

資料

食中毒菌汚染実態調査実施要領の内容変更に伴うサルモネラ寒天平板培地の比較

村上光一・市原祥子・江藤良樹・濱崎光宏・竹中重幸・堀川和美

食中毒菌汚染実態調査実施要領の内容変更に伴い、従来当所で食中毒菌汚染実態調査に使用していた寒天培地が使用できなくなった。そのため、新実施要領に定められたサルモネラ検出用寒天平板培地の性能を、従来使用していた寒天平板培地等と、その性能を比較した。その結果、硫化水素産生性以外を鑑別の徴表とする培地では CHROMagar™ Salmonella (クロモアガーサルモネラ) が、硫化水素産生性を鑑別の徴表とする培地では、DHL 寒天培地が優れていることが判明した。

[キーワード：サルモネラ、培地、チフス菌、非定型的サルモネラ]

1 はじめに

サルモネラは公衆衛生上重要な病原体である。この病原体は、チフス性のサルモネラと非チフス性のサルモネラに分類されるが、前者はヒトに腸チフスあるいはパラチフスを起こし、後者は主として急性腸炎(サルモネラ症)を惹起する。非チフス性サルモネラは、食品を媒介とするものや、カメなどの動物を介してヒトに感染することが多い。飲食物がサルモネラを媒介してヒトにサルモネラ症を起こした場合は、食中毒として取り扱われる。

これらサルモネラの検出において検査法、特に培地の性能が試験結果を左右することは言を待たない。そのため、多くのサルモネラ検出用培地が開発されてきた。近年、C8-esterase 活性をサルモネラが比較的特異的に有することから、5-bromo-6-chloro-3-indolyl-octanoate などの特定酵素基質を利用した培地の開発が盛んとなった<sup>1)</sup>。

一方、当所では、食品の食中毒菌汚染実態調査を厚生労働省からの委託事業として実施している。この事業の検査法も、前述の培地開発の流れを受け、サルモネラの検査法、特に使用培地が新たに指定されることとなった(平成 21 年 6 月 23 日付食安発第 0623005 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)。この通知のなかで、サルモネラの検査では、(サルモネラが硫化水素を産生することを徴表として分離する培地のうち) DHL 寒天培地、MLCB 寒天培地、及び XLD 寒天培地の中から種類選択し、(サルモネラが硫化水素を産生することを徴表とせずに分離する培地のうち) CHROMagar™ Salmonella (クロモアガーサルモネラ、BD)、ChromID™ Salmonella Agar (SM2、

表 1 鶏肉等 35 検体におけるサルモネラ検出状況

	陰性	検出	偽陽性*
XLD	24	2	9
クロモアガー サルモネラ	33	2	0
SM2	34	1	0

\*サルモネラでない集落がサルモネラのように視認されるもの

XLD: XLD寒天培地

クロモアガーサルモネラ: CHROMagar™ Salmonella

SM2: ChromID™ Salmonella Agar (SM2)

BioMérieux)、ES サルモネラ II (栄研化学) 及びスルファピリジン添加ブリリアントグリーン寒天培地 (BGS) の中から種類選択することが定められた。

また、この新たな寒天培地の指定は、現在、国立医薬品食品衛生研究所で進められている公定法の制定に関連していると考えられ、我々も当該通知による培地の指定を蔑ろにできない。

この結果、従来当所で当該事業に使用してきた寒天平板培地である SMID 寒天培地 (BioMérieux)、及び XLT4 寒天培地 (BD) は指定培地でなくなった。そのため、今回指定された培地の中で、より性能の高い寒天平板培地を選択する必要が発生した。今回、我々は、新たに当該通知で指定された培地のうち数種類を選び、従来使用してきた培地等とその性能を比較した。

