

河川水中での *Vibrio cholerae* non-O1 の生存

内山 秀和*

Vibrio cholerae non-O1 が河川水中の栄養を利用して生存する可能性を、濾過滅菌あるいは高圧蒸気滅菌処理した河川水と未処理の河川水を用いて検討した。*V. cholerae* non-O1 は、高圧蒸気滅菌処理した河川水の中で増殖したが、濾過滅菌処理した河川水中では生存菌数が経日的に減少し、また未処理の河川水中では始め 10^6 CFU/ml あった菌数が速やかに減少し、10日以降は検出されなくなった。*V. cholerae* non-O1 は、河川水中の常在細菌との栄養の競合により実験的閉鎖系内に高密度で生存し続けることができないと考えられた。また、合成培地を用いた検討により、*V. cholerae* non-O1 の増殖に必要な栄養は、炭素源のブドウ糖の他に、窒素源、リン酸源、イオウ源の無機塩類であった。濾過滅菌河川水に合成培地の栄養源を添加すると、炭素源あるいはリン酸源を補わなかったとき *V. cholerae* non-O1 は増殖しなかった。これらの結果から、河川水が *V. cholerae* non-O1 によって汚染されると、*V. cholerae* non-O1 は河川水中の溶存物質と粒子状物質を栄養にして生存する可能性が示唆された。

Key words : *Vibrio cholerae*, 栄養, 環境微生物, 河川, 飲料水

I はじめに

コレラの原因菌である *Vibrio cholerae* O1 と生物学的性状が同一で O1 抗血清に凝集しない *V. cholerae* non-O1 は、食中毒の原因菌に指定されている¹⁾。栄養の希薄な環境状況で細菌が生存するには、自己の消化によっている²⁾。そして *V. cholerae* O1 は、細胞成分の消耗によって生存することが報告されている^{3,4)}。海水、河川水などの環境水中の常在細菌の菌数は、環境水に含まれる栄養の濃度との相関がみられ⁵⁾、この栄養を摂取して生存していることが示されている。*V. cholerae* は、湾内の海水の中から分離され、海水中に常在する細菌であると報告されている⁶⁾。*V. cholerae* O1 の栄養要求は、アンモニウム塩のみを窒素源とし、有機アミノ酸を含んでいない培地に発育することが報告され⁷⁾、炭素源を除いた無機物質の栄養で増殖できるとされている⁸⁾。

ところが、日本の河川水の *V. cholerae* non-O1 による汚染は、上水の処理技術の発達により感染の危険性が無いと考えられているために、本菌の河川水中での生存については検討されていない⁹⁾。

しかし、環境水から分離された *V. cholerae* non-O1 にコレラエンテロトキシンの産生が報告されており¹⁰⁾、さらに本菌により汚染された魚介類による食中毒の事例が報告されている¹¹⁾。本菌が環境水中に生存していることは、水利用の過程において感染が生じる可能性を示唆し、公衆衛生上の問題となる。

そこで、河川水中における *V. cholerae* non-O1 の生存の可能性を、滅菌処理を加えた河川水あるいは未処理の河川水に接種した本菌の増殖あるいは消失により検討した。また、*V. cholerae* non-O1 の増殖に必要な栄養を合成培地により検討した。

II 材料と方法

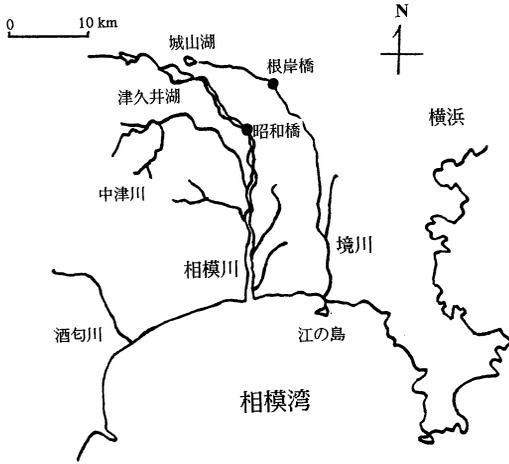
1. 河川水の採水方法と水質試験

神奈川県の中流地点(昭和橋)から1993年1月と9月に河川の表層から採水した。また、比較のために神奈川県と東京都の境を流れる境川の中流地点(根岸橋)から同様に1993年1月と9月に採水した(図1)。

採水した河川水は、氷冷して1時間以内に実験室に運び、水質試験と同時に河川水中の細菌数の算定を行った。河川水の水質試験は、採水地点で測定した気温(水銀温度計)と水温(ペッテニコ

* 北里大学医療衛生学部公衆衛生学研究室
連絡先: 〒228 神奈川県相模原市北里 1-15-1
北里大学医療衛生学部公衆衛生学研究室
内山秀和

図1 相模川と境川の採水地点



ヘル水温計), また, 実験室に運搬後にアンモニア性窒素 (ネスラー法), リン酸イオン (モリブデン酸アンモニウム法), 電気伝導度 (電気伝導度計), pH (比色法), Cl^- イオン (電極法), および河川水中の生菌数 (後述) と大腸菌群数 (最確数法) を測定した¹²⁾。

2. 使用菌株

国立予防衛生研究所から分与を受け当教室にて保存している, 感染ヒト糞便から分離された *V. cholerae* non-O1 (O-37, Sudan) 株, および当教室にて境川の河川水から分離された *V. cholerae* non-O1 株 No. 85-5 を用いた (以下, 各々を Sudan 株, 85-5 株と略す)。その他に, 相模川と境川の両河川水から分離した各々 5 株および川崎市衛生研究所より分与を受けたヒト由来の 10 株と河川水から分離した 10 株は, 栄養要求試験に試験菌株として用いた。菌株は, 普通寒天培地 (栄研化学) にて 36°C 18 時間の前培養後, 0.85% NaCl 水溶液 (以下, 食塩水) にて 3 回遠心洗浄し, 食塩水に再浮遊させた菌液を用いた。あるいは, Na^+ イオンを含まない試験には, 当該試験用の溶液にて遠心洗浄し, 再浮遊させた菌液を用いた。

