

腸炎ビブリオ, ビブリオ・バルニフィカスの酸性条件での安定性

Stability of *Vibrio parahaemolyticus* and *V.vulnificus* in Acid Condition

渡邊 節 名村 真由美*¹ 川野 みち
齋藤 紀行

Setsu WATANABE, Mayumi NAMURA, Michi KAWANO,
Noriyuki SAITO

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*: Vp) 及びビブリオ・バルニフィカス (*V.vulnificus*: Vv) は、食中毒や感染症の原因となるビブリオ属菌である。今回、Vp, Vvを各温度及び各pHの条件下で培養し、経時的にコロニー形成による発育性を検討した結果、低温及び低pHで生菌数が低下することが確認された。このことから、Vp, Vvで汚染された食品を低温あるいは低pHにすることが食中毒発生防止対策に有効であると考えられた。また、Vp, VvをpH 5～6の弱酸性下で継続して培養すると菌株の生化学的性状及び病因因子保有の変化はないが、菌の形態及び培地発育が非典型的となることから、このような状態の菌分離には検査手法の改善が示唆された。

キーワード：ビブリオ属菌；低温；低pH；グルコース・ペプトン培地

Keywords : *Vibrio* ; low temperature ; lowpH ; glucose-pepton broth

1 はじめに

Vp, Vvは食中毒や感染症の原因となるビブリオ属菌である。Vpは沿岸水域に生息しており夏季に著しく増殖し、魚介類を介して発生する我が国の食中毒の代表的な原因菌である。VvはVp同様魚介類の摂食により感染し、軽症の場合嘔吐や下痢の食中毒症状を呈するが、重篤な場合急激な壊死性筋膜炎から敗血症に陥る、死亡率の高い感染症の原因菌である。特にVp食中毒は例年発生が多く、国では食品の安全性確保のため生食用鮮魚介類等の検査方法を示し、成分規格等を定めている¹⁾。

今回、我々は国で示している低温保管や魚介類の水道水による洗浄の有効性を検証するため、中温から低温での温度発育性、各種培地及び蒸留水での発育性について検討した。低温及び蒸留水ではVp, Vvの菌数減少が確認され、さらに自家調整したグルコース・ペプトン (GP) 培地でVp, Vvを培養した場合、一過性の増加後急激に菌の減少、形態変化を起こすことが示された。この変化の要因として培地pHの急激な酸性化が考えられた。この現象の詳細な解析が食中毒発生予防施策に有効な資料となると思われるので報告する。

2 材 料

2.1 供 試 菌

患者由来耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin

gene : tdh) 産生Vp株 (Vp379)、食品由来tdh非産生菌Vp株 (VpS61)、食品由来Vv 2株 (Vv212, Vv224)、対照として食品由来の大腸菌 1株 (Ec) を用いた。

2.2 培 地

発育試験としてアルカリペプトン水 (APW)、ハートインフュージョン (HI) ブイヨン、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、GP培地、pH培地 (pH4, 5, 6, 7及び8)、蒸留水 (distilled water:DW) を用いた。GP培地はグルコース 4%、ペプトン 1%、食塩 1%の割合に加え、pHを8.2に調整した。この培地は菌の発育に伴ってpHが低下する培地である。一方、pH培地はリン酸緩衝液でpHを4, 5, 6, 7及び8に調整し、これにペプトン 1%食塩 1%を加えた培地で、菌の発育によりpHが変動しない培地である。菌数測定用として、TCBS寒天培地 (TCBS)、普通寒天培地 (NA) 及びクロモアガービブリオ (CV) を用いた。

3 方 法

Vp及びVvはAPWに、大腸菌はトリプトソイブイヨン (TSB) に1白金耳をそれぞれ接種し、37°C 24時間培養したものを菌原液とした。

3.1 温度安定性試験

各供試菌原液を10⁵cfu/mlになるよう調整し、Vp及びVvは10mlのAPW、大腸菌はTSBに各100μlずつ添加し、5, 15, 25°Cの各温度で培養した。培養1, 2, 3, 7日目の培養液から適量を採り、10段階希釈したものをVp及び

* 1 現 宮城県がんセンター

VvはTCBS 2枚に、大腸菌はNA 2枚に接種し、培養翌日に出現コロニーを計測し菌数を求めた。また、-30°Cでの安定性は保存1週間毎に菌数を測定した。

3.2 培地発育試験

APW, HI, PBS, GP, 各pH培地及びDWが各10ml入った試験管に 10^6 cfu/mlに調整した各菌液 100μ lを添加し、25°Cで培養し、温度安定性試験と同様に経時的に菌数を測定した。

