

## 魚介類を対象とした *Vibrio cholerae* 検査における培養温度の影響

横山 敬子<sup>a</sup>, 河村 真保<sup>b</sup>, 小西 典子<sup>b</sup>, 尾畑 浩魁<sup>b</sup>, 貞升 健志<sup>c</sup>

国内発生コレラの感染源の一つとして、輸入魚介類の関与が指摘されている。しかし、魚介類から *Vibrio cholerae* を分離することは容易ではない。その理由として、*V. cholerae* を特異的に増殖させる増菌培地が無く、魚介類に付着している様々な夾雑菌の影響により *V. cholerae* の増殖が抑えられてしまう、あるいは *V. cholerae* の増殖以上に夾雑菌が発育してしまうことが考えられる。そこで、魚介類から *V. cholerae* を効果的に検出するために、増菌培養液の NaCl 濃度および培養温度の影響について検討を行った。その結果、魚介類等を対象とした *V. cholerae* の検査方法として、NaCl 濃度 1~2% のアルカリ性ペプトン水で 42°C 増菌培養後、TCBS 寒天培地に塗抹し、42°C 培養する方法が最も効率的でかつ有効であった。

キーワード: *Vibrio cholerae*, 魚介類, 培養温度, NaCl 濃度, リアルタイム PCR 法

### はじめに

わが国におけるコレラ患者の発生件数は、2000年頃には年間50件前後あったが、2007年4月の感染症法改正でコレラが2類感染症から3類感染症に変更されてからは年間30件以下となり、さらに、2012年以降は一桁台で推移している。その多くは輸入感染事例とされるが、海外渡航歴が無い国内事例も頻度は少ないものの発生がみられる<sup>1)</sup>。また、数年に一事例程度、国内の集団発生例<sup>2)</sup>も報告されているが、原因と推定された食品から *Vibrio cholerae* が検出された事例はほとんど無い。加えて、検疫所の検査においても輸入生鮮魚介類から *V. cholerae* が検出された例は非常に少ない。

この様に、食品から *V. cholerae* を検出することが非常に困難な理由としては、*V. cholerae* を特異的に増殖させる選択増菌培地が無く、魚介類に存在する様々な夾雑菌（マリネビブリオ）の影響で *V. cholerae* の増殖が抑えられてしまう、あるいは *V. cholerae* の増殖以上に夾雑菌が発育してしまうことが考えられる。そこで、食品から *V. cholerae* を効率的に検出する検査法の確立を目指し、増菌培地の NaCl 濃度および培養温度の影響について検討を行った。

### 実験方法

#### 1. 増菌培養温度および NaCl 濃度による増殖態度の検討

##### 1) 供試菌株

*V. cholerae* O1 El Tor Ogawa CT+ (TVC355), *Vibrio parahaemolyticus* (TVP2126), *Vibrio fluvialis* (TVF156), および *Vibrio alginolyticus* (TVA1) を供試した。供試菌株は、TSB (Trypticase Soy Broth; BD) で培養後、滅菌生理食塩水で希釈し接種菌液とした。

#### 2) 方法

アルカリ性ペプトン水 10 mL (pH8.6; 栄研化学) に、それぞれ 0%, 1%, 2%, 3% となるように NaCl を加えたものを増菌培地とした。

(1) 単独培養 各々の NaCl 濃度の増菌培地に 4 種の接種菌液をそれぞれ  $10^0$  cfu/10 mL となるように接種し、培養温度 37°C および 42°C で 15 時間培養後、増菌培地中の菌数について TCBS 寒天 (栄研化学) を用い、ミスラ法<sup>3)</sup> で生菌数を測定し、増殖態度を比較検討した。

(2) 混合培養 各々の NaCl 濃度の増菌培地に、各菌株が  $10^0$  cfu/10 mL および  $10^1$  cfu/10 mL の 2 濃度になるよう 4 種類の接種菌液を混合し接種した。(1) の単独培養と同様の条件で混合培養における各菌株の増殖態度を比較した。

