

カキの海水中における赤痢菌の取込みと生残

山口県環境保健研究センター

矢端 順子・富永 潔・富田 正章・松村 健道

Internalization and Survival of *Shigella sonnei* within the Oyster

Junko YABATA, Kiyoshi TOMINAGA, Masaaki TOMITA

Kendo MATSUMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health

はじめに

平成13年11月から12月にかけて西日本を中心とした30都府県で159名の細菌性赤痢患者の発生があった。疫学調査の結果、山口県内の2業者が出荷したカキが感染源として推定され、回収等の措置が講じられた。これらのカキは韓国から冷凍の状態で輸入されており、厚生労働省は同時期に輸入された韓国産カキから分離された赤痢菌の遺伝子型が、患者便由来の赤痢菌と一致したことを公表した¹⁾。カキを原因とした赤痢患者の集団発生事例は国内ではなく、確立した検査法もない状態での感染源の追求は困難を極めた。この事例では、韓国産カキが、どのような経緯で赤痢菌の汚染を受けたのかは解明されていないが、養殖海域に流入した赤痢菌によって、カキが汚染されたと推測される。米国の事例²⁾では、養殖海域に汚水が捨てられていたことによりカキが赤痢菌による汚染を受け、集団発生につながっている。

カキに起因する食中毒の主要な病因である小型球形ウイルス(SRSV)は、下水から河川水を通してカキの養殖海域に流入し、カキの体内に取り込まれると言われている³⁾。赤痢菌についても、SRSVと同様にカキの体内に取り込まれ、流通後のカキにおいても赤痢菌が生残り感染源となることが考えられる。

本研究では、カキが赤痢菌に汚染された時の菌の生残期間及びその影響因子について検討した。

材料及び方法

1 カキ及び海水

使用したカキは山口県秋穂町地先沿岸に生息する天然カキで、長期間の飼育による活力低下を防ぐため、実験前日に採取した。採取したカキは実験までの間、採取場

所の海水を入れた容器内で、エアポンプを用いて持続的に通気した状態で飼育した。海水はカキの餌となるプランクトン等を含むため、滅菌や濾過などを行うことなくそのままの状態で使用した。検査に用いたカキの重量は、むき身の状態で2.4~7.3g(平均4.5g)であった。

2 供試菌

供試菌は、平成13年12月に韓国産カキの喫食を原因とした赤痢患者の便から分離された*Shigella sonnei*(*S. sonnei*)で、トリプトソイブイオン培地(日水)3mlで35℃18時間培養後、培養液の0.1mlを滅菌生理食塩水100mlに懸濁し、 5.8×10^5 /mlの菌液として使用した。

3 カキの*S. sonnei*の取り込み試験

容量20Lの容器にカキを採取した場所の海水を2L入れ、*S. sonnei*の菌液2mlを添加、混和後、カキを20個入れた。室温(25℃)で6時間、曝露した後、3個のカキを取りだし、10ppmの次亜塩素酸ソーダ液に浸し、表面を消毒した後、無菌的に殻を開けて中身を取りだし、1個ずつ滅菌ストマフィルターに採取した。カキの重量を測定した後、袋の上からカキを手でもみホモジナイズし、カキの重量の倍量のシゲラブロスを入れ混和した。この2倍希釈試料についてシゲラブロスを用いた最確数法(5本法)により、カキ中の*S. sonnei*の菌数を測定した。シゲラブロスの各希釈系列の培養は、厚生労働省の示した方法⁴⁾に基づき、嫌気条件下(アネロパック法)で42℃、20時間行った。選択分離培地には、DHL寒天培地(日水)、SS寒天培地(日水)、クロモアカー-TAM培地(関東化学)の3種類を用い、シゲラブロスの培養液を画線塗抹し、35℃20時間培養した。*S. sonnei*の確認は、各選択分離培地上の赤痢菌が疑われるコロニーについ

て、TSI培地とLIM培地における生化学性状と、血清学的検査により行った。

4 カキ中の*S. sonnei*の生残期間の試験

*S. sonnei*を6時間曝露させたカキを、新しい海水(菌未接種)2Lに移し、3日後、7日後及び10日後に、カキ及び海水中から*S. sonnei*の分離とその菌数を、取り込み試験の方法と同様の方法で測定した。なお、海水は、カキの排泄物等による劣化を防ぐため、2日毎に新しいものと交換し、エアポンプで一定速度で通気した。

