

細菌の生存におよぼす好適環境水の影響の評価

Survival of various bacteria in "the third water"

増澤 俊幸¹⁾・林原 光宏¹⁾・小濱 剛²⁾Toshiyuki MASUZAWA¹⁾, Mitsuhiro HAYASHIBARA¹⁾
and Takeshi KOHAMA²⁾

本研究では、ヒトの手指の常在菌である黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*、腸内常在菌である大腸菌*Escherichia coli*、海産性魚類の常在菌で食中毒の起因菌である腸炎ビブリオ*Vibrio parahaemolyticus*、淡水に生息するウナギによく見られる魚病細菌であるパラコロ病原菌*Edwardsiella tarda*を被検菌として選び、好適環境水中での生存性を調べた。比較対象として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、人工海水、超純水 (ミリQ水) を用いた。それぞれの水中における4種の細菌の生存性は、その細菌の性質に依存して異なっていた。すなわち、好塩性の腸炎ビブリオは、人工海水では生存するが、好適環境水、PBS、ミリQ水中では素早く死滅した。一方、パラコロ病原菌は、人工海水では速やかに死滅したが、好適環境水、PBS、ミリQ水中では生存した。大腸菌は、試験したすべての水中で、5日間生存した。黄色ブドウ球菌は、人工海水では生菌数が大きく減少したが、好適環境水、PBS、ミリQ水中では、多くが生残した。

結論：好適環境水中における細菌の生菌数はその細菌の性質に左右され、必ずしも好適環境水が細菌の増殖を抑制するわけではないことが明らかになった。一方、好塩性の腸炎ビブリオは好適環境水中で死滅することから、活魚の輸送等に利用することで、腸炎ビブリオ食中毒の抑止に利用できる可能性を示した。

1. はじめに

好適環境水は岡山理科大学の山本俊政准教授により、地球人口の増加により将来起こるかもしれない食糧危機に対処するため、魚類の効率的陸上養殖を実現する目的で開発された¹⁾。好適環境水は、海水中に存在する元素のうち、対象とする水生生物に必要な元素 (ナトリウム・カリウム・カルシウム等) を最低限の濃度で調整した人工飼育水であり、従来の人工海水に比べ、約10分

の1のコストで生産することが可能となる。また、海産性魚類、ならびに淡水魚の飼育が可能であり、通常の海水を用いた養殖に比べ、飼育魚の発育が早く、感染症の発症も少ないことが経験的に知られている²⁾。各種魚病細菌が好適環境水中では、生存しにくい可能性も推測されるが、実証実験はなされていない。そこで、本研究では、魚類にみられる細菌として2菌種、ヒトの常在菌として2菌種を選んだ。腸炎ビブリオ*Vibrio parahaemolyticus*は海産性魚類に常在し食中毒の原因であり好塩性である。一方、ウナギによく見られる魚病細菌であるパラコロ病原菌*Edwardsiella tarda*は淡水を好む。ヒト常在菌では、幅広塩濃度で増殖可能とされるヒトの皮膚常在菌である黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*とヒトの腸内常在菌であり水の糞便汚染指標ともされる大腸菌*Escherichia coli*を選び、それぞれの好適環境水中での生存性を調べた。好適環境水の比較対象として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、人工海水、超純水 (ミリQ水) を用いた。

連絡先：増澤俊幸 masuzawat@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科

Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

(2018年9月7日受付, 2018年11月21日受理)

2. 実験方法

1) 被検菌：黄色ブドウ球菌、大腸菌、腸炎ビブリオ、パラコ病原菌を表1に示す培地、温度で培養した。腸炎ビブリオは、河村好章博士（愛知学院大学薬学部）、パラコ病原菌は、国立研究開発法人 水産総合研究センター増養殖研究所より菌株の提供を受けた。

2) 被検水：好適環境水 (NaCl 7.0587g/L、CaCl₂・2H₂O 0.3641g/L、KCl 0.18125g/L、pH7.7)²⁾、人工海水(マリンアートスーパーフォーミュラ SF-1、富田製薬)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS)、ミリQ水 を121°C、15分間高圧蒸気滅菌した後、実験に用いた。

