

平成 25 年度 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業  
食品中の微生物試験及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

分担課題名 腸炎ビブリオ試験法

研究分担者：甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者：小西 典子 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

下島 優香子 東京都健康安全研究センター

仲真 晶子 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の標準試験法を作成することを目的として、15 検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品 25 g 中腸炎ビブリオ菌数が 10 個台であれば 100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2 種類）と酵素基質培地（3 種類）の 5 種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

#### A. 研究目的

食品を対象とした腸炎ビブリオの標準試験法を作成することを目的として、これまでに増菌培地や確認培地等に添加する食塩濃度、培養温度、培養時間、また選択分離培地等に関する事項について検討を行ってきた。そしてこれらの結果を踏まえ、新しい試験法の提案を行った（提案法）。

一方、食品を対象とした国際的な試験法として ISO 法が示されている。提案法を日本の標準法とするためには ISO 法と同等あるいはそれ以上の精度であることを確認する必要がある。前年度は、提案法と ISO 法で腸炎ビブリオ検出率の比較実験を行った。

その結果、提案法での腸炎ビブリオ検出率は ISO 法と同等、あるいは同等以上であることが確認できた。今年度は、模擬検体を用いて複数検査機関で腸炎ビブリオの検出を試み、提案法の評価を行った（コラボレイティブ・スタディ）。

#### B. 研究方法

##### 1. 検査実施機関

地方衛生研究所をはじめとした食品検査実施機関合計 15 箇所を検査を 2 回に分けて実施した。第 1 回目は 2013 年 12 月 16 日～20 日、第 2 回目は 2014 年 1 月 20～24 日に実施した。

## 2. 供試菌株および食品

食中毒患者から分離された病原毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性の腸炎ビブリオ 1 株 (血清型 O3 : K6, V12-10) を供試した。食品は、市販の「あさりのむき身 (冷凍品)」を用いた。

## 3. 模擬検体の作製法

「あさりのむき身」は、解凍後、流水で 1 回洗浄して滅菌済みストマッカー袋に 25 g ずつ秤量した。

食品へ接種するための腸炎ビブリオは、2%NaCl 加アルカリペプトン水で 2 回継代培養後、滅菌生理食塩水で  $10^{-6}$  倍希釈 (高菌数群),  $10^{-7}$  倍希釈 (中菌数群),  $10^{-7}$  倍希釈液をさらに 2 倍希釈 (低菌数群) し、食品 25 g にそれぞれ  $100 \mu\text{l}$  ずつ接種し、模擬検体を作製した。

## 4. 検体の送付

1 検査機関につき、高菌数群, 中菌数群, 低菌数群および未接種群を各 4 検体ずつ、合計 16 検体を送付した。ストマッカー袋に入れた模擬検体は、さらにバイオパウチ袋に入れ、発砲スチロールの容器に冷媒、温度記録計と共に梱包、ジュラルミンケースに入れて各検査機関へ送付した (写真 1)。

## 5. 腸炎ビブリオ接種菌数測定方法

接種菌数を測定するために、 $10^{-6}$  倍希釈液,  $10^{-7}$  倍希釈液および  $10^{-7}$  倍希釈液をさらに 2 倍希釈した菌液を、3%NaCl 加普通寒天培地に  $100 \mu\text{l}$  ずつ各 10 枚の平板に滴下し、コンラージ棒を用いて平板全体に菌液を延ばす程度に軽く塗抹した。接種菌数は、出現した集落数から算出して求めた。

## 6. 食品からの腸炎ビブリオ検出方法

食品からの腸炎ビブリオ検出方法を図 1 に示した。

## 1) 増菌培地

増菌培地は、2%NaCl 加アルカリペプトン水 (栄研化学) を用いた。ストマッカー袋に入れた模擬検体 (腸炎ビブリオを接種した食品) に、増菌培地を 225ml 加え 30 秒間ストマッキングし、 $37^{\circ}\text{C}$  で 16~18 時間培養後、選択分離培地に塗抹した。

