



Title	腸炎ビブリオに関する研究 : 3. 東南アジア地域の海底泥土ならびに魚介類から分離した腸炎ビブリオの血清学的性状, マウスに対する毒性および溶血能について
Author(s)	安永, 統男; 黒田, 正彦
Citation	長崎大学風土病紀要 7(2), p.107-113, 1965
Issue Date	1965-06-23
URL	http://hdl.handle.net/10069/3951
Right	

This document is downloaded at: 2020-10-26T16:46:16Z

腸炎ビブリオに関する研究

3. 東南アジア地域の海底泥土ならびに魚介類から分離した腸炎ビブリオの血清学的性状, マウスに対する毒性および溶血能について

安永 統 男*・黒田 正 彦*

やす なが のり お くろ だ まさ ひこ

本報文の一部は第38回日本細菌学会総会(昭和40年4月2日, 東京)で報告した。

Studies on *Vibrio parahaemolyticus*.

3. On the serological property, toxicity for mice and hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from marine muds and fishes in the Southeast Asia.

Norio YASUNAGA and Masahiko KURODA

Nagasaki Prefectural Institute of Public Health

Received for publication June 8, 1965

Abstract: In the previous survey on the distribution of *Vibrio parahaemolyticus*, it was revealed by YASUNAGA that the organisms were distributed widely in marine muds and fishes in the Southeast Asia as well as in Japan. In the present work, the serological properties, toxicities for mice and hemolytic activities of the isolates were examined. The results obtained are as follows:

1) The 82 cultures of biotype 1 were employed to serological examination, and all of them were classified into 22 of 32 K-serotypes (Table 1). Concerning O antigen, O 9 of 10 O-groups was not detected (Table 2). The rate of detection of O 1~O 5 was 81 percents (Table 3).

2) The toxicities of the 31 cultures of biotype 1, the 4 cultures of biotype 2 and a culture of middle type for mice were tested. The both of biotypes 1 and 2 indicated lethality for mice, but the middle type did not (Table 4).

3) The hemolytic activity was tested on the 82 cultures of biotype 1 by means of the method A and B as shown in Table 5. The 4 cultures of them gave positive hemolysis test in the former and a culture in the latter (Table 5).

* 長崎県衛生研究所

緒 言

前報のごとく、安永(1964)は基隆、シンガポール、コロombo、香港および印度洋において腸炎ビブリオの分布調査を試み、港湾内の海底泥土、市販ならびに捕獲魚介類からの分離菌株について生物学的性状検査を行なった結果、本菌が東南アジア地域にも広く分布していることを明らかにし、海外からわが国への搬入魚介類についても本菌の汚染は十分に留意されるべきであると述べた。

しかしながら、このような自然環境由来の菌株のヒトに対する起病性に関しては異論が多い。坂崎(1964a)は血清型の如何によらず全ての Biotype 1 の菌はヒトに対し病原性を有するものとの見方をしており、また善養寺ら(1964a)も大体において同様な意見を持っているが、一方堀ら(1964)は抗原型によ

り病原性に強弱があるのではないかとの見解に立っている。本菌の毒性の主体はK抗原であろうと想像されているが(坂崎1964a,)、間接的にヒトへの起病性を推定するために、これまでマウスに対する毒性試験およびウサギ結紮小腸に対する腸炎起病性試験すなわちDe-test等が行なわれている(善養寺1964b, 坂崎1964b)。また、最近加藤ら(1965)により溶血能をもとにBiotype 1 の菌のうちから病原性菌株を推測する試験方法も提示せられている。

本報においては、今回東南アジア地域で分離した菌株について行なった血清学的型別、マウスに対する毒性ならびに加藤らの方法にしたがう溶血能試験の結果について述べる。

実 験 方 法

1. 血清学的型別試験

昭和39年に改訂せられた厚生省の病原性好塩菌食中毒検査要領(坂崎1964c)に準拠し、Biotype 1 の菌82株を対象にK抗原型別ならびにO抗原群別を実施した。型別試験には東芝化学工業株式会社製の腸炎ビブリオ診断用家兔免疫血清を使用した。

2. マウスに対する毒性試験

マウスは生後35~40日、体重18g前後のgpc系を用いた。供試菌株は36株で、そのうちBiotype 1 が31株(シンガポール15, コロンボ1, 香港13, 印度洋2), Biotype 2 が4株(基隆2, シンガポール1, コロンボ1)および中間型1株(シンガポール)であった。なお、Biotype 1 のうち12株が魚介類、19株が海底泥土由来の菌株であった。これらの菌株を3%食塩加ブイオン10ml中で37°C、24時間培養後、適宜同ブイオンにて希釈し比濁(東京光電株式会社製7A型光度計を使用)により均一の菌量(0.8~3.0×10⁶/1ml)とした。その菌液0.5mlおよび10倍希釈菌液0.5mlを各5頭腹腔内に接種し、48時間まで

