

腸炎ビブリオの低温抵抗に関する一実験

浅 川 末 三
(広島大学水畜産学部水産学科)

A Laboratory Study on the Resistivity of *Vibrio parahaemolyticus* against Low Temperature

SUEZO ASAKAWA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama

(Figs. 1-2, Tables 1-2)

わが国における食中毒原因食品は水産物を最多としており、最近はその大部分が腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* (以下、本菌と略記) によるといわれている。本菌は海洋性細菌なので、先ず魚貝類に付着しそれを介して食中毒をおこすものと考えられている¹⁾。

一般に魚貝類は漁獲後氷蔵あるいは凍結冷蔵をされて市場に出荷される場合が多い。一方、本菌は低温には弱いことが知られている。例えば、我妻²⁾は3%食塩加寒天培養基上の本菌が2~5°Cで15~30日間にほとんど死滅したことを見ている。従ってもしも、魚貝類に付着した本菌が冷蔵されることによって短期間に死滅するものならば、魚貝類を冷蔵することは本菌による食中毒予防に期待がもてるものと考えられた。

そこで、本菌の0°C以下の低温抵抗性に関する基礎的実験を行なった。その結果、本菌はたしかに低温には弱いが、魚肉に多量に付着した場合には-20°Cでも相当期間生存することが判明したので、上記の期待は食品衛生上からは大してできないことを知った。

昭和39年10月6日、日本水産学会秋季大会で本実験の概要を口演したが、ここにその詳細を報告する。

実験材料および方法

供試菌株

昭和38年9月、著者ら³⁾が大阪湾底質から分離した本菌の生物I型菌とII型菌、新らしく人糞から分離した大腸菌で3%食塩加寒天培地によく発育した菌株を対照用とした。

菌数測定用培地

肉エキス0.4%、ペプトン1%、ブドウ糖0.1%、寒天1.5%の組成の市販寒天培地(栄研)に食塩3%およびティポール0.01%を添加しpHを7.4に修正、121°C 15分間滅菌したものをを用いた。

純培養実験法

各供試菌をそれぞれ3%食塩加ペプトン水中に37°C 18時間増菌培養し、その1mlを滅菌した3%食塩水99mlに混釈し、更に混釈した3段階の菌液を作った。各稀釈段階における菌液1ml当たりの菌数はTable 1の0時間目のとおりであった。各稀釈菌液1mlずつを、滅菌したポリエステル製ペトリ皿(径90mm、深さ13mm)に分取し、これに菌数測定用培地を約20ml注加して常法通り混合、平板に固め皿の蓋の方を合せ重ねて2枚1組として直ちに-20°C、-10°Cと0°Cの冷蔵室内に放置した。

一定時間後にペトリ皿1組を取り出して37°C 24時間培養し、発育したコロニー数の平均値を以てそ

Table 1. Changes in the bacterial number of the agar plate* inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* or *Escherichia coli* during storage at -20 , -10 , and 0°C

