

助成番号 0919

## イカ塩辛における好塩性食中毒原因菌腸炎ビブリオの動態と迅速測定法

中口 義次

京都大学東南アジア研究所

**概要** 魚介類の生食を好む我が国の食習慣では、魚介類を汚染している食中毒病原体に対して注意を払う必要があり、行政も広く啓蒙している。2007年9月、関東9都県で大規模な腸炎ビブリオ食中毒が発生した。原因食品は、宮城県の水産加工業者が製造したイカ塩辛であった。塩分濃度が10%以上のイカ塩辛では、腐敗菌や食中毒菌の増殖が抑えられるが、現在人気の塩分濃度が5%前後のイカ塩辛では、腸炎ビブリオなど好塩性細菌の増殖には好都合となる。大規模食中毒の原因となったイカ塩辛はこの減塩タイプのもので、汚染した腸炎ビブリオの病原性菌株が増殖し、そのイカ塩辛を食べたヒトに食中毒症状を呈したものと思われた。腸炎ビブリオは、生および加熱不十分な魚介類を喫食を介して、ヒトに食中毒を引き起こす海洋性の好塩性細菌である。食中毒を引き起こす腸炎ビブリオの病原性菌株は、耐熱性溶血毒(TDH)およびTDH類似溶血毒(TRH)の両方もしくはどちらか一方を持ち、環境中での病原性菌株の分布頻度は腸炎ビブリオ全体の1%以下である。本研究では、日本の伝統的な塩蔵食品であるイカ塩辛において、塩分濃度と腸炎ビブリオの汚染および増殖の関係について調べることを目的とした。

イカ塩辛は、市販品あるいは自家製を使用した。イカ塩辛の塩分濃度は、塩分濃度計で測定した。一般細菌および腸炎ビブリオの検出には、LB寒天培地、標準寒天培地、1% NaCl加標準寒天培地、TCBS寒天培地、CHROMagar Vibrioを使用し、37度で培養した。イカ塩辛への接種実験には、腸炎ビブリオの病原性菌株を使用した。また、腸炎ビブリオの増殖可能な塩分濃度を調べた。

市販品のイカ塩辛は、塩分濃度10%以上の伝統的な高塩分のイカ塩辛と塩分濃度5%前後の低塩分のイカ塩辛に分かれた。これら両タイプと自家製のイカ塩辛における腸炎ビブリオの汚染を調べたところ、検出限界以下であった。腸炎ビブリオの病原性菌株を各種のイカ塩辛に接種したところ、時間の経過とともに菌数が減少した。その減少の傾向は、自家製イカ塩辛では緩やかで、市販品のイカ塩辛では、低塩分あるいは高塩分にかかわらず急激であった。腸炎ビブリオの増殖可能な塩分濃度は1-8%の範囲であった。

今回、市販品と自家製のイカ塩辛について、塩分濃度を指標として、腸炎ビブリオの汚染および増殖を調べたが、塩分濃度の違いによる明確な差はみられなかった。一方、一般細菌では、低塩分イカ塩辛は高塩分のイカ塩辛に比べて、10倍以上の一般細菌数があり、時間の経過とともに、菌数の差は大きなものとなった。また、他の要因として水分活性を考慮しながら、腸炎ビブリオの汚染および増殖を検討する必要があると思われた。

## 1. 研究目的

我が国では、毎年1,000件以上の食中毒事例が発生し、3万人以上の患者が報告されている。そのほとんどが、細菌やウイルスによる食中毒である。また、生鮮魚介類を生で食べることを好む我が国の食習慣では、魚介類を汚染している食中毒病原体に対して、特に注意が必要である

といえる。2007年9月、宮城県の食品加工業者が製造したイカ塩辛による大規模な腸炎ビブリオ食中毒が、関東9都県の広範囲にわたって発生した。その規模は、92件の食中毒事例と620名の患者数と報告されている。イカ塩辛とは、加熱処理されていない鮮度の良いイカを使用して、イカの胴肉とキモ(肝臓)、食塩、必要に応じてその他の調

