

＝原 著＝

富山県における市販魚介類および漁港海水の腸炎 ビブリオ菌数の推移と食中毒事例数との相関 (1979～1995, 2008～2012年)

金谷潤一[†]・磯部順子・木全恵子・
清水美和子・佐多徹太郎・綿引正則

(富山県衛生研究所)

(受付: 平成26年1月21日)

(受理: 平成26年3月7日)

Correlation between Levels of *Vibrio parahaemolyticus* Detected in
Seawater from Fishing Ports and in Fishes on the Market and
the Number of Cases of Foodborne Outbreak in Toyama Prefecture
during 1979–1995 and 2008–2012

Jun-ichi KANATANI[†], Junko ISOBE, Keiko KIMATA,
Miwako SHIMIZU, Tetsutaro SATA and Masanori WATAHIKI

(Toyama Institute of Health, 17-1 Nakataikoyama, Imizu, Toyama 939-0363; [†] Corresponding author)

In 1999 and 2001, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan notified the prefectural governors of the guidelines on sanitary controls such as the recommendation on the use of sterilized seawater for washing fishes and the use of refrigerated transport for the prevention of *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning. Therefore, we examined how these national policies have impacted levels of *V. parahaemolyticus* in raw fishes in the market. We investigated the levels of *V. parahaemolyticus* in raw fishes and in seawater in Toyama Prefecture from July to October during 1979–1995 and 2008–2012. The isolation rate and geometric mean±S.D. ($\log_{10}/100$ ml) in *V. parahaemolyticus*-positive samples by the most probable number method from fishes collected during 1979–1995 (66.3%, 2.73 ± 1.27) were significantly higher than in those collected during 2008–2012 (50.6%, 1.89 ± 0.44 ; $p<0.05$). The isolation rate and geometric mean±S.D. ($\log_{10}/100$ ml) of *V. parahaemolyticus*-positive samples from seawater collected during 2008–2012 were 86.9% and 1.07 ± 0.53 , respectively. The gene encoding thermostable direct hemolysin (*tdh*) was detected by PCR in 20.5% of samples examined, and the O3:K6 (*tdh*+) strain was isolated in 2 samples. These results reveal that *V. parahaemolyticus* was ubiquitous in seawater at fishing ports during the warm season. Furthermore, our findings suggest that adherence to the guidelines on sanitary controls has brought about a reduction of cases of *V. parahaemolyticus* food poisoning in recent years.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh* gene, fishes, seawater

緒 言

腸炎ビブリオは汽水域に広く分布し、冬季に少なく夏季に多く検出される細菌である^{1, 6, 15, 16}。なかでもヒトに下痢症を引き起こす耐熱性溶血毒 (thermostable di-

[†] 連絡先

☎ 939-0363 富山県射水市中太閤山17-1

rect hemolysin; TDH) および耐熱性溶血毒類似毒素 (TDH-related hemolysin; TRH) 産生性腸炎ビブリオは、下痢症患者便から分離される一方^{4, 18)}、食品や環境水中からはあまり分離されない¹⁴⁾。

全国の腸炎ビブリオによる食中毒は、1975年には667件報告され、1996年以降には血清型 O3:K6 の本菌による食中毒が多発¹³⁾、1997年には腸炎ビブリオによる食中毒が全体の77%を占めた⁵⁾。1998年にはその発生件数は839件と最も多かったが、その後は徐々に減少し、2012年はわずか9件となった (厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 年次別食中毒発生状況, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>)。富山県においても本菌による食中毒は同様に推移し、2008年以降は発生していない。この減少の一因として、1999年に生食用魚介類および煮カニ等の加熱加工魚介類は4℃以下で低温管理することを周知する厚生労働省からの通知が出されたこと⁹⁾や、2001年に水産食品に係る規格の改正や流通市場内での汚染海水の使用回避による二次汚染防止等に関する通知¹⁰⁾が出されたことが効果的であったと考えられる。富山県においても、これらの改正等を受け、2002年に県内の魚市場9カ所と荷さばき施設3カ所に紫外線海水殺菌装置が導入され、食中毒発症予防に活用されている。しかしながら、これらの通知や取り組みによって、実際に市販されている魚介類に付着している腸炎ビブリオの菌数が減少したのかについてはこれまでに調査されていない。

