

食品からの病原性腸炎ビブリオ検出方法の検討

藤代敏行¹・大庭美和子¹・衛藤真理子¹・井樋美詠子²

Study for Detection of Enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Food

Toshiyuki FUJISHIRO, Miwako OHBA, Mariko ETOH
and Mieko IBI

Summary

The 3-step enrichment culture and immunomagnetic bead method were applied for the detection of enteropathogenic *V. parahaemolyticus* (Vp+) in raw fish samples. The samples inoculated with Vp+, non-enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* were cultured at 37 °C for 2 hours, and then stocked at 4 °C or -20 °C for 3 days. The stocked samples were cultured 3 times in enrichment broth. After 3rd culture, the immunomagnetic bead method was performed to select a specific K antigen-type, and then the polymerase chain reaction (PCR) method was used for the detection of *tdh* gene. Vp+ was detected by two enrichment methods, salt polymyxin broth (SPB) (18 hours incubation) - SPB (6 hours incubation) - SPB (18 hours incubation) and SPB base (2 hours incubation) - adding polymyxin B (18 hours incubation) - SPB (6 hours incubation).

Key Words : 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus*, 耐熱性溶血毒産生遺伝子 *tdh*
3段階増菌法 Three-step enrichment culture, PCR Polymerase chain reaction
免疫磁気ビーズ法 Immunomagnetic bead method, 食品 Food

はじめに

腸炎ビブリオ（以下 Vp と略）は日本における代表的な食中毒菌の 1 つであり、Vp による食中毒は夏場に多発する。本菌の病原因子については、神奈川現象に關与する耐熱性溶血毒（以下 TDH と略）および TDH に類似する易熱性溶血毒（以下 TRH と略）が証明されており、これら TDH, TRH の産生は *tdh* および *trh* と呼ばれる遺伝子に支配されている¹⁾。

食中毒患者から分離される Vp の多くは *tdh* または *trh* を保有する病原性 Vp（以下 Vp+ と略）であるが、魚介類や海水から分離される Vp のほとんどは *tdh* および *trh* を保有しない非病原性 Vp（以下 Vp- と略）である^{1,2)} ため、本菌による食中毒の原因食品を特定することは困難な実状である。

近年、2 段階または 3 段階増菌法とビーズ法を用いて海水や食品から Vp+ を検出する方法が報告されている³⁻⁶⁾。しかし、これらの報告における 1 次増菌は 6 時間であり、食中毒の検体が夕方に搬入された場合などには、2 次増菌への継代が真夜中になり、実用的とは言えない。

一方、食中毒の原因食品は冷蔵または冷凍保存されていることが多く、食品中の Vp は損傷菌となり検出されにくくなる。このため、損傷菌の存在を前提に増菌培養方法を検討することが必要である。

そこで、検体の冷凍処理や種々の増菌条件を設定し、食品から Vp+ を検出する方法を検討したので報告する。

実験方法

1. 使用菌株と菌液の調整

患者由来の Vp+ 2 株、食品由来の Vp- 6 株および食品由来の *V. alginolyticus*（以下 Va と略）2 株をそれぞれ 3% 食塩加トリプトソイ寒天培地（以下 TSA 平板と略）

1. 福岡市保健環境研究所微生物部門

2. 福岡市保健環境研究所微生物部門

（現所属：福岡市教育委員会学校給食センター柳瀬支所）

に塗抹し、37℃ 一夜培養後、一定量を 3%食塩加トリプトソイブロス（以下 TSB と略）に接種した。37℃ 4 時間培養後、段階希釈してクロモアガービブリオ寒天培地（以下 CAV 平板と略）に塗抹し、37℃ 一夜培養後、菌量を測定し、各菌株の増殖速度を調べた。

本実験では、増菌液中で増殖速度が $V_p < V_{p-}$ となる厳しい条件となるよう、上記の菌株の中から、 V_p は血清型 O1:K25 の株、 V_{p-} は O10:K19 の株を選定した。

選定した菌株を TSB で 37℃ 一夜培養後、各菌数を CAV 平板で測定し、 V_p 菌液を 1 μ L、 V_{p-} 菌液を 100 μ L、 V_a 菌液を 10mL の割合（1：100：10,000 の比率）で混合し、接種菌液を調整した。

2. 刺身への菌液接種

5g の刺身を用意し、調整した混合菌液を 100 μ L ずつ接種した。なお、菌液接種前の刺身については、TSB で一夜培養後、CAV 平板に塗抹し、 V_p および V_a が存在しないことを確認した。

食中毒発生時に採取する検体の状況に近づけるため、菌液を接種した検体は、37℃ 2 時間孵卵器に放置後、3 日間冷蔵または冷凍で保存した。

3. 三段階増菌法

冷蔵および冷凍した検体それぞれについて、表 1 に示す 8 種類の方法で三段階の増菌を行った。培養はすべて 37℃ で行った。

Table 1 Enrichment method

	1st culture		2nd culture		3rd culture	
	Medium	Hour	Medium	Hour	Medium	Hour
A	TSB ^{a)}	6	SPB ^{b)}	18	SPB	6
B	TSB	6-12 ^{c)}	SPB	6	SPB	18
C	TSB	2	SPB	18	SPB	6
D	TSB	4	SPB	18	SPB	6
E	TSB	18	SPB	6	SPB	18
F	SPB	18	SPB	6	SPB	18
G	SPBbase ^{d)}	2	+Polymyxin	18	SPB	6
H	SPB base	4	+Polymyxin	18	SPB	6

a) TSB

: Trypticase soy broth supplemented with 3% NaCl

b) SPB: Salt polymyxin broth

c) Refrigeration for 12 hours at 4℃, after 1st culture for 6 hours at 37℃

d) SPB base

: Pepton 10.0g, Yeast extract 3.0g, Sodium chloride 20.0g, Water 1L

A ~ E では、TSB → 食塩ポリミキシンブイヨン（以下 SPB と略）→ SPB を用い、それぞれ培養時間を変えて増菌した。なお B では、TSB で 6 時間増菌後、12 時間冷蔵し、SPB に植え継いだ。

F では 3 段階すべてに SPB を使用した。

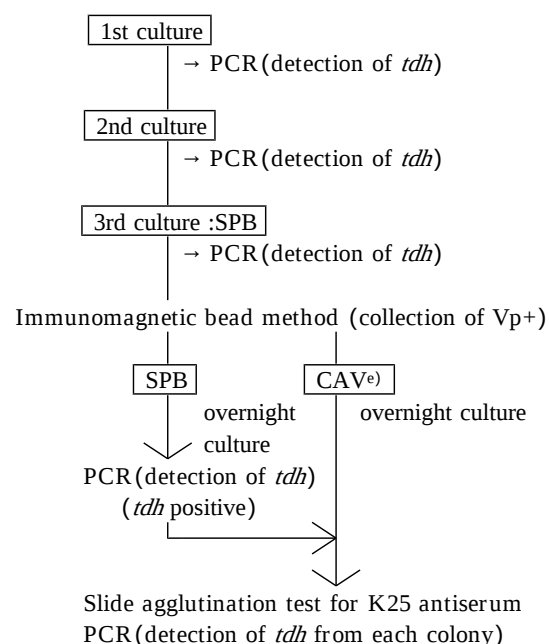
G および H では、SPB 基礎培地（表 1）→ 同培地にポリミキシン B 添加（2.5 万単位/mL）→ SPB の組み合わせで、培養時間を変えて増菌した。

4. PCR による *tdh* の検出と免疫磁気ビーズ法による V_p の選択的集菌

増菌液や CAV 平板からの PCR による *tdh* の検出、および免疫磁気ビーズ法による V_p 株の集菌は、図 1 に示す各段階で実施した。

PCR は、VPD-1,2（宝酒造）の *tdh* 検出用プライマーを用いて 50 μ L 系で実施した。

免疫磁気ビーズ法は、Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG（DYNAL 社）を用い、添付の説明書に基づき、 V_p 免疫血清 K 25（デンカ生研）を感作した。



^{e)} CAV: CHROMagar Vibrio

Fig 1 Detection of *tdh* and V_p (K 25) strain

各段階の増菌液からの PCR は、増菌液 1mL の遠心沈渣に水 100 μ L を加えて 95℃ 5 分間加熱し、12,000rpm 2 分間遠心した上清 5 μ L を鋳型に用いた。

3 次増菌終了後、増菌液 1mL に抗体感作免疫磁気ビーズ 25 μ L を加えて V_p を選択的に集菌後、SPB および CAV 平板に接種し、一夜培養した。

そして、一夜培養した SPB から PCR を行い、*tdh* が検出された場合、CAV 平板上のコロニーが Vp+であるか否かを、抗血清(K 25)によるスライド凝集反応と PCR により調べた。

CAV 平板からの PCR では、1 枚の平板に出現したコロニーを最大 52 個釣菌し、水 100 μ L に混合浮遊し、95 5 分間加熱後、12,000rpm で 2 分間遠心した上清 5 μ L を鋳型に用いた。

実験結果

1. 刺身への接種菌数

選定した菌株は、TSB に一夜培養後、Vp+は 5.6×10^4 CFU/ml、Vp- は 2.8×10^8 CFU/ml、Va は 6.7×10^7 CFU/ml の菌量に達した。

Vp+の増殖は、Vp-、Va に比較して 1,000 分の 1 以下であった。

これらの菌量を、Vp+ : Vp- : Va = 1 : 100 : 10,000 の割合で混合し、その 100 μ L を刺身に接種したため、計算上の接種菌数は、Vp+が 1CFU 以下、Vp-が 2.8×10^5 CFU、Va が 6.7×10^6 CFU となった。

2. 増菌液および免疫磁気ビーズ法からのPCR

各増菌液および免疫磁気ビーズ法からの PCR 結果を表 2 に示した。

Table 2 PCR result after enrichment culture and application immunomagnetic bead method

		1st	2nd	3rd	bead
		culture	culture	culture	method ^{f)}
A	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-
B	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-
C	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-
D	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-
E	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-
F	4	-	+	+	+
	-20	-	-	-	-
G	4	-	-	+	+
	-20	-	-	-	-
H	4	-	-	-	-
	-20	-	-	-	-

^{f)} bead method: immunomagnetic bead method

A ~ H までの 8 種類の増菌方法の中で、増菌液から

*tdh*を検出できたのは、F および G の場合、すなわち、SPB (18 時間培養) - SPB (6 時間培養) - SPB (18 時間培養) および SPB 基礎培地 (2 時間培養) - 同培地にポリミキシン B を添加 (18 時間培養) - SPB (6 時間培養) の組み合わせであった。

また F・G の増菌条件でも、冷凍検体からは *tdh* は検出されなかった。

F・G の 3 次増菌液について、免疫磁気ビーズ法から CAV 平板に塗抹し Vp+株を検索したところ、F では、10 コロニー中 7 コロニーが Vp+であり、G では 4 コロニー中 1 コロニーが Vp+であり、高率に Vp+株が回収された。

一方、*tdh* が陽性となった F・G の増菌液を、6 代まで SPB に継代増菌を続け、各代ごとに CAV 平板に塗抹し PCR を用いて Vp+株を検索したが、Vp+株は回収できなかった。

考察

本実験で刺身に接種した Vp+の菌量は、計算上 1CFU 以下と少なく厳しい増菌条件であったが、これは、選択性の強い CAV 平板を菌数測定に用いたことが影響しており、菌数測定には選択性の弱いビブリオ寒天などを使用するほうが適していると考えられた。

食品中の Vp の増菌については、1 次増菌を TSB で行い、その後 SPB で選択増菌することが多い³⁻⁶⁾。

しかし、今回の実験結果では、1 次増菌で TSB を使用した場合は *tdh* を検出できず、SPB (18 時間培養) - SPB (6 時間培養) - SPB (18 時間培養) および SPB 基礎培地 (2 時間培養) - 同培地にポリミキシン B を添加 (18 時間培養) - SPB (6 時間培養) の組み合わせの場合に *tdh* を検出できた。

これは、接種した Vp+の菌量が 1CFU 以下 (計算値) と少なく、かつ、Vp-や Va との菌量の比が 100,000 倍以上と非常に大きかったため、選択効果のない TSB 中では Vp+の増菌には不利な条件となったものと考えられた。

近年、検食は -20 以下で保存されるようになったため、原因食品に付着している Vp は、凍結損傷菌となっていることが多い⁷⁾。今回の実験で *tdh* を検出できたのは冷蔵検体の場合であり、凍結検体からは検出できなかった。これは凍結の方が冷蔵より損傷の度合いが大きいことによるものと思われる。

