

飲食店いけす水・水産加工施設からの腸炎ビブリオ および関連遺伝子の検出状況(2001年度)

山崎省吾・山口仁孝・野口英太郎

Investigation of *Vibrio parahaemolyticus* and the Relation Gene from Marine products (2001)

Shogo YAMASAKI, Yoshitaka YAMAGUCHI and Hidetaro NOGUCHI

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Restaurant Fish preserve water, Seafood processing plant, PCR
キーワード: 腸炎ビブリオ, 飲食店いけす水, 水産加工施設, PCR

はじめに

前回の報告(平成12年度調査)¹⁾で、腸炎ビブリオ(以下、VP)関連遺伝子である耐熱性溶血毒素遺伝子(以下、*tdh*)、耐熱性溶血毒類似毒素遺伝子(以下、*trh*)および病原性発現調節遺伝子(以下、*toxR*)の海水からのPCRスクリーニングの有効性を実証した。

同年度6～9月の長崎県沿岸海水、市場水およびいけす水の調査では、*tdh*は検出されなかったが、*trh*、*toxR*が検出された。その結果、水産品に係る海水のVP汚染の可能性が示唆された。

今回の調査では、前回に引き続き飲食店いけす水(以下、いけす水)のVP汚染状況を調査し、また、沿岸海水を使用している水産加工施設の衛生指導の資料とするため、水産加工品および使用水の施設工種別における細菌汚染状況も併せて調査した。

なお本調査は、平成12年度腸炎ビブリオ調査の続報である。

調査方法

1 材料

[いけす水]

長崎県内の飲食店6店(A～F店)を調査対象施設とし、平成13年7～9月の3ヶ月間の各月1回計3回調査した。検体は、約1Lを材料とした。

検体数は、各飲食店1回の調査につき1検体とし、計18検体であった。

[水産加工施設]

長崎県内の水産加工施設A、B、Cの3施設を調査対象施設とし、平成13年6～9月の4ヶ月間各月1回計4回調査を実施した。検体は各施設とも加工工程の使用水(加工魚の解凍水、加工洗浄水、最終洗浄水)、施設使用水の取水口付近の沿岸海水(以下、沿岸海水)を約1Lおよび水産加工原料(以下、原料)、水産加工品を材料とした。

検体数は、各施設とも各月施設使用水3検体、沿岸海水1検体、原料と加工品各々1検体を材料とし、施設使用水36検体、沿岸海水8検体、水産加工原料および加工品計23検体であった。

2 方法

[VP汚染実態調査](図)

いけす水および使用水は、MPN3管法²⁾により定量した。VPの耐熱性溶血毒素(以下、TDH)および耐熱性溶血毒類似毒素(以下、TRH)陽性菌分離のため、アルカリ性ペプトン水(以下、AP)で1代増菌し、本増菌液1mlを熱抽出で鋳型DNAを作製し、PCRスクリーニング(*tdh*, *trh*, *toxR*)¹⁾を行った。PCR陽性の増菌液を食塩加ポリミキシン・ブイオン(SPB)で1代再増菌し、TCBSおよびクロモアガービブリオ(CAV)平板培地にて菌分離を行い、VPが疑われる集落を我妻培地および尿素培地に接種し、TDH/TRH陽性菌の分離を試みた。

原料および加工品は、試料25gについて上記と同様に実施した。

[生菌数と大腸菌群数]

水産加工施設使用水, 同原料, 加工品は, 生菌数(混釈平板法)と大腸菌群数(MPN5管法)を定法に従い測定した。

試料

増菌培養 AP (定量試験および定性試験)(37, 18hrs)

PCR スクリーニング (*tdh*, *trh*, *toxR*)

[定量試験]

TCBS(37, 18hrs)

[定性試験]

増菌培養 SPB(37, 18hrs)

TCBS および CAV(37, 18hrs)

(TDH/TRHスクリーニング)

TDH試験:我妻培地, TRH試験:尿素培地

(確認試験)

TSI, SIM, 林ツルセ, 耐塩性試験

(図) VP 検査フロー

調 査 結 果

1 いけす水

[VP汚染実態調査] (表1)

VPは, 9検体 (50%) から分離された。VP検出検体のうち100MPN/100ml以上を2検体が示した。*tdh*は全18検体とも陰性, *trh*は7月調査3検体が陽性, *toxR*は全検体陽性であった。

表1 VP汚染実態調査(飲食店いけす水)

