



ビブリオ属菌の検査 —ESビブリオ寒天培地について—

栄研化学株式会社 研究開発統括部 小松 理

「es」とは、栄研化学株式会社がお届けする、環境：Environment 衛生：Sanitation を主体とした微生物検査：Examination の葉（しおり）です。



LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法



販売元

FUJITSU 富士通システムソリューションズ

LAMP法は1ステップ、等温でできる遺伝子増幅法です。
標的遺伝子の6箇所の領域を4種類のプライマーで認識し、
1時間以内で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍(社内データ)に増幅することができます。

食品・環境検査用	サルモネラ検出試薬キット
	腸管出血性大腸菌検出試薬キット
	ベロ毒素(VT) タイピング試薬キット
	大腸菌O157検出試薬キット
	<i>L.monocytogenes</i> 検出試薬キット
研究用	カンピロバクター検出試薬キット
	ノロウイルスGI検出試薬キット ノロウイルスGII検出試薬キット

製造販売元

栄研化学株式会社

〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

【問い合わせ先】
お客様相談窓口
フリーダイヤル ☎ 0120-308-421

1. はじめに

ビブリオ属菌の検査用培地には、TCBS寒天培地などの糖分解性を利用した培地と合成酵素基質を用いた培地があります。合成酵素基質を用いた培地の検討を行い、ESビブリオ寒天培地を開発しましたので、その概要と性能を紹介します。

2. ビブリオ属菌検査用の2つのタイプの培地の説明

1. 糖分解性を利用した培地

このタイプの培地は、糖分解で生じた酸をpH指示薬の色の変化で鑑別する培地です。例えばTCBS寒天培地では、白糖分解性をpH指示薬のブロムチモールブルー(BTB)とチモールブルー(TB)の色の変化で鑑別します。*Vibrio parahaemolyticus*は白糖非分解、*V. cholerae*は白糖を分解するためそれぞれのコロニーは緑色と黄色になります。

2. 合成酵素基質を用いた培地

合成酵素基質培地は、菌が特異的に産生する酵素を鑑別に利用した培地です。例えば、菌がβ-ガラクトシダーゼを産生する場合は、反応を色で鑑別可能にする発色団を結合したβ-ガラクトシダーゼ用合成基質を処方します。β-ガラクトシダーゼを産生する菌では、酵素作用によって処方した酵素基質から発色団が遊離しコロニーが着色することで鑑別します。

3. 各々の培地の良い点と問題点について

1. TCBS寒天培地

良い点は抑制力が強いことで、胆汁酸でグラム陽性菌の発育を抑制し、さらにチオ硫酸ナトリウムおよびクエン

酸ナトリウムと高アルカリ(pH8.8)との協同作用により、ビブリオ属菌以外のグラム陰性菌の発育も抑制します。問題点は、pH変化を利用しているため白糖分解能を有する*V. alginolyticus*が多量に発育した場合に、コロニーが密集した部分の培地全体が黄変してしまっており、白糖非分解の*V. parahaemolyticus*の鑑別が出来ない場合があることです。また白糖非分解の*V. vulnificus*が、*V. parahaemolyticus*と同じ緑色となり、区別が付きません。この*V. vulnificus*は、海水や魚介類から分離され、肝臓障害の人や糖尿病、免疫力が低下した人が感染すると皮膚病変や、敗血症を起こし激しい経過をとることがあるため、迅速な分離同定が重要となっています。

2. 合成酵素基質を用いた培地

合成酵素基質培地の利点は、例えば、*V. parahaemolyticus*が藤色、*V. cholerae*が緑色、*V. alginolyticus*が白色コロニーのように、菌種別に固有の色で鑑別ができることです。さらにpH変化によらないため、コロニーが密集している部分でも色調の鑑別がしやすくなっています。問題点は、抑制力がTCBS寒天培地と同程度のため、*V. alginolyticus*が多量に発育した場合に*V. parahaemolyticus*などの菌が*V. alginolyticus*の白色コロニーに埋没してしまう場合があること。また*V. vulnificus*は*V. cholerae*と同じコロニー色となり鑑別ができない点があります。

