

海水より分離した 腸炎ビブリオの溶血性について。

秋田県衛生科学研究所

金 鉄 三 郎

I はじめに

1965年神奈川衛研⁽¹⁾、加藤らは、腸炎ビブリオの新事実として、ヒト血液を用いた溶血反応によって、腸炎ビブリオ亜群1を、2群別出来ることを報告している。これは同所の秋山ら、の改良培地を用いた場合、沿岸、海水魚類等から本菌亜群1の検出率は従来報告されたそれより、はるかに高いもので真夏の候には殆んど100%に近いことを認めると共に、夏季にみられる腸炎ビブリオの多発は、このような海洋由来性と陸上における食品汚染によって一応理解されるのであるが、それにしても本菌による食品汚染の実態と、実際の本菌によって起った食中毒発生病数、ないし患者数とのくいちがいは、夏季においてさえ散発的発生にとどまることなど考慮しても余りにかけ離れていることに矛盾ありとして、腸炎ビブリオ亜群1の菌の間にも、その起病力に強弱2群を想定し生物化学的、血清学的に2群別する追求を試みた結果、腸炎ビブリオの亜群1のヒト赤血球に対する溶血能が、菌株の分離由来別に著しい差のあることを発表した。それによると、食中毒患者由来株では約95%、健康保菌者では約65%に、魚類その他の食品、沿岸、海水等の自然界からの溶血陽性は、僅かに0~3%程度の低率であることを明らかにしている。

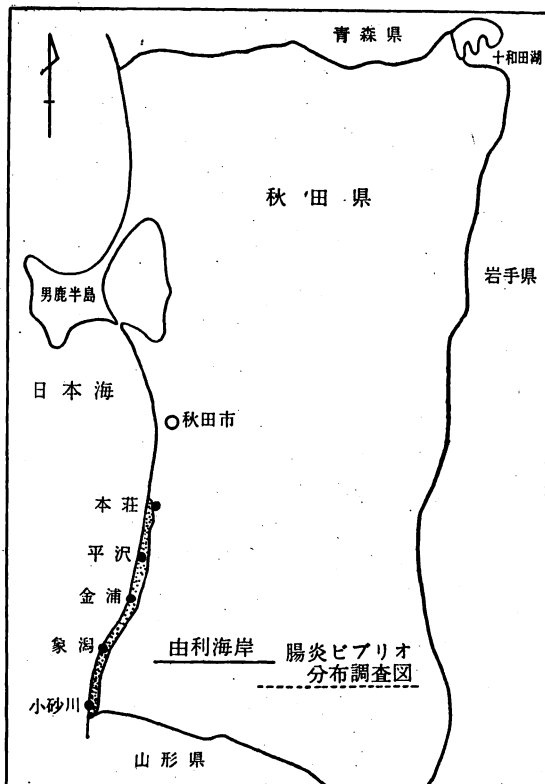
私共は最初自然界に分布する腸炎ビブリオの調査を行ったのであるが、1964年9~10月及び1965年5月より9月に至る期間に、由利海岸の海水1500件、魚介類272件より219株を分離し、また1966年には市販魚類の店頭における汚染調査の際は128株を得たのであるが、次にこれらについてヒト血液に対する溶血能の追試実験を試みた結果、自然界分布の腸炎ビブリオが非溶血株のものも勿論あるが溶血株が高率に分離検出され、然も或時期に偶発的と思われる溶血株の分布を見ることがあったので

、其の経過を報告すると同時にこのことについて各方面の御意見を頂きたいと思う。

II 調査並びに分離方法

1 由利海岸に於ける腸炎ビブリオの調査。

秋田県にとって魚業資源の大きな由利海岸一帯を選びその自然界における腸炎ビブリオの分布調査を行った。



(イ) 1964年には9月下旬より10月上旬にわたり、本荘平沢、金浦、象潟、小砂川の5地区を選び海水500件から56株、魚類252件から26株、計82株の腸炎ビブリオを分離することが出来た。

(ロ) 1965年同じく由利海岸の平沢、金浦、小砂川の3地区を、5、7、9月の3回、象潟地区を8月に、計海水1000件、魚類20検体を採取、海水より129株、魚類より8株の腸炎ビブリオを分離することが出来た。

2 市販魚類の店頭に於ける腸炎ビブリオ汚染調査。

1966年海岸調査に引き続いて、市販魚類の店頭における腸炎ビブリオによる汚染調査を実施、各保健所の協力を得て県内の4市、能代、秋田、男鹿、大曲の市内店頭より、魚類600件体を採取、体表、臓器別にすると延べ1200件より腸炎ビブリオ128株を分離することが出来た。