No.	調査月	飲食店	水温()	pH	PCR			VP- MPN100ml	VP菌分離
					<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxR</i>		
1	7月	A	16.0	7.2	-	+	+	230	+
2		B	17.0	7.5	-	+	+	<30	+
3		C	20.5	6.7	-	-	+	40	+
4		D	20.0	6.8	-	-	+	<30	-
5		E	17.5	8.2	-	+	+	<30	-
6		F	21.0	7.0	-	-	+	<30	+
7	8月	A	17.0	6.9	-	-	+	<30	-
8		B	22.0	7.2	-	-	+	430	+
9		C	19.5	6.3	-	-	+	70	+
10		D	20.5	6.4	-	-	+	<30	+
11		E	16.0	8.0	-	-	+	<30	+
12		F	18.0	6.0	-	-	+	<30	-
13	9月	A	17.0	6.9	-	-	+	<30	-
14		B	20.0	7.1	-	-	+	<30	-
15		C	19.1	7.0	-	-	+	<30	-
16		D	18.0	6.8	-	-	+	<30	-
17		E	16.0	7.6	-	-	+	<30	-
18		F	17.0	7.2	-	-	+	30	+

2 水産加工施設

[VP汚染実態調査]

(1) 工程別使用水および沿岸海水(表2)

使用水14検体(36.8%)からVPが検出された。VP検出検体のうち100MPN/100ml以上は3検体であった。*tdh*は3検体, *trh*は15検体, *toxR*は33検体が陽性であった。

沿岸海水6検体(75.0%)からVPが検出された。VP検出検体のうち100MPN/100ml以上は1検体のみであった。*tdh*陰性, *trh*4検体, *toxR*は全8検体陽性であった。

(2) 原料および加工品(表3)

1検体(4.3%)のみが, 36MPN/gを示した。他の検体からはVPは検出されなかった。*tdh*は全検体陰性であったが, *trh*は2検体, *toxR*は15検体陽性であった。

[生菌数と大腸菌群数]

(1) 工程別使用水および沿岸海水(表2)

(使用水)生菌数は, 解凍水がA・C施設の各々4検体, 最終洗浄水がA施設2検体, C施設2検体の計12検体が 10^4 cfu/ml以上を示した。大腸菌群数もまた, 生菌数で高値を示した検体が同様に高値を示す傾向を認めた。

(沿岸海水)生菌数および大腸菌群数が高値を示したのはB施設沿岸の2検体であった。

(2) 原料および加工品(表3)

生菌数は11検体が 10^4 cfu/g以上を示し, 大腸菌群数も, 生菌数が高値を示した同一検体が高値を示す傾向を認めた。原料よりも加工品で汚染傾向を認めた。

3 VP-TDH/TRH陽性菌の検出

調査を実施した全ての検体から検出されなかった。

参 考 文 献

1) 山口仁孝: 海水中の腸炎ビブリオTDH, TRHおよびToxR遺伝子の検出, 長崎県衛生公害研究所報, 45, 115-118(1999)

2) 厚生省生活衛生局監修: 食品衛生検査指針微生物編, 社団法人日本食品衛生協会, 134-151(1990)

表2 水産加工施設汚染実態調査(使用水および沿岸海水)

