

平成 15 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 15 年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

1. 「腸炎ビブリオ血清型 03K6 株の  
水産魚介類での増殖に関するデータ」
2. 「感染力(胃酸での生存能力)条件の検討」

平成 16 年 2 月  
東京海洋大学(旧 東京水産大学)  
藤井建夫教授  
木村 凡助教授

平成 15 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 16 年 2 月 27 日

東京海洋大学（旧東京水産大学） 藤井建夫、木村 凡

### 1. 腸炎ビブリオ血清型 03K6 株の水産魚介類での増殖に関するデータ

#### 目的:

腸炎ビブリオ食中毒は主に魚介類の喫食が原因とされている。腸炎ビブリオ食中毒の予防対策を講ずるには、最近急増している新しい血清型 03:K6 についてのデータが必要である。これまでの食中毒調査の結果では、原材料汚染とともに不適切な温度管理が発生原因と指摘されている。しかし、現在検出分布データや疫学データは提出されつつあるが、魚介類毎の本菌の増殖しやすさの程度に関するデータについてはまだ十分に報告されていない。これらのデータは水産魚介類製品の製造・加工管理に従事する中小企業に必要なものであり、利用度の高いデータになるであろう。以上の必要性から、魚介類別に、それらの管理条件（温度、生鮮度および包装）と腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) 03:K6 株、および対照として 03:K6 以外の血清型菌株の増殖データを提供する。

#### 1-1. 03:K6 株と他の血清型株との増殖速度比較

*V. parahaemolyticus* の 03:K6 株の増殖速度と、同時期および過去に食中毒の発生原因となった他の血清型株の増殖速度を比較、検討する。

#### 実験方法:

##### 1) 供試菌株:

煮カニにおける増殖速度測定には、東京都衛生研究所（現、東京都健康安全研究センター）から 2002 年度に分与された *V. parahaemolyticus* V02-21 (03:K6), V02-36 (03:K6), V02-64 (03:K6), V02-106 (03:K6), V02-123 (03:K6) および 1977 年度に分与された VP+1 (011:K19), VP+3 (05:K15), VP+6 (04:K10), VP+8 (037:K3), VP+9 (03:K31), VP+11 (04:K42), VP+13 (03:K7), VP+17 (03:K58) の計 13 株を使用した。いずれも食中毒患者由来の TDH 陽性株である。

また、TSB 培地における増殖速度測定には、東京都衛生研究所（現、東京都健康安全研究センター）から 2002 年度に分与された *V. parahaemolyticus* V02-21 (03:K6), V02-36 (03:K6), V02-64 (03:K6), V02-106 (03:K6), V02-123 (03:K6), V02-43 (04:K8), V02-91 (04:K11),

V02-105 (08:K41), V02-162 (02:K3), V02-186 (01:K25) および 1977 年度に分与された VP+1 (011:K19), VP+3 (05:K15), VP+6 (04:K10), VP+8 (037:K3), VP+9 (03:K31), VP+11 (04:K42), VP+13 (03:K7), VP+17 (03:K58) の計 18 株を使用した。いずれも食中毒患者由来の TDH 陽性株である。

## 2) 魚介類試料:

03:K6 株と非 03:K6 株との増殖特性の違いについての検討実験には、頻繁に食中毒を引き起こしている生食用の煮カニを代表サンプルとして用いた。東京都内の量販店で購入し、無菌的に約 10g を滅菌シャーレに入れて -20℃ で凍結保存した。実験に供する際は 5℃ 下で約 2 時間解凍し、さらに室温 25℃ 下に約 20 分間放置した。

## 3) 煮カニにおける増殖速度測定

Trypticase Soy Broth (TSB) 培地 (BBL) [塩化ナトリウム (国産化学) を終濃度 3.0% (w/v) になるように添加] にて 30℃, 一晩培養した供試菌の前培養液 (8~9 Log cfu/mL) を段階希釈し、さらに 30℃, 2 時間培養して対数増殖期の培養液 (5~6 Log cfu/mL) を得た。

魚介類試料にその培養液を 100 μL 接種後、それぞれ 25℃ に 0 および 4 時間放置した。処理後は魚介類試料を回収し、5 倍量の希釈用ペプトン水 [0.1% BACTO Peptone (DIFCO) および 1.8% 塩化ナトリウム (同上)] を加えストマッカー [400-T (オルガノ)] を用いて 2 分間ホモジナイズした後、スパイラルプレーター [EDDY JET (GSI クレオス)] を用いて TCBS 寒天平板 (栄研) に塗抹した。25℃ で 18~24 時間培養後、生菌数を計測した。以上の実験を 2 回行い、初発菌数に対する 4 時間後の生菌数の増減を対数値で表し [相対生菌数 (Log cfu/g)], 平均値を算出した。

## 4) TSB 培地における増殖速度

5mL TSB 培地 (同上) に供試菌株をそれぞれ 1 白金耳接種し、小型振盪培養装置 [バイオフォトレコーダー TN-1506 (ADVANTEC)] を用いて 25℃, 振とう培養 (45 rpm) を行い、各供試菌の対数増殖期前期の前培養液 ( $OD_{660}=0.5$ , 約 8 Log cfu/g) を得た。その菌液 100 μL を 5mL TSB 培地に接種し、25℃, 振とう培養 (45 rpm) を 2000 分以上行い、2 分毎に  $OD_{660}$  を測定した。

得られたデータより、対数増殖期の最短の倍加時間 (T) を  $T = \ln 2 \times \ln(N/N_0)/t$  に代入して求めた (N: t 時間後の菌数,  $N_0$ : 最初の菌数, t: 時間)。

## 結果および考察:

*V. parahaemolyticus* 13 菌株 (03:K6 株 5 株および過去に食中毒を起こした非 03:K6 株 8 株) を煮カニに接種し、温度管理不備下 (25℃) に 4 時間放置後の菌数増減を調べたところ、非 03:K6 株 8 株では -1.4~1.1 Log cfu/g, 03:K6 株 5 株では 1.4~1.9 Log cfu/g の相対生菌数となり、03:K6 株は非 03:K6 株よりも増殖速度が速かった (Fig. 1-1)。またこの挙動をより正確に検討するために、さらに多くの菌株を用いて純粋培養系における増殖速度を調べた。本菌の 18 菌株 (03:K6 株 5 株, 最近食中毒を起こした非 03:K6 株 5 株および過去に食中毒を起こした非 03:K6 株 8 株) をそれぞれ 5mL TSB 培地 (3% NaCl) に接種し、25℃ に 2000 分以上振とう培養し (45 rpm), 2 分毎に  $OD_{660}$  を測定した。得られた増殖曲線から対数増殖期の最短の倍加時間を算出したところ、03:K6 株 5 株では 31~40 分であり、最近の非 03:K6 株 5 株では 33~47 分、過去の非 03:K6 株では 61~267 分であった (Fig.

