



食品の腸炎ビブリオ検査法の解説

東京医科歯科大学大学院医学系研究科 島田俊雄

1996年頃から、これまで国内で主流であった腸炎ビブリオの血清型がO4:K8からO3:K6へと菌型の変化がみられ、この菌型による食中毒が激増した。インド亜大陸でも1996年頃から同一の血清型に起因する食中毒が急増し、タイ、韓国および台湾においてもO3:K6菌株による事例の増加が問題視されている。また、米国では1997年7～8月および1998年7～9月にO3:K6菌株の流行が勃発し、血清型O3:K6による世界的な腸炎ビブリオ食中毒のさらなる拡大が危惧される。一方1998年、新しい血清型O4:K68による事例が発生し注目されたが、タイやインドでもこの新型菌が多数分離されており、今後O4:K68型菌に原因する食中毒の動向にも十分な注意が肝要であろう。

PFGE(パルスフィールドゲル電気泳動)による解析では、最近分離された国内外のO3:K6菌株は相互に類似性が極めて高く、単一クローンが拡大した可能性が示唆される。さらに、新血清型O4:K68菌株がO3:K6流行株とPFGEパターンが同一であることから、この新型菌の起源はO3:K6に関係するものと思われる。

今や腸炎ビブリオ食中毒はわが国だけの問題ではなく、世界的なレベルで対応しなければならない状況に至っている。

このような事態を踏まえて、厚生労働省では従来の腸炎ビブリオ食中毒防止対策に加え、平成13年6月7日付で、食品衛生法施行規則および食品添加物等の規格基準の一部が改正され、腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格および基準の設定がなされた。

成分規格では、(1)切り身、むき身の生食用魚介類加工品、生食用かき、冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)からの腸炎ビブリオの菌数を製品1gあたり最確数100以下であること、(2)煮かき(ゆでかき)、ゆでだこでは腸炎ビブリオ陰性であることが設定された。

1. 成分規格のための腸炎ビブリオの検査法

(1) 検体の採取と試料の調製

答申では、「検体25gにPBS 225mLを入れ、ストマッキング処理する」となっている。実際には蠕動式ブレンダー400用ビニール袋に、検体25gをPBS(滅菌リン酸緩衝生理食塩水またはリン酸緩衝希釈水、表1)225mLに入れ、ストマッカーなどの蠕動式ブレンダーで30秒間処理する。なお、貝類などの破片、エビやカニなどの甲殻類の殻や魚の鰓などが含まれる場合には、ポリ袋が傷つけられることがあるので、検体を細断し、PBSとともにポリ袋に入れ、数分間激しく振り出し、検体とする。

(2) 検査方法

1) 切り身、むき身の生食用魚介類加工品、生食用かき、冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)からの腸炎ビブリオの菌数測定(最確数の求め方、図1)

成分規格: 製品1gあたり腸炎ビブリオ最確数100以下であること。

検体25gにPBS 225mLを入れ、ストマッキング処理し、検体の10倍希釈液を作製し試料とする。つぎに検体の10倍希釈液1mLをPBS 9mLの入った試験管に入れ、検体の100倍希釈液を作製する。

検体の10倍希釈液および100倍希釈液をアルカリペプトン水10mLの入った3本の試験管にそれぞれ1mLずつ接種し、また検体の100倍希釈液をアルカリペプトン水10mLの入った3本の試験管に0.1mLずつ接種する。

37°C、1夜培養後、各試験管の上層の1白金耳をTCBS(thiosulfate citratebile Salts

sucrose)寒天培地に塗抹し、37℃、1夜培養する。

培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定し、各段階希釈した試験管の陽性本数を最確数表に当てはめて、1gあたりの最確数を求める。

2) 煮かに(ゆでかに)、ゆでだこの検査(図2)

成分規格:腸炎ビブリオ陰性であること。

検体25gにアルカリペプトン水225mLを入れ、スタマッキング処理した試料を37℃、1夜培養後、上層の1白金耳をTCBS寒天培地に塗抹し、37℃、1夜培養する。

培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定する。同定は食品衛生検査指針にもとづいて行なう。

また、これらの方法と同等以上の性能を有すると認められた方法で実施してもよい。

これまで増菌培地は食塩ポリミキシムイオンであったが、今回アルカリペプトン水(表2)に変更になった。食品からのサルモネラや腸管出血性大腸菌O157などの増菌の場合と同様、魚介類や海水中の腸炎ビブリオは損傷を受けている細胞がかなりあり、そのような損傷菌は抗生物質や胆汁酸塩などを含む培地には発育できない菌がかなり存在する。このような損傷菌なども発育させるために、抗生物質などを含まないアルカリペプトン水で増菌することになった。

