

イカ塩辛による腸炎ビブリオ食中毒事例

An Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning on Squid guts pickled in salt

加藤 浩之 高橋 恵美 佐々木ひとえ
小林 妙子 菅原 優子 谷津 壽郎
齋藤 紀行*¹

Hiroyuki KATO, Emi TAKAHASHI, Hitoe SASAKI
Taeko KOBAYASHI, Yuko SUGAWARA, Juro YATSU
Noriyuki SAITO

平成 19 年に宮城県で製造されたイカ塩辛を原因食品とした大規模食中毒事件が発生し、患者総数は 620 名で 1 都 8 県に及んだ。食中毒患者便からは従来法で、原因食品からは PCR と K6 免疫磁気ビーズと増菌法を組み合わせた方法で腸炎ビブリオ O3 : K6 耐熱性溶血毒 (TDH) 陽性が検出された。

キーワード：腸炎ビブリオ O3 : K6 ; TDH ; K6 免疫磁気ビーズ

Key words : *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 ; Thermostable Direct Hemolysin ; K6 Immunomagnetic Particles

1 はじめに

平成 19 年度に宮城県（仙台市を除く）において発生した食中毒事件数は 16 件であった。病因物質別ではノロウイルスによるものが 5 件と最も多く、細菌性の食中毒ではカンピロバクター 4 件、ついで腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* 以下 V.p) 2 件であった。V.p は 1950 年、大阪で発生したシラス大規模食中毒事件の原因菌で藤野により、初めて発見されて以来、小規模な食中毒事件が繰り返された^{1) 2)}。塩釜市内で製造されたイカ塩辛を原因食品とする、本県としては初めて経験した V.p による大規模食中毒事件であった。

2 食中毒事件の概要

平成 19 年 9 月 8 日から 15 日にかけて横浜市、横須賀市、茨城県において V.p による広域食中毒事件が 6 件発生した。いずれの事件でも患者らの共通食が同一施設で製造されたイカ塩辛のみであること。また、患者の便およびイカ塩辛より V.p O3 : K6 を検出したことから、当該原因施設が製造したイカ塩辛を原因食品とする食中毒と断定された。この事例は 1 都 8 県で広域的に発生し、イカ塩辛を食べた 2,050 名中 620 名が、下痢、腹痛、嘔吐などの症状を呈し入院を必要とした (表 1)。

保健所の調査で、汚染経路の特定には至らなかったものの、以下の事実が明らかになった。

- ①温度管理がなされていない製造室で長時間の作業を行っていた。
- ②充填・包装室の空調設備が、8 月中旬から 9 月中旬まで故障していた。
- ③製品の温度管理がなされていなかった。
- ④原料 (イカ耳, イカ腑), イカ洗浄に使用する殺菌海水、

- 製品等に関する定期的な自主検査を実施していなかった。
- ⑤作業手順書, 施設管理に関する記録に不備があった。
- ⑥製造および品質管理体制も構築が不十分であった。

3 材料および方法

3.1 材料

発症者便 3 件, 食品 26 件 (塩辛製品 16 件, 塩辛残品 1 件, イカ耳 1 件, イカ腑 8 件), 拭き取り 11 件およびイカ洗浄に使用する殺菌海水 1 件を検査材料とした。

3.2 培地等

増菌用培地：アルカリペプトン水 (以下 APW ; 栄研化学) 食塩ポリミキシンブイヨン (以下 SPB ; 日水製薬) 分離用培地：TCBS 培地 (日水製薬), クロモアガービブリオ (以下 CV 培地 ; 関東化学)

生化学性状培地：1% NaCl 加 TSI (栄研化学), 1% NaCl 加 LIM (日水製薬), 0, 3, 8, 10% NaCl 加ブイヨン (関東化学)

血清型別試験：腸炎ビブリオ型別用免疫血清 (デンカ生研)

免疫磁気ビーズ：Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG (Dynal 社) 免疫磁気ビーズで、これに腸炎ビブリオ免疫血清を混合吸着させたもの

PCR 用プライマー：耐熱性溶血毒遺伝子 (以下 VPD-1.2; Takara 社)

表 1 食中毒事件の概要

発生年月日	2007/9/8
摂食者数	2,050名
患者数	620名
原因食品	イカ塩辛
原因物質	腸炎ビブリオ O3 : K6
原因施設	塩釜市内の魚介類加工業施設

