

表3 冷凍・冷蔵保存別における赤痢菌の検出率							
冷蔵・冷凍	試験法	菌接種	PCR		分離培地		
			invE	ipaH	SS	CRT	DHL
カキ 冷蔵	試験法 1+2	control	2/180	2/180	0/180	0/180	0/180
		L	50/180	57/180	49/180	50/180	46/180
		H	92/180	98/180	104/180	106/180	102/180
		TOTAL	144/540	157/540	153/540	156/540	148/540
コーン 冷蔵	試験法 1+2	control	1/180	2/180	0/180	0/180	0/180
		L	174/180	178/180	180/180	180/180	180/180
		H	179/180	180/180	180/180	180/180	180/180
		TOTAL	354/540	360/540	360/540	360/540	360/540
		TOTAL	498/1080	517/1080	513/1080	516/1080	508/1080
カキ 冷凍	試験法 1+2	control	0/180	1/180	0/180	0/180	0/180
		L	13/180	16/180	15/180	18/180	16/180
		H	46/180	52/180	59/180	67/180	63/180
		TOTAL	59/540	69/540	74/540	85/540	79/540
コーン 冷凍	試験法 1+2	control	1/180	3/180	0/180	0/180	0/180
		L	122/180	128/180	127/180	130/180	127/180
		H	179/180	180/180	180/180	180/180	180/180
		TOTAL	302/540	311/540	307/540	310/540	307/540
		TOTAL	361/1080	380/1080	381/1080	395/1080	386/1080

表4 試験方法別における赤痢菌の検出率							
試験法	菌接種	PCR		分離培地			
		invE	ipaH	SS	CRT	DHL	
試験法1 カキ	control	0/180	0/180	0/180	0/180	0/180	
	L	6/180	8/180	10/180	16/180	13/180	
	H	25/180	35/180	52/180	62/180	42/180	
	TOTAL	31/540	43/540	62/540	78/540	55/540	
試験法1 コーン	control	1/180	2/180	0/180	0/180	0/180	
	L	146/180	151/180	153/180	155/180	153/180	
	H	178/180	180/180	180/180	180/180	180/180	
	TOTAL	325/540	333/540	333/540	335/540	333/540	
		TOTAL	356/1080	376/1080	395/1080	413/1080	388/1080
試験法2 カキ	control	2/180	3/180	0/180	0/180	0/180	
	L	57/180	65/180	54/180	53/180	49/180	
	H	113/180	115/180	111/180	111/180	112/180	
	TOTAL	172/540	183/540	165/540	164/540	161/540	
試験法2 コーン	control	1/180	3/180	0/180	0/180	0/180	
	L	150/180	155/180	154/180	155/180	154/180	
	H	180/180	180/180	180/180	180/180	180/180	
	TOTAL	331/540	338/540	334/540	335/540	334/540	
		TOTAL	503/1080	521/1080	499/1080	499/1080	495/1080
		TOTAL	859/2160	897/2160	894/2160	912/2160	883/2160

図1 *Shigella sonnei*の試験法 (I)

