

## 流通過程における腸炎ビブリオの汚染に関する研究

### 1 小売店舗における非生食用魚体の汚染状況について

岡崎秀信・別所元茂・※三守 弘

#### I はじめに

1950年藤野らによって発見された本菌による食中毒は、1963年統計上にあらわれて以来首位の座を独占しており、自然毒、化学物質によるものを除いた細菌性食中毒のみを対象に考えると、60~70%の高率を示している。<sup>12)</sup>このことは、魚介類の生食を好む国民性もさることながら、腸炎ビブリオ食中毒多発時期である7月下旬から10月中旬の間は、海水温の上昇と共に、沿岸海水中の腸炎ビブリオ菌数も増加し、<sup>4), 5)</sup>新鮮な魚介類でも本菌の汚染は避けられない現状であり、以後の取扱い如何によっては、世代時間の短いことと相俟って、本菌による食中毒が首位を独占している大きな原因と考えられる。しかし、患者分離株と海水、魚介類など自然環境由来株との間における神奈川現象陽性株の分離頻度には大きな差があり、陽性株と陰性株の病原性について種々論じられているが結論は得られていない。<sup>13), 14)</sup>しかしながら、限実に神奈川現象陰性株による食中毒事例、<sup>15), 16), 17)</sup>魚介類、海水等の本菌汚染度と、食中毒発生がよく相関していること<sup>8), 9)</sup>、最近の知見として、三輪谷ら<sup>13)</sup>によって神奈川現象陰性株からも、下痢因子としてCHO細胞に形態変化を生ずるCholera toxin様毒素が分離されたことを報告しており、神奈川現象陰性株の病原性が否定されていない現状では、魚介類の衛生的評価を、神奈川現象陰性株を指標として行うことも許されようとする。

そこで、本菌による食中毒防止のため、流通過程の末端で、消費者との接点である小売店舗の非生食用魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態を追求し、衛生指導基準設定の資料とすべく調査を行った。なお同時に、自主検査、あるいは監視業務の現場における簡易検査法としてAgar Stamp法(以下AS法)の実用性に関する検討も併せて行った。

#### II 材料および方法

1 店舗の選定; 調査店舗は業態、経営規模、衛生状態の3点を考慮して、次の3店舗を選んだ。

A店……大店舗で主に旅館、料理店などへ卸を行い、高級魚が多い、監視表による衛生状態はB級。

B店……小売と料理など仕出し兼業の中規模店舗で、衛生状態はA級。

C店……近所の一般消費者へ販売する小規模店舗で、衛生状態はC級。

3店舗とも冷却器を備えたショーケース(庫内温度5°C~7°C)内に魚体は陳列されている。

2 調査魚類; 一般に消費の多い対象魚を中心に、アジ、サバ、カレイ、ペラ、キス、コノシロ、メバルなど7魚種とし、毎回出来るだけ同一魚種を調査して月別、魚種別、店舗別の変動がみられるように努めた。

3 調査期間; S50年6月から12月初旬まで、毎月2回、計11回行った。

4 調査方法; 各店舗に陳列された調査対象魚を、それぞれ個別にビニール袋に採取し、クーラーに保存して研究室に持帰り、直ちに実験に供した。なお、各店舗の室内温度、魚体陳列ケース内温度、気温も併せて記録した。

##### 1) 定性および定量培養法

定性および定量培養法として、著者らも参加した厚生省腸炎ビブリオ予防対策研究班(班長予研坂崎利一博士)で定めた方法に従った。すなわち、魚体表面を鱗付のまま、なるべく肉を付けないように減菌袋で10g採取し減菌ポリミキシンBブイオン(日水)90mlを加え、ストマッカーで圧出し、10倍稀釈液として検査材料とした。

定量には、増菌培地としてポリミキシンBブイオン(日水)、分離培地にはTCBS培地(栄研)を用い、最確数は3本法によって算出した。すなわち、ポリミキシンBブイオンからTCBS培地に分離して生じた緑色コロニーを、確認培地に移植し、腸炎ビブリオの性状を示すコロニーの得られたポリミキシンBブイオン管数からMPNを求めた。

定性は、定量に用いた10倍稀釈試料の残余を、そのまま37°Cで1夜培養後、TCBS培地に分離し、生じた緑色コロニーを確認培地に移植し、腸炎ビブリオと同等すると共に、血清型、および神奈川現象を調べた。なお、TCBS培地上の発育良好な黄色コロニーは*V. alginolyticus*と見做した。

