

冷凍保存した食品検体からのコレラ菌検査法の検討

小 野 一 晃[†]

埼玉県衛生研究所 (〒355-0133 比企郡吉見町大字江和井410-1)

(2013年5月28日受付・2013年12月16日受理)

要 約

冷凍保存した食品検体からのコレラ菌分離法について検討した。コレラ菌の数は、 -20°C で1週間冷凍保存した生理食塩水中で1/100から1/10,000に減少した。免疫磁気ビーズ法を用いることで、冷凍保存した食品検体から本菌の分離が可能であったが、検出感度を高めるためには増菌培養を繰り返す必要があった。 10^3cfu/ml のコレラ（血清型O139）菌液を0.5ml接種し、 -80°C で1年間冷凍保存したエビからは、増菌培養を3回繰り返すことで、接種菌の分離が可能であった。さらに、1%量のピルビン酸ナトリウムとカタラーゼ（2,000U/plate）を添加した改良培地がコレラ菌の分離に有効であった。本研究により、増菌培養（場合によっては数回繰り返す）後の試料に免疫磁気ビーズ法と改良培地を用いることが、冷凍保存した食品検体からのコレラ菌分離に有効であることが示唆された。

—キーワード：増菌培養，冷凍食品，免疫磁気ビーズ法，改良培地，コレラ菌。

----- 日獣会誌 67, 354～359 (2014)

近年、海外渡航歴のないコレラ患者が報告されるようになった（厚生労働省ホームページ；全国食中毒統計）。その原因の一つとして、コレラ菌に汚染された輸入食品が考えられるが [1, 2]，過去において、検食等の食品からコレラ菌が分離された例はなく、原因は明らかにされていない。埼玉県においても、平成20年3月にある飲食店でコレラ菌による食中毒事例が発生し、そこを利用した12グループ217名のうち5グループ8名からコレラ菌が検出されたが、食品からは菌が検出されなかったため、原因の特定はできなかった [3]。

本菌による食中毒は、比較的低菌量の摂取でも発症することが知られている。しかしながら、保存中、特に冷凍保存により、食品中の菌は大幅に減少あるいは死滅するため [4-6]，検食（残品）からの菌分離が困難となることが、原因が特定できない大きな要因であると考えられている。そこで、本研究では、冷凍保存された食品からコレラ菌を分離することを目的に検査法の検討を行った。

材 料 及 び 方 法

供試菌株：下痢症状を示した患者の便から分離した *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa 血清型 O1 (A 株) を 1 株，*Vibrio cholerae* El Tor Inaba 血清型 O1 (B 株) を

1 株，及び *Vibrio cholerae* 血清型 O139 (C 株) を 1 株，計 3 株を用いた。

生理食塩水中のコレラ菌消長試験：供試菌株 3 株をアルカリ性ペプトン水（日水製薬㈱，東京）にそれぞれ 1 白金耳量接種し， 37°C ，18 時間培養した。培養液は滅菌生理食塩水で 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} 希釈液を作製後，冷蔵 (5°C) 及び冷凍 (-20°C) 状態で保管した。各試料を 1 週間ごとに取り出し，滅菌生理食塩液で段階希釈後，TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid, U.K.) 培地にそれぞれ 0.1ml ずつ接種し，菌数を測定した。

培地の検討：改良培地は TSA 培地とクロモアガービプリオ (CROMAgar Microbiology, France) 培地を 2 : 1 の比で混合し，サプリメントとしてピルビン酸ナトリウム (0.1% [v/v]) (和光純薬工業㈱，大阪) とカタラーゼ (2,000U/plate) (和光純薬工業㈱，大阪) を添加し [7] たものとした。この改良培地の性能を確かめるため，①TSA 培地，②TSA 培地に前述のサプリメントを加えたもの，③クロモアガービプリオ培地，④クロモアガービプリオ培地に前述のサプリメントを加えたもの，⑤改良培地を用いて以下の試験を行った。前述の消長試験に用いた A 株菌液の 10^{-2} 希釈液 (10^5cfu/ml 相当) を -20°C で 24 時間冷凍保存後， 25°C のフラン器内で解凍した。解凍した試料を①～⑤の培地の各 2 枚に