生死を観察して判定を行なった。

3. 溶血能試験

Biotype 1 の菌82株について前記加藤らの方法Aならびにその後改良せられた方法B(神奈川県衛生研究所1965)に基づき実施した。すなわち、A:各菌株を3%食塩含有ブレインハートインフュージョン培地(日水製)10ml中で、37°C、20時間培養後、その1白金耳量を3%食塩含有牛肉水寒天培地(1.5%ヒトO型脱繊維素血液添加)上に滴下し37°Cで18時間培養した。その結果、透明な溶血環の認められた場合を溶血能陽性、認められない場合溶血能陰性と判定した。B:前法と同様に培養した各菌液を3%食塩含有ブレインハートインフュージョン寒天培地(ヒトO型血液5%, クリスタル紫0.0001%添加)に同じく接種し37°Cで20時間培養を行なった後溶血環の有無を検べた。血液は血液銀行より入手の保存血液(クエン酸ナトリウム0.26g, クエン酸0.09g, ブドウ糖0.26g/100ml)を用いた。

実験結果および考察

K抗原の型別試験の結果、Biotype 1 の菌82株の全てが既知の血清型に型別せられた。Table 1にこれらの菌株の地域別ならびに検体別によるK抗原の出現状態を示した。現在までのところ、腸炎ビブリオはK抗原によって32菌型に分類されているが(坂崎1964d), 本実験に用いた菌株はそのうちの22の菌型に全て

型別できた。最も多数に出現のみられた菌型はK32の14株で次いでK6の9株、19の7株となっている。地域別によりK抗原の出現を比較してみると、香港では48株中K8, K17, K25, K26に型別されたのが18株を占めていたが、シンガポールでの分離菌株には以上の菌型は含まれていなかった。また、シンガポール

Table 1. Serological Classification of Biotype 1 *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Southeast Asia

Antigen		Source of Strains						Total Number of Strains
K	O	Singapore		Hongkong		Colombo	Indian Ocean	
		Marine Mud	Fish	Marine Mud	Fish	Marine Mud	Fish	
1	1	1			1			2
6	3	2	3	2	2			9
8	4			2	4			6
9	4		1	1				2
10	4					1		1
12	4	1						1
13	4	2		3				5
15	5	1		1				2
16	5	3						3
17	5			4	2			6
18	6						1	1
19	7	2		4	1			7
20	8	2						2
22	8			1	1			2
24	10	2		1	1			4
25	1			1	2			3
26	1			2	1			3
27	2	1*	1		1		1	4
28	2	1						1
29	3		1	1				2
30	3	2						2
32	1	5		6	3			14

Remarks : Through the studies carried out at National Institute of Health, 32 K-antigens and 10 O-groups had been established on the organisms belonging to biotype 1, and the antigenic schema indicating relationship between K antigens and O groups had been presented. At the present work, K antigens of the isolates were decided by agglutination on slide glass, and O groups of them were done based on K antigens according to the schema.

* Sucrose fermenting strain.

で検出されたK12, K16, K20, K28, K30に型別できる菌株は香港においては分離されていない。しかし、この結果が真に地域差を示すものか否かは今のところ何とも説明できない。想像するに、出現のみられない菌株については、さらに検体の数および種類を増すことにより、または分離方法の如何によっては検出できるのではないだろうか、コロamboで分離した1株はK10、また印度洋の2株はクロカワの鯉から分離したのがK18、サワラの胃から分離したのがK27に型別されたが、K10, K18は共にこれらの地域以外では見

出されなかった。

O抗原型はK抗原の型別結果をもとに推定し群別を行なったが、O1~O10までのうちO9には出現がみられなかった。Table 2にはO群のみによる地域別ならびに検体別の出現状態をかかげた。前述のごとく、K18に相当するO6は印度洋の魚類から検出されたのみで他の地域の分離菌株には含まれていなかった。なおまた、シンガポールの海底泥土および香港の海底泥土、魚類由来の菌株はO1に最も多く出現が認められた。

Table 2. O Antigen of Biotype 1 *Vibrio parahaemolyticus*
Isolated in Southeast Asia

O Group	Source of Strains						Total Number of Strains
	Singapore		Hongkong		Colombo	Indian Ocean	
	Marine Mud	Fish	Marine Mud	Fish	Marine Mud	Fish	
1	6		9	7			22
2	2	1		1		1	5
3	4	4	3	2	1		14
4	3		6	4			13
5	4	1	5	2			12
6						1	1
7	2		4	1			7
8	2		1	1			4
9							0
10	2		1	1			4

Table 3. Detection Rate of O1~05 Groups 1
Vibrio parahaemolyticus Isolated in Southeast Asia

Source of Strains	Number of Strains	Antigen *	
		O1 ~ O5	K 8, K 6, K 8, K11 K12, K15, K25, K29
Marine Mud	55	73 %	20 %
Fish	27	85 %	44 %
Singapore	31	81 %	26 %
Hongkong	48	81 %	31 %
All Places Except Keelung	82	81 %	28 %

* From the experimental results on the 2000 strains at National Institute of Health, it was confirmed that the strains with these antigens were isolated with high percentage in Japan.

わが国での分離腸炎ビブリオについてのO群別結果では出現頻度はO1~O5までが高くなっており、K抗原についてはK3, K6, K8, K11, K12, K15, K25ならびにK29に高い出現がみられている(坂崎1964)。東南アジア由来菌株のO抗原およびK抗原における出現頻度をこれらのO群、K抗原型についてみると、Table 3 に示したようにO群では全域で81%と可成りの高率となっており魚介類だけについては85%に達している。K抗原に関しては全域で28%程度であったが、魚介類由来菌株のみでは44%と高くなっている。しかるに、抗原型とヒトへの起病性との

関係については前述のように種々見解がある。坂崎(1964a)はヒトからはどのK抗原型も検出されること、およびヒトから検出頻度の高いまたは低い抗原型については自然界からの検出頻度も同様であることから、Biotype 1 の菌は全てその血清型はどうであってもヒトに病原性を有すると考えている。一方、堀ら(1964)が行なった調査結果では、患者由来菌株と魚体等からの分離菌株におけるK抗原の検出頻度が一致しなかったことにおいて、O1~O5までの菌群のなかにもK抗原に細分すると病原性に強弱があるのではないかと推考している。このような特定の抗原型の出

現と病原性との間の相関性に関しては、今後さらに多くの食中毒事例における調査および自然界における本菌分布調査に俟つ必要がある。

マウスに対する毒性は Table 4 に示したように、各菌株間で強弱の差異はあったが Biotype 1, 2 共に致死作用が認められた。これに対し、わずか 1 株ながら中間型菌株は毒性を示さず前二者とは明らかな相違を示した。Biotype 1 と 2 とを比較すると、総合的にみて両者間に著しい差異はなくわが国での分離菌株についての成績 (善養寺 1964 b, 坂崎 1964 b) と一致した。なお、Biotype 2 は先に善養寺ら (1964 c) によって Biotype 1 とは“種”を異にするとの報告がなされたが、その後この主張は坂崎 (1964 a)

によって支持をうけ、最近新たに *Vibrio alginolyticus* なる種名も提出されている (坂崎 1965)。しかし、病原性の有無については意見の一致がみられていない。腸炎ビブリオから除外されるにしても別の立場から今後検討されるべきであろう。また、Biotype 1 で白糖分解性の 1 株もマウスに対し毒性を示したが、善養寺ら (1964 a) はこのような菌株は Biotype 1 および 2 のいずれにも含ませず中間型とみなしており、Biotype 2 と同様に腸炎ビブリオからはずすのが妥当であるとし食中毒起因菌としての病原性についても否定的である。しかし、“種”の問題は別として人に対する病原性に関しては、本実験で用いた中間型とは異なりマウスに対する致死作用も明らかに認められており、現段階では完全に無視できないのではないかと思われる。いずれにせよ、マウスに対する毒性は東南アジア由来の腸炎ビブリオについても確かめられたが、坂崎 (1964 a) が述べているように本菌の食中毒起因菌としての本質的な毒力とは無関係なものであり、この結果を直接にヒトへの起病性と結びつけることには当然に多くの問題がある。したがって、病原性菌株を検出するための確実な技法の確立が望まれるところである。

前述したごとく、加藤らはヒト O 型血液の溶血能によって Biotype 1 の菌のうちから病原性菌株を検出する方法 A について検討し、溶血能とヒトへの起病性には密接なる関連性があるのではないかと推察している。さらにその後再現性のある条件が吟味せられ改良法 B が提出されている。これらの方法にしたがって東南アジア由来菌株について溶血能を試験した結果、Table 5 にみられるように Biotype 1 の菌 82 株中 A の方法では 4 株、B の方法ではわずかに 1 株だけが陽性を示した。これらの溶血性菌株はいずれもシンガポールの海底泥土から分離したものであり、また B の方法による陽性 1 株は A の方法による陽性 4 株のうちに含まれている。わが国における分離菌株について神奈川県衛生研究所で行なわれた A の方法による溶血能試験成績 (加藤ら 1965) ならびに B の方法による成績 (神奈川県衛生研究所 1965) では、前者で魚由来菌株の陽性率 2%、後者で海水および川 (感潮線より下流) 由来菌株の陽性率は 0.54%、魚、その他の食品ならびに漬け水等からの由来株の陽性率は 0% となっている。これらの成績を東南アジアで分離した菌株の成績に照合してみると、海底泥土由来の菌株については比較できなかったが、魚介類由来の菌株については大体において類似した結果であると云える。

Table 4. Toxicity for Mice* of Strains Isolated in Southeast Asia

Biotype	Counts of Organisms Inoculated		Number of Strains
	0.8~3.0×10 ⁶	0.8~3.0×10 ⁵	
1	●●●●●●●●	●●●●●●●●	3
	●●●●●●●●	●●●●●●○	2
	●●●●●●●●	●●●●●○○	5
	●●●●●●●●	●●●○○○○	7
	●●●●●●●●	●○○○○○○	5
	●●●●●●●●	○○○○○○○	3
	●●●●●●○	●●●●○○○	1
	●●●●●●○	●○○○○○○	2
	●○○○○○○○	○○○○○○○	2**
	○○○○○○○	1	
2	●●●●●●●●	●●●●○○○	1
	●●●●●●●●	○○○○○○○	1
	●●●●●●○	○○○○○○○	1
	●●●●○○○	○○○○○○○	1
Middle	○○○○○○○	○○○○○○○	1***

* Mice, 35~40 days old of gpc strain weighing about 18g, received intraperitoneally 0.5 ml of the 3% NaCl containing broth cultures of the strains; mice that died or survived after 48 hours are indicated by ● or ○ respectively.

** One of them was a sucrose fermenting strain.

*** Voges-Proskauer reaction (-), sucrose fermentation (+) and growth in peptone water containing 10% NaCl (+).

Table 5. Hemolytic Activity of Biotype 1 *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Southeast Asia

Source of Strains	Number of Strains	Experimental Method			
		A		B	
		Number of Hemolytic Strains	Detection Rate of Hemolytic Strains	Number of Hemolytic Strains	Detection Rate of Hemolytic Strains
Marine mud	55	4	7.3 %	1	1.9 %
Fish	27	0	0 %	0	0 %
Total	82	4	4.9 %	1	1.2 %

Remarks : The methods A and its modified B were recently presented by staffs of Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory. The beef-extract agar medium (added 3% NaCl and 1.5% defibrinated human blood of O group) in the method A and the brain-heart infusion agar medium (added 3% NaCl, 0.0001% crystal violet and 5% preserved blood) in the method B were employed for hemolysis test. One drop of the brain-heart infusion cultures incubated for 20 hours at 37°C was inoculated on the agar media. After incubation for 18~20 hours at 37° an observation was made about the presence of the transparent hemolytic-ring around the culture. From their experiments on the isolates in Japan carried out based on these methods, it was found that almost such as sea-water, sea-fish and food not hemolytic activity, while the majority of biotype 1 from the feces of human patients had it. Consequently, they considered that hemolytic activity of biotype 1 might be related closely to its pathogenicity.

他方、食中毒患者由来の菌株についての陽性率は、同研究所における成績ではAの方法で98% Bの方法で89%と極めて高率となっている。このような溶血能を呈する菌株のみを病原性の対象とすると、自然環境中には真の病原性菌株は極く低率でしか生棲していないことになる。本菌食中毒の発生頻度から推定すると、あるいは以上の結果は Biotype 1 の自然界における分布の凡その実態を表わしているのかも知れない。腸炎ビブリオの溶血性に関しては、藤野らの本菌発見当初より認められており（藤野 1964）、最近では溶血性と

レンチナーゼ作用との関連性も追究されているが（川村 1964）、これまで溶血能と病原性との関係についての研究は見当らない。この点において、加藤らの方法による病原性菌株の検出試験は極めて興味深いものがある。

しかしながら、実際の場合本菌食中毒の発生機序は可成り複雑なものがあると想像され、未知の条件が菌自体または宿主側に存在することも考えられるので、Biotype 1 の菌の全てが病原性を有するものとみなすべきか否かについては今後さらに検討を要しよう。

摘 要

先に東南アジア地域の港湾内の海底泥土ならびに魚介類から分離した腸炎ビブリオについて、血清学的型別、マウスに対する毒性および溶血能の各試験を行なったところ次のごとき結果が得られた。

1) Biotype 1 の菌82株の全てが既知のK抗原に型別できたが、出現のみられた菌型は32種のうち22種であった。そのうちK32が14株と最も多く、次ぎにK

6の9株、K19の7株であった。また、シンガポールと香港での分離菌株におけるK抗原の出現を比較すると両者間で可成りの相違がみられた。

2) 抗原型O群別ではO1~O10のうちO9のみが欠けていた。O1~O5までの出現頻度は81%となっており、わが国での分離菌株の場合と同様に高率の出現が認められた。

3) マウスに対する毒性試験においては、Biotype 1が32株、Biotype 2が4株および中間型が1株供試された。その結果、Biotype 1, 2共に全て致死作用が認められたのに対し、中間型菌株は毒性を示さず明らかな差異がみられた。

4) 加藤らの方法Aならびにその改良法Bに基づく

ヒトO型血液に対する溶血能試験の結果、供試82株のBiotype 1のうち前法で4株、後法でそのうちの1株に陽性が認められた。このように溶血株の出現頻度が低率であったのは、本実験に用いた菌株が食中毒患者由来のものではなく自然界由来の菌株であるためかも知れない。

終わりに、本実験を行なうに当り色々と御助言を戴き本文の御校閲を賜わった長崎大学風土病研究所福見秀雄所長（国立予防衛生研究所細菌第一部長）、血清学的型別試験に際し御教示を戴いた国立予防衛生研究所坂崎利一博士ならびに溶血能試験において御助言を戴いた神奈川県衛生研究所加藤貞治博士に深甚なる謝意を表す。また、長崎大学風土病研究所林薫助教授および当研究所高橋克巳所長には本文の御校閲を賜わった。厚く御礼申し上げる。

文 献

1) 藤野恒三郎： *Pasteurella parahaemolytica* から *Vibrio parahaemolyticus* へ。藤野恒三郎，福見秀雄編：腸炎ビブリオ，初版：13-37，1964。

2) 堀 道紀，前島健治，飯田 豊，仲西寿男：腸炎ビブリオ食中毒の汚染源の追求（第21回日本公衆衛生学会，第V分科会シンポジウム追加発言）。食品衛生研究14（13）：54-56，1964。

3) 神奈川県衛生研究所：腸炎ビブリオの溶血能について。1965。

4) 加藤貞治，小原 寧，一戸治江，秋山昭一，滝沢金次郎，松原喜章：腸炎ビブリオの新所見。腸炎ビブリオ1亜群菌の溶血能について（予報）。食品衛生研究 15（2）：81，1965。

5) 川村 修： *Vibrio parahaemolyticus* の溶血性について（第17回日本細菌学会関西支部総会講演要旨）。日本細菌学雑誌19（12）：511，1964。

6) 坂崎利一（1964 a）：腸炎ビブリオの性状と病原性（第21回日本公衆衛生学会，第V分科会シンポジウム発言）。食品衛生研究 14（12）：76-79，1964。

7) 坂崎利一（1964 b）：細菌学的諸性状と分類学上の位置。藤野恒三郎，福見秀雄編：腸炎ビブリオ，初版：69-107，一成堂，東京，1964。

8) 坂崎利一（1964 c）：腸炎ビブリオ検査の問題点について。食品衛生研究 14（7，8）：117-133，

1964。

9) 坂崎利一（1964d）：腸炎ビブリオの血清学的型別について（検査要領改正案から）。モダンメディア 10（7）：49-57，1964。

10) 坂崎利一（1965）：好塩菌症-腸炎ビブリオの細菌学について（第39回日本伝染病学会総会，シンポジウム発言要旨）。日本伝染病学会雑誌 38（13）：21，1965。

11) 安中統男：腸炎ビブリオに関する研究。2。東南アジア地域の港湾内の海底泥土ならびに捕獲，市販魚介類における腸炎ビブリオの分布。長崎大学風土病紀要，6（4）：201-208，1964。

12) 善養寺 浩，坂井千三，寺山 武，工藤泰雄（1964 a）：腸炎ビブリオの生物型と食中毒起炎株との関係について。疫学調査からみた。メヂヤサークル（52）：79-95，1964。

13) 善養寺 浩（1964 b）：病原性について。藤野恒三郎，福見秀雄編：腸炎ビブリオ，初版：181-193，一成堂，東京，1964。

14) 善養寺 浩，坂井千三，寺山 武，工藤泰雄，伊藤 武（1964 c）：腸炎ビブリオの生物型と種の関係。Adansonian Classification による。メヂヤサークル（55）：187-204，1964。