#### 2. TCBS 寒天培地の培養温度が *V. cholerae* および他のビブリオ属菌の発育に及ぼす影響の検討

##### 1) 供試菌株

*V. cholerae* O1 El Tor Ogawa CT+ (3 株), *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa CT- (3 株), *V. cholerae* O1 El Tor Inaba CT+ (3 株), *V. cholerae* O1 El Tor Inaba CT- (1 株), *V. cholerae* O1 Classical Ogawa CT+ (1 株), *V. cholerae* O139 CT+ (1 株), *V. cholerae* non-O1, non-O139 CT- (3 株), *V. parahaemolyticus* (3 株), *V. fluvialis* (3 株), *V. alginolyticus* (3 株) を供試した。

##### 2) 方法

各供試菌株を TSB で培養した後、滅菌生理食塩水で  $10^5$  倍に希釈 (約  $10^3$  cfu/mL に相当) 後、50  $\mu$ L を TCBS 寒天平板上に滴下し、25°C, 37°C, 42°C で 15 時間培養した。TCBS 寒天平板上に 10 コロニー以上発育したものを陽性とした。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

3. リアルタイム定量PCRプライマーの設計

コレラ毒素 *ctxA* をターゲットとしたリアルタイム PCR 用プライマーを HYBsimulator Ver.4.0 software (Funakoshi Co.,Ltd.) を用いて設計した (表1) .

4. 上海ガニへの *V. cholerae* 接種実験

1) 供試菌株

患者由来株 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa CT+ (TVC 355) を供試した. 供試菌株を TSB で培養後, 滅菌生理食塩水で希釈し接種菌液とした.

2) 方法

市販の上海ガニを購入し, *V. cholerae* に汚染されていないことを確認した後, 添加試験に供試した. 上海ガニ 25 g に接種菌液を, 低濃度 ( $1.7 \times 10^0$  cfu/25 g), 中濃度 ( $1.7 \times 10^1$  cfu/25 g), 高濃度 ( $1.7 \times 10^2$  cfu/25 g) となるよう接種し,  $-30^\circ\text{C}$  で 3 日間保存した. 室温で解凍後, アルカリ性ペプトン水 (2% NaCl, pH8.6) を 225 mL 加え, ① $37^\circ\text{C}$  (6 時間および 18 時間) 培養, ② $42^\circ\text{C}$  (6 時間および 18 時間) 培養, ③ $37^\circ\text{C}$  (6 時間) 培養後  $42^\circ\text{C}$  (12 時間) 培養の 2 段階法の 3 種類の条件で増菌培養した. 培養後, TCBS 寒天へ塗抹分離し,  $37^\circ\text{C}$  および  $42^\circ\text{C}$  で培養し, *V. cholerae* の発育状況を比較した. 更に各増菌培養液から *ctxA* 遺伝子を標的としたリアルタイム定量 PCR 法を行い, 培養液中の *V. cholerae* 菌数を推定した. 培養液は, アルカリ熱抽出法<sup>4)</sup>により DNA を抽出した. リアルタイム PCR は, Applied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific) を使用した. インターカレータ法のリアルタイム PCR 試薬は, SYBR Premix DimerEraser™ (TaKaRa) を用いた. 反応液組成は, SYBR Premix DimerEraser (2×) 10  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye (50×) 0.4  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{M}$  プライマー各 0.6  $\mu\text{L}$ , テンプレート 2  $\mu\text{L}$ , 滅菌精製水 5.6  $\mu\text{L}$  とした.