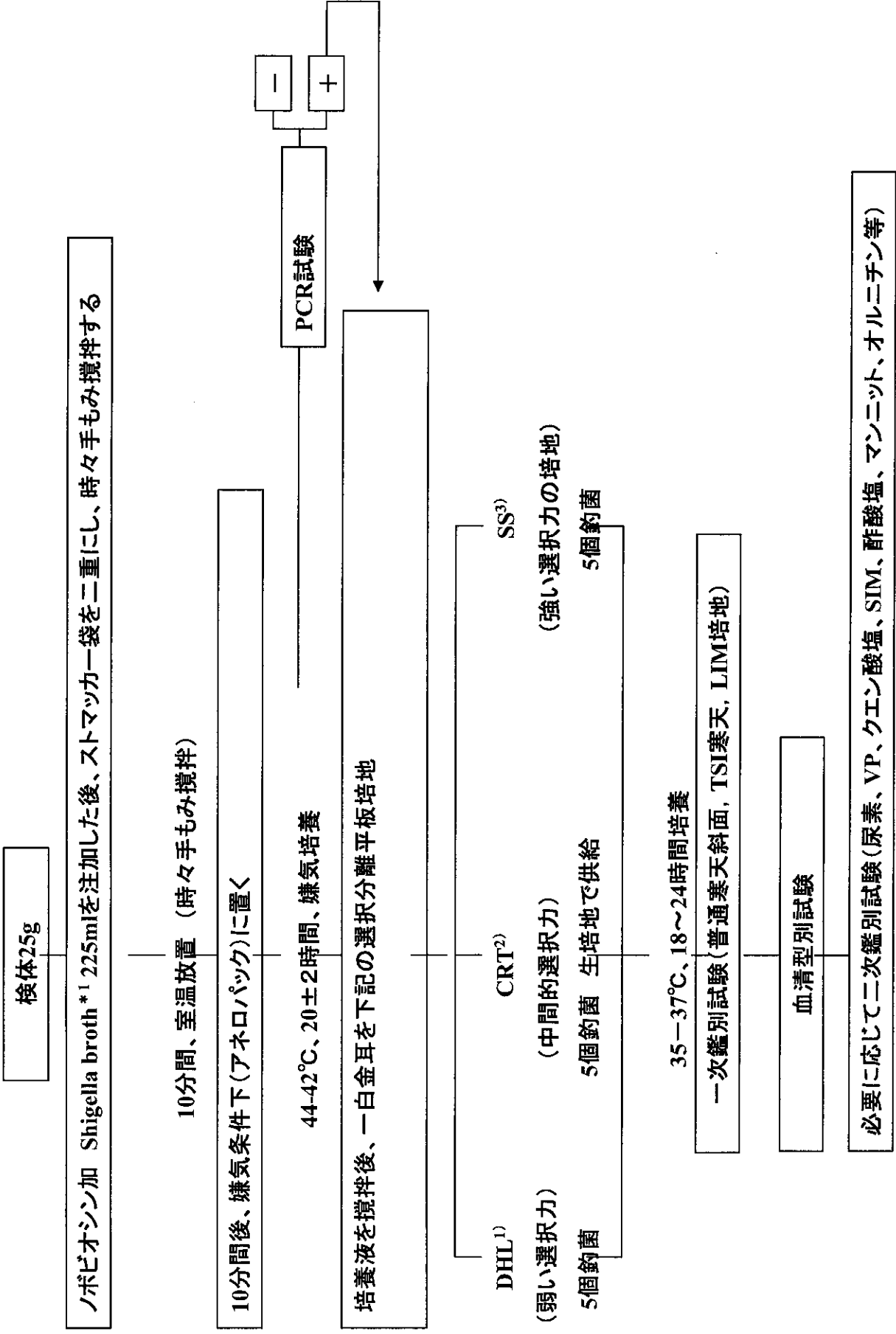
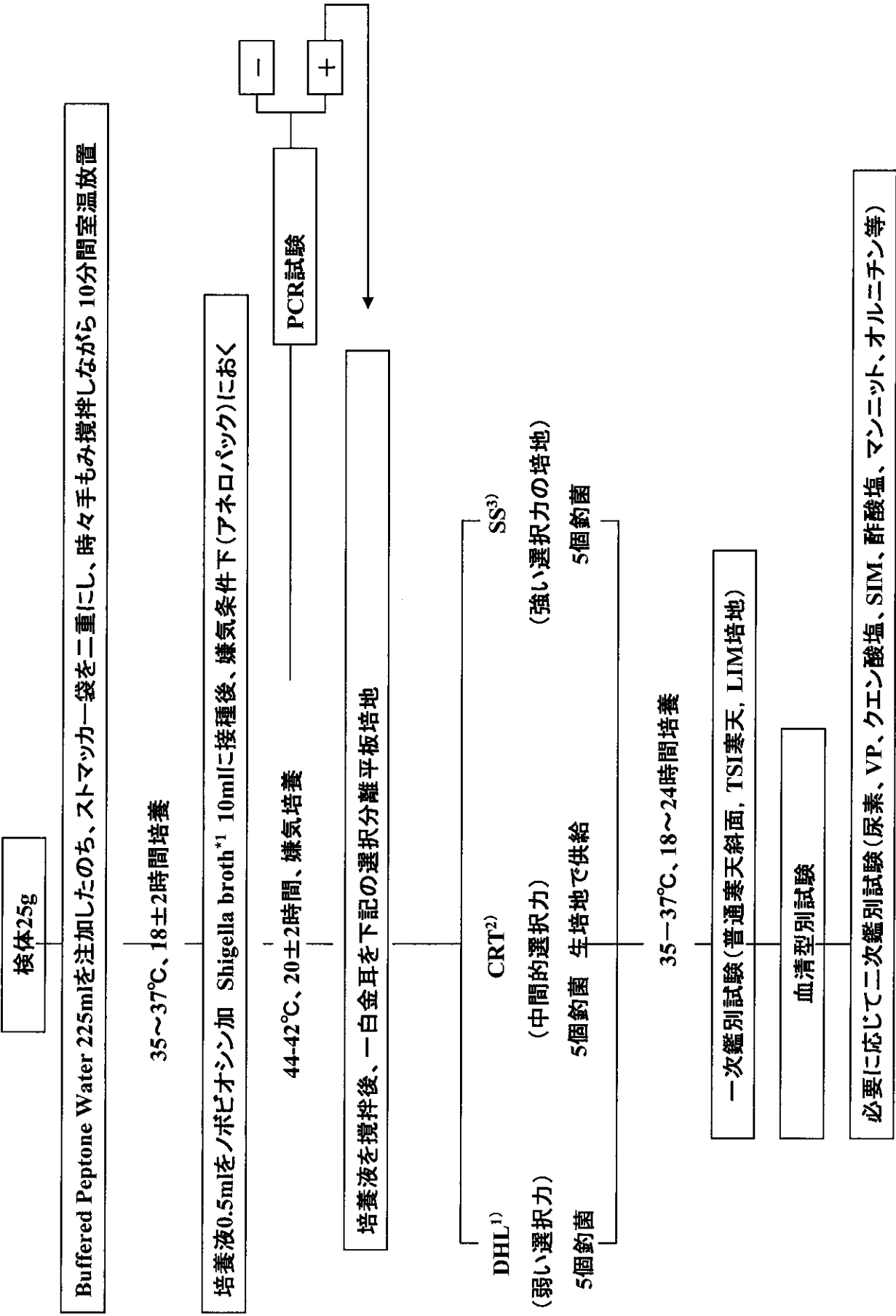


図2 *Shigella sonnei*の試験法(Ⅱ)