4. ESビブリオ寒天培地開発の経緯について

従来、ビブリオ属菌検査用培地は、*V. parahaemolyticus*と*V. cholerae*の分離が主な目的でした。1978年以来、重篤感染症例が報告されている*V.*

*vulnificus*の分離も重要になっていることから、ESビブリオ寒天培地は*V. parahaemolyticus*、*V. cholerae*、*V. vulnificus*の選択性を高め、かつこれら3菌種を別々のコロニー色で鑑別できる培地として開発しました。

1. ESビブリオ寒天培地における3菌種鑑別の原理について

ESビブリオ寒天培地は、糖分解性と合成酵素基質を利用した培地です。糖分解性については、TCBS寒天培地と同じ原理でBTBの色の変化で鑑別を行っています。また*V. cholerae*と*V. vulnificus*は、β-ガラクトシダーゼを産生しますが、*V. parahaemolyticus*は産生しないことから、白糖分解性と合成酵素基質の反応を組み合わせることで写真(図1)に示すように*V. parahaemolyticus*を緑青色、*V. cholerae*を黄褐色～茶色、*V. vulnificus*を紺色と別々のコロニー色に着色しています。

2. 抑制力の改善

TCBS寒天培地や市販の合成酵素基質培地では*V. alginolyticus*の発育抑制能が低く、本菌が多量に発育すると培地色が黄変したりコロニーが埋没してしまうことがあるため、ESビブリオ寒天培地では、食材中に多く存在する*V. alginolyticus*を抑制する選択剤を新たに処方しました。使用した選択剤は、熱に安定なため直接培地に添加してありますが、培地使用時の高アルカリ下(pH.8.8)での加熱で劣化する傾向があるため、加温溶解後にpH修正を行います。

