

新型腸チフス菌および新型サルモネラの検出のための、 新しい検出用培地の開発

研究期間（平成13年度～14年度）

村上光一，長野英俊，濱崎光宏，堀川和美，高田智，世良暢之

要 旨

食中毒や腸チフスを引き起こすサルモネラの中で，非定形的な性状（乳糖を分解する，硫化水素を産生し難い，リシンを脱炭酸し難い等）を示すサルモネラを簡便に検出するため，サルモネラが利用できない糖3種類と，2種類の酵素活性を検出する基質を用いた寒天平板培地を作製した．その結果，非定形的な性状のサルモネラ及び定形的な性状を示すサルモネラでは，いずれも青色の集落を形成するのに対してして，大腸菌，*Klebsiella* 等のサルモネラ以外の腸内細菌では，赤色等の青色以外の集落を形成した．また，紫外線下にて乳糖分解性サルモネラは蛍光を発した．菌の発育についてもミスラ法による培地の評価を行ったところ，開発した培地上でサルモネラはマッコンキー寒天培地と同程度の発育支持特性を示した．下水試料を増菌培養後，画線培養した結果，今回開発した培地は SS 寒天培地，および DHL 寒天培地と同等のサルモネラ検出率を示した．今回開発した培地は，非定形的なサルモネラをも定形的性状のサルモネラと同様に検出可能な培地であり，特に乳糖分解性サルモネラの検出には最適で，今後，非定形的なサルモネラによる食中毒等の検査に役立つものと考えられる．

〔キーワード：サルモネラ，寒天平板培地，非定形的サルモネラ〕

1 はじめに

サルモネラは，食中毒や腸チフスの原因として重要な細菌である．このため，このサルモネラを簡便に且つ正確に検出するための培地が各種開発されている．

しかし，これらの培地の多くは，サルモネラが大腸菌等と異なり，乳糖を分解しないこと，及び硫化水素を産生しやすいことを徴表として検出するものが殆どである．また，それらの性状に加えてサルモネラがリシンを脱炭酸することを徴表として検出する培地もある．そのため，その存在が注目されている非定形的性状のサルモネラ（乳糖を分解するサルモネラ，硫化水素を産生しないサルモネラ，あるいはリシンを脱炭酸しないサルモネラ）の検出には，これら従来の培地は適していない．

本研究では，非定形的性状のサルモネラを定形的性状のサルモネラと同時に検出可能な培地を作製することを目的とした．

2 研究方法

非定形的性状のサルモネラならびに定形的性状を示す

サルモネラの糖の分解性，酵素活性を確認し，サルモネラ以外の大腸菌，*Klebsiella pneumoniae*，*Citrobacter freundii*，ならびに*Enterobacter cloacae* 等の腸内細菌と比較し，非定形的性状のものも含めたサルモネラだけに共通する性状を検索した．その結果をもとに，開発する培地上で，定型および非定形のサルモネラを同時に分離するために，実際に利用可能な徴表を摸索した．

菌の集落形成の確認：乳糖を分解するサルモネラ（3株），硫化水素を産生しないサルモネラ（5株），あるいはリシンを脱炭酸しないサルモネラ（3株），定形的な性状を示すサルモネラ（100株），及び大腸菌等の標準菌株が，開発した培地上で培養したときどのような集落を形成するか観察した．

ミスラ法による培地の評価：定形的な性状を示すサルモネラ（2株），非定形的性状のサルモネラ（10株），大腸菌（2株）及び*Citrobacter freundii* ATCC8090を用いて，ミスラ法にて菌の発育状況をマッコンキー寒天培地と比較した．

表1 今回開発した培地上での各菌の形成集落

菌株	用いた今回開発した培地 株数		SS寒天培地, DHL寒天培地	XLD寒天培地, XLT4寒天培地
乳糖分解性サルモネラ	3	青色集落 (紫外線下で蛍光あり)	赤色	黄色
硫化水素非産生サルモネラ	5	青色集落 (紫外線下で蛍光なし)	透明	透明
リシン脱炭酸試験陰性サルモネラ	3	青色集落 (紫外線下で蛍光なし)	辺縁部透明 中心部黒色	辺縁部黄色 中心部黒色
一般的な性状を持つサルモネラ	100	青色集落 (紫外線下で蛍光なし)	辺縁部透明 中心部黒色	辺縁部透明 中心部黒色
大腸菌	10	赤色集落 (紫外線下で蛍光なし)	赤色集落	黄色集落

実際の検査試料からのサルモネラの分離実験:下水試料について,前増菌(EEMブイオンを37℃で18時間培養し,この培養物 0.1 ml をRappaport-Vassiliadis 培地に加え,42℃で18時間培養した)した培養物とセレナイト培地のみで増菌培養したものの2種類の試料を,それぞれ今回開発した培地,SS寒天培地,およびDHL寒天培地に塗布し,37℃で18時間培養し,サルモネラを分離する能力を検討した。

3 結果及び考察

今回開発した培地に用いる徴表として,サルモネラが利用できない糖3種類と,ある種のエステラーゼの酵素活性,糖分解鑑別の蛍光基質を用いることとした。

菌の集落形成の確認:表1に示すように,非定形的性状ならびに定形的性状のサルモネラを,この培地上に塗布したとき,全ての株が,青色のコロニーを形成した。それに対して,大腸菌, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica* 及び赤痢菌は赤色など青色以外の色を発した(いずれもATCC株)。しかし, *Plesiomonas shigelloides* (ATCC株)はサルモネラと同様青色の集落を形成した。また,紫外線下において乳糖分解性サルモネラは蛍光を発した。それに対して乳糖を分解する酵素を持ちながらも,培地中の糖を分解した大腸菌等は,培地のpHが低下したため,蛍光を発しなかった。

ミスラ法による培地の評価:被検菌はマッコンキー寒天培地と同程度の発育支持特性(10^{-7} ~ 10^{-8})を示した。

実際の検査試料からのサルモネラの分離実験:下水試料の前増菌培養を施したものを寒天培地に画線培養したものは,今回開発した培地,SS寒天培地,DHL寒天培

地で,釣菌した菌のうち,それぞれ100%(70株中70株),100%(70株中70株),96%(70株中67株)がサルモネラであった。セレナイト培地のみで増菌培養したものでは,今回開発した培地,SS寒天培地,DHL寒天培地で,釣菌した菌のうち,それぞれ97%(100株中97株),96%(100株中96株),94%(100株中94株)がサルモネラであった。このように,今回開発した培地はサルモネラの検出率においてSS及びDHL寒天培地と同等の性能を示した。

4 まとめ

今回開発した培地は,非定形的なサルモネラをも定形的性状のサルモネラと同様に判別可能で,かつ紫外線照射により乳糖分解性サルモネラをも簡便に識別可能である。従来の培地に比較し,非定形的なサルモネラの検出に資するところが大きいと考えられる。

5 行政的意義,貢献

サルモネラは食中毒や腸チフスを起こす細菌として,公衆衛生上重要である。サルモネラのうち非定形的性状を示すサルモネラは,従来の培地のみを用いた検査では,見過ごされやすい。今回開発した培地では,非定形的なサルモネラも,定形的サルモネラと同様に検出することが可能である。このことにより,非定形的性状のサルモネラによる食中毒を含めたサルモネラ症の,早期発見,感染拡大防止,原因食品の特定,感染源の特定等に資するものと考えられる。また,この培地は特許取得が可能であり,今後,福岡県の知的財産の活用といった方面でも行政に貢献できると考えられる。

文 献

- 1) Murakami, K. *et al.*, Microbiol. Res., (投稿中)