富山県衛生研究所では、多発する腸炎ビブリオ食中毒の予防に役立てるため、1979~1995年および2008~2012年にかけて、市販魚介類の腸炎ビブリオ菌数を県の魚介類の腸炎ビブリオ調査およびVpマリン事業の一翼を担う形で調査してきた。また2008~2012年には、同様の事業と連動して漁港海水の腸炎ビブリオ菌数、耐熱性溶血毒遺伝子 (*tdh* gene)、*tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 の検出率を調査してきた。

そこで本研究では、これらの調査によって得られた結果を解析し、市販魚介類および漁港海水の腸炎ビブリオ菌数と食中毒発症件数との関連性について、腸炎ビブリオ食中毒予防対策に関連する通知が出された時期を踏まえて考察した。

材料および方法

1. 供試材料

魚介類については、1979~1995年および2008~2012年の6~10月にかけて、富山県内の鮮魚取扱店の地場産魚介類のみを対象とし、1回に3~6魚種ずつ購入した。1979~1995年は1,005検体 (アジ類210検体、キス149検体、フクラギ79検体、カマス類66検体、ハマチ63検体、その他438検体)、2008~2012年は235検体 (アジ類42検体、カマス類18検体、トビウオ18検体、タイ13検体、フクラギ12検体、その他132検体) を購入し、計

1,240検体 (アジ類252検体、キス152検体、フクラギ91検体、カマス類84検体、トビウオ68検体、その他593検体) を調査対象とした。

漁港海水については、2008~2012年の6~10月にかけて、富山県内の主要5漁港の表層海水を採水し、計176検体を調査対象とした。なお、地点Cについては2008~2009年のみ調査を行った。

2. 腸炎ビブリオ菌数の測定

魚介類は、魚体の表皮 (ヒレ、ウロコ、エラなど) 10 gに食塩ポリミキシンプイオン 90 mlを加え1分間手もみし、これを原液とした。腸炎ビブリオ菌数は、食品衛生検査指針^{11, 12)} に準拠した最確数 (most probable number; MPN) 3本法で算定した。すなわち、1~5段目に1倍濃度の食塩ポリミキシンプイオン 10 mlを3本ずつ用意し、1段目には試料 1 mlずつ加えた。2段目以降は試料を10倍段階希釈したものをそれぞれ 1 ml加え、35℃で18~24 hr培養した。それぞれの増菌培養液をTCBS寒天培地 (日水製薬) に塗抹し、35℃で18~24 hr培養した。ただし、腸炎ビブリオ以外の菌が多く発育し、平板培地上で腸炎ビブリオを釣菌できないことが予想されたため、MPNの1段目は1白金耳で2枚の培地を用いて、2枚目の発育菌数が少なくなるよう塗抹した。生育した濃緑色コロニーを釣菌し、3%食塩加TSI培地、3%食塩加LIM培地、無塩ペプトン水、8%食塩ペプトン水、10%食塩ペプトン水で性状を確認した。腸炎ビブリオが検出された試験管の本数からMPN菌数表によって、魚介類100 gあたりの腸炎ビブリオ菌数を求めた。なお、検出限界値は30/100 gとした。

漁港海水はそのまま試料原液として用いた。すなわち、1段目には2倍濃度の食塩ポリミキシンプイオン (日水製薬) 10 mlを3本、2~5段目には1倍濃度の食塩ポリミキシンプイオン 10 mlを3本ずつ用意し、1段目には試料 10 mlずつ、2段目には1 mlずつ加えた。3段目以降は試料を10倍段階希釈したものをそれぞれ 1 ml加え、35℃で18~24 hr培養した。それぞれの増菌培養液を魚介類の場合と同様に検査し、100 ml当たりの腸炎ビブリオ菌数を求めた。検出限界値は3/100 mlとした。

