

TDH陽性*Vibrio parahaemolyticus*が推定原因食品から 検出された食中毒事例

土田千鶴子^{1*}, 小野 悦子^{1**}, 鈴木 暢枝¹⁾, 伊丹秀次郎^{1*}
横山 栄二²⁾, 小岩井健司²⁾

A case study of food poisoning in which the TDH-positive strain of *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from the incriminated food of the outbreak.

Chizuko TSUCHIDA¹⁾, Etsuko ONO¹⁾, Nobue SUZUKI¹⁾, Hidejiro ITAMI¹⁾
Eiji YOKOYAMA²⁾, Kenji KOIWA²⁾

I はじめに

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) による食中毒は、ここ数年間増加傾向にあり、1998年には事件数・患者数ともに国内食中毒事例のトップとなった¹⁾。近年の*V. parahaemolyticus*による食中毒の増加要因として、*V. parahaemolyticus*血清型O3:K6による食中毒の増加が指摘されている^{2,3,4)}。*V. parahaemolyticus*血清型O3:K6は、1994年にインドのカルカッタで分離されて以来全世界的に食中毒の原因となっており^{3,4)}、我が国の沿岸環境中にも定着していることが報告されている^{5,6)}。*V. parahaemolyticus*の病原因子として耐熱性溶血毒 (TDH) および耐熱性溶血毒類似溶血毒 (TRH) が病原性に関与していると推察されている⁷⁾。しかしながら、*V. parahaemolyticus*による食中毒の際、患者からはTDHまたはTRH陽性株が分離されるが食中毒の推定原因食品からTDHまたはTRH陽性株が分離されるのは非常にまれである¹⁾。また、市販の魚介類や海水などの環境からもTDH陽性株を分離することは非常に困難であることも知られている^{1,8)}。著者らは、1998年の春から秋にかけて市販魚介類からの*V. parahaemolyticus*分離を試み、71検体中27検体から*V. parahaemolyticus*を検出したが、それらは全てTDH陰性株であった⁹⁾。

*V. parahaemolyticus*による食中毒は、その発生が7月から9月に集中し8月に発生のピークを持つ夏期多発傾向にあるが¹⁾、今回我々は、1999年3月に*V. parahaemolyticus*血清型O3:K6による食中毒を経験し、推定原因食品から*V. parahaemolyticus*血清型O3:K6を検出したので報告する。

II 材料および方法

1) 疫学調査

平成11年3月20日、医療機関から木更津保健所へ食中毒症状を呈している患者がいる旨の通報があった。患者からの聞き取り調査の結果、寿司弁当チェーン6店舗が原因施設であることが疑われ、それぞれの店舗を管轄する木更津保健所 (5店舗) および

1) 木更津保健所

2) 衛生研究所

* 現山武保健所

** 現船橋保健所

(2000年11月10日受理)

安房保健所 (1店舗) で店舗への立ち入り調査を行った。

2) 細菌学的調査

患者便65検体、原因施設の従業員便86検体、同ふきとり36検体、同収去食品157検体について、SS, DHL, TCBS, ビブリオ寒天による直接塗抹培養を行った。同時に患者便、従業員便については、1%食塩加アルカリ性ペプトン水 (pH8.8)、セレナイトブイヨンを用いて、また原因施設のふきとり、収去食品については、食塩ポリミキシン・ブイヨン、ラバポート・ブイヨンを用いて増菌培養を行った。なお、検査初日に搬入された患者便7検体については、SIB, CIN, MSEY, NGKG, パツラー寒天平板による直接分離培養を行ったが、疫学調査の進展により腸炎ビブリオ食中毒であることが濃厚となったため、他の検体についてはこれらの検査は実施しなかった。

分離された菌株は、常法により生化学性状試験および血清学的試験を行い同定した。なお、*V. parahaemolyticus*が検出された場合には、KAP-RPLAキット (デンカ生研) を使用してTDH産生性について調査した。

汚染指標細菌については、食品の残品の量が少なく実施不可能であったため、*V. parahaemolyticus*と同様の生態を有し海産食品からしばしば検出される¹⁰⁾ *V. alginolyticus*の検出状況について調査した。

3) パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE)