5. ESビブリオ寒天培地の評価

1. ビブリオ属菌の発育性と集落コロニー色調

表1に示す通り4つの培地を用い、

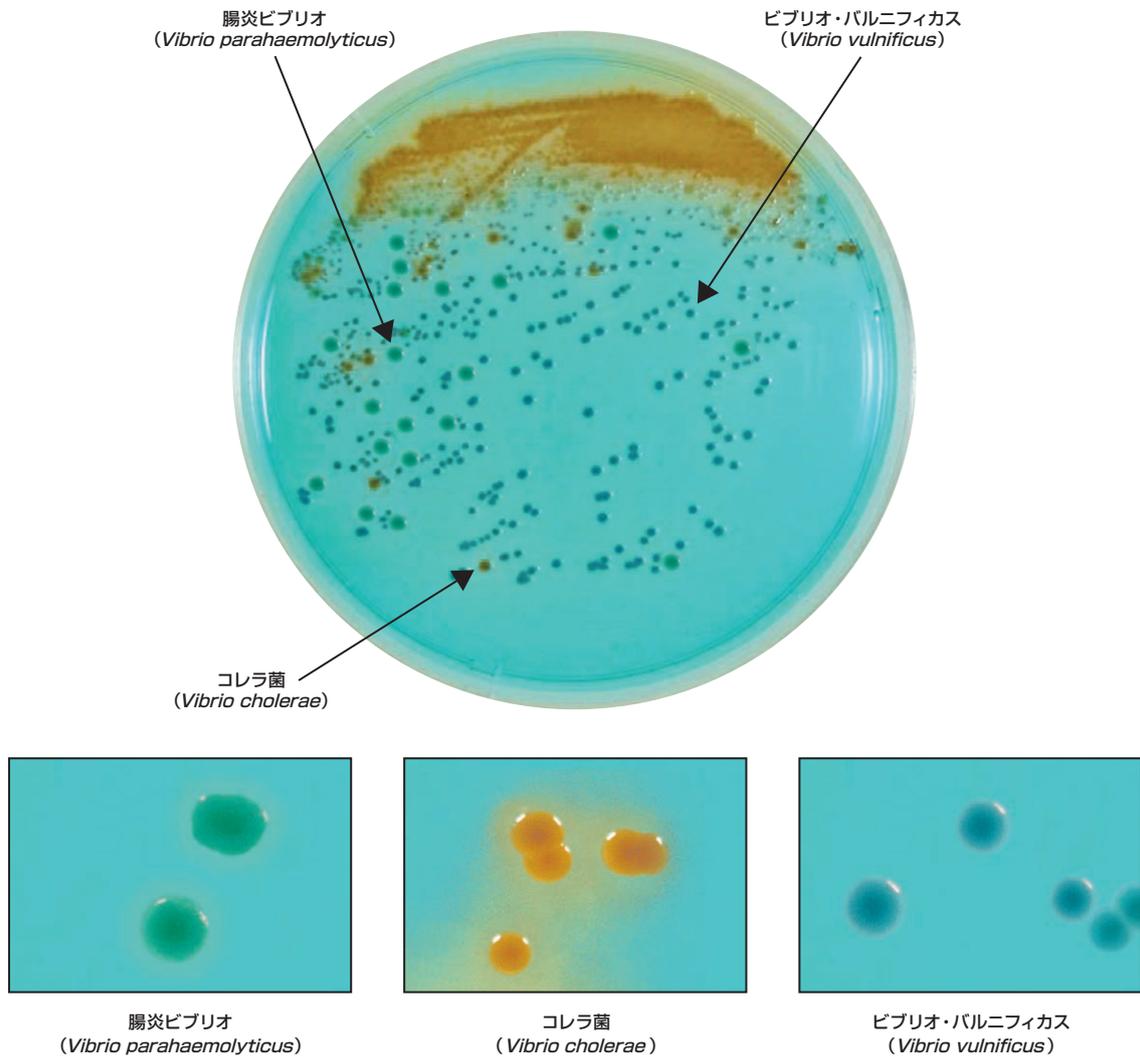


図1 ESビブリオ寒天培地でのビブリオ属菌の色調

表1 4種類の選択培地におけるビブリオ属菌4菌種の発育性とコロニー色

培地	<i>V. parahaemolyticus</i> (n=31)		<i>V. cholerae</i> (n=25)		<i>V. vulnificus</i> (n=8)		<i>V. alginolyticus</i> (n=10)	
	発育数	コロニー色	発育数	コロニー色	発育数	コロニー色	発育数	コロニー色
ESビブリオ寒天培地	31	緑青緑	25	黄褐色	8	紺	0	—
市販酵素基質培地A	31	紫	25	青	5	青	10	白
市販酵素基質培地B	31	緑	25	紫	7	紫	10	白
TCBS寒天培地	31	緑	25	黄色	6	緑	10	黄

ビブリオ属菌4菌種をMiles&Misra法で比較しました。供試菌の接種は、 $10^7 \sim 10^2$ cfu/mLの菌液を0.02mLずつ滴下し、37°C、18時間培養しました。発育性は、*V. parahaemolyticus*、*V.*

*cholerae*の発育は4培地で差はありませんでした。*V. vulnificus*は、ESビブリオ寒天培地は8株全てが発育しましたが、残り3培地では発育しない株がありました。*V. alginolyticus*の抑制

では、ESビブリオ寒天培地が10菌株すべてを 10^7 cfu/mLの高濃度でも抑制しましたが、他の3培地はすべて発育が認められました。また市販の合成酵素基質培地AとBは、*V. cholerae*と*V.*