##### 2) Agar Stamp法

※ 高松保健所

腸炎ビブリオの現場における簡易検査法として、Agar Stamp法(AS法)の実用性についての検討を同時に行った。用いたAgar Stampは2×5cm、面積10cm<sup>2</sup>の矩形ポリ容器に、TCBS培地を寒天面がやゝ盛上るように作製されたものを、円筒形の容器に収めたもので、日水製薬で試作されたものを、1検体について2枚ずつ用いた。方法は魚体腹部表面に軽く押捺し、庖丁、マナ板も同様に、つけ水は培地面を浸し、容器に入れて37℃1夜培養を行った。生じた緑色コロニーは、

定量法と同様に腸炎ビブリオであることを確認し、発育良好な黄色コロニーはV.alginolyticusとして、2枚のAgar Stampの平均値で記録した。50個以下は実数で、100個未満は≐、100個以上で集落が一部融合した計測不能の場合を∞とした。

### III 研究成績

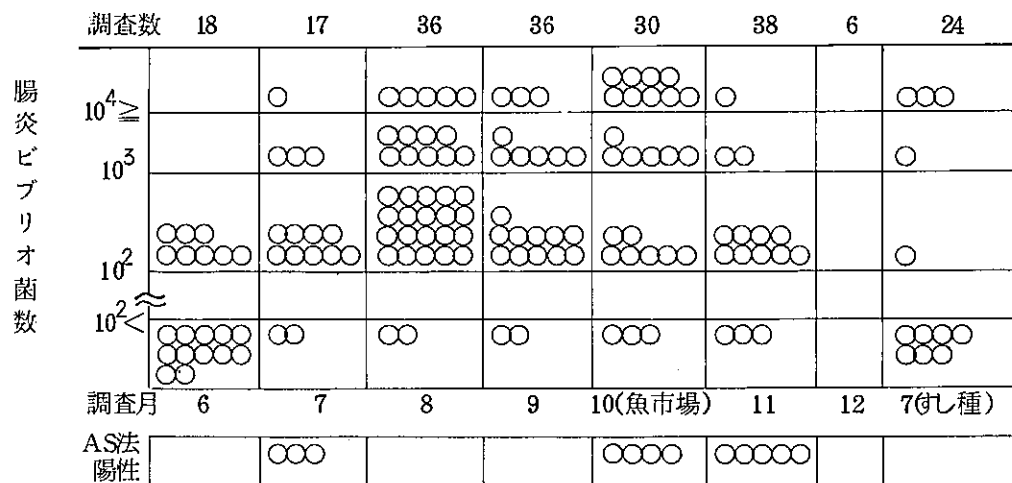
#### 1 小売店舗における月別腸炎ビブリオ数

##### 1) 非生食用魚介類の汚染状況

表1 小売店舗における月別腸炎ビブリオ数

調査月	店舗別	調査数	スタンプ法 陽性数	定量法 陰性数	定量法陽性数				陽性率 %	10 <sup>3</sup> <	K-型別数
					10 <sup>2</sup> <	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup> ≥			
6	A	6	0	1	3	2	0	0	94	0	2
	B	6	0	0	3	3	0	0			2
	C	6	0	0	3	3	0	0			2
7	A	5	0	1	2	1	1	0	88	24	4
	B	6	1	0	0	4	1	1			5
	C	6	2	1	0	4	1	0			2
8	A	12	0	0	0	9	2	1	94	39	4
	B	12	0	1	1	5	4	1			4
	C	12	0	1	1	4	3	3			7
9	A	12	0	0	1	3	0	8	97	61	5
	B	12	0	1	1	6	1	3			5
	C	12	0	0	0	2	5	5			5
11	A	6	0	1	1	2	1	1	75	17	0
	B	6	3	1	1	3	1	0			2
	C	6	2	1	1	4	0	0			0
12	B	6	0	6	0	0	0	0	0	0	0
7	すし種	24	0	12	7	1	1	3	50	17	6
10	魚市場	30	4	5	2	7	6	9	83	50	8
計		185	12	32	28	63	27	35	83		63

