

瀬戸内市地先のマガキ及びイワガキにみられた消化管内細菌数の周年変化

山野井英夫

Seasonal Changes of Bacterial Number within the Digestive Tract of Cultured Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Iwagaki Oyster *C. nippona* in the Coastal Waters of Setouchi City

Hideo YAMANOI

キーワード：マガキ，イワガキ，消化管，細菌数

海産魚介類を原因食品とした食中毒事例では，小型球形ウイルス（SRSV）としてかつて知られたノロウイルスのほか，腸炎ビブリオ菌 *Vibrio parahaemolyticus* がその原因として広く知られており，実際，本県の養殖マガキ *Crassostrea gigas* から，漁場によっては厳冬期に前者が，秋季に後者が検出され，生食用ではなく加熱調理用出荷への切り替えを余儀なくされることがある。市場や消費者からの要望は生食用に偏っており，加熱調理用は生食用より単価が低いために，生食用養殖マガキの安定出荷に対する養殖業者の要望は強い。

本県とも海況の良く似た広島県では，養殖マガキの消化管内細菌叢を2年間にわたって季節ごとに調査し，1g当たり $10^{4.3} \sim 10^{5.6}$ CFUの一般細菌数を報告しているが，常在細菌叢に着目した25℃培養のみによる調査であったことから人の食中毒との関連を論じたものではない。¹⁾

このため，まず本県の養殖カキ類における消化管内細菌に関する基礎資料を得ることを目的として，岡山県瀬戸内市牛窓町鹿忍に位置する水産試験場地先の試験筏でマガキ及びイワガキ *C. nippona* を毎月サンプリングし，消化管内細菌数の周年変化を調査したので以下に報告する。

材料と方法

岡山県水産試験場地先海面の試験筏で垂下養殖されていたマガキ及びイワガキを材料とした。マガキは，水産試験場で2003年夏に人工または天然採苗されたもので，瀬戸内市牛窓町錦海地先または同町水産試験場地先（両者は直線距離で約4km離れている）で垂下養殖されていた。錦海地先から試験場地先に移動したマガキを供す

る場合，少なくとも1か月以上経過した個体を用いた。イワガキは山陰地方から約3年前に購入され，試験場地先筏で垂下養殖されていたもので推定5歳以上の個体であった。'05年1月から12月までマガキを，同年4月から12月までイワガキを調査に供した。

筏から取りあげたカキを，直ちに実験室に持ち込んでナイフで開殻し，むき身とした。むき身重量を秤量後，消化管を無菌的に摘出し，その約0.3gをガラスホモジナイザーにとり，重量を測定した後，滅菌海水を加えて3mlとした。磨砕後，これを原液として滅菌海水で10倍段階希釈し，生菌数の測定に供した。

培地としてTCBS寒天培地（栄研）と，食塩濃度を3%に調整した普通寒天培地（栄研）を，各希釈段階ごとに4枚ずつ用い，平板ごとに0.1mlを接種してコンラージ棒で塗布し，培養に供した。培養温度を25℃と37℃とし，それぞれに各培地2枚ずつを供した。37℃では翌日に，25℃では2日後にコロニー数を計数し，当初の消化管重量と希釈率から摘出消化管1g当たりの細菌数を求めた。

10月と11月の調査の際には，細菌数の最も多かったマガキ個体と，逆に最も少なかったマガキ個体を2~3個体ずつ選び，25℃培養下で普通寒天培地上に生育してきたコロニーから無作為に釣菌して純培養し，それらの簡易同定を行った。なお，細菌数の多かったマガキ4個体から得られた菌株は90株，細菌数の少なかったマガキ5個体から得られた菌株は49株で，合計139株であった。

結果

海水温 調査日における試験筏の表面海水温を図1に

示した。1月に約10℃であった海水温は2, 3月に8℃台にまで低下した後, 4月から上昇に転じ, 8月に最高水温を記録した後, 9月以降下がりをはじめ, 12月には再び10℃以下となった。

