

表15 各種の選択増菌培地の培養時間によるMPN値の比較

選択増菌培地	陽性検体数	24時間培養と48時間培養のMPN値	
		24 h = 48 h <sup>*1</sup>	24 h < 48 h <sup>*2</sup>
7.5%食塩+1%ピルビン酸 ナトリウム加TSB培地	29	19	10
10%食塩+1%ピルビン酸 ナトリウム加TSB培地	28	12	16
GCB培地	27	9	18

\*<sup>1</sup> 3本法でのMPN値が、24 h培養と48 h培養で等しかった

\*<sup>2</sup> 3本法でのMPN値が、48 h培養の方が高くなった

表16 選択増菌培養液からのMSEY培地とBP培地の検出率比較

選択増菌培地	培養時間	検体数	陽性検体数	
			MSEY培地	BP培地
7.5%食塩+1%ピルビン酸 ナトリウム加TSB培地	24h	30	29(96.7%)	29(96.7%)
10%食塩+1%ピルビン酸 ナトリウム加TSB培地	24h	30	28(93.3%)	26(86.7%)
10%食塩+1%ピルビン酸 ナトリウム加TSB培地	48h	30	28(93.3%)	28(93.3%)
GCB培地	48h	30	27(90.0%)	24(80.0%)

黄色ブドウ球菌の検査法・直接平板培養法（ステージ1：原案）

1. 検体の調製

検体 25 g を無菌的に採取し、ストマックバッグに入れ、緩衝ペプトン水（BPW、別表1、市販のBPWでも可）225 ml を加え、1分間ストマッキング処理し、10倍乳剤を作製する。また、必要に応じて10倍乳剤の10倍段階希釈液（100倍、1,000倍など）を作製する。

2. 菌数測定

10倍乳剤またはその10倍段階希釈液0.1 ml をそれぞれ2枚の選択分離平板培地（Baird-Parker 寒天培地または3%卵黄加マンニット食塩寒天培地）に塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で、 $48\pm 2$ 時間培養する。

3. 純培養

疑わしい集落を1平板につき2~5個釣菌し、トリプトケースソイ寒天培地(TSA)、ハートインヒュージョン(HI)寒天培地、普通寒天培地などの非選択平板培地に塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で、 $22\pm 2$ 時間培養する。

疑わしい集落については、あらかじめラテックス凝集反応で調べることを薦める。

4. 同定

- 1) グラム染色：常法に従う。
- 2) コアグラージェ試験

試験管法によるコアグラージェ試験（別表2）は、純培養した集落を釣菌し、0.2~0.3 ml のブレインハートインヒュージョンブイヨン（BHI）の入った小試験管に懸濁する。またこの懸濁液の1白金耳量をTSA、HI寒天培地、普通寒天培地などに斜面または画線培養し、 $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ で、 $22\pm 2$ 時間培養する。

次に、上記のBHI培養試験管にEDTA添加ウサギ血漿（市販の乾燥ウサギ血漿でも可）0.5 ml を加え、かるく混和して、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽（フラン器でも可）で、24時間まで培養・観察する。

培養後1時間間隔で、血漿凝固の有無を調べ、完全凝固（全体がゼリー状）または部分凝固（一部がゼリー状）した時点で陽性と判定する。なお、ゼリー状の凝固を示さないものでもフィブリンの析出した

