

目 次

9. コラボ試験の目的

10. 参考引用規格

11. 実施予定試験所数

12. 試験方法

13. 試験検体

14. 試験菌株

15. 菌接種試料の調製

16. 試料の輸送

9. 試験

10. 試験試料の処理方法

11. 結果の提示

12. 統計

別添 黄色ブドウ球菌の試験法・MPN法による菌数測定法

(ステージ3：コラボ案) NIHSJ-05-ST3

1. コラボ試験の目的

食品流通経済のグローバル化にある現状を背景として、国際的に互換性のある試験を行うことは重要であり、このような観点からわが国における食品微生物試験法の見直しを行い、信頼性の高い試験法について検討を行ってきた。本コラボ試験においては、黄色ブドウ球菌試験法について検証を行うことを目的とする。本試験においては以下の再現性を確認することを目的とする。

- ①室内再現性 (Repeatability)
- ②室間再現性 (Reproducibility)

1.2. 参考引用規格

国際的に通用する検証を実施するために、コラボの国際規格である ISO16140 に準拠し、また、ISO の考え方を取り入れている AOAC 法のコラボレートスタディーの実施例を参照し実行する。

1.3. 実施予定試験所数

10ヶ所程度で実施予定

1.4. 試験方法

以下の試験法について、使用培地等試験法詳細を特定して検査を行い、それぞれの妥当性を検証する。

MPN 法による菌数測定

1.5. 試験検体

本試験において、SIC コードに基づき、どのカテゴリーに対して検証するか決定する。黄色ブドウ球菌による危害の可能性が高い食材を用いて試験を行う。食品検体は食肉 1 種類につき行う。

1.6. 試験菌株

本試験では 2 種類の菌株を使用する。

1.7. 菌接種試料の調製

スパイクによる 2 段階の菌量レベルを検討する。菌液濃度は

- ① 100-999 CFU / g × 6 サンプル
- ② 10-99 CFU / g × 6 サンプル
- ③ 非スパイク試料 × 6 サンプル

18. 試料の輸送

アイスパックで7℃以下(冷蔵)に保って輸送し、各試験室に到着後は当該菌の増殖しない2-7℃で冷蔵保存。温度記録をとる。

19. 試験

別添のプロトコールによる。Baird-Parker 寒天培地と3%卵黄加マンニット食塩寒天培地を併用する
試験は、試料が到着後、速やかに開始する。

20. 試験試料の処理方法

- ⑤ 試料の包装表面をアルコール綿で拭く。
 - ⑥ 滅菌したピンセット、ハサミを用い、包装を開く。
 - ⑦ 試料 10 g をストマッカー袋に入れる。
 - ⑧ 希釈液 90 ml を加え、1 分間ストマッキングして、10 倍乳剤とする。
- 注：コラボでは、試料をストマッカー袋で配布予定のため、①～③は省略

21. 結果の提示

試験結果は、MPN 法による菌数測定を行い、MPN 値を示し、生データと共に解析担当者に提出する。

12. 統計

すべての生データを、解析担当者が集め、統計解析を行う。

別添. 黄色ブドウ球菌の試験法・MPN法による菌数測定法

(ステージ3：コラボ案) NIHSJ-05-ST3

1. 黄色ブドウ球菌の定義

直接平板培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

2. 試験の概要

本試験は、一定量の試料中にどの程度の黄色ブドウ球菌が存在するかをMPN法により定量する定量試験である。試料を秤量し、その9倍量の7.5%NaCl および1%ピルビン酸ナトリウム加TSBを加え、10倍乳剤を作製する。10倍乳剤を10 ml 空の滅菌中試験管3本に、その1 ml、0.1 ml および0.01 ml (あるいは10倍乳剤の階段希釈液1 ml ずつ) を7.5% NaCl および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。これらの中試験管を一晩培養し、選択分離培地で黄色ブドウ球菌の集落形成を確認し、MPN換算表にてMPN値を算出する。

3. 使用機器、器具

直接平板培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

4. 選択増菌培養法における菌数測定 (表1)