Elapsed time in hrs (-20°C)	0	0.5	1	2	5	10	24	48	96				
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	5.0×10^5	6.3×10^4	5.6×10^4	3.0×10^4	0								
	5.0×10^3	8.9×10^3	3.3×10^3	2.5×10^1	0								
	5.0×10^1	4.6×10^1	2.2×10^1	0									
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype II)	1.1×10^6	1.3×10^5	6.4×10^4	4.4×10^4	4.2×10^3	4.2×10^2	1.6×10^2	0					
	1.1×10^4	5.0×10^3	1.5×10^3	1.0×10^2	0								
	1.1×10^2	7.5×10^1	1.7×10^1	0									
<i>E. coli</i>	1.4×10^6	1.4×10^6	1.3×10^6	1.0×10^5	5.0×10^4	3.0×10^4	2.5×10^4	1.1×10^4	0				
	1.4×10^4	1.4×10^4	1.2×10^4	9.0×10^3	1.4×10^3	7.0×10^2	7.3×10^2	1.2×10^2	0				
	1.4×10^2	1.4×10^2	1.1×10^2	6.0×10^1	2.8×10^1	1.6×10^1	8.0×10^0	0					
Elapsed time in hrs (-10°C)	0	1	5	10	24	48	96	148	264				
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	5.0×10^5	2.6×10^4	4.5×10^1	0									
	5.0×10^3	1.9×10^3	0										
	5.0×10^1	7.0×10^0	0										
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype II)	1.1×10^6	2.1×10^4	1.3×10^4	3.2×10^2	0								
	1.1×10^3	2.0×10^3	1.4×10^2	0									
	1.1×10^2	2.5×10^1	0										
<i>E. coli</i>	1.4×10^6	1.4×10^6	1.3×10^5	1.3×10^5	1.0×10^5	7.5×10^4	3.2×10^3	3.5×10^1	0				
	1.4×10^4	1.1×10^4	5.0×10^3	4.2×10^3	2.5×10^3	9.5×10^2	0						
	1.4×10^2	1.3×10^2	6.0×10^1	2.8×10^1	2.3×10^1	0							
Elapsed time in days (0°C)	0	0.5	1	2	3	4	7	11	17	25	28	40	
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	5.0×10^5	3.5×10^3	3.9×10^2	5.1×10^1	2.0×10^1	0							
	5.0×10^3	2.1×10^1	0										
	5.0×10^1	0											
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype II)	1.1×10^6	—	—	1.6×10^4	9.2×10^3	4.0×10^3	7.3×10^2	2.8×10^2	3.9×10^1				
	1.1×10^4	—	—	1.8×10^1	8.0×10^0	0				0			
	1.1×10^2	—	—	0									
<i>E. coli</i>	1.4×10^6	1.4×10^6	1.4×10^6	2.0×10^5	—	2.0×10^5	1.8×10^5	1.4×10^5	1.2×10^5	—	5.4×10^4	3.9×10^3	
	1.4×10^4	9.1×10^4	1.2×10^4	1.0×10^4	—	1.0×10^4	5.4×10^3	5.1×10^3	3.5×10^3	—	5.6×10^2	7.7×10^1	
	1.4×10^2	1.4×10^2	1.3×10^2	1.1×10^2	—	8.1×10^1	5.0×10^1	4.4×10^1	1.9×10^1	—	8.0×10^0	0	

Figures represent the average number of viable cell count in the plates duplicated.

* The agar medium was prepared with a nutrient agar containing 3% NaCl and 0.01% 'teepol'.

の時間までの生残菌数とした。

魚肉培養実験法

本菌の生物 I 型菌および大腸菌を 3% 食塩加ペプトン水中に 37°C 18 時間増菌し、その 10ml を滅菌した 3% 食塩水 200ml に混釈した、この混釈菌液 1ml には I 型菌は 6.7×10^6 、大腸菌は 6.6×10^5 存在した。市販のマグロ背部肉を 1 cm³ に切断した切身の必要個数をこの混釈菌液中に約 30 分間浸漬し、あらかじめ滅菌し所定温度に冷却しておいたポリエステル製ペトリ皿内に 2 個ずつの汚染切身を入れ、直ちに -20°C、-10°C と 0°C の冷蔵室内に重ねることなしに放置した。

一定時間後にペトリ皿 1 枚ずつを取り出し、内部の切身 2 個を別々に滅菌 3% 食塩水中にホモジナイズし、常法に従って段階希釈をして平均生菌数を計測した。ただし、マグロ切身にはすでに 3% 食塩加寒天培地に発育する細菌が切身 1 個当たり 1.8×10^3 付着していたので、供試菌を混じらない滅菌 3% 食塩水中に同様処理をしたマグロ切身について空試験を同時に行ない、上記生菌数から差し引いて供試菌の生残菌数とした。

Table 2. Changes in the bacterial number of the tuna meat* inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* or *Escherichia coli* during storage at -20, -10, and 0°C