結 果

1. 増菌培養温度およびNaCl 濃度による増殖態度の検討

1) 単独培養

0%, 1%, 2%, 3%の各濃度のNaCl加アルカリ性ペプトン水に接種菌液を加え,  $37^\circ\text{C}$ および $42^\circ\text{C}$ で増菌培養を行った. 培養後, TCBS寒天平板培地上の菌数を測定し増菌効果を比較した. その結果, 0%NaCl加アルカリ性ペプトン水  $37^\circ\text{C}$ 培養では*V. cholerae* のみが $10^7$  cfu/mL 程度まで増菌されていたが, 他のビブリオ属菌の発育は抑制され, 菌は検出されなかった. 1%~3% NaCl加アルカリ性ペプトン水  $37^\circ\text{C}$ 培養では, いずれの供試菌株も $10^7$  cfu/mL 程度まで増菌していた. 一方,  $42^\circ\text{C}$ で増菌培養を行った場合, 0% NaCl加アルカリ性ペプトン水では, *V. cholerae* を含め全ての菌種で発育が認められなかった. 1% NaCl加アルカリ性ペプトン水では, *V. cholerae* のみ $10^7$  cfu/mLまで増菌されていたが, 他菌種の発育は抑制された. 2%および3% NaCl加アルカリ性ペプトン水による増菌では, *V. cholerae* の発育は $10^7$ cfu/mL

表 1. リアルタイム定量 PCR

Target gene	<i>ctx A</i>
Accession No.	X58785
Sequence (5' →3' )	F: TGATCATGCAAGAGGAAGCTCAG R: CCAGACAATATAGTTTGACCCACT
SYBR Premix DimerEraser™ (TaKaRa)	

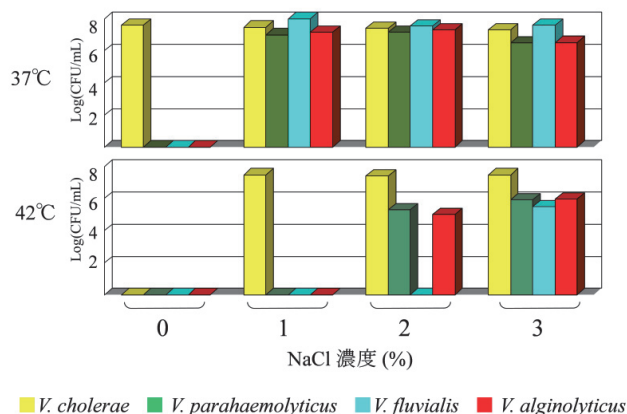


図 1. 単独培養における増菌培養温度および NaCl 濃度の影響

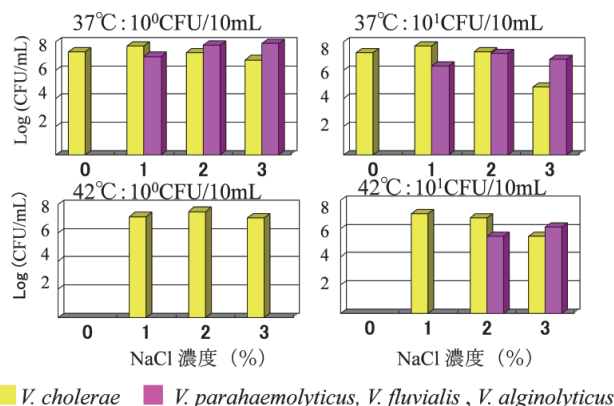


図 2. 混合培養における増菌培養温度および NaCl 濃度の影響

程度であったが, 他菌種も $10^6$  cfu/mL程度に増菌していた (図1).

2) 混合培養

4種類の菌を混合して同様に培養した場合,  $37^\circ\text{C}$ 培養では, 1%~3%NaCl加アルカリ性ペプトン水中において, 供試した4種類すべての菌の発育が認められた. しかし,  $42^\circ\text{C}$ 培養では,  $10^0$  cfu/10 mLの低濃度接種において*V. cholerae* のみが増殖したのに対し,  $10^1$  cfu/10 mLの添加菌量では, 2%および3%NaCl濃度において他のビブリオ属菌の発育が確認された. 以上のことから, 1%NaCl加アルカ

り性ペプトン水で42°C培養した場合が、最も*V. cholerae*の増殖がよく、かつ他のビブリオ属菌の増殖を抑えるという結果が得られた(図2)。

## 2. TCBC 寒天培地の培養温度が *V. cholerae* および他のビブリオ属菌の発育に及ぼす影響の検討

10種類の菌種(各1~3株)をTCBC寒天平板に塗抹分離し、25°C、37°C、42°Cで培養した場合の発育状況を確認した。その結果、25°C、37°Cで培養した場合は全ての菌種で発育が認められた。しかし、42°C培養では*V. cholerae*のみ発育が認められ、*V. parahaemolyticus*、*V. fluvialis*、*V. alginolyticus*は発育が認められなかった(表2)。