選択増菌培養法においてはMPN法 (3本法) による菌数測定を行う。

4-1 検体の調製

試料を秤量し、その9倍量の7.5%NaCl および1%ピルビン酸ナトリウム加TSBを加え、10倍乳剤を作製する。

4-2 選択増菌培地

10倍乳剤を10 ml 空の滅菌中試験管3本に、その1 ml、0.1 ml および0.01 ml を7.5%NaCl および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。

これらの中試験管を $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 22 ± 2 時間培養する。

4-3 選択分離培地

選択分離培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

4-4 純培養

直接平板培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

4-5 同定

直接平板培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

4-6 判定

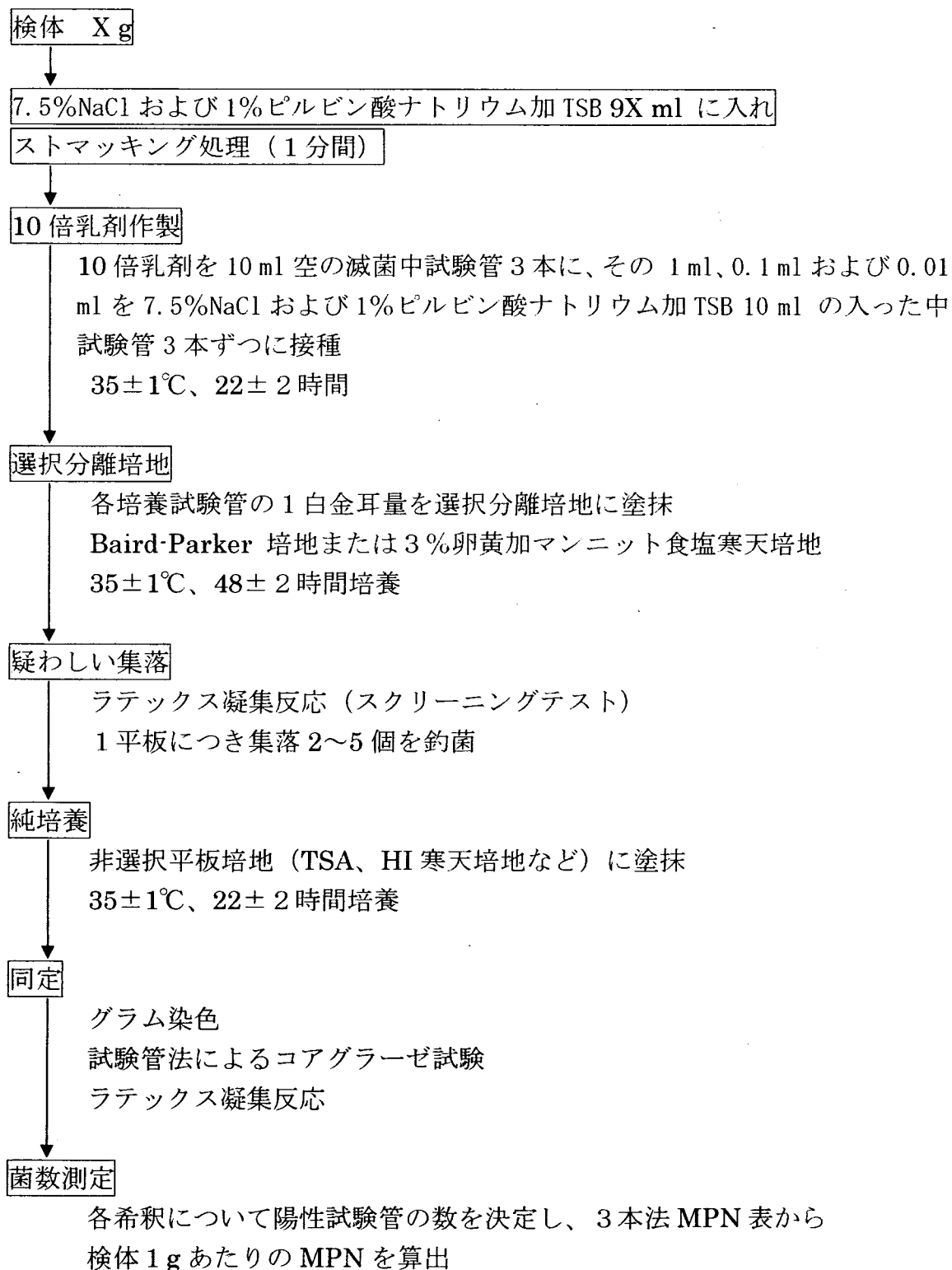
各希釈における黄色ブドウ球菌陽性の試験管数をかぞえ、算出範囲内にある3段階について3本法 MPN 表から係数を求め、検体試料 1 g あたりの MPN を算出する。

