

平成16年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成16年度
病原微生物データ分析実験作業
成果報告書

「腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 株の基礎データ構築」

平成17年2月
国立大学法人 東京海洋大学
藤井建夫教授
木村 凡助教授

平成 16 年度

食品製造工程管理情報高度化促進事業病原微生物データ分析実験報告書

平成 17 年 2 月 28 日

東京海洋大学 藤井建夫、木村 凡

腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 株の基礎データ構築

目的：

1996 年のインドにおける腸炎ビブリオ O3:K6 株による食中毒の発生を契機に、日本を含む東アジアおよび米国において、本血清型の腸炎ビブリオによる食中毒が広域的に発生している。パルスフィールド電気泳動などを中心とした遺伝子型解析の結果、腸炎ビブリオ O3:K6 株は、単一クローンが世界中に広がって食中毒を引き起こしている可能性が高い。

しかし、なぜこの株のみがここ数年で、東アジアおよび米国全域で爆発的に食中毒を引き起こしているのかについては、不明である。考えられる可能性を整理すると、(1) 本株は他の血清型の株 (TDH 陽性、陰性を問わず) と食品中での増殖力が異なる、(2) 本株が他の血清型の株 (TDH 陽性、陰性を問わず) よりヒトへの感染力が強い、の 2 点に整理できる。このうち、水産加工業者にとっては、前者の情報、すなわち食中毒原因菌の本株がどのような条件で増殖しやすいのかについて知ることは重要である。具体的には、温度、塩濃度および pH などに関する詳細な情報の提供が大いに役に立つものと考えられる。

以上のデータをデータベースで利用できることになれば、水産加工業者にとって、温度管理不備の危険性、酢の物等の pH 調整具合やその管理不備の危険性、塩分管理の要点など、数々の現場応用へと大変有効な情報となる。しかも、多数の菌株の情報を提供することにより、信頼の高い情報提供が可能である。

実験設計：

Vibrio parahaemolyticus 40 株に対して、温度、塩濃度および pH 条件を組み合わせ、吸光度 (OD₆₆₀) 測定により 1,280 通りの増殖曲線 (40 株×16 条件×2 回測定) を得た。その後吸光度値を生菌数 (Log cfu/mL) に換算し、微生物増殖データ分析ソフトウェア (MicroFit version 1.0) を使用して、ラグタイムおよびログタイムのデータを算出した。

測定条件として、温度 4 区分 [15, 20, 25, 30°C (NaCl 3.0%, pH 7.2 条件下)]、塩濃度 5 区分 [NaCl 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 7.0 % (30°C, pH 7.2 条件下)]、pH 7 区分 [pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 (30°C, NaCl 3.0% 条件下)] における経時的な増殖データを出した。

実験方法:

1. 供試菌株

東京都健康安全研究センターから分与された食中毒患者由来の *V. parahaemolyticus* O3:K6・TDH 陽性株 20 株、同所から分与された環境由来の O3:K6・TDH 陰性株 3 株、および東京都健康安全研究センター多摩支所から分与された環境由来の非 O3:K6・TDH 陰性株 17 株の計 40 株を使用した (Table 1)。これらの菌株は、LB 寒天培地スラント [Bacto Tryptone (Difco, ベクトンディッキンソン) 1.0% (w/v), Bacto Yeast Extract (Difco, ベクトンディッキンソン) 0.5% (w/v), 塩化ナトリウム (国産化学) 1.8% (w/v) および寒天末 (国産化学) 1.5% (w/v)] に 30°C で 6 時間培養し、15°C 下で 1~2 ヶ月間保存した。

2. 使用培地

菌の生育に及ぼす温度 4 区分 [15, 20, 25, 30°C (NaCl 3.0%, pH 7.2 条件下)] ならびに塩濃度 5 区分 [NaCl 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 7.0 % (30°C, pH 7.2 条件下)] の影響を測定するための前培養および本培養には、Trypticase Soy Broth (TSB) 培地 (ベクトンディッキンソン) [塩化ナトリウムをそれぞれ塩濃度 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 7.0 % (w/v) になるよう添加; pH 7.2 (未調整)] を使用した。pH 7 区分 [pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 (30°C, NaCl 3.0%条件下)] の実験には、TSB 培地 [塩化ナトリウムを塩濃度 3.0% (w/v) になるよう添加; pH 7.2] を調整後、緩衝剤として 3-Morpholinopropanesulfonic acid [MES (同仁化学)] あるいは 2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate [MOPS (同仁化学)] を、4 区分 (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5) および 3 区分 (pH 7.0, 7.5, 8.0) にそれぞれ 0.1% (w/v) 添加し、6N HCl および 12N NaOH を用いてそれぞれの pH に調整した。これらの培地は、121°C で 15 分間高圧滅菌を行い、実験に使用した。

3. *V. parahaemolyticus* の増殖曲線

TSB 培地 (NaCl 3.0%, pH 7.2 条件下) で 30°C、一晚静置培養した定常期の供試菌の前培養液 (8~9 Log cfu/mL) について、紫外・可視分光光度計 [UV-1700 (島津製作所)] を用いて吸光度 (OD_{660}) を測定した。その培養液を、 $OD_{660}=0.005\sim0.025$ (6.4~6.5 Log cfu/mL) になるように、各塩濃度、pH 条件に調製した 5mL TSB 培地 [L 字型試験管 TN-5L (Advantec) を使用] に接種した。その後、小型振盪培養装置 [バイオフィトレコーダー TN-1506 (Advantec)] を用いて各温度条件下で振とう培養 (45 rpm) を行い、経時的に吸光度 (OD_{660}) により増殖を測定した。測定間隔は、温度区分 15°C 下では 30 分毎に、それ以外では 15 分毎に行った。この実験を 2 回行った。