## 3. リアルタイム定量PCR

*ctxA* 遺伝子を標的としたリアルタイム定量PCR法により、*V. cholerae* 菌数とCt値の関係を検討した結果、直線性( $R^2: 0.998$ )を示した(図3)。

## 4. 上海ガニへの*V. cholerae* 接種実験

上海ガニに*V. cholerae*を接種し、-30°Cで3日間冷凍保存した検体を室温で解凍後、アルカリ性ペプトン水を加え3種類の培養条件で増菌培養を行った。増菌後、リアルタイム定量PCRにより増菌培地中の*V. cholerae*菌数を算出した結果、37°Cでは低濃度、中濃度のいずれも、検出限界以下となった。高濃度では、6時間培養  $9.0 \times 10^3$  cfu/mL、18時間培養  $9.7 \times 10^3$  cfu/mLとなった。

高濃度添加した18時間培養後の増菌液をTCBC寒天培地に塗抹し、37°Cおよび42°Cで培養したところ、37°Cでは、*V. cholerae*は検出されなかった。しかし、TCBC寒天培地を42°Cで培養すると、低~高濃度のすべてのレベルから*V. cholerae*が検出された。また、増菌培養温度を42°Cにすると、18時間培養後には、低濃度では  $9.5 \times 10^4$  cfu/mLに、高濃度では  $3.1 \times 10^5$  cfu/mLまで菌が増殖し、TCBC寒天培地での*V. cholerae*の釣菌が可能であった。一方で、37°C(6時間培養)→42°C(12時間培養)の2段階増菌法では、低濃度で  $6.3 \times 10^3$  cfu/mLに、高濃度で  $8.8 \times 10^4$  cfu/mLに菌数が増加した。

今回検討した培養温度で、最も効率良く*V. cholerae*が分離されたのは、増菌培養温度42°C、TCBC寒天培養温度42°Cで培養した場合であった。この温度条件では、*V. cholerae*は増菌培地中で  $10^4 \sim 10^5$  cfu/mL程度にまで増菌され、TCBC寒天平板上では夾雑菌の増殖をかなり抑えることができた。一方、*V. cholerae*検出率が最も低い培養条件は、増菌培養温度37°C、分離培養温度37°Cの場合であった。この条件下では夾雑菌が優位に発育してしまい、増菌培養液中の*V. cholerae*の菌数は  $10^3$  cfu/mL以下に留まった(表3)。

表2. TCBC 寒天培地における *V. cholerae* およびその他のビブリオ属菌の培養温度別発育状況

菌種	供試株数	発育の有無		
		25°C	37°C	42°C
<i>V. cholerae</i> 01 El Tor Ogawa (CT+)	3	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 01 El Tor Ogawa (CT-)	3	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 01 El Tor Inaba (CT+)	3	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 01 El Tor Inaba (CT-)	1	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 01 Classical Inaba (CT+)	1	+	+	+
<i>V. cholerae</i> 0139 (CT+)	1	+	+	+
<i>V. cholerae</i> non01, non0139 (CT-)	3	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	+	+	-
<i>V. fluvialis</i>	3	+	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	3	+	+	-

+; 発育、-; 発育せず

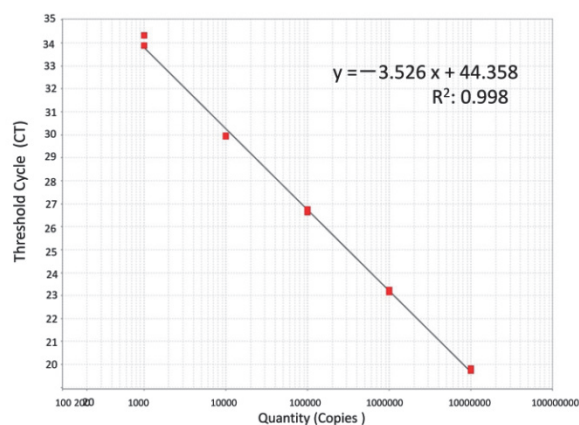


図3. *V. cholerae* 検量線 (リアルタイム定量 PCR)