5. 希釈液、培地、試薬

直接平板培養法 (NIHSJ-03-ST3) に準ずる。

表 1

黄色ブドウ球菌の検査法・MPN 法による菌数測定法 (MPN 3 本法)



添付資料

希釈液、培地および試薬の組成と調製

1. 選択増菌培地

市販のトリプトケースソイブロス (TSB) を基礎培地として、これに 7.5%NaCl および 1%ピルビン酸ナトリウムとなるよう添加して用いる。

2. Baird-Parker 寒天培地

2-1 基礎培地

組成

カゼイン胨消化物 (Tryptone)	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
肉エキス	5.0 g
ピルビン酸ナトリウム	10.0 g
L-グリシン	12.0 g
塩化リチウム	5.0 g
カンテン (ゲル強度により)	12 ~ 22 g
精製水 (最終)	1,000 ml
pH 7.2 ± 0.2	

市販品 Oxoid CM0275 など

2-2 亜テルル酸カリウム溶液 (1%) Potassium tellurite solution

組成

K ₂ TeO ₃	1.0 g
精製水	100 ml

溶解 (微加熱可) 後、0.22 μm フィルターにてろ過滅菌、4℃で1ヶ月まで保存可

市販品 Oxoid SR030 (3.5%溶液) など

2-3 卵黄液 (20%) Egg yolk emulsion

新鮮卵で卵殻に傷のないものを選び、洗剤でブラシ洗浄する。流水で水洗後、70%エタノールに30秒間浸漬後に風乾するか、あるいはエタノールを噴霧後に火炎滅菌する。無菌的に割卵して卵白を除去する。この場合、市販のステンレス製の黄身取り器を滅菌して使用すると容易である。卵黄を滅菌した広口びん (希釈びん等) に入れ、4倍量の無菌精製水を加え、例えば滅菌ガラス棒を用いてエマルジョンを作製する。保存する場合は4℃で、3日以内に使用する。

(注) 基礎培地に卵黄液を加えて混合すると泡立つが、市販のステンレス製連続分注器を使用すれば、平板作製時に泡を消す手間が省ける。

市販品 Oxoid SR047 (30%溶液) など

2-4 スルファメサジン (スルファジミジン) 溶液 (0.2%)

Sulfamezathine (sulfamethazine, sulfadimidine)

プロテウス *Proteus* による汚染がある時にのみ使用可。

組成

スルファメサジン	0.2 g
NaOH 0.1M	10 ml
精製水	90 ml

溶解後、0.22 μ m フィルターにてろ過滅菌、4°Cで1ヶ月まで保存可

2-5 培地調製

組成

基礎培地	100 ml
亜テルル酸溶液 (最終 0.01%)	1.0 ml
卵黄液	5.0 ml
(スルファメサジン溶液 2.5 ml)	

基礎培地を 121°C 15 分間オートクレーブした後約 50°C に保温。亜テルル酸カリウム溶液、卵黄液を加え、90 mm シャーレに 20~25 ml 分注 (>4 mm 厚)。組成中市販品使用の時は使用書にあるとおり所定濃度にて調整する (卵黄最終 1.5% などが異なる)。