Elapsed time in hrs (-20°C)	0	2	4	9	24	48
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	2.1×10^6	1.0×10^6	5.0×10^5	4.8×10^5	4.0×10^5	1.5×10^5
<i>E. coli</i>	3.2×10^5	2.7×10^5	2.2×10^5	1.2×10^5	1.6×10^5	9.4×10^4
Other bacteria**	1.8×10^3	1.6×10^3	1.5×10^3	1.4×10^3	9.6×10^2	7.0×10^2
Elapsed time in hrs (-10°C)	0	5	10	25	49	120
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	2.1×10^6	1.9×10^6	1.3×10^6	9.5×10^5	4.4×10^5	1.5×10^5
<i>E. coli</i>	3.2×10^5	2.6×10^5	2.2×10^5	2.3×10^5	1.5×10^5	1.8×10^5
Other bacteria**	1.8×10^3	1.8×10^3	1.8×10^3	1.7×10^3	1.7×10^3	1.7×10^3
Elapsed time in days (0°C)	0	2	5	9	14	21
<i>V. parahaemolyticus</i> (biotype I)	2.1×10^6	2.1×10^6	2.7×10^4	2.4×10^4	2.3×10^4	2.7×10^4
<i>E. coli</i>	3.2×10^5	2.0×10^5	2.0×10^5	1.5×10^5	8.7×10^4	7.3×10^4
Other bacteria**	1.8×10^3	2.1×10^3	2.9×10^3	4.7×10^3	9.9×10^3	4.7×10^4

Figures represent the average number of viable cell count in the tuna meat pieces duplicated.

* The dorsal part of tuna muscle was cut to 1 cm³ pieces.

** Other bacteria are the original microorganisms which had contaminated the tuna meat.

実験結果および考察

純培養実験の結果を Table 1 に示す。すなわち、本菌の生物 I 型菌は -20°C に放置された場合には初菌数が少ないと 2 時間、非常に多くても 5 時間以内に死滅した。-10°C では -20°C よりは生残時間が延長されたが初菌数の多いものでも 10 時間以内には死滅した。また、0°C では初菌数が少ないと半日、多くても 4 日以内で死滅した。

生物 II 型菌は、I 型菌よりも各段階の初菌数が約 2 倍多いので両者を直ちに比較することは危険ではあるが、I 型菌よりは低温抵抗力が多少強い傾向が見られる。しかし、-10°C 以下では約 1 日間でもほとんどが死滅した。これが 0°C では初菌数が多いと 17 日間も生残した。

ここで疑問の生じるのは、II型菌の初菌数 1.1×10^6 が -10°C では24時間で死滅したのに、 -20°C では24時間目になお 1.6×10^2 の生残菌がある点である。この原因は使用した寒天培養基の冷却曲線を示した Fig. 1 に見られるように、 -10°C では過冷却現象が生じ、 -20°C 放置よりも放置後20分前後の冷却度が大であったためと思われる。事実、Table 1 の1時間目の菌数を見ると、 -20°C では 6.4×10^4 に対し -10°C では 2.1×10^4 と既に3分の1の生残菌数にすぎない。この過冷却現象は、培養基の冷却曲線を知るためにサーミスターを用いて経時的に温度測定を3回行った内2回見られた。これに対し、 -20°C では同じく3回測定中1度もこの現象が見られなかった。

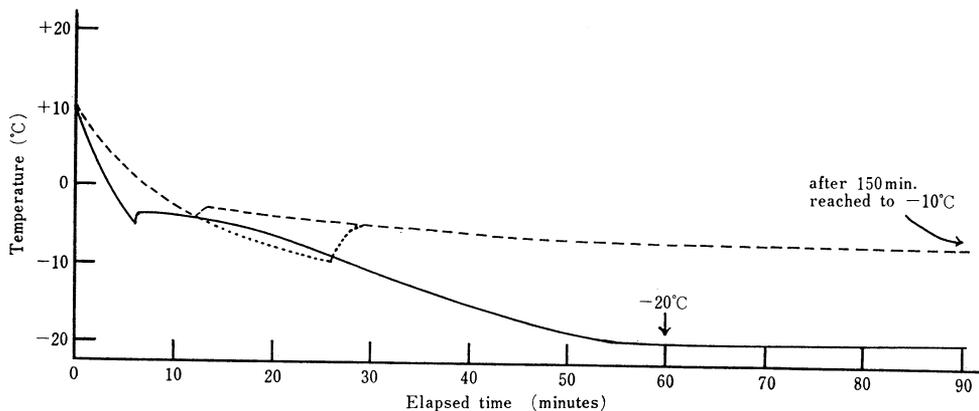


Fig. 1. The freezing curves of the agar medium (2 mm thick plate) in a plastic Petri-dish. Temperatures plotted were taken at the central part of materials.
 ----- at -10°C refrigerator, supercooling curve
 — at -20°C refrigerator

