

# 腸炎ビブリオ培養検査の比較検討

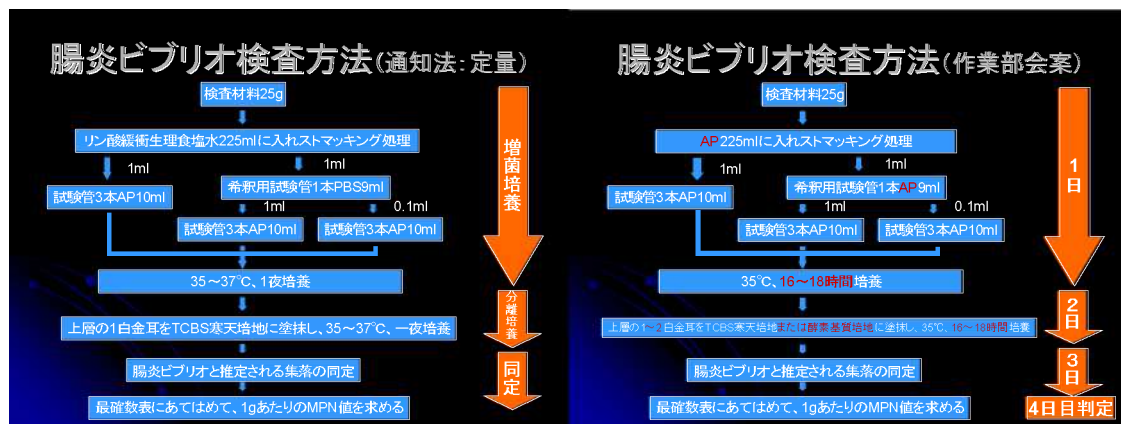
○前原智史<sup>1)</sup>、尾首雅史<sup>1)</sup>、木村禎彦<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>大阪市中央卸売市場食品衛検、<sup>2</sup>大阪市保健所南東部生活衛生監視事務所

## 【はじめに】

腸炎ビブリオは昭和 25 年、日本でシラス食中毒の原因菌として、世界で初めて発見された。その後、日本で主として研究され、菌種名も含め検査法が開発された細菌である。また、わが国の食文化とも密接な関係があり、最も重要な食中毒原因菌の 1 つとなっている。厚生（労働）省は腸炎ビブリオ食中毒予防対策として、平成 13 年 6 月に生食用魚介類の成分規格を設定し、発生予防対策を強化した。これを機に腸炎ビブリオ食中毒は減少傾向にある。しかしながら、刺身を代表とする日本の食文化との密接な関係により、特に夏季食中毒の重要な病因物質となっていることには変わりがない。一方、わが国では、告示・通知による検査法は長期にわたり用いられ、ほとんど修正されないのが現状である。平成 17 年に厚生労働省科学研究費により食品からの微生物標準試験法の検討委員会が作られ、腸炎ビブリオ検査も当該作業部会で検討されている。また、海外での微生物標準検査法策定の実状を考え、わが国の食品の微生物試験法は、国際的に通用するレベルの信用性を備え、実効性の高い試験法を策定する方向へ進もうとしている。しかしながら、腸炎ビブリオは増殖速度が速いことが知られており、他の細菌検査のように取り扱おうとすると、思わぬ落とし穴にはまることもあり、手技の熟練を要する検査といっても過言ではない。

そこで今研究では、検査の経験と技量を必要とされる当該検査手技を普遍化するため、一連の検査方法の細部を見直すとともに、腸炎ビブリオ成分規格検査（通知法）及び食品からの微生物標準試験法検討委員会腸炎ビブリオ作業部会案（作業部会案）及び短時間（5～6 時間）増菌培養及び酵素基質添加培地塗抹を基本とする方法（新法）の有用性について比較検討した。



## 【材料と方法】

大阪市中央卸売市場を流通する生鮮魚介類を材料として、通知法に基づいて TCBS 寒

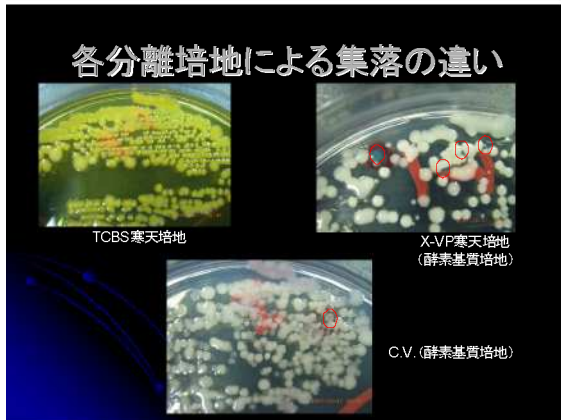


天培地を用いた場合及び作業部会案である酵素基質添加培地を使用した場合を比較した。増菌培養時間では、1夜培養（通知法）、16～18時間培養（作業部会案）及び短時間（5～6時間）培養を比較した。また、遠心分離により短時間増菌培養液を10倍濃縮した場合の有用性を遠心なしの場合と比較した。培地の塗抹方法では、3