3.3 形態観察と性状検査

GP及びpH培地で培養した菌液を経時的に採取し、スライドグラスに塗抹乾燥固定後、フクシンで染色し、鏡検により形態を観察した。また、各培養時期に各培地で分離した菌株をTSI寒天培地、LIM培地及び0, 3, 8, 10%食塩加Nutrient brothを用いて性状を確認した。さらにPCR法を用いてVpのtdh遺伝子及びVvの特異溶血毒遺伝子(VVh)を確認した。

4 結果

4.1 各温度での発育

Vp, Vv及び大腸菌を5, 15, 25°Cで培養し、1, 2, 3, 7日目にビブリオ属菌はTCBSで大腸菌はNAで菌数測定した結果を図1に示した。培養温度が5°C培養の場合、大腸菌が1日目から生菌数が減少したが7日目まで 10^3 cfu/mlオーダーであったのに対し、Vpは3日目まで 10^2 cfu/mlオーダーとなり7日目では検出されなかった。

VvもばらつきはあるがVpと同様の推移であった。15及び25°C培養での発育は、Vpや大腸菌は良好な発育を示し2日目で 10^8 cfu/mlオーダーに達し7日目でもその菌量を検出した。しかし、VvはVpと比較すると増殖が弱く菌数差は15°Cで1/5倍、25°Cで1/15倍であった。

一方-30°Cで保存した場合、結果を図、表には示さないが、大腸菌が2週間目600cfu/ml、3週間目80cfu/mlの生菌数が検出されたのに対し、ビブリオ属菌で検出されたものはなく低温で死滅することが確認できた。

4.2 各培地での発育

10^6 cfu/mlに調整したVp, VvをAPW, HI, PBS, GP培地, DWの各培地等に接種し37°Cで培養し、Vp, VvはTCBS, 大腸菌はNAを用いて菌数測定を行った。APW, HI, PBS, DWでの発育を図2に示した。APW, HIでの菌の発育は良好で、1日目で 10^9 cfu/mlに増加し7日目でも多数の菌が検出されが、PBS, DWでは各菌とも1~2日で検出されなくなった。GP培地での発育を図3に示した。即ち、大腸菌は1日目で 10^8 cfu/mlに増加し3日目まで菌量を保持した。しかし、 10^6 cfu/ml濃度のVp, Vvは培養1日目で $10^9 \sim 10^8$ cfu/mlに増加したがその後減少し、7日目ではVp3791株だけが 10^2 オーダー検出されたが他のVpS61, Vv212, Vv224はTCBSで検出されなかった。

GP培地での各菌株の発育について接種菌数を増やし24時間まで経時的に観察した結果を図4に示した。菌数を 10^5 cfu/mlに調整し接種したVpは3時間後やや増加す