むき身重量 今回の調査に供したマガキのむき身重量の平均値と範囲を図2に, イワガキのそれを図3にそれぞれ示した。平均むき身重量が最大でも30gを越えることのなかったマガキに対し, イワガキでは50gに届く月さえあり, イワガキがマガキより大きいことは明らかであった。また, 夏に大型化するイワガキに対して, マガキは冬季に重くなる傾向があったが, 個体差も大きかった。

消化管内細菌数 マガキ及びイワガキにおける消化管1g当たりの細菌数を調査月ごと個体ごとに対数表示で図4 (マガキ), 図5 (イワガキ) にそれぞれ示した。いずれの図中においても, 菌数が検出限界 ($5.0 \times 10\text{CFU/g}$ 前後) 以下であった場合は1.0として表した。

培養温度が37℃の場合, 普通寒天培地を用いて測定したマガキの一般細菌数は, まれに検出限界以下のこともあったものの, 冬季には最大でも 10^4CFU/g であった一方, 夏季には 10^6CFU/g を越える個体もあって, 冬季に少なく夏季に多い傾向が明瞭であった。また, その傾向はTCBS寒天培地を用いた場合一層顕著で, 検出限界

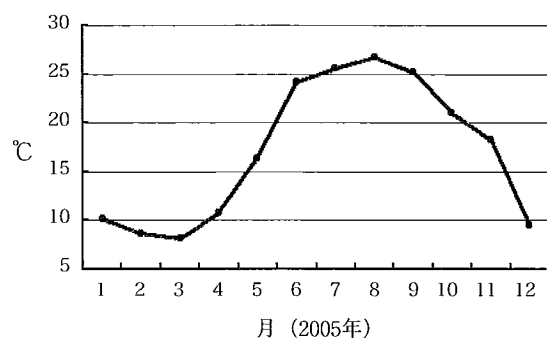


図1 調査時の海水温

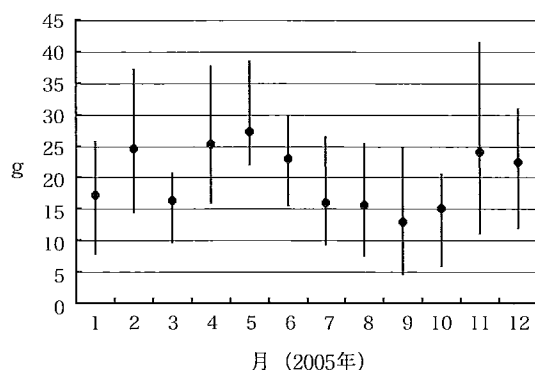


図2 マガキむき身重量の平均値と範囲

以下の個体が多かった冬季に対して, 6~11月には多くの個体が 10^4CFU/g 前後にも達し, 8月には 10^6CFU/g の個体もあった。

培養温度が25℃の場合, 37℃の場合と異なり季節性は不明瞭で, 一般細菌数, TCBS細菌数とも $10^3 \sim 10^5\text{CFU/g}$ の個体が多かった。

イワガキの場合, 図5に示したように, 37℃培養で得られた一般細菌数, TCBS細菌数の推移には, マガキと同様に夏季に多く冬季に少ない傾向がみられた。また, 25℃培養の結果をみると, 10月に検出限界以下の個体が現れるなど, マガキではみられない秋季の低下傾向が認められた。

こうした傾向は, 平均値でみるとより明瞭であった(図6)。なお, 図中の表示については, まず個体ごとに菌数 (CFU/g) の対数値をとり, その算術平均値で示した。ただし, 個体により検出限界以下であった場合は便宜的に1.0とした。

図6に示したように, 25℃培養におけるマガキの消化管内細菌数は一般細菌数, TCBS細菌数とも周年 $10^3 \sim 10^4\text{CFU/g}$ で推移し大きな変化は見られなかった。一方, 37℃培養では, 図3でも既に明らかであったように夏季に多くなるという形で季節性が認められた。