3. *tdh* 遺伝子の検出と *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 の分離

魚介類は、上述の試料原液を35℃で18~24 hr培養した増菌液を用いて *tdh* 遺伝子の検出を行った。漁港海水は、2008~2012年に採水した検体 (1,000 ml) をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過濃縮後、100 mlの3%食塩加 Trypticase Soy Broth (Becton, Dickinson and Company) で37℃、6 hr培養した増菌液を用いた。

増菌液 1 mlを遠心分離 (12,000 rpm, 5 min) した後、沈渣菌体に100 μlの5% (wt/vol) Chelex-100溶液 (Bio-Rad Laboratories) に懸濁し、100℃で10 min加熱し、遠心分離 (12,000×g, 5 min) 後の上清をDNA抽出液とし

Table 1. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* detected in fishes in Toyama Prefecture during 1979–1995 and 2008–2012

Year	Name of fishes	No. of samples:					Geometric mean \pm S.D. ($\log_{10}/100$ g) in <i>V. parahaemolyticus</i> -positive samples
		Analyzed	Positive of <i>V. parahaemolyticus</i> (%)	With MPN*** (/100 g):			
				30–99	100–999	>1,000	
1979–1995	Aji	210	153 (72.9)	30	49	74	2.91 \pm 1.20
	Kisu	149	100 (67.1)	25	23	52	2.93 \pm 1.18
	Fukuragi	79	60 (75.9)	21	27	12	2.39 \pm 0.98
	Kamasu	66	50 (75.8)	6	17	27	3.01 \pm 0.96
	Hamachi	63	40 (63.5)	15	14	11	2.37 \pm 0.96
	Others	438	263 (60.0)	82	86	95	2.66 \pm 1.19
	Total	1,005	666 (66.3)*	179	216	271	2.73 \pm 1.27**
2008–2012	Aji	42	26 (61.9)	17	7	2	1.90 \pm 0.52
	Kamasu	18	12 (66.7)	10	2	0	1.75 \pm 0.25
	Tobiuo	18	11 (61.1)	5	6	0	1.94 \pm 0.33
	Tai	13	7 (53.8)	7	0	0	1.68 \pm 0.18
	Fukuragi	12	7 (58.3)	4	1	2	2.08 \pm 0.66
	Others	132	56 (42.4)	34	21	1	1.91 \pm 0.40
	Total	235	119 (50.6)*	77	37	5	1.89 \pm 0.44**

* $p < 0.05$; χ^2 test** $p < 0.05$; Student's *t* test

***MPN, most probable number

た. *tdh* 遺伝子検出用のプライマーは、伊藤ら³⁾が報告したプライマー TDF-1 (5'-AGCTTCCATCTGTCCTTTT-3')およびTDF-2 (5'-ATTACCACTACC ACTCTCATA-3')を用いた (増幅産物: 434 bp). PCR 反応は95°C 5分の熱変性の後、94°C, 54°C, 72°C各1 minを30サイクルで行った. PCR反応液は、2%アガロースゲルを用いて1×TBE bufferで100 V, 30 min電気泳動後、臭化エチジウム染色を行い、紫外線照射下で写真撮影し増幅産物の有無を確認した. PCRによる増幅産物が検出された検体については、既報⁷⁾に従って*tdh*保有腸炎ビブリオ O3:K6の分離を行った.

結 果

1. 魚介類における腸炎ビブリオ検出率と菌数

1979～1995年および2008～2012年の22年間における結果をTable 1に示した. 22年間における魚介類の腸炎ビブリオ検出率は63.3% (785/1,240検体)であった. 魚介類における腸炎ビブリオ検出率について、魚介類の取り扱いに殺菌海水の使用を推奨する通知が出た2001年以前と以後のデータを比較すると、1979～1995年の魚介類における腸炎ビブリオ検出率は66.3% (666/1,005検体)であったが、2008～2012年の検出率は50.6% (119/235検体)となり、2008～2012年の値のほうが有意に低かった ($p < 0.05$; χ^2 test). 各年代の主要5魚種を見ると、1979～1995年はフクラギの検出率が75.9% (60/79検体)と最も高く、ハマチの検出率が63.5% (40/63検体)と最も低かった. 一方で、2008～2012年はカマス類の検出率が66.7% (12/18検体)と最も高く、タイの検出率が53.8% (7/13検体)と最も低かった. 魚