3. 河川水中の生菌数と従属栄養細菌数の算定

採水した河川水より 3 回の検体採取を行い, 各々の一定量を食塩水で 10 倍階段希釈し, 標準寒天培地 (ニッスイ) と Peptone-Yeast-Glucose (以下, PYG; ペプトン 2 g, 酵母エキストラクト 1

g, ブドウ糖 0.5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, $\text{pH} 7.0 \pm 0.2$) 培地に塗布した。検体を塗布した標準寒天培地は 36°C 24 時間培養し, また PYG 培地は 20°C 5 日間培養した。培養後, 標準寒天培地上に形成される集落数を生菌数とし, PYG 培地上に形成される集落数を従属栄養細菌数として, 各検体の 1 ml 当たりの菌数を常用対数で求め 3 検体の平均値で表わした。生菌数と従属栄養細菌数の経日変化は, 10°C と 20°C の水温に河川水を 2 つに分け, 数日毎に各々 3 回の採水を行ない, 同様に培養と算定を行って求めた。

4. 河川水の処理

相模川と境川から採水した河川水は, 高圧蒸気滅菌 (121°C , 20 分) した河川水 (以下, 高圧滅菌河川水), メンブランフィルター (ミリポアフィルター HA, 直径 47 mm, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$) で濾過滅菌した河川水 (以下, 濾過滅菌河川水), ろ紙 (TOYO ROSHI No. 5 C) にて浮遊物を除いた河川水 (以下, ろ過河川水), および処理を加えない河川水 (以下, 河川原水) を用いた。

5. *V. cholerae* non-O1 の生存菌数の算定

Sudan 株あるいは 85-5 株を高圧滅菌河川水, 濾過滅菌河川水, ろ過河川水と河川原水の各々の 3 検体に接種した。接種した菌株の生存菌数は, 経目的に一定量を各検体より採取し, 食塩水で 10 倍階段希釈して TCBS 寒天培地 (栄研化学) に塗布し, 36°C 24 時間培養後 *V. cholerae* non-O1 の定型集落数から 1 ml 当りの菌数を常用対数で求め, 3 検体の平均値で表わした。この菌数の検出限界は 0.3 で, 検出限界未満の場合に検出されないとした。

6. *V. cholerae* non-O1 の栄養要求の試験

V. cholerae non-O1 の栄養要求試験は, 窒素源 (NH_4^+), 炭素源 (ブドウ糖), イオウ源 (SO_4^{2-}), リン酸源 (PO_4^{3-}) の栄養組成から成る合成培地 (NH_4Cl 1.0 g, NaCl 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, ブドウ糖 5.0 g, KH_2PO_4 0.27 g, Na_2HPO_4 6.45 g, 蒸留水 1,000 ml, $\text{pH} 7.5$) を用いた。合成培地の組成である MgSO_4 を (NH_4)₂ SO_4 あるいは MgCl_2 に, NH_4Cl を (NH_4)₂ HPO_4 に, SφRENSEN Buffer を K_2HPO_4 に各々置き換えた培地あるいは組成の 1 つを除いた培地を用いて, *V. cholerae* non-O1 の増殖に必要な栄養を検討した。合成培地に接種した試験菌株は,

接種後36°C, 24~120時間の静置培養を行い, 増殖による混濁が生じた培地より5代まで継代培養を行った。

7. 栄養組成の濃度による *V. cholerae* non-O1 の増殖

合成培地の栄養組成の1つのみを2倍階段希釈して, 他の栄養組成の濃度を一定とした希釈合成培地を作成した。この希釈合成培地に Sudan 株を接種して, 36°C24時間培養後に培地の吸光度を測定 (島津 SP-20, 520 nm) した。増殖密度は, 各3検体の培地の吸光度を平均して表わした。

8. 栄養を添加した濾過滅菌河川水の中の *V. cholerae* non-O1 の増殖

濾過滅菌河川水に合成培地の最終濃度と同じになるように栄養組成の1つのみを除いて添加した。この栄養を添加した濾過滅菌河川水の中に接種した Sudan 株あるいは85-5株は, 36°C24時間培養した。増殖密度は, 各3検体の培地の吸光度を平均して表わした。

III 成 績

1. 河川水の水質

相模川と境川の水質は, 表1に示したように相模川より境川の方が水質試験項目のイオン濃度, および細菌数について高い値を示した。また, 境川に比較して相模川の水質の変動は少なかった。既報での検討においても, 両河川の水質を比較すると, 採水の時期による河川水の水質の変化は, 相模川より境川で大きかった¹³⁾。両河川水中に浮遊物は, 肉眼でみられなかった。そして両河川水の透視度は, 30 cm 以上であった。なお, 今回用いたすべての河川水から TCBS 寒天培地上に *V. cholerae* non-O1 の定型集落は形成されなかった。

2. 河川水中での *V. cholerae* non-O1 の生存

相模川からの河川原水, ろ過河川水, 濾過滅菌河川水と高圧滅菌河川水に接種した Sudan 株あるいは85-5株の生存菌数の経日変化を図2に示した。水温20°Cの高圧滅菌河川水に接種した両菌株の生存菌数は, 始発菌数 10^5 CFU/ml から一時減少するが, 14日以上 $10^3 \sim 10^4$ CFU/ml の菌数を維持した。しかし両菌株は, 濾過滅菌河川水の中で始発菌数 10^5 CFU/ml から10日後10 CFU/ml 以下の生存菌数に減少し, また河川水中に常