イワガキでの結果をみると, 25℃培養による一般細菌数, TCBS細菌数ともマガキより少ない傾向が認められただけでなく, 9, 10月に一旦下がった後, 11, 12月に回復する現象が観察された。この秋季の菌数減少は37℃培養でもみられ, マガキよりも早期に始まる秋季の菌数減少となって表れていた。ただし, 37℃での秋季の菌数減少は回復することなく, 冬季に向かってさらに進行した。

次に, 消化管内細菌数にみられた著しい個体差が, その組成の違いに起因したものであるかどうかを調べた結果を表1に示した。そこに示したように, ほぼ全ての個体にお

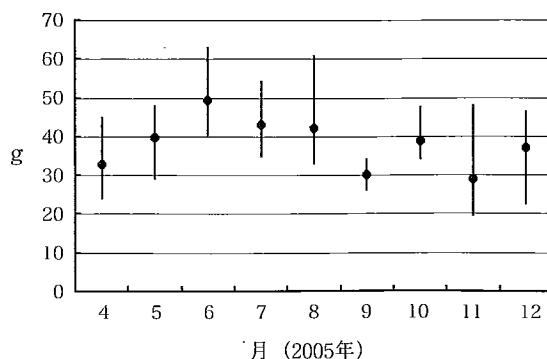


図3 イワガキむき身重量の平均値と範囲

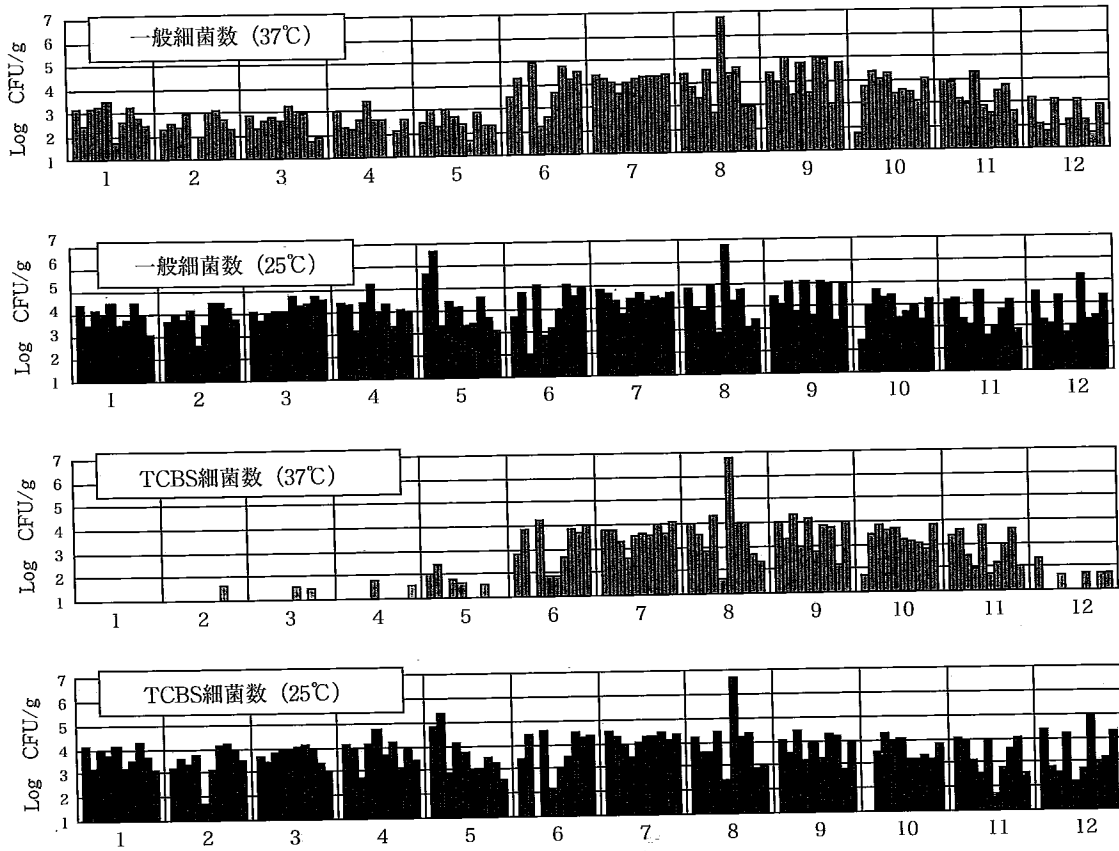


図4 マガキにおける消化管内細菌数の推移 (2005年, 月別・個体別表示)