図1 小売店舗における月別腸炎ビブリオ陽性数



調査開始時の6月における各店舗の腸炎ビブリオ汚染状況は、3店舗共ほぼ同様で、陽性率はすでに94%の高率を示しているが、定量的には $10^2 \leq 100g$ で菌数的にはまだ低いが、7月には汚染率88%と大差はないが定量的には $10^3/100g$ 台が各店舗とも現れ始め、衛生状態A級のB店舗で $10^4/100g$ がみられた。この傾向は8月、9月に最高となる。すなわち、陽性率では94%、97%とほとんどの魚体から検出され、汚染菌量も $10^3/100g \geq$ の高汚染が39%、61%と、9月初旬がビ

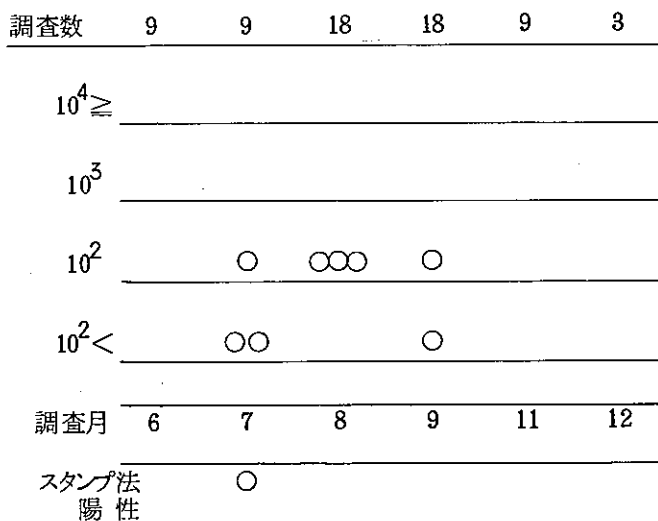
ークを示している。10月は魚市場に入荷したものを調査したが、汚染率は83%、 $10^3/100g >$ の高汚染は50%と減少し、11月にはそれぞれ75%、17%と低下、12月初旬にはB店舗のみであるが、6検体とも腸炎ビブリオは陰性となった。この量的汚染状況の推移は、腸炎ビブリオ食中毒発生の推移とよく一致し、密接な関連性がうかがわれる。

2) つけ水、庖丁、まな板などの汚染状況

表2 つけ水、庖丁、まな板の腸炎ビブリオ

調査月	店舗別	スタンプ法 陽性数	定量法 陰性数	定量法陽性数				調査総数	K-型別数
				$10^2 <$	$10^2$	$10^3$	$10^4 \geq$		
6	A	0	3	0	0	0	0	3	1
	B	0	3	0	0	0	0	3	
	C	0	3	0	0	0	0	3	
7	A	0	2	0	1	0	0	3	1
	B	1	2	1	0	0	0	3	
	C	0	2	1	0	0	0	3	
8	A	0	5	0	1	0	0	6	1
	B	0	4	0	2	0	0	6	
	C	0	6	0	0	0	0	6	
9	A	0	4	1	1	0	0	6	
	B	0	6	0	0	0	0	6	
	C	0	6	0	0	0	0	6	
11	A	0	3	0	0	0	0	3	
	B	0	3	0	0	0	0	3	
	C	0	2	1	0	0	0	3	
12	B	0	3	0	0	0	0	3	
計		1	57	4	5	0	0	66	5