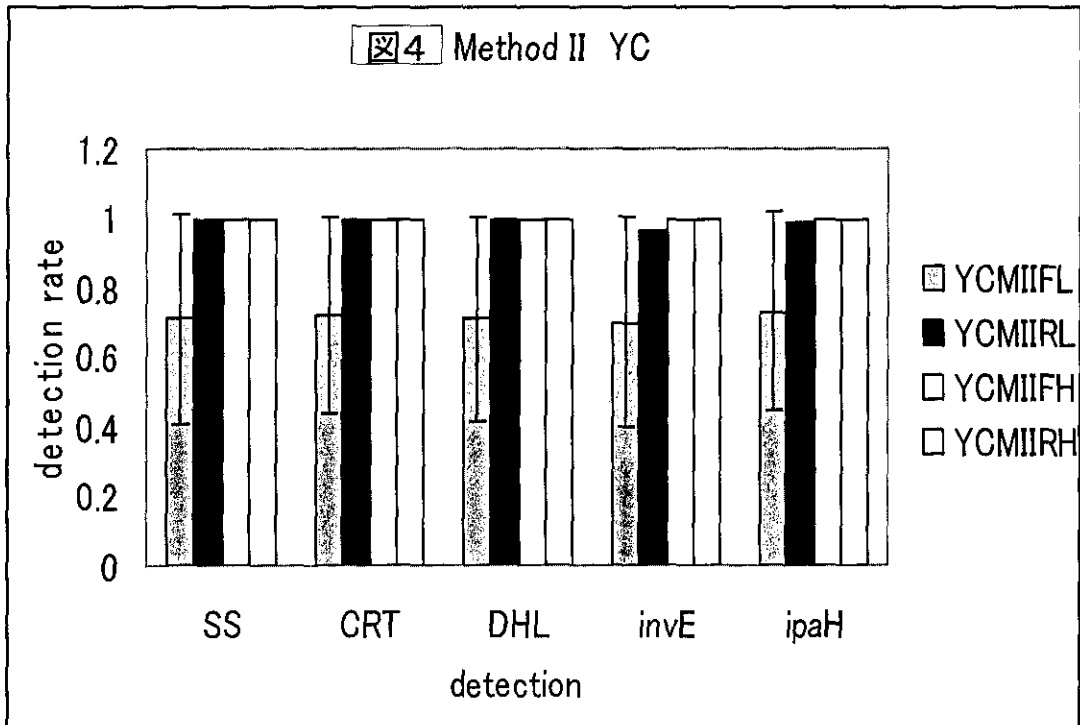
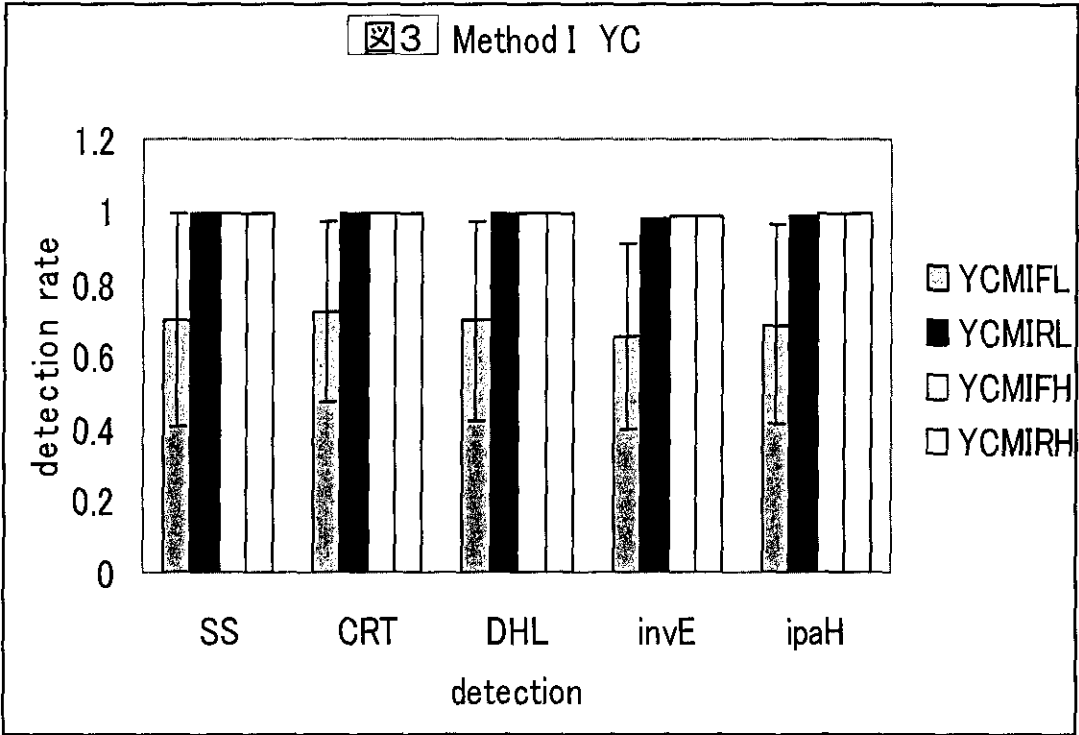