[†] 連絡責任者(現所属)：小野一晃 (埼玉県食肉衛生検査センター越谷分室)

〒343-0012 越谷市増森1-13 ☎048-965-6481 FAX 048-965-6485

E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

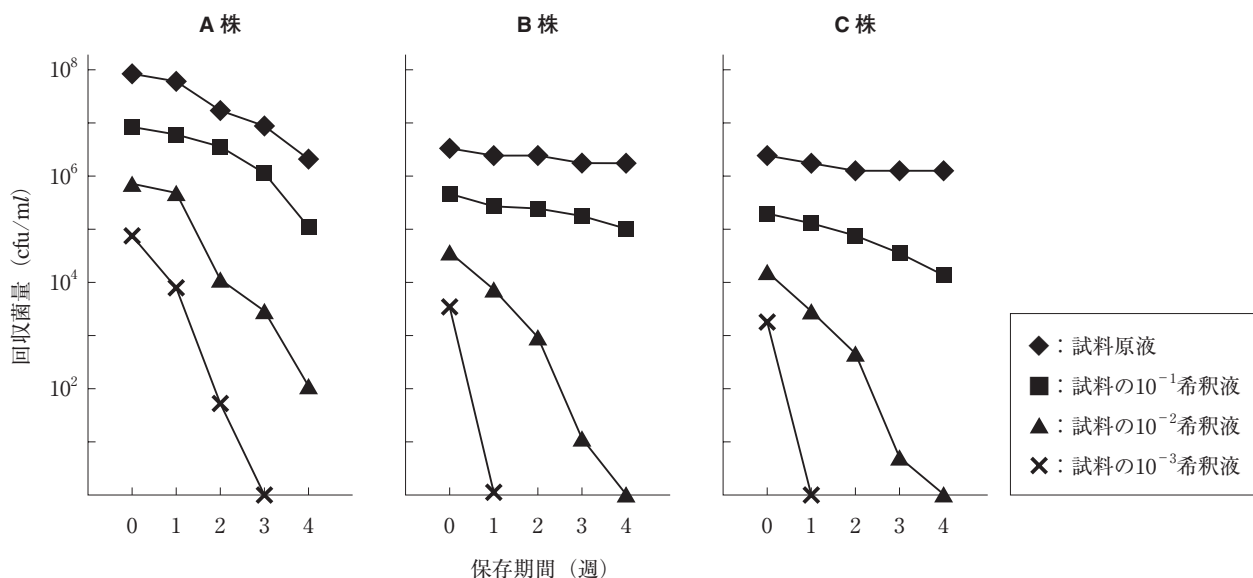


図1 冷蔵 (5℃) 保存時の生理食塩水中のコレラ菌の消長

A株: *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa 血清型 O1

B株: *Vibrio cholerae* El Tor Inaba 血清型 O1

C株: *Vibrio cholerae* 血清型 O139

0.1ml ずつ接種し, 37℃, 24時間培養後, 平板上に発育したコレラ菌数を測定した. この試験を5回繰り返すことにより, 各平板上に発育したコレラ菌数の算術平均値を比較することによって, 培地の分離能力を検討した.