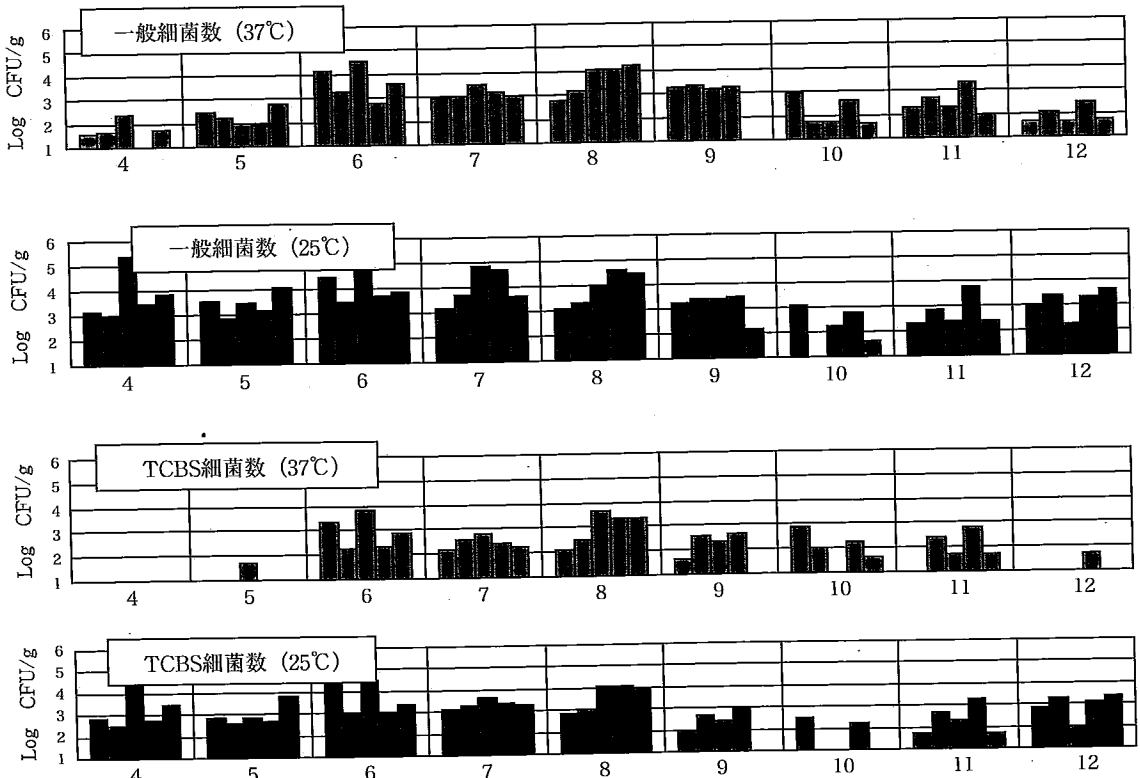


図5 イワガキにおける消化管内細菌数の推移 (2005年, 月別・個体別表示)