味料などを加えることに作り出される伝統食品である<sup>1)</sup>。古く冷蔵庫のない時代に、魚介類を保存するために考案された塩蔵食品である。また、イカ塩辛は、現在最も人気のある塩辛である。伝統的なイカ塩辛は、高濃度の食塩を加えて、腐敗を防ぎながら、イカの肝臓に含まれる自己消化酵素の働きにより、旨みを醸成させる食品である。10%以上の塩分濃度では、腐敗菌や食中毒菌の増殖が阻止されるので、常温保存ができる<sup>2)</sup>。しかし現在、イカ塩辛として一般的に販売されている商品のほとんどは、近年の減塩指向の影響から5%前後の塩分濃度である。この塩分濃度5%前後のタイプのイカ塩辛は、塩辛さが減り、口あたりが良く、比較的若年齢層にも受け入れられているようである。大規模食中毒の原因となったイカ塩辛も、この減塩タイプのイカ塩辛であり、汚染した腸炎ビブリオの増殖に好適であったと考えられる。

腸炎ビブリオ感染症は、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の病原性菌株で汚染された生または加熱不十分な魚介類の喫食を介して、ヒトに食中毒症状を引き起こす腸管感染症である。主な症状は下痢症であり、他にもまれであるが、腹痛、頭痛、嘔吐、発熱などの急性胃腸炎症状が報告されている<sup>3)</sup>。この感染症は、広く世界各地で発生が報告されており、一年中気温の高い熱帯や亜熱帯地域では一年中、温帯地域では比較的気温の高い夏場に多く発生している<sup>4)</sup>。

腸炎ビブリオは、海洋性で好塩性のグラム陰性の通性嫌気性桿菌であり、極単鞭毛および側毛を持ち運動性を示す。増殖速度が極めて速く、至適条件下では10分以内に分裂増殖する。また菌の生育には塩分が必要である。その生息域は、塩分が必要なことから、海水中および汽水域である。その活動は、水温が15°C以上で活発になるため、我が国では夏場によく分離され、夏場の食中毒原因細菌として、特に注目されている。この細菌は、1950年、大阪泉南地域で起こった「シラス食中毒事件」(患者272名と死者20名)の原因細菌として、大阪大学微生物病研究所の藤野恒三郎博士により発見された。その発見以降、アジア地域をはじめ、世界各地で腸炎ビブリオによる腸炎ビブリオ感染症が報告され、原因となる腸炎ビブリオの病原性菌株が分離されている<sup>4)</sup>。腸炎ビブリオのうち、食中毒患者から原因細菌として分離されるものの多くは溶血毒といわれる毒素を産生し、これが主要な病原性因子である。

主要な病原性因子として、耐熱性溶血毒 (thermostable direct hemolysin, TDH) と TDH 類似溶血毒 (TDH-related hemolysin, TRH) が知られている。特に、ある種の血液寒天培地上で神奈川現象という溶血活性を示す因子として、耐熱性溶血毒が世界的にも注目され、食中毒患者からの腸炎ビブリオ感染症の確定診断および食品検査における腸炎ビブリオの病原性菌株の汚染検査において、この毒素および毒素遺伝子が対象とされている。

腸炎ビブリオのリスク評価と対策として、「ゆでだこ」と「飲食に供する際に加熱処理を要しないゆでがに」については陰性であること、「生食用鮮魚介類」、「むき身の生食用カキ」および、「冷凍食品(生食用冷凍鮮魚介類)」については、最確数レベルで1gあたり100菌数以下とする成分規格がそれぞれ定められている。これら成分規格に対し、腸炎ビブリオ検査の公定法が定められている。また、米国では、生ガキにおける腸炎ビブリオのリスク評価が実施されている。その中で、「生ガキ1g中の腸炎ビブリオの総菌数が500,000の場合、腸炎ビブリオ感染症の発症率が50%である」などの成果が発表されている。

## 2. 研究方法

### 2.1 腸炎ビブリオ菌株および培養方法

実験に供した腸炎ビブリオ菌株は、病原性菌株 (*tdh* 遺伝子陽性, *trh* 遺伝子陽性) を使用した。腸炎ビブリオの培養については、L-broth 培地を用い、37°Cで18時間培養し、必要に応じて、1mlあたりの菌数をLB寒天培地あるいは1% NaCl加標準寒天培地上に接種して求めた。腸炎ビブリオの生育可能な塩分濃度を調べるために、NaClを使用して、塩分濃度を1%刻みのL-broth培地を作製し、腸炎ビブリオの病原性菌株を植菌し、37°Cで18時間培養して、生育状態を確認した。