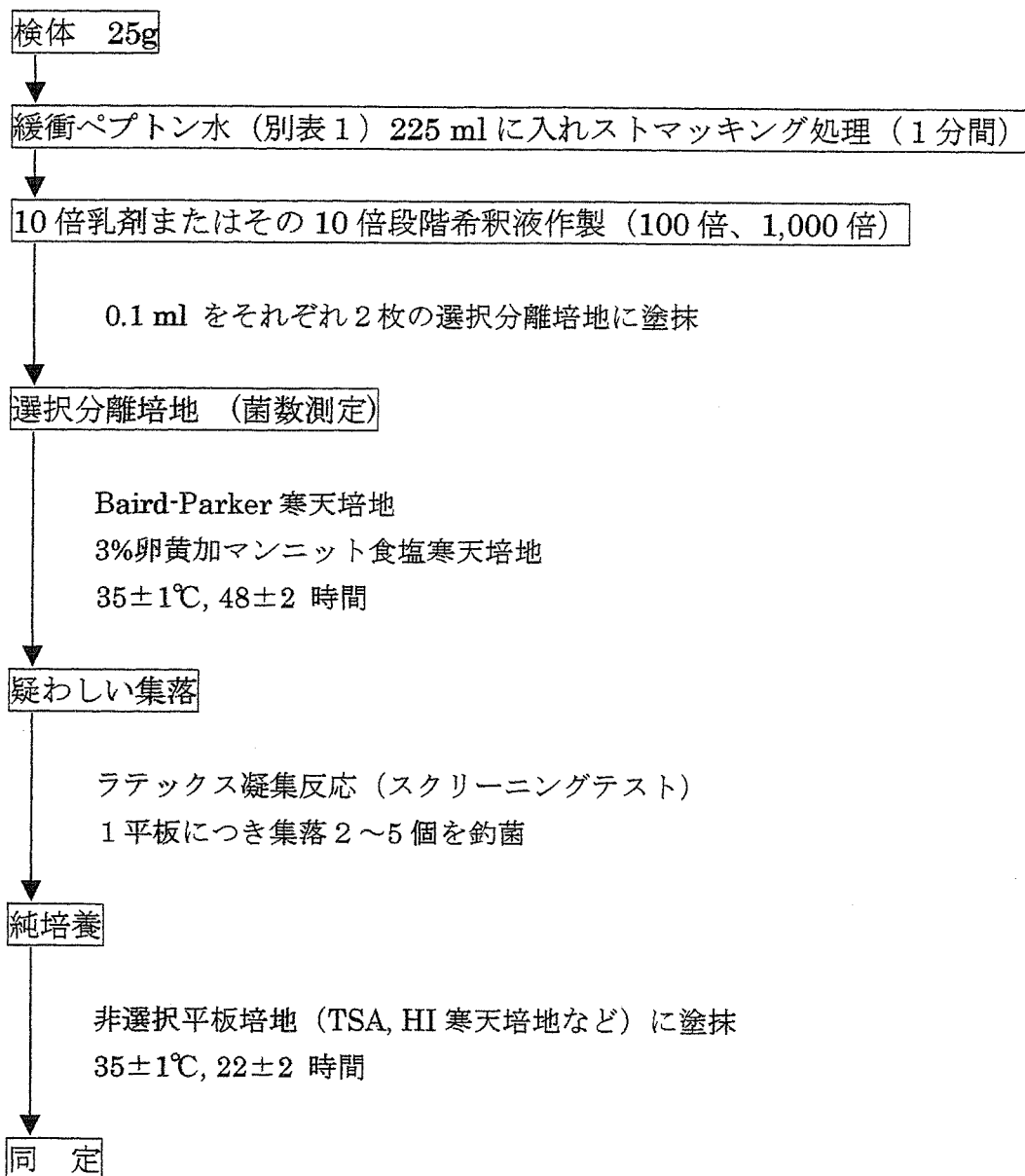
ものも陽性と判定する。

疑わしい反応が出た場合は、TSA、HI 寒天培地、普通寒天培地などで純培養した菌苔を、白金耳で少量とり、0.2~0.3 ml の BHI の入った小試験管に懸濁し、 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $22 \pm 2$  時間培養し、再試験を実施する。

なお、市販の黄色ブドウ球菌鑑別用キットであるラテックス凝集反応試薬を用いてもよい。この場合は、使用書に記載した方法で実施する。

グラム陽性の球菌、コアグラーゼ陽性であれば、黄色ブドウ球菌と同定してよい。必要に応じて、補助的試験（カタラーゼ試験、リゾスタフィン感受性試験、アセトイン産生試験、嫌気的条件下でのブドウ糖及びマンニットの発酵試験、耐熱性ヌクレアーゼ産生試験など）を実施する。