4°C で保存 1 日までとする (自家製の場合は、培地性能が低下しないことを確認した期間内であればこの限りではない)。

使用前に寒天乾燥 (25~50°C、培地表面の水滴が消えるまで)。

市販生培地の使用を可とする。ただし、市販の生培地については、業者の示す使用期限を越えないように冷蔵で保存する。

4. 3%卵黄加マンニット食塩寒天培地

3-1 基礎培地

組成

肉エキス	1 g
ペプトン	10 g
NaCl	75 g
マンニット	10 g
カンテン	15 g
フェノールレッド (0.2%溶液)	12 ml
精製水 (最終)	850 ml
pH 7.4 ± 0.2	

市販品 ニッスイ、栄研など

3-2 培地調製

基礎培地を 121°C 15 分間オートクレーブした後、卵黄液 (2-3) を 150 ml 加えて混合、シャーレに分注、固めた後乾燥して用いる。

市販の 30% 卵黄液を用いる時は基礎培地量を 900 ml とし、卵黄液 100 ml を添加する。

市販生培地の使用を可とする。

4. コアグラージェ試験用ウサギ血漿

ウサギ血漿は市販の乾燥ウサギ血漿を使用書のとおり希釈して用いる。あるいは新鮮ウサギ血漿を 3 倍量の滅菌精製水を用いて希釈したものをを用いてもよいが、凝固防止剤にクエン酸塩を用いた場合は EDTA を 0.1% 加えて使用する。

II-3 腸炎ビブリオ試験法

1) 腸炎ビブリオ試験法

甲斐明美

荒川英二

2) PCR での検討

荒川英二

宮原美知子

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19年度 分担研究報告書

「食品を対象とした腸炎ビブリオ試験方法に関する研究」

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
	下島優香子	東京都健康安全研究センター
	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

研究要旨：食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法として、今年度は腸炎ビブリオの同定法について検討した。同定に用いる培地、TSI 寒天、LIM 培地、VP 半流動培地の食塩濃度を1%と2%で検討した結果、腸炎ビブリオの発育は2%の方がやや旺盛であったが、判定成績は同一であり、いずれの食塩濃度も使用可能であることが確認された。

前年度までに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培養温度は37℃から35±1℃、②増菌培養時間は1夜から16～18時間、③リジン脱炭酸試験の培養時間は、リジン単味試験の1～4日からLIM培地18～24時間、④分離培地に酵素基質培地を追加、⑤耐塩性試験は食塩濃度0、3、8、10%から0、8%、⑥増菌培地のアルカリペプトン水の食塩濃度は2%（1%も可）、⑦同定培地であるTSI寒天、LIM培地、VP半流動培地の食塩濃度は2%（1%も可）が適当である。これらの成績に基づき、標準法の作業部会案を提案した（資料）。

更に、検査時間を短縮するために、腸炎ビブリオの迅速同定法として、PCR法を検討した結果、感度は問題ないが、特異性については更に検討が必要であることが示唆された。

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確認培地である TSI 寒天培地、LIM 培地、VP 半流動培地の食塩濃度を検討すると共に、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提案する。また、検査時間を短縮するために、腸炎ビブリオの迅速同定として PCR 法を検討する。

B. 研究方法

1. 培養法の検討

現行の告示法では、腸炎ビブリオの同定は、腸炎ビブリオと推定される集落について、糖分解試験、耐塩性試験、VP 試験、リジン脱炭酸試験を行い同定している。糖分解試験に使用する TSI 寒天、リジン脱炭酸試験に使用する LIM 培地、VP 試験に使用される VP 半流動培地の食塩濃度は 1%とされていたが、腸炎ビブリオの最適食塩濃度が 3%であることから、食塩濃度が