### 2.2 細菌培養用培地と腸炎ビブリオ選択分離培地

菌数測定に用いた培地は、LB寒天培地、標準寒天培地(日水製薬株式会社)、1% NaCl加標準寒天培地、TCBS寒天培地(栄研化学)、CHROMagar Vibrio (CHROMagar, フランス)を使用した。標準寒天培地は一般細菌数を調べるために使用したが、腸炎ビブリオは、標準寒天培地中に塩分が含まれていないために生育できない。LB寒天培地および1% NaCl標準寒天培地は、一般細菌および腸炎ビブリオの菌数を測定するために使用し

た。また、腸炎ビブリオ選択分離培地である TCBS 寒天培地および CHROMagar Vibrio は、腸炎ビブリオの菌数測定のために使用した。全ての寒天培地は 37℃でインキュベートした。

### 2.3 イカ塩辛と塩分濃度

使用したイカ塩辛のうち、市販品については、実験室周辺のスーパーマーケットなどで入手した (Table 1)。また、自家製のイカ塩辛については、購入したスルメイカを Figure 1 に示す方法に従い作製した<sup>5)6)</sup>。それぞれのイカ塩辛の塩分濃度については、塩分濃度測定計 (C-121,

Table 1. 使用したイカ塩辛

商品名	製造会社	製造場所	購入場所	原材料	食塩相当量	実測塩分濃度 (%)
A	A	北海道	Aスーパー	いか、いか内臓、食塩、みりん、砂糖、ソルビット、pH調整剤、調味料(アミノ酸等)、着色料(紅麴)、増粘多糖類	4.7 g/100 g	4.7
B	B	北海道	Aスーパー	いか(函館産)、食塩、いかの肝臓、魚醤、酵母エキス、ソルビット、酒精、調味料(アミノ酸)、酸味料、増粘多糖類、着色料(紅麴、パプリカ)	5.0 g/100 g	6.0
C	A	北海道	Bスーパー	いか、いか内臓、食塩、みりん、砂糖、ソルビット、調味料(アミノ酸)、pH調整剤、着色料(紅麴、パプリカ色素)、増粘多糖類、(原材料の一部にゼラチンを含む)	5.2 g/100 g	4.4
D	C	北海道	Cスーパー	いか、食塩、還元水飴、たん白加水分解物、ソルビトール、pH調整剤、調味料(アミノ酸等)、酒精、着色料(紅花黄、カロチノイド、紅麴、ラック)、増粘剤(キサンタン)、(原材料の一部に乳、大豆を含む)	記載なし	3.9
E	D	京都府	Dスーパー	いか、食塩、みりん、ソルビット、調味料(アミノ酸等)、アルコール、pH調整剤、リン酸塩(Na)、増粘剤(キサンタンガム)、着色料(紅麴)、香辛料	記載なし	5.9
F	E	北海道	Eスーパー	いか、食塩、みりん、発酵調味料、調味料(アミノ酸等)、グリセロール、ソルビット、酒精、甘味料(甘草)、安定剤(キサンタン)、酸化防止剤(ビタミンE)	17.3 g/100 g	18.0
自家製イカ塩辛	自家製	石川県(イカ産地)	Dスーパー(イカのみ)	いか、いかの肝臓、食塩(天然塩)		4.5