1-2). このように O3:K6 株の増殖速度は、最近の非 O3:K6 株とほとんど差がなく、O3:K6 株に特化した増殖の速さはみられなかったが、過去の非 O3:K6 株より早い増殖速度の傾向を示した。

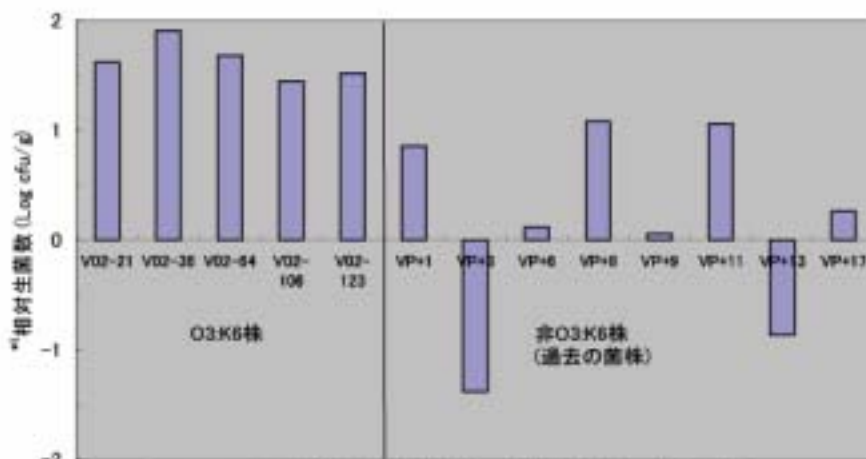


Fig. 1-1 O3:K6株と他の血清型株の水産魚介類での増殖比較 (代表的食品として煮カニを用い、菌の接種後、25°Cで4時間培養した)

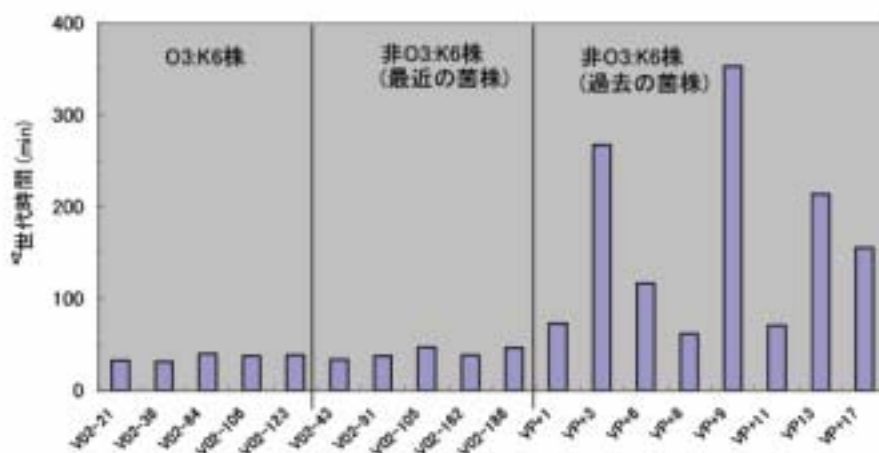


Fig. 1-2 対数増殖期の最短世代時間 (25°C, TSB培地にて振とう培養)

- \*1: 相対生菌数=Log (4時間後の菌数/初発菌数)
- \*2: 世代時間 (T): 対数増殖期の最短の増加時間  
 $T = \ln 2 \times \ln(N/N_0) / \ln(N/N_0) / t$  (N: t時間後の菌数, N<sub>0</sub>: 最初の菌数, t: 時間)

以上の結果より、最近食中毒を起こした菌株は、血清型に関係なく温度管理不備下に放置された場合、過去に食中毒を起こした菌株よりも短時間で食中毒発症菌数にまで増殖する危険性が示された。本菌による食品の一次、二次汚染および温度管理不備の防止を今まで以上に徹底する必要がある。また今後は 03:K6 株の増殖挙動についてより多くの菌株、魚種を用いて詳細に調べることが望まれる。

## 1-2 魚介類別 03:K6 株増殖評価および生存評価

一時的な温度管理不備条件における *V. parahaemolyticus* 03:K6 の増殖危険性について魚介類別に評価する。

### 実験方法:

#### 1) 供試菌株:

東京都衛生研究所（現、東京都健康安全研究センター）から 2002 年度に分与された *V. parahaemolyticus* V02-36 (03:K6), V02-64 (03:K6), V02-123 (03:K6) および 1977 年度に分与された VP+8 (037:K3) の計 4 株を使用した。いずれも食中毒患者由来の TDH 陽性株である。

#### 2) 魚介類試料:

##### イ) 鮮度良好時の魚介類における挙動

生食用のマグロ、ハマチ、イカ、生タコ、ホタテ、煮カニおよび甘エビを東京都内の量販店で購入し、無菌的に約 10g に切り、滅菌シャーレに入れて -20℃ で凍結保存した。実験に供する際は、5℃ 下で約 2 時間解凍し、さらに室温 25℃ 下に約 30 分間放置した。

##### ロ) 鮮度低下時の魚介類における挙動

イ) の操作後、さらに 25℃ に約 4 時間放置した。

#### 3) 鮮度良好時および低下時の魚介類における挙動

TSB 培地（同上）にて 30℃、一晩培養した供試菌の前培養液（約 9 Log cfu/mL）を段階希釈し、さらに 30℃、2 時間培養して対数増殖期の培養液（5~6 Log cfu/mL）を得た。魚介類試料にその培養液を 100 μL 接種後、それぞれ 25℃ および 5℃ に 0 および 4 時間放置した。処理後は魚介類試料を回収し、5 倍量の希釈用ペプトン水（同上）を加えストマッカー（同上）を用いて 2 分間ホモジナイズした後、スパイラルプレート（同上）を用いて TCBS 寒天平板（同上）に塗抹した。25℃ で 18~24 時間培養後、生菌数を計測した。

追加的に、魚介類試料の pH を実験毎に測定した。魚介類試料に 2 倍量の蒸留水を加え、ストマッカー（同上）を用いて 2 分間ホモジナイズし、得られた液の pH を pH メーター [KS701 (日本ベンターネット)] を用いて測定した。

以上の実験を 2 回行い、初発菌数に対する 4 時間後の生菌数の増減を対数値で表し [(相対生菌数 (Log cfu/g))], 平均値を算出した。

### 結果および考察:

一般的に消費者に広く食されることの多い生食用の 7 魚種（マグロ、ハマチ、イカ、生タコ、ホタテ、煮カニおよび甘エビ）に対して *V. parahaemolyticus* 4 菌株 (03:K6 株 3 株お

よび過去に食中毒を起こした非O3:K6株 1株) を接種後、温度不備下 (25 ) および冷蔵下 (5 ) に 4 時間放置後の菌数増減を調べた。その結果、5 に 4 時間放置した場合、いずれの魚種についても著しい菌数変化はみられなかったが (Fig. 2-1, 2-2), 25 に 4 時間置いた場合、魚種による増殖しやすさに差がみられた。25 に 4 時間置いた場合、マグロおよびハマチといった赤身魚において本菌は死滅もしくは増殖停滞し、生タコ、イカ、ホタテ、煮カニおよび甘エビといった軟体類および甲殻類において多くの場合で活発な増殖が観察された (Fig. 2-1, 2-2)。マグロでは 5 に 4 時間置いた場合より 25 に 4 時間置いた場合に、 $-0.3 \sim -3.0$  Log cfu/g と大幅な菌数減少がみられ、またハマチにおいても  $-2.9 \sim 1.3$  Log cfu/g と大幅な菌数減少または微弱な増殖を示すにとどまったことから (Fig. 2-1, 2-2), マグロ、ハマチといった赤身魚は、本菌の増殖に不適であったと考えられる。この理由として pH が比較的 low に増殖に不適であることが挙げられ (平均 pH: マグロ 5.7、ハマチ 6.0), pH 6.0 以下の魚種で本菌の増殖が停滞するという以前の報告に一致している。また低い NaCl 濃度に起因しているという報告もある。他の魚種の pH は 6.0 以上と高かったことから (平均 pH: 生タコ 6.2 イカ 6.6 ホタテ 6.3 煮カニ 7.1 甘エビ 7.5), これらの魚種は本菌の増殖に適していたと考えられる。なお、このような死滅現象は 5 でも、25 ほど顕著ではなかったが、起きている。基本的に同じメカニズムで死滅が起きたと推察できる。