種によってばらつきがあったが、どちらの年代においても検体数の多かった3魚種 (アジ類、フクラギおよびカマス類) について見ると、アジ類は1979～1995年が72.9%で2008～2012年が61.9%、フクラギは75.9%と58.3%、カマス類は75.8%と66.7%となり、3魚種すべてにおいて2008～2012年の検出率のほうが低かった. 陽性検体における幾何平均菌数について見ると、1979～1995年は2.73 \pm 1.27であったが、2008～2012年は1.89 \pm 0.44となり、有意に低かった ($p < 0.05$; Student's *t* test). 幾何平均菌数は魚種に関係なく、2008～2012年の値のほうが低い値であった. 今回の調査では、各魚種を購入し、検査した月 (平均気温) に偏りはなかった.

魚介類の腸炎ビブリオ菌数の変動を年次ごとに示した (Fig. 1). 1995年以前を見ると、富山県内における腸炎ビブリオの食中毒が発生しなかった1982年と1992年は、魚介類における腸炎ビブリオの検出率は39.4%と45.0%と、他の年と比較して最も低い二つの値であった. また、魚介類の腸炎ビブリオ菌数が1,000/100 gを超えた検体の割合についても、1982年は4.5%、1992年は7.5%であり最も低い二つの値であった. しかしながら、陽性検体における幾何平均菌数 ($\log_{10}/100$ g) は2.20 (1982年)、2.22 (1992年) となり、他の年と同様の値であった. 2008年以降を見ると、富山県内で腸炎ビブリオの食中毒は発生していない. この5年間における魚介類の腸炎ビブリオ菌数が1,000/100 gを超えた検体の割合は平均2.2%であり、1979～1995年における平均の割合 (24.8%) と比べ低い値で推移していた.

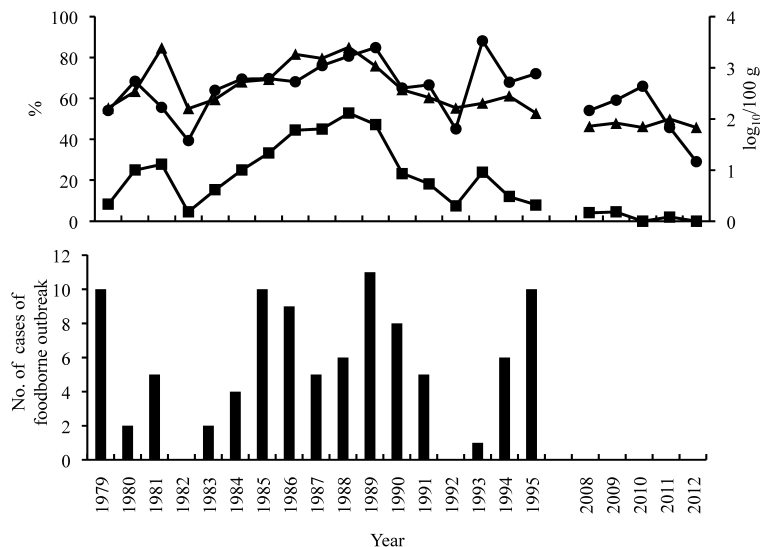


Fig. 1. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* detected from fishes and the number of foodborne outbreak in Toyama Prefecture. Each line indicates isolation rate of *V. parahaemolyticus* from fishes (●), rate of fish samples in which *V. parahaemolyticus* was detected more than 1,000/100 g (■), and geometric mean ± S.D. (log₁₀/100 g) in *V. parahaemolyticus*-positive fish samples (▲), respectively. Each bar indicates the number of outbreak incidence.