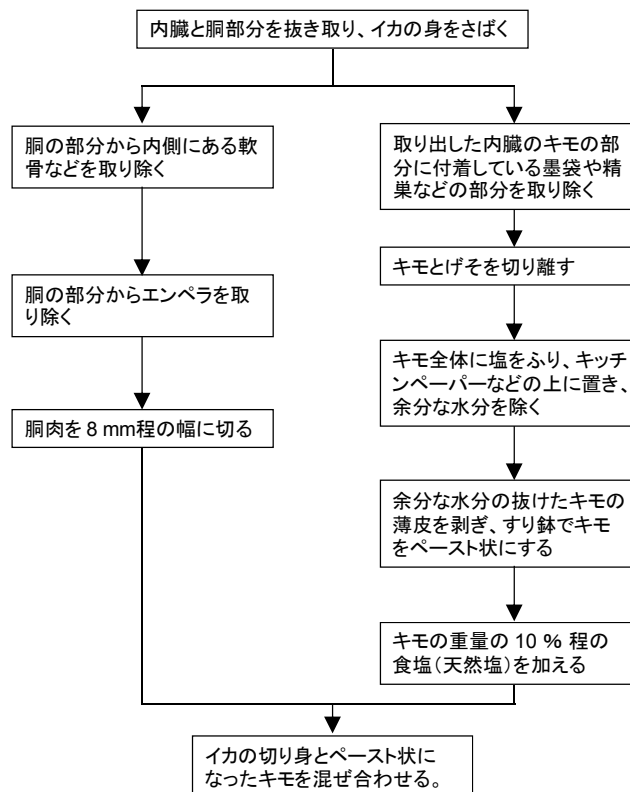


Figure 1. 自家製イカ塩辛の作製方法

堀場製作所)により求めた。

## 2. 4 細菌数測定のためのイカ塩辛の処理法

腸炎ビブリオ病原性菌株の一晩培養液を 1 ml あたり  $10^7$  の菌数になるように希釈して調整し、市販あるいは自家製のイカ塩辛 (100 g) に接種して、イカ塩辛 1 g あたりの腸炎ビブリオの菌数が  $10^5$  になるようにした。また同時に、腸炎ビブリオの病原性菌株を接種しないものを陰性コントロールとして準備した。それぞれ、25°C でインキュベートした。菌数測定のためのサンプリングは、インキュベート後、0 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間で実施した。サンプリングしたイカ塩辛 (10 g) は、10 倍希釈になるように生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) を使用した。さらに、その希釈溶液から生理食塩水を用いて段階希釈を実施し、その希釈溶液を各種寒天培地上に接種して 37°C で培養し、一般細菌数および腸炎ビブリオの菌数をコロニーカウント法により求めた。

## 3. 研究結果と考察

### 3. 1 腸炎ビブリオの増殖至適塩分濃度

腸炎ビブリオの生育至適塩分濃度を調べた。通常、腸炎ビブリオは塩分濃度が 0% の培地中では増殖することができない。一方、同じ *Vibrio* 属細菌のコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) は、塩分濃度が 0% の培地中であっても、増殖することが知られている。今回使用した腸炎ビブリオの病原性菌株では、塩分濃度が 0 から 8% に調整した培地中で、増殖することが確認できた (Figure 2)。塩分濃度が 0% および 9% 以上の培地中では、増殖を確認することができなかった。これは、腸炎ビブリオが、近年、消費者に

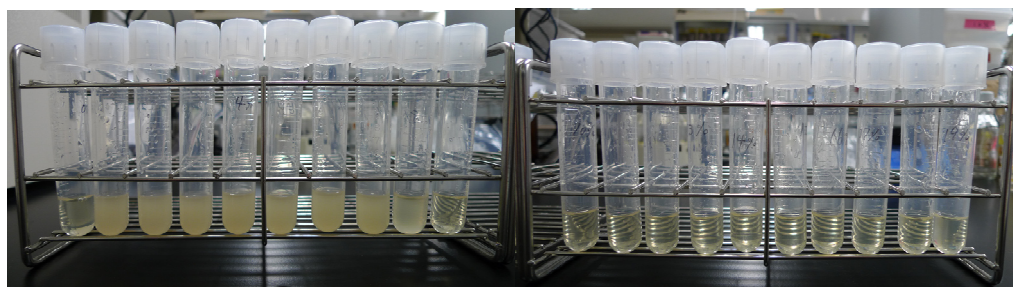
人気のある「低塩分イカ塩辛」といわれるような塩分濃度が 5% 前後のイカ塩辛の中では、腸炎ビブリオの増殖に好適であるということである。一方、塩分濃度が 10% 以上で 15% 程度の伝統的なイカ塩辛の中では、腸炎ビブリオがその塩分濃度の高さから、増殖しにくいもしくは増殖できないということが考えられた。