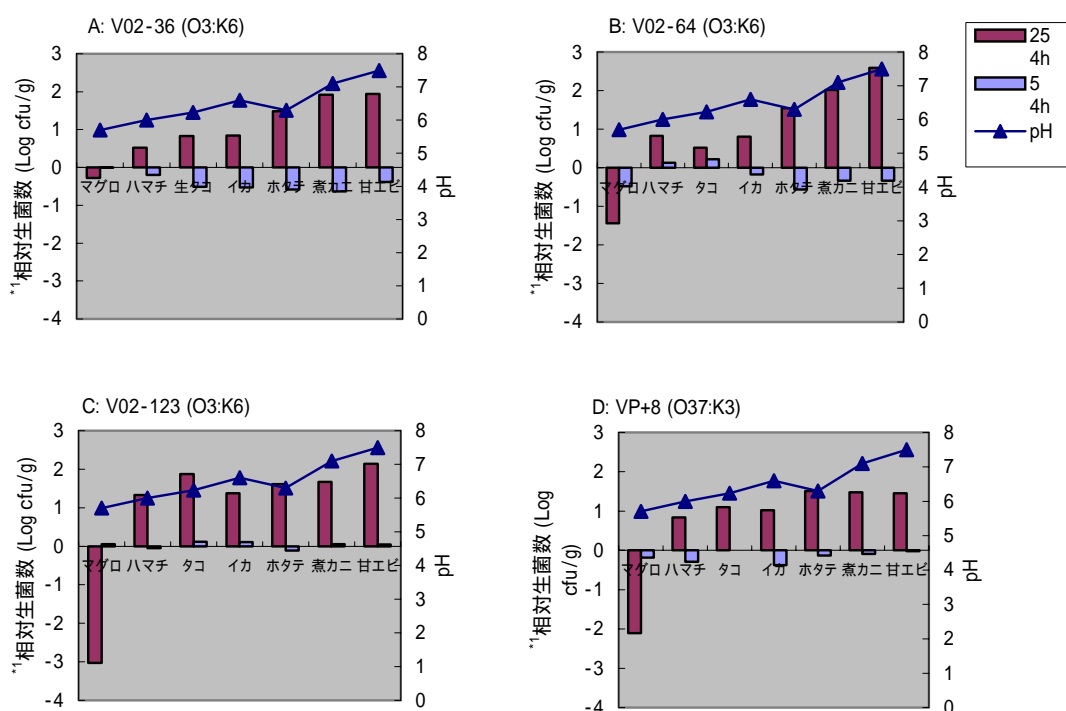


Fig. 2-1 鮮度良好時の魚介類における *V. parahaemolyticus* 4菌株 [V02-36 (O3:K6) (A), V02-64 (O3:K6) (B), V02-123 (O3:K6) (C), VP+8 (O37:K3) (D)] の増殖生存評価

菌株別にみると、多くの魚種において O3:K6 株 3 株は非 O3:K6 株 1 株よりも相対生菌数がわずかに多かったが、各魚種における増殖しやすさについては著しい差はみられなかった (Fig. 2-1, 2-2). 魚介類の鮮度による差を調べるために、鮮度良好時および鮮度低下時の魚介類試料両方について試験したところ、著しい差はみられなかった (Fig. 2-1, 2-2).

このように *V. parahaemolyticus* の温度管理不備条件下での増殖は、どの菌株、魚介類の鮮度状態においても、軟体類や甲殻類の魚肉で著しく、赤身魚で停滞することが示された。軟体類や甲殻類の魚肉は、食中毒防止のために、特に一次汚染、二次汚染および温度管理不備を防止することが必要不可欠といえる。

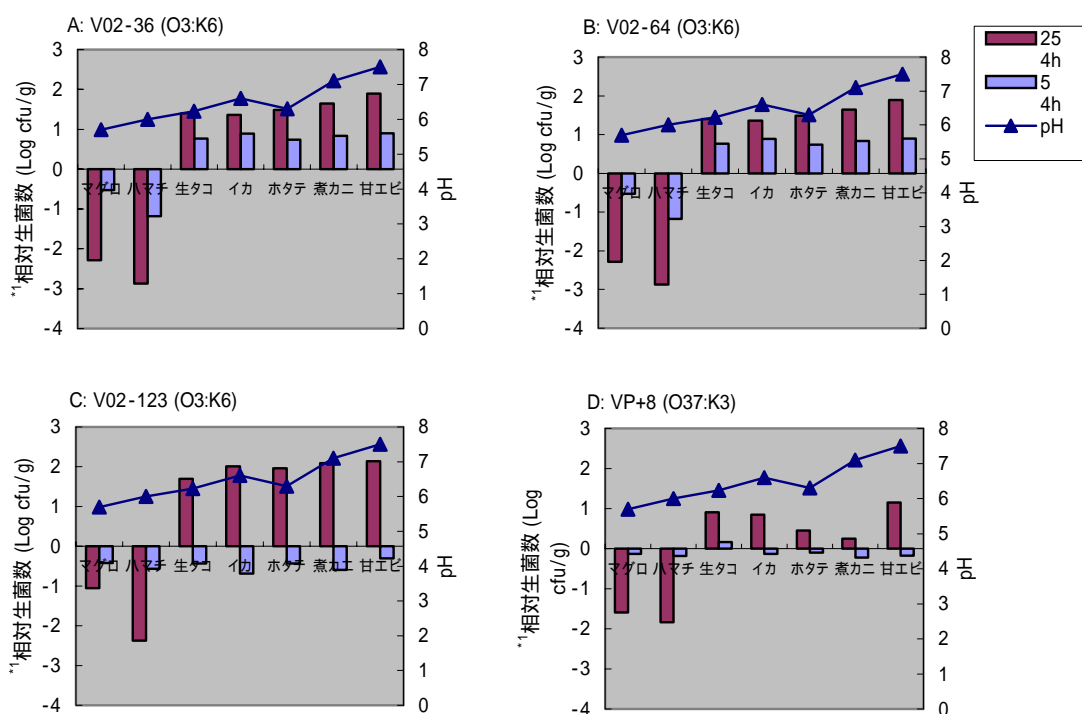


Fig. 2-2 鮮度低下時の魚介類における *V. parahaemolyticus* 4菌株 [V02-36 (O3:K6) (A), V02-64 (O3:K6) (B), V02-123 (O3:K6) (C), VP+8 (O37:K3) (D)] の増殖生存評価

## 2. 感染力（胃酸での生存能力）条件の検討

### 目的：

腸炎ビブリオは本来、酸に弱いため pH の低いヒトの胃液を通過しにくいと考えられている。しかし、実際には胃を通過し、感染型食中毒を引き起こしている。食品とともに大量接種された腸炎ビブリオがヒトの胃酸環境を通過する要因は、単に接種菌量だけで決まるものなのだろうか。どのような食品環境（成分、pH など）が胃酸に対する耐性を誘発しやすいのか。マグロ、ハマチなど魚種によって、付着菌数が同等であっても、食中毒を引き起こすリスクが変わってくるのではないだろうか。感染型食中毒細菌の胃酸への耐性に関しては、病原性大腸菌 0157 やサルモネラについては近年国際的に明らかにされつつある新しい知見であるが、腸炎ビブリオに関して科学的データはほとんど報告されていない。また、腸炎ビブリオに関して、食品別の食中毒リスクを評価したというデータは十分に存在しない。これらのデータは、腸炎ビブリオ 03:K6 の増殖とともに感染力（ここでは胃酸への耐性）からみた危険度データも合わせて参照することにより、腸炎ビブリオ 03:K6 による食中毒の防除の指針となるだろう。

### 2-1 感染力（胃酸での生存能力）条件の検討～基礎データ～

*V. parahaemolyticus* の 03:K6 株の胃酸での生存能力を検討する。

#### 実験方法：

##### 1) 試菌株：

東京都衛生研究所（現、東京都健康安全センター）から分与頂いた食中毒患者由来の TDH 陽性株である *Vibrio parahaemolyticus* V02-36(03:K6), V02-64(03:K6), Vp+11(04:K42), 我が研究室で作成した V02-64 株由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子欠損株である V02-64mutA17 の計 4 株を使用した。