* 1 現 東北生活文化大学

耐熱性溶血毒産生試験：逆受身ラテックス凝集反応（以下 KAP-RPLA；デンカ生研）

3.3 方法

便および拭き取り検査は微生物検査必携の方法³⁾に従い、直接塗抹培養および増菌培養で食中毒菌の検索を行った。食品以外の検体を用いた V.p の検査手順を示した（図1）。海水については V.p 最確数法（以下 V.p MPN）を実施した。

食品からの V.p 検出法 A 法から E 法を示した（図2）。

直接法（以下 A 法）：食品 100g に PBS100ml を加えたものをストマッカー処理後、その 25 μ l を TCBS 培地および CV 培地に直接塗抹し、37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後検出する。

増菌法（以下 B 法）：食品 100g に PBS100ml を加えたものをストマッカー処理後、その 1ml を APW に加え 37 $^{\circ}$ C 18 時間増菌培養後 25 μ l を TCBS 培地および CV 培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後検出する。

2段階増菌法（以下 C 法）：食品 25g に APW225ml を加え 37 $^{\circ}$ C 6 時間培養後、その 1ml を SPB に加え 37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後 25 μ l を TCBS 培地および CV 培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後検出する⁴⁾。

PCR+K6 免疫磁気ビーズ法（以下 D 法）：食品 25g に APW225ml を加え 37 $^{\circ}$ C 6 時間培養後その培養液 1ml について PCR を行い、TDH 陽性のものを K6 免疫磁気ビーズに吸着させ、その 25 μ l を TCBS 培地および CV 培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後検出する⁵⁾。

PCR+K6 免疫磁気ビーズ増菌法（以下 E 法）：食品 25g に APW225ml を加え 37 $^{\circ}$ C 6 時間培養後、その培養液 1ml について PCR を行い、TDH 陽性のものを K6 免疫磁気ビーズで吸着させ、その 25 μ l に APW1ml を加え 37 $^{\circ}$ C 18 時間増菌培養後 TCBS 培地および CV 培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C 18 時間培養後検出する。

PCR：各菌株を滅菌蒸留水に懸濁後、96 $^{\circ}$ C 6 分加熱し、10,000rpm で遠心した上清をテンプレートとした。Primer は VPD-1, 2 を用い電気泳動後、耐熱性溶血毒（以下 TDH）を確認した。

使用殺菌海水：原液、10 倍、100 倍希釈液について各 3 本を MPN 管で培養した。各 MPN 管から TCBS 培地および CV 培地で V.p を分離し、菌株の生化学的性状確認を行い 100ml 当たりの MPN 値を算出し菌数とした。

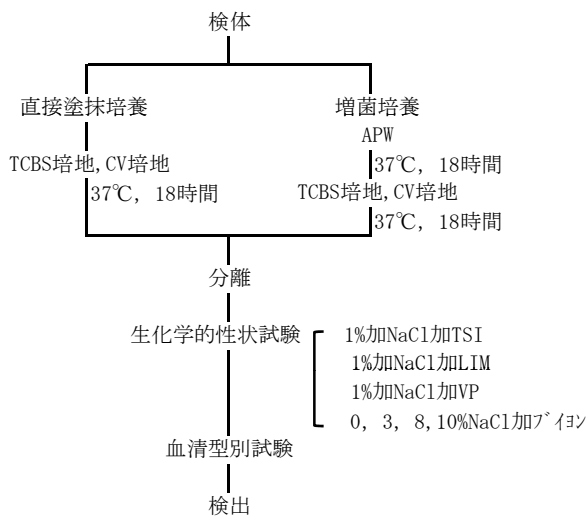


図1 腸炎ビブリオの検出手順

表2 腸炎ビブリオの検出状況

検体の種類	便	食品	拭き取り
検体数	3	26	11
菌検出数	2	1	0

直接法 (A法) 増菌法 (B法) 2段階増菌法 (C法) PCR+K6免疫磁気ビーズ法 (D法) PCR+K6免疫磁気ビーズ増菌法 (E法)

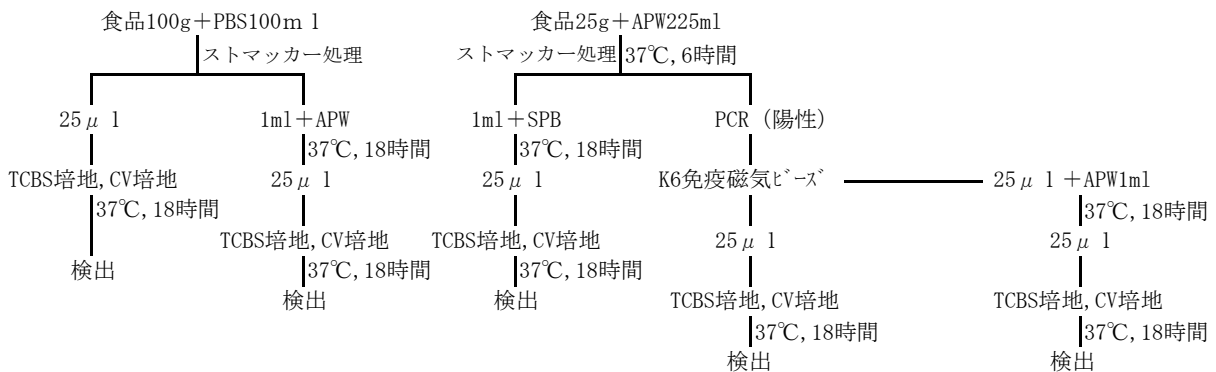


図2 食品からの腸炎ビブリオ検出法

4 結果

患者便3名分について菌検索を行った結果、2名よりV.p O3:K6 TDH陽性を検出した。拭き取りからは検出されなかった(表2)。

使用殺菌海水のV.p MPNは0.3未満/mlで海水からV.pは検出されなかった。

食品(塩辛製品16件、塩辛残品1件、イカ脷8件、イカ耳1件)26件についてA～E法により菌検索を行った結果、A～D法では検出されず、E法のみで塩辛製品1件からV.p O3:K6 TDH陽性を検出した。

5 考察

V.p食中毒事例において、食品からTDH陽性V.pが検出されず原因食品の特定が困難であることから、食中毒予防対策上の大きな問題とされてきた。今回、26品目の食品のうち1件からE法によりV.p O3:K6 TDH陽性を検出した。A～D法では検出できなかったがPCRとK6免疫磁気ビーズと増菌を組み合わせたE法で分離することができた。そのE法でも検出されたのは26件中1件であった。

横須賀市が実施した患者便30件および回収されたイカ塩辛8件(ロット不明)合計38件のV.p検出菌株は、すべて血清型がO3:K6 TDH陽性であり、パルスフィールドゲル電気泳動法でも同一の泳動パターンを示し、菌株の由来が同じである可能性が示された。

保健所の調査では、当該イカ塩辛の原料の受け入れから製品の包装出荷までの何れかの過程でV.pに汚染され、製品は不適切に保管されたうえ、長期間にわたり出荷・流通させたことにより、被害を拡大させたものと考えられた。

当該製品の塩分濃度はV.pの至適塩分濃度である4%

前後、仕込み期間は1日から4日であり、調味腑などによる、いわゆる和え物風のイカ塩辛であった。塩分濃度が約10%を超える、伝統的な長期熟成による保存食としてのイカの塩辛とは異なり、保存性が悪い製品であった。

このような製品については、製造から摂食まで、一貫して徹底した低温管理を行う必要があると思われた。

6 まとめ

- ①患者便3名分について菌検索を行い、2名よりV.p O3:K6 TDH陽性を検出した。拭き取り、使用殺菌海水からは検出されなかった。
- ②食品26件について原因菌検索を行ったところ「イカ塩辛」製品1件からV.p O3:K6 TDH陽性を検出した。

7 謝辞

検体採取及び助言を頂きました食と暮らしの安全推進課、塩釜保健所及び大崎保健所の食品薬事班の方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) 秋山昭一：腸炎ビブリオ物語，第1版，1(2004)，(医学書院)
- 2) 三輪谷俊夫：腸炎ビブリオ第Ⅲ集，第1版，2(1990)，(近代出版)
- 3) 厚生省監修微生物検査必携細菌・真菌検査，第3版，D-72(1987)，(日本公衆衛生協会)
- 4) 野池道子，佐々木美江，山口友美，有田富和，畠山敬，齋藤紀行，白石廣行：宮城県保健環境センター年報，19，59-61(2001)
- 5) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針微生物編，第1版，208(2004)，(社団法人日本食品衛生協会)