黄色ブドウ球菌の検査法・直接平板培養法（ステージ1：原案）



グラム染色

試験管法によるコアグララーゼ試験（別表2）

ラテックス凝集反応

**別表 1**

**Buffered peptone water (BPW) (緩衝ペプトン水) [M192]**

Peptone 10g  
NaCl 5 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (リン酸水素二ナトリウム) 3.5g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (リン酸二水素カリウム) 1.5g  
Distilled water 1,000 ml  
オートクレーブ 121℃, 15 分間  
pH 7.2±0.2

**別表 2**

**1. 試験管法によるコアグラゼ試験**

疑わしい集落

1 平板につき集落 2～5 個を釣菌

純培養

非選択平板培地 (TSA, HI 寒天培地など) に塗抹  
35±1℃, 22±2 時間  
純培養した集落を釣菌

0.2～0.3 ml の BHI broth 小試験管に懸濁

35±1℃, 22±2 時間

懸濁液の 1 白金耳量を非選択平板培地に斜面または画線培養 (コアグラゼ再試験用及び菌株保存用)

EDTA 添加ウサギ血漿 (市販の乾燥ウサギ血漿でも可) 0.5 ml を加える

35±1℃の恒温水槽またはフラン器で 24 時間まで培養・観察

完全凝固、部分凝固

コアグラゼ陽性と判定する

**2. ラテックス凝集反応**

市販のキットを使用する場合は、使用書に記載した方法で実施する。

黄色ブドウ球菌の検査法・選択増菌培養法（ステージ1：原案）

黄色ブドウ球菌の汚染菌数が少数と想定される食品，競合菌が多数含まれていると想定される食品，菌が損傷を受けていると想定される食品の検査に選択増菌培養法を用いる場合の検査法。

1. 検体の調製

直接平板培養法に準ずる。

2. 選択増菌培地

10倍乳剤またはその10倍段階希釈液を7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加TSBに接種する。35℃±1℃で、22±2時間培養する。

3. 選択分離培地

選択増菌培養液の1白金耳量を、Baird-Parker寒天培地または3%卵黄加マンニット食塩寒天培地に塗抹し、35±1℃で、48±2時間培養する。

4. 純培養

直接平板培養法に準ずる。

5. 同定

直接平板培養法に準ずる。

黄色ブドウ球菌の検査法・選択増菌培養法（ステージ1：原案）

検体 25g

緩衝ペプトン水(別表1)225 ml に入れストマッキング処理(1分間)

10倍乳剤またはその10倍段階希釈液作製(100倍、1,000倍)

7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加TSBに接種  
35±1℃, 22±2時間  
各培養試験管の1白金耳量を培地に塗抹

選択分離培地

Baird-Parker 寒天培地  
3%卵黄加マンニット食塩寒天培地  
35±1℃, 48±2時間

疑わしい集落

ラテックス凝集反応(スクリーニングテスト)  
1平板につき集落2~5個を釣菌

純培養

非選択平板培地(TSA, HI寒天培地など)  
35±1℃, 22±2時間

同定

グラム染色  
試験管法によるコアグララーゼ試験(別表2)  
ラテックス凝集反応



黄色ブドウ球菌の検査法・菌数測定法（ステージ1：原案）

黄色ブドウ球菌の汚染菌数が少数と想定される食品，競合菌が多数含まれていると想定される食品，菌が損傷を受けていると想定される食品の検査に MPN 法（3 本法）による選択増菌培養法を行う。

1. 検体の調製

直接平板培養法に準ずる。

3. 選択増菌培地（菌数測定）

10 倍乳剤および 10 倍段階希釈（100 倍、1,000 倍）液 1 ml を，それぞれ 7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加トリプトケースソイブロス（TSB）10 ml の入った中試験管 3 本ずつに接種する。

または 10 倍乳剤を 10 ml, 1 ml および 0.1 ml を，それぞれ 7.5%NaCl+1%ピルビン酸ナトリウム加 TSB（10 ml）の入った中試験管 3 本ずつに接種する。なお、検体試料 10 ml を接種する場合は 2 倍濃度の培地を用いる。これらの中試験管を 35℃±1℃で、22±2 時間培養する。