Table 2. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* detected in fishes according to mean atmospheric temperature

Year	Mean temperature (°C)	No. of samples:		Geometric mean ± S.D. (log ₁₀ /100 g) in <i>V. parahaemolyticus</i> -positive samples
		Analyzed	Positive of <i>V. parahaemolyticus</i> (%)	
1979-1995	>25	253	179 (70.8)	2.95 ± 1.23]**]**
	20-25	519	351 (67.6)	
	<20	233	136 (58.4)	
2008-2012	>25	118	60 (49.2)	1.92 ± 0.42
	20-25	87	44 (49.4)	1.81 ± 0.35
	<20	30	12 (60.0)	1.97 ± 0.44

* $p < 0.05$; χ^2 test
 ** $p < 0.05$; Student's *t* test

2. 魚介類における腸炎ビブリオ検出率および菌数と平均気温との相関

平均気温別の魚介類における腸炎ビブリオ検出率と陽性検体における幾何平均菌数を、1979～1995年と2008～2012年に分けてデータを比較した (Table 2). 1979～1995年では、平均気温が20℃未満のときは58.4%, 20～25℃のときは67.6%, 25℃より高いときは70.8%と、平均気温が高くなるにつれて陽性率も高くなった. 20℃未満と20～25℃, 20℃未満と25℃より高いときではそれぞれ有意差があった ($p < 0.05$; χ^2 test). 陽性検体における幾何平均菌数 (log₁₀/100 g) は、平均気温が20℃未満のときは2.48 ± 0.98, 20～25℃のときは2.73 ± 1.17, 25℃より高いときは2.95 ± 1.23と、気温が高くなるにつれて有意に高くなった ($p < 0.05$; Student's *t* test). 一方、2008～2012年においては、平均気温と陽性率、幾何平均菌数のいずれも有意な差は見られなかった.

3. 魚介類における *tdh* 遺伝子の検出

2008～2011年の4年間に購入した187検体について、試料原液の培養液から *tdh* 遺伝子の検出を行った結果、すべての検体が陰性であった.

4. 漁港海水における腸炎ビブリオ菌数、*tdh* 遺伝子の検出および *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3 : K6 の分離

2008～2012年に富山県内の漁港海水から腸炎ビブリオの検出を行った結果、5年間の検出率は86.9% (153/176検体) であり、陽性検体における幾何平均菌数 (log₁₀/100 g) は1.07 ± 0.53であった (Table 3). 菌数別に見ると、3～10/100 mlが40.9% (82/176検体), 10～99/100 mlが44.3% (78/176検体), 100～999/100 mlが7.4% (13/176検体) であった. 漁港海水の20.5% (36/176検体) から *tdh* 遺伝子が検出され、そのうち2検体から *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3 : K6 が分離された. 年次ごとに検出率や菌数の差は見られなかった.

Table 3. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh* gene, and O3:K6 (*tdh*+) strain detected in seawater at fishing ports in Toyama Prefecture during 2008–2012

Year	Analyzed	No. of samples:					Positive for <i>tdh</i> gene	Positive of <i>tdh</i> -coding <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 (%)	Geometric mean ± S.D. ($\log_{10}/100$ ml) in <i>V. parahaemolyticus</i> -positive samples
		Positive of <i>V. parahaemolyticus</i> (%)	With MPN* (/100 g):						
			3-10	11-99	100-999				
2008	40	34 (85.0)	12	17	5	11 (27.5)	0	1.30 ± 0.56	
2009	40	35 (87.5)	13	18	4	5 (12.5)	1 (2.5)	1.12 ± 0.58	
2010	32	28 (87.5)	12	14	2	8 (25)	1 (3.1)	1.12 ± 0.47	
2011	32	27 (84.4)	19	18	0	4 (12.5)	0	0.79 ± 0.33	
2012	32	29 (90.6)	16	11	2	8 (25)	0	1.07 ± 0.46	
Total	176	153 (86.9)	72	78	13	36 (20.5)	2 (1.1)	1.07 ± 0.53	

*MPN, most probable number

Table 4. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh* gene, and O3:K6 (*tdh*+) strain detected in seawater at fishing ports according to mean atmospheric temperature

Mean temp. (°C)	Analyzed	No. of samples:					Positive for <i>tdh</i> gene (%)	Positive of <i>tdh</i> -coding <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 (%)	Geometric mean ± S.D. ($\log_{10}/100$ ml) in <i>V. parahaemolyticus</i> -positive samples
		Positive of <i>V. parahaemolyticus</i> (%)	With MPN** (/100 g):						
			3-10	11-99	100-999				
≥25	86	78 (90.7)	34	39	5	24 (27.9)	2 (1.1)	1.10 ± 0.50	
<25	90	75 (83.3)	38	29	8	12 (13.3)]*	0	1.04 ± 0.56	