こういった損傷菌は TSB のような栄養豊富な培地では発育できるが、栄養分の少ない培地では発育できなくなり、また培地に添加した抗生物質に対する感受性も増

す．そのため，一般的には TSB など前培養し，その後選択培地で 2 次増菌を行うことが勧められている．

しかし，今回の結果から，目的以外の細菌が非常に多いと，選択性のない TSB で前培養しても効果がないものと考えられ，今後，損傷菌が十分発育しかつ目的以外の細菌の発育が抑制される増菌方法を工夫していくことが必要と思われる．

食品の増菌液を分離培地に広げ，Vp+の分離を行う場合，その成否は Vp+と Vp-の混在比率に大きく左右される．特にその比が 1 : 100 以上であれば，Vp+を検出することは労力的に容易ではない．そのため，目的とする Vp の K 抗原に対する抗血清を感作したビーズと増菌液を反応させ，選択的に目的の Vp を集菌する免疫磁気ビーズ法が開発され⁸⁾，海水や貝類の汚染調査に応用されている^{5,6)}．

今回，*tdh* が検出された増菌液から免疫磁気ビーズ法で Vp+を集菌し，CAV 平板に塗抹したところ，わずか 4 ~ 10 コロニーの検索で Vp+が見つかり，きわめて効率の良い結果であった．一方，免疫磁気ビーズ法を使わない場合は，6 代まで継代増菌培養を続けても Vp+株を検出できず，免疫磁気ビーズ法の効果が確認された．

これらのことから，微量の Vp+に汚染された食品の検査には，SPB(18 時間培養) - SPB(6 時間培養) - SPB(18 時間培養)と SPB 基礎培地(2 時間培養) - ポリミキシン添加(18 時間培養) - SPB(6 時間培養)の 3 段階増菌を行い，3 次増菌液から免疫磁気ビーズ法を行い，Vp+を集菌する方法が有効であると考えられた．

一方，通常の Vp 食中毒では，原因食品は相当数の Vp+に汚染されているため，損傷菌の存在を前提に，1 次増菌には TSB を加える必要があると思われる．

実際の食中毒検査では，検体が夕方以降に搬入されることが多く，1 次増菌の時間は作業環境上 18 時間であることが望ましい．今後は，Vp+，Vp-および Va の接種菌量やその比率を変えて実験を行い，実際の食中毒検査に応用しやすい 3 段階増菌法を検討していく必要がある．

要 約

3 段階増菌法と免疫ビーズ法を用いて刺身から Vp+を検出する方法について検討した．刺身に Vp+，Vp-，Va を添加後，37℃ 2 時間培養し，4℃ または -20℃ で 3 日間保存した．保存後の検体は 3 段階増菌を行い，免疫磁気ビーズ法を行った後，PCR で *tdh* を検索した．

その結果，SPB(18 時間培養) - SPB(6 時間培養) - SPB(18 時間培養)，および SPB 基礎培地(2 時間培養) - ポリミキシン添加(18 時間培養) - SPB(6 時間培養)の組み合わせが有効であった．

文 献

- 1) 本田武司：耐熱性溶血毒および類似毒素，腸炎ビブリオ第 集，105 ~ 115，近代出版
- 2) 竹田美文ら：腸炎ビブリオ，日細菌誌，36，617 ~ 628，1981
- 3) 齋藤志保子他：秋田県内の河口域における腸炎ビブリオ O3:K6TDH+の分離状況について，秋田県衛生科学研究所報，63, 2000
- 4) 熊谷進他：食品からの腸炎ビブリオ検出方法の研究，厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業,1999
- 5) 工藤由起子他：免疫磁気ビーズ法および酵素基質培地を用いた TDH 産生性腸炎ビブリオ O3:K6 の自然汚染貝からの検出，感染症誌，75，955-960，2001
- 6) 刑部陽宅他：免疫磁気ビーズによる海水からの耐熱性溶血毒産生性腸炎ビブリオ O3:K6 の分離，日本食品
- 7) 森地敏樹：各種の理化学的処理で生ずる非致死の損傷菌の特徴とその検出，モダンメディア 23(12) 571-587 微生物学会雑誌，17(1)，5-10，2000
- 8) Tomoyasu.T. : Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study , Appl.Environ.Microbiol. , 58 , 2679-2682 , 1992