増菌培養法による冷凍食品検体からのコレラ菌分離試験: コレラ菌 A, B, C 株をおのおのアルカリ性ペプトン水に1白金耳量接種し, 37℃, 18時間培養した. 培養した菌液を滅菌生理食塩水で希釈し, 10^3 cfu/mlの菌液を作製した. この菌液を1mlの注射器 (テルモ株, 東京) を用いて市販のマグロ (切り身の表面に1片当たり100 μ l 接種しコンラージ棒で塗抹) 及びエビ (胸部に500 μ l 注入) にそれぞれ接種後, -20℃ (エビ) 及び-80℃ (マグロ) で1年間冷凍保存した. この保存検体25 g に225mlの増菌培養液 (市販のアルカリ性ペプトン水に最終濃度が1%になるようにピルビン酸ナトリウムを添加) を加え, 37℃, 18時間培養 [一次増菌] 後, その30mlを新たな増菌培養液120mlに接種し, 37℃, 6時間培養した [二次増菌]. さらに, 二次増菌培養液の0.5mlを新たな増菌培養液10mlに接種し, 37℃, 18時間培養した [三次増菌]. 増菌培養液から以下に示す免疫磁気ビーズ法でコレラ菌を回収し, この培養法でコレラ菌が分離されるまで一次, 二次, 三次と最大3回増菌培養を繰り返した. 増菌培養液からのコレラ菌回収は, 市販の磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG, ライフテクノロジーズジャパン株, 東京) を用いた免疫磁気ビーズ法にて行った [8, 9]. すなわち, ビーズ浮遊液0.5mlに市販のコレラ菌免疫血清 (血清型 O1 及び O139, デンカ生研株, 東京) 10 μ l を加

え, 4℃, 18時間ゆるやかに振とうさせ, 抗体感作ビーズを作製した [10]. ビーズを用いた集菌操作は添付のプロトコルに準じ, 増菌培養液1mlと抗体感作ビーズ30 μ lを混合し, 攪拌しながら室温で30分間反応させた後, 専用の磁石によりコレラ菌を集菌した. コレラ菌の分離には前述した改良培地を用い, 集菌操作 (ビーズ処理) 後の試料20 μ lを2枚の平板に画線塗抹後, 37℃, 24時間培養してコレラ菌の分離を行った.

成 績

冷蔵・冷凍保存時における生理食塩水中のコレラ菌消長試験: 血清型 O1 (A株, B株) 及び O139 (C株) を5℃で冷蔵保存した時の生理食塩水中における消長を図1に示す. 冷蔵保存4週間後の試料原液 (◆) の菌数 (cfu/ml) は, A株で 7.6×10^7 から 2.8×10^6 に, B株で 3.8×10^6 から 1.8×10^5 に, C株で 2.4×10^6 から 1.2×10^6 に減少した. 試料原液の 10^{-1} 希釈液 (■) では, A株で 7.6×10^6 から 1.0×10^5 に, B株で 3.8×10^5 から 1.0×10^5 に, C株で 2.4×10^5 から 1.4×10^4 に減少した. 試料原液の 10^{-2} 希釈液 (▲) では, A株で 7.6×10^5 から 1.0×10^2 に, B株で 3.8×10^4 から 0 に, C株で 2.4×10^4 から 0 に減少した. 試料原液の 10^{-3} 希釈液 (×) では, A株で 7.6×10^4 から 0 に, B株で 3.8×10^3 から 0 に, C株で 2.4×10^3 から 0 に減少した.

次に, -20℃で冷凍保存した時の生理食塩水中における消長を図2に示す. 冷凍保存1週間後の試料原液 (◆) の菌数 (cfu/ml) はA株で 7.6×10^7 から 9.6×10^5 に, B株で 3.8×10^6 から 2.8×10^4 に, C株で $2.4 \times$