Figure 5 Method I Oyster

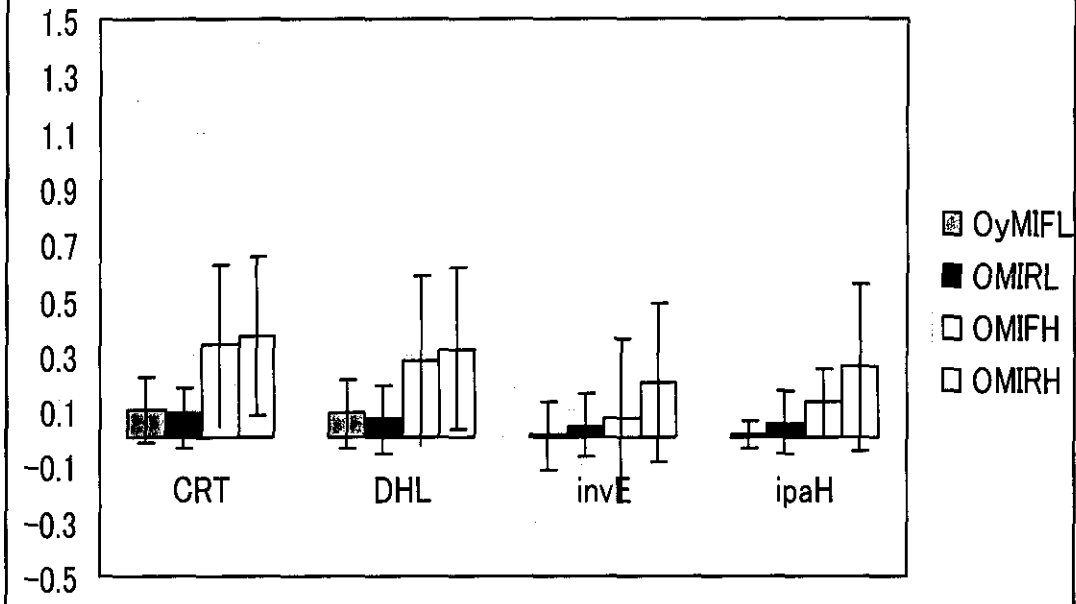


Figure 6 Method II Oyster

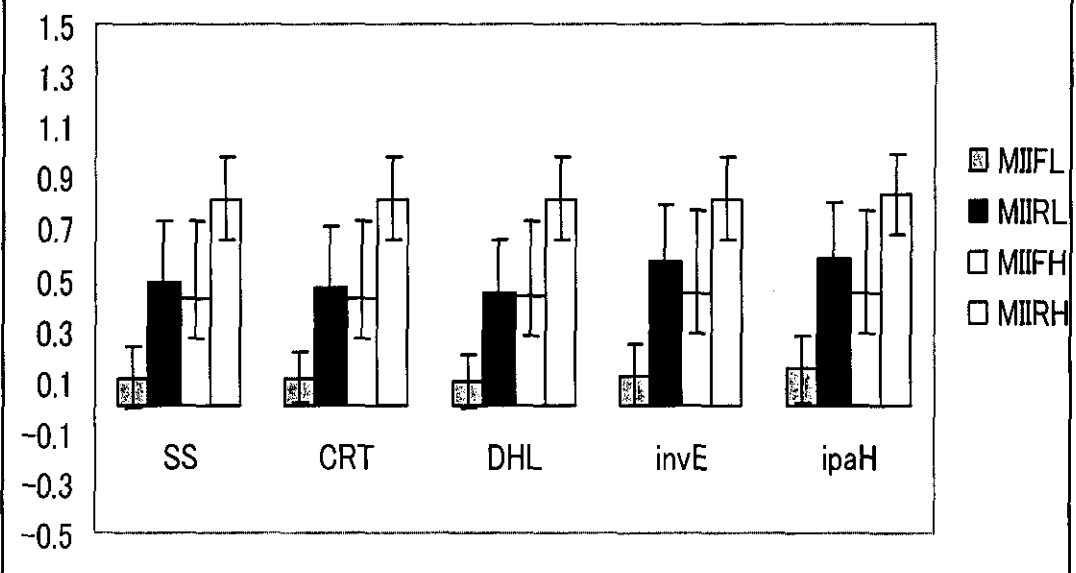


図7 試験法I

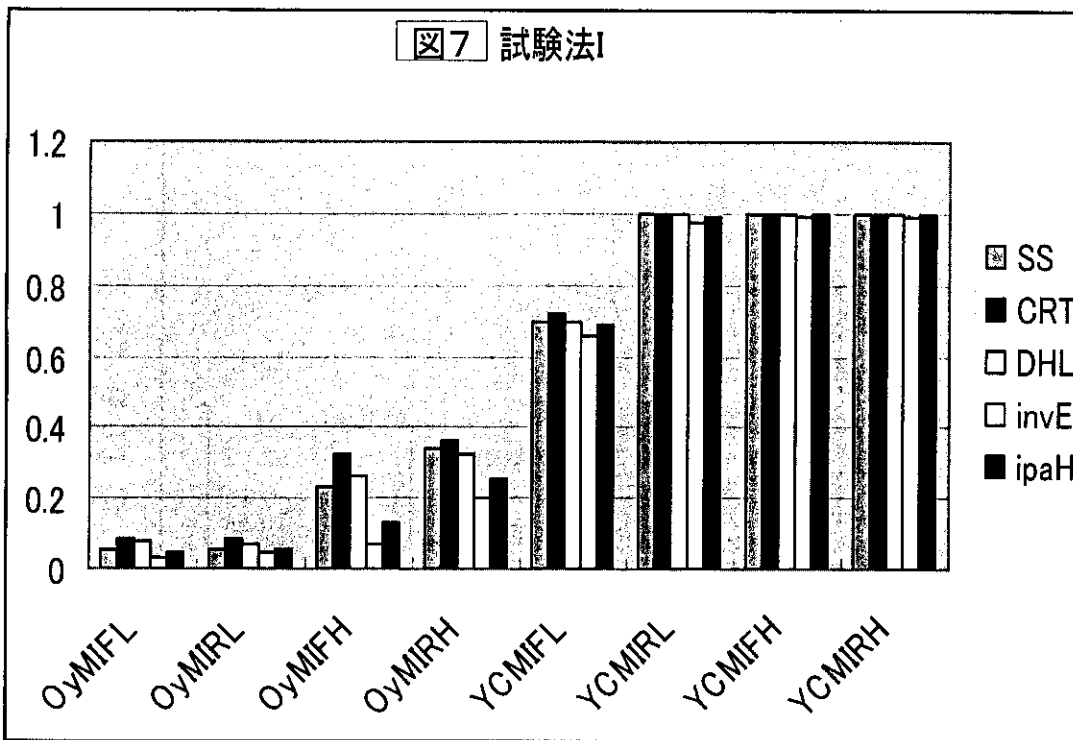


図8 試験法II

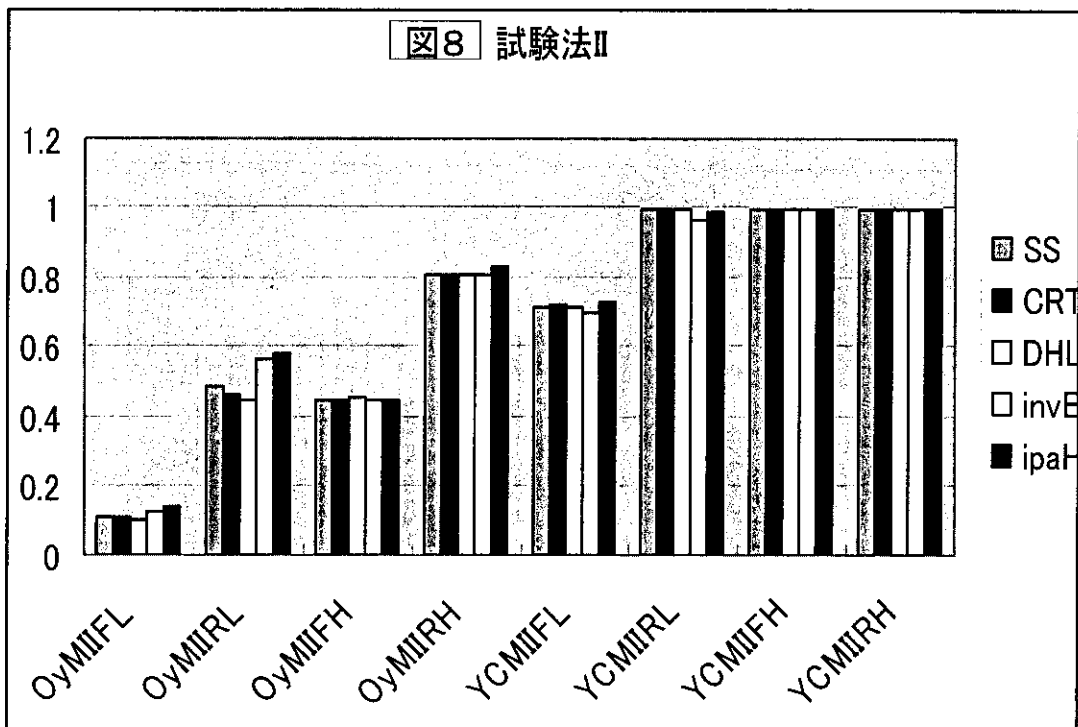


図9 *Shigella sonnei*の試験法(1)