満田ら¹¹⁾に準じて、検出された*V. parahaemolyticus*のPFGEを行った。制限酵素Not I で処理後、CHEF-DR III (Bio Rad) を用いてpulse time 1~50秒、温度12°Cで20時間泳動した。

III 結果

1) 疫学調査

患者発生期間は平成11年3月16日から3月23日であり (図1)、喫食者数679名中、木更津保健所および安房保健所管内で323名の有症者が発生した。12~28時間で有症者の8割が発症しており、下痢、腹痛、吐き気、嘔吐、発熱 (37~39°C) を主徴としていた。

原因施設の寿司弁当チェーン店は、セントラルキッチン1店舗 (以下「S店」という。) が販売店の寿司ネタを加工し、販売店5店舗 (以下、「A店」、「B店」、「C店」、「D店」および「E店」という。) で販売されていた。販売店ごとに購入日別の患者発生数を調査したところ、3月20日のB店では患者の発生がなかった

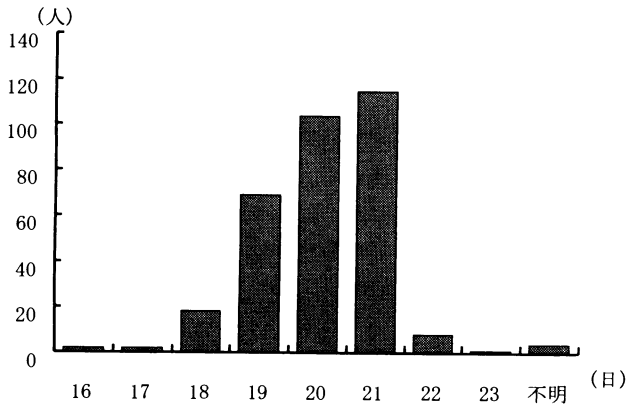


図1 日別患者発生状況

(表1)。聞き取り調査の結果、B店では客からホタテの臭気が強い旨の苦情があったことから、3月20日のメニューからホタテを除外していたことが明らかとなった。また、他店舗の従業員からもホタテの臭気が特に強かったことを聴取出来た。

ホタテの取り扱いについて調査したところ、S店で3月12日に冷凍ホタテ50kgを仕入れ、3月14日に8kg、3月15～18日に毎日10kg、3月19日に2kgを加工していた。その際に、製造マニュアルではホタテを冷蔵庫内で解凍することとなっていたにも関わらず、室温で20～22時間かけて行っていた。この時期の外気温について調査したところ、3月14～19日にかけて気温が高い状態であった(図2)。

2) 細菌学的調査

患者便37検体、従業員便2検体および食品3検体から*V. parahaemolyticus*が検出された(表2)。検出された*V. parahaemolyticus*

表1 購入日別患者発生状況

| 購入店 | 購入日 | | | | | | 計 |
|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| | 3/15 | 3/16 | 3/17 | 3/18 | 3/19 | 3/20 | |
| A | 0 | 0 | 3 | 3 | 19 | 43 | 68 |
| B | 2 | 0 | 5 | 15 | 29 | 0 | 51 |
| C | 0 | 0 | 0 | 9 | 10 | 40 | 59 |
| D | 0 | 0 | 7 | 23 | 3 | 17 | 50 |
| E | 0 | 0 | 8 | 27 | 39 | 21 | 95 |
| 計 | 2 | 0 | 23 | 77 | 100 | 121 | 323 |

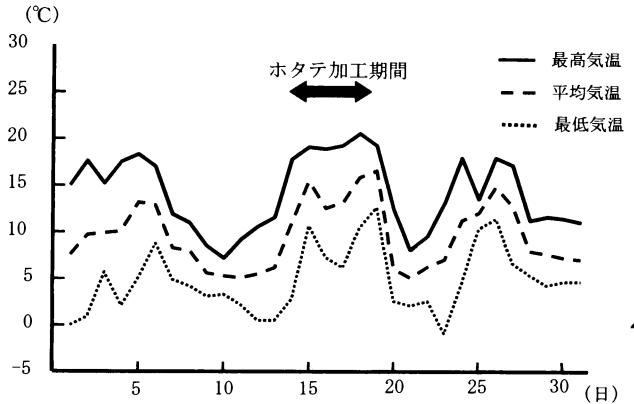


図2 3月の気温変化

の血清型は、患者便および従業員便から検出された株の全てと、ホタテから検出された1株およびアナゴから検出された1株がO3:K6であった。そのうち、患者便および従業員便から検出された株の全てと、ホタテから検出された1株がTDH陽性であった(表3)。なお、*V. parahaemolyticus*以外の食中毒細菌は検出されなかった。