3. 選択分離培地

各中試験管の培養液の 1 白金耳量を、Baird-Parker 寒天培地または 3% 卵黄加マンニット食塩寒天培地に塗抹し、35±1℃で、48±2 時間培養する。

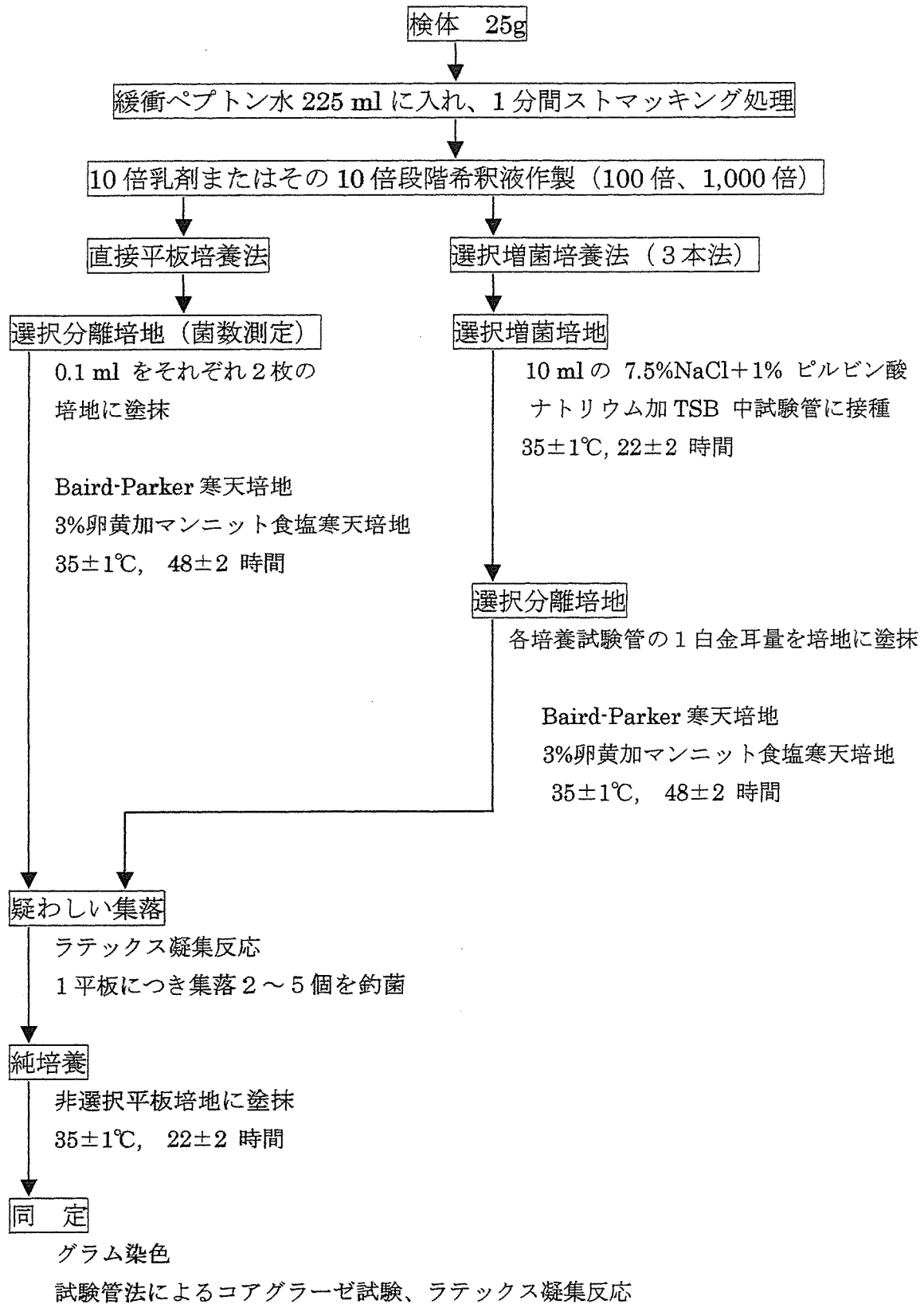
4. 純培養

直接平板培養法に準ずる。

5. 同定

直接平板培養法に準ずる。

黄色ブドウ球菌の検査法・菌数測定法（ステージ1：原案）



## II 分担研究報告

### II-3 腸炎ビブリオ検査法

分担研究者 甲斐明美

荒川英二

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」  
平成18年度 分担研究報告書

「食品を対象とした腸炎ビブリオ検査方法に関する研究」

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	荒川 英二	国立感染症研究所
協力研究者	八柳 潤	秋田県衛生科学研究所
	金子 誠二	東京都健康安全研究センター
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	下島優香子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：食品を対象とした腸炎ビブリオ検査方法の検討として、今年度は市販されている酵素基質寒天培地の有用性を検討した。その結果、本培地上に出現する腸炎ビブリオ様集落の色調には幅があるが、培養時間（14 時間以上）による色調の差が少ないこと、色調から他の菌の集落と区別がしやすいこと等、酵素基質培地の有用性が確認された。前年度の本研究で明確にした「腸炎ビブリオ検査の基本方針」をふまえ、現在厚生労働省から示されている告示法のうち、以下の点を改良することを提案する。①乳剤調整時の希釈液は BPW，②増菌培地は 1～2%食塩加アルカリペプトン水，③増菌培養の条件は 35±1℃，16～18 時間，④分離培地は TCBS 寒天培地または酵素基質培地が適当である。

A. 研究目的

現在、国内における食中毒起因菌の検査法は、厚生労働省から出された告示法、通知法や「食品衛生検査指針」等を参考に実施されている。しかし、これらの検査法は十分に議論されずに作成されたものが多いため、必ずし