冷凍保存した食品検体からのコレラ菌検査法の検討

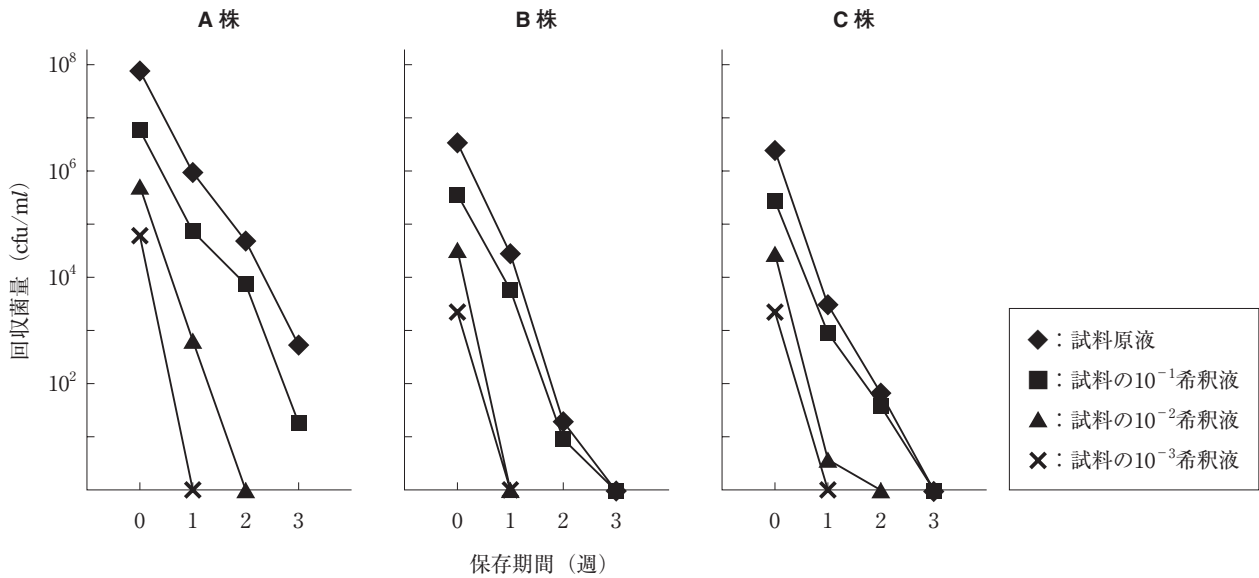


図2 冷凍 (-20℃) 保存時の生理食塩水中のコレラ菌の消長

A株: *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa血清型O1

B株: *Vibrio cholerae* El Tor Inaba血清型O1

C株: *Vibrio cholerae* 血清型O139

10⁶から3.5 × 10³に減少した。試料原液の10⁻¹希釈液(■)では、A株で7.6 × 10⁶から8.2 × 10⁴に、B株で3.8 × 10⁵から5.6 × 10³に、C株で2.4 × 10⁵から8.3 × 10²に減少した。試料原液の10⁻²希釈液(▲)では、A株で7.6 × 10⁵から7.5 × 10²に、B株で3.8 × 10⁴から0に、C株で2.4 × 10⁴から4に減少した。試料原液の10⁻³希釈液(×)では、A株で7.6 × 10⁴から0に、B株で3.8 × 10³から0に、C株で2.4 × 10³から0に減少した。また、保存3週間後の試料原液(◆)の菌数(cfu/ml)は、A株で7.6 × 10⁷から5.9 × 10²に、B株で3.8 × 10⁶から0に、C株で2.4 × 10⁶から0に減少した。試料原液の10⁻¹希釈液(■)では、A株で7.6 × 10⁶から2.3 × 10⁴に、B株で3.8 × 10⁵から0に、C株で2.4 × 10⁵から0に減少した。試料原液の10⁻²希釈液(▲)では、A株で7.6 × 10⁵から0に、B株で3.8 × 10⁴から0に、C株で2.4 × 10⁵から0に減少した。試料原液の10⁻³希釈液(×)では、A株で7.6 × 10⁴から0に、B株で3.8 × 10³から1.0 × 10⁵に、C株で2.4 × 10³から0に減少した。

改良培地の検討: 検討した5種類の培地上に発育したコレラ菌数を比較した結果を表1に示す。TSA並びにTSAにサプリメントを加えた培地の発育集落の平均値は、おのおの26.2cfu/平板, 41.2cfu/平板であった。一方、クロモアガービブリオ並びにクロモアガービブリオにサプリメントを加えた培地の発育集落の平均値は、おのおの1.2cfu/平板, 4.6cfu/平板と、サプリメントを加えた培地の方が発育したコレラ菌数が多かった。また、改良培地上の発育集落の平均値は25.2cfu/平板でTSAのそれとほぼ同様であったが、改良培地上のコレラ菌の