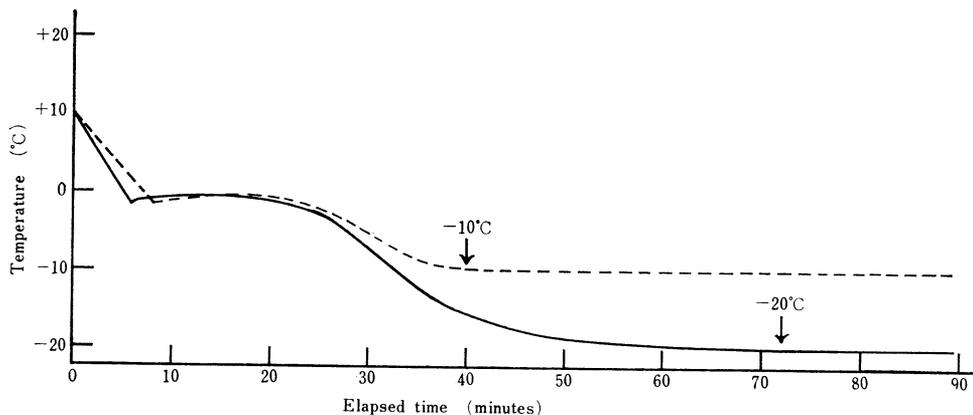


Fig. 2. The freezing curves of the tuna meat (1 cm³ piece). Temperatures plotted were taken at the central part of materials.
 ----- at -10°C refrigerator
 — at -20°C refrigerator

対照の大腸菌は RAJ ら⁴⁾あるいは FELSTEHAUSEN ら⁵⁾も認めているように低温には比較的弱い細菌である。本実験でも -20°C では4日以内、 -10°C では11日以内に死滅した。しかし、 0°C では初菌数が多いと40日以上も生残した。

以上のことから、本菌は大腸菌に較べても低温には非常に弱い菌種であることは明らかである。これ

を以て直ちに冷蔵・冷凍魚貝類は本菌による食中毒に対し安全であるとはいえない。なぜならば、本実験は人工的な培養基に単独接種した特別な場合であるからである。次に、魚肉に接種した場合を行なった。ただし、真の食中毒菌とされる生物 I 型菌と対照の大腸菌のみを使用した。その結果を Table 2 に示す。

この表を見ると、実験期間中にすべてが死滅した例は一つもないので考察に不便である。この表から横軸に放置期間、縦軸に生残菌数の対数を取った死滅曲線を書いて（本文には図を略した）以下考察をすすめることにする。

生物 I 型菌は -20°C 放置で約 6 時間までに急減し以降漸減したが、48 時間後でも初菌数の約 7% が生き残った。 -10°C では初めから漸減傾向を示したが、120 時間後でも約 7% が生き残った。また、 0°C ではいわゆるシグモイド曲線を描き、放置後 2 日ないし 5 日間に急減したが以降はほとんど死滅が見られなかった。対照の大腸菌は各放置温度とも初めから漸減傾向を示した。

すなわち、本菌が魚肉に付着した場合には、 0°C 以下に冷蔵されると次第に付着菌が死滅はするが、たとえ -20°C に冷凍されても、その付着菌数にもよるが短時間内に死滅しつくすとはいえない。RAJ ら⁴が大腸菌その他を用いて冷凍のカキあるいはフィッシュスティックで実験し論じているように、魚貝肉という高蛋白質成分を有する培地では低温に弱い本菌も生存期間が延長されることが判明した。