煮かに(ゆでかに)やゆでだこはゆで上げた時点では、腸炎ビブリオなどの細菌は死滅している。従って、これらの製品から腸炎ビブリオが検出された場合には、海水や魚介類などを介して腸炎ビブリオが二次汚染したものであり、ゆで上げ後の処理や保存方法が適切でないことを示しており、加工基準や保存基準に適合していないことになる。このことから、煮かに(ゆでかに)やゆでだこの成分規格は腸炎ビブリオ陰性とされた。

切り身やむき身などの市販品の腸炎ビブリオの最確数は通常100/g以下である。それらの食品の最確数が100/gを越えた場合には、それらの食品の処理やその後の保存状態などが不適切で、食品に腸炎ビブリオが多数汚染したか、あるいは食品中で増殖したことを示しており、加工基準や保存基準に適合していないことになり、生食用としては適切ではない。従って、切り身やむき身などの生食用魚介類加工品、生食用かきおよび冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)の成分規格は腸炎ビブリオの最確数が100/g以下とされた。

2. 海水や食品からの耐熱性溶血毒(TDH)陽性腸炎ビブリオの分離法

参考までに海水や食品からのTDH陽性腸炎ビブリオの分離法を示す。

これは、平成12年度厚生科学研究、生活安全総合研究事業、「腸炎ビブリオ汚染実態調査研究」で検討されたものである。

海水の場合には海水1,000mLをメンブランフィルター(0.45μm)で濾過したフィルターを検査材料とするが、目詰まりするのでフィルターを数回取り換える。すべてのフィルターをアルカリペプトン水100mLに入れ、37℃、18時間培養(一次増菌)後、PCR(*tdh*)を行う。ここでPCR陽性の場合のみ、その1mLを食塩ポリミキシムイオン(10mL)で37℃、18時間二次増菌後、その上層の0.5mLを再度食塩ポリミキシムイオン(10mL)で37℃、6時間、三次増菌する。三次増菌イオンについて免疫磁気ビーズ(O3:K6など)で処理・集菌後、ビーズをTCBS寒天培地に塗抹する。TCBS寒天培地上の腸炎ビブリオが疑われる集落を出来るだけ多く、滅菌楊枝などを用いて我妻寒天培地(神奈川現象試験用培地)に画線培養し、明らかな溶血環が認められた菌株についてTDH遺伝子(*tdh*)および血清型(O3:K6など)を検査する。

食品の場合には前述の(1)に準じて処理し、検査に供する。

一次増菌には抗生物質を含まないアルカリペプトン水を、二次、三次増菌には選択性の強い食塩ポリミキシムイオンを用いる。

表1 PBS(リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝希釈水)

リン酸一カリウム(無水)34gを500mLの精製水に溶かし、これに約1mol/L水酸化ナトリウム溶液約175mLを加えてpH7.2になるように調整し、さらに精製水を加えて全量を1,000mLとしたものを原液とする。この原液1.25mLに精製水*を加えて1,000mLとし、高圧滅菌を行う。

*リン酸緩衝生理食塩水には、精製水の代わりに生理食塩水(塩化ナトリウム8.5gを精製水1,000mLに溶解したもの)を使用する。

表2 アルカリペプトン水の組成(培地1,000mLあたり)

ペプトン	10.0g
塩化ナトリウム	20.0g
pH8.6	

図1 切り身、むき身の生食用魚介類加工品、生食用かき、冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)からの腸炎ビブリオ菌数測定(最確数の求め方)

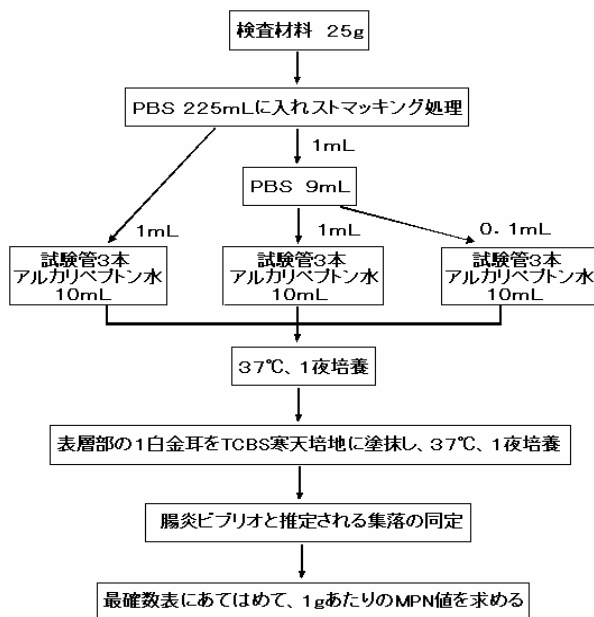


図2 煮かに(ゆでかに)、ゆでだこの検査