##### 2) 方法

Luria-Bertani (LB) 培地<sup>1)</sup>( pH7.0 )で一晩培養した供試菌の培養液を、再び同培地に 1/100 量接種し  $0.D_{600}=0.1 \sim 0.2$  に達するまで振とう培養した。この培養液を集菌し（15000rpm, 10 分）生理的食塩水で洗浄した。洗浄されたペレットは LB 培地 (NaCl 3%, pH 5.0, 5.5, 6.0, 7.0、計 4 つの pH) に再懸濁し、2 時間室温で放置した。その後、再び集菌、生理的食塩水で洗浄・再懸濁を行い、1mL を人工胃液<sup>2)</sup>（37℃、pH2.5, 3.0, 4.0、Lys 1%添加・非添加）に接種し、37℃ に保ちながら 30 分毎に生残数をカウントした。カウントの方法は、1mL を 9mL のリン酸緩衝溶液<sup>3)</sup>（pH7.0, NaCl 3%）に接種した後、LB 培地（agarose 2%）を用いてスパイラルプレーター（IUL Instruments, Spain）で塗抹し、30℃で一晩培養しコロニー数をカウントした。人工胃液接種時（0 分）の菌数は、リン酸緩衝溶液 9mL に加えて同様にカウントした。人工胃液の接種時の菌数と、30 分毎の生菌数を比較して生残数（%）を求めた。実験・結果は、3 回の平均値を算出したものである。



- \* 人工胃液の pH 設定は、pH2.5, 3.0, 4.0 の 3 点で評価を行った。また、人工胃液中にアミノ酸（リジン）を添加し、リジンの有無による生残評価を行った（基礎的な予備実験で腸炎ビブリオの低 pH 下での生存にリジンが関与していることが確認されている。）
- \* 各 pH の LB 培地に 2 時間曝す行為を adaptation と以下に記載する。予備的に低 pH に曝されることで、低 pH(胃酸)に耐性となることが基礎的な予備実験で明らかとなっている。

#### \*1 LB 培地

1% Bacto Tryptone (Difco), 0.5% Bacto Yeast Extract (Difco), 3.0% NaCl (国産化学)

塩化ナトリウム水溶液もしくは塩酸により pH を調整後、高圧蒸気滅菌 (121 , 15 分)

#### \*2 人工胃液

8.3g Proteose Peptone (Difco), 3.5g D-glucose (国産化学), 2.05g NaCl (国産化学), 0.6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (国産化学),

0.11 CaCl<sub>2</sub> (国産化学), 0.37g KCl (国産化学), 0.1g lysozyme (生化学), 50mg 胆汁末 (和光純薬), 13.3mg

pepsin (和光純薬) を 1L の蒸留水に溶解し、塩酸で pH2.5 にする。必要に応じて、10%[wt/vol]炭酸水

素ナトリウム (国産化学) 水溶液で pH を上げる。人工胃液調整後、濾過滅菌 (0.2 μm) をして使用する。

#### \*3 リン酸緩衝溶液

3.0% NaCl, 0.3% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (国産化学), 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (国産化学)

pH7 前後であることを確認し、高圧蒸気滅菌。

## 結果及び考察

結果は、別紙の予備実験・結果に記載する。

V02-64mutA17 を除く 3 株では、adaptation pH5.5 の時に、pH4.0 胃酸で曝した時の 30 分後の生残率が Lys 添加及び非添加区で 1%を越えており、他の adaptation pH 区よりも生残率が高い傾向にあることが確認できた。またこの 3 株では、株ごとに差異はあるが、リジン添加区の方が非添加区に比べて、生残率が高い傾向が認められた。しかし、V02-64mutA17 は他菌に比べて酸に弱い傾向があり、さらにリジンの有無と生存率は無関係であった (Fig.3-1, Fig.3-2, Fig.3-3, Fig.3-4) 。

以上の結果を踏まえて、pH5.5 程度の食品に本菌がさらされた時、胃酸を通過する危険性が高まることが考えられる。

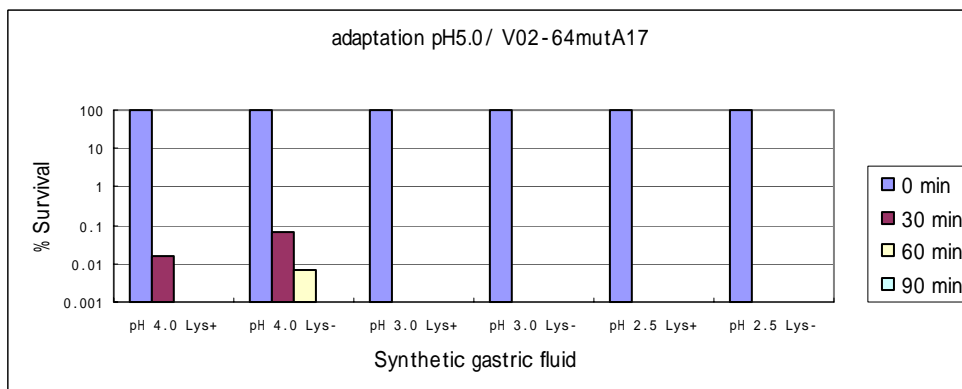
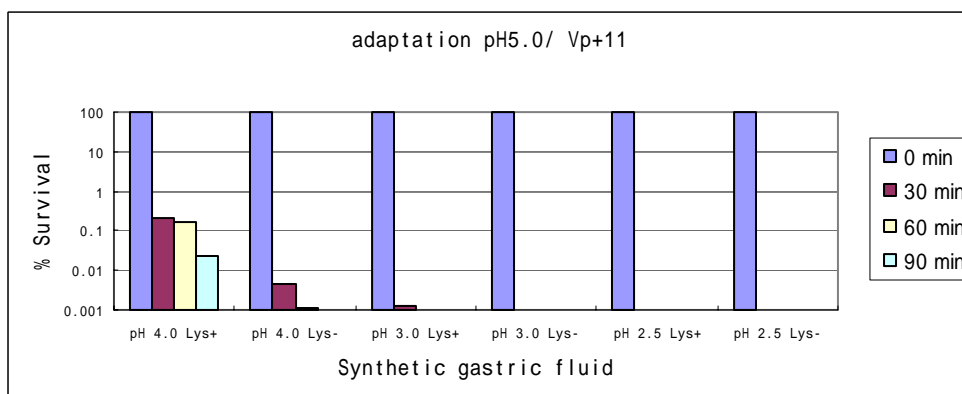
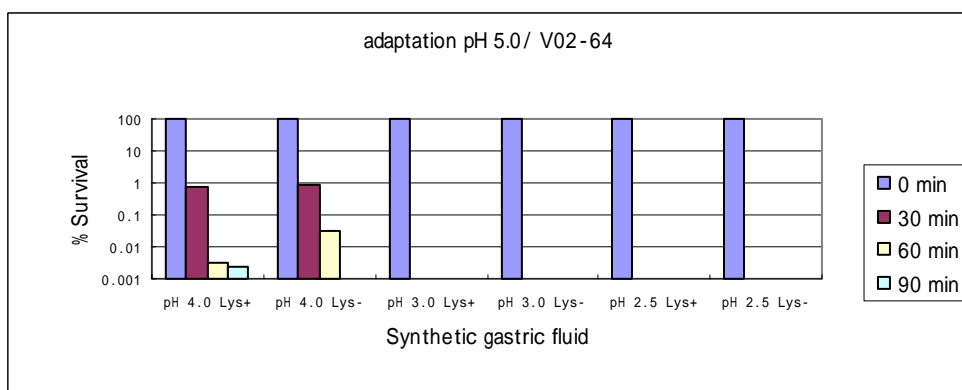
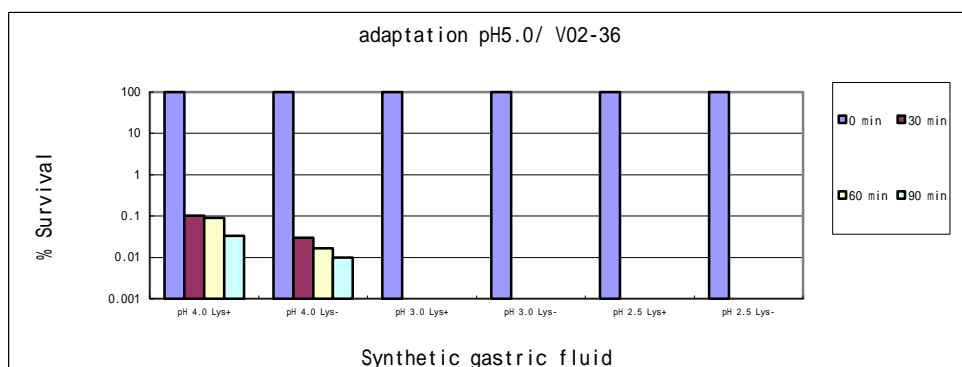