表1 実験に用いた河川水の水質試験

水質項目 ¹⁾	河 川 名			
	相 模 川		境 川	
採水日(月/日)	1/20	9/29	1/21	9/29
気温°C	8.0	21.6	8.0	19.7
水温°C	8.4	18.2	8.4	20.4
pH	7.6	7.4	7.6	7.2
E. C. μ S/cm	148.3	131.0	465.0	593.0
Cl ⁻ mg/l	6.2	2.9	66.0	28.5
NH ₄ ⁺ mg/l	0.1	<0.1	6.0	3.0
PO ₄ ³⁻ mg/l	0.2	0.15	4.0	0.7
生菌数/ml	1.2×10^4	1.1×10^4	1.8×10^5	8.6×10^4
従属栄養細菌数/ml	1.4×10^5	1.1×10^4	1.1×10^6	ND ²⁾
大腸菌群数(MPN)/100 ml	7.9×10^3	2.1×10^3	2.2×10^5	4.4×10^4

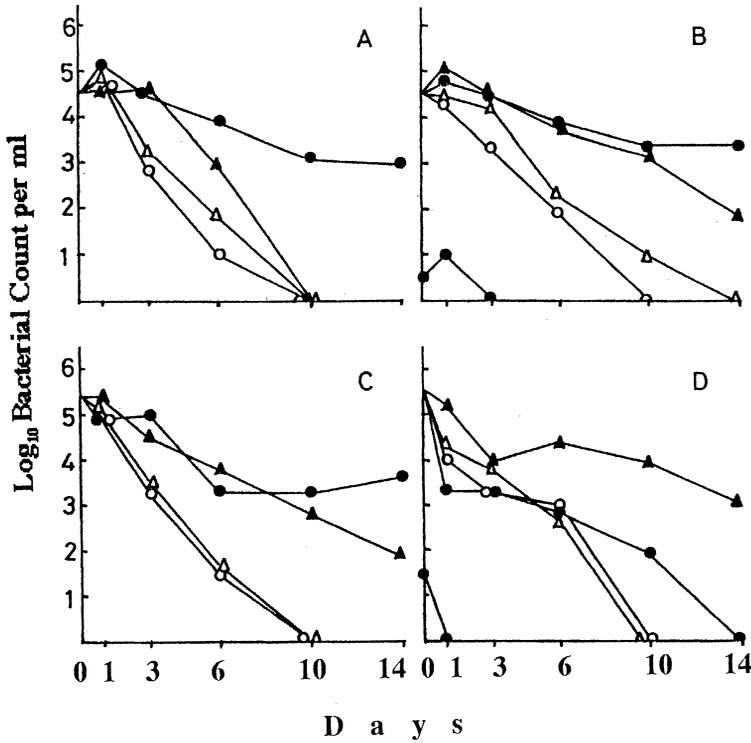
1) 略語; E.C.: 電気伝導度, Cl⁻: クロロイオン濃度, NH₄⁺: アンモニア性窒素濃度, PO₄³⁻: リン酸イオン濃度, MPN: 最確数法 (most probable number) による菌数,

2) ND: 未試験

に細菌が生存する河川原水とろ過河川水の中では始発菌数 10^5 CFU/ml から速やかに減少し, 10日以内に検出されなくなった。しかし, 図2(B), (D)に示した水温10°Cの高圧滅菌河川水に接種した両菌株は, 始発菌数 10^5 CFU/ml から14日後には生存菌数 10^3 CFU/ml 以下に減少し, また始発菌数を10 CFU/ml とすると3日以降には検出されなくなり, 増殖しなかった。また濾過滅菌河川水に接種した両菌株の生存菌数は, 水温10°Cの方が水温20°Cに比べて緩やかに減少した。したがって, 相模川からの処理および未処理の河川水の中での生存菌数の増加あるいは減少の経日変化は両菌株とも同様であった。

境川からの河川原水と各処理を加えた河川水に接種した Sudan 株あるいは85-5株の水温20°Cでの経日的な生存菌数の変化を各々図3(A), (B)に示した。高圧滅菌河川水中の両菌株の生存菌数は, 始発菌数 10^6 CFU/ml を14日以上維持したが, 濾過滅菌河川水中では両菌株の生存菌は14日目までに検出されなくなり, ろ過河川水と河川原水では両菌株の生存菌は10日目までに検出されなくなった。よって, 相模川あるいは境川からの処理と未処理の河川水の中での両菌株の生存菌の増殖あるいは減少の傾向は, 変わらなかった。

図2 相模川の河川水に各処理を加えた河川水と未処理の河川水中での *V. cholerae* non-O1株の生存菌数

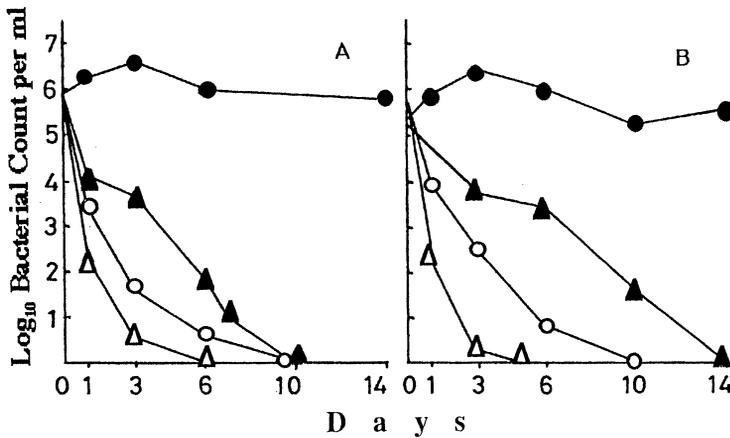


(9月30日採水)