表1 各培地上に発育したコレラ菌数の比較

試験回数	培地の種類				
	TSA ^{a)}	TSA ^{b)} +サプリメント	CV ^{c)}	CV +サプリメント	改良 培地
1	12	27	0	0	18
2	17	31	0	3	20
3	20	33	1	5	24
4	37	34	1	5	31
5	45	81	4	10	33
算術平均	26.2	41.2	1.2	4.6	25.2

a) Tryptone Soya Agar

b) サプリメント: ビルビン酸ナトリウム (0.1% [v/v]) とカタラーゼ (2,000U/plate)

c) クロモアガービブリオ

コロニーは、接種菌が青色に発色するため、他の菌との区別が容易であった。

コレラ菌接種した冷凍食品検体からのコレラ菌分離試験: 冷凍保存した食品検体からコレラ菌の分離を行った結果を表2に示す。A株, B株を接種したマグロ, エビ及びC株を接種したマグロについては、増菌培養法の一次増菌培養液で菌陽性と判定された。一方、C株を接種したエビの一次、二次増菌培養液からは、接種菌は分離できなかったが、本検体の三次増菌培養液からは菌が分離された。

考 察

わが国では、コレラは毎年数十例報告されているが、その多くは海外で感染した輸入事例であり、国内事例で

表2 冷凍保存した食品検体からのコレラ菌検査結果

試料	A株 ^{a)} 接種		B株 ^{b)} 接種		C株 ^{c)} 接種	
	マグロ ^{d)}	エビ ^{e)}	マグロ	エビ	マグロ	エビ
一次増菌培養液	+ ^{f)}	+	+	+	+	- ^{g)}
二次増菌培養液	NT ^{h)}	NT	NT	NT	NT	-
三次増菌培養液	NT	NT	NT	NT	NT	+

a) *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa 血清型O1b) *Vibrio cholerae* El Tor Inaba 血清型O1c) *Vibrio cholerae* 血清型O139

d) -80℃で1年間保存 e) -20℃で1年間保存

f) +:陽性 (3/3検体) g) -:陰性 (3/3検体)

h) NT:検査せず

は原因食品との疫学的な関連がみられない散发事例がほとんどである。コレラ菌は、赤痢菌・チフス菌・パラチフスA菌などととも代表的な輸入経口感染症の起因菌であるが、2007年の感染症法改正により入院勧告を必要としない3類感染症となった。また、検疫法の改正により検疫の対象疾病から外されたため、検疫所では食品のコレラ菌の検査は行われていないのが現状である。このためコレラ菌に汚染された輸入食品が市場に出回る可能性も完全には否定できない。

埼玉県におけるコレラの事例では、発症3カ月前までに海外渡航歴を有していた患者はなく、飲食店で提供された食品には、冷凍や冷蔵の生鮮魚介類や野菜など、コレラ菌に汚染された可能性のある食材が含まれていた[11-13]。しかし、寿司、刺身として喫食された残品のイカ及び参考品として取去したマグロ、ホタテ、カンパチ等の魚介類からコレラ菌は検出されず、原因食品を特定するには至らなかった。

生理食塩水中における消長試験から、5℃の冷蔵保存では保存期間が長くなるに従って菌数が減少したが、 10^5 cfu/ml以上の検体では、4週間後でも1オーダー程度の減少で大きな変化はみられなかった。一方、冷凍保存では1回の凍結・解凍により菌数は2~4オーダー減少し、初期菌量が 10^6 cfu/ml以上の検体においても、冷凍保存3週間後（凍結・解凍を3回繰り返した場合）に5~6オーダー減少した。

本研究では、冷凍保存された食品からコレラ菌の分離を可能にするため、クロモアガービブリオ培地を改良し、凍結・解凍により損傷を受けた菌の分離に適した培地の検討を行った。市販のクロモアガービブリオ培地上のコレラ菌は酵素基質により青色に発色し、他の夾雑菌と区別することが可能であるが、コレラ菌の発育を抑制する成分も含まれているため、凍結・解凍により損傷を受けた菌を分離する際に支障をきたすことが予測された。損傷菌は各種選択剤に対して感受性になることが指摘されていることから[14]、菌の発育を抑制する物質が含まれないTSA培地とクロモアガービブリオ培地を