Fig.3-1 各種 pH 適応後の腸炎ピブリオの耐酸性の比較

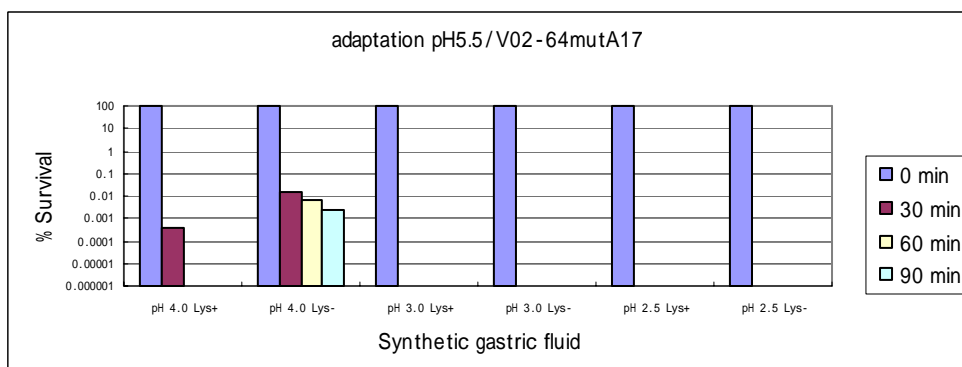
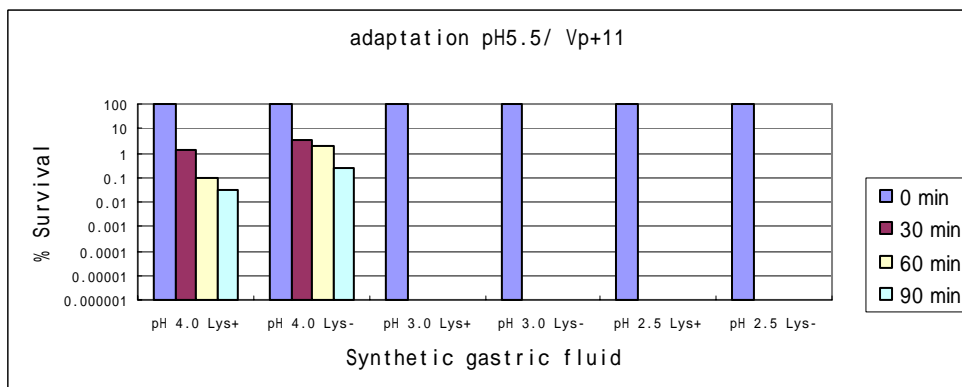
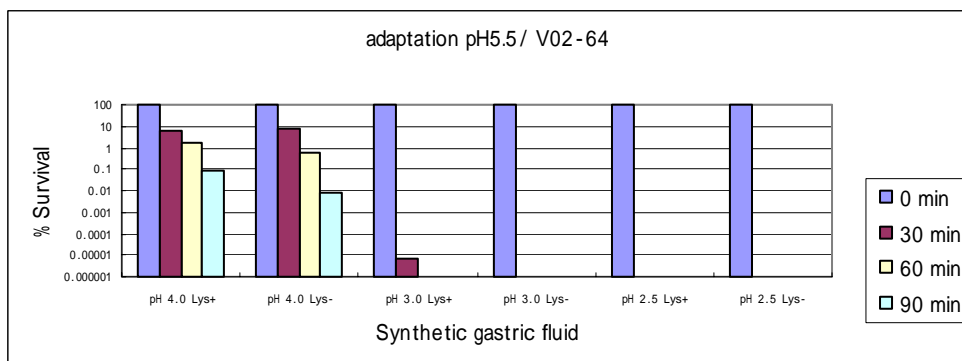
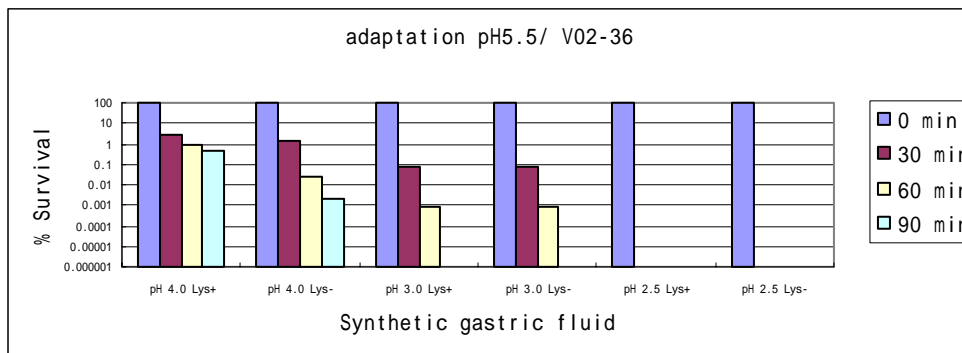


Fig.3-2 各種 pH 適応後の腸炎ピブリオの耐酸性の比較

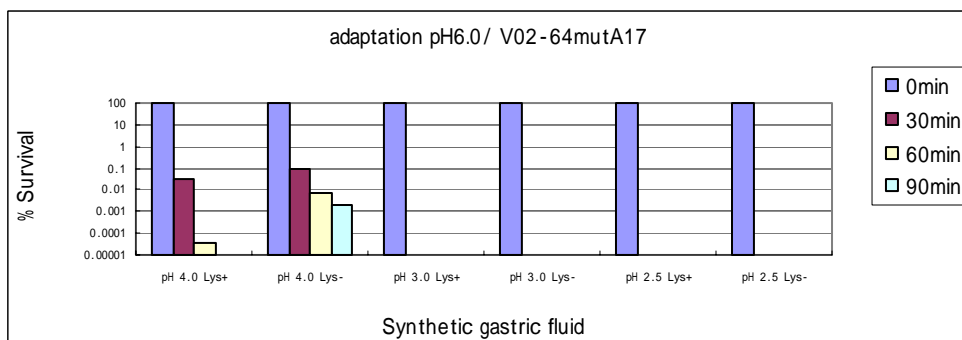
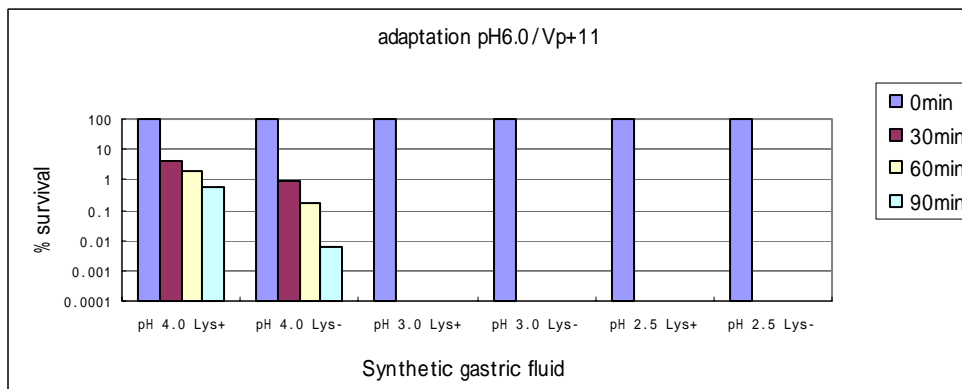
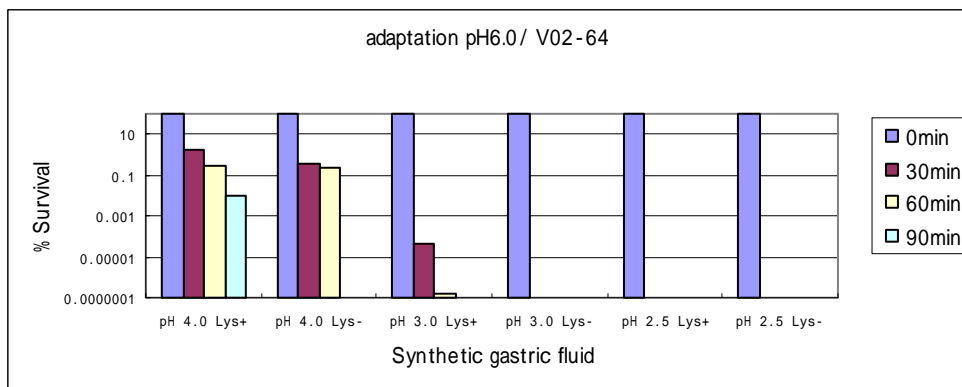
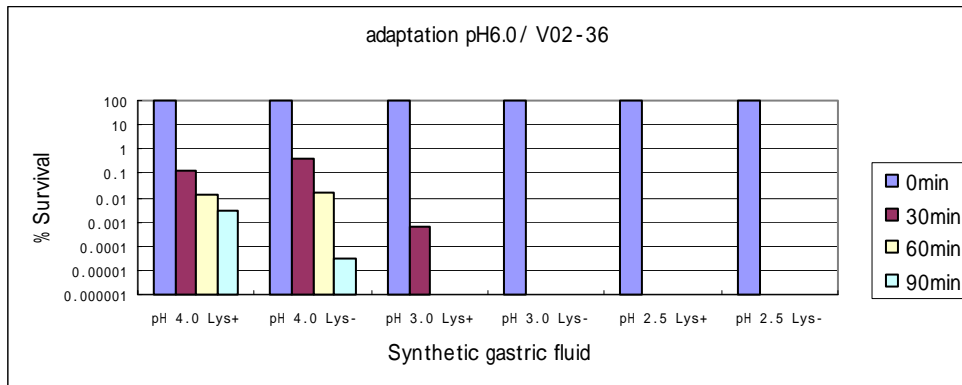