No.	検体名	調査月	施設	採水場所	水温()	pH	PCR			VP- MPN/100ml	生菌数 cfu/ml	大腸菌群数 MPN/ml	VP菌分離
							tdh	trh	toxR				
1	使用水	6月	A	解凍水	0.0	6.60	-	+	-	<30	120000	17.0	NT
2				洗浄水	23.5	8.36	-	+	+	<30	<3000	<0.2	-
3				最終洗浄水	23.7	8.52	-	+	-	<30	<3000	<0.2	NT
4	沿岸海水			取水口	24.5	8.35	-	+	+	<30	<3000	0.5	+
5	使用水	6月	B	解凍水	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6				洗浄水	23.7	8.30	+	+	+	<30	<3000	0.8	+
7				最終洗浄水	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8	沿岸海水			取水口	24.0	7.92	-	+	+	<30	60000	160.0	+
9	使用水	6月	C	解凍水	6.7	6.65	-	+	+	<30	1600000	>160	+
10				洗浄水	24.0	7.53	-	+	+	<30	<3000	4.9	+
11				最終洗浄水	13.6	7.05	-	+	+	<30	279000	>160	+
12	沿岸海水			取水口	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
13	使用水	7月	A	解凍水	2.4	7.40	-	-	+	<30	26000	7.9	-
14				洗浄水	24.0	7.60	-	-	+	<30	600	<0.2	-
15				最終洗浄水	23.8	6.80	-	-	+	<30	46000	14.0	+
16	沿岸海水			取水口	26.7	7.70	-	-	+	<30	<300	<0.2	+
17	使用水	7月	B	解凍水	12.5	6.70	-	-	+	<30	4600	6.0	+
18				洗浄水	24.0	7.70	-	-	+	<30	<300	<0.2	+
19				最終洗浄水	19.2	7.70	-	-	+	<30	1100	14.0	+
20	沿岸海水			取水口	26.0	6.70	-	-	+	<30	300	<0.2	+
21	使用水	7月	C	解凍水	14.6	6.60	-	-	+	<30	12600	2.0	-
22				洗浄水	24.0	7.50	-	-	+	<30	<300	<0.2	-
23				最終洗浄水	9.1	6.80	-	-	+	<30	27000	2.0	-
24	沿岸海水			取水口	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
25	使用水	7月下	A	解凍水	6.8	6.40	-	+	+	<30	72000	160.0	-
26				洗浄水	26.0	7.40	-	-	+	<30	<300	<0.2	-
27				最終洗浄水	25.3	8.10	-	-	-	<30	<300	<0.2	-
28	沿岸海水			取水口	29.8	8.10	-	+	+	<30	<300	<0.2	-
29	使用水	8月	B	解凍水	7.0	6.80	+	+	+	350	3200	7.9	+
30				洗浄水	27.7	7.50	-	-	+	60	<300	1.3	-
31				最終洗浄水	18.9	9.10	-	-	-	<30	300	<0.2	-
32	沿岸海水			取水口	29.2	7.50	-	+	+	360	24400	160.0	+
33	使用水	8月	C	解凍水	19.6	6.60	-	-	+	380	150000	>160	+
34				洗浄水	26.8	7.30	+	+	+	<30	<300	4.9	+
35				最終洗浄水	10.0	7.50	-	+	+	<30	460	7.9	+
36	沿岸海水			取水口	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
37	使用水	9月	A	解凍水	1.2	8.10	-	-	-	<30	160000	7.9	-
38				洗浄水	26.8	8.10	-	-	-	160	<300	54.0	+
39				最終洗浄水	25.5	6.60	-	-	-	<30	40000	160.0	-
40	沿岸海水			取水口	26.5	7.90	-	-	+	<30	<300	4.9	-
41	使用水	9月	B	解凍水	3.2	6.50	-	-	+	<30	480	7.9	-
42				洗浄水	26.2	7.80	-	-	+	<30	<300	3.3	-
43				最終洗浄水	18.7	8.80	-	-	-	<30	<300	<0.2	-
44	沿岸海水			取水口	27.1	7.90	-	-	+	<30	810	3.5	+
45	使用水	9月	C	解凍水	14.2	6.30	-	-	+	<30	15000	>160	-
46				洗浄水	25.9	7.30	-	-	-	30	<300	3.3	+
47				最終洗浄水	5.3	7.40	-	-	+	<30	<300	<0.2	-
48	沿岸海水			取水口	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	

備考) + : 検出、- : 検出せず、NT: 実施せず。なお、No. 25-28は7月下旬に実施した。

表3 水産加工施設汚染実態調査(原料および加工品)

No.	検体名 (魚種名)	採取日	施設	工程	PCR			VP- MPN/g	生菌数 cfu/g	大腸菌群数 MPN/g	VP菌分離
					tdh	trh	toxR				
1	サバ	6月	A	原料	-	-	+	<3	<3000	8	-
2				加工品	-	-	+	<3	12000	33	-
3	カサゴ	6月	B	原料	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
4				加工品	-	-	+	<3	13000	49	-
5	アジ	6月	C	原料	-	-	+	<3	37000	>1600	-
6				加工品	-	-	+	<3	94000	920	-
7	サバ	7月	A	原料	-	-	-	<3	<3000	<2	NT
8				加工品	-	-	+	<3	7700	49	-
9	アジ	7月	B	原料	-	-	+	<3	3200	2	-
10				加工品	-	-	+	<3	3800	8	-
11	アジ	7月	C	原料	-	-	+	<3	13000	5	-
12				加工品	-	-	+	<3	39000	NT	-
13	アジ	7月下	A	原料	-	-	+	<3	3500	2	-
14				加工品	-	-	+	<3	54000	13	-
15	カサゴ	8月	B	原料	-	-	+	<3	<3000	<2	-
16				加工品	-	-	-	<3	<3000	<2	-
17	アジ	8月	C	原料	-	+	+	36	47000	>1600	+
18				加工品	-	+	+	<3	15000	>1600	-
19	サバ	9月	A	原料	-	-	-	<3	6700	13	-
20				加工品	-	-	-	<3	99000	>1600	-
21	カサゴ	9月	B	原料	-	-	-	<3	<3000	<2	-
22				加工品	-	-	-	<3	<3000	2	-
23	アジ	9月	C	原料	-	-	-	<3	<3000	33	-
24				加工品	-	-	-	<3	120000	130	-

備考) + : 検出、- : 検出せず、NT: 実施せず。No.13-14は7月下旬に調査実施。