*vulnificus*をコロニーの色調で鑑別することは困難でしたが、ESビブリオ寒天培地は、コロニー色調による鑑別が可能でした。

2. 市販のアサリからのビブリオ属菌の分離

栃木県内の20店舗より購入したアサリ60検体（アサリのむき身25gを1検体とする）で、ビブリオ属菌の分離を行いました。食品衛生検査指針 微生物編（2004）に従い、アサリ25gをアルカリペプトン水225m Lでホモジナイズし、37℃、18時間増菌培養しました。その一白金耳量を4つの培地に接種し、37℃、18時間培養後、発育した定型的なコロニーについて確認試験

を行いました。その結果、表2に示す通り*V. parahaemolyticus*が分離されたのは、ESビブリオ寒天培地で59検体、培地Aで57検体、培地Bで58検体、TCBS寒天培地で50検体と、ESビブリオ寒天培地が最も多くの検体から分離されました。*V. cholerae*は、4培地とも分離されませんでした。*V. vulnificus*が分離された検体は、ESビブリオ寒天培地で2検体、培地Aで1検体、培地BとTCBS寒天培地は分離されませんでした。

6. おわりに

ESビブリオ寒天培地は、*V. paraha-*

*emolyticus*を緑青色、*V. cholerae*を黄褐色～茶色、*V. vulnificus*を紺色と、3菌種を別々のコロニー色で着色させることが可能でした。ESビブリオ寒天培地は供試した3培地と比較して*V. alginolyticus*を強く抑制しており、効率よく*V. parahaemolyticus*、*V. cholerae*、*V. vulnificus*を分離することが可能でした。

以上のことより合成酵素基質を用いたESビブリオ寒天培地は、*V. parahaemolyticus*、*V. cholerae*、*V. vulnificus*に対して高い鑑別性を有しており、病原性を有するビブリオ属菌の分離に有効です。

表2 4種類の選択培地における市販アサリ60検体からのビブリオ属菌の分離比較

培地	検出菌種と分離検体数		
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. vulnificus</i>
ESビブリオ寒天培地	59	0	2
市販酵素基質培地A	57	0	1
市販酵素基質培地B	58	0	0
TCBS寒天培地	50	0	0



学会・講習会・展示会 2009年7月～12月

名称	会期	会場	問い合わせ先	備考
2009分析展	9/2～4	千葉県： 幕張メッセ	(社)日本分析機器工業会 2009分析展委員会事務局 Tel:03-3292-0642	
日本防菌防黴学会 第36回年次大会	9/14～15	大阪府：千里ライフ サイエンスセンタービル	日本防菌防黴学会事務局 Tel:06-6538-2166	弊社出展予定
第98回 日本食品衛生学会学術講演会	10/8～9	北海道： 函館国際ホテル	実行委員会事務局 北海道大学大学院水産科学研究院 食品衛生研究室内 Tel:0138-40-5573	
食品開発展2009	10/14～16	東京都： 東京ビッグサイト	食品開発展事務局 Tel:03-5296-1017	弊社出展予定
日本食品微生物学会30周年記念学術総会	10/19～21	東京都： タワーホール船堀	日本食品微生物学会30周年記念学術総会事務局 財団法人 日本食品分析センター内 Tel:03-3469-7135	弊社出展予定 10/20 ランチョンセミナー
2009日本国際包装機械展	10/20～23	東京都： 東京ビッグサイト	2009日本国際包装機械展 事務局 社団法人 日本包装機械工業会 内 Tel:03-6222-2277	

会期・会場等は変更されることがあります。参加される際は必ずご確認ください。

無断複写・無断転載を禁じます

[es] NO.048 (2009年7月発行)

●監修/森地敏樹 ●発行/栄研化学株式会社 栄研化学(株)ホームページ <http://www.eiken.co.jp/>

●編集/栄研化学株式会社 es 事務局 〒110-8408 東京都台東区台東 4-19-9 山口ビル 7 Tel:03-5846-3286 Fax:03-5846-3292

5075 AK4MK