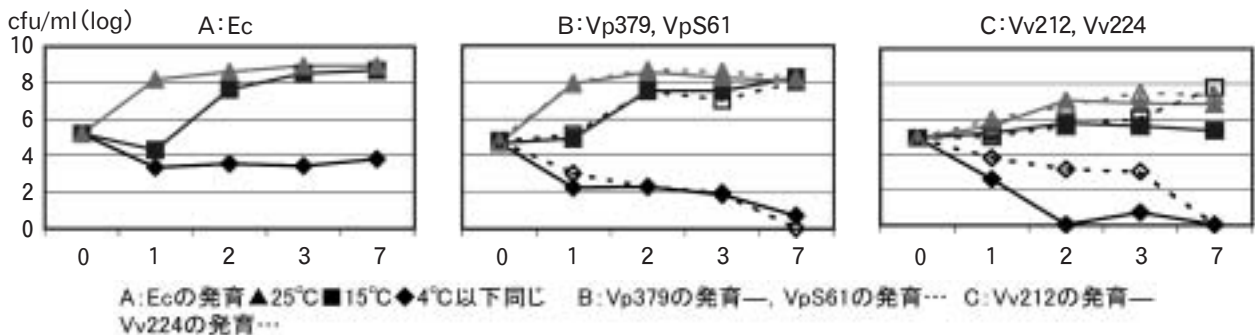


図1 各菌の温度別発育

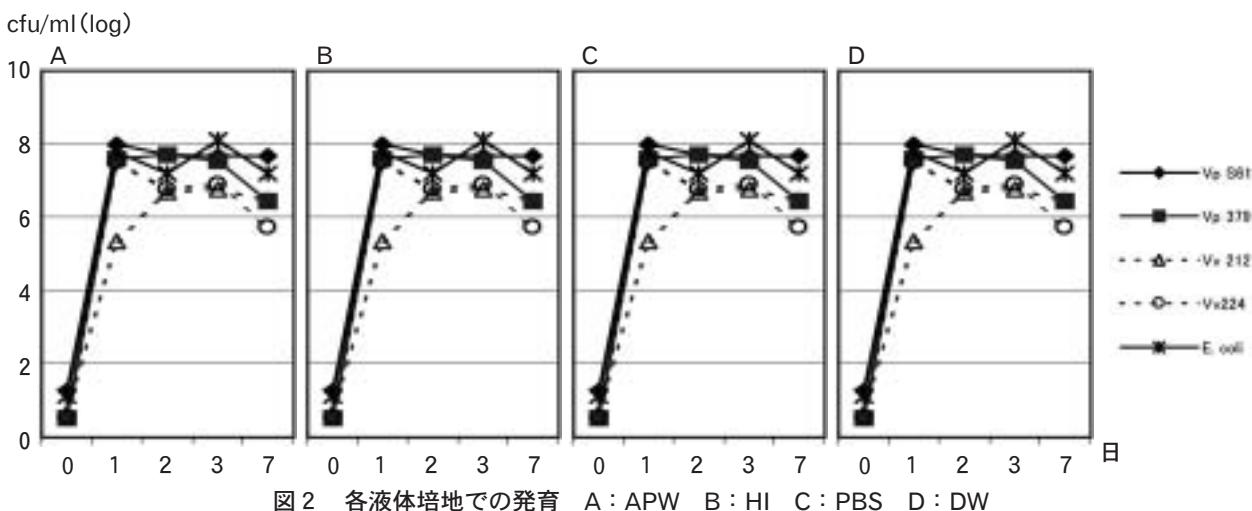


図2 各液体培地での発育 A: APW B: HI C: PBS D: DW

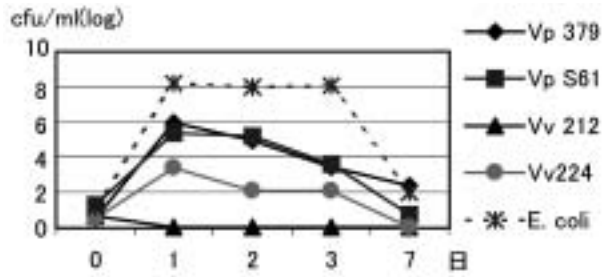
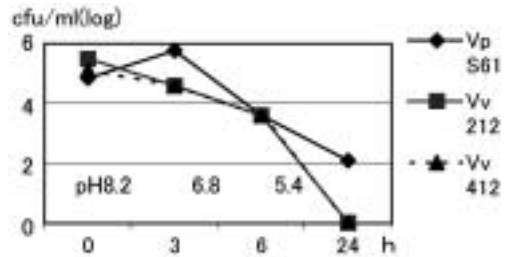