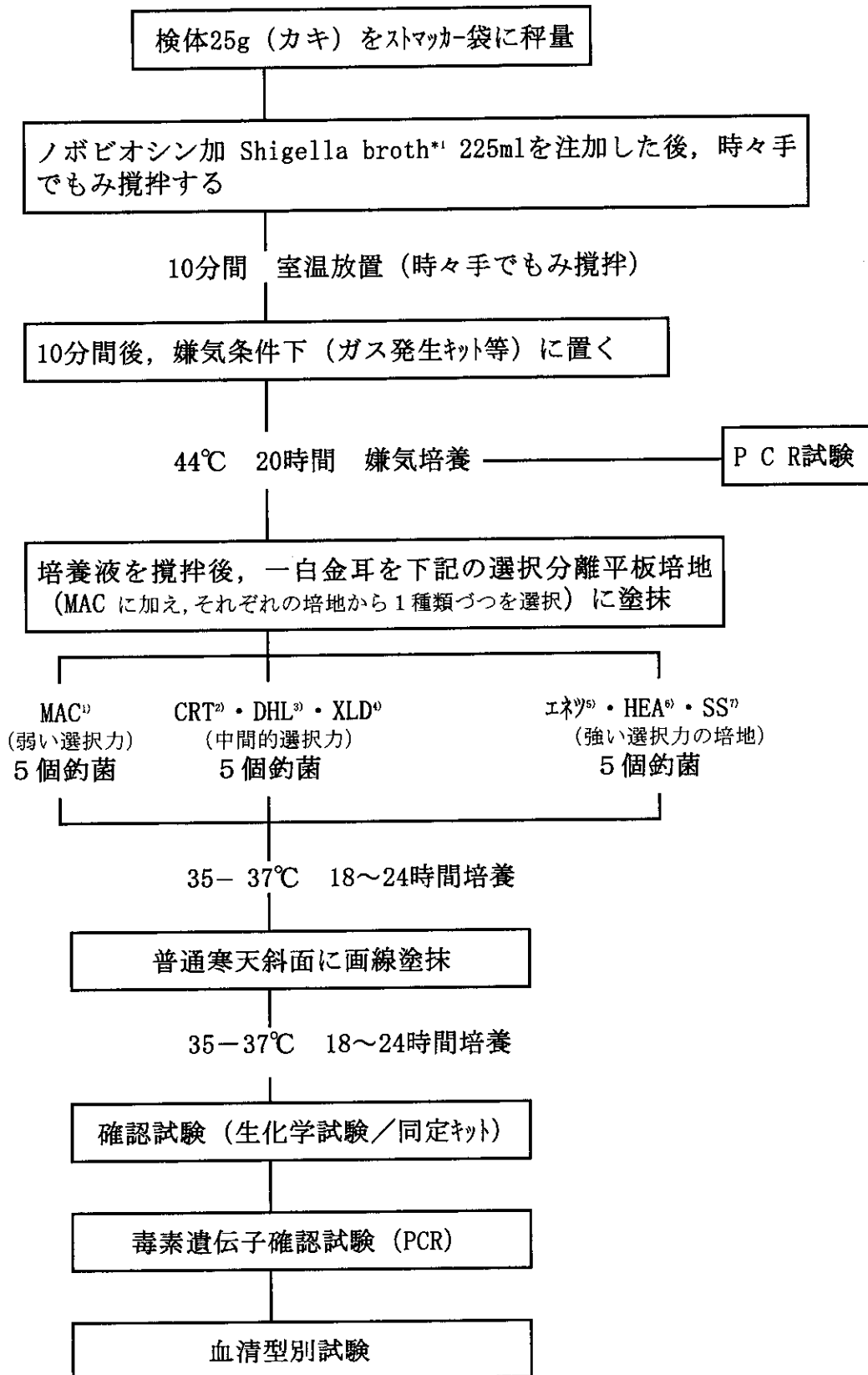


図10 冷凍カキの *Shigella sonnei* 試験法 (2)

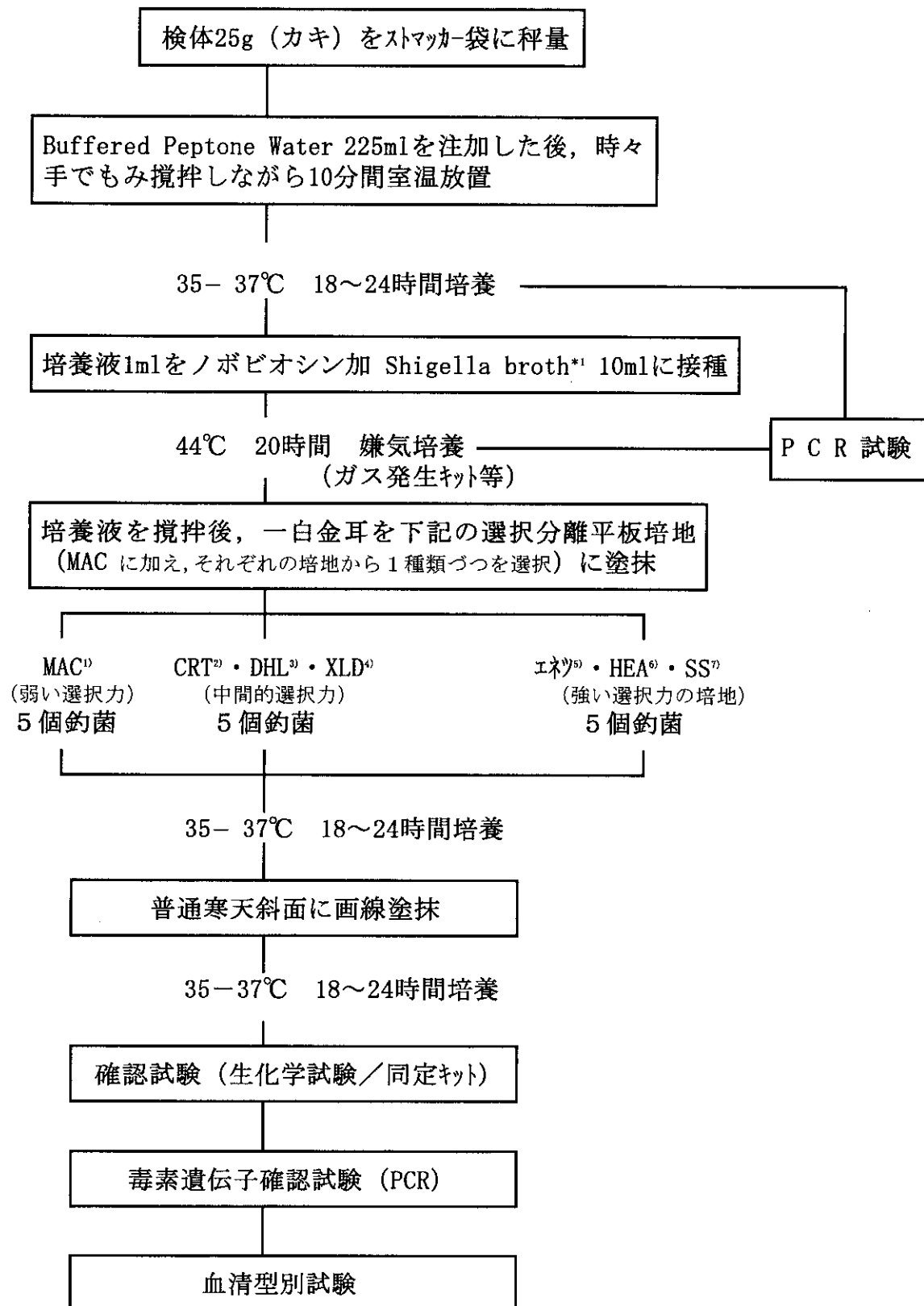
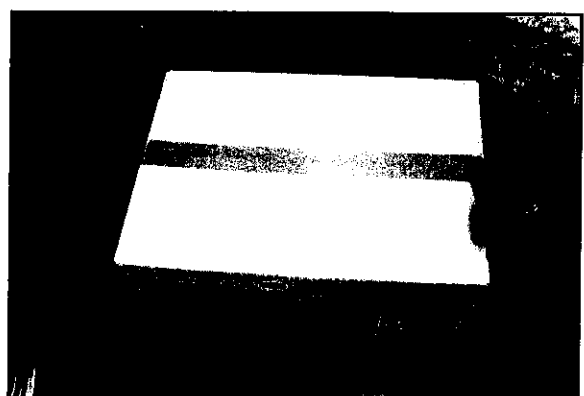
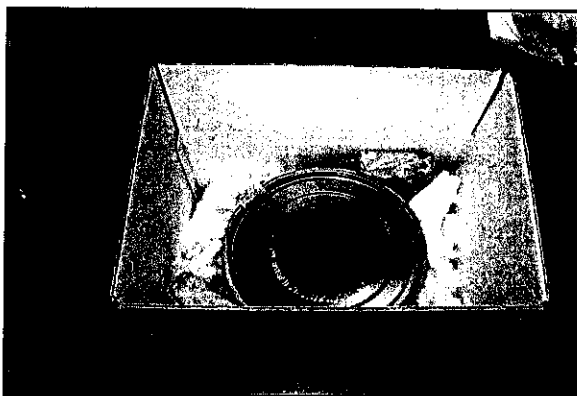
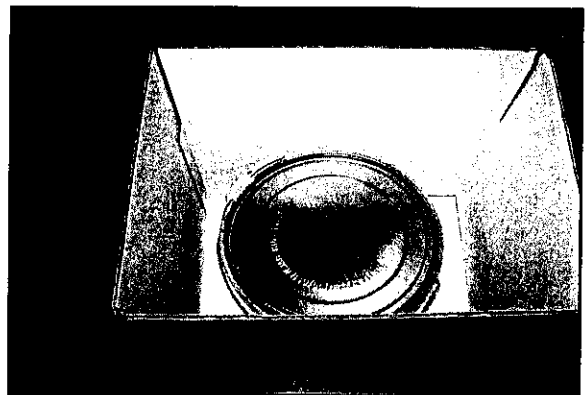
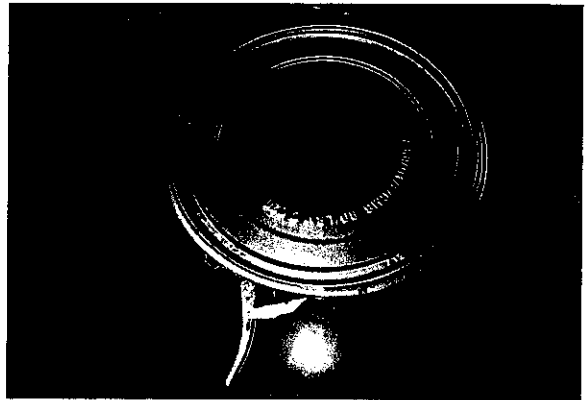


写真1



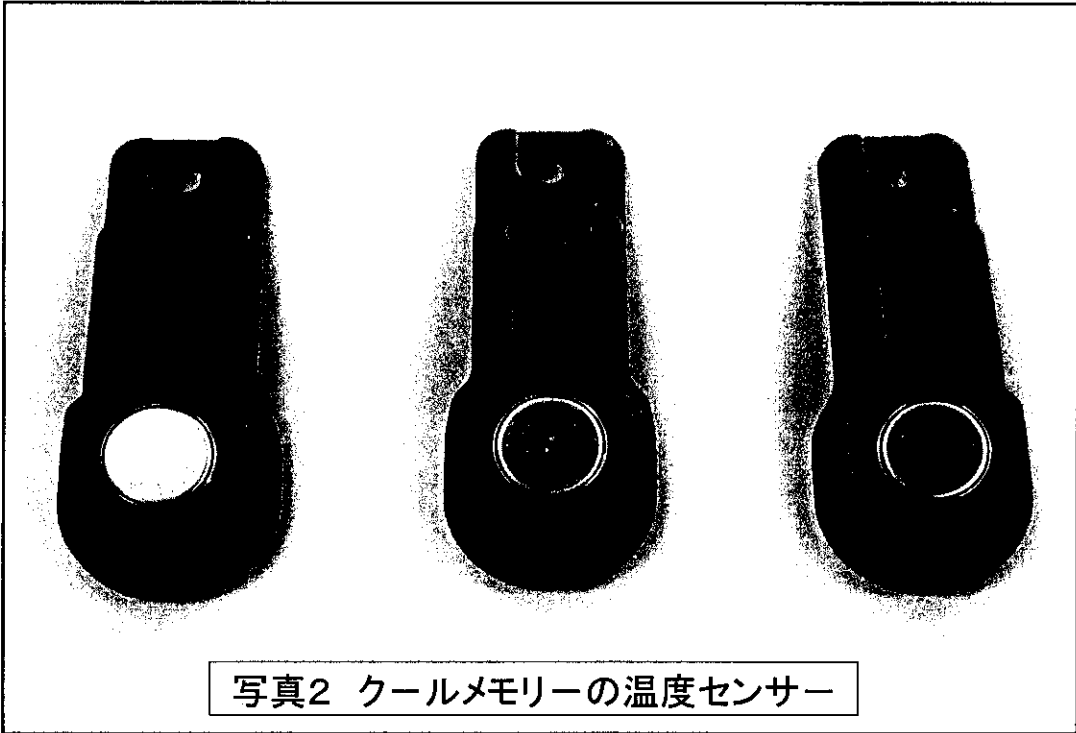


写真2 クールメモリーの温度センサー



写真3 クールメモリとコンピュータ

資料 1

赤痢菌 (*Shigella sonnei*) の検査法解説

1. 検体の採取

1) 食品の場合は 200g 以上を採取する。なお、表面汚染が考えられる食品は、表面部 300~500cm²を厚さ 0.2~0.3mm に削り検体とする。

2) 水の場合は、蛇口をアルコール綿等で殺菌後 3 L 以上を採水する。水槽から直接採水する場合は、柄杓（ヒシヤク）等を使用する。なお、塩素消毒した水はチオ硫酸ナトリウムで中和する。

2. 試料の調製

1) 食品

採取した検体の全体を細切、混和後、その 25g をストマッカー袋（ピペットが目詰まりするような検体ではフィルター機能のあるものを使用）に秤量して試料とする。

2) 水

採取した検体の 3 L をメンブレンフィルター（ポアサイズ 0.45 μm）により濾過する。フィルターが途中で目詰まりした場合は新しいフィルターを追加使用する。なお、検水が成分の違い、汚濁の状態などから 1 枚のフィルターではろ過できない場合は、水試料（3 L）を適宜小分けする。

3) 陽性対照の作製方法と使い方

赤痢菌 (*Shigella sonnei*) 株（普通寒天斜面保存株）の一白金耳を T S B（3mL）に接種、35~37℃で 18 時間培養する。この培養液 1 mL を 0.1% ペプトン加滅菌生理食塩水（9 mL）を用いて 10⁻⁵ 倍希釈する。この 10⁻⁵ 倍希釈液 1 mL を、さらに 40mL の 0.1% ペプトン加滅菌生理食塩水で希釈した菌液を試料とする。本試料 200 μL を検体 25g に接種し陽性対照とする。陽性対照に用いる菌株は、P F G E（DNA パターン）が確認されているものを用いること。

3. 増菌培養

1) 食品

ストマッカー袋中の試料に増菌培地 225mL を注加した後、時々手揉みしながら 10 分間室温放置する（ストマッカー処理はしない）。室温放置後、増菌培地が B P W の場合は、35～37℃で 18～24 時間好気培養する。増菌培地が Shigella broth の場合は 44℃で 18～24 時間嫌気培養する。ただし、食中毒検体の検査にあたっては、検査検体数を増やしたり、一次および二次増菌に加え、Shigella broth を用いた三次増菌やビーズ法などの導入に加え、分離平板培地の種類を増やすなどの工夫が必要と思われる。

2) 水

濾過したフィルターを必要に応じ細切し、中試験管など適当な滅菌容器に入れ、増菌培地が B P W の場合は培地 15mL を注加して 35～37℃で 18～24 時間好気培養する。増菌培地が Shigella broth の場合は培地 15mL を注加して 44℃で 18～24 時間嫌気培養する。

4. 増菌用培地

1) B P W (Buffered Peptone Water) (OXOID, MERCK, 栄研, その他)

ペプトン	10.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸 2 ナトリウム	4.0g*
リン酸 1 カリウム	1.5g*
蒸留水	1,000mL

pH 7.2±0.1

★：121℃で 15 分間滅菌後 40℃程度に冷却し使用する。*リン酸緩衝剤の配合は、培地メーカーによってまちまちであるが、担当者の好みで選択しても差し支えない。

2) Shigella broth (自家調製, OXOID)

組成：

トリプトン	20.0g
リン酸水素二カリウム	2.0g
リン酸二水素カリウム	2.0g
塩化ナトリウム	5.0g

グルコース	1.0g
Tween80	1.5mL
ノボビオシン	0.5mg
精製水	1000mL
pH	7.0±0.2

★：ノボビオシン以外のすべての組成（31.5g/L）をフラスコに入れ，1 Lの精製水を加えて溶解する．121℃・15分間オートクレーブする．ノボビオシン50mgを1 Lの精製水に溶解し，0.2μmのメンブランフィルターでろ過滅菌する．調製したノボビオシン溶液は，滅菌した培地225mLに2.5mLの割合で添加する（ISOではノボビオシン25.0mgを1 Lの精製水で溶解し，5 mLを添加する事になっている）．Tween80の比重は1.08であるため1.5g/Lの添加でも良い．

嫌気培養

- ・嫌気ジャー（OXOID, MERCK, BBL, 三菱化学, その他）
- ・嫌気性菌用ガス発生キット（OXOID, BBL, 三菱化学, その他）

★嫌気ジャーを用いた嫌気培養

- ① 嫌気性菌用ガス発生キットを嫌気ジャーにセットする．触媒が必要な場合はこれも同時にセットする事．
- ② 培養する検体を嫌気ジャーに入れる．
- ③ 嫌気性指示薬を嫌気ジャーにセットする．
- ④ 嫌気性菌用ガス発生キットを活性化し，嫌気ジャーにセットする．
- ⑤ ジャーを密閉し，インジケータの色で，嫌気となっている事を確認してから，44℃で20時間培養する．

5. 分離培養

一般に，標的菌（赤痢菌：*Shigella sonnei*）を分離しようとする場合には，多くの単離集落が出現するように塗抹することである．また，使用する分離培地の種類や平板数を増やしたり，あるいは増菌培養液を希釈するなどの操作を行うことが重要である．釣菌する集落は，疑わしい集落をできる限り多く釣菌しないと，標的菌を得ることは難しい．分離用培地としては，以下のものが利用できるが，培地組成はメーカーにより若干異なっているので，それ

それぞれの研究室あるいは検査室で日常使い慣れた培地を用いることを薦める。はじめて使用するところでは、標準菌を各分離培地に接種して、集落の大きさ、色調、形状などを確認しておくこと。

1) MAC : MacConkey Agar No.3 (OXOID,Difco,栄研,日水,その他)

組成

ペプトン	20.0g
乳糖	10.0g
胆汁酸塩 No.3	1.5g
塩化ナトリウム	5.0g
ニュートラルレッド	0.03g
クリスタルバイオレット	0.001g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL

pH 7.1±0.2

★ : すべての組成 (51.5g/L) をフラスコに入れ、1 L の精製水を加えて加温溶解する。溶解後、121℃・15 分間オートクレーブした後、50℃ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する。

2) CRT : CHROMagarO157TAM (CHROMagar ; 関東化学)

組成

ペプトンと塩化ナトリウム	31.5g
カンテン	12.0g
特殊色素混合物	1.0g
精製水	1000mL

pH 7.2

★ : すべての組成 (44.5g/L) をフラスコに入れ、1 L の精製水を加えて加温溶解する。溶解後、50℃ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する。オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない。

3) DHL Agar (日水,栄研,OXOID,MERCK,その他)

組成

肉エキス	3.0g
------	------

ペプトン	20.0g
乳糖	15.0g
白糖	10.0g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0g
チオ硫酸ナトリウム	2.3g
クエン酸ナトリウム	1.0g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0g
ニュートラルレッド	0.03g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL
pH	7.0±0.2

★ : すべての組成 (63.3g/L) をフラスコに入れ, 1 L の精製水を加えて加温溶解する. 溶解後, 50℃ ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する. オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない.