4. 生菌数への換算

吸光度 (OD_{660}) を生菌数 (Log cfu/mL) に換算するため、代表株 2 株 [O3:K6・TDH 陽性株 1 株 (V02-64) および非 O3:K6・TDH 陰性株 1 株 (T1)] を用いた。「3. *V. parahaemolyticus* の増殖曲線」と同様に、供試菌株の前培養液を L 字型試験管内の 5mL TSB 培地に接種し、小型振盪培養装置を用いて 30°C 下で振とう培養 (45 rpm) を行い、15 分毎に吸光度 (OD_{660}) により増殖を測

定した。それと同時に、平板塗抹法による生菌数測定を行った。経時的に OD₆₆₀ 測定直後の L 字型試験管を小型振盪培養装置から取り出し、100 μL を分取し L 字型試験管を元に戻し、振とう培養を再開させた。その後、分取した菌液を必要に応じて希釈用ペプトン水 [Bacto Peptone (Difco, ベクtonディッキンソン) 0.1% (w/v) および塩化ナトリウム 1.8% (w/v)] を用いて段階希釈し、Trypticase Soy Agar (TSA) 平板培地 (ベクtonディッキンソン) [塩化ナトリウムおよび寒天末をそれぞれ終濃度 1.8% (w/v), 2.0% (w/v) になるように添加] にスパイラルプレーター [EDDY JET (IUL)] を用いてらせん状に 49.2 μL 塗抹し、25°C で 18~24 時間培養した。培養後平板上に得られたコロニーを、スパイラルプレーターの計測法に従ってカウントし、生菌数を算出した。この実験を 2 回行い、吸光度 (OD₆₆₀) と生菌数 (Log cfu/mL) の相関曲線を Excel 2000 (Microsoft) を用いて描き、近似式とその相関係数を得た (Fig. 1, 式 1)。式 1 を用いて、吸光度 (OD₆₆₀) の生菌数 (Log cfu/mL) への換算を行った。

換算式は、

$$Y = -0.0129X^6 + 0.1992X^5 - 1.1895X^4 + 3.5146X^3 - 5.4493X^2 + 4.8704X + 6.3623$$

$$[R^2 = 0.9877; X = \text{OD}_{660}, Y = \text{生菌数 (Log cfu/mL)}] \quad (\text{式 1})$$

とした。

5. 予測微生物学的増殖モデル

式 1 により得られた吸光度 (OD₆₆₀) の生菌数 (Log cfu/mL) への換算値について、微生物増殖データ分析ソフトウェアである MicroFit version 1.0 [Institute of Food Research (IFR); <http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/MicroFit/default.html> より供与] を用いて増殖曲線を作成し、ラグタイム (誘導時間; lag time)、ログタイム (世代時間; doubling time) のデータをそれぞれ算出した。MicroFit version 1.0 は Baranyi ら¹⁾の予測式に基づいてモデリングを行うソフトウェアである。増殖曲線作成の際には、測定値 (プロット) と予測値 (増殖曲線) がフィットするよう、誤差を表すパラメータ [error estimate, RSS (Residual Sum of Squares) および RSM (Root Mean Square Error)] が 0.00~0.10 の範囲内に入るように測定値の適用範囲を選択した。ラグタイムおよびログタイムは 1 株について 2 回測定分の平均値を表した (Table 2)。

結 果:

V. parahaemolyticus 40 株 (O3:K6・TDH 陽性株 20 株, O3:K6・TDH 陰性株 3 株, 非 O3:K6・TDH 陰性株 17 株) の温度 4 区分 [15, 20, 25, 30°C (NaCl 3.0%, pH 7.2 条件下)], 塩濃度 5 区分 [NaCl 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 7.0 % (30°C, pH 7.2 条件下)], pH 7 区分 [pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 (30°C, NaCl 3.0%条件下)] におけるラグタイム、ログタイム (2 回測定分の平均値) を表した (Table 2)。培養条件のうち、*V. parahaemolyticus* の増殖に適している順番は、ラグタイム、ログタイムを比較したところ、温度区分では 30、25、20、15°C、塩濃度区分では 1.0、2.0、3.0% がほぼ同じで、0.5、7.0% と続き、pH 区分では 6.5、7.0、7.5、8.0 がほぼ同じで、6.0、5.5、5.0 と続いた (Table 2)。各区分において、最も著しい増殖がみられた条件下でのラグタイムおよびログタ

イムは、40 菌株の平均値によると温度区分 30℃において 1.29、0.28 時間、塩濃度区分 1.0、2.0、3.0%において 1.29~1.36、0.28~0.30 時間、pH 区分 6.5、7.0、7.5、8.0 において 1.28~1.44、0.30~0.34 時間であった (Table 2)。また最も著しい増殖を示す菌株のデータによると、温度区分 30℃、塩濃度区分 1.0、2.0、3.0%、pH 区分 7.5、8.0 においてログタイムが 14~15 分と最も短かった (Table 2)。

血清型および TDH の有無による増殖挙動の違いを調べるために、各培養条件下における O3:K6・TDH 陽性株 20 株および非 O3:K6・TDH 陰性株 17 株のラグタイム、ログタイムの平均値をそれぞれ算出し、総合的に比較した。その結果、温度、塩分、pH ともに至適環境領域では両者に差異は認められなかった。両者に差が認められたのは、温度、塩分、pH のそれぞれ増殖に不利な領域であり、15℃ (NaCl 3.0%, pH 7.2 条件下)、NaCl 0.5% (30℃, pH 7.2 条件下)、pH 5.0 (30℃, NaCl 3.0%条件下) において、違いがみられた。15℃下において、非 O3:K6・TDH 陰性株のラグタイムおよびログタイムはそれぞれ 14.28、1.73 時間であるのに対し、O3:K6・TDH 陽性株では 10.61、1.69 時間と短かった (Table 2, Fig. 2-1, 2)。また、pH 5.0 下においても、非 O3:K6・TDH 陰性株のラグタイムおよびログタイムはそれぞれ 9.38、1.19 時間であるのに対し、O3:K6・TDH 陽性株では 6.61、0.91 時間と短かった (Table 2, Fig. 4-1, 2)。なお、pH 5.0 条件下については、40 株中 4 株 (O3:K6・TDH 陽性株 1 株、非 O3:K6・TDH 陰性株 3 株) で 24 時間以内に増殖が確認されなかったため、それぞれ 19 株、14 株の平均値を表した (Table 2, Fig. 4-1, 2)。一方 NaCl 0.5% 下においては、非 O3:K6・TDH 陰性株のラグタイムは 1.96 時間であるのに対し、O3:K6・TDH 陽性株では 2.43 時間と短かった (Table 2, Fig. 3-1, 2)。よって、15℃下 および pH 5.0 下において、O3:K6・TDH 陽性株は非 O3:K6・TDH 陰性株と比較して増殖が顕著であり、NaCl 0.5%下において増殖がやや弱いことが示された。このように差がみられた培養条件は、いずれも本菌にとって増殖に不利な環境であり、それ以外の条件下 (20~30℃, NaCl 1.0~7.0%, pH 5.5~8.0) では、ほとんど差がみられなかった (Table 2, Fig. 2~4)。ただし 15℃、NaCl 0.5%および pH 5.0 条件下では、2 回の増殖データの誤差が大きく、再現性が得られないといった傾向や、菌株間の差が大きいといった傾向がみられた。

考 察：

本研究で増殖モデリングに使用した生菌数については、直接平板培養法により測定したものではなく、吸光度 (OD₆₆₀) と平板培養法による生菌数 (Log cfu/mL) の相関曲線の近似式 (式 1) をもとに、吸光度 (OD₆₆₀) から間接的に求めている。実際に生菌数測定した値ではないが、近似式の相関係数が高く ($R^2=0.9877$)、近似式により換算が可能であると判断した。

培養条件のうち、*V. parahaemolyticus* の増殖に適している順番は、ラグタイム、ログタイムを比較したところ、温度区分では 30、25、20、15℃、塩濃度区分では 1.0、2.0、3.0%がほぼ同じで、0.5、7.0%と続き、pH 区分では 6.5、7.0、7.5、8.0 がほぼ同じで、6.0、5.5、5.0 と続いた (Table 2)。この順番は仁科ら⁴⁾が本菌の液体培地において増殖挙動を調査した場合とほぼ同様であった。

また最も著しい増殖を示す菌株のデータによると、温度区分 30℃、塩濃度区分 1.0、2.0、3.0%、pH 区分 7.5、8.0 においてログタイムが 14~15 分と最も短かった (Table 2)。この結果は、加藤ら²⁾の示した本菌の至適条件 [NaCl 1~3%、pH 7.5~8.5 (BHI 液体培地, 37℃条件下)] の範囲内であった。加藤ら²⁾の実験では培養温度が 37℃と比較的高いため、世代時間は 11~12 分とさらに短かった。本実験でも 37℃で調査した場合、さらにログタイムが短くなることが予想される。

日本では、腸炎ビブリオ食中毒を防止するため、生食用水産加工品について冷蔵保存下を出てから可能な限り速やか (最大 2 時間以内) に消費するよう提言されている³⁾。本実験で得られたラグタイム、ログタイムによると、*V. parahaemolyticus* が 2 時間以内に増殖する可能性がある培養条件は、温度区分では 30℃、NaCl 区分では 1.0~3.0%、pH 区分では pH 6.0~8.0 であり、その増加量は 1.0~2.5 Log cfu/g であった。特に、30℃ (NaCl 3.0%、pH 7.2) においては、2 時間以内に 2.5 Log cfu/g と大幅な菌数増加が起こることが明らかになった。最適条件をそのまま食品に置き換えて考えることは必ずしもできないが、このデータは、上記の NaCl 濃度、pH 範囲内の食品に 2.5~4.0 Log cfu 以上の本菌汚染が起きた場合、30℃に 2 時間放置すると、食中毒発症菌数 (5 Log cfu ~) に達してしまう可能性を示している。多くの生鮮魚介類 (タコ、ホタテ、ボイルカニ、アマエビなど) の NaCl 濃度は 1%に近く、pH は 6.0~8.0 間に存在する。また夏季や暖房のかかった部屋では、室温が 30℃以上に達する場合もあることから、これらの食品を 2 時間でも温度不備下に放置することは非常に危険である。さらに本研究では定常期の細胞を接種して増殖曲線を調べていることから、増殖活性の強い対数増殖期の細胞が食品に付着した場合は、より活発に増殖しラグタイムおよびログタイムが短くなることが予想される。これより、流通工程において、生食用水産加工品の腸炎ビブリオ最確数を 100/g 以下に定め、かつ 10℃以下に保存することの重要性が確認された。