表2 *V. parahaemolyticus*検出状況

| 検体 | S店 | A店 | B店 | C店 | D店 | E店 | 計 |
|------|-------|------|------|--------|------|-------|-------|
| 食品 | 2*/56 | 0/0 | 0/20 | 1**/27 | 0/27 | 0/27 | 3/157 |
| ふきとり | 0/6 | 0/6 | 0/7 | 0/8 | 0/6 | 0/3 | 0/36 |
| 患者便 | ND | 4/7 | 3/8 | 3/8 | 8/9 | 19/33 | 37/65 |
| 従業員便 | 0/8 | 0/11 | 0/15 | 2/18 | 0/21 | 0/13 | 2/86 |

V. parahaemolyticus 検出検体数/検体数

*ホタテ、カズノコ

**アナゴ

表3 検体別*V. parahaemolyticus*検出状況

| 検体 | 分離培地 | 血清型 | TDH |
|-------|--------------|--------|-----|
| 患者便 | TCBS, ビブリオ寒天 | O3:K6 | + |
| 従業員便 | TCBS, ビブリオ寒天 | O3:K6 | + |
| ホタテ* | ビブリオ寒天 | O3:K6 | + |
| | ビブリオ寒天 | O2:KUT | - |
| カズノコ* | ビブリオ寒天 | O2:KUT | - |
| アナゴ** | TCBS, ビブリオ寒天 | O3:K6 | - |

*S店で3/18に加工

**C店で3/19に販売

S店の保存検食からの*V. alginolyticus*検出状況は、3月18日の検食から多く検出され、食材としてはホタテから多く検出されていた(表4)。また、販売店の保存検食からは、加熱食品であるポイルエビやタマゴからも*V. alginolyticus*が検出された(表5)。

3) PFGE

ホタテ由来と患者由来のTDH陽性株(血清型O3:K6)のPFGEパターンは、パターンが全く一致する株と、250kbpおよび390kbp付近のバンド1~2本の差異が認められる株とに大別された(図3)。

表4 S店の保存検食からの*V. alginolyticus*検出状況

| 検食 | 加工日 | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 14日 | 15日 | 16日 | 17日 | 18日 | 19日 | 20日 |
| シャケ | | | | | ○ | | |
| タコ | | | | | | | |
| マグロ | | | | | | | |
| イカ | | | | | | | |
| カズノコ | | | | | ◎ | ○ | |
| イクラ | | | | | | | |
| ホタテ貝柱 | | ○ | ○ | | ◎ | ◎ | ○ |
| アナゴ | | | | | ○ | ○ | |
| ウナギ | | | | | | | |
| サバ | | | | | | | |

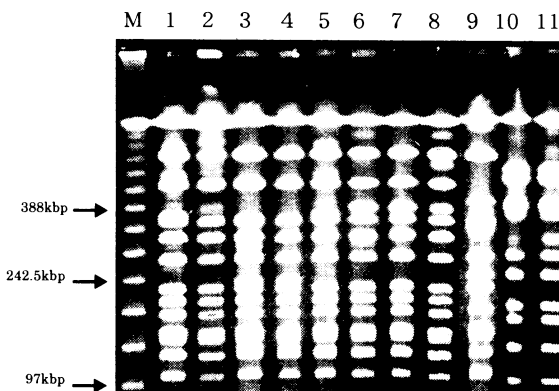
◎ 直接塗抹で*V. alginolyticus*陽性
○ 増菌培養で*V. alginolyticus*陽性