A : Sudan 株の河川水中での生存 (水温20°C), B : Sudan 株の河川水中での生存 (水温10°C), C : 85-5株の河川水中での生存 (水温20°C), D : 85-5株の河川水中での生存 (水温10°C)

記号 ; ○ : 河川原水, △ : ろ過河川水, ● : 高圧滅菌河川水, ▲ : 濾過滅菌河川水

図3 境川の河川水に各処理を加えた河川水と未処理の河川水中での *V. cholerae* non-O1株の生存菌数



(1月21日採水)

A : Sudan 株 (水温20°C), B : 85-5株 (水温20°C)

記号 ; ○ : 河川原水, △ : ろ過河川水, ● : 高圧滅菌河川水, ▲ : 濾過滅菌河川水

夏季と冬季の相模川河川水からの高圧滅菌河川水に接種した Sudan 株あるいは85-5株の経日的な生存菌数の変化を図4(A), (B)に示した。両菌株は、水温20°Cの高圧滅菌河川水中で始発菌数10² CFU/ml以下から3日目以降に、生存菌数10⁴ CFU/mlに増殖後、10日目までその生存菌数を維持した。

また、図4(C), (D)に示した冬季の境川からの高圧滅菌河川水（水温20°C）の中で両菌株は、始発菌数10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ CFU/mlのいずれからでも、10⁶ CFU/mlに増殖し、その後その菌数を維持した。よって、相模川および境川からの水温20°Cの高圧滅菌河川水中で、両菌株は採水した季節に関係なく増殖が可能であった。

3. 河川水の中の従属栄養細菌数と生菌数の経日変化

相模川から（9月29日採水）の河川原水とろ過河川水の中の生菌数と従属栄養細菌数の経日変化

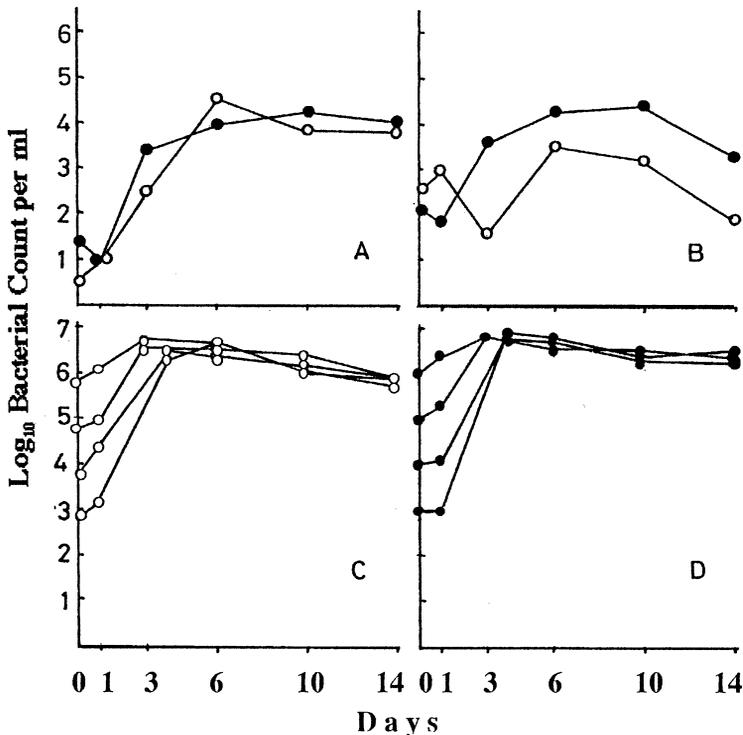
は、水温10°Cあるいは20°Cで図5に示したように14日間生存菌数10⁴ CFU/mlから10⁵ CFU/mlでほぼ一定の菌数を保った。しかし、標準寒天培地とPYG寒天培地上に形成される集落の形態は、14日間の菌数算定ごとに一様でなかった。

4. *V. cholerae* non-O1の増殖に必要な栄養

合成培地に接種した Sudan 株は、始発菌数10² CFU/mlから36°C24時間培養後、約10⁸ CFU/mlに増殖した。合成培地の栄養組成をそれぞれ他の物質に置き換えた培地で Sudan 株は、ブドウ糖、NK₄⁺、SO₄²⁻、PO₄³⁻を栄養として必要とした。しかし、合成培地の中のMg²⁺、Cl⁻イオンは、Sudan 株の栄養として必要としなかった。また、合成培地の中のNaClを除いても増殖した。