Fig.3-3 各種 pH 適応後の腸炎ピブリオの耐酸性の比較

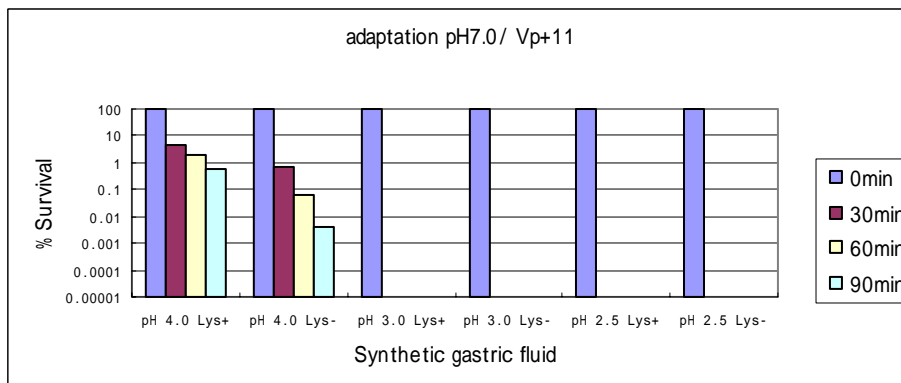
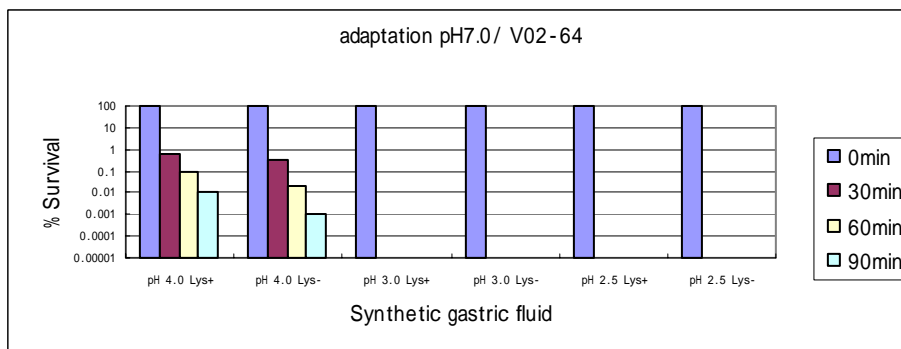
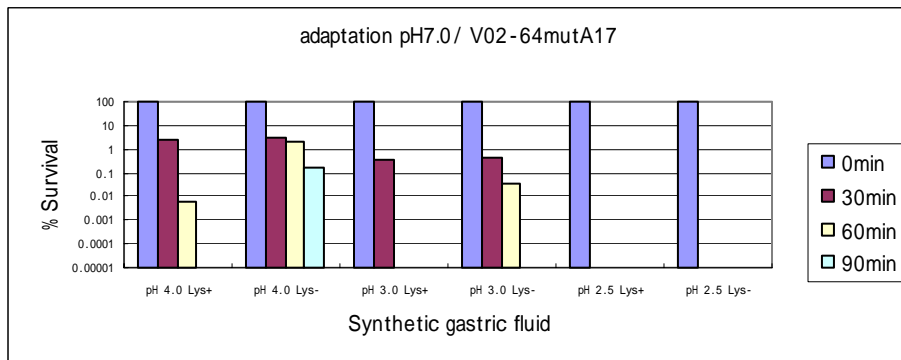
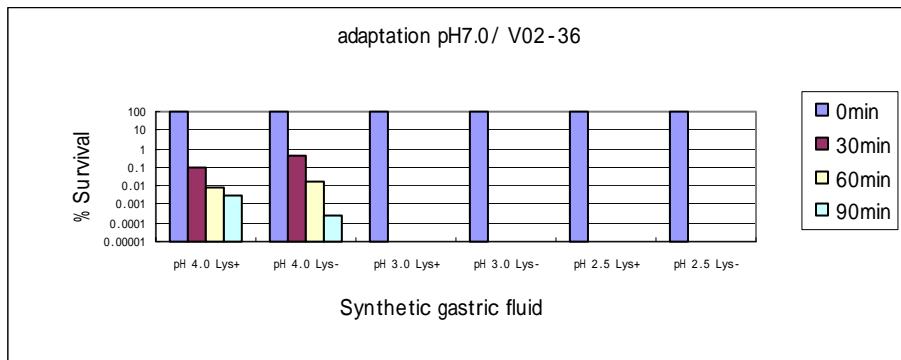


Fig.3-4 各種 pH 適応後の腸炎ピブリオの耐酸性の比較

## 2-2 感染力（胃酸での生存能力）条件の検討～食品別評価～

*V. parahaemolyticus* の 03:K6 株を食品に接種し、付着食品別に胃酸での生存能力を検討する。

### 実験方法：

#### 1) 供試菌株：

東京都衛生研究所（現、東京都健康安全センター）から分与頂いた食中毒患者由来の TDH 陽性株である *Vibrio parahaemolyticus* V02-36(03:K6), V02-64(03:K6), Vp+11(04:K42), 我が研究室で作成した V02-64 株由来のリジン脱炭酸酵素遺伝子欠損株である V02-64mutA17 の計 4 株を使用した。