図3 各菌のGP培地の発育



VpS61だけ3時間後に一過性に増加するがビブリオ属菌はpHの低下とともに急激に減少する

図4 GP培地の発育及びpH推移

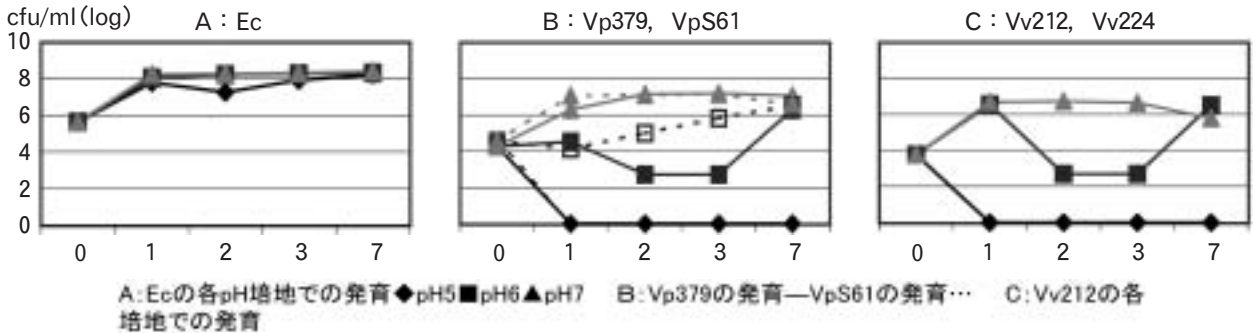


図5 pH培地の発育

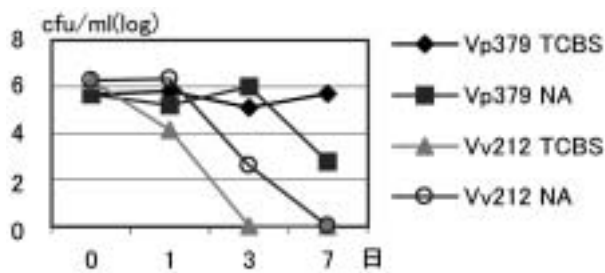
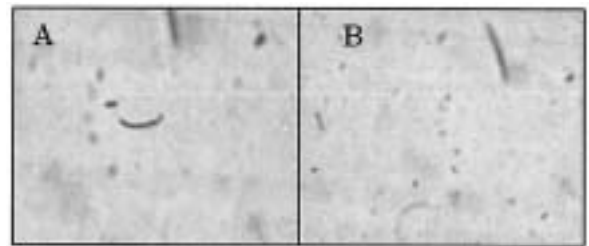


図6 GP培地でのTCBS及びNAの発育性



A : APW培養1日目のVp, B : GP培養7日目のVp

図7 Vpの形態変化

るが、6時間後には 10^3 cfu/mlとなり、24時間後にはVpで 10^2 cfu/mlに減少した。Vvは培養と共に激減し24時間後には検出されなかった。培地のpHは培養当初8.2であったが、3時間後Vp, Vv共に6.8に、6時間以降は5.4となった。

4.3 各pH培地での発育

GP培地でのVp, Vvの急激な菌減少は培地のpH変化によると考え、菌の発育によりpH変化が起きないpH培地を作成し、Vp, Vv及び大腸菌の各pHでの発育を経時的に測定した。Vp, VvはTCBS, 大腸菌はNAを用いて菌数測定し、pH5, 6及び7の結果を図5に示した。pH7培地ではVp, Vv共に発育は良好であったが、pH5では急激に減少し検出されなかった。pH6では一旦減少した後、再度増加する挙動を示した。このことからVp, Vvの発育にpHが影響を与えていることが確認された。

4.4 異なる培地での菌発現

Vp379とVv212をGP培地で培養し、経時的にNAとTCBSの2培地上での菌発育を比較した結果を図6に示す。GP培地やpH6培地で培養を継続すると3日目以降

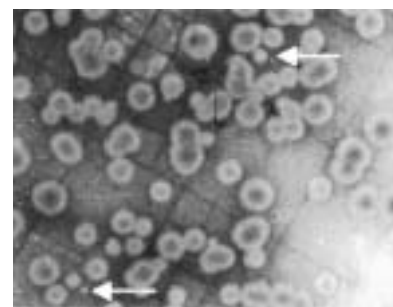


図8 TCBS培地上のVpコロニー：←は変性コロニー

TCBS上に典型的なコロニーと共に小さいコロニーや淡緑色コロニーが出現したが、これらのコロニーも計測に含めた。一般的にNAとTCBSでのビブリオ属菌のコロニー出現に差が生じるが、NAがTCBSの10倍以上となることはない。しかしVpでGP培地7日目で、Vvでは1日目から明確な菌数差が認められた。

4.5 菌の形態及び生化学的性状への影響

ビブリオ属菌をGP培地で継続培養し、これをNAとTCBSで菌数を計測すると $10^2 \sim 10^3$ 倍の差が生じ、さらに

TCBS培地上ではビブリオ属菌特有の乳糖非分解の青色の大きなコロニーと淡緑色の微小コロニーの2種類が出現した。CV培地上でも同様で、Vp特有の中心部が藤色で周辺が白い大きなコロニーと白い小さなコロニーの2種類が出現した。ともに培養日数が経過すると典型的なコロニーは減少し、微小コロニーの割合が増加した。

培養した各時期の菌をフクシン染色し形態観察した。VpのAPW培養とGP培養7日目の形態を図7に示した。GP培養当初は典型的な短桿菌であったが(A)、GP培地培養3日目になると菌体は細く短くなり、7日目になると球状菌で占められ(B)、培養日数が経過するに従って典型的な桿菌は減少した。Vvも同様の傾向を示し、7日目の培養液中に球状菌が多数観察されるにもかかわらず、NA、TCBSで菌は検出されなかった。

NA、TCBS及びCVで典型的な性状を示さなかったVp、Vvのコロニーを釣菌し、それぞれについて生化学的性状試験を行ったがいずれも典型的な生化学的性状を示し、しかも病因因子であるtdh遺伝子やVvh遺伝子が検出された。図8にGP培地でVpを3日培養しTCBSに塗抹し出現したコロニーを示した。

5 考 察

Vpによる食中毒は毎年全国で約300件発生しており、その発生防止対策は急務である。国は平成13年、魚介類の浄化、10℃以下の低温管理、食品の70℃1分以上の加熱等を示し、食品の成分規格を設けた。しかし、これらの対策をとってもなおVpによる食中毒が発生していることから更なる食中毒予防対策が求められている。