3 腸炎ビブリオ分離方法

海水および魚類よりの腸炎ビブリオ分離に当っては、当初より一貫して4%食塩加1%ペプトン水を増菌培地として、BTBティポール平板培地に分離培養後その集落について諸性状検査を行い、資料の統一性をはかった

4 検査方法

①供試菌株別由来

- (イ) 39~40年度由利海岸、海水魚類よりの分離菌 220株
 - (ロ) 41年魚類よりの分離菌 219株
 - (ハ) 36~38年度食中毒よりの分離保存菌 34株
 - (ニ) 41年度食中毒例よりの分離 13株
 - (ホ) その他の食中毒より分離株分譲 68株
(青森、岩手、新潟、宮城の各県衛研究所より分与のもの)
- 合計 462株

②溶血性実験方法。(加藤らの法による)¹⁾

(イ)使用培地

ブレンハートインフュージョン } PH
寒天 1.5 }
食塩 2.5 } 7.4

0.1%クリスタル紫アルコール液0.1%に加える。これを55℃に於て人血5%の割合に加え平板とする。

(ロ)使用方法

寒天平板凝固後、純エタノール2~3ml注ぎ表面をアルコールに浸し直ちにふせてアルコールを除きフラン器内で乾燥して用いる。

(ハ)供試菌

A) 3% NaCl 加普通寒天培地、37℃20時間培養の菌苔。

B) 3% NaCl加1%ペプトン水、37℃20時間培養の菌液。

以上のA), B), 2つの菌を併用した。

(ニ)実施方法、供試菌を1平板12分割程度に劃線培養37℃18時間後判定、更らに再確認を要するものについては1平板5分割程度にして使用した。

(ホ)判定方法、集落の周囲が極めて明瞭なものを(卍)陽性、菌苔を1%フォルマリン加生理的食塩水で洗い流した後で菌苔下に透明な溶血環を認めるものを(+)陽性とした。

「腸炎ビブリオ」溶血実験表 (1)

—食中毒関係—

年度	区分	検体	供試株数	溶血性			溶血%	備考
				-	+	卍		
36 38	食中毒	糞便	28	1	1	26	96.4	継代数 10代?
		食品	6	5		1	16.6	
41	食中毒	糞便	13			13	100.0	2代
36	食中毒	〃	11	4		7	63.6	青森県衛生 研究所より 分譲された 0株
40	保菌者	〃	1	1				
40	食中毒	〃	18			18	100.0	新潟県衛生 研究所より 分譲された 株
41	食中毒	〃	18			18	100.0	
41	食中毒	〃	15			15	100.0	岩手県衛生 研究所より 分譲された 株
41	食中毒	〃	5			5	100.0	宮城県衛生 研究所より 分譲された 株

「腸炎ビブリオ」溶血実験表 (2)

— 海水及び魚類株 —

採取年月	区 分	検 体	分離数	溶 血 性			溶血%	備 考		
				-	+	+				
39	9	本 荘 海 岸	海 水	4	4		0	「由利海岸に於ける腸炎 ビブリオの調査研究」 第1回		
			魚 類	2	2		0			
		平 沢 海 岸	海 水	14	14		0			
			魚 類	6	6		0			
	10	象 潟 海 岸	海 水	7	7		0			
			魚 類	8	8		0			
		小 砂 川 海 岸	海 水	18	17	1	5.5			
			魚 類	6	6		0			
	金 浦 海 岸	海 水	13	2	11	84.6				
		魚 類	4	4		0				
	40	5	平 沢 海 岸	海 水	6	5	1		16.6	「全 上 第 2 回」
				魚 類	5	5			0	
金 浦 海 岸			海 水	28	28		0			
			魚 類	3	3		0			
小 砂 川 海 岸		海 水	7	7		0				
7		象 潟 海 岸	海 水	7	7		0			
8		平 沢 海 岸	海 水	8	8		0			
		金 浦 海 岸	海 水	8	8		0			
		小 砂 川 海 岸	海 水	15	15		0			
9		平 沢 海 岸	海 水	14	14		0			
		金 浦 海 岸	海 水	16	16		0			
		小 砂 川 海 岸	海 水	20	2	18	90.0			
41		5~9	店 舗	魚 体表	42	41	1	2.3	「店頭汚染調査」	
				魚 臓器	86	84	2	2.3		

「腸炎ビブリオ」溶血実験表 (3)