V. cholerae non-O1の試験菌株を合成培地に接種したところすべての菌株は増殖し、5代まで継代培養することが可能であった。しかし、すべての試験菌株は、合成培地の栄養組成が1つ欠ける

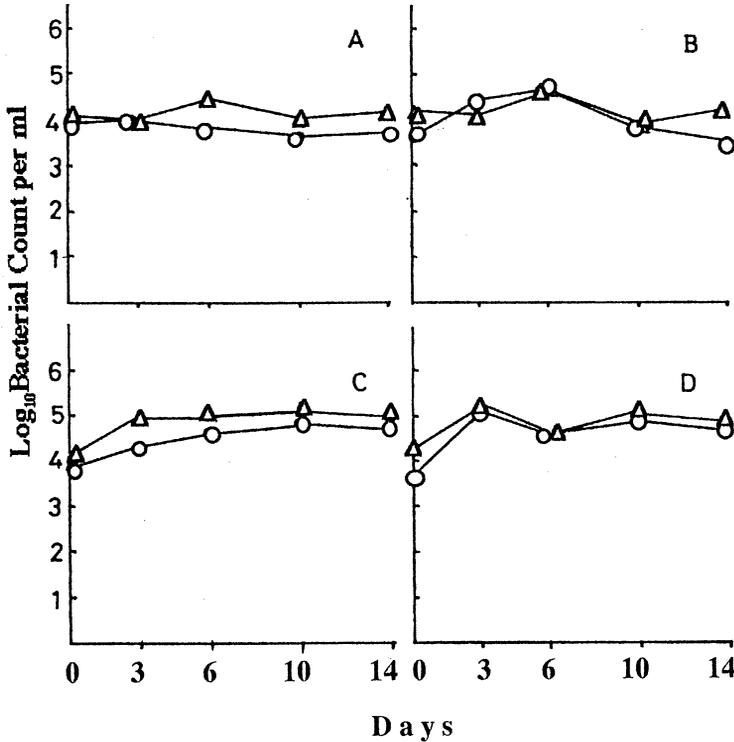
図4 異なる季節の河川水、および、異なる河川の河川水中での *V. cholerae* non-O1株の生存菌数



A: 夏季（9月29日）の相模川からの高圧滅菌河川水中での生存菌数（水温20°C）、B: 冬季（1月20日）の相模川からの高圧滅菌河川水の中での生存菌数（水温20°C）、C, D: 境川から採水（1月21日）した高圧滅菌河川水の中での生存菌数（水温20°C）

記号；○：*V. cholerae* non-O1 (O-37, Sudan) 株, ●：*V. cholerae* non-O1株 No. 85-5

図5 河川原水とろ過河川水の中の生菌数と従属栄養細菌数の経日変化



(相模川, 9月29日採水)

A: 河川原水 (水温20°C), B: ろ過河川水 (水温20°C), C: 河川原水 (水温10°C), D: ろ過河川水 (水温10°C)

記号; ○: 生菌数, △: 従属栄養細菌数

と増殖することがなかった(表2)。よって、合成培地は、*V. cholerae* non-O1の増殖に必要な栄養源を含んでいると思われた。また、*V. cholerae* non-O1に必要な栄養は、炭素源を除くとNH₄⁺, SO₄²⁻, PO₄³⁻の無機物質のみであることが示された。

5. 栄養を添加した河川水中での増殖

希釈合成培地に接種したSudan株の36°C24時間培養後の増殖密度を吸光度で図6に示した。増殖の判定は、合成培地にSudan株を培養した場合の吸光度と同様に、接種した時の吸光度0.04未満を-, 培養後の吸光度0.09以上を+とし、その中間の0.04以上~0.09未満を±とした。

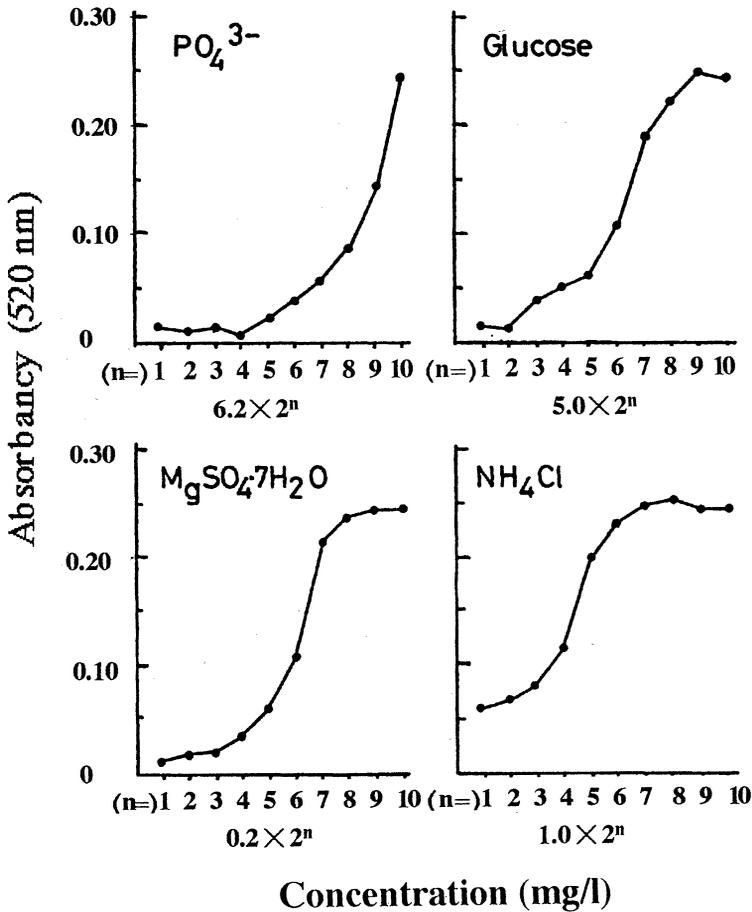
表3は、濾過滅菌河川水に栄養組成の1つを除いた合成培地を添加したものにSudan株あるいは85-5株を接種したときの菌増殖の判定を示した。両菌株は、相模川と境川からの濾過滅菌河川水に炭素源を除いた合成培地を添加した場合には増殖できなかった。また、リン酸源を除いた合成

表2 合成培地の栄養組成の組合せと *Vibrio cholerae* non-O1株¹⁾の経代培養による増殖の検討

栄養源	合成培地の栄養組成の組合せ ²⁾					
NH ₄ Cl	○	○	○	○	○	●
NaCl	○	○	○	○	●	○
MgSO ₄ ·7H ₂ O	○	○	○	●	○	○
Glucose	○	○	●	○	○	○
SφRENSEN'S Buffer ³⁾	○	●	○	○	○	○
KH ₂ PO ₄ +Na ₂ HPO ₄	○	○	○	○	○	○
継代培養	増殖の判定					
(初代)	+ ⁴⁾	- ⁵⁾	-	-	+	-
(2代)	+	-	-	-	+	-
(3代)	+	ND ⁶⁾	ND	ND	+	ND
(4代)	+	ND	ND	ND	+	ND
(5代)	+	ND	ND	ND	+	ND