### 3. 2 市販品のイカ塩辛の塩分濃度

食品加工業者が製造し、一般的に流通している市販品のイカ塩辛について、その塩分濃度の実態調査を実施した。入手可能だった 6 品の塩分濃度について、塩分濃度測定計を用いて実測した。低塩分イカ塩辛といわれる塩分濃度が 5% 前後のイカ塩辛が 5 品、伝統的なイカ塩辛といわれる塩分濃度が 10% 以上のものが 1 品であった (Table 1)。どの商品においても、原材料や賞味期限 (未開栓) などの基本的な情報は記載されていた。また計 6 品のうち、4 品で塩分相当量の記載があった (Table 1)。塩分濃度計で実測した値は、記載されている塩分相当量に近いものであった。これらの結果から、近年、消費者に好まれているイカ塩辛は、塩分濃度が 10% 以上の伝統的なイカ塩辛ではなく、比較的塩分濃度が 5% 前後の低い塩分のイカ塩辛であることが分かった。また、保存方法として、低塩分イカ塩辛では、「要冷蔵」が明記されているのに対し、塩分濃度が 10% を超えるイカ塩辛では、「直射日光を避けて保存」と明記されていたのは、高い塩分濃度が、雑菌および食中毒菌などの増殖防止に効果があるということが知られているためであると考えられる。

### 3. 3 イカ塩辛中での一般細菌および腸炎ビブリオ

市販のイカ塩辛と作製した自家製イカ塩辛における一



培地中の塩分濃度 (%)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
腸炎ビブリオの増殖	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 2. 塩分濃度に依存した腸炎ビブリオの増殖

一般細菌および腸炎ビブリオの汚染状況を調べた。自家製のイカ塩辛は、スルメイカを購入し、スルメイカの胴肉および肝臓、食塩（天然塩）のみで作製し、保存料、調味料および着色料などは一切添加せずに、Figure 1 のようにして調理、作製した。腸炎ビブリオの病原性菌株の接種実験については、L-broth で一晚培養した菌液を1 ml あたり約 $10^7$  になるように希釈した後、それぞれのイカ塩辛に添加し、25°C でインキュベートし、それぞれの時間でサンプリングしたものを用いた。

市販品の低塩分のイカ塩辛を使用した結果では、腸炎ビブリオ添加および腸炎ビブリオ非添加のサンプルの両方において、標準寒天培地と1%のNaClを添加した標準寒天培地で、インキュベート時間が増えても、菌数に大きな差はみられなかった（Figure 3 A and B）。また、腸炎ビブリオ添加および腸炎ビブリオ非添加の両方において、インキュベート時間の経過に伴い、菌数の増加がみられ、0時間と比べると48時間では、約1,000倍に細菌数が増加していた（Figure 3 A and B）。一方、腸炎ビブリオを選択的に検出する2種類の培地であるCHROMagar VibrioとTCBS寒天培地上では、腸炎ビブリオの接種直後の0時間でのみ、腸炎ビブリオが検出された（Figure 3 C and D）。しかし、インキュベート時間が増加すると、0時間で検出されていた腸炎ビブリオは検出できなくなった。一方、腸炎ビブリオを接種していないサンプルからは、腸炎ビブリオは全く検出されなかったことから、この市販品の低塩分イカ塩辛には腸炎ビブリオの汚染がなかったことが分かった。

次に、市販品の約18%の高い塩分のイカ塩辛を使用した結果では、腸炎ビブリオ添加および非添加の両方において、25°Cでのインキュベート時間が延びても、一般細菌数の変化はみられなかった（Figure 4 A and B）。これは、低塩分のイカ塩辛では、その塩分濃度の低さから、25°Cという条件下では、細菌の増殖を抑えることができなかったが、高い塩分濃度のものでは、時間が経過しても、細菌数はほとんど増加せずに、低い細菌数のままで一定であることが分かった。一方、腸炎ビブリオの分離選択培地上では、腸炎ビブリオを添加したもので、0時間でのみ、腸炎ビブリオが検出された（Figure 4 C and D）。腸炎ビブリオ非添加のサンプルからは、腸炎ビブリオは検出されなかった。こ