図2 つけ水、庖丁、まな板の腸炎ビブリオ数

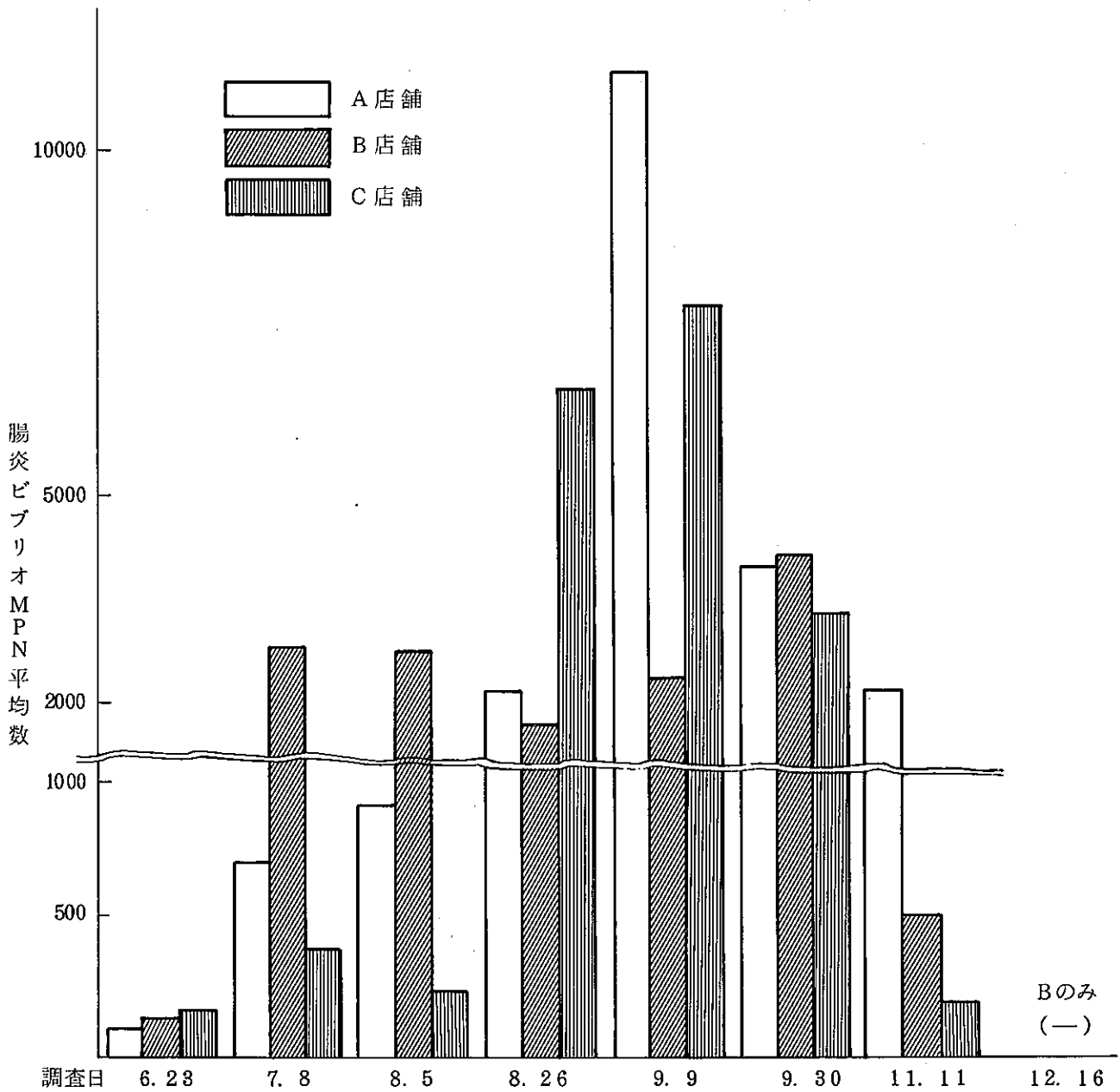


つけ水、庖丁は調査期間を通じて、比較的汚染度は少く、まな板に陽性例が少数みられたのみである。すなわち、調査総数66検体のうち、陽性は9検体13.5%で腸炎ビブリオ数も $10^2/100g$ 以下で、 $10^3/100g$ 以上の高汚染はなかった。