1:1, 2:1, 3:1の比で混合し、さらにサプリメント（ピルビン酸ナトリウムとカタラーゼ）を加えた3種類の培地を作製し、検討した。その結果、クロモアガービブリオ培地の割合が増えるほど、コレラ菌の発育は強く抑制され、平板上の菌数は減少する傾向にあった。一方、TSA培地とクロモアガービブリオ培地の比が3:1の場合、コレラ菌の発色が弱く、他菌との区別が困難であったが、混合比が2:1では判別が可能であった（データ示さず）。コレラ菌の検出感度を上げるためにはTSA培地の割合を上げた方がよいが、食品の増菌培養液からのコレラ菌の分離を目的とした本研究では、夾雑菌とコレラ菌を区別するため、TSA培地とクロモアガー培地の比を2:1とした改良培地を使用した。

ピルビン酸ナトリウムとカタラーゼは、強力な H_2O_2 除去剤として作用し、損傷細胞におけるカタラーゼ活性の低下を補い、代謝経路に損傷を受けた細菌の回復に有効であることが報告されている[15-18]。本研究においても、凍結・解凍により損傷を受けたコレラ菌を分離する際に、ピルビン酸ナトリウムとカタラーゼの添加が有効であることが示された。

今回、食品の増菌培養液を改良培地に直接塗抹しても、接種菌の分離はできなかったが、免疫磁気ビーズ法を用いることでコレラ菌O1（A株、B株）を接種したマグロとエビの一次増菌培養液から菌の分離が可能であった。また、コレラ菌O139（C株）を接種したエビの一次、二次増菌培養液からは免疫磁気ビーズ法と改良培地を併用しても接種菌は分離されなかった。しかしながら、この検体の増菌培養を3回繰り返すことにより、接種菌の分離が可能となった。食品への接種菌量はマグロで100cfu/切り身（約10g）、エビで500cfu/匹（約25g）であったことから、マグロで約10cfu/g、エビで約20cfu/g以上の汚染がみられた場合には本法でコレラ菌の分離が可能であることが示された。

本研究では、①増菌培養を繰り返し行うこと、②増菌培養液から免疫磁気ビーズ法によりコレラ菌を集菌すること、③分離平板にはピルビン酸ナトリウムとカタラーゼを添加した改良培地（TSA培地とクロモアガー培地の比は2:1）を用いることにより、 10^3 cfu/mlのコレラ菌を接種したマグロとエビから、冷凍保存から1年後でも菌分離が可能であった。以上のことから、食中毒事件等発生時の冷凍保存された食品検体からのコレラ菌検査法として本法が有効であることが示唆された。

引用文献

- [1] Forssman B, Mannes T, Musto J, Gottlieb T, Robertson G, Natori JD, Shadbolt C, Biffin B, Gupta L: *Vibrio cholerae* O1 El Tor cluster in Sydney linked to imported whitebait, Med J Aust, 187, 345-347 (2007)