#### 2) 食品試料：

魚介類を使用。煮カニ、タラ、エビ、ホタテ、マグロを使用。（煮カニ以外は、生もの）

#### 3) 方法

LB 培地で一晚培養した供試菌の培養液を、再び同培地に 1/100 量接種し  $O.D._{600}=0.1\sim 0.2$  に達するまで振とう培養した。この培養液を集菌し（15000rpm, 10 分）生理的食塩水で洗浄した。洗浄されたペレットは生理的食塩水に再懸濁し、その 100  $\mu$ L を食品 5g に添加し 2 時間室温で放置した（この時、接種した菌量をカウントした）。また、この時食品由来の菌数を測定するために、菌液非接種の食品サンプル 5g も用意し 2 時間室温で放置した。食品は、滅菌シャーレ上で培養液を摂取し、2 時間後にストマッカー袋へ移行した。この食品サンプルを 45mL の人工胃液（37  $^{\circ}$ C、pH2.5, 3.0, 4.0）に添加し、ストマッカーで食品と人工胃液を混ぜて、この混合溶液を 50mL 溶コーニング（滅菌済み）に移し、30 分毎に混合液を取り出し、生菌数をカウントした。カウント方法は、1mL を取り出し、9mL のリン酸緩衝溶液（pH7.0, NaCl 3%）に添加した後に LB 培地（agarose 2%）及び TCBS 寒天培地（栄研）を用いスパイラルプレーター（IUL Instruments, Spain）で塗抹し、30  $^{\circ}$ C で一晚培養しコロニー数をカウントした。人工胃液接種時（0 分）の菌数は、生理的食塩水 45mL に食品サンプルを加えてストマッカーで混合した後、同様にカウントした。人工胃液接種時の菌数と、30 分毎の生菌数を比較し生残率（%）を求めた。さらに食品の pH 及び人工胃液に添加後の pH を測定した。食品データ・結果は、3 回の平均値を算出した。

\* 人工胃液の pH は pH2.5, 3.0, 4.0 の 3 点で評価した。

### 結果及び考察

結果は、Fig.4-1、Fig.4-2、Table 1、Table 2 に記載する。

5 種類の魚介類に *V. parahaemolyticus* 培養液を添加し 2 時間放置後、人工胃液を混合し本菌の生残率を求めた。食品サンプルに摂取せず、培養後すぐに胃酸（pH4.0, 3.0, 2.5）に曝した場合は、すべての株で死滅が見られたが、食品サンプルに接種した場合には、そ

の死滅が非常に緩やかになることが確認された。また、胃液中での本菌の挙動は、魚種による違いが反映されることが観察された。

マグロにおいては pH2.5, pH3.0 の人工胃液を混合したところ 30 分後には全く生残が確認されなかった。また、pH4.0 の人工胃液に曝露した場合でも V02-64 株でのみ 30 分後に生残がみられたが他の株はすべて死滅した。

一方、タラ、煮カニにおいては pH4.0 の人工胃液に晒した本菌はすべての株で 90 分後まで生き残り、pH3.0 の人工胃液混合区でも V02-36 以外の株で 60~90 分まで生残が確認された。さらに、タラでは pH2.5 の人工胃液に晒したのにもかかわらず V02-64 株、VP+11 株の 2 株で生残が確認された。

ホタテとエビにおいて、両者は極めてよく似た挙動を示した。pH2.5, pH3.0 の人工胃液に曝露したところ、すべての株が死滅したが pH4.0 の人工胃液混合区では高い生残率を示した。また、この pH4.0 における各株の挙動は V02-36 株では異なるものの他の株ではほぼ同一であった。

本結果から、*V. parahaemolyticus* の胃酸に対する耐性は魚種によって異なることが明らかとなった。予備実験の結果では、pH5.5 付近で最も耐性となったが、pH5.5 に最も近いマグロにおける本菌の酸耐性獲得は最も低いものとなった。以前、同じ赤身魚であるカツオで同様の実験を行ったところ、マグロと類似した挙動を示した。よって、赤身魚において本菌の酸耐性獲得能は低いことが考えられる。その理由は赤身魚に共通する成分が関係あると考えられる。また、興味深い見解として、マグロ程度の pH で 2 時間 adaptation した場合は、本菌は増殖することが予備の実験で明らかとなっているが、マグロに実際 adaptation すると、菌が死滅する傾向がみられる。

煮カニ、タラで本菌の酸耐性が最も高められるという結果となり、特に煮カニは過去に本菌による食中毒事例があることから、カニにおける本菌の汚染は嚴重に注意を払うべきであると思われる。タラは、生で喫食することはほとんど無いと思われるが、本菌の 2 次汚染という観点から、注意すべき魚種であろう。

エビ、ホタテでは、胃液 pH が 3.0 以下で本菌の生存が見られなかったが、pH4.0 の時には生存が確認された。ホタテの pH は 6.2, エビは 7.0 と両者は pH が 1 も違うが、類似の挙動が示されている。胃液における酸耐性には、食品サンプルの pH より、サンプル由来の成分の方が問題となることが伺える。

これらのデータから、白身の魚、貝類、甲殻類、軟体動物類に腸炎ビブリオが付着することで、胃酸を通過しやすくなると考えられる。よって、これらの食材において、本菌の食中毒発生リスクが高いことが示唆される。貝類は、中腸腺に細菌やウイルス等が蓄積しやすいということから、本菌の食中毒発生リスクが高いと考えられているが、2 次汚染で付着することにより、胃酸通過能力が高まり、感染のリスクが高められる可能性も考えられる。