3) 店舗別腸炎ビブリオの汚染状況

調査回数7回、調査魚種6種の腸炎ビブリオ菌数の平均値を、各店舗ごとに示したのが図3である。

図3 店舗別腸炎ビブリオ，MPN平均数（6魚種）

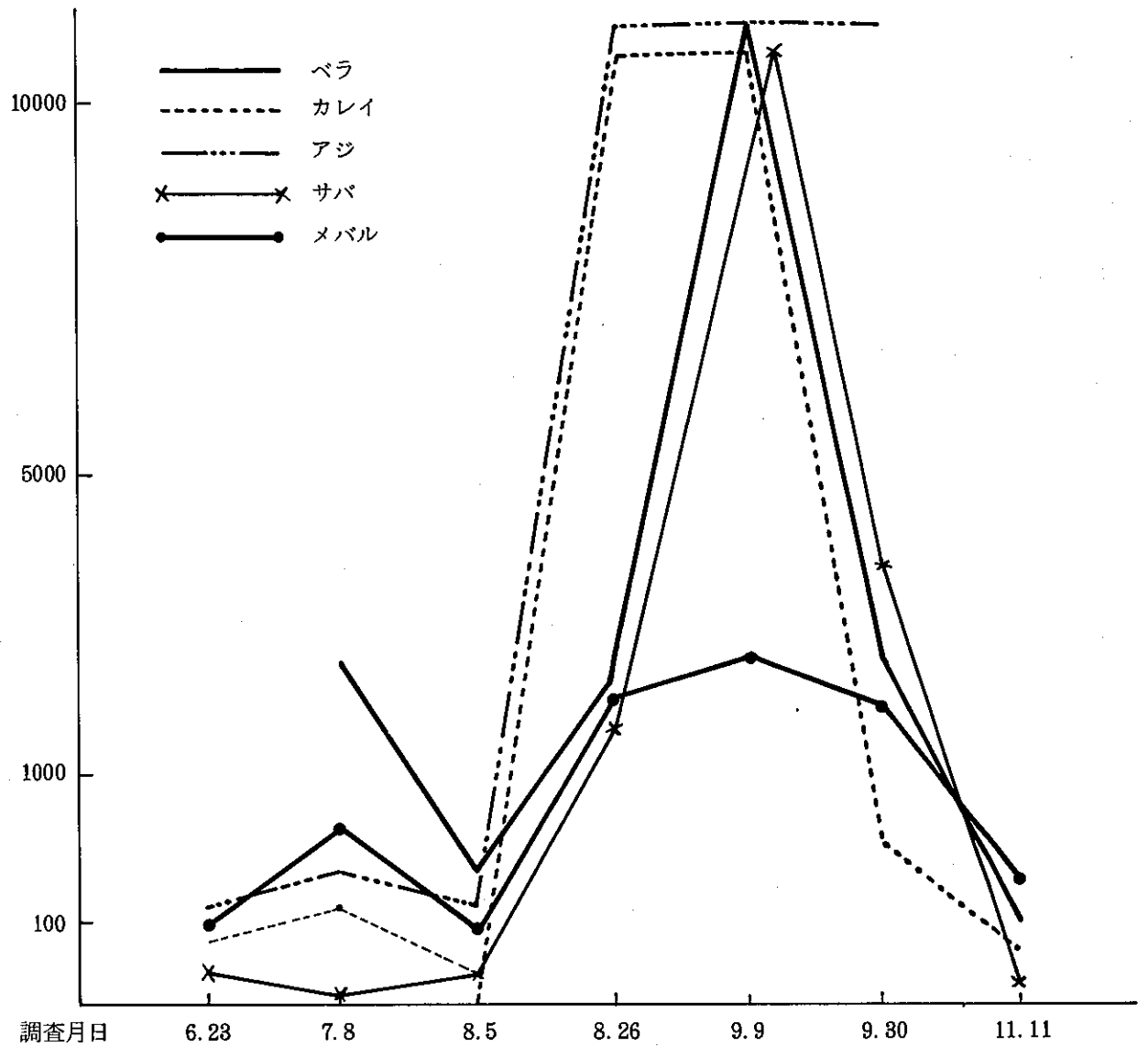


A店舗は8月上旬までは $10^2/100g$ であったが、8月下旬から10月上旬まで $10^3/100g$ 以上で、とくに9月初旬では6魚種とも $10^4/100g$ 以上を示した。B店舗は6月と10月が $10^2/100g$ 台で、その間は $10^3 \sim 10^4/100g$ を示し、C店舗は8月下旬から9月下旬の間 $10^3/100g$ 台で、6月～8月中旬、および11月は $10^2/100g$ 以下であった。すなわち沿岸海水中の腸炎ビブリオ数がピークに達する8月下旬から9月下旬にかけてはA、B、C3店舗とも $10^3 \sim 10^4/100g \geq$ の高

汚染を示し、店舗差がほとんどみられないことから、魚市場より各店舗に持帰った時点で、すでに高汚染を受けていると考えられる。その他の月では若干店舗差がみられるが、それは外観上の衛生状態とは相関せず、取扱量の多少による魚体の扱い方によるものと思われ、大量に取扱うA、B店舗に高く、外観上衛生状態C級のC店舗が、ピーク時を除けば汚染が少い状況から推定出来る。