3) 生存試験：表1中に示した液体培地約10mlを用いて、それぞれ被検菌を至適培養温度で一晩～数日間、前培養した。15mlの遠心チューブにいれた10mlの4種の被検水に前培養液0.1mlを加え、素早く混合した。直ちに、それぞれのチューブから0日目の試料を100μL回収し、それぞれの細菌用の液体培地900μLに加え、10倍希釈液を調製した。さらに、同様に10²～10⁵倍希釈を順に調製した。それぞれの希釈液100μLを表1に示した寒天平板培地に接種し、コンラージ棒を用いて塗抹した。それぞれの至適温度で1日～3日培養した。

被検菌を接種した4種類の水試料は、それぞれの細菌に最適な温度で5日間振とうした。その後、1日目、3日目、5日目に同様に試験水を回収し、10倍段階希釈液を調整し、平板培地に塗抹したのち、培養した。後日、100～200個のコロニーが形成されたシャーレを選び、形成コロニー数を数え、2枚のシャーレの平均から生菌数を算出した。

3. 結果と考察

本研究では、ヒトの常在菌である黄色ブドウ球菌、大腸菌、海産性魚類由来食中毒の起因菌である好塩性の腸炎ビブリオ、淡水に生息するウナギのパラコ病原菌を選び、好適環境水中での生存性を調べた。比較対象とし

て、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、人工海水、超純水 (ミリQ水)を用いた。それぞれの水中における4種の細菌の生存性は、その細菌の性質に依存していることが明らかになった。すなわち、海洋細菌である腸炎ビブリオは、塩が含まれないミリQ水、さらに生理的濃度の食塩が含まれるPBS、さらにほぼ生理的食塩濃度に近い塩が含まれる好適環境水中では、3日以内に死滅した。一方、栄養源として有機物が全く含まれない人工海水中でも生残菌の減少は1/100程度であり、生残した。腸炎ビブリオは好塩性であり、増殖至適塩濃度は海水とほぼ同じ3%程度、1～8%の食塩存在下で増殖する³⁾。一方、無塩下では発育せず、真水は殺菌的に作用することが知られる。このため海産性魚類をおろす際には、魚体を真水でよく洗浄することで、腸炎ビブリオ食中毒を抑制できることが知られており、今回の結果はこの細菌の性質に依存するものと言える。

ウナギのパラコ病原菌はウナギの魚病細菌であり、鰭や体表の発赤、肝臓や腎臓の膿瘍を引き起こす⁴⁾。発育可能塩濃度は0～4%である。今回の実験では、人工海水中では3日以内で生菌が検出できなくなった。一方、好適環境水、PBS、さらには塩を全く含まないミリQ水中では、一度10倍程度に生菌数が上昇し、その後1/100程度まで減少した。有機物を栄養として含まない水中では、自らのもつ栄養で数回は分裂増殖した後、緩やかに死滅へ向かったと推測される。

大腸菌は、すべての試験水中で5日目でも10⁸個/ml以上が生存した。大腸菌は代表的な動物の腸内常在細菌であると同時に、土壌、水、あるいは海水中でも長期にわたって生存できることから、河川や海水浴場などの糞便汚染の指標として用いられている。好塩性ではないが、富栄養状態であれば8%塩化ナトリウム存在下でも増殖できる⁵⁾。今回の実験では、好適環境水を含むすべての被検水中で最低5日間安定に生存することを確認した。

黄色ブドウ球菌は、人工海水中では速やかに死滅に向かったが、5日目でも10⁴個/ml以上が生存した。好適環境水、PBS、ミリQ水中では10⁷個/ml以上が生存した。

表1 被検菌株

使用株	前培養			生存試験培地		
	液体培地	培養温度	培養日数	寒天培地	培養温度	培養日数
黄色ブドウ球菌	普通ブイオン培地	37°C	1日	普通寒天培地 (栄研化学)	37°C	1日
大腸菌	普通ブイオン培地	37°C	1日	普通寒天培地 (栄研化学)	37°C	1日
腸炎ビブリオ	アルカリペプトン水	37°C	1日	TCBS (栄研化学)	37°C	1日
パラコ病原菌	普通ブイオン培地	20°C	3日	普通寒天培地 (栄研化学)	20°C	3日