も現在の現場に即しているとは限らず、問題点も多い。また、食品検査は、国外の標準法のような規格化されたプロトコールには従っておらず、国際的に認められた検査法も確立されていないのが現状である。

本分担研究では、食品を対象とした

腸炎ビブリオ検査方法について検討する。今年度は、腸炎ビブリオの新しい分離培地である酵素基質培地の有用性について検討する共に、現場に即した検査法を確立することを目的として、現在の告示法を基に検査法の改良を行い提案する。

## B. 研究方法

### 1. 酵素基質培地の有用性についての検討

現在、腸炎ビブリオの分離寒天培地としての酵素基質培地は、クロモアガービブリオ (OXOID) および X-VP 寒天 (日水製薬) が市販されている。

#### 1) 分離寒天培地上の腸炎ビブリオ様集落の同定

アサリ、カキ、赤貝等の貝類およびマグロ、アジ等の魚介類 109 件および海水 26 件の合計 135 件を供試した。これらの魚介類 10~25g に 10 倍量のアルカリペプトン水を加え 35℃~37℃、16~21 時間増菌培養後、クロモアガービブリオに塗抹分離した。またその一部は X-VP 寒天培地にも塗抹分離した。出現した赤紫色集落 (クロモアガービブリオ) および青~青緑色 (X-VP 寒天培地) について、1 検体あたり 5 集落を目安に釣菌し、それらが腸炎ビブリオであるか否かの同定を行った。

腸炎ビブリオの同定は、3%食塩加 TSI 寒天、3%食塩加 LIM 培地、1%食塩加 VP 半流動寒天および耐塩性 (NaCl, 0%, 3%, 8%) 試験によった。更に、*toxR* 遺伝子を標的とする

PCR 法でも確認した。

#### 2) 酵素基質培地上での腸炎ビブリオ集落の色調変化

魚介類から分離された腸炎ビブリオ 9 株および腸炎ビブリオではないが、クロモアガービブリオ寒天培地上で赤紫色を示す菌 1 株の合計 10 株をクロモアガービブリオに画線塗抹し、35℃および 37℃で 14 時間、18 時間および 24 時間培養後、色調の変化を観察した。

### 2. 告示法の改良

前年度の本研究において明確にした「食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法の基本方針」をもとに、現在、厚生労働省から出されている告示法の改良を行い、すべての検査法の基礎となり、迅速診断法等を検討する場合の比較対象となる方法である標準法を確立し、提案する。