—39年海水分離株—

	区 分	生 物 型		溶 血 性			溶血%	備 考
		型 別	株 数	-	+	卅		
5 地 区 海 岸 500 件 分離 56株	金 浦 海 岸 10.27日 採取	1	3	0	3	0	$\frac{11}{13}$	気象条件 天候 晴 気温 22.0°C 水温 17.0°C (100件)
		2	10	2	8	0	84.6%	
9 ~ 10月 採 取	そ の 他 の 海 岸	1	29	28	1	0	$\frac{1}{43}$	(400件)
		2	14	14	0	0	2.32%	

「腸炎ビブリオ」溶血実験表 (4)

—40年海水分離株—

	区 分	生 物 型		溶 血 性			溶血%	備 考
		型 別	株 数	-	+	卅		
4 地 区 海 岸 1,000 件 分離 129株	小 砂 川 海 岸 9.27日 採取	1	0	0	0	0	$\frac{18}{20}$	気象条件 天候 雨 気温 23.0°C 水温 23.5°C (100件)
		2	20	2	18	0	90.0%	
5 ~ 9 月 採 取	そ の 他 の 海 岸	1	19	19	0	0	$\frac{1}{109}$	(900件)
		2	90	89	0	1	0.91%	

III 検査成績

1 別表1のとおり、食中毒よりの分離株においては加藤らの成績と同じく患者糞便よりの分離株は、青森衛研の36年度分離株の63.6%を除き殆んど100%の陽性を示し41年度実施した店頭における魚類についての分離株は、2表の2.3%の溶血性にとゞまり、これ1)も加藤らの成績とはば一致するものであったが、39~40年度由利海岸調査の分離株の溶血性について

は、予期せぬ結果を見ることに至った。即ち39年の金浦海岸、40年度の小砂川海岸を除いては、海水魚類の溶血性は0.91~23.2%と加藤らの実験成績に符合するものの39年10月金浦海岸海水の13株中の11株は84.6%の溶血性、40年9月の小砂川海岸海水分離の20株中18株は、90%の高率な溶血性を認めることが出来た。

腸炎ビブリオの諸性状 (5)

—海水分離株—

分離年月	区分	No.	白糖	10 % 耐塩性	VP反応	血清型	マウス		生物型	抗血性	Swar ming
						0 ~ K	○	○			
39. 10	金 浦	405	-	-	-	-	●	●	1	+	+
		431	+	+	+	-	●	●	2	+	+
		451	+	+	+	-	●	●	2	+	-
		467	+	+	-	-	●	●	2	+	+
		468	+	+	+	3 - 31	●	●	2	+	+
		469	+	+	+	-	●	●	2	+	-
		470	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		473	+	+	+	-	●	○	2	+	-
		474	+	+	+	-	○	○	2	+	+
		476	-	-	-	2 - 27	●	●	1	+	-
		477	-	-	-	-	●	●	1	+	-
40. 9	小砂川	903	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		906.	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		919	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		924	+	+	+	-	○	○	2	+	+
		927	+	-	+	-	○	○	2	+	+
		930	+	+	+	-	○	○	2	+	+
		932	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		934	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		937	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		938	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		944	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		946	+	+	+	-	●	●	2	+	+
		950	+	+	+	-	○	○	2	+	+
		952	+	+	+	-	○	○	2	+	+
		963	+	+	+	-	●	●	2	+	+
		980	+	+	+	-	●	○	2	+	+
		982	+	+	+	-	○	○	2	+	+
985	+	+	+	-	●	○	2	+	+		

2 溶血株の諸性状

(1) 生物型との関連性

腸炎ビブリオは、これまで生物型1と2に分類されていたが、その腸炎起病株は生物型1のみに限定すべきであろうと善養寺らは述べており、生物型2は腸炎ビブリオより除くべきことを強調した。

一方坂崎は、生物型2にはSwarmingの性状があるのに、生物型1ではこの性状が全く認められないとの観点から、善養寺らの提案を支持、腸炎ビブリオを生物型1のみに限定し生物型2を独立した新菌

種とみなし、これにVibrio, alginolyticusの命名を提案、この意見は1965年度の厚生省特別調査にもとり入れられて、腸炎ビブリオは、従来の生物型1(亜群1)のみを指すことになっており、神奈川衛研の加藤らの実験もこの亜群1のみに限られて、その溶血性の強弱実験を行なっているが、私の実験は生物型1, 2にかかわらずヒト血液の溶血実験を行なったが、この点より溶血株と生物型との相関性を見ると、3, 4表のとおり、生物型1(亜群1)が3株に対して、生物型2(亜群2)が、26株と圧倒的