4) 魚種別腸炎ビブリオ汚染状況

図4 C店舗における魚種別腸炎ビブリオMPN数



7回の調査で6回以上調査出来た同一魚種5魚種のMPN平均値を、C店舗の場合について示したもので(図4)、6月下旬から8月上旬にかけては、5魚種とも $10^2/100g$ 台の菌数であるが、8月下旬から9月下旬にかけてはメバルを除いて、他の4魚種は $10^4/100g \geq$ を示し、11月上旬にはいずれも $10^2/100g$ に減少した。

魚種間の差は余りなく、鱗のあるものが、ないものより多い傾向がみられた。

### 2 魚市場における魚介類の汚染状況

10月4日魚市場に入荷した県内産、近県産(高知、徳島、愛媛の各県)、遠県産(長崎、山口、印度洋(冷凍)、鳥取、佐賀、石川の各県)各10検体を同様の方法で調査した。

表3 魚市場における腸炎ビブリオ汚染状況

産地別	調査数	陰性数	陽性数 (100g中)					K-型別数
			$10^2$	$10^3$	$10^4 \geq$	陽性率	$10^3 >$	
県内産	10	0	2	4	4	100%	80%	4
近県産	10	22	4	1	3	80	40	3
遠県産	10	3	4	1	2	70	30	1
計	30	5	10	6	9	平均83	平均50	8

県内産の陽性率は100%で、そのうち、 $10^3/100g$  台40%で、 $10^4/100g \geq 40\%$ 、 $10^2/100g \leq 20\%$  で、カレイ、コノシロ、ボラなどが高く、近県産では陽性率80%で、 $10^3/100g$  10%、 $10^4/100g > 30\%$ 、 $10^2 \leq 40\%$ で、高汚染魚は、タチウオ、イカ、タナゴなどであり、遠県産では陽性率70%、 $10^2 \leq 40\%$ 、 $10^3/100g$  10%、 $10^4/100g$  20%で高汚染魚はアジのみで、サバ、カマス、ハマチは陰性であった。すなわち、県内産、近県産、遠県産の順に汚染率、汚染菌量が高く、このことは冷凍、氷詰など輸送に際しての冷蔵処理によると思われる。

### 3 Agar Stamp 法と定量法

簡易検査法としてのAS法を、腸炎ビブリオ検出という目的から定量法と比較してみると、非生食用魚介類の定量法による陽性率は表1から83%で、AS法では3.2%、庖丁、まな板などの調理器具は表2から定量法は13.6%、AS法では1.5%と極めて低率であり、直接腸炎ビブリオ検出にAS法は不相当と考えられる。しかし、腸炎ビブリオと共存する *V. alginolyticus* の検出率をみると、非生食用魚介類で94%、調理器具で25.7%と、腸炎ビブリオの定量法による成績と相関を示している。今回 *V. alginolyticus* の定量は行なかったが、坂崎、仲西<sup>10)</sup>らによれば、AS法で10~20個の *V. alginolyticus* 集落は $10^2/100g$ 以上の腸炎ビブリオの存在を推測し保ると述べており、腸炎ビブリオの汚染指標菌として、*V. alginolyticus* をAS法で行うのも1つの方法と思われる。AS法が腸炎ビブリオを直接検出し難いのは、多くの場合腸炎ビブリオ菌数よりも、*V. alginolyticus* が $10^2$ 程度多く、廿(50個以上)のコロニーが生じた場合、少数の腸炎ビブリオ緑色コロニーは黄変し鑑別困難となり、とくに100個以上では不可能といえる。また、AS法は魚体面を軽く押擦するのみなので、鱗の下部にある腸炎ビブリオは検出されず、定量法の場合と大きな差を生ずる原因であろう。

### 4 分離腸炎ビブリオの血清型

分離した腸炎ビブリオの血清型は、検体数251検体中陽性数162検体、型別出来たのは68検体41.3%で、58.7%はK型別不能であった。型別K血清型は25血清型に渉り、その主なものは02:K 28 19株(29.2%)で最も多く03:K 33 7株(10.8%)、04:K 34 6株(9.02%)、03:37 4株(6.1%)、K 42, K 20各3株(4.6%)で、この6血清型で64.3%を占めており、他の血清型は1~2株ずつであった。