## 2) 分離培地

選択分離培地は、糖の分解性を指標とする TCBS 寒天 (栄研化学), ISO 法で使っている Triphenyltetrazolium chloride soya trypton agar (TSAT, 自家製), および酵素基質培地である CHROMagar Vibrio (関東化学), ES ビブリオ寒天 (栄研化学), X-VP 寒天 (日水) の 5 種類を用いた。

各増菌培養液を白金耳 ( $10 \mu\text{l}$ ) で一定量塗抹分離後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 16~18 時間培養し、腸炎ビブリオ様集落について確認培地 (2% NaCl 加 TSI 寒天, 2%NaCl 加 LIM 培地, 0%NaCl 加ペプトン水) に接種し、腸炎ビブリオであることを確認した。

## C. 研究結果

### 1. 接種菌数

「あさりのむき身」25 g に接種した腸炎ビブリオ菌数は、高菌数接種群で 20.4 個および 14.4 個, 中菌数接種群では 2.0 個および 1.3 個, 低菌数接種群では 1.4 個および 1.0 個であった。

### 2. 食品の生菌数

供試した「あさりのむき身」の生菌数は 1 回目  $3.2 \times 10^3$  個 /g, 2 回目は 300 個以下 /g であった。

### 3. 検体搬送時の温度変化

検体搬送時の温度記録計を解析した結果、全ての施設において、検体送付から到着時

の梱包開封時までの間は 10℃以下に保たれていた。

#### 4. 腸炎ビブリオ検出状況

1) 第1回目コラボレイティブ・スタディ  
15施設で実施したコラボレイティブ・スタディの実施結果を表1に示した。菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は60検体中60検体(100%)、中菌数接種群51検体(85%)、低菌数接種群31検体(51.7%)、未接種群0検体であった。

分離培地により検出率に差が認められたのは1施設のみであり、15施設中14施設は、腸炎ビブリオ陽性検体であれば、いずれの分離培地からも検出されていた。1施設では、高菌数接種群2検体で分離培地による差が認められた。すなわち、TSAT寒天培地で腸炎ビブリオ陰性が1検体、CHROMagarVibrioで陰性が2検体であった。(表2)。

2) 第2回目コラボレイティブ・スタディ  
菌数接種群別に腸炎ビブリオ陽性検体数および陽性率をみると、高菌数接種群は60検体中60検体(100%)、中菌数接種群47検体(78.3%)、低菌数接種群31検体(51.7%)、未接種群0検体であった。

分離培地による検出率の差が認められたのは1施設のみであり、高菌数接種群のTSAT寒天のみが、腸炎ビブリオ陰性であった(表3)。尚、分離培地による検出率に差が認められた各1施設は、1回目と2回目でそれぞれ異なっていた。

#### D. 考察

今回、食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を確立するために、15施設でコラ

ボレイティブ・スタディを実施した。高菌数を接種した群では、いずれの回も100%の検出率、未接種群では検出されなかった。中菌数接種群の検出率は85%および78.3%、低菌数接種群の検出率は、いずれも51.7%であった。提案法では、食品25g中に腸炎ビブリオが10個台存在すれば100%検出できることが明らかとなった。

分離培地別検出状況をみるとTCBS寒天、X-VP寒天、ESビブリオ寒天はいずれの菌量でも腸炎ビブリオの検出が可能であった。

一方、TSAT寒天およびCHROMagarVibrioでは、高菌数接種群で分離できなかった検体が各2検体ずつ認められた。これはTSAT寒天およびCHROMagarVibrioの抑制力が弱く、腸炎ビブリオ以外の菌が多く発育してしまったためと考えられた。今回使用した分離培地ではX-VP寒天の抑制が最も強く、微小な集落はまったく発育しなかった。