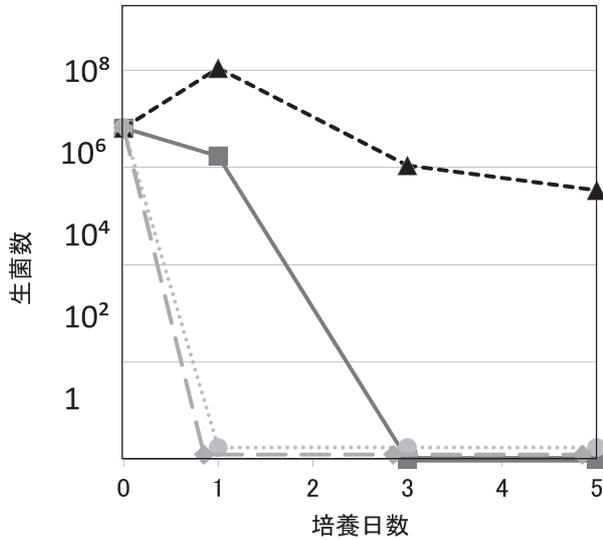


図1 腸炎ビブリオの生菌数の変化

凡例:好適環境水(■)、ミリQ水(●)、PBS(◆)、人工海水(▲)
 ミリQ水、PBS中の腸炎ビブリオの生存菌は1日目に、好適環境水中では3日目に検出されなくなった。一方、人工海水中では、3日目に約1/100に減少したが、5日目の生残数の減少はわずかであった。

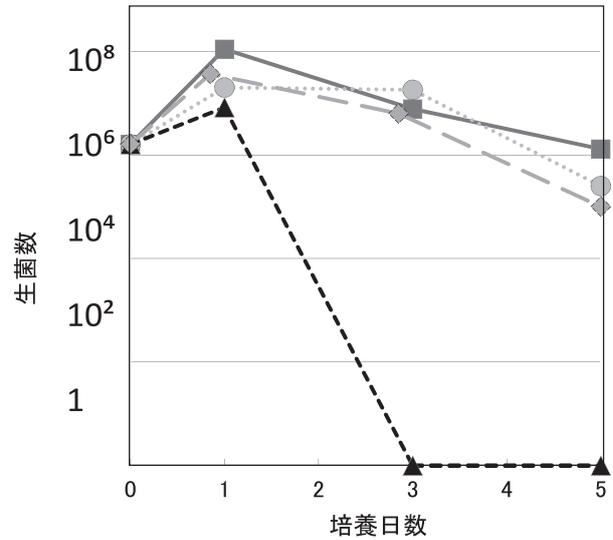


図2 パラコロ病原菌の生菌数の変化

凡例:好適環境水(■)、ミリQ水(●)、PBS(◆)、人工海水(▲)
 好適環境水、ミリQ水、PBS中のパラコロ病原菌は、1日目で約10倍に増加し、数回分裂増殖したと考えられる。その後、5日目までに約1/100に生存菌数は減少した。一方、人工海水中では、3日目に検出されなくなった。

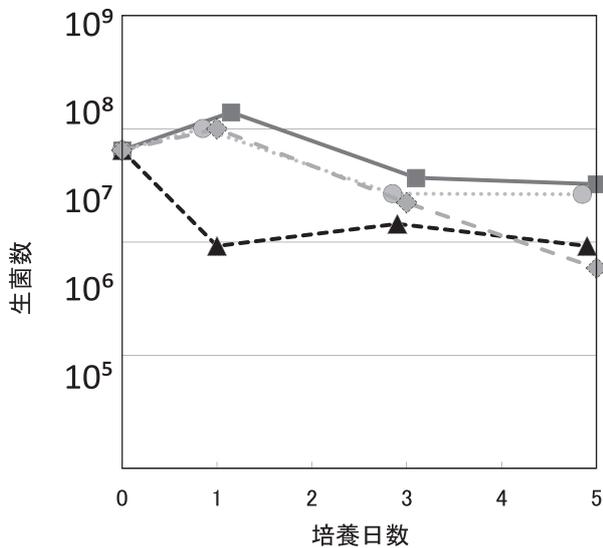


図3 大腸菌の生菌数の変化

凡例:好適環境水(■)、ミリQ水(●)、PBS(◆)、人工海水(▲)
 好適環境水、人工海水、ミリQ水、PBSのすべての被検水中で大腸菌の生存菌数は、5日目までに約1/10に減少したが、急激な生残数の減少は見られなかった。今回試験した4菌種では最も影響がなかった。