* $p < 0.05$; χ^2 test

**MPN, most probable number

平均気温が25℃以上のときと25℃未満のときに分け、腸炎ビブリオの検出率や陽性検体における幾何平均菌数に有意な差はなかった (Table 4)。しかしながら、海水中の *tdh* 遺伝子検出率は、平均気温が25℃未満のときは13.3% (12/90検体) であったのに対し、25℃以上のときは27.9% (24/86検体) と有意に高かった ($p < 0.05$; χ^2 test)。 *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 が分離された2検体は、いずれも平均気温が25℃以上のときに採水された検体であった。

考 察

2008～2012年の5年間において、富山県内の漁港海水の9割近くの検体から腸炎ビブリオが検出された。過去の調査で、漁港の港内の腸炎ビブリオ菌数は港口と比べ高いことがわかっている⁸⁾。漁港では、水揚げした魚のうち不要なものは漁港内へ捨てられることがしばしばあり、実際に底泥から魚の鱗も多く得られている。また、漁港内の腸炎ビブリオ菌数は表層水より低層水の菌数が多かったことから、漁港の底の有機物が本菌の増殖の原因となり、漁港海水の腸炎ビブリオ菌数増加の原因となっている可能性がある。腸炎ビブリオは海水温の低い冬季には海水中から検出されないが、海水温が17℃以上に上昇すると検出されるようになると報告されている¹⁴⁾。今回の調査では、平均気温と漁港海水の腸炎ビブリオの検出率、菌数に有意な差はなかったが、本調査は6

月下旬から10月上旬にかけて行われており、17℃以下の時期にほとんど調査していない。一方、われわれの過去の調査において、腸炎ビブリオ食中毒発生予防に関連する通知が出された2001年以前 (1996～2001年) と以後 (2002～2009年) の漁港海水における腸炎ビブリオ菌数は、減少傾向は見られたものの、有意な差はなかった²⁾。したがって、夏季の漁港海水には年代にかかわらず腸炎ビブリオが常在していると考えられた。

一方、1979～1995年および2008～2012年の22年間にわたり、魚介類の腸炎ビブリオ菌数を調査した結果、2008～2012年の5年間における腸炎ビブリオの検出率、菌数は、腸炎ビブリオ食中毒予防対策に関連した通知が出された1995年以前のそれと比較して有意に低かった。さらには、魚介類における腸炎ビブリオの検出率と菌数は、1995年以前の調査では平均気温が高くなるにつれて有意に高かったのに対し、2008～2012年の5年間は平均気温との間に差は認められなかった。工藤らの調査では、腸炎ビブリオによる食中毒が多発した流行時の株と同じ遺伝子型の株が近年も感染を引き起こしていることや、O3:K6だけでなくほかの血清型による食中毒も減少していることから、O3:K6の流行が終わったためではなく、食中毒を抑制する要因が食中毒発生を減少させていると報告している¹⁷⁾。したがって、上述した魚介類と漁港海水の調査結果は、魚介類の腸炎ビブリオによる汚染は、魚介類の洗浄に使用された漁港海水によるとこ

ろが大きいことを示している。また、漁港海水は併設されている魚市場の使用海水として、魚介類の洗浄以外に、せり場の床・魚箱の洗浄、いけす用の海水、冷凍魚の解凍等にも使われており、これらの場所から魚介類の腸炎ビブリオによる汚染が広がる可能性もある。すなわち、過去の本菌による食中毒は腸炎ビブリオに汚染された漁港海水を使用していたことが主な原因の一つと考えられる。したがってわれわれのデータは、腸炎ビブリオ食中毒発生予防に関連する通知等が本菌による食中毒の減少に大きく貢献したことを補完する。ただし、近年の調査においても魚介類の約5割から腸炎ビブリオが検出されたことから、本菌による食中毒がほとんど発生していない現在の状況は、県内の魚市場と荷さばき施設に紫外線海水殺菌装置が導入され、食中毒発生予防に活用されていることに加え、流通過程における低温での保存・輸送、調理施設での衛生管理等が広く認識され、徹底されていることも一因であろう。