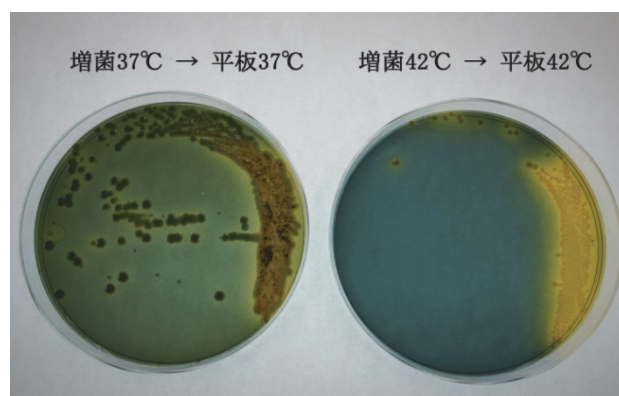


写真. *V. cholerae* 添加上海ガニの TCBC 寒天培地

表 3. 上海ガニへの *V. cholerae* 添加実験結果

増菌培養 温度	菌濃度 レベル	添加菌量 (cfu/25g)	リアルタイム 定量PCR (cfu/mL)			TCBS寒天上で <i>V. cholerae</i> 発育状況*	
			培養時間			平板培養温度	
			0 h	6 h	18 h	37°C	42°C
	添加せず		ND	ND	ND	—	—
37°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$< 10^3$	$< 10^3$	-/+++	+/** **
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$< 10^3$	$< 10^3$	-/+++	+/**
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$9.0 \times 10^3$	$9.7 \times 10^3$	-/+++	+++/-
42°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$< 10^3$	$9.5 \times 10^4$	+/**	+++/**
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$3.2 \times 10^3$	$9.8 \times 10^4$	+/**	+++/**
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$2.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^5$	+/**	+++/**
37°C→42°C	低	$1.7 \times 10^0$	ND	$< 10^3$	$6.3 \times 10^3$	+/**	+++/**
	中	$1.7 \times 10^1$	ND	$< 10^3$	$2.7 \times 10^4$	+/**	+++/**
	高	$1.7 \times 10^2$	ND	$2.2 \times 10^3$	$8.8 \times 10^4$	+/**	+++/**

\* 18h増菌培養後にTCBS寒天に塗抹, \*\* *V. cholerae* / その他の菌

ND ; not detected , + ;  $\leq 10$ cfu発育, ++ ;  $\leq 10^2$ cfu発育, +++ ;  $\geq 10^3$ cfu発育 - ; 発育せず

## 考 察

現在、食品のコレラ菌検査は、厚生労働省からの通知法「魚介類等の食品からの*V. cholerae*の検出方法について（平成14年10月21日食監発第1021006号）」に基づいて実施している。通知法では、0%NaCl加アルカリ性ペプトン水（pH8.6）で36°C±1°C、18～20時間培養（1次増菌培養）後、更にアルカリ性ペプトン水に接種し36°C±1°C、8～10時間培養（2次増菌培養）した後にTCBS寒天平板へ分離培養を行う方法が示されている。この方法は夾雑菌が非常に少ない食品では有効であるが、*V. cholerae*以外のビブリオ属菌が付着している生鮮魚介類等では*V. cholerae*の検出が困難となる場合がある。また、海外においてもISO法<sup>5)</sup>、FDA BAM法<sup>6)</sup>によって*V. cholerae*の検査法が示されているが、いずれも分離培地の培養温度は35±2°Cとなっている。そこで、夾雑菌が多い食品から、効果的に*V. cholerae*を検出するための方法を検討した。その結果、増菌培地の塩分濃度と培養温度、培養時間、さらに分離平板の培養温度を変化させることで、*V. cholerae*を非常に効率良く検出できることが明らかとなった。