本実験では、15℃ (NaCl 3.0%、pH 7.2 条件下)、pH 5.0 (30℃、NaCl 3.0%条件下) において、O3:K6・TDH 陽性株の増殖が非 O3:K6・TDH 陰性株と比較して活発であり、NaCl 0.5% (30℃、pH 7.2 条件下) においてやや弱いことが示された (Table 2, Fig. 2~4)。O3:K6・TDH 陽性株の低温増殖性の高さについて、仁科ら⁴⁾が同様の報告をしており、15℃ (NaCl 1, 3%および pH 5.8, 7, 8 条件下) では他の血清型株よりも顕著な増殖がみられ、他の条件下 (温度 20℃、25℃、NaCl 1, 3, 7% および pH 5.8, 7, 8 の組み合わせ) では差がみられていない。仁科ら⁴⁾は本菌の増殖挙動の調査において、4 株のみの使用にとどまったが、本研究では O3:K6・TDH 陽性株、非 O3:K6・TDH 陰性株でそれぞれ 20 株、17 株を増殖挙動の比較に用いたことから、さらに信頼性が高いデータが得られたといえる。ただし、これらの培養条件は、いずれも本菌にとって増殖に不利な環境であったことから、2 測定間や菌株間の誤差が大きいといった傾向がみられた。いずれの O3:K6・TDH 陽性株および非 O3:K6・TDH 陰性株も、本研究のような増殖挙動の差異を示すとは限らないことを留意すべきであろう。本研究において O3:K6・TDH 陽性株の増殖性が、低温および低 pH 下で相対的に高いと示されたことから、冷蔵下の食品や、低 pH 食品において、O3:K6・TDH 陽性株が非病原性株 (非 O3:K6・TDH 陰性株) よりも優勢に増殖する可能性が示唆される。また、近年の本血清型株流行の原因との関連性も考えられ、今後さらなる調査が期待される。

本研究では液体培地中で本菌の挙動を調査しているが、食品の栄養成分や構造、細菌間の相互作用や細胞の状態による影響などから、液体培地中と実際の食品では微生物の増殖は異なる。しかし本実験のデータは、食品への接種実験を行う際の基礎的データとして用いることが可能であると考えられる。

要約:

腸炎ビブリオ O3:K6 株および非 O3:K6 株 (全 40 菌株) を用いて、各種温度、塩濃度および pH 条件の TSB 培地で培養し、ラグタイム、ログタイムを調査した。培養条件のうち、本菌の増殖に適している順番は、温度区分では 30、25、20、15℃、塩濃度区分では 1.0、2.0、3.0% がほぼ同じで、0.5、7.0% と続き、pH 区分では 6.5、7.0、7.5、8.0 がほぼ同じで、6.0、5.5、5.0 と続いた。多くの場合で、O3:K6・TDH 陽性株の増殖は非 O3:K6・TDH 陰性株とほぼ同じ挙動を示したが、15℃ (NaCl 3.0%, pH 7.2)、pH 5.0 (30℃, NaCl 3.0%) 条件下において、O3:K6・TDH 陽性株の増殖が非 O3:K6・TDH 陰性株と比較して顕著であり、NaCl 0.5% (30℃, pH 7.2) 条件下においてやや弱いことが示された。低温および低 pH 下での増殖性の高さは、冷蔵下の食品や、低 pH 食品において、O3:K6・TDH 陽性株が非病原性株 (非 O3:K6・TDH 陰性株) よりも優勢に増殖する可能性が予想される。このことから、O3:K6 についてはその他の株と区別して、増殖の危険性を評価し、その対策を進める必要があると示唆された。また、これらの増殖条件に関するデータは、食品への接種実験を行う際の基礎的データとして用いることが可能であると考えられる。

文献:

- 1) Baranyi, J., T. A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23. 277-294.
- 2) 加藤博. 1965. 各種食品細菌の増殖速度に関する研究. 第 1 報 *Vibrio parahaemolyticus* の generation time について. 日本細菌学雑誌. 20:94-99.
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 “食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 13 年 6 月 7 日, 食発第 170 号 (2001).
- 4) 仁科徳啓. 和田正道. 小澤宏和. 工藤由紀子. 小沼博隆. 長谷川順子. 熊谷進. 2004. 各種 pH, 塩濃度および温度条件による *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 の増殖動態. 食品衛生学雑誌. 45:35-37.
- 5) Sanyal, S.C., P.C. Sen. 1974. Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. Saikon, Tokyo, pp. 227-235.

Table 1 供試菌株

分離源 および血清型	菌株名	分離年	病原遺伝子		血清型
			<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
患者由来 O3:K6	V96-110	1996	+	-	O3:K6
	V96-178	1996	+	-	O3:K6
	V96-223	1996	+	-	O3:K6
	V97-19	1997	+	-	O3:K6
	V98-10	1998	+	-	O3:K6
	V98-290	1998	+	-	O3:K6
	V98-324	1998	+	-	O3:K6
	V99-38	1999	+	-	O3:K6
	V99-107	1999	+	-	O3:K6
	V00-145	2000	+	-	O3:K6
	V00-161	2000	+	-	O3:K6
	V01-38	2001	+	-	O3:K6
	V01-141	2001	+	-	O3:K6
	V02-21	2002	+	-	O3:K6
	V02-36	2002	+	-	O3:K6
	V02-64	2002	+	-	O3:K6
	V02-106	2002	+	-	O3:K6
	V02-123	2002	+	-	O3:K6
	V03-80	2003	+	-	O3:K6
	V03-108	2003	+	-	O3:K6
環境由来 O3:K6	V19	1999	-	-	O3:K6
	V37	1999	-	-	O3:K6
	V71	1999	-	-	O3:K6
環境由来 non-O3:K6	T1	2003	-	-	O2:KUT
	T2	2003	-	-	O2:KUT
	T7	2003	-	-	O10:K52
	T12	2003	-	-	O5:K17
	T13	2003	-	-	O5:K17
	T21	2003	-	-	O10:KUT
	T29	2003	-	-	O3:KUT
	T31	2003	-	-	O5:K17
	T34	2003	-	-	O2:K28
	T44	2003	-	-	O4:K34
	T57	2003	-	-	O11:KUT
	T68	2003	-	-	O1:K32
	T84	2003	-	-	O2:K28
	T92	2003	-	-	O7:KUT
	T106	2003	-	-	O11:KUT
	T122	2003	-	-	O1:KUT
T129	2003	-	-	O3:KUT	

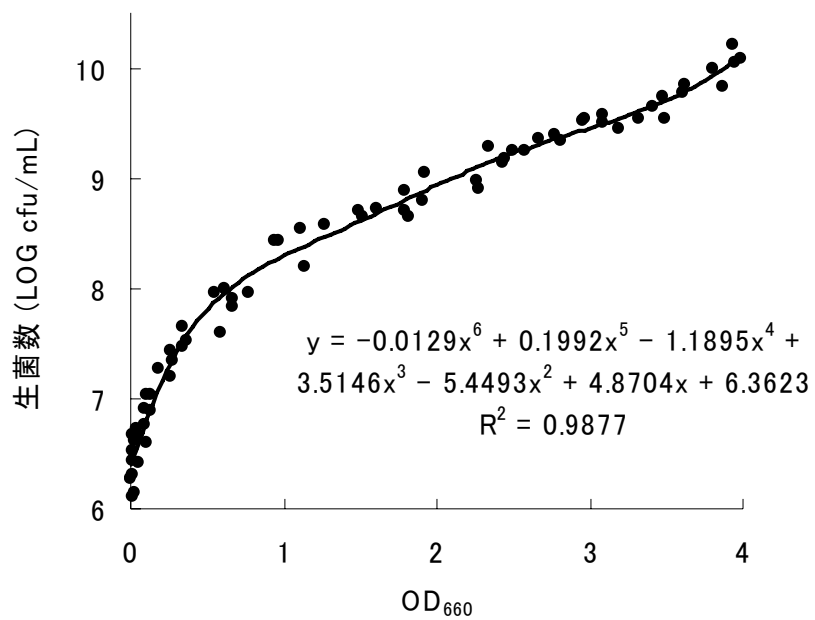


Fig. 1 吸光度 (OD₆₆₀) と生菌数 (LOG cfu/mL) の相関曲線.

Table 2 培地中における *V. parahaemolyticus* のラグタイムおよび倍加時間 (2測定の平均)

(a) 貯蔵温度別 (NaCl 3.0%, pH 7.2条件下)

病原性、血清型 (菌株数)	菌株名	ラグタイム (hour)				ログタイム (hour)				
		15°C	20°C	25°C	30°C	15°C	20°C	25°C	30°C	
TDH+, O3:K6 (N=20)	V96-110	12.41	5.12	2.65	1.43	1.77	0.87	0.44	0.28	
	V96-178	11.04	4.16	1.84	1.09	1.47	0.73	0.34	0.26	
	V96-223	10.74	3.34	2.05	1.28	1.75	0.94	0.43	0.30	
	V97-19	10.34	3.27	1.84	1.00	1.50	0.66	0.43	0.27	
	V98-10	10.51	4.75	2.18	1.28	1.40	0.63	0.41	0.27	
	V98-290	13.23	5.27	2.15	1.17	1.67	0.77	0.41	0.28	
	V98-324	11.94	3.92	3.15	1.92	1.93	0.77	0.47	0.31	
	V99-38	9.94	3.69	1.41	0.91	1.50	0.65	0.39	0.26	
	V99-107	11.53	4.51	1.96	1.15	1.50	0.63	0.39	0.27	
	V00-145	12.24	6.68	2.26	1.39	1.51	0.67	0.38	0.25	
	V00-161	9.20	4.40	1.76	1.10	1.47	1.07	0.46	0.28	
	V01-38	9.34	4.10	1.57	0.91	1.47	0.80	0.40	0.26	
	V01-141	9.44	3.51	2.61	1.39	1.36	0.73	0.37	0.29	
	V02-21	9.10	3.27	1.63	0.94	1.40	0.61	0.39	0.27	
	V02-36	9.21	3.23	1.70	1.13	1.33	0.64	0.36	0.29	
	V02-64	11.31	3.73	1.98	1.26	1.34	0.60	0.41	0.27	
	V02-106	9.26	4.78	1.68	0.96	1.31	0.96	0.40	0.26	
	V02-123	9.21	3.08	1.32	0.95	1.57	0.56	0.40	0.29	
	V03-80	9.16	3.27	2.55	1.37	1.24	1.07	0.41	0.26	
	V03-108	13.15	3.58	2.04	1.43	1.45	0.70	0.40	0.26	
	Average	10.61	4.08	2.01	1.20	1.49	0.75	0.40	0.27	
	Max.	13.23	6.68	3.15	1.92	1.93	1.07	0.47	0.31	
	Min.	9.10	3.08	1.32	0.91	1.24	0.56	0.34	0.25	
	SD	1.38	0.88	0.45	0.24	0.17	0.15	0.03	0.02	
TDH-, O3:K6 (N=3)	V19	8.96	3.37	2.15	1.53	1.42	0.73	0.44	0.26	
	V37	13.04	4.23	3.06	1.79	1.79	0.83	0.47	0.34	
	V71	11.75	3.69	2.03	1.14	1.58	0.74	0.40	0.26	
		Average	11.25	3.76	2.41	1.48	1.59	0.76	0.43	0.29
		SD	1.70	0.35	0.46	0.27	0.15	0.04	0.03	0.04
TDH-, non-O3:K6 (N=17)	T1	13.15	4.39	2.22	1.02	1.46	0.72	0.39	0.26	
	T2	23.38	4.45	2.76	1.21	2.22	0.70	0.41	0.25	
	T7	11.74	3.83	1.95	1.21	1.35	0.69	0.37	0.25	
	T12	26.52	6.25	2.09	1.19	2.43	0.72	0.41	0.27	
	T13	10.54	3.74	1.70	1.03	1.31	0.89	0.39	0.27	
	T21	23.76	4.09	1.79	1.15	2.85	0.66	0.38	0.27	
	T29	14.84	4.13	2.36	1.28	2.05	0.66	0.36	0.28	
	T31	11.14	3.69	2.03	1.14	1.59	0.67	0.44	0.31	
	T34	10.18	3.53	1.56	0.86	1.37	0.58	0.42	0.28	
	T44	15.52	3.85	2.83	1.74	1.58	0.60	0.38	0.26	
	T57	9.40	3.85	1.93	1.13	1.60	0.67	0.41	0.26	
	T68	15.14	5.03	2.09	1.29	1.71	0.79	0.47	0.29	
	T84	10.33	3.73	1.92	1.40	1.85	0.72	0.39	0.31	
	T92	11.81	3.86	2.00	1.21	1.51	0.67	0.40	0.27	
	T106	8.86	3.49	1.53	0.90	1.44	0.70	0.39	0.26	
	T122	11.44	3.83	1.88	1.20	1.62	0.72	0.42	0.30	
	T129	14.96	3.49	1.85	1.03	1.45	0.61	0.40	0.26	
		Average	14.28	4.07	2.03	1.17	1.73	0.69	0.40	0.27
	Max.	26.52	6.25	2.83	1.74	2.85	0.89	0.47	0.31	
	Min.	8.86	3.49	1.53	0.86	1.31	0.58	0.36	0.25	
	SD	5.19	0.66	0.35	0.19	0.41	0.07	0.03	0.02	
Average		12.05	3.97	2.15	1.29	1.60	0.73	0.41	0.28	
Max.		26.52	6.68	3.15	1.92	2.85	1.07	0.47	0.34	
Min.		8.86	3.08	1.32	0.86	1.24	0.56	0.34	0.25	
SD		3.97	0.77	0.42	0.24	0.32	0.12	0.03	0.02	

SD: Standard deviation (標準偏差)

Table 2 (続き)

(b) NaCl濃度別 (30°C, pH 7.2条件下)

病原性、血清型 (菌株数)	菌株名	ラグタイム (hour)					ログタイム (hour)				
		0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	7.0%	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	7.0%
TDH+, O3:K6 (N=20)	V96-110	2.72	2.69	1.65	1.43	4.39	0.40	0.36	0.32	0.28	0.54
	V96-178	1.54	1.54	1.11	1.09	2.96	0.29	0.26	0.26	0.26	0.45
	V96-223	2.65	1.66	1.28	1.28	2.63	0.44	0.36	0.32	0.30	0.55
	V97-19	2.14	1.34	1.11	1.00	2.57	0.36	0.28	0.26	0.27	0.44
	V98-10	2.03	1.23	1.00	1.28	2.14	0.34	0.28	0.25	0.27	0.40
	V98-290	2.50	1.47	1.28	1.17	2.63	0.41	0.37	0.29	0.28	0.53
	V98-324	2.71	1.79	1.34	1.92	3.27	0.42	0.33	0.29	0.31	0.58
	V99-38	1.94	1.35	1.55	0.91	2.46	0.35	0.29	0.29	0.26	0.44
	V99-107	2.92	1.33	1.34	1.15	2.46	0.35	0.29	0.26	0.27	0.44
	V00-145	2.79	1.83	1.55	1.39	3.44	0.33	0.27	0.28	0.25	0.46
	V00-161	1.70	1.48	1.12	1.10	2.73	0.35	0.31	0.27	0.28	0.49
	V01-38	2.24	1.16	1.26	0.91	2.30	0.35	0.29	0.36	0.26	0.44
	V01-141	2.27	1.32	1.11	1.39	2.24	0.37	0.29	0.25	0.29	0.49
	V02-21	2.18	1.15	0.95	0.94	2.18	0.32	0.26	0.24	0.27	0.39
	V02-36	5.38	1.29	0.89	1.13	2.21	1.02	0.28	0.25	0.29	0.46
	V02-64	2.25	1.14	1.06	1.26	2.17	0.35	0.28	0.27	0.27	0.40
	V02-106	2.22	1.12	0.94	0.96	2.25	0.33	0.29	0.25	0.26	0.37
	V02-123	1.87	1.31	0.75	0.95	2.48	0.37	0.28	0.26	0.29	0.39
	V03-80	2.21	1.47	1.79	1.37	2.44	0.36	0.37	0.39	0.26	0.48
	V03-108	2.38	1.34	1.35	1.43	2.24	0.33	0.29	0.26	0.26	0.42
Average	2.43	1.45	1.22	1.20	2.61	0.39	0.30	0.28	0.27	0.46	
Max.	5.38	2.69	1.79	1.92	4.39	1.02	0.37	0.39	0.31	0.58	
Min.	1.54	1.12	0.75	0.91	2.14	0.29	0.26	0.24	0.25	0.37	
SD	0.76	0.35	0.26	0.24	0.54	0.15	0.03	0.04	0.02	0.06	
TDH-, O3:K6 (N=3)	V19	1.54	1.07	1.07	1.53	2.37	0.34	0.30	0.26	0.26	0.47
	V37	2.38	1.38	1.28	1.79	2.65	0.39	0.35	0.31	0.34	0.57
	V71	3.12	1.29	2.85	1.14	2.89	0.38	0.29	0.46	0.26	0.44
	Average	2.34	1.25	1.73	1.48	2.63	0.37	0.31	0.34	0.29	0.49
	SD	0.65	0.13	0.79	0.27	0.21	0.02	0.03	0.08	0.04	0.06
TDH-, non-O3:K6 (N=17)	T1	2.60	1.58	1.62	1.02	2.44	0.35	0.30	0.26	0.26	0.46
	T2	2.06	1.51	1.29	1.21	2.60	0.34	0.28	0.25	0.25	0.43
	T7	1.88	1.28	1.01	1.21	2.11	0.33	0.29	0.25	0.25	0.43
	T12	2.17	2.36	1.37	1.19	5.08	0.35	0.37	0.27	0.27	0.63
	T13	1.62	1.19	1.09	1.03	2.28	0.34	0.32	0.32	0.27	0.48
	T21	2.05	1.28	0.93	1.15	2.54	0.33	0.31	0.25	0.27	0.50
	T29	1.46	1.03	1.01	1.28	1.94	0.35	0.29	0.26	0.28	0.46
	T31	1.90	1.14	1.01	1.14	2.56	0.42	0.34	0.29	0.31	0.45
	T34	1.83	1.06	0.84	0.86	2.20	0.34	0.29	0.26	0.28	0.45
	T44	1.93	1.27	0.96	1.74	2.62	0.30	0.24	0.24	0.26	0.44
	T57	1.89	1.10	0.92	1.13	2.41	0.34	0.30	0.25	0.26	0.45
	T68	2.32	1.47	1.27	1.29	2.94	0.42	0.33	0.27	0.29	0.49
	T84	1.84	1.23	1.09	1.40	2.27	0.44	0.36	0.30	0.31	0.51
	T92	2.01	1.27	1.15	1.21	2.27	0.32	0.29	0.27	0.27	0.40
	T106	1.88	1.19	1.12	0.90	2.14	0.36	0.29	0.26	0.26	0.43
	T122	1.96	1.04	1.22	1.20	2.55	0.37	0.32	0.30	0.30	0.47
	T129	1.90	1.03	1.17	1.03	2.13	0.34	0.29	0.25	0.26	0.36
	Average	1.96	1.29	1.12	1.17	2.53	0.35	0.30	0.27	0.27	0.46
Max.	2.60	2.36	1.62	1.74	5.08	0.44	0.37	0.32	0.31	0.63	
Min.	1.46	1.03	0.84	0.86	1.94	0.30	0.24	0.24	0.25	0.36	
SD	0.25	0.31	0.19	0.19	0.68	0.04	0.03	0.02	0.02	0.06	
Average	2.24	1.33	1.36	1.29	2.59	0.37	0.30	0.29	0.28	0.47	
Max.	5.38	2.69	2.85	1.92	5.08	1.02	0.37	0.46	0.34	0.63	
Min.	1.46	1.03	0.75	0.86	1.94	0.29	0.24	0.24	0.25	0.36	
SD	0.63	0.33	0.35	0.24	0.59	0.11	0.03	0.04	0.02	0.06	