今回の調査では、市販魚介類の6割以上の検体から腸炎ビブリオが検出された。検出率が最も高かったのはカマス類であったが、菌数はキスが最も高く、魚種によって検出率および菌数にばらつきが見られた。しかしながら、魚介類を購入し、検査した月（平均気温）や年代に偏りは見られず、今回の調査で魚種ごとの検出率や菌数に差が見られた理由は不明であるが、そのメカニズム等には興味を持たれる。

漁港海水の約2割から *tdh* 遺伝子が検出されたが、*tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 を分離できたのは全体の1.1% (2検体) であった。漁港海水から *tdh* 遺伝子は検出されるが *tdh* 保有腸炎ビブリオがあまり分離できない理由として、他の雑菌と競合して培養液中で増殖できない、死菌の遺伝子を検出している、Viable but Non-Culturable の状態であることなどが考えられる。今回の調査結果では、平均気温が高くなると *tdh* 遺伝子の検出率が有意に高くなった。夏季は腸炎ビブリオ菌数が増えるため、検体1,000 mlあたりに *tdh* 保有腸炎ビブリオが含まれる可能性も増えているのかもしれない。今回の調査結果では、魚介類から *tdh* 遺伝子は検出されなかったが、魚介類から *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 が分離された報告もあることから¹⁹⁾、魚介類の洗浄の際に腸炎ビブリオに汚染された漁港海水を使用することは、*tdh* 保有腸炎ビブリオを付着させるリスクがある。

本研究によって、夏季の漁港海水には依然として TDH 産生性を含む腸炎ビブリオが広く分布しているが、近年魚介類の洗浄における殺菌海水の導入や低温輸送などの衛生管理によって、魚介類の腸炎ビブリオ菌数および検出率は減少し、結果として腸炎ビブリオによる食中毒を減少させることができていると考えられた。今回の結果は、長期間にわたり環境中における病原細菌の動態を明らかにすることは、食中毒対策につながる有益なデータを提供できる可能性を示している。

要 約

本研究では、1999年および2001年に出された腸炎ビブリオ食中毒発生予防に関連する通知が市販魚介類の腸炎ビブリオ菌数に与えた影響を調査するため、1979～1995年および2008～2012年にかけて市販魚介類の腸炎ビブリオ菌数を、2008～2012年には漁港海水の腸炎ビブリオ菌数、*thermostable direct hemolysin (tdh) gene*, *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 の検出率を調査した。その結果、1979～1995年の魚介類における腸炎ビブリオ検出率は66.3% (666/1,005検体)、幾何平均菌数±SD ($\log_{10}/100$ g) は 2.73 ± 1.27 であったが、2008～2012年は50.6% (119/235検体) および 1.89 ± 0.44 であり、有意に低くなった ($p < 0.05$; Student's *t* test)。また、1979～1995年は平均気温が20℃未満のときは58.4%および 2.48 ± 0.98 、20～25℃のときは67.6%および 2.73 ± 1.17 、25℃より高いときは70.8%および 2.95 ± 1.23 と、平均気温が高くなるにつれて高くなった。一方2008～2012年においては、平均気温と陽性率、幾何平均菌数のいずれも有意な差は見られなかった。漁港海水の腸炎ビブリオ検出率は86.9% (153/176検体) であり、幾何平均菌数は 1.07 ± 0.53 であった。そのうち20.5% (36/176検体) から *tdh* 遺伝子が検出され、2検体から *tdh* 保有腸炎ビブリオ O3:K6 が分離された。本研究によって、夏季の漁港海水には依然として TDH 産生性を含む腸炎ビブリオが広く分布しているが、魚介類の洗浄における殺菌海水の導入や低温輸送などの衛生管理によって、近年の魚介類の腸炎ビブリオ菌数および検出率は減少し、結果として腸炎ビブリオによる食中毒を減少させることができていると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、富山県厚生部生活衛生課、各厚生センターおよび富山市保健所の関係各位のご協力をいただいたことに深謝いたします。また、富山県衛生研究所細菌部で本調査に参加された刑部陽宅氏、細呂木志保氏、嶋 智子氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 赤羽莊資: 腸炎ビブリオ, その他のビブリオ. 日食微誌, **6**, 51-65 (1989).
- 2) 磯部順子: 富山県における腸炎ビブリオ対策—TDH産生性腸炎ビブリオの生態と食中毒—. 腸炎ビブリオ 第IV集. 篠田純男, 甲斐明美, 山本重雄, 土屋友房, 西沢光昭, 荒川英二, 飯田哲也編, p. 220-226. 近代出版, 東京(2013).
- 3) 伊藤文明, 吉野谷 進, 平野千春, 山岡弘二, 松石武昭, 荻野武雄, 島田俊雄, 伊藤健一郎, 渡辺治雄: 遺伝子増幅法を用いた腸炎ビブリオ *tdh* 遺伝子検出法の検討. 臨床と微生物, **20**, 208 (1993).
- 4) Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T.,