分割使用した場合と1枚塗りの場合を比較した。また、1白金耳を塗抹する方法と直径の違う（φ0.28～1.2mm）各種白金線及びコンラージ棒を使用する方法を添加試験により経時的に比較した。塗抹前に培地穿刺することの有用性を比較した。平板培地を作りたてで使用する場合と十分に乾燥した後使用する場合を比較した。

## 【成績と考察】

通知法の TCBS 寒天培地を使用した腸炎ビブリオ分離方法と比較して、酵素基質添加



培地を使用する分離方法が、明らかに分離効率が高かった。この大きな要因は、TCBS 寒天培地が白糖非分解の陰性反応（緑色）を示す集落を陽性（腸炎ビブリオ）と判別するのに対し、酵素基質添加培地では、特異酵素基質反応の結果、特異的に発色した集落で判断する点である。TCBS 寒天培地のように陰性反応の集落を探す場合、白糖分解（黄色）集落に囲まれると、白糖非分解集落（腸炎ビブリオ）も黄色に発色して

しまう（擬陽性）欠陥が露呈された。実際に疑陽性集落から同定し、陽性となる確率は TCBS 寒天培地と酵素基質添加培地（クロモアガービブリオ）で顕著な差があった。これを避けるために、作業部会案では、増菌培養及び分離培養時間を 16～18 時間に

### 通知法(TCBS寒天培地)による陽性率

	腸炎ビブリオ疑集落数*	陽性数(率)
平成21年度	451	42(9.3%)
平成22年度	255	45(18%)

\*:大阪市中央卸売市場における生食用魚介類等の全同定検査件数

C.V.では93～94%が陽性という報告

通知法は×

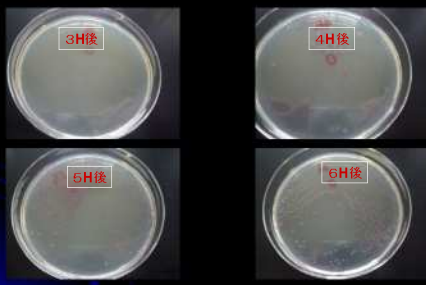
設定されている。これをそのまま検査すると、検査開始2～3日目には早朝や夜に作業

### 増菌培養方法の違いによる検出率の比較

検体No.	1夜培養	6時間培養
1	460(3-3-1)	460(3-3-1)
2	42(2-2-3)	1100(3-3-2)
3	3.0(0-0-1)	3.0(0-0-1)
4	3.6(1-0-0)	9.1(2-0-0)
5	93(3-2-0)	240(3-3-0)
6	23(3-0-0)	43(3-1-0)

個/g(MPN/パターン)

### 白金耳塗抹による集落発現状況



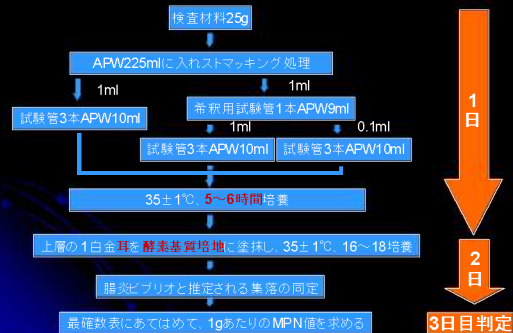
APIに1.9個/mlになるように添加し、37℃培養

する必要性が生じる。一方、短時間増菌培養法では、検査開始を午前中に設定すれば、スムーズに検査を継続することが可能である。検査に係る精度の高さ、検査効率や労力等を考え合わせると、酵素基質添加培地を使用することは、分離培地間の価格差を超えるメリットがあると考えられた。また、分離培地を乾燥して使用すること、分割しないこと、培地に穿刺してから塗抹することが分離効率に影響を及ぼすことが示唆された。塗抹方法としては、短時間（5～6時間）増菌培養では、白金耳の方が発現集落を分離し易いこと。1日増菌培養では、できるだけ細い口径の白金線を使用すると、分離効率が良いことが示唆された。

### 【結論】

腸炎ビブリオは増殖速度が速い微生物である。通常の細菌検査法に従い実施すると、これが障害となって分離できなくなるケースにしばしば遭遇する。各検査機関では担当者が経験的にこれを回避してきたが、これを普遍化させなければ、腸炎ビブリオ検査法の標準化は成し得ない。本方法は、通知による方法や作業部会案と比較して、特別な機材等の導入を必要とせずに結果までの判定を1日短縮できると考えられた。本研究が腸炎ビブリオ検査標準化の一助となれば幸いである。

### 腸炎ビブリオ検査方法【新法】



### 通知法と新法での検出率の比較

検体No.	通知法	新法
1	3.0(0-0-1)	7.2(1-0-1)
2	3.6(1-0-0)	9.1(2-0-0)
3	93(3-2-0)	240(3-3-0)
4	23(3-0-0)	43(3-1-0)

個/g(MPN/パターン)

3日目判定