## C. 研究結果

### 1. 酵素基質培地の有用性についての検討

#### 1) クロモアガービブリオ寒天培地上の腸炎ビブリオ集落様の同定

魚介類および海水をアルカリペプトン水で増菌培養後、クロモアガービブリオへ塗抹分離した。出現した腸炎ビブリオ様集落 (赤紫色) を釣菌し、生化学的性状あるいは PCR 法で腸炎ビブリオの同定を行った結果、361 集落中 341 集落 (94.5%) が腸炎ビブリオと同定された (表 1)。

次に、同じ赤紫色集落でも色や集落

の大きさに差が認められたため、単純に赤紫色だけを選択基準に釣菌した結果、腸炎ビブリオは158集落中107集落(67.7%)であった(表2)。

## 2) X-VP 寒天培地上の腸炎ビブリオの同定

上記増菌培養液をX-VP寒天上に分離し、腸炎ビブリオの同定を行った結果、104集落中101集落(97.1%)が腸炎ビブリオであった(表3)。

## 3) クロモアガービブリオ寒天上の腸炎ビブリオ集落の経時的色調変化

腸炎ビブリオ9株および類似菌1株をクロモアガービブリオ寒天に画線塗抹し、35℃および37℃で14~24時間培養し、色調の変化を観察した。その結果、35℃および37℃の培養温度による色調の差、あるいは14~24時間の培養時間による色調の差はほとんど認められなかった。しかし、同じ腸炎ビブリオと同定された菌株でも白っぽい赤紫色から濃い色まで集落の色調に差があることが確認された(図1)。

## 2. 告示法を基にした検査法の改良

### 1) 供試検体量

供試検体量としては現在、25gが日本の成分規格検査法やISO法で採用されている。食中毒検査では10g法、FDAでは50g法が用いられているが、サルモネラ作業部会や黄色ブドウ球菌作業部会の方向性として25g法が検討されていることや、現行法についても考慮した結果、腸炎ビブリオ検査法においても、検体量は25gが適当で

あると判断した。

乳剤の濃度については現行の10倍乳剤で良いのか、それとも濃厚液(3倍乳剤等)の方が良いのかは、今後検討する必要がある。

### 2) 腸炎ビブリオ菌数(最確数)測定の際の希釈液

現行法では食品にPBS(3%食塩)を加えてストマッキング処理して乳剤を調整する事となっている。しかし、サルモネラ等、他の検査のことを考慮するとBuffered Pepton Water(BPW)を用いた方が良いとの結論に達した。

### 3) 増菌培地

病原性株(溶血毒産生株)の検出には、2次、3次増菌培養をした方が良いという報告がある。しかし前年度の本研究において、一般食品検査法では、腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)を対象とし、必要以上に検査日数を要する検査は行わないという方向性を示した。現行法では増菌培地として「アルカリペプトン水」を用いることになっている。今回は、腸炎ビブリオを検査対象とすることから、腸炎ビブリオが発育するのに最も適した塩分を加え、「1~2%食塩加アルカリペプトン水」で増菌することが妥当であると考えた。

### 4) 培養条件

現在の告示法では、「37℃、一夜培養」となっており、培養時間が非常に曖昧な表記となっている。ビブリオ属菌の発育速度は他の腸管系病原菌と比較しても速いため、培養時間が長いと腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌

が多く発育してしまうため、目的菌の分離が非常に困難になる。また、TCBS寒天上の集落は、培養時間が長くなるに伴い糖分解が進み、集落の色調が変化してしまうことや、他のビブリオ属菌の集落が大きく発育してしまうため、目的菌の釣菌が困難になってしまう。これらのことから培養時間は、他の腸管系病原菌検出法より短い16～18時間が妥当であるとした。また培養温度については、現行の37℃ではなく、他の食品検査法と同様、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ に統一することとした。

#### 5) 分離培地

現在、分離培地としては主にTCBS寒天が使用されている。しかし近年、糖分解を指標としない新しい分離培地である酵素基質培地が市販されている。酵素基質培地は、主に腸管出血性大腸菌やサルモネラの分離に使用され、有効性が確認されている。腸炎ビブリオを対象にした酵素基質培地の有効性についても検討した結果、