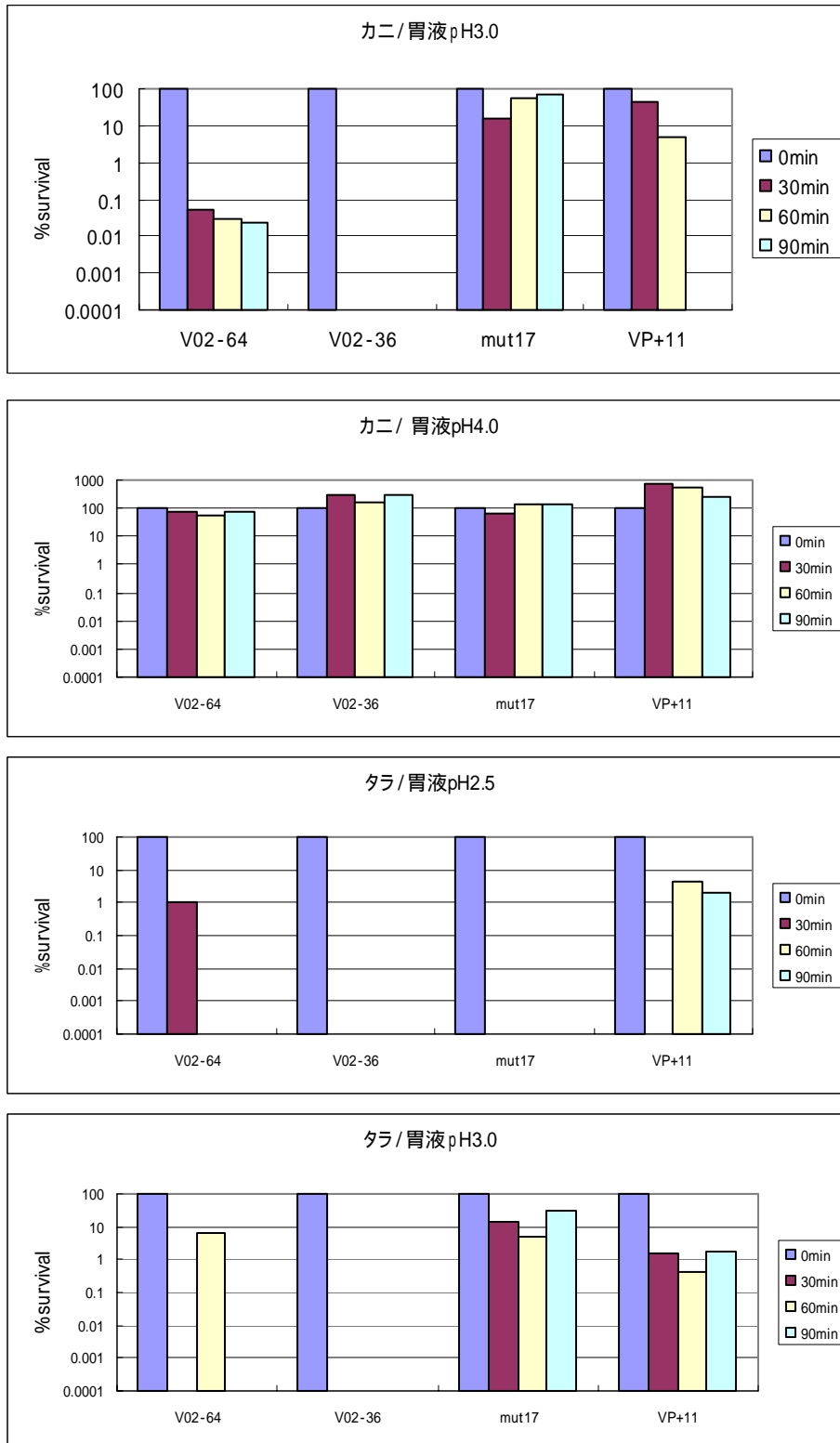


Fig.4-1 各種魚介類に摂取後、人工胃液に暴露した場合における腸炎ビブリオの生残性の差異



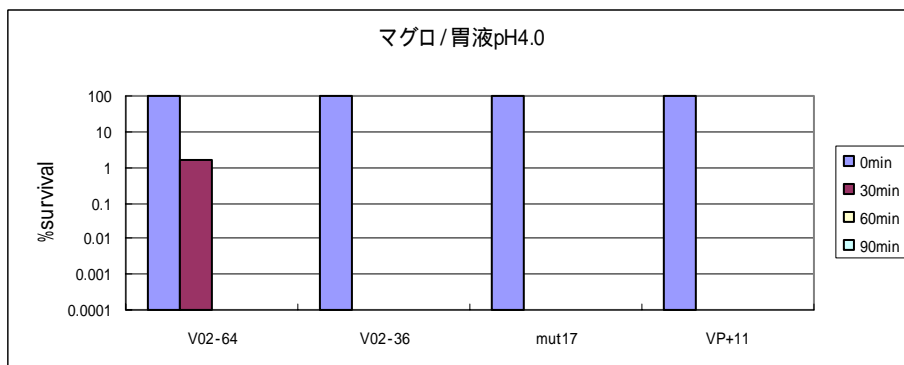
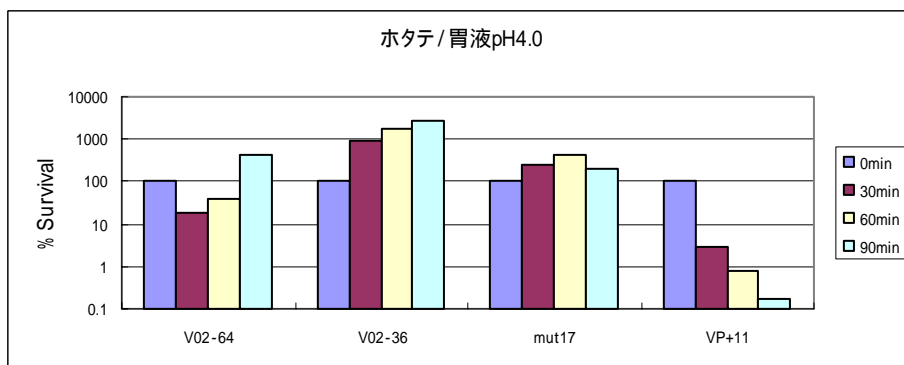
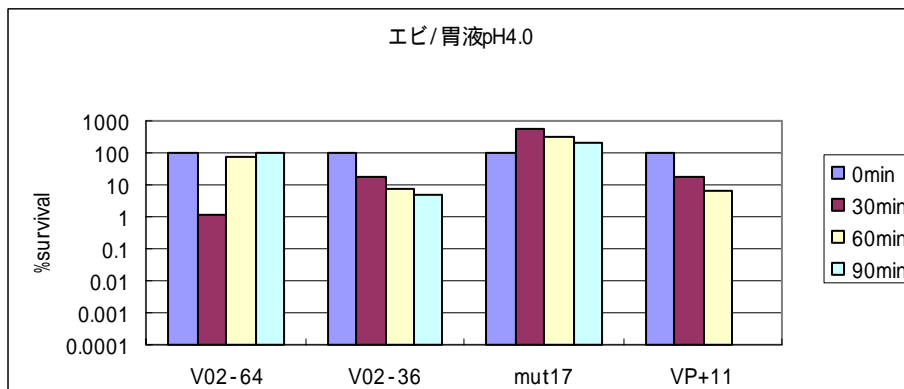
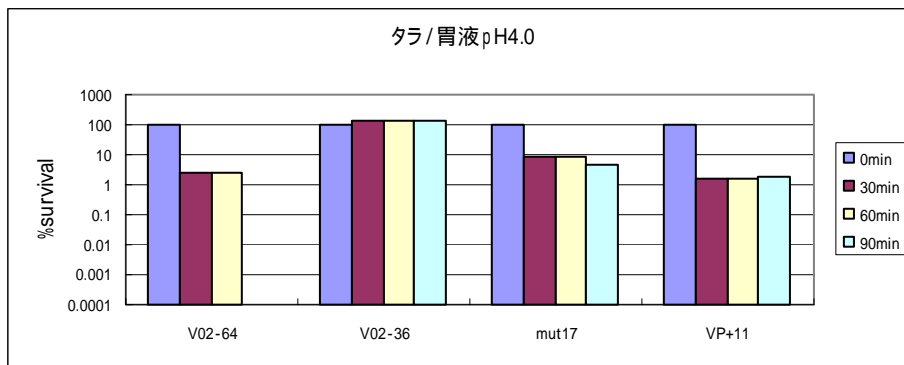


Fig.4-2 各種魚介類に摂取後、人工胃液に暴露した場合における腸炎ビブリオの生残性の差異

Table 1. 実験に用いた魚介類の pH

食品サンプル	pH
ゆでガニ	7.3
タラ	6.8
エビ	7.0
ホタテ	6.2
マグロ	5.8

Table 2. 魚介類を混合後の胃液の pH

	ゆでガニ	タラ	エビ	ホタテ	マグロ
pH2.5	4.4	4.4	3.7	4.4	4.3
pH3.0	5.1	4.7	4.1	5.0	4.7
pH4.0	6.2	5.4	5.0	5.7	5.6

### 3. 要 約

03:K6 株の増殖速度は、最近の非 03:K6 株とほとんど差がなく、03:K6 株に特化した増殖の速さはみられなかったが、過去の非 03:K6 株より早い増殖速度の傾向を示した。この結果より、最近食中毒を起こした菌株は、血清型に関係なく温度管理不備下に放置された場合、過去に食中毒を起こした菌株よりも短時間で食中毒発症菌数にまで増殖する危険性が示された。また、一般的に消費者に広く食されることの多い生食用の 7 魚種（マグロ、ハマチ、イカ、生タコ、ホタテ、煮カニおよび甘エビ）に対して 03:K6 株 の増殖能力を調べた結果、どの菌株、魚介類の鮮度状態においても、軟体類や甲殻類の魚肉で著しく、赤身魚で停滞することが示された。

一方、腸炎ビブリオの感染力（胃酸での生存能力）条件の検討の結果、食品サンプルに接種せず、培養後すぐに胃酸（pH4.0, 3.0, 2.5）に曝した場合は、すべての株で死滅が見られたが、食品サンプルに接種した場合には、その死滅が非常に緩やかになることが確認された。また、胃液中での本菌の挙動は、魚種による違いが反映されることが観察された。特に、白身の魚、貝類、甲殻類、軟体動物類には本菌の耐酸性を高めるデータが得られた。よって、これらの食材において、本菌の食中毒発生リスクが高いことが示唆される。貝類は、中腸腺に細菌やウイルス等が蓄積しやすいということから、本菌の食中毒発生リスクが高いと考えられているが、二次汚染で付着することにより、胃酸通過能力が高まり、感染のリスクが高められる可能性も考えられる。

以上