表5 販売店の保存検食からの*V. alginolyticus*検出状況

| 検食 | B店* | | C店 | | | D店 | | |
|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 17日** | 18日 | 18日 | 19日 | 20日 | 18日 | 19日 | 20日 |
| シャケ | | | | | | | ○ | ◎ |
| タコ | | | | | | | ○ | ○ |
| マグロ | | | | | | | | |
| イカ | | ○ | | | | ○ | ○ | |
| イクラ | ◎ | ○ | ○ | ○ | | | ○ | |
| ホタテ貝柱 | ◎ | | | | | | | |
| アナゴ | ◎ | ○ | | | ○ | | | |
| ツブガイ | ◎ | ○ | ◎ | ○ | ○ | ○ | ◎ | ○ |
| タマゴ | ○ | | ○ | ○ | ○ | | ◎ | ○ |
| 甘エビ | | | | | | | ○ | |
| ポイルエビ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | | |

◎ 直接塗抹で*V. alginolyticus*陽性
○ 増菌培養で*V. alginolyticus*陽性

*販売店
**販売日



M: 48.5kbp ladder
1~4: 木更津保健所管内患者由来株
5~7: 安房保健所管内患者由来株
8: ホタテ由来TDH陽性株(血清型O3:K6)
9: アナゴ由来TDH陰性株(血清型O2:K不明)
10: カズノコ由来TDH陰性株(血清型O2:K不明)
11: ホタテ由来TDH陰性株(血清型O2:K不明)

図3 検出された*V. parahaemolyticus*のPFGEパターン

IV 考察

疫学調査の結果、ホタテをメニューからはずした3月20日のB店での購入者に患者発生が認められなかったこと、*V. parahaemolyticus*が検出された従業員2名は苦情があったホタテを試食していたことから、ホタテが推定原因食品として疑われた。また、細菌検査によりホタテからTDH陽性*V. parahaemolyticus*が検出され、患者由来株と血清型が一致した。患者由来株のPFGEパターンは、ホタテから検出されたTDH陽性*V. parahaemolyticus*と全く同一パターンを示す株とバンド1~2本の差異が認められる株とに大別されたが、PFGEによる細菌のゲノムDNA解析では同一の集団発生由来株間ではバンドが2~3本異なる株であっても同一クローン由来であることが強く示唆される¹²⁾ことから、ホタテ由来TDH陽性*V. parahaemolyticus*と患者由来株は同一クローン由来であることが示唆され、今回の食中毒の原因食品がホタテであったことが確認された。

今回の事例では、原因食品となったホタテを製造マニュアルに違反して室温解凍しており、その間の気温が高かったために室温解凍中にホタテを汚染していた*V. parahaemolyticus*が増殖したことが食中毒の誘因として考えられる。また、*V. alginolyticus*が加熱食品である卵焼きやポイルエビから検出されていた(表5)ことから、調理行程での交叉汚染が考えられ、セントラルキッチンであるS店および各販売店において衛生的な食品の取り扱いが出来ていなかったことが推察される。

食品からTDH陽性*V. parahaemolyticus*を検出することは非常に困難であることが知られているが、その理由については未だ明らかとなっていない。Paceら¹³⁾は、食品中に存在するTDH陽性*V. parahaemolyticus*はTDH陰性株に比較して培養不可能な状態(Viable but Not Culturable)になりやすいと報告しており、また、寒冷刺激を受けた*V. parahaemolyticus*はTCBSのようなピブリオ用の選択培地に発育せず非選択性培地のみで発育することが報告されている¹⁴⁾。今回の事例では、食品からの*V. parahaemolyticus*検出の際に使用したTCBSとピブリオ寒天のうち選択性の弱いピブリオ寒天からのみTDH陽性*V. parahaemolyticus*が検出されており(表3)、使用する培地の検討が必要であると思われる。また、TDH陽性*V. parahaemolyticus*の菌量は増菌培養後もTDH陰性*V. parahaemolyticus*よりも少ないため分離培地上に出現した*V. parahaemolyticus*のコロニーを数多く検査する必要がある^{15),16),17),18),19)}。今回の事例でも数回にわたり増菌培地から分離培地へ接種してTDH陽性*V. parahaemolyticus*を検出したが、非常に多大な労力を必要としたため、今後、PCRによってTDH産生遺伝子であるtdh遺伝子の有無をスクリーニングする方法^{15),16),17),18),19)}や、免疫磁気ビーズによって菌量の少ないTDH陽性*V. parahaemolyticus*を集菌する方法²⁰⁾を導入する必要があると思われる。

