

赤痢菌の鑑別培地，CA 培地について

岐阜県衛生研究所

所 光男 長野 功 後藤 喜一

岐阜県公衆衛生検査センター

中 村 章

(平成1年11月9日受付)

(平成1月12月20日受理)

Key words : *Shigella*, *Differential medium*, *Sodium citrate*,
Sodium acetate

要 旨

SS寒天平板上で赤痢菌が疑われた集落由来株を培養時間24時間で簡易に鑑別できる培地を改良するための基礎実験を赤痢菌23株，*Escherichia coli* 129株を用いて行なった。その結果，合成培地に酢酸ナトリウム0.3%，ブドウ糖0.02%，クエン酸ナトリウム0.3%を加え改良したCA培地（Citrate-Acetate medium）は，従来我が国で常用されているクリステンゼンのクエン酸塩培地に比べ，赤痢菌と*E. coli*の鑑別に優れていることが確認された。

健康者検便のSS寒天板上で赤痢菌が疑われた集落由来株130株を用い赤痢菌との鑑別性をCA培地，クリステンゼンのクエン酸塩培地，酢酸ナトリウム寒天培地を用いて比較した結果，24時間の培養の時点では，CA培地はクリステンゼンのクエン酸塩培地，酢酸ナトリウム寒天培地より鑑別性が優れていることが確認された。

更に，使用した130株の同定を行い上記3培地の菌種による鑑別性を検討した結果，赤痢菌の鑑別培地としてCA培地は*Escherichia* sp.の鑑別ではクリステンゼンのクエン酸塩培地より優れており，*Hafnia* sp.の鑑別では酢酸ナトリウム培地より優れていることが確認された。

はじめに

厚生省通牒¹⁾²⁾および食品衛生法³⁾では食品関係従事者，給食関係従事者の衛生管理を目的として保菌者検便を受けるように勧奨しており，主に赤痢菌，チフス菌が検査対象菌となっている。赤痢は法定伝染病でありその確定には迅速性が要求されることから，通常，一次鑑別培地としてはTSI寒天培地，LIM培地が用いられている⁴⁾。しかしながら，これらの2培地だけが用いられた場合，ブドウ糖からのガス非産生，非運動性，リジン・デカルボキシラーゼ陰性の性状を示す組織侵入性大

腸菌等⁴⁾⁵⁾が赤痢菌でないとは否定できない。従って，通常はクリステンゼンのクエン酸塩培地（以下C-Cit培地）⁶⁾か酢酸ナトリウム培地（以下Acet培地）⁷⁾を一次鑑別培地に加えている⁴⁾⁸⁾。しかしながら，これらの培地は検査の迅速性，精度の点で必ずしも満足できるものでない⁴⁾⁵⁾。そこで，著者らは検査精度の向上と迅速化を目的として鑑別培地の改良を試みた結果，赤痢菌の鑑別培地として，従来常用されているC-Cit培地およびAcet培地より，鑑別性，迅速性とも優れた培地を考案したので報告する。

I. 材料および方法

1. クエン酸ナトリウム・酢酸ナトリウム寒天培地（CA培地）

別刷請求先：（〒500）岐阜市野一色4-6-3

岐阜県衛生研究所微生物第2部

所 光男

平成2年7月20日

新たに考案したCA培地の組成をTable 1に示した。即ち、クエン酸ナトリウム3.0g, 酢酸ナトリウム2.0g, ブドウ糖0.2g, リン酸一水素カリウム1.0g, リン酸二水素アンモニウム1.0g, 硫酸マグネシウム0.2g, 塩化ナトリウム5.0g, プロモチモールブルー0.08g及び寒天15.0gを精製水1,000mlに溶解, pHを7.0に調整, 試験管に3mlずつ分注し, 121°Cで15分間滅菌後, 斜面に固めた。

2. 赤痢菌, *Escherichia coli* および食品関係従事者糞便由来株の発育の比較

1) 供試培地

CA培地, 酢酸ナトリウム培地 (Difco), C-Cit培地 (自家製) を用いた。

2) 供試菌株

赤痢菌23株, *E. coli* 129株は当衛生研究所保存株を供試菌株とした。食品関係従事者糞便由来株

Table 1 Composition of CA agar for differentiating *Shigella*

Composition (g/L)	CA agar ¹⁾
Sodium citrate	3.0
Sodium acetate	2.0
Glucose	0.2
Dipotassium phosphate	1.0
Mono ammonium phosphate	1.0
Magnesium sulfate	0.2
Sodium chloride	5.0
Borm thymol blue	0.08
Agar	15.0
pH	7.0

¹⁾ : Citrate Acetate agar

は岐阜県公衆衛生検査センターで実施している食品関係従事者検便のSS寒天平板上に発育してきた集落で, 集落の性状からは赤痢菌が疑われた220株を供試菌株とした。

3) 培養方法

供試株は普通寒天斜面で37°C, 一夜培養したものを, 白金線を用い, その少量を斜面に接種した。これを37°Cで48時間培養し, 24時間, 48時間後発育しているかを判定した。

3. 食品関係従事者糞便由来株の同定

医学細菌の同定の手引き⁹⁾及びBergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1¹⁰⁾に準じて行なった。

II. 成 績

1. 赤痢菌の発育の比較

供試した赤痢菌23株はCA培地, C-Cit培地, Acet培地のすべてに全く発育しなかった。

2. *E. coli* の発育の比較

E. coli 129株の発育状況をTable 2に示した。CA培地とAcet培地の陽性株数はほとんど差がなく, CA培地は24時間培養で120株(96.0%), 48時間培養で123株(98.4%), Acet培地は24時間培養で119株(95.2%), 48時間培養で121株(96.8%)が陽性を示した。しかしながら, C-Cit培地だけは, 24時間培養で35株(28.0%), 48時間培養で112株(89.5%)と低く, χ^2 検定を実施した結果, 培養時間24時間と48時間でCA培地はC-Citに対して陽性率の有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

3. 食品関係従事者糞便由来株の発育の比較

Table 2 Growth of organisms on various differential media

Organisms	No. of tested	Differential media	No. of positive (%)	
			