なお、Table 2 を見ると生物 I 型菌の初菌数が同じであるのに -10°C の 120 時間目の生残菌数が 0°C の 5 日目 (120 時間目) よりも多い。このことから -10°C よりも 0°C の方が死滅率が大であると即断はできない。純培養実験でもこのようなことは見られなかった。また Table 2 に示すようにマクロ切身に付着していた供試菌外の雑菌が、 -20°C ・ -10°C では漸減したのに対し 0°C では漸増した。例えば -10°C 120 時間目における I 型菌数対雑菌数は約 90:1 であるのに、 0°C 5 日目のそれが約 10:1 である。すなわち、 0°C においては特に雑菌の I 型菌に対する何らかの阻害作用があったのではないかと考えられるからである。事実、各放置温度区の最終試料についての検査であるが、生菌数を測定したコロニーを釣菌し、堀江ら⁶の 3% 食塩加サッカロース・ラクトース・マンニット寒天培地に穿刺してその黄変を見る方法で I 型菌の定性試験を行なった結果、 -10°C 120 時間目の発育コロニーはほとんど I 型菌であり、 0°C 21 日目は 3 分の 1 が I 型菌であった。すなわち、菌数測定のための 1 枚のペトリ皿内の I 型菌の発育は -10°C のは純培養に近く、 0°C のは雑菌と混在状態にあることが認められた。この定性試験から推察すると -10°C よりも 0°C の方が菌種間の拮抗作用が大であったと思われる。

Fig. 2 にマクロ切身の冷却曲線を示すが、寒天培地で見られた -10°C での過冷却現象は 3 回繰返し測定中 1 度も見られなかった。

これを要するに、本菌は低温抵抗性が著しく弱いことは確かであるが、魚肉に付着した場合にはその抵抗性が相当に強化されることは注目すべき点である。従って、本菌付着の恐れのある魚貝類を、長期間凍結冷蔵した場合はともかく、短期間冷蔵・凍結処理することによって本菌を死滅せしめて食中毒を予防しようとするのは、食品衛生上から期待できないように考えられる。

摘 要

- (1) 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* の 0°C 以下における低温抵抗力を調べた。
- (2) 寒天培養基に接種し純培養状態で -20°C 、 -10°C および 0°C に放置すると、接種菌量により多少の長短はあるが、接種菌全部が相当短期間に死滅した。
- (3) 市販マクロ切身に接種して同様な放置試験を行なった結果は、短期間では全部が死滅しなかった。
- (4) 腸炎ビブリオ付着の恐れのある魚貝類を冷蔵・冷凍することによって、短期間に本菌を死滅させて食中毒を予防しようとするのはできないであろうと論じた。

引用文献

- 1) 柳沢文徳：魚介類食中毒と好塩性細菌，食品衛生研究，**10**，(6) 35~43 (1960)
- 2) 我妻正三郎：病原性好塩菌に関する研究，第3報 主として昭和34年に発生した食中毒患者から検出した菌種群について，同上，**11**，(4) 60~74 (1961)
- 3) 浅川末三：瀬戸内海における腸炎ビブリオの分布，I. 夏季調査について，本紀要，**6**，213~221 (1965)
- 4) H. RAJ and J. LISTON.: Survival of Bacteria of Public Health Significance in Frozen Sea Foods, *Food Technology*, **15**, 429-434 (1961)
- 5) V. C. FELSTEHAUSEN, D. H. STRONG, and J. H. TORRIE.: The Influence of Selected Bacteria upon the Flavor of a Precooked Frozen Poultry Product, *ibid.*, **17**, 654-656 (1963)
- 6) 堀江 進・佐伯和昭・奈良正人・小嶋秩夫・関根 隆・高柳 健：病原性好塩菌の沿岸海域における分布，日本水産学会誌，**29**，785~793 (1963)

SUMMARY

Vibrio Parahaemolyticus, a major causative organism of food poisoning in Japan, is known to be widely distributed in the coastal sea areas, and it is supposed that the marine products, such as fish and cuttlefish, may be previously contaminated with the organisms in sea water before landing. Furthermore, it has seemed that the organism is weak under low temperature conditions.

The present study was carried out on the resistivity of the organism for the culture at low temperature. On the pure cultures with an agar medium at -20 , -10 , and 0°C , they became extinct in a short period of storage time (Table 1). But on the similar experiments using tuna meat pieces inoculated with the organisms, a considerable number of them survived for a long time unexpectedly (Table 2).

Therefore, from the food hygiene point of view, it was found that the insufficient refrigerated or frozen marine products which had been attacked by the organisms are no safe foodstuffs from the susceptible of poisoning.