K血清型と店舗間、魚種間に特定の傾向は認められず神奈川現象はすべて陰性であった。

## IV 考 察

今回の非生食用魚介類の腸炎ビブリオ汚染調査で、重点を流通過程の末端で、消費者との接点である小売店舗におき、月別、魚種別、店舗別の汚染状況をみたが、月別では多くの研究<sup>1), 3), 7)</sup>にみられるように、8月下旬から9月上旬にかけてピークを示し、この時期は、店舗別、魚種別の差は僅少で、調査魚種の大部分が $10^4 \geq 100g$ を示し、魚獲後の衛生的取扱い方も影響する<sup>4), 5)</sup>、海水などの環境汚染が主原因と考えられる。諸報告にもあるように海水温度、気温は最も高く、沿岸海水中の腸炎ビブリオ菌数も $10^3/100g \leq$ 前後に達し、魚獲直後の魚体から $10^3/100g$ 程度の腸炎ビブリオが検出されていることからいえる。調査は6月下旬から始めたがすでに陽性率は94%、菌数は $10^2/100g <$ で、11月に到って陽性率75%、菌数は大部分 $10^2/100g <$ 、12月初旬で陰性となっている。このように、非生食用魚介類の本菌汚染は不可避であり、流通過程における低温維持と、洗滌などによる物理的減少方法を有効に利用して、本菌の増殖を防止せねばならない。非生食用魚体は加熱調理を原則とし、高汚染魚でもそれ自体が食中毒を起すことはないと考えられるが、これらを材料として生食用に調理加工する場合注意が必要である。

店舗別の成績については、月別汚染状況からも推測出来るように、店舗の衛生状態は多少の影響はあるが大きいものでなく、外観上衛生状態C級の小店舗が、A級の大店舗より汚染のピーク時を除いては良好であった。現在のように大、小店舗に拘らず冷蔵ショーケースが整備された販売形態では、魚体の取扱い方、あるいはこれと関連する取扱量の多少が関係するように思われる。

魚種別では、消費量の多い大衆魚を主にしたが、メバルを除いてはほぼ同様なカーブを示し、魚種間に大差は認められなかったが一般にアジ、カレイ、コノシロなどは汚染菌数が高く、メバル、ベラ、サバはや、低い傾向がみられた。このような魚種間の多少の差は、量的多少による大衆魚、高級魚の差、鱗の有無、肉質の硬軟、鮮度低下の遅速などが関係しており、魚種間の二次汚染に注意が必要である。

今回の研究で分離された腸炎ビブリオは、すべて神奈川現象陰性で、K血清型も海水から分離頻度の高いタイプが多かった。しかし、最初に述べたように、神奈川現象陽性株の自然界における生態が完全に解明されておらず、また神奈川現象陰性株の病原性が否定されていない現状では、魚体に付着している神奈川現象陰性菌を以って、衛生的評価の指標とすることも止むを得ないと考えられる。また、神奈川現象陰性株による食中毒例の報告<sup>15), 16), 17)</sup>もしばしばみられ、環境由来の神奈川現象陰性

菌増加と、食中毒発生の関連についての報告<sup>2),9)</sup>によっても、このことの妥当性を裏付けている。以上の観点から、加熱調理を原則とする非生食用魚介類の腸炎ビブリオ許容菌数は $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 / 100 g$ 以下に抑えることが望ましく、本菌による食中毒を減少せしめるためには、合理的な衛生指導基準の早期設定が必要である。

なお、AS法は、直接腸炎ビブリオ検出には不適當で *V. alginolyticus* を指標とした簡易検査法として汚染状態のスクリーニングに用いるべきである。

## V ま と め

市販魚介類の衛生指導基準設定の基礎資料とするため流通過程末端の小売店舗における腸炎ビブリオ汚染状態を追求した。

1. 6月～11月の調査期間中規模、業態、衛生状態の異なる3店舗を選んで7回調査したが、汚染のピークは8月下旬から9月初旬で、業態、規模、衛生状態に余り差はなく、他の期間中は小規模店の方が良好であった。
2. 月別陽性率では、6月下旬すでに94%の汚染がみられるが、菌数は $10^2 / 100 g$ 程度で、8月下旬から9月下旬にかけて $10^3 \sim 10^4 \geq / 100 g$ の高汚染がみられ12月初旬に陰性となった。
3. 同一店舗で6回以上調査出来た同一5魚種についてみると、アジ、カレイ、コノシロは汚染が高く、メバル、サバがや、低い。魚種間に大きな差はみられず季節的環境要因の影響が大きい。
4. つけ水、まな板、庖丁の汚染は比較的少く、菌数も $10^2 / 100 g$ 以下であった。
5. 定量法とAS法の比較では、AS法の検出率は低く直接腸炎ビブリオの検出には適さない。
6. 魚市場の調査では、県内産の汚染率が高く、近県産遠県産の順に低かった。
7. 分離株の血清型は43.1%が型別出来、K28, K33, K34, K37などの分離頻度が高かったが、店舗別、魚種別による一定の傾向はみられなかった。