比較項目は、検出率、発育支持性等である。サルモネラの食中毒において、非チフス性サルモネラを媒介する飲食

表2 鶏肉 15 検体 (いずれかの培地にてサルモネラが検出された検体) を用いての各寒天培地におけるサルモネラ検出結果の比較

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉	鶏肉
クロモア ガーサル モネラ	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
SM2	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
SMID	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++
SS	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
DHL	++	++	++	++	++	不検出	++	+	++	++	++	++	++	++	++
XLD	+	+	+	+	+	+	+	+	不検出	++	+	++	++	+	+
XLT4	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

+: サルモネラを疑うことが可能な集落が 10未満出現したこと、++は10以上出現したことを示す。

クロモアガーサルモネラ: CHROMagar™ Salmonella

SM2: ChromID™ Salmonella Agar (SM2)

SMID: SMID 寒天培地

SS: SS 寒天培地

DHL: DHL 寒天培地

XLD: XLD寒天培地

XLT4: XLT4寒天培地

表3 各培地の発育支持性 (菌液を 10 倍ずつ希釈し、10<sup>5</sup> 倍希釈から 10<sup>12</sup> 倍希釈液を 1 μL ずつ接種)

	チフス菌				パラチフスA菌				パラチフスB菌			
	株A		株B		株C		株D		株E		株F	
	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
SM2	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-
クロモアガーサル モネラ	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-
SMID	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
SS	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	10 <sup>5</sup>	-	10 <sup>5</sup>	-
DHL	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	-
XLD	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-
XLT4	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-

各培地の略語は表2脚注のとおり

10<sup>5</sup>: 10<sup>5</sup>を表す。














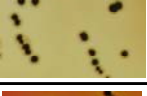







培地	乳糖を利用し酸を産生する菌株		リシン脱炭酸陰性菌株		硫化水素非産生菌株	
	写真	結果：各培地で示すべきサルモネラの特徴を、コロニーが示しているか	写真	結果：各培地で示すべきサルモネラの特徴を、コロニーが示しているか	写真	結果：各培地で示すべきサルモネラの特徴を、コロニーが示しているか
SM2		×		○		○
クロモアガーサルモネラ		× (発育せず)		○		○
SMID		× (発育せず)		○		○
SS		×		○		×
DHL		×		○		×
XLD		×		○		×
XLT4		×		○		×

図1 サルモネラの各培地の比較（各培地の略語は表2脚注のとおり）

物の種類は多いが、最も主要なものは鶏卵と鶏肉である<sup>1), 2), 3)</sup>。そのため、今回は鶏肉を中心とした食品検体中のサルモネラを対象にその性能を比較した。

## 2 方法

### 2・1 検出率の比較1

検査材料として、35 検体の鶏肉を中心とした食品を用い、検査を実施した。検体 約 25 g を秤量し、これをスタマッカー用の袋にいれ、225 ml の緩衝ペプトン水を加えた後、スタマッカーにて1分間ストマックした。これを 35℃ にて 20 時間培養した。ついでラパポートバシリアディス及びテトラチオン酸塩培地に、培養液をそれぞれ 0.1 ml 及び 1 ml 接種し、42℃ にて 18 時間培養した。その後、ラパポートバシリアディス培養物を XLD 寒天培地、クロモアガーサルモネラ及び SM2 に塗抹し、同様にテトラチオン酸塩培地の培養物も両寒天培地に塗抹した。寒天培地は 35℃ にて 18 時間培養し、サルモネラを疑う集落を釣菌した。釣菌は TSI 寒天培地等を既報<sup>5)</sup> のとおりに用い、サルモネラであるか同定した。

### 2・2 検出率の比較2

検査材料として、既にサルモネラを含んでいることが、他の試験にて明らかとなっている 15 検体の鶏肉を中心とした食品を用い、検査を実施した。用いた寒天培地は、クロモアガーサルモネラ、SM2、SMID 寒天培地、SS 寒天培地、DHL 寒天培地、XLD 寒天培地及び XLT4 寒天培地であり、方法は「2・1検出率の比較1」のとおりである。