1%と2%の培地をそれぞれ作成し、菌の発育とそれぞれの反応成績を5施設で比較検討する。

供試菌株は、食品、環境、ヒトから分離された腸炎ビブリオ菌株計330株である。

2. 腸炎ビブリオの迅速同定法としての PCR 法の検討

腸炎ビブリオを特異的に検出する遺伝子検査を応用した診断用試薬、すなわち PCR 法に用いるプライマーは、市販されていない。研究的に報告されているプライマーの内、*toxR* (Kim *et al.*, JCM 37, 1173-1177, 1999) と LDH (石橋ら, 大阪府立公衛研所報, 食品衛生編 23, 67-71, 1992) が研究レベルで使用されることが多い。しかしこれらのプライマーには非特異反応等の問題点も指摘されている。今回、腸炎ビブリオと *V. alginolyticus* の *toxR* 遺伝子をシーケンスして配列を決定し、腸炎ビブリオを特異的に検出するプライマー *toxRn* を作製した (本報告書中、分担研究者 荒川らの報告参照)。

1) 特異性の検討

食品、環境、ヒトから分離された腸炎ビブリオ621株、その他ビブリオ属菌および類縁菌473株について *toxRn* を用いて PCR 反応 (94°C30秒, 63°C30秒, 72°C30秒を30サイクル, 72°C7分を1サイクル) を行い、特異性を検討した。

2) PCR 法による検出感度の検討

腸炎ビブリオ菌株 V89-056 (東京都健康安全研究センター分離株, ヒト由来) を 3% 食塩加 TSB で培養し, ペプトン加生理食塩水で 10 倍段階希釈した。それぞれの希釈液から DNA をアルカリ抽出して, プライマー *toxRn*, *toxR* および LDH を用いて PCR を行い, 感度を比較した (n=2)。菌数は 3% 食塩加フツウ寒天にて測定した。

C. 研究結果

1. 培養法の検討

1) 培養温度

培養温度は, サルモネラや黄色ブドウ球菌の培養温度と統一するために, 現行の 37°C から, 35±1°C に変更することとした。この温度変更は, 腸炎ビブリオの発育に影響を及ぼさないことを確認した。

2) 培養時間

現在の告示法では, 「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, 目的菌の釣菌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。これらのことから培養時間は, 他の腸管系病原菌の培養時間よりやや短い 16~18 時間が妥当であるとされた。

3) リジン脱炭酸試験の培養時間

告示法ではリジン単味試験で 1~4 日となっている。しかし, 実際の検査の場で, リジン単味試験が行われることはほとんどなく, 大部分の施設で LIM 培地が使用されている。また, 腸炎ビブリオ検査において, LIM 培地を使用しても問題は全くないことから, 本試験は, LIM 培地で行い, 培養時間は, 18~24 時間と変更することにした。

4) 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。腸炎ビブリオを対象にした酵素基質培地について昨年度検討した結果, 有効性が確認されたので, 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結論した。

5) 耐塩性試験

現行の告示法では, 食塩濃度 0, 3, 8, 10% で発育を確認することになっているが, 意義の大きい 0, 8% の 2 種類の濃度に変更した。

基礎培地は Nutrient Broth 以外にも, ペプトン水またはトリプトン水 (pH7.2) を使用しても差し支えないとした。これらの培地については, 腸炎ビブリオ標準菌株を用いて 0% で発育しないこと, 8% で発育すること

を確認した。

6) 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、本研究において、「一般食品検査法では、病原株・非病原株を問わず、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ている。

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。本試験法では、腸炎ビブリオを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、「2%食塩加アルカリペプトン水（1%食塩濃度も可）」で増菌することが妥当であると考えた。

7) 確認培地の食塩濃度の検討

腸炎ビブリオの確認培地として使用するTSI寒天、LIM培地、VP半流動寒天培地の食塩濃度について5施設でそれぞれ検討した結果、供試した腸炎ビブリオ330株の成績は、全株共、食塩濃度1%、2%でいずれも同一であった。発育は2%の方がやや旺盛であったが、成績に差異は認められなかった（表1）。

以上の成績から、上記確認培地の食塩濃度は2%（1%も可）に変更した。

2. 腸炎ビブリオの迅速同定法としてのPCR法の検討

1) 各種プライマーの特異性の検討

3種類のプライマー *toxRn*、*toxR*、LDHの特異性を、それぞれ5施設(A, B, C, D, E)で検討した。

A施設では、腸炎ビブリオ105株、それ以外のビブリオ属菌5菌種14株を対象に、プライマー *toxRn* とLDHで比較検討した結果、これらのプライマーには、腸炎ビブリオのみが反応し、それ以外の菌株は反応しないことを確認した（表2）。