の結果からも、この市販品の伝統的な高塩分タイプのイカ塩辛には、腸炎ビブリオの汚染はなかったことが分かった。両者の市販品を比較してみると、インキュベート0時間の一般細菌数で、約10倍の差があり、低い塩分のイカ塩辛の方が含まれる一般細菌数が多いことが分かった（Figure 3 A and Figure 4 A）。また、両方の市販品ともに、 $10^5$ の菌数で腸炎ビブリオを添加しても、時間の経過とともに、腸炎ビブリオが死滅するという事は予想外であった。2007年に、市販品の低塩分のイカ塩辛で腸炎ビブリオ食中毒が大規模に発生したことを考えると、少なくとも、低塩分のイカ塩辛では、腸炎ビブリオがある程度の菌数で維持されるか、もしくは菌数が増加するものだろうと考えていたからである。

原料がスルメイカと天然塩のみで作製した自家製のイカ塩辛（塩分濃度4.5%、Table 1）では、腸炎ビブリオ添加および非添加で、インキュベートの時間とともに一般細菌数が増加するという低塩分イカ塩辛と同様の傾向がみられた（Figure 5 A）。また、一般細菌だけでなく好塩性細菌も検出できるように改良した1%NaClを加えた標準寒天培地上では、標準寒天培地と比べて、菌数が相対的に高いことが分かった（Figure 5 A and B）。これは、スルメイカに付着していた好塩性細菌が自家製のイカ塩辛の中で増加したためではないかと考えられる。一方、市販品の両方のタイプで、この傾向がみられなかったのは、食品加工業者がイカ塩辛を製造する過程で、イカに付着していると考えられる細菌を除去しているためではないだろうかと考えられる。また、腸炎ビブリオを選択的に培養できる両方の培地上では、腸炎ビブリオ添加のサンプルで、インキュベートが24時間まで、腸炎ビブリオを検出することができた（Figure 5 C and D）。インキュベート時間が長くなるに従って、腸炎ビブリオの菌数は減少し、48時間後では検出できなかった。また、先の市販品の両方のタイプで、インキュベートが6時間後で、すでに添加した腸炎ビブリオが検出できなくなっていたが、自家製のイカ塩辛では、その減少は緩やかであった。これは、自家製のイカ塩辛に含まれていない物質が、市販品のイカ塩辛には含まれており、その腐敗防止や日持ち向上などといった働きによるものではないかと考えられた。