1) ヒト由来の11株および河川から分離の20株の *Vibrio cholerae* non-O1株。2) ○: 合成培地の栄養組成として含む。●: 合成培地の栄養組成として含むまない。3) SφRENSEN'S Bufferの組成としてのKH₂PO₄とNa₂HPO₄。4) +: 24時間以内に増殖, 5) -: 120時間培養後に増殖を認めない。6) ND: 未実施

図6 合成培地中の栄養組成を希釈した場合の Sudan 株の増殖



培地を濾過滅菌河川水に添加した場合も、両菌株は十分に増殖できなかつた。相模川の河川水では窒素源が欠ける合成培地を濾過滅菌河川水に添加した場合も両菌株は、十分に増殖しなかつた。

IV 考 察

Vibrionaceaeに属する細菌は、河川、湖、沼、および、海水の環境水の中に広く分布している。その生態についての研究は、湾内²⁾、海洋で詳細に実施され、高い割合で生存し、かつ、広域に生存していることが示されている¹⁴⁾。Vibrio属の中のV. choleraeは、NaClを添加しないペプトン水で増殖することのできる菌種の1つに含まれ、増殖に必要な栄養物質があれば低い塩濃度の淡水中で生存の可能性が考えられる。河川水のV. cholerae O1による汚染は時々報告されるが、多くの場合

その汚染は、一過性に経過する。しかし、これと同じ属の細菌であるV. cholerae non-O1は、コレラの流行と同時に、あるいはその後に汚染の起こった河川から分離される^{15,16)}。Colwellらは、病原性のあるVibrio属菌が環境水中に常在菌として生存している可能性を報告している⁶⁾。河川水などの環境水中からV. cholerae non-O1が分離されることは、環境条件によって増殖する可能性が考えられ、汚染された水や水産食品を介して人体に感染する可能性が増大する¹¹⁾。

水産食品による感染報告は、その水産物を捕獲した環境水からのV. cholerae non-O1の分離に際して、水質試験での塩濃度を注目している^{17,18)}。V. cholerae El Tolによって汚染された井戸水に含まれる塩類によって、V. cholerae El Tolは一時的な増殖が示されている¹⁹⁾。今回の栄養要求試験の

表3 濾過滅菌河川水に合成培地の栄養組成の添加による *Vibrio cholerae* non-O1 株の増殖

河川水 ¹⁾	菌株 ²⁾	対照 ³⁾	合成培地の欠落した栄養源			
			(PO ₄ ³⁻)	glucose	(SO ₄ ²⁻)	(NH ₄ ⁺)
相模川(9-21-'93)	Sudan	+ ⁴⁾	- ⁵⁾	-	+	-
相模川(9-21-'93)	85-5	+	± ⁶⁾	-	+	-
相模川(1-20-'93)	Sudan	+	±	-	+	±
相模川(1-20-'93)	85-5	+	±	-	+	±
境川(9-21-'93)	Sudan	+	±	-	+	+
境川(9-21-'93)	85-5	+	±	-	+	+
境川(1-21-'93)	Sudan	+	±	-	+	+
境川(1-21-'93)	85-5	+	±	-	+	+

1) 濾過滅菌河川水(採水年月日)。2) ヒト由来の *Vibrio cholerae* non-O1(O-37, Sudan) 株および河川から分離の *Vibrio cholerae* non-O1 株 No.85-5。3) 合成培地の組成のすべてを含む。4) + : 24時間培養後に吸光度0.09以上に増殖, 5) - : 24時間培養後に吸光度 0~0.04未満, 6) ± : 24時間培養後に吸光度0.04以上~0.09未満。

結果より, *V. cholerae* non-O1 の増殖に必要な栄養源は, 炭素源と, 無機塩類の NH₄⁺, SO₄²⁻, PO₄³⁻ のみであった。Singleton らは, 栄養物質が 1,000 μg/l 以下であれば, 塩濃度によって *V. cholerae* の生存が維持されることを報告している²⁰⁾。また, Rhodes らは, Na⁺ 濃度が 5 mM 以下のコロラド川から *V. cholerae* non-O1 を分離し, 生存の可能性を報告した²¹⁾。相模川と境川の調査では, *V. cholerae* non-O1 分離時に Na⁺ 濃度 1 mM 以下であり, 塩濃度は 0.04~0.3% であった¹³⁾。実験に用いた相模川の河川水の塩濃度は, Cl⁻ イオン量から換算²²⁾すると 0.04% と 0.15% と上述の報告より低い。この低い塩濃度の河川水からの高圧滅菌河川水中に接種された *V. cholerae* non-O1 の増殖は, 河川水の中に加熱処理によっても分解されない栄養成分の存在によっており, この菌の増殖に必要な栄養が河川水中に存在することが考えられた。

しかし, 同じ河川水を用いた濾過滅菌河川水の中では, 両菌株は増殖しなかった。すなわち, 河川水を濾過滅菌することにより, 溶存物質以外の増殖に必要な栄養物質が除去されたのか, あるいはまた, 加熱を加えていないことから phage の存在の可能性も考えられた。しかし, *V. cholerae* non-O1 株の増殖した培地への濾過滅菌河川水の添加によって, 培地の白濁の消失のないことから phage の存在の可能性は低いと考えられた。