4) XLD Agar (OXOID, 栄研, Difco, MERCK, その他)

組成

酵母エキス	3.0g
乳糖	7.5g
白糖	7.5g
キシロース	3.75g
塩酸リジン	5.0g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム	6.8g
クエン酸鉄アンモニウム	0.8g
フェノールレッド	0.08g
カンテン	12.5g
精製水	1000mL
pH	7.4±0.2

★ : すべての組成 (52.9g/L) をフラスコに入れ, 1 L の精製水を加えて加温溶解する. 溶解後, 50℃ ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する. オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない.

5) エネツ : Salmonella Agar acc. to Onoz (MERCK)

組成

酵母エキス	3.0g
肉エキス	6.0g
肉ペプトン	6.8g
乳糖	11.5g
白糖	13.0g
胆汁酸塩混合物	3.825g
クエン酸ナトリウム	9.3g
チオ硫酸ナトリウム	4.25g
L-フェニルアラニン	5.0g
クエン酸鉄	0.5g
硫酸マグネシウム	0.4g
ブリリアントグリーン	0.00166g
ニュートラルレッド	0.022g
アニリンブルー	0.25g
メタクロムイエロー	0.47g
リン酸水素二ナトリウム	1.0g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL
pH	7.1±0.2

★ : すべての組成 (80.5g/L) をフラスコに入れ, 1 L の精製水を加えて加温溶解する. 溶解後, 50°C ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する. オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない. 本培地は溶けにくいので注意すること.

6) HEA : Hektoen Enteric Agar (OXOID, Difco, その他)

組成

プロテオースペプトン	12.0g
酵母エキス	3.0g
乳糖	12.0g
白糖	12.0g

サリシン	2.0g
胆汁酸塩 No.3	9.0g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム	5.0g
クエン酸鉄アンモニウム	1.5g
酸性フクシン	0.1g
ブロモチモールブルー	0.065g
カンテン	14.0g
精製水	1000mL
pH	7.5±0.2

★ : すべての組成 (76.0g/L) をフラスコに入れ, 1 L の精製水を加えて加温溶解する. 溶解後, 50℃ ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する. オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない. 本培地は溶けにくいので注意すること.

7) SS Agar : Salmonella Shigella Agar (OXOID, 日水, 栄研, MERCK, Difco)

組成

肉エキス	5.0g
ペプトン	5.0g
乳糖	10.0g
胆汁酸塩	8.5g
クエン酸ナトリウム	8.5g
チオ硫酸ナトリウム	8.5g
クエン酸鉄	1.0g
ブリリアントグリーン	0.00033g
ニュートラルレッド	0.025g
カンテン	13.5g
精製水	1000mL
pH	7.0±0.2

★ : すべての組成 (60g/L) をフラスコに入れ, 1 L の精製水を加えて加温溶解する. 溶解後, 50℃ ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する. オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない.

6. 確認培養

分離平板培地上に発育した赤痢菌 (*Shigella sonnei*) と疑われる集落を釣菌して普通寒天斜面培地に接種し、35～37℃で18～24時間培養する。この培地を基株としてグラム染色、チトクロームオキシダーゼおよびカタラーゼ試験を行う。また、普通ブイヨンに接種、培養後、本培養液をTSI斜面寒天培地、LIM培地、ブドウ糖加普通ブイヨン(ダーラム管入り)、オルニチン培地(メラー)、シモンズクエン酸塩斜面寒天培地およびアセテート斜面寒天培地にそれぞれ接種し、35～37℃で18～24時間培養する。培養後、TSI斜面寒天培地では高層部黄変、斜面部赤変(黄変の場合あり)硫化水素陰性、糖からのガス産生陰性(TSIで糖からのガス産生の有無を判定することもできるが、糖の種類を特定するのは困難)、ブドウ糖からのガス産生陰性、LIM培地では運動性なし、インドール陰性、硫化水素陰性、リシンデカルボキシラーゼ陰性、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、クエン酸塩培地陰性およびアセテート培地陰性の菌株を赤痢菌陰性と確定し、血清学的試験を行う。

赤痢菌 (*Shigella sonnei*) の主な生化学性状

グラム染色	(-)
チトクロームオキシダーゼ	(-)
カタラーゼ	(+)
運動性	(-)
インドール	(-)
リシンデカルボキシラーゼ	(-)
ブドウ糖からのガス産生	(-)
乳糖分解性 (-) 陽性の場合あり	(-)
白糖分解性 (-) 陽性の場合あり	(-)
硫化水素産生	(-)
オルニチンデカルボキシラーゼ	(+)
クエン酸塩	(-)
アセテート培地	(-)

インドール試験 (コバックの方法) :

培養を終了したLIM培地で運動性およびリシンデカルボキシラーゼの陽性陰性を観察，記帳した後，LIM培地にクロロホルム約1mLを重層する（浸透してはならない）．次に，コバックの試薬約1mLを滴下する．陽性の場合にはクロロホルム層が赤色となる．大腸菌は陽性であるが，赤痢菌は陰性で赤変しない．

コバックの試薬は，パラジメチルアミノベンツアルデヒド5gをアミルアルコールまたはイソアミルアルコール75mLに溶かし，さらに濃塩酸25mLを加えてつくる．冷蔵庫で保存すれば長期間使用できる．

チトクロームオキシダーゼの確認法：

寒天平板培地上の赤痢菌と思われる集落を楊子で釣菌し，その菌苔を精製水でわずかに湿らせた試験用濾紙上にこすり付着させる．チトクロームオキシダーゼ陽性菌は，1分以内に被検菌の付着部分が深青色を呈する．陰性菌は変化しない．色の変化が明確で無い場合は，楊子またはガラス棒を用いて再度行う．

- ・ オキシダーゼ鑑別用スティック（OXOID：関東化学 No.714064-1）
100本 定価 6,800円
- ・ オキシダーゼテスト（BBL：No.261181）50個 定価 7,500円

カタラーゼ試験法：

寒天平板培地上の赤痢菌と思われる集落を楊子で釣菌し，その菌苔をスライドグラスあるいは窓ガラス用ガラスに付着させる．付着させた部分に3%過酸化水素水をガラスのキャピラリーチューブあるいは注射器（1mL）で吸い上げ一滴滴下する．カタラーゼ陽性菌は，気泡を産生するが陰性菌は気泡の産生がない．

A) LIM培地（日水，栄研，MERCK，その他）

組成

ペプトン	12.8g
酵母エキス	3.0g
ブドウ糖	1.0g
L-リジン塩酸塩	10.0g
L-トリプトファン	0.5g
ブロムクレゾールパープル	0.02g
カンテン	2.7g