Table 2 (続き)
(c) pH別 (30°C, NaCl 3.0%条件下)

病原性、血清型 (菌株数)	菌株名	ラクトタイム (hour)							ロケタイム (hour)							
		pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8	pH 5	pH 5.5	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8	
TDH-, O3 K6	V96-110	10.31	2.46	1.93	2.09	1.98	2.68	3.51	0.77	0.47	0.50	0.39	0.34	0.32	0.33	
	V96-178	-	2.57	1.89	1.63	1.28	1.34	1.54	-	0.43	0.37	0.33	0.31	0.27	0.29	
	V96-223	5.96	2.07	1.70	1.63	1.44	1.66	1.94	0.72	0.54	0.39	0.37	0.33	0.32	0.34	
	V97-19	6.13	1.92	1.54	1.34	1.20	1.19	1.27	0.93	0.46	0.36	0.32	0.30	0.27	0.28	
	V98-10	9.07	2.09	1.34	1.32	1.19	1.01	1.12	1.37	0.39	0.34	0.30	0.28	0.27	0.30	
	V98-290	7.47	2.43	1.61	1.38	1.52	1.29	1.76	0.79	0.50	0.37	0.36	0.34	0.33	0.38	
	V98-324	5.74	1.99	1.71	1.69	1.64	2.17	2.70	0.78	0.41	0.35	0.33	0.38	0.34	0.37	
	V99-38	5.42	2.23	1.70	1.31	1.25	1.33	1.48	0.81	0.39	0.33	0.31	0.28	0.27	0.29	
	V99-107	8.18	3.32	2.62	2.03	1.45	1.38	1.42	0.82	0.42	0.37	0.34	0.31	0.28	0.29	
	V00-145	11.23	3.30	2.05	1.65	1.62	1.69	1.87	2.22	0.42	0.36	0.34	0.29	0.29	0.29	
	V00-161	5.78	1.77	1.35	1.59	1.19	1.34	1.49	0.69	0.39	0.32	0.32	0.30	0.31	0.34	
	V01-38	7.27	2.08	1.69	1.01	1.55	1.19	1.37	0.85	0.38	0.33	0.40	0.35	0.28	0.31	
	V01-141	6.88	2.03	1.60	1.21	1.22	1.34	1.43	0.93	0.37	0.29	0.31	0.29	0.28	0.29	
	V02-21	5.06	1.87	1.50	1.73	1.04	0.90	1.22	0.69	0.40	0.30	0.33	0.28	0.27	0.35	
	V02-36	6.56	1.91	1.43	1.59	0.96	1.13	1.32	1.15	0.41	0.30	0.26	0.30	0.27	0.26	
	V02-64	5.14	2.91	1.38	1.08	0.99	0.97	1.53	0.62	0.44	0.36	0.38	0.28	0.28	0.25	
	V02-106	4.98	2.03	1.53	1.53	1.26	1.26	1.28	0.73	0.37	0.32	0.31	0.28	0.24	0.37	
V02-123	5.66	2.00	1.54	1.27	1.12	1.32	1.43	0.93	0.40	0.34	0.32	0.28	0.27	0.26		
V03-60	2.95	1.87	1.47	1.14	1.10	1.46	1.63	0.53	0.40	0.34	0.39	0.41	0.38	0.37		
V03-108	5.94	4.29	1.82	1.56	1.49	1.16	1.14	0.76	0.62	0.34	0.34	0.31	0.27	0.27		
Average	6.61	2.36	1.67	1.49	1.32	1.39	1.62	0.91	0.43	0.35	0.33	0.31	0.29	0.31		
Max.	11.23	4.29	2.62	2.09	1.98	2.68	3.51	2.22	0.62	0.50	0.40	0.41	0.38	0.38		
Min.	2.95	1.77	1.34	1.01	0.96	0.90	1.12	0.53	0.37	0.29	0.26	0.28	0.24	0.25		
SD	1.92	0.63	0.29	0.28	0.25	0.40	0.55	0.36	0.06	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04		
TDH-, O3 K6	V19	5.33	1.76	1.20	1.26	1.20	1.10	1.23	0.80	0.42	0.36	0.35	0.28	0.30	0.31	