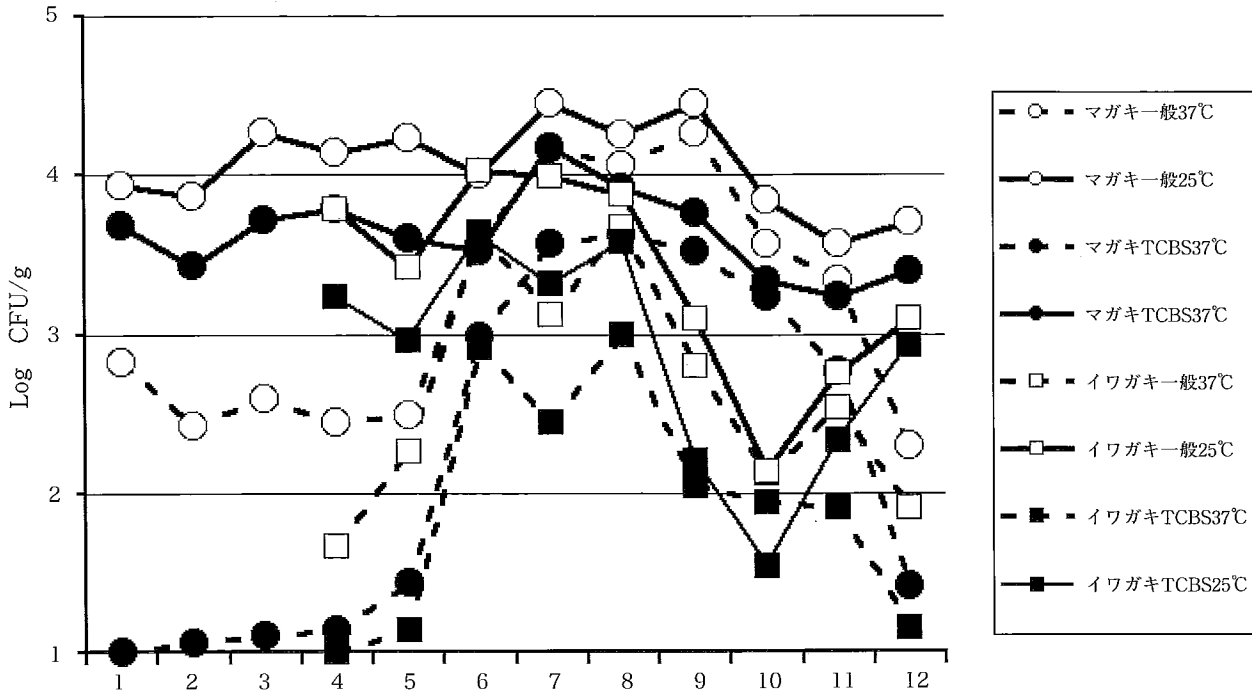


図6 マガキ、イワガキにおける平均消化管内細菌数の推移

表1 マガキにおける個体別細菌組成の比較 (%)

	Entero.	Vibrio	Aeromonas	inert	同定不能	
多かった 個体	No.1	12	68	4	16	0
	No.2	16	64	4	8	8
	No.3	0	79	0	16	5
	No.4	0	71	0	24	5
少なかった 個体	No.1	60	20	0	0	20
	No.2	7	86	0	0	7
	No.3	0	71	0	14	14
	No.4	22	56	0	22	0
	No.5	0	86	0	7	7

全株グラム陰性。Entero; オキシダーゼ陰性, Vibrio; 運動性有り, 糖から酸を産生し, ガスを産生しない, Aeromonas; 運動性有り, 糖から酸とガスを産生する, inert; 糖から酸もガスも産生しない。

いて *Vibrio* 属細菌が優勢し、属レベルでみた限り組成と菌数の多寡に明瞭な関連は認められなかった。

考 察

水産試験場地先のマガキ及びイワガキにおける消化管内細菌数の季節的変化を、食塩濃度3%普通寒天培地及びTCBS寒天培地を用い、25及び37℃の培養温度で調査した結果、海況の比較的良く似た広島県で報告された一般細菌数とほぼ同じレベルの菌数が本県でもマガキから25℃で周年検出されたほか、37℃培養での細菌数が夏場に著しく多くなる現象が観察され、またマガキ、イワガキともに個体差が極めて大きいことなども明らかになった。