### 2・3 発育支持性

ミスラ法による発育支持性の評価を行った。用いた菌株は、チフス菌 (2 株)、パラチフスA菌 (2 株) 及びパラチフス B 菌 (2 株) である。比較した培地は、SM2、クロモアガーサルモネラ、SMID 寒天培地、SS 寒天培地、DHL 寒天培地、XLD 寒天培地及び XLT4 寒天培地である。

### 2・4 菌の集落形成の確認

非定形的性状のサルモネラである乳糖を分解し酸を産生するサルモネラ、リシンを脱炭酸しないサルモネラ、通常の条件では硫化水素を産生しないサルモネラを用い、これらの集落がどのように形成されるか観察した。比較した培地は、SM2、クロモアガーサルモネラ、SMID

寒天培地、SS 寒天培地、DHL 寒天培地、XLD 寒天培地及び XLT4 寒天培地である。

### 3 結果

#### 3・1 検出率の比較1

表 1 に示すようにクロモアガーサルモネラが最も良好な結果を示した。XLD 寒天培地は偽陽性が多く、検査時間に無駄が多く発生した。

#### 3・2 検出率の比較2

表 2 に示すように DHL 寒天培地及び XLD 寒天培地に難が認められた。特に XLD 寒天培地は発育するサルモネラの集落数も少ない傾向が認められた。

#### 3・3 発育支持性

表 3 に示すように、サルモネラの中で最も発育条件が制限されるとされる血清型の一つ、パラチフス B 菌の発育結果を見ると、SM2、XLD 寒天培地及び DHL 寒天培地が優れていた。

#### 3・4 菌の集落形成の確認

図 1 に示すように SM2、クロモアガーサルモネラ及び SMID 寒天培地の中では、SM2 が優れていた。

### 4 考察

これらの結果から、選択すべき(サルモネラが硫化水素を産生することを徴表として分離する)培地の中では、XLD 寒天培地よりも DHL 寒天培地が優れていることが明らかとなった。また、サルモネラが硫化水素を産生することを徴表とせずに分離する培地の中では、SM2 及びクロモアガーサルモネラの何れが優れているか顕著な差は認められなかったが、今回の検討において SM2 の発育集落は、何れも扁平で、限界不明瞭な集落で、近隣の集落とあまりに近接するものが多かった。これは含有する界面活性剤の成分あるいは含量に由来するものでないかと考えられる。特定酵素基質培地では、特定酵素基質を培地中に溶解することに困難さが伴い、

brij-58 等の界面活性剤を添加する必要があるためである<sup>6)</sup>。以上の点から、その実用性に鑑み、クロモアガーサルモネラを以降の食中毒菌汚染実態調査では使用することとした。

### 文献

- 1) M. Manafi: New developments in chromogenic and fluorogenic culture media, Int. J. Food Microbiol., 60, 205-218, 2000.
- 2) K. Murakami, K. Horikawa, K. Otsuki: Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J. Vet. Med. Sci.; 61, 439-42, 1999.
- 3) K. Murakami, K. Horikawa, K. Otsuki: Genotypic characterization of human and environmental isolates of *Salmonella choleraesuis* subspecies *choleraesuis* serovar Infantis by pulsed-field gel electrophoresis. Microbiol. Immunol. 43, 293-6, 1999.
- 4) T. Noda, K. Murakami, Y. Ishiguro *et al.*: Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar Infantis for humans in Japan, Foodborne Pathog. Dis., 7, 727-735, 2010.
- 5) K. Murakami, K. Horikawa, T. Ito *et al.*: Environmental survey of salmonella and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. Epidemiol. Infect., 126, 159-172, 2001.
- 6) 村上光一, 長野英俊, 野田多美枝ら: 赤痢菌を検出するための固形培地および培養方法, 特願 2005-9673, 平成 17 年 3 月 30 日(特許出願), 2005.