, 他: 日水産, 33, 126 (1967).
- 7) 加藤貞治, 小原 寧, 他: 食品衛生研究 15 (8), 83 (1965).
- 8) 安永統男, 黒田正彦: 長崎大風土病紀要 7 (2), 107 (1965).
- 9) 堀江進, 佐伯和昭, 他: 日水産, 28, 742 (1962).
- 10) 坂崎利一: 食品衛生研究 14 (7, 8), 117 (1964).
- 11) 宮本 泰, 中村一成, 他: 日本公衛誌, 8, 673 (1961).