人に病害性がある、当海域でカキから分離される可能性があると推定される *Vibrio* 属細菌には、*V.*

parahaemolyticus や *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* などがあるが、今回の検討では、それらの出現動向を種レベルで把握することはしなかった。しかし、これら *Vibrio* 属細菌が、いずれも37℃で増殖能を有していること、また、TCBS寒天培地上で増殖しうることなどから、夏場の危険性が冬場に比べて著しく高くなることは容易に推定できる。37℃培養でのTCBS細菌数が6~10月の間、高い水準で推移し、11月に至ってもなお少なくないレベルで検出されたことは、本県における養殖マガキの出荷が10月中旬から例年始まることと合わせ考慮すれば、食品衛生上留意すべきことと考えられた。

冒頭で触れた広島県での例でも、分離菌の増殖温度範囲が、冬場に比べて夏場は高温側に遷移することが報告されており、増殖可能温度の比較的高い *V. harveyi* の出現率が夏場に高くなることなどの関連が述べられている。

ところで、腸炎ビブリオ食中毒の原因菌である *V. parahaemolyticus* については、外洋水からは検出されず我が国沿岸海水から多数検出されること、相模湾沿岸では海水温が20℃を越える7~10月に海水から比較的多く検出されることなど、海水中における季節的消長について数多くの知見が既にある。^{2,3)}

濾過食性であるカキの消化管内細菌叢が、それら海水中における本菌の消長と無縁ではいられないことは容易に推測されるし、実際、米国アラバマ州でも海水温が概

ね20℃を越える4～10月には、カキにおける本菌数が 10^2 CFU/gを越えることが、DePaolaらによって明らかになっている。⁴⁾

また、重篤な敗血症を引き起こすことのある*V. vulnificus*についての研究は、歴史的な経緯から欧米に偏っているものの、上記のDePaolaらは、この*V. vulnificus*についても同時に調査し、両菌はともにカキにおいて良く似た動態を示すことを報告している。ただ、周年にわたって海水温の高い南インド沿岸でカキにおける*V. vulnificus*の動態を調べたParvathiらは、夏の塩分低下との相関について報告しており、海域の自然条件によって一様でないことが察せられる。⁵⁾

我が国では例は比較的少ないものの、本県に近い徳島県において冬季及び春季、*V. vulnificus*が1例も分離されなかった一方、夏季の調査では40.3%のカキから、秋季でさえ10.4%のカキから本菌が分離されたとの報告があり、カキにおけるこれらの菌の消長は、海水温の変化、及び海中における菌の消長と密接に関連していることがうかがわれる。⁶⁾

今回、夏を中心にマガキ及びイワガキの消化管に多数出現した37℃でも増殖する*Vibrio*属細菌が、種としては何であったのか詳細には検討していない。しかし、7、8月の分離菌について、いくつかの重要性状について試験して同定を試みたところ、*V. parahaemolyticus*と判断される細菌が一部で分離されたことから、本県でも夏から秋にかけての高水温期に本菌がマガキに出現している可能性が裏付けられた。

活きたカキ類を、いわゆる殻付きの状態ですぐ殺菌海水もしくは清浄海水中に1日程度おいて大腸菌を大きく減少させる手法については、比較的多くの知見が古くからある。⁷⁻¹⁰⁾しかし、病原性*Vibrio*に着目した研究は、浄化効果が低いと考えられていること¹¹⁾に加えて、多くのカキ生産地でカキ出荷時期の海水温が比較的低いために問題視されてこなかった経緯がある。いずれにしても、マガキ血球の貪食作用が、*Vibrio*属細菌には働きにくいことも報告されており、¹²⁾今回一般細菌とした消化管内細菌数の多くも*Vibrio*属であったことなどを考えると、マガキ、イワガキの消化管と*Vibrio*属細菌との親和性は極めて高いと考えられた。

イワガキの消化管内細菌数の推移に、マガキではみられない秋季の低下傾向が認められたことについて、イワガキ固有の現象であった可能性のほか、本来の生息域ではない本県地先で養殖されたことに伴う生理現象であった可能性も否定できない。