謝辞

食中毒の検査を行っていただいた、木更津および安房保健所の食品衛生監視員および検査課の関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 島田俊雄, 荒川英二 (2000): 最近の腸炎ビブリオ食中毒事情 防菌防黴誌, 28, 157-167
- 2) Bag, O. K., Nandi, S., Bhadra, R. K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Nishibuchi, M., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Y. and Nair, G. B. (1999): Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. J. Clin. Microbiol. 37, 2354-2357
- 3) Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J. and Nishibuchi, M. (2000): Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strain evidence by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. J. Clin. Microbiol. 38, 578-585
- 4) Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A. K., Garg, S., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B. and Nishibuchi, M. (1997): Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southwest Asian travelers arriving in Japan. J. Clin. Microbiol. 35, 3150-3155
- 5) Arakawa, E., Murase, T., Shimada, T., Okitsu, T., Yamai, S. and Watanabe, H. (1999): Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 52, 246-247
- 6) 刑部陽宅, 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 北村敬 (2000): 免疫磁気ビーズによる海水からの耐熱性血溶毒産生性腸炎ビブリオO3:K6の分離 日食微誌, 17, 5-10
- 7) Shirai H., Ito, H., Hirayama, H., Nakabayashi, Y., Kumagai, K., Takeda, Y. and Nishibuchi, M. (1990): Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. Infect. Immun., 58, 3568-3573
- 8) 廣瀬昌子, 須釜久美子, 力田正二, 加藤一夫, 氏家悦男 (2000): 環境の腸炎ビブリオ検査 病原微生物検出情報, 21, 147-148
- 9) 土田千鶴子, 小野悦子 (1998): 未発表
- 10) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山武, 工藤康雄, 伊藤武 (1985) 腸炎ビブリオ, 腸管系病原菌の検査法, p125-138, 医学書院
- 11) 満田年宏, 荒井一二, 川本進, 横田俊平(1995): パルスフィールドゲル電気泳動法による感染症の分子疫学的解析 日細菌誌, 50, 1077-1086
- 12) Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., 33, 2233-2239
- 13) Pace, J. L., Chai, T.-J., Rossi, H., A. and Jiang, X. (1997): Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2372-2377
- 14) Kumazawa, N. H., Kato, E., Takaba, T. and Yokota, T. (1988): Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in two gastropod mollusks, *Clithon retropictus* and *Nerita albicilla*. Jpn. J. Vet. Sci. 50: 918-924
- 15) 児玉実, 高垣紀子, 橋渡佳子, 石橋勝之, 毛利好江, 伊藤文明, 河本秀一, 笠間良雄, 山岡弘二, 萩野武雄 (2000): 食品のPCRスクリーニングが有効であった腸炎ビブリオO3:K6食中毒事例 病原微生物検出情報, 21, 33-34
- 16) 尾畑浩魅, 小西典子, 有松真保, 松下秀, 和田真太郎, 柳川義勢, 甲斐明美, 諸角聖 (2000): PCR法を用いた海水からのTDHおよびTRH産生腸炎ビブリオの検出 第33回腸炎ビブリオシンポジウム 臨床と微生物, 27, 112-113
- 17) 緒方喜久代, 阿部義昭, 湊祐一, 帆足喜久雄 (2000): 食品残品(にぎり寿司)から耐熱性溶血毒(TDH)産生性腸炎ビブリオO3:K6が検出された食中毒事例 病原微生物検出情報, 21, 34-35
- 18) 斎藤志保子, 八柳潤, 安部真理子 (1999): 秋田県における腸炎ビブリオ分離状況および分離株(O3:K6 TDH+)のパルスフィールド・ゲル電気泳動による解析 病原微生物検出情報, 20, 9-10
- 19) 杉山明, 中野陽子, 岩出義人, 山内昭則, 中山治, 松本正, 廣幸音, 伊藤勤, 西中隆道, 庄司正, 熊澤教眞 (1999): 原因食品から耐熱性溶血毒産生性*Vibrio parahaemolyticus*が検出された食中毒事例 病原微生物検出情報, 20, 189-192
- 20) Tomoyasu, T. (1992) Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study. J. Clin. Microbiol., 58, 2679-2682