結果

6時間曝露後、3日後、7日後及び10日後の海水及びカキの*S. sonnei*の菌数を表1に示す。6時間曝露後の海水中の菌数は、 4.6×10^2 /mlであった。カキ1gあたりの*S. sonnei*の菌数は0.4~240と幅広かったが、海水中の菌数の約34%であった。6時間曝露後に、菌未接種の新しい海水に移したカキについて、3日後に検査した結果、3個のカキの内1個から、100gあたり40個(0.4/g)の*S. sonnei*を検出した。7日後及び10日後の検査では、それぞれ4個及び5個のカキを検査したが、*S. sonnei*は検出されなかった。また、海水中の*S. sonnei*は、3日後以降検出されなかった。

考察

カキが細菌を大量の海水とともに内蔵に取り込むことについてはいくつかの報告がある⁵⁾⁶⁾。今回の実験においても、海水から赤痢菌が検出されなくなった後も菌を保有していたことは、赤痢菌がカキに取り込まれた後一定期間生残していたことを示す。しかしながら、曝露後1週間でカキの保有菌数は検出下限値以下になっており、

菌の保有は一過性のものと考えられた。カキが大腸菌などの細菌を取り込み、排出する速度には水温が関与しているとの報告がある⁶⁾。今回の実験は、25℃の室温で実施したが、カキが主に出荷される冬期では、水温が低下し、生残期間が長くなる可能性がある。

今回の実験においては、同一の飼育条件でも、赤痢菌の保有菌数にはばらつきがみられ、個々のカキの活力状態が菌の取り込みと生残に関係しているものと考えられた。このことは、養殖場において大量のカキが同じ曝露を受けた場合でも、個体によって、赤痢菌の汚染状況に違いが生じることを示唆する。

カキが赤痢菌の汚染を受けた初期には、赤痢菌がカキの内部に取り込まれているため、殻付き及びむき身いずれの状態でも、洗浄操作のみでは赤痢菌を除去できないと考えられる。加工、流通過程の中での二次汚染も考慮する必要がある。

赤痢菌の増菌培養について、籍島ら⁷⁾はシゲラブロスを用いた検査法で、その検出下限値は1gあたり10個ないしはそれ以上と報告しており、韓国産冷凍輸入カキから赤痢菌を分離した宮原ら⁸⁾は緩衝ペプトン水による前増菌培養後シゲラブロスによる増菌を行い、このカキの汚染菌量は0.2CFU/gと報告した。赤痢菌では極めて少量の菌で感染が起こることや、カキのような食品では、様々な細菌による汚染のため、赤痢菌の発育が抑制される可能性も考えられる。また、冷凍などにより、菌が損傷を受けていることも考慮する必要がある。小沼ら⁹⁾は緩衝ペプトン水を使用した前増菌培養の方法についても検討している。今後、さらに検査法の改良を検討し、効果的な検出方法を開発していく必要がある。

表1 海水及びカキからの*S. sonnei*の検出状況

	6時間後		3日後		7日後		10日後	
	重量(g)	菌数(/100g)	重量(g)	菌数(/100g)	重量(g)	菌数(/100g)	重量(g)	菌数(/100g)
カキ	7.3	24,000	3.5	<30	3.5	<30	4.5	<30
	5.5	40	6.6	40	3.6	<30	3.2	<30
	5.9	24,000	3.7	<30	3.8	<30	3.7	<30
					5.1	<30	6.8	<30
							2.4	<30
海水	46,000/100ml		<3/100ml		<3/100ml		<3/100ml	

文献

- 1) 佐野喜彦：食品衛生研究. 52(9), 35~41 (2002)
- 2) Reeve, G. et al. : N. Engl. J. Med. 321(4), 224~227 (1989)
- 3) 関根大正ほか：日食微誌. 14(3), 135~143 (1997)
- 4) 厚生労働省医薬品局食品保健部監視安全課：平成14年1月9日付事務連絡 (2002)
- 5) Dore, W.T. et al. : Appl. Environ. Microbiol. 61(8), 2830~2834 (1995)
- 6) Hartland, B.J. et al. : Appl. Environ. Microbiol. 37(3), 517~520 (1979)
- 7) 霜鳥翔一ほか：感染症誌. 64(10), 1337~1344 (1990)
- 8) 宮原美知子ほか：防菌防黴. 30(5), 299~302 (2002)
- 9) 小沼博隆ほか：厚生科学研究費補助金 (厚生科学特別研究事業) 平成13年度研究報告書食品から赤痢菌検出に関する研究 (2002)