そこで, 濾過滅菌河川水に炭素源, 窒素源, イオウ源, リン酸源を添加すると, 窒素源あるいは

イオウ源が添加されない場合でも増殖し, 河川水中には増殖に十分な量の窒素源とイオウ源が存在することが示された。水質試験の結果より相模川の河川水は窒素源であるアンモニア性窒素量が 0.1 mg/l 以下と低いため, 濾過滅菌河川水への窒素源を欠いた合成培地の添加は増殖密度が低かったが, 境川からの濾過滅菌河川水に窒素源を欠いた合成培地を添加した場合は増殖した。相模川からの高圧滅菌河川水の中で 10⁴ CFU/ml, 境川からの高圧滅菌河川水の中で 10⁶ CFU/ml の菌数に *V. cholerae* non-O1 を増殖させる程度に炭素源とリン酸源は存在していたが, 濾過滅菌によってさらに減少あるいは栄養物質の欠落のために, 高い密度の増殖ができないことが考えられた。すなわち, 河川水の中の 0.45 μm の孔径のメンブランフィルターによって除去される粒子状物質が, 増殖に関与していることが考えられた。

粒子状物質については, 詳細な検討を加えていないが, プランクトン, 藻類, リン酸の懸濁状の団粒²³⁾, 栄養物質の粒子状物質への付着, あるいは, 微細な有機物質の塊などの存在が考えられた。*V. cholerae* non-O1 は, 粒子状物質への付着による栄養の獲得あるいは高圧蒸気滅菌の加熱による粒子状物質の栄養が水中へ分散しこれを獲得したことが考えられた。

自然の河川水中で生存している細菌の内冬寒培地上に増殖することができる細菌は, 一定温度の実験的な閉鎖系内で希薄な栄養状態の河川水の中に14日間ほぼ一定の菌数を示した。河川原水と

ろ過河川水の中で生菌数と従属栄養細菌数の経日的変化を観察する際、寒天培地上に形成される集落形態は観察日ごとに変化が見られた。すなわち、河川水中に生存する細菌群の構成は経日的に変化を生じているものと思われた。Harrisonは、栄養のない飢餓状態において菌体または死菌体とその分解有機物質が保護作用または栄養物質として菌の生存に寄与すると報告している²⁾。寒天培地上の個々の集落を形成する菌について詳細な検討を加えなかったが、限られた河川水中の栄養を利用して生存する菌とその死菌体有機物質を利用して生存する菌によって一定の菌数が維持されたものと考えられる。

河川原水あるいはろ過河川水に接種した *V. cholerae* non-O1 は、生存菌数が速やかに減少し分離されなくなったが、死滅したのではなく、低密度で生存しているとも思われる。一方、水質試験結果に示したごとく(表1) 両河川は水質の差があり、生菌数、従属栄養細菌数と大腸菌群数に差がみられる。したがって、河川の水質汚染と細菌の菌数は、相関があると報告される⁵⁾ ように、相模川と境川の水質の異なる河川水からの高圧滅菌河川水の中での *V. cholerae* non-O1 は、増殖する菌数に差が示された。単一に存在する時は、増殖できるだけの栄養があるにもかかわらず、他の細菌が存在することによって *V. cholerae* non-O1 の増殖が見られないのは、河川水中の細菌による栄養獲得の競合によるものと考えられた。西尾らも *Salmonella* の河川水中での生存菌数の速やかな減少は、水中における細菌相互の影響と考えている²⁴⁾。自然の河川水を実験的な閉鎖系の環境とした場合、希薄な栄養状態で *V. cholerae* non-O1 のみ単一に高密度で他の細菌、藻類、プランクトンなどの微生物と共存することは困難があると考えられた。増殖に必要な栄養物質が河川水に存在することは、低い密度で生存し続けていることも考えられ、自然界では河川水の流れによる栄養の補給が行われ、必要とする栄養が獲得し易くなり、他の菌との低密度での共存が可能となるならば、河川水中での生存の可能性が考えられる。

V. cholerae non-O1 は、低温による生存への影響があることが報告されている²⁵⁾。そこで、夏季と冬季に採水した高圧滅菌河川水中で本菌株は20°Cの水温であれば採水の季節に関係なく増殖

し、低い水温10°Cの時には増殖できなかった。すなわち、水温のみが増殖抑制に関与し、季節による水質の変化によるものでないことが示された。冬季の *V. cholerae* の生存は死滅するのではなく、生存する可能性があるという報告もあり、Huqらは、プランクトン (*copepods*) に付着した *V. cholerae* がこの生物の粘液により保護され10°Cでも生存が可能であると、低温での保護作用を示す物質の存在を報告している²⁶⁾。また、濾過滅菌河川水中での *V. cholerae* non-O1 の生存菌数は、水温20°Cより10°Cにおいて生存菌数の減少が少なかった。これは、低温の河川水の中では代謝活性の低下によって自己消化²⁾することなく生存を延長していると考えられる。

相模川と境川からの *V. cholerae* non-O1 検出率は両河川とも40%程度である¹³⁾。本報告は、河川の水層水のみでの検討であるが、プランクトン、淡水性の生物、土壌表面、河川底質においても低温環境から保護を受ける可能性が考えられ、これらは今後の検討課題である。

以上のことから塩濃度が低い淡水の河川水の場合において、*V. cholerae* non-O1 は他の微生物との競合による増殖の抑制をうけるが、河川水中の栄養によって増殖し生存する可能性があると考えられた。

V 結 論

V. cholerae non-O1 の河川水の中で生存するために必要とする条件について検討した。

1. *V. cholerae* non-O1 は、窒素源 (NH_4^+)、リン酸源 (PO_4^{3-})、イオウ源 (SO_4^{2-}) の無機化合物と炭素源が増殖に最低限必要で、他に栄養を必要としなかった。
2. 高圧蒸気滅菌した河川水の中で *V. cholerae* non-O1 株は増殖し、河川水の中に増殖に必要な栄養物質が存在していた。
3. 濾過滅菌した河川水の中で *V. cholerae* non-O1 は増殖することができなく、河川水の中の粒子状物質が栄養の一部となっていた。
4. *V. cholerae* non-O1 の増殖は、季節の水質に関係なく水温によっていた。
5. *V. cholerae* non-O1 は、実験的な閉鎖系内の河川水の中で常在の微生物との栄養の競合が起こるため、高密度で生存することができなかつ