B施設では、3種類のプライマー *toxRn*、*toxR*、LDHの特異性を検討した結果、腸炎ビブリオはいずれのプライマーも189株のうち188株(99.5%)を検出した。*V. alginolyticus* 菌株では、105株のうち、プライマー *toxRn*、*toxR* では4株が陽性となる非特異反応が認められたが、LDHでは全て陰性であった。その他ビブリオ属菌4菌種48株はいずれのプライマーも陰性であった（表3）。

C施設では、腸炎ビブリオ100株(17血清型菌)、それ以外のビブリオ属菌5菌種54株を対象に、プライマー *toxRn* と *toxR* で比較検討した結果、これらのプライマーには、腸炎ビブリオのみが反応し、それ以外の菌株は反応しないことを確認した（表4）。検討した株の中には、TCBS寒天上で腸炎ビブリオに非常に酷似した集落をつくり、生化学的性状も類似するため、その判別が重要な *Vibrio vulnificus* の01, 3, 4, 5, 6, 7群を含む34株が含まれている（表5）。

D施設では、腸炎ビブリオ144株、それ以外のビブリオ属菌13菌種、及

び類似菌を含めて合計124株を対象に、プライマー *toxRn* と *toxR* で比較検討した。その結果、腸炎ビブリオでは、プライマー *toxRn* で環境由来の1株、*toxR* で、環境由来の2株が反応しなかった。これら反応しなかった菌株は、遺伝子レベルで腸炎ビブリオと同定した菌株であった。腸炎ビブリオ以外の菌では、*Vibrio* sp. 等の5株がいずれのプライマーとも反応した(表6)。

E施設では、腸炎ビブリオ83株、それ以外のビブリオ属菌4菌種104株、*Aeromonas* 3株、その他21株を対象に、プライマー *toxRn* と LDH で比較検討した結果、これらのプライマーは、腸炎ビブリオには全株が陽性を示した。プライマー *toxRn* は、腸炎ビブリオ以外の株では陰性を示したが、LDH は、*V. alginolyticus* の3株で陽性となった(表7)。

以上、本研究班で開発した *toxRn* の特異性の検討の成績をまとめると、本プライマーで腸炎ビブリオ菌株621株のうち619株(99.7%)が陽性を示した。検出出来なかった菌株は、いずれも環境由来株であった。一方、その他のビブリオ属菌473株では9株(1.9%)が陽性となる非特異反応が確認された(表8)。非特異反応の認められた菌株は、*V. alginolyticus* 4株、同定できなかった環境由来の *vibrio* 属菌等5株であった。これらの菌株は、プライマー *toxR* でも同様の反応が認められており、さらに検討が必要である。

2) 各種プライマーの検出感度

3種類のプライマー *toxRn* , *toxR* , LDH 感度を検討した結果、*toxRn* は腸炎ビブリオ菌数 8.2×10^4 (cfu/ml) 以上では2件とも検出した。 8.2×10^3 (cfu/ml) では2件のうち1件を検出した。 8.2×10^2 (cfu/ml) は検出できなかった。*toxR* , LDH は 8.2×10^2 (cfu/ml) まで2件とも検出した(表9)。

D. 考察

前年度までに本研究で策定した「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、標準法の作業部会案を提案した(資料)。その際、腸炎ビブリオ試験法も、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試験法と調和を図ることが必要である。特に、培養温度等について統一を図った。

次に、腸炎ビブリオの迅速同定法として、分担研究者の荒川が開発したプライマー *toxRn* を用いたPCR法について検討を行った。*toxRn* は腸炎ビブリオを特異的に検出したが、621株のうち2株を検出できなかった。その株は環境の拭き取り検体由来株で、血清型は010:KUTであったが、010の凝集は弱かった。他の1株も環境由来株であった。その他のビブリオ属菌473株のうち9株が陽性となったが、そのうち4株は *V. alginolyticus* であった。*V. alginolyticus* は腸炎ビブリオと塩基配列の相同性が非常に高いと報告されており、株によっては稀に *toxR*

遺伝子内に設計したプライマーによって非特異的に検出されてしまうことが示唆された。

特異性について *toxRn*, *toxR* および LDH の 3 種類のプライマーで検討した結果、今回の検討では *toxRn* と *toxR* では *V. alginolyticus* 105 株中 4 株が陽性となったが、LDH では陰性となった。しかし、*toxRn* と LDH で比較検討した際には、食品由来の *V. alginolyticus* で *toxRn* では陰性であるが LDH では陽性になってしまう株もあり、いずれのプライマーも *V. alginolyticus* をはじめとするビブリオ属菌を非特異的に検出してしまう可能性があることが示唆された。

既に報告されて研究的に広く使用されている腸炎ビブリオ検出用プライマー *toxR*, LDH と比較検討した結果、感度は *toxRn* がやや劣る傾向にあったが、いずれのプライマーも 1×10^4 程度まで検出することができたので、菌の同定には、全く問題のないことが判明した。また、増菌培養液からのスクリーニング試験にも導入可能な感度と考えられる。

E. 結論

前年度までに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、以下の点を改良した作業部会案を提案した。①培養温度は 37℃ から $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、②増菌培養時間は 1 夜から 16~18 時間、③リジン脱炭酸試験の培養時間は、リジン単味試験

の 1~4 日から LIM 半流動培地 18~24 時間、④分離培地に酵素基質培地を追加、⑤耐塩性試験は食塩濃度 0, 3, 8, 10% から 0, 8%, ⑥増菌培地のアルカリペプトン水の食塩濃度は 2% (1% も可)、⑦確認培地である TSI 寒天、LIM 培地、VP 半流動培地の食塩濃度は 2% (1% も可) が適当である。これらの成績に基づき、標準法の作業部会案を提案した (資料)。

更に、検査時間を短縮するために、腸炎ビブリオの迅速同定に PCR 法を応用することを検討した。PCR 法の感度には問題ないが、特異性については更に検討が必要であることが示唆された。

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〉
準備中

H. 知的所有権の取得状況

なし

表1 確認培地の食塩濃度の検討

施設	供試 菌株数	食塩濃度1%		食塩濃度2%		食塩濃度*による 判定結果の差異
		発育	判定	発育	判定	
A	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
B	100	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
C	80	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
D	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し
E	50	++ ~ +++	可能	+++	可能	無し

供試確認培地: TSI寒天、LIM培地、VP半流動寒天培地

* 1% および 2%

資料 1

A. 腸炎ビブリオ試験法・定性法(作業部会案:ステージ 2)

1. 試験方法

検体 25g に 2%NaCl 加アルカリペプトン水 (pH8.6~8.8, NaCl 1%も可) (APW) 225ml を入れ、ストマッキング処理した試料を、35±1℃、16~18 時間培養後、上層の 1~2 白金耳を TCBS 寒天培地、または酵素基質培地に塗抹し、35±1℃、16~18 時間培養する。出現した培地上の腸炎ビブリオと推定される集落を同定する。

なお、市販のアルカリペプトン水に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

2. 同定

腸炎ビブリオと推定される集落については普通寒天斜面、TSI 寒天、LIM 培地に接種し、35±1℃で 18~24 時間培養後、TSI 寒天および LIM 培地の性状が表 1 に一致した場合は、更に耐塩性試験、VP 試験およびオキシダーゼ試験を行う。表 1 に示した性状と一致したものを腸炎ビブリオと同定する。

① 普通寒天斜面培地

普通寒天斜面培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、35±1℃で 18~24 時間培養する。

普通寒天斜面培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	5g	塩化ナトリウム	20g
ペプトン	10g	寒天	15g
		pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の普通寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

② TSI 寒天による試験

TSI 寒天培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、35±1℃で 18~24 時間培養後、斜面部の黄変により乳糖及び白糖の分解性を、高層部の黄変によりブドウ糖の分解性を、高層部の黒変により硫化水素の産生性を、高層部の気泡又は亀裂によりガス産生性を確認する。