に多いことである。腸炎ビブリオの生物型1は白糖分解性(-)VP反応(-)食塩耐溶性7%(+)10%は(-)まれに(+)のものに限り、その他は生物型2として善養寺の提案に従って分類したものである。

(iv) 動物試験, Swarming, その他の性状。

溶血株の生化学的性状検査は厚生省の腸炎ビブリオ検査要領によって実施したものである。

A 動物試験法

3%NaCl加1%ペプトン水10mlに供試菌を接種, 37℃18時間培養の菌液を0.25ml宛体重15g以上のマウス2匹を使用, その腹腔内に注射5日間経過観察した成績であるが, 溶血性株, 必ずしもマウスを倒し得ないものも見られる。

B Swarming 試験法

坂崎による3%NaCl加寒天平板培地(寒天1%)をよく乾燥して1菌株, 1枚を用い, その中心部に点状接種37℃20時間培養の結果を判定, 対照として全上培地に0.1%ティポールを加えた平板培地を使用した。その結果, 金浦株の生物型2にスワミング陰性が3株, 逆に生物型1に陽性が1株認めることが出来た。

IV 考 察

自然界由来の腸炎ビブリオ亜群1の溶血性については先に述べたとおり加藤らは, 0~3%という数字を発表しているが今回私の追試験でも一般海水, 魚類等の自然由来では, 3%以下の成績であった。

これに対して患者分離株においては100%におよぶヒト血液に対する溶血性を認めることが出来た。これは腸炎ビブリオの起病性について, 1新性状として⁷⁾なづけるところであり岩手衛研, 石母田なもこの追試験において腸炎ビブリオの溶血反応によって, 患者由来その他の由来株の2群別の可能性, 更らに多少の差はあるがK抗原型別とスワミングの成績が統一されることを報告しているが, 今回の私の実験結果から或時期に海水より分離した腸炎ビブリオは, 生物型2であるにもかかわらず高率に溶血性が認められたこととその溶血性は, 生物型, 動物試験, その他の性状等と相関性を認め難く, 然もその分布が特異な要素を含むことが察知出来ることである。これは一港湾, 或は特

定な海岸が自然環境に大きく左右された場合, 例えば潮流の変異, 或は陸上の風水害等の影響を受けて, 腸炎ビブリオの集中的な汚染を蒙ることもまぬがれないことが示唆されているものがあり, この海水分離株の溶血性についての問題は, 生物型による溶血性, 生物型2のスワミングの問題などと共に疫学との関連について今後更らに調査実験を重ねたいと考えるものである。

V 結 論

- 1 由利海岸の海水および魚類についての腸炎ビブリオの分布調査, 市販の店頭魚類の汚染状況を調査してヒト由来の菌株を含め, ヒト血液に対する溶血性を追試の結果, 自然界由来別では39年度海水分離の金浦海岸株(10月27日採取)13株中84.6%が陽性, その他の海岸43株中2.3%が陽性。同じく40年度の海水分離の小砂川海岸株(9月27日採取)20株中90%が陽性, その他海岸109株は0.91%陽性であった。同じく41年度魚類よりの分離株128株では, 2.3%の溶血性陽性であった食中毒患者分離株では当所保存株の36~38年の28株は96.4%, 41年の13株は100%, 分譲をうけた36年の青森衛研の11株の63.6%, 40~41年の新潟, 岩手, 宮城, 各衛研の56株は100%の溶血陽性率であった。
- 2 このようにヒト血液に対する溶血性実験から新しい, いくつかの問題を深めることが出来た。

終りに本実験に当って貴重な菌株を分与せられた青森, 岩手, 新潟, 宮城の各県衛生研究所各位に厚く感謝申しあげたい。

文 献

- 1) 加藤貞治: モダンメディア 12(6): (1966)
- 2) 児玉 威: 日本食品衛生学雑誌 Vol. 7. No. 3, 1966年
- 3) 秋田県衛生科学研究所報: No. 10, 1966年
- 4) 厚生省: 病原性好塩菌食中毒検査要領, 1963年
- 5) 善養寺浩, ほか: メディアサークル 52, 1964年
- 6) 坂崎利一: 食品衛生研究 15(7)1965年
- 7) 岩手県衛生研究所: 年報 9. 1966年
藤野恒三郎, 福見秀雄編: 腸炎ビブリオ 一成堂, 1964年