- Takeda, Y., et al.: Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from south-east Asian travellers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 3150-3155 (1997).
- 5) 尾畑浩魅, 甲斐明美, 柳川義勢, 諸角 聖: 東京都内における下痢症由来腸炎ビブリオ血清型O3:K6の出現状況. *病原微生物検出情報*, **20**, 163-164 (1999).
 - 6) 刑部陽宅, 山崎茂一, 児玉博英: 富山湾沿岸における腸炎ビブリオの生態と食中毒について. *日本公衛誌*, **20**, 6773-676 (1973).
 - 7) 刑部陽宅, 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 北村敬: 免疫磁気ビーズによる海水からの耐熱性溶血毒産生性腸炎ビブリオO3:K6の分離. *日食微誌*, **17**, 5-10 (2000).
 - 8) 刑部陽宅, 細呂木志保, 田中大祐, 清水美和子, 磯部順子, 永井美之: 漁港における腸炎ビブリオの分布. *日食微誌*, **19**, 113-117 (2002).
 - 9) 厚生省生活衛生局食品保健課長/乳肉衛生課長: 魚介類による腸炎ビブリオ食中毒の発生防止の徹底について. 平成11年8月19日, 衛食第115号/衛乳第169号 (1999).
 - 10) 厚生労働省医薬局食品保健部長: 食品衛生法施行及び食品, 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).
 - 11) 厚生労働省監修: MPN値の算定法. *食品衛生検査指針微生物編*. p.135-137, 日本食品衛生協会, 東京 (2004).
 - 12) 厚生労働省監修: 腸炎ビブリオおよびその類縁菌. *食品衛生検査指針 微生物編*. p.201-224, 日本食品衛生協会, 東京 (2004).
 - 13) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課: 〈特集〉腸炎ビブリオ1996~1998. *病原微生物検出情報*, **20**, 1-2 (1999).
 - 14) 小沼博隆: 腸炎ビブリオ. HACCP: 衛生管理計画の作成と実践 改訂データ編. 熊谷 進, 小久保弥太郎, 小沼博隆, 豊田正武編, p.45-54, 中央法規出版, 東京 (2003).
 - 15) 西尾隆昌, 貴田正義, 下内啓万: 腸炎ビブリオの生態学的研究. 1. 海水および海底泥土における分布. *広島大学医学雑誌*, **15**, 615-618 (1967).
 - 16) 細呂木志保, 田中大祐, 磯部順子, 刑部陽宅, 北村敬: 漁港の海水・海泥における腸炎ビブリオ実態調査(富山県Vpマリン実態調査事業)について. *食品衛生研究*, **50**, 91-95 (2000).
 - 17) Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., et al.: Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, **157**, 95-101 (2012).
 - 18) Honda, T., Ni, Y. and Miwatani T.: Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, **56**, 961-965 (1988).
 - 19) 八柳 潤, 斎藤志保子: 腸炎ビブリオ (O3:K6) のパルスフィールドゲル電気泳動による解析. *日食微誌*, **17**, 107-108 (2000).