今回の検討では増菌培地のNaCl濃度を1～2%とし、培養温度を通常の37°Cより少し高めの42°Cで培養することで夾雑菌の発育を抑え、*V. cholerae*のみを優勢に増菌させることが可能となった。さらに、TCBS寒天平板を42°C培養することにより、夾雑菌の発育を抑えることが出来た（写真）。ここにはデータを示してはいないが、酵素基質平板培地についても42°C培養の検討を行った。しかし、酵素基質培地上の各菌特有のコロニーの色調は、37°Cにおける培養条件によるものであり、培養温度を変えた条件下では、*V. cholerae*とその他の菌に明瞭な識別は出来なかった。一方、TCBS寒天培地についても、メーカーによる培地の

選択性の強さに違いがみられることから、使用する培地については、事前にその特徴を確認することが望ましいと考えられる。さらに、今回設計したリアルタイムPCRを用い、増菌培養液中の*V. cholerae*の有無をスクリーニング検査することで、より効率的な検査を行うことが可能と考えられる。

食品中の細菌叢は多種多様である。そのため公定法等に準じた検査法において、夾雑菌が多く含まれ*V. cholerae*の分離が困難であった食品等に、今回示した方法を用いることで*V. cholerae*の分離が可能となる場合もある。また、本方法における分離平板上のコロニーは純培養に近い状態であったことから、検査員による分離技術の差は解消され、分離平板を必要以上に増やすことが無くなる。今回は、モデル食品として他のビブリオ属菌が多く含まれている上海ガニを用いて添加実験を行ったが、魚介類の種類によっては付着している細菌叢に多少の差があると考えられるので、食品の種類を変えてさらに検討する必要がある。加えて、Viable But Nonculturable (VBNC) についても検討課題である。

## ま と め

魚介類等からの*V. cholerae*の検査方法としては、アルカリ性ペプトン水のNaCl濃度が1～2%（1%）、培養温度は42°C、分離培養温度42°Cの場合が最も有効であった。また、リアルタイムPCRをスクリーニング検査に活用することにより、さらに効率的な検査を実施することができる。

**謝 辞** 本研究を行うにあたり、ご協力いただいた元・東京都健康安全研究センターの高橋正樹氏、甲斐明美氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症疫学センター：病原微生物検出情報, **32**, 96-98, 2011.
- 2) 東京都衛生局編：池之端文化センターに関連したコレラ流行調査報告書, 1980.
- 3) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二：新 細菌培地学講座 - 上 - 〈第二版〉, 182-190, 1986, 近代出版, 東京.
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品全部監視安全課：食安監発1120第1号, 腸管出血性大腸菌O26, O103, O111, O121, O145及びO157の検査法について（通知）, 平成26年11月20日.
- 5) ISO/TS 21872-1 : 2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.– Part 2 : Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.
- 6) Kaysner, C. A. and DePola, A.: *Vibrio*, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 9, U.S. Food and Drug Administration. 2004. Washington D.C. U.S.A.

### Effect of Culture Temperature in *Vibrio Cholerae* Bacteria Test for Seafood

Keiko YOKOYAMA<sup>a</sup>, Maho KAWAMURA<sup>a</sup>, Noriko KONISHI<sup>a</sup>, Hiromi OBATA<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>b</sup>

Imported seafood is one of the major causes of domestic cholera. However, the isolation of isolate *Vibrio cholerae* from seafood is difficult due to the lack of a good enrichment broth for *V. cholerae*. That other bacteria organisms also grow alongside *V. cholerae* in most of the available enrichment broths is an additional difficulty. This study investigated the effects of salinity and culture temperature in the detection of *V. cholerae* from seafood. The results show that the optimum method for detecting *V. cholerae* from seafood involves the use of 1-2% NaCl concentration of alkaline peptone water, a culture temperature of 42 °C, and a separation culture temperature of 42°C.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, seafood, culture temperature, NaCl concentration, real-time PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan