

受賞研究

赤痢菌検出法培地の開発研究

村上光一^{*1}，長野英俊^{*2}，野田多美枝^{*1}

(平成17年度知事賞受賞：平成17年10月28日)

細菌性赤痢に関しては，現在でも世界で毎年約 8,000 万人が罹患し，うち約 70 万人が死亡している¹⁾．我が国における細菌性赤痢患者（疑似症患者および保菌者を含む）の届け出は2001年844例，2002年699例，2003年473例，2004年578例（国立感染症研究所）である．以上のように細菌性赤痢は，今なお重要な感染症であり，赤痢菌は食中毒の重要な病因物質でもある．2001年には韓国産かきを原因とする大規模広域食中毒に発展した事例があり，かつ生かきを摂食した家族からの二次感染も起こっている²⁾．

しかし，赤痢菌は，汚染した食品の中から検出することが腸内細菌のなかで最も困難な菌群であると考えられている．このため，食品を介して発生する感染事例が多いにもかかわらず，原因食品が特定されないため，実際の食中毒事例よりも少数の事例のみが食中毒として報告されるに過ぎないと指摘されている³⁾．汚染食品から赤痢菌を検出することが困難である理由は，増菌用培地，分離培地共にその性能が低いことが挙げられるが，

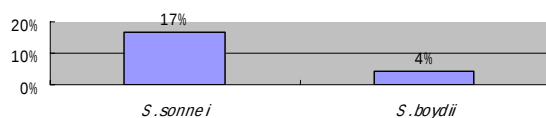


図 1 ほぼ同数の大腸菌とともに培養した場合の DHL 寒天培地上の赤痢菌の出現率、大腸菌4株、赤痢菌10株を用い、それぞれ100集落での出現率をもとに算出した(計4000集落)

性能の低さをもたらす細菌側の要因として，赤痢菌が他の菌の産生する酸に弱いことが報告されている⁴⁾．実際に，現行の寒天平板培地を用いた競合菌の存在下で，赤痢菌の検出率を検討したところ，かなり低いことが判明した（図1）．

そこで今回，赤痢菌を検出するための新しい寒天平板培地を開発することを目的とした研究を行なった．

赤痢菌は他の腸内細菌と大きく異なる生化学性状が

少ない．そのため，従来の培地では，赤痢菌を分離する上で検出感度が低く，赤痢菌の検出に問題があった．そこで，新たな寒天平板培地の開発を行った．

今回，赤痢菌の生化学性状の特徴を近縁の他の菌種と比較することにより，4 菌種総ての赤痢菌を検出するのに適した寒天平板培地（新型培地 1）および，赤痢菌のうち，我が国で最も患者数の多いゾンネ赤痢菌を検出するのに適した培地（新型培地 2）をそれぞれ開発した．

新型培地 1 では，赤痢菌は黄色の集落を形成した．新型培地 2 では，赤痢菌は青色または紺色集落を形成した．性能を評価するため，かきに赤痢菌を添加し，本培地にて培養した．赤痢菌と視認される集落を釣菌後，真に赤痢菌であった割合を既存の培地と比較すると，新型培地 1 では，従来の培地に比較して 1.7 倍以上，新型培地 2 では，2.6 倍の検出感度を示した．

同様に，パセリでは，新型培地 1 で，1.8 倍以上の検出感度を示した．さらに，ヒト糞便 10 g に *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 株など 8 菌種と，赤痢菌を混合して培養した時，新型培地 1 は，従来の赤痢菌用寒天平板培地の 1.4 倍以上の検出感度を示した．健康者の便 5 名分に等量の生理食塩水を加え，これら 5 件をともに混和し，この 9 容に1 容のゾンネ赤痢菌液を加えたものを 5 段階（ 1.4×10^1 から 1.4×10^5 ）希釈して新型培地 2 で培養し，ゾンネ赤痢菌と視認される菌を分離し，真にゾンネ赤痢菌であった割合を比較した．その結果，本発明の寒天平板培地上で青色あるいは紺色もしくは水色集落を形成し，ゾンネ赤痢菌を疑い分離した菌株の内，87.5 % がゾンネ赤痢菌であった．それに対して，従来から用いられている SS 寒天培地では，1.8 %，DHL 寒天培地では，21.7 % がゾンネ赤痢菌にすぎなかった．このように新型培地 2 は，従来の赤痢菌用寒天平板培地の少なくとも 4 倍以上の検出感度を示した．

*1 福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野 3 9 ）

*2 現：福岡県田川保健福祉環境事務所（〒825-8577 田川市大字伊田松原通り 3 2 9 2 - 2 ）

表 1 新型培地 1 (4 菌種の赤痢菌を検出) の組成

構成物	1 リットル中の含量
L (+) - リシンー塩酸塩	5 g
D - グルコース	3.5 g
プロモチモールブルー	0.032 g
プロモクレゾールパープル	0.02 g
5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - グルコピラノシド	0.375 g
ポリオキシエチレン (20) セチルエーテル	0.05 g
N , N - ジメチルホルムアミド	1.5 g
寒天	15 g
ペプトン	15 g
酵母エキス	3 g
塩化ナトリウム	5 g
クリスタルバイオレット	0.001 g
胆汁酸塩	2 g

表 2 新型培地 2 (ゾンネ菌種の赤痢菌を検出) の組成

構成物	1 リットル中の含量
D - キシロース	10 g
スクロース	5 g
ニュートラルレッド	0.04 g
5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - グルクロニド	0.15 g
ポリオキシエチレン (20) セチルエーテル	0.05 g
N , N - ジメチルホルムアミド	1.5 g
寒天	15 g
ペプトン	20 g
酵母エキス	3 g
塩化ナトリウム	5 g
クリスタルバイオレット	0.001 g
胆汁酸塩	2.5 g

また、新型培地の発育支持性を Miles と Misra の方法⁵⁾にて確認したところ、新型培地 1 および 2 は、 10^7 希釈まで赤痢菌が検出され、既存の寒天平板培地と比較し良好な値を示した。

以上のように、今回開発した新型培地 1 および 2 は、従来の寒天平板培地の性能を上回り、十分に実用性のある赤痢菌検出用寒天平板培地であると考えられた。

最後に、本研究を進めるにあたり、様々に御助力いただきました当所 吉村健清所長、石黒靖尚病理細菌課長はじめ関係各位に深謝するとともに、受賞に際しご高配いただきました山下芳郎保健福祉部企画課長（現保健福祉課長）はじめ本庁関係各位に謝意を表します。

文 献

- 1) WHO, Guidelines for shigellosis, Geneva, 2005 .
- 2) 増本喜美子ら：病微検出情報，24，3-6，2003 .
- 3) de Boer, E. *et al.* : Int J Food Microbiol , 45 , 43-53 , 1998 .
- 4) Mehlman, I.J. *et al.* , : J Assoc Off Anal Chem. , 68 , 552-555 , 1985 .
- 5) 厚生省監修，財団法人日本公衆衛生協会：微生物検査必携 細菌・真菌検査第3版，1987 .