提案法に関するコラボレイティブ・スタディ参加機関からの意見で多かったのは、培地の選択性が実感できたということであった。また、分離平板へ塗抹した後の培養時間について、16~18時間培養では勤務時間外になってしまうため、プログラムインキュベーターが必要であるとの指摘があった。作業手順として、塗抹分離した平板を室温に置いておき、夕方から培養すること等も考える必要がある。

#### E. 結論

食品を対象とした腸炎ビブリオ標準試験法を作成するために、複数機関で検査を実施し提案法の評価を行った。今回のコラボレイティブ・スタディでは、食品25g中腸

炎ビブリオ菌数が10個台であれば100%検出することができた。また接種菌数を少なくすると検出率も低下した。

今回使用した分離平板は、糖の分解性を指標とした培地（2種類）と酵素基質培地（3種類）の5種類であった。それぞれ抑制力や目的とする菌の色調に特徴があるため、糖の分解性を指標とした培地と酵素基質培地との併用が望ましいと考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

小西典子，尾畑浩魅，高橋正樹，下島優香子，仲真晶子，工藤由起子，甲斐明美：食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法作成のための基礎的検討（2）.第47回腸炎ビブリオシンポジウム，広島県，2013.11.

#### H. 知的財産権の出願，登録状況

なし

## 写真. 検体の送付方法



- ① バイオパウチに食品検体(25g×8袋)を入れてシールする。



- ② バイオパウチ2袋(8検体×2袋)を発泡スチロール箱に入れ、両サイド面に冷媒を入れる。



- ③ バイオパウチ袋の間に温度記録計を入れる。



- ④ 更に上にも冷媒を入れる。



- ⑤ 検体の入った発砲スチロールをジュラルミンケースに入れて送付。

図1. 腸炎ビブリオ試験法・定性法(コラボレイティブ・スタディ用)

供試食品 : あさりのむき身

菌株 : 1株(血清型O3:K6, TDH産生株)

接種菌数 : 高濃度(10<sup>1</sup>オーダー/25g) × 4検体  
中濃度(10<sup>1</sup>オーダー/25g) × 4検体  
低濃度(10<sup>-1</sup>オーダー/25g) × 4検体  
未接種 × 4検体 } 16検体 × 2回実施

方法

模擬検体(食品25g)

↓  
増菌培地 2%NaCl加アルカリペプトン水 225ml 添加  
ストマッキング処理

↓  
37°C ± 1°C, 16~18時間

↓  
増菌培養液の1~2白金耳を分離培地に画線塗抹

- ・選択分離培地: TCBS寒天, TSAT寒天
- ・酵素基質培地: CHROMagar Vibrio, X-VP, ES vibrio,

↓  
37°C ± 1°C, 16~18時間

↓  
腸炎ビブリオと推定される集落について生化学的性状試験

- ・2%NaCl加TSI寒天
- ・2%NaCl加LIM培地
- ・0%NaCl加ペプトン水

表1 . 新しい腸炎ビブリオ検査法のためのコロボレイティブ・スタディ実施結果

	接種菌数	供試数	施設数	
			V.p 陽性(%)	V.p 陰性(%)
1回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	51 (85)	9 (15)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)
2回目	高菌数	60	60 (100)	0 (0)
	中菌数	60	47 (78.3)	13 (21.7)
	低菌数	60	31 (51.7)	29 (48.3)
	未接種	60	0 (0)	60 (100)

検査実施 : 15施設  
 高菌数接種群: 10<sup>1</sup>個 /25g  
 中菌数接種群: 10<sup>0</sup>個 /25g  
 低菌数接種群: 10<sup>0</sup>個 / 25g

表2. 分離培地別検出状況(1回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	58 (96.7)	60 (100)	60 (100)
中菌数	51	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)	51 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)

表3. 分離培地別検出状況(2回目)

接種菌数	陽性数	V.p検出数(%)				
		TCBS	TSAT	CHROMagar	X-VP	ES vibrio
高菌数	60	60 (100)	59 (98.3)	60 (100)	60 (100)	60 (100)
中菌数	47	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)	47 (100)
低菌数	31	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)	31 (100)