①培養時間が長くなっても集落の色調があまり変化しないため、腸炎ビブリオ集落が分かりやすい

②他のビブリオ属菌と集落の色調が全く異なるので見つけやすい

という利点があることが確認された。そこで分離培地としては、現行の「TCBS寒天培地」から「TCBS寒天培地または酵素基質培地」とし、必要に応じてどちらの培地でも選択できる事が適当であると考えた。

#### D. 考察

比較的新しい分離培地である酵素基質培地の有用性について検討した結果、釣菌した361集落のうち341集落(94.5%)が腸炎ビブリオと同定された。培養時間による集落の色調変化を調べた結果、14～24時間まで、集落の色調に大きな変化は認められなかった。これらの結果から、腸炎ビブリオの分離培地としてクロモアガービブリオ寒天培地を使用することは非常に有用であることが確認された。しかし、同じ腸炎ビブリオでも菌株によって集落の色調に多少の差が認められたことから、集落の色調のみから腸炎ビブリオと同定することには問題がある。

前年度の本研究で策定した「腸炎ビブリオ検査の基本方針」をもとに、現在示されている告示法の改良を行い、標準法を検討中である。その際、腸炎ビブリオ検査法も、サルモネラ作業部会や黄色ブドウ球菌作業部会が提案する検査法と調和を図ることが必要である。腸炎ビブリオ検査法では特に、10倍乳剤調整用の希釈液や培養温度等について統一する方向で検討中である。

#### E. 結論

市販されている酵素基質培地の有用性を検討した結果、腸炎ビブリオ様集落の色調には幅があるが、培養時間(14時間以上)による色調の差が少ないこと、色調から他の菌の集落と区別がしやすいこと等、酵素基質培地の有用性が確認された。

前年度の本研究で明確にした「腸炎ビブリオ検査の基本方針」をふまえ、現在厚生労働省から示されている告示法の改良について検討した。主な改良点は以下のとおりである。

①乳剤調整時の希釈液：BPW

②増菌培地：1～2%食塩加アルカリペプトン水

③増菌培養の条件：35±1℃，16～18時間

④分離培地：TCBS 寒天培地または酵素基質培地

#### F. 健康危機情報

夏期には腸炎ビブリオ食中毒が多く発生するため、本菌の検査法を確立することは、食中毒予防のためにも重要である。

#### G. 研究発表

〈発表論文〉

尾畑浩魅，下島優香子，小西典子，門間千枝，矢野一好，甲斐明美，諸角聖，福山正文：腸炎ビブリオ食中毒事例における PCR 法を用いた食品からの耐熱性溶血毒 (TDH) 産生菌の分離，日本感染症学雑誌，80：383－390，2006.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし



表1 クロモアガービリオ寒天培地上の  
腸炎ビブリオ様集落の同定

食品	検査地域	供試 食品数	赤紫集落 (+) 食品数	供試 集落数	腸炎ビブリオ 同定集落数	(%)
魚介類	秋田	14	11	53	53	(100)
	東京	51	24	55	52	(95.5)
	静岡	40	26	95	94	(98.9)
	大分	4	4	26	24	(92.3)
海水	富山	20	20	56	55	(98.2)
	大分	6	6	76	63	(82.9)
		135	91	361	341	(94.5)

表2 クロモアガービブリオ寒天培地上の赤紫集落の同定

食品	検査地域	供試食品数	赤紫集落(+) 食品数	供試集落数	腸炎ビブリオ 同定集落数	(%)
魚介類	東京	51	24	63	52	(82.5)
海水	富山	20	20	95	55	(57.9)
	合計	71	44	158	107	(67.7)

表3 X-VP寒天培地上の青色集落の同定

食品	供試 食品数	青色集落 (+) 食品数	供試 集落数	腸炎ビブリオ 同定集落数	(%)
あさり	26	24	104	101	(97.1)