本県で平成11年から実施した腸炎ビブリオ生息実態調査の結果、Vpは県内の海水、海泥中に5～8ヶ月間継続して検出され、特に海水温が20℃を超える5～9月に高率に検出された²⁾。Vvも同様に菌数は少ないが7～9月に検出された³⁾。

一般にビブリオ属菌は5℃以下あるいは塩類を含まない条件下では発育せず、魚介類の低温流通、魚介類表面を水道水等で洗浄することがVp食中毒予防として有効であるとされている⁴⁾⁵⁾。Vp、Vvについて、培養温度、各種培地や蒸留水での発育性を検証した結果、Vp、Vvは低温では発育せず菌が減少し、蒸留水でも急激な菌の減少が認められ前述のことが確認できた。

この検証実験において、Vp、Vvがグルコースを含むGP培地で異常な発育を示した原因は、菌培養当初の培地pHが8.2であったのが24時間後には5.4と急激なpHの低下が認められたことから、培地pH変化によるものと考えられた。そこで、pHが4～8の各培地を作成しそれぞれでの発育を検討した。その結果、pH5以下では菌の発育が抑制され急速に菌が減少することが明らかになった。一般にビブリオ属菌は好塩性であり、APW、HIで発育が良好である。これらの培地の主成分はペプトンで、菌発育に伴って分解されるとアミン類やアンモニア等が産生さ

れ、培地はアルカリ性に傾く。しかし、本実験で使用したGP培地にはグルコースが4%と多量に添加され、これが分解されると有機酸が産生され、培地は酸性となる。Vp、VvがGP培地で不安定な挙動を示したのは、前述のとおり菌の発育に伴う培地の酸性化によるものであると推察された。以上のことは、Vp、Vvは酸性の条件で発育が抑制されることを示し、このことを活用しビブリオ属菌による食中毒発生を防止できる可能性を示唆している。

一方、pH6の弱酸性の培地で菌は直ちに死滅せず、発現型に変化を起こしながら生存していることが明らかになった。すなわち、弱酸性処理を受けた菌は、生化学性状や病原因子を維持したまま形態が桿菌から球状へ変化したり、平板培地でのコロニーの形状変化、すなわち発育性の変化を起こすことが明らかになった。これは、酸に対する菌側の防御作用の一つとして形態変化が起こったものと考えられ⁶⁾、その結果、発育阻害物質のないNAには発育するものの、発育阻害物質を含むTCBSやCVなどの培地には発育しにくくなったと考えられた。また、GP培地では3日以上培養すると、培地中に球状菌が多数観察されるにもかかわらず、NA、TCBSでは検出されない状態が見出された。これは菌が死滅している他、培養できないVNC (Viable but Nonculturable) 的状態になったためとも考えられる。自然界の多くの細菌は菌に対してストレスとなる条件に曝されているためVNC状態にあると言われている⁷⁾。今回示した酸性条件下でのVp、Vvの形態変化、菌数変動は酸ストレスによりVNCが誘導された結果と推察された。

これまで多くのビブリオ属菌が疑われた食中毒や感染症の事例で、患者から菌が検出されても食品から菌を検出することは困難であった。食品のpHや温度その他の因子が作用し、今回のように菌の発育が抑制されたり、出現しても典型的な形状を示さない変性したコロニーになっていたと考えられた。また、現在の食品検査での公定法では非典型的なVpのコロニーは釣菌することはなく、検出率の低下を招いていた可能性があると考えられた。今後、食品からのビブリオ属菌の検出法について検討が必要であると思われる。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部通知：“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(2002)。
- 2) 畠山敬、山口友美、齋藤紀行、秋山和夫、白石廣行、小笠原久夫：宮城県保健環境センター年報，18，56(2000)。
- 3) 齋藤紀行、佐々木美江、山口友美、畠山敬、渡邊節、白石廣行：宮城県保健環境センター年報，20，68(2002)。
- 4) 坂崎利一編：“食中毒”，p69(1981)，(中央法規出版)。
- 5) 厚生省生活衛生局監修：“食中毒予防必携”，p104，p131(1988)(社団法人日本食品衛生協会)。

- 6) 齊藤永仁, 小西康平, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博: 感染症学雑誌, 78, 171 (2004).
- 7) 河本秀一, 石村勝之, 高杉佳子, 宮野高光, 児玉実, 伊藤文明, 笠間良雄, 山岡弘二, 荻野武雄: 広島市衛生研究所年報 17, 37 (1998).