た。

以上のことより、自然の河川水中では *V. cholerae* non-O1 の増殖に必要な栄養が供給されることによって生存する可能性が示唆された。

本稿の要旨は第52回日本公衆衛生学会総会（1993年10月、北九州）において発表した。本研究は AKPS (All Kitasato Project Study) 研究助成 No. 5-3-3 の援助を受けた。

(受付 96.4. 5)
採用 97.6.16)

文 献

- 1) 厚生省通達（環食第59号，昭和57年3月11日付），食品衛生研究 1982; 32: 481-507.
- 2) Harison Jr AP. The response of bacterium lactis aerogenes when held at growth temperature in the absence of nutrient: an analysis of survival curves. Proc Roy Soc B 1960; 152: 418-428.
- 3) Baker MR, Singleton LF, Hood AM. Effects of nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol 1983; 46: 930-940.
- 4) Hood AM, et al. Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol 1986; 52: 788-793.
- 5) Brasfield H. Environmental factors correlated with size of bacterial populations in a polluted stream. Appl Microbiol 1972; 24: 349-352.
- 6) Colwell RR, Kaper J, Joseph SW. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrio. Science 1977; 198: 394-396.
- 7) 太田喜久子. *Vibrio* El Tol の要素要求に関する研究, 日細誌 1959; 14: 823-828.
- 8) Baumann P, Furniss AL, Lee JV. Genus I *Vibrio* *Pacini*. Krieg NR, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology, 1, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984; 518-538.
- 9) 工藤泰雄. コレラ菌（菌の病原性と防疫対策）. 公衆衛生情報 1989; 19(4): 4-8.
- 10) Craig JP, et al., Production of cholera-like enterotoxin by *Vibrio cholerae* non-O1 strain isolated from the environment. Infect Immun 1981; 34: 90-97.
- 11) Wilson R, et al., Non-O1 group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis associated with eating raw oysters. Am J Epidemiol 1981; 114: 293-298.
- 12) 菌数測定. 日本薬学会編; 衛生試験法・注解. 東京: 金原出版, 1990; 147-159.
- 13) Uchiyama H, Todoroki T. Water quality and isolation of *Vibrio cholerae* non-O1 from an aquatic environment. 感染症誌 1989; 63: 1313-1321.
- 14) Simidu U, Kogure K, Tsukamoto K. Distribution of *Vibrionaceae* in the Sea. Nihon Biseibutu Seitai Gakkaiho 1987; 1: 65-74.
- 15) Nair GB, et al. Toxin profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 from environmental Sources in Calcutta, India. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 3180-3182.
- 16) 滝田真也, 他. 1979年市川市真間川で分離されたコレラ菌の病原性および生存性について. 日本公衛誌 1980; 27: 535-542.
- 17) Garay E, Arnau A, Amaro C: Incidence of *Vibrio cholerae* and related *Vibrio* in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. Appl Environ Microbiol 1985; 50: 426-430.
- 18) Lin FYC, et al. Persistence of Cholera in United States; Isolation of *Vibrio cholerae* O1 from a patient with diarrhea in Maryland. J Clin Microbiol 1986; 46: 1232-1233.
- 19) Pandit CG, et al. Survival of *Vibrio cholerae* biotype El Tor in well water. Bull Wild Hlth Org 1967; 37: 681-685.
- 20) Singleton FL, et al. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. Appl Environ Microbiol 1982; 43: 1080-1085.
- 21) Rhodes JB, Smith HL, Ogg JE. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovers from surface waters in Western Colorado. Appl Environ Microbiol 1986; 51: 1216-1219.
- 22) Greengerg AE, Trussell RR, Clesceri LS. American Public Health Association; Standard methods for the examination of water and wastewater 16th ed. Washington, DC. American Public Health Association 1985; 789.
- 23) リン酸イオン. 日本薬学会編; 衛生試験法・注解. 東京: 金原出版, 1990; 965-966.
- 24) 西尾隆昌, 貴田正義, 下内啓万. 河川水における腸管系病原細菌の消長—モデル実験による観察—, 日本公衛誌 1971; 18: 717-723.
- 25) Singleton FL, et al. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. Appl Environ Microbiol 1982; 44: 1047-1058.
- 26) Huq A, et al. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl Environ Microbiol 1983; 45: 275-283.

SURVIVAL OF *VIBRIO CHOLERAE* NON-O1 IN FRESHWATER RIVER

Hidekazu UCHIYAMA

Key words: *Vibrio cholerae*, Nutrient, Environmental bacteria, River, Drinking water

The survival of *Vibrio cholerae* non-O1 was investigated in sterile and untreated river water. The essential nutrients for growth of the organism were also investigated using a compound medium. *V. cholerae* non-O1 was shown to increase in autoclaved sterile river water, but did not increase in filtrated river water, and starting with an initial number of 10^6 CFU/ml organism, the organism could not be isolated from untreated river water after day 10. The growth or survival of the organism was also studied with filtrated river water to which all essential nutrients except one was added. In this water, *V. cholerae* non-O1 did not increase when either phosphate or a carbon source was not present. These results indicate that *V. cholerae* non-O1 can survive in river water by taking nutrients for growth from solutes and particle matter in the river water.

* Laboratory of Public Health, School of Allied Health Sciences, Kitasato University