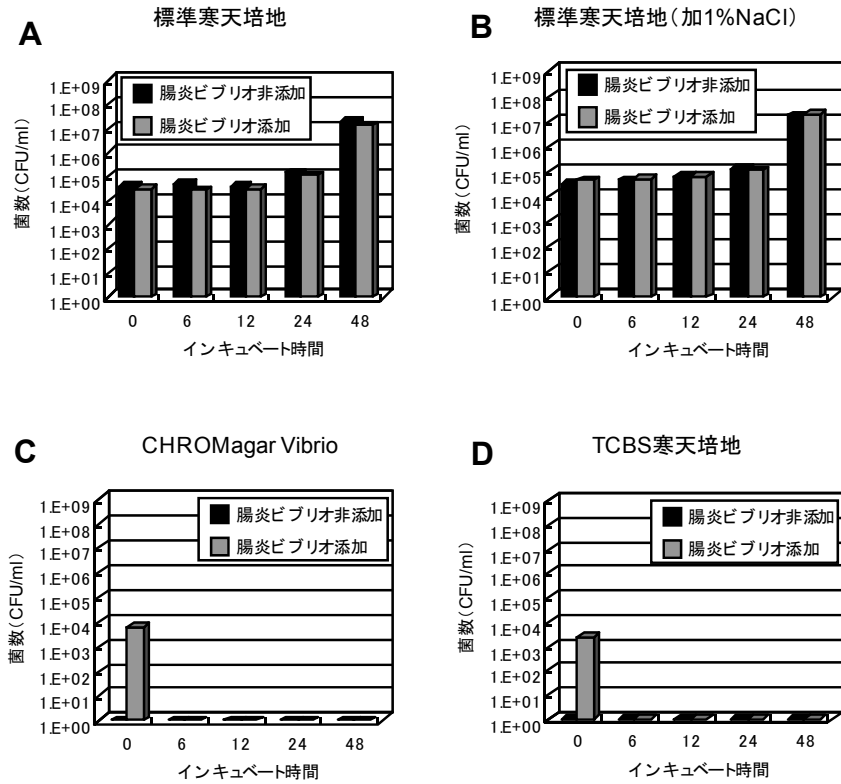


Figure 3. 市販品の低塩分イカ塩辛中での一般細菌および腸炎ビブリオの検出

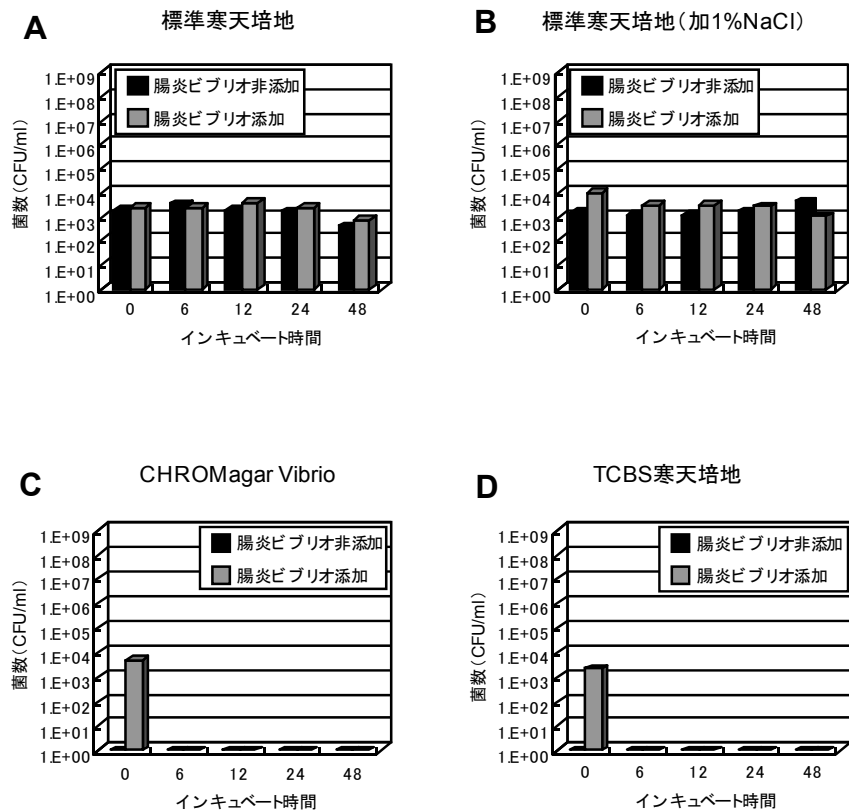


Figure 4. 市販品の伝統的な高塩分イカ塩辛中での一般細菌数および腸炎ビブリオの検出

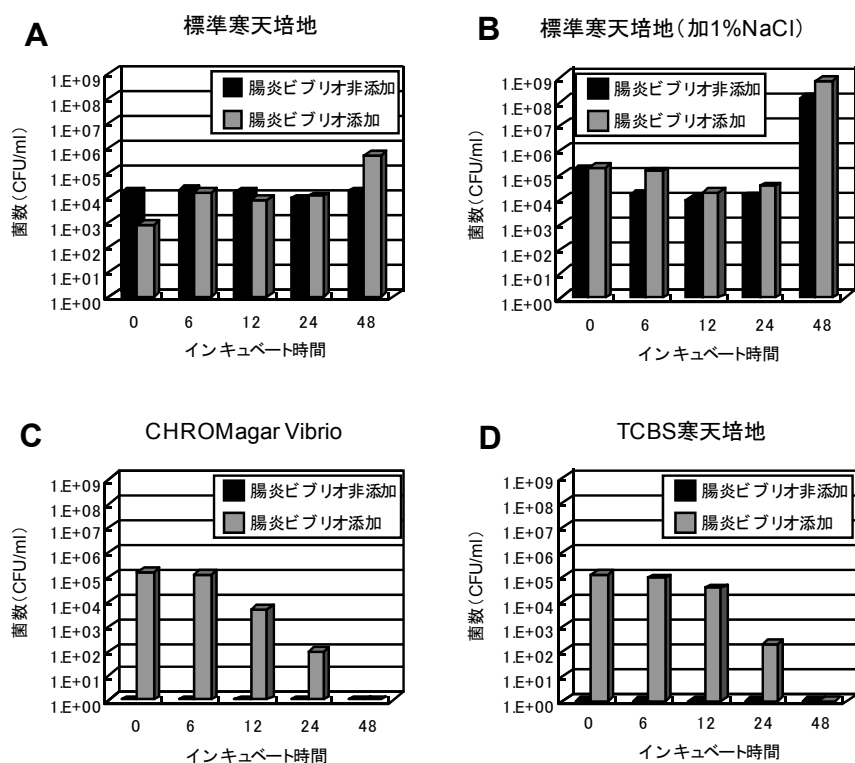


Figure 5. 自家製イカ塩辛中での一般細菌および腸炎ビブリオの検出

## 5. 今後の課題

3つのタイプのイカ塩辛(市販品で低塩分タイプのイカ塩辛, 市販品で高塩分タイプのイカ塩辛, 自家製で低塩分タイプのイカ塩辛)に、腸炎ビブリオを接種し、その増殖を検討したが、予想に反して、どのタイプのイカ塩辛においても、腸炎ビブリオの菌数の増加はみられなかった。腸炎ビブリオ食中毒の原因となるイカ塩辛の中に存在する腸炎ビブリオの病原性菌株を迅速に検出する方法の開発を予定していたが、先の結果のように、どのタイプのイカ塩辛においても、腸炎ビブリオは死滅してしまったため、今回、イカ塩辛中からの腸炎ビブリオの病原性菌株の検出系の開発は断念した。

今回、それぞれのイカ塩辛において、塩分濃度を指標とした腸炎ビブリオの増殖を検討したが、装置が手元にない理由から、その食品の水分活性を指標とした検討はできなかった。食品サンプルに汚染している細菌を調べる場合、水分活性は重要な要因でもある。今回、どのイカ塩辛の中でも、腸炎ビブリオが死滅したことを考えると、その生育および増殖の要因として、水分活性を検討するべきであると考えられた。水分活性測定器を購入し、さらなる検

討を実施する予定にしている。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、研究助成金を賜りました財団法人ソルト・サイエンス研究財団(現、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団)に厚くお礼を申し上げます。

## 文献など

- 1) 藤井建夫著、1992年、塩辛・くさや・かつお節、恒星社厚生閣
- 2) 藤井建夫著、2000年、魚の発酵食品、成山堂書店
- 3) 西沢光昭、2009年、食品安全の事典の「腸炎ビブリオ」の項目、朝倉書店、109-114頁
- 4) 中口義次など、2006年、世界レベルで重視される腸炎ビブリオ食中毒、生物の科学「遺伝」別冊19号127-135頁
- 5) 臼井一茂著、1996年、塩辛づくり隠し技、創森社
- 6) 内山高典、室橋裕和著、2002年、手作りの味 塩辛づくし、雄鶏社

No. 0919

## Dynamics and Rapid Detection Method of *Vibrio parahaemolyticus*, a Halophilic Food Poisoning Bacterium, in Salted Cuttlefish

Yoshitsugu Nakaguchi

Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University