また、多くの場合、イワガキでマガキより菌数が少なかったことについては、血球の貪食能の強弱に起因した可能性も考えられた。しかし、両者の貪食能についてザイモサンを異物として用いて検討された報告¹³⁾によると、貪食能に大きな差は通常なく、ただ、低水温時にはイワガキの貪食能はマガキより大きく低下したことが報告されている。今回の調査では、低水温時でもイワガキのほうがマガキより消化管内細菌数が少なかったことから、消化管内細菌数の多寡に及ぼす血球の貪食能の影響は、低水温によるイワガキの他の生理作用の低下、特に摂餌や濾水能力の低下等に比べればむしろ小さいと推測された。

マガキ、イワガキを問わず調査期間を通じて個体差が著しかったことの原因は不明であった。細菌相互の拮抗作用等に起因した現象であった可能性があるものの、手がかりを得ようとした組成調査では明瞭な違いを見ることができなかった。また、仮に他種細菌の増殖や定着を阻害する特殊な細菌等の存在が明らかとなって、菌数における大きな個体差を説明しえたとしても、その細菌が一部のカキにのみ定着する原因をも特定しうるものではない。いずれにしても種レベルでの詳細な比較など、今後の検討課題としたい。

また、今回は食塩濃度を調整した普通寒天培地を一般細菌分離用に供したが、上述の種々の現象に海水依存性細菌が重要な役割を果たしている可能性も考えられる。海水で調整したZoBell 2216e寒天培地を用いると、今回の場合も普通寒天培地と比較して5割がた多い菌数が検出されることを別途確認していることから、今後の検討には、ZoBell 2216e寒天培地など海水培地の適用も必要と考えられた。

文 献

- 1) Iida, Y., R. Honda, M. Nishihara, and K. Muroga, 2000: Bacterial Flora in the Digestive Tract of Cultured Pacific Oyster, *Fish Pathol.*, 35 (4), 173-177.
- 2) 申 錫雨・堀江 進・奥積昌世・小林義久, 1976: 沿岸海水における腸炎ビブリオの季節的消長と細菌フローラ, *日水誌*, 42 (9), 1041-1053.
- 3) 堀江 進・佐伯和昭・奥積昌世, 1967: 海水および河口水における腸炎ビブリオ菌数の測定, *日水誌*, 33 (2), 126-130.
- 4) DePaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook, 2003: Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters,

- Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3), 1521-1526.
- 5) Parvathi, A., H. S. Kumar, I. Karunasagar, and I. Karunasagar, 2004 : Detection and Enumeration of *Vibrio vulnificus* in Oysters from Two Estuaries along the Southwest Coast of India, Using Molecular Methods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (11), 6909 - 6913.
- 6) 大仲賢二・古畑勝則・井口光二・原元宣・福山正文, 2002 : *Vibrio vulnificus* 感染症に関する基礎的研究 : 海水, 海泥およびカキからの本菌分離状況, *感染症*, 76 (7), 528 - 535.
- 7) 安川隆, 1934 : 牡蠣より分離せる大腸菌族に就て, *日本水誌*, 3, 77 - 79.
- 8) 遠山祐三・安川隆, 1935 : 牡蠣の浄化に関する実験的研究, *日本水誌*, 4, 176 - 182.
- 9) Tohyama, Y., 1935 : The Bacteriological Analysis of Japanese Oyster, *日本水誌*, 4, 75 - 78.
- 10) 黒沢和寛・S. Caoile・A. Cariaga, 1991 : オゾンによるマガキおよびミナミマガキの浄化, *水産増殖*, 39 (4), 393 - 398.
- 11) W. S. Otwell, G. E. Rodrick, and R. E. Martin, 1991 : Molluscan Shellfish Depuration, CRC Press, Boston.
- 12) 森勝義, 2005 : 水産増養殖システム3, 貝類・甲殻類・ウニ類・藻類, マガキ (p171 - 267), 初版, 恒星社厚生閣, 396pp.
- 13) 高橋計介・矢内秀和・室賀清邦・森勝義, 2005 : イワガキおよびマガキ血球の形態と貪食能, *水産増殖*, 53 (1), 53 - 59.