	V37	4.59	2.04	1.71	1.72	1.52	1.11	1.47	0.71	0.43	0.35	0.36	0.35	0.36	0.35	
	V71	4.77	1.71	1.32	1.35	1.39	1.35	1.20	0.64	0.36	0.30	0.33	0.30	0.30	0.29	
	Average	4.90	1.83	1.41	1.44	1.37	1.19	1.30	0.72	0.40	0.33	0.34	0.31	0.32	0.32	
	SD	0.32	0.15	0.22	0.20	0.13	0.11	0.12	0.06	0.03	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02	
	TDH-, non-O3 K6	T1	10.37	2.37	1.66	1.64	1.89	1.43	1.53	1.15	0.37	0.37	0.35	0.33	0.27	0.27
		T2	9.89	2.31	1.87	1.49	1.47	1.45	1.43	1.34	0.39	0.33	0.32	0.28	0.27	0.27
T7		8.62	1.95	1.45	1.33	1.17	1.16	1.28	1.05	0.35	0.32	0.30	0.28	0.32	0.31	
T12		9.87	1.91	1.43	1.45	1.37	2.45	2.63	1.07	0.50	0.44	0.35	0.31	0.35	0.34	
T13		7.24	1.81	1.33	1.21	1.07	1.26	1.46	1.07	0.35	0.31	0.33	0.30	0.31	0.33	
T21		6.26	1.91	1.72	1.60	1.05	1.30	1.51	0.84	0.41	0.35	0.36	0.30	0.33	0.33	
T29		-	1.90	1.62	1.17	1.45	1.02	1.15	-	0.42	0.31	0.34	0.28	0.24	0.28	
T31		8.46	2.02	1.59	1.22	1.04	1.22	1.34	1.26	0.47	0.38	0.26	0.33	0.29	0.29	
T34		-	1.93	1.39	1.43	1.43	1.15	1.24	-	0.33	0.31	0.29	0.29	0.28	0.27	
T44		9.44	1.94	1.33	1.66	0.98	1.19	1.19	1.08	0.46	0.40	0.38	0.36	0.30	0.29	
T57		-	2.29	1.54	1.34	1.12	1.21	1.30	-	0.39	0.32	0.30	0.29	0.27	0.28	
T68		13.41	2.58	8.17	1.74	1.88	1.37	1.59	2.03	0.51	1.35	0.44	0.33	0.31	0.32	
T84		20.59	1.77	1.46	1.42	0.91	1.15	1.21	1.94	0.38	0.34	0.35	0.29	0.34	0.33	
T92		7.26	2.54	1.83	1.31	1.15	1.14	1.24	0.81	0.37	0.34	0.37	0.29	0.27	0.28	
T106		7.36	1.96	1.37	1.22	1.02	1.05	1.20	0.99	0.36	0.33	0.31	0.28	0.28	0.28	
T122		6.91	2.05	1.50	1.24	1.22	1.03	1.25	1.30	0.43	0.39	0.38	0.33	0.31	0.33	
T129		5.61	1.59	1.04	1.19	1.46	1.06	1.22	0.82	0.39	0.31	0.31	0.30	0.29	0.32	
Average	9.38	2.05	1.91	1.39	1.27	1.27	1.40	1.19	0.40	0.40	0.34	0.30	0.29	0.30		
Max.	20.59	2.58	8.17	1.74	1.89	2.45	2.63	2.03	0.51	1.35	0.44	0.36	0.35	0.34		
Min.	5.61	1.59	1.04	1.17	0.91	1.02	1.15	0.81	0.33	0.31	0.26	0.28	0.24	0.27		
SD	3.66	0.27	1.58	0.18	0.28	0.32	0.33	0.36	0.05	0.24	0.04	0.02	0.03	0.03		
Average	6.96	2.08	1.66	1.44	1.32	1.28	1.44	0.94	0.41	0.36	0.34	0.31	0.30	0.31		
Max.	20.59	4.29	8.17	2.09	1.98	2.66	3.51	2.22	0.62	1.35	0.44	0.41	0.38	0.38		
Min.	2.95	1.59	1.04	1.01	0.91	0.90	1.12	0.53	0.33	0.29	0.26	0.28	0.24	0.25		
SD	3.09	0.51	1.06	0.24	0.26	0.36	0.46	0.38	0.06	0.16	0.04	0.03	0.03	0.03		

- 24時間以内に増殖せず