TSI 寒天培地 (2%NaCl 加)

肉エキス	3g	クエン酸鉄アンモニウム	0.2g
酵母エキス	3g	チオ硫酸ナトリウム	0.2g
ペプトン	20g	フェノールレッド	24mg
乳糖	10g	寒天	12g
白糖	10g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	1g		
塩化ナトリウム	20g	pH	7.3

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、半斜面培地とする。

なお、市販の TSI 寒天に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

③ LIM 培地による試験

LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を高層部に穿刺し、35±1℃で 18~24 時間培養後、培地の色が濃い紫色になったものをリジン陽性とする。また、高層部に菌が発育し混濁の認められたものを、運動性陽性とする。さらに、インドール試薬を加えて5分以内に赤色したものを陽性とする。

LIM 培地 (2%NaCl 加)

ペプトン	10g	塩化ナトリウム	20g
酵母エキス	3g	プロムクレゾールパープル	20mg
ブドウ糖	1g	寒天	3g
L-リジン塩酸塩	10g	精製水	1,000ml
L-トリプトファン	0.5g	pH	6.7

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧滅菌を行い、高層培地とする。

なお、市販の LIM 培地に塩化ナトリウムを最終濃度 1~2%になるように加えたものを使用してもよい。

インドール試薬には、Kovac 法と Ehrlich 法があるが、どちらを使用しても差し支えない。Kovac 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 5g を 50℃の水浴中でアミルアルコール 75ml に溶かし、冷やしてから濃塩酸 25ml を加えて作り、遮光して 4℃に保存する。Ehrlich 試薬は、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 1g をエタノール 95ml に溶かし、これに濃塩酸 20ml を加えて作る。

④ 耐塩性試験

Nutrient Broth (Difco, Merck, BBL: 肉エキス 0.3%、ペプトン 0.5%) 又は Lab-Lemco Broth (Oxoid) に塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および 8%加えたものに、腸炎ビブリオと

推定される菌を接種し、35±1℃で18時間培養し、明瞭な増殖による培地の濁りを確認する。

また、上記 Broth 以外にペプトン水又はトリプトン水 (pH7.2) に、塩化ナトリウムをそれぞれ 0%および8%加えたものを使用しても差し支えないが、使用にあたっては腸炎ビブリオ標準菌株を用い、0%で発育しないこと、8%で発育することを確認した後、使用すること。

なお、本試験に際して接種する菌は、普通寒天培地の菌を用い、接種菌量は希釈により濁りが目に見えない程度の少菌量を接種すること。

⑤ Voges-Proskauer (VP) 試験

VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度が 1~2%になるように加えたものに、腸炎ビブリオと推定される集落を接種し、35±1℃で18~24時間培養後、その上層部に6% α-ナフトール・アルコール液 0.2ml 及び 0.3%クレアチン加 40%水酸化カリウム水溶液 0.1ml を加え、1時間以内に赤色あるいは深紅色となったものを陽性とする。

VP 半流動培地 (2%NaCl 加)

酵母エキス	1g	塩化ナトリウム	20g
カゼインペプトン	7g	寒天	3g
ソイペプトン	5g	精製水	1,000ml
ブドウ糖	10g	pH	7.0

加温溶解し、試験管に分注した後、高圧蒸気滅菌を行う。

なお、市販の VP 半流動培地に塩化ナトリウムを最終濃度 2%になるように加えたものを使用してもよい。

⑥ チトクローム・オキシダーゼ試験

1 w/v %テトラメチル *p*-フェニルジアミン蒸留水液を染みこませたろ紙をシャーレ内に置き、ろ紙に白金耳 (白金製) で普通寒天培地上の菌を塗布する。10秒以内に紫色に変色すれば陽性である。

なお、市販のチトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙を使用してもよい。市販の試験用ろ紙に精製水を数滴滴下し、ろ紙全体を湿らせた後、普通寒天培地上の菌を白金耳で塗布する。