- [2] Wong CS, Ang LW, James L, Goh KT : Epidemiological characteristics of cholera in Singapore, 1992–2007, *Ann Acad Med Singapore*, 39, 507–512 (2010)
- [3] 猪野富美子 : コレラ菌による食中毒, *食衛誌*, 50, 187–188 (2009)
- [4] Johnston MD, Brown MH : An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperature and studies on their sensitivity to heating and freezing, *J Appl Microbiol*, 92, 1066–1077 (2002)
- [5] Nascumento DR, Vieira RH, Almeida HB, Patel TR, Laria ST : Survival of *Vibrio cholerae* O1 strains in shrimp subjected to freezing and boiling, *J Food Prot*, 61, 1317–1320 (1998)
- [6] Albert MJ, Neira M, Motarjemi Y : The role of food in the epidemiology of cholera, *World Health Stat Q*, 50, 111–118 (1997)
- [7] Yamazaki M, Aoki H, Iwade Y, Matsumoto M, Yamada K, Yamamoto H, Suzuki M, Hiramatsu R, Minagawa H : An enrichment medium for increasing a very small number of *Vibrio parahaemolyticus* cells to the detection limit of the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay, *Jpn J Infect Dis*, 65, 111–116 (2012)
- [8] Biswas B, Vemulapalli R, Dutta SK : Detection of *Ehrlichia risticii* from feces of infected horses by immunomagnetic separation and PCR, *J Clin Microbiol*, 32, 2147–2151 (1994)
- [9] Olsvik O, Popovic T, Skjevue E, Cudjoe K, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M : Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology, *Clin Microbiol Rev*, 7, 43–54 (1994)
- [10] 刑部陽宅, 細呂木志保, 磯部順子, 田中大祐, 北村敬 : 免疫磁気ビーズによる海水からの耐熱性溶血毒産性腸炎ビブリオ O3 : K6 の分離, *日食微誌*, 17, 5–10 (2000)
- [11] Dutt AK, Alwi S, Velauthan T : A shellfish-borne cholera outbreak in Malaysia, *Tran R Soc Trop Med Hyg*, 65, 815–818 (1971)
- [12] Eberhart-Phillips J, Bessser RE, Tormey MP, Feikin D, Araneta, MR, Wells J, Kilman L, Rutherford GW, Griffin PM, Baron R, Mascola L : An outbreak of cholera from food on an international aircraft, *Epidemiol Infect*, 116, 9–13 (1996)
- [13] Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ : Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1301–1314 (1998)
- [14] Tollison SB, Johnson MG : Sensitivity to bile salts of *Shigella flexneri* sublethally heat stressed in buffer or broth, *Appl Environ Microbiol*, 50, 337–341 (1985)
- [15] Martin SE, Flowers RS, Ordal ZJ : Catalase: Its effect on microviol enumeration, *Appl Environ Microbiol*, 32, 731–734 (1976)
- [16] Chambliss LS, Narang N, Juneja VK, Harrion MA : Thermal injury and recovery of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in ground chicken with temperature, pH, and sodium chloride as controlling factors, *J Food Prot*, 69, 2058–2065 (2006)
- [17] Hood AM, Tuck A, Dane CR : A medium for the isolation, enumeration and rapid presumptive identification of injured *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*, *J Appl Bacteriol*, 69, 359–372 (1990)
- [18] Nebra Y, Jofre J, Blanch AR : The effect of reducing agents on recovery of injured *Bifidobacterium* cells, *J Microbiol Methods*, 49, 247–254 (2002)

Improvement of Detection Methods for Isolation of *Vibrio Cholerae*
in Frozen Food Samples

Kazuaki ONO[†]

* Saitama Prefectural Institute of Public Health, 410-1 Ewai, Yoshimi-cho, Hiki-gun, 355-0133, Japan

SUMMARY

The aim of this study is to develop for the high sensitive isolation methods for *Vibrio cholerae* from frozen food samples. After being frozen at -20°C for one week, the bacterial numbers of *V. cholerae* in physiological saline were reduced by a factor of 1/100-1/10,000. However, this bacterium was able to be isolated from the frozen food samples by using the immunomagnetic beads technique. In order to achieve a higher level of detection, enrichment procedures were repeated several times. A shrimp sample stored at -80°C for one year after inoculation with 0.5ml (10^3 cfu/ml) of *V. cholerae* serotype O139 required the enrichment procedures to be repeated three times for isolation. In addition, an original selective agar plate supplemented with 0.1 % volume of sodium pyruvic acid and 2,000 U/plate of catalase was useful for the isolation of *V. cholerae*. In this study, the application of the immunomagnetic beads separation technique and use of the improved selective agar plate after the enrichment procedure of the samples (occasionally, repeated several times) should facilitate a comprehensive approach to the detection of small numbers of *V. cholerae* in frozen foods.

—Key words : enrichment procedure, frozen food sample, immunomagnetic beads separation technique, improvement of selective agar plate, *Vibrio cholerae*.

[†] Correspondence to (Present address) : Kazuaki ONO (Saitama Prefectural Meat Inspection Center, Koshigaya-branch)
1-13 Mashimori, Koshigaya-shi, 343-0012, Japan
TEL 048-965-6481 FAX 048-965-6485
E-mail : ono.kazuaki@pref.saitama.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 354 ~ 359 (2014)