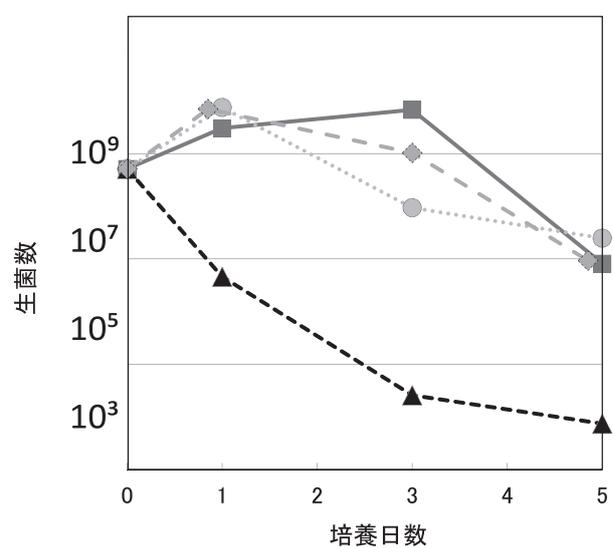


図4 黄色ブドウ球菌の生菌数の変化

凡例:好適環境水(■)、ミリQ水(●)、PBS(◆)、人工海水(▲)
 好適環境水、ミリQ水、PBS中の黄色ブドウ球菌の生存菌数は、3日目から5日目にかけて約1/100~1/1000に減少した。一方、人工海水中の黄色ブドウ球菌の生存菌数は3日目、5日目には約1/100,000に急激に減少した。

一般的には、黄色ブドウ球菌は耐塩性で、10%食塩中でも増殖できるとされるが、これは栄養となる有機物等が含まれた培地中での現象であり、今回のような栄養源が含まれない水中とは条件が異なるためと推察される⁶⁾。

以上のことから好適環境水は好塩性の海洋性細菌の増殖を抑制するが、黄色ブドウ球菌や大腸菌に対しては殺菌性、あるいは増殖を抑制する効果はないことが示された。今回の結果は、各種被検水中の細菌の生存は、それぞれの細菌の性質に依存することを示している。また、腸炎ビブリオは好適環境水中では、長期生存できないことが明らかになった。魚介類を生食する習慣がある日本では、古来から腸炎ビブリオ食中毒が発生しており、1960年代からの腸炎ビブリオ食中毒の発生件数は毎年300～500件、患者8,000～15,000名が報告されていた⁷⁾。これに対して2001年腸炎ビブリオ食中毒低減のための法改正がなされ⁸⁾、魚介類は氷などで低温にすること、魚市場で使用する洗浄用水は腸炎ビブリオ陰性の水道水や滅菌海水などを利用することなどの加工基準が明確に規定された。その結果この食中毒は減少に転じ、2017年は7件97名の腸炎ビブリオ食中毒の発生しか報告されていない⁹⁾。このことから、好適環境水を海産性活魚の輸送に用いれば、輸送中に腸炎ビブリオの殺菌が可能となるなど、新たな好適環境水の活用法が開けるかもしれない。

参考文献

- 1) 山本俊政：観賞魚用飼育水、トリートメント水、および、観賞魚用トリートメント水、観賞魚用トリートメント水生成分物質、公開特許公報（A）、特解 2011-30474
- 2) 平成29年度 千葉科学大学 私立大学研究ブランディング事業報告書 p.2, p.6
- 3) 本田武司：腸炎ビブリオ，細菌学 朝倉書店 p.409-418, 2002.
- 4) 宮崎照雄：パラコロ病 新魚病図鑑 p.81, 2006
- 5) 佐々木利明、大島朗伸、石田昭夫、永田進一：大腸菌の高塩環境適応機構とその応用 Bull. Soc. Sea. Water. Sci. Jpn, 64, 64-69 2010.
- 6) 野田公俊：黄色ブドウ球菌，細菌学 朝倉書店 p.160-168, 2002.
- 7) 食品安全委員会：食中毒発生状況の推移（細菌・ウイルス別 事件数） www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kai20100701sfc&fileId=007 (2018年11月12日)
- 8) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会：腸炎ビブリオ食中毒防止対策のための水産食品に係る規格及び基準，2001 <https://www.mhlw.go.jp/shingi/0105/s0518-2.html> (2018年11月12日)
- 9) 厚生労働省：食中毒統計資料 平成29年（2017年）食中毒発生状況 https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html (2018年11月12日)