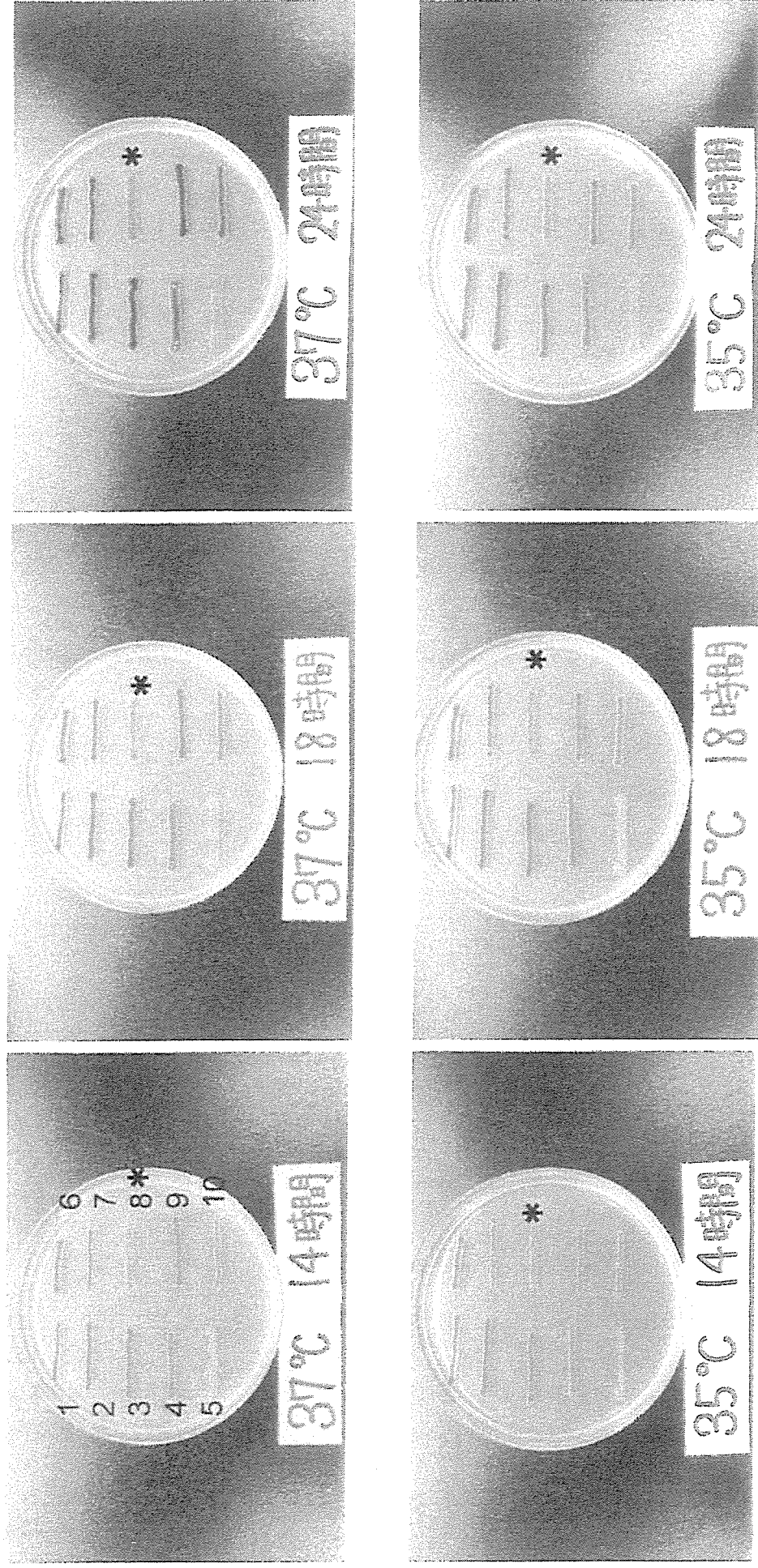


図1. クロモアガービブリオ寒天上の腸炎ビブリオ集落の経時的色調変化

- No.1～7, No.9～10: 腸炎ビブリオ
- No.5: やや白いがTCBS寒天上では腸炎ビブリオ様集落
- No.8: 腸炎ビブリオではない(TCBS寒天上では腸炎ビブリオ様集落)