本報告の要旨は、昭和51年度日本獣医公衆衛生学会(高松)で発表した。

なお本研究は、厚生省腸炎ビブリオ食中毒予防対策研究班の研究の一端として行ったものであることを付記する。

## 文 献

1. 浅川豊, 赤羽荘介, 和田直子; 生食用魚介類の汚染調査, 静岡県衛生研究所報告, 19; 7~11, 1976
2. 浅川豊 腸炎ビブリオの食品汚染とその対策について, 食品衛生研究, 25; 7, 545~547, 1975
3. 駒井嘉明, 山本, 平川正男, 嶋田暁, 石崎衛治;

バカ貝の流通経路における腸炎ビブリオの汚染実態調査, 食品衛生研究, 26; 1, 66~70, 1976

4. 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; 11, 673~676, 1973
5. 衣笠勇雄, 武藤章, 川原邦夫, 秋山雄介, 古川正徳, 戸泉慧; 熊本県有明海, 不知火海沿岸海域の魚介類における腸炎ビブリオ分布状況調査について(第二報), 食品衛生研究, 25; 3, 77~80, 1975
6. 西尾隆昌, 貴田正義, 下内啓万, 加納賢五; 腸炎ビブリオの生態学的研究, IV河川における分布, 兵庫県衛生研究所研究報告, 2; 27~37, 1967
7. 宮崎佳都夫, 中森純三, 西尾隆昌; 小売店舗における海産魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態, I非生食用魚体体表部の腸炎ビブリオ生菌数, 広島県衛生研究所, 公害研究所研究報告, 24; 21~29, 1977
8. 村上一, 神保勝彦, 神崎政子, 小久保弥太郎, 春田三佐夫, 山田満; 最確数法による生食用むき身貝中の推定腸炎ビブリオ数の測定, 食衛誌, 16; 247~252, 1975
9. 坂井千三, 寺山武, 伊藤武, 善養寺, 山田満, 岩根善郎; 腸炎ビブリオ中毒の予防に関する研究, 食品衛生研究, 25; 537~540, 1975
10. 坂崎利一, 仲西寿男; 腸炎ビブリオ食中毒予防に関する基本的条件とその応用, 食品衛生研究, 27; 6, 527~532, 1977
11. 村上一, 山田満; 海産食品中の腸炎ビブリオの簡易定量法とその応用, 食品衛生研究, 25; 7, 535~537, 1975
12. 桑名俊昭; 昭和51年度食中毒発生状況, 食品衛生研究, 27; 10, 925~941, 1977
13. 竹田美文, 本田武司, 三輪谷俊夫; 腸炎ビブリオの病原因子, 日細菌誌, 32; 1, S-IV-7, 63, 1977
14. 藤野恒三郎; 腸炎ビブリオに関する最近の知見, 食衛誌, 18; 2, 131~141, 1977
15. 寺田友次, 横尾裕, 仲西寿男, 寺本忠司; 神戸市における食中毒患者より分離した腸炎ビブリオの新K抗原菌株について, 日細菌誌, 30; 3, 515~516, 1975
16. 善養寺, 坂井千三, 工藤泰雄, 伊藤武, 丸山務; 神奈川現象陰性腸炎ビブリオ04; K12と推定される食中毒について, メディアサークル, 15; 3, 83~86, 1970
17. 岡崎秀信, 寺田友次; 腸炎ビブリオの新K抗原型, 日細菌誌投稿中, 1977
18. 岡崎秀信, 別所元茂, 三守弘; 流通過程における腸炎ビブリオの研究, II生食用魚介類(刺身, すし種)の汚染状況および衛生指導基準の検討, 香川県衛生研究所報, 5; 40~50 1978