### Summary

Japanese people like raw seafood. Therefore we must pay attention to the handling of them. There was a large food-poisoning outbreak by *Vibrio parahaemolyticus* in the Kanto area on September 2007. The cause of this outbreak was salted cuttlefish produced in the Tohoku area. The salted cuttlefish which is called Ika-no-shiokara in Japanese is a traditional salted food in Japan. High levels of salt in this food prevent growth of putrefactive bacteria and food-poisoning bacteria. On the other hand, low-salt one which is popular now is suitable for the growth of them. This food which caused the large outbreak was the latter case. Virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* cause a *Vibrio parahaemolyticus* infection for human. The major virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* are thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH). The virulent strain of *Vibrio parahaemolyticus* has one or both virulent genes. The purpose of this study is to clarify the relations of the salinity in salted cuttlefish and the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. Both marketed and self-cooked salted cuttlefish was used in this study. *Vibrio parahaemolyticus* was able to grow in an environment of 1 - 8% salinity. There were two types of the salted cuttlefish in the market. One was the low salinity (around 5%), and the other was high salinity (over 10%). There were no strains of *Vibrio parahaemolyticus* in both types. After inoculation of *Vibrio parahaemolyticus*, a number of bacteria of *Vibrio parahaemolyticus* drastically decreased in these foods. Concerning the difference of the salinity, there was no difference in the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. On the other hand, the viable bacterial counts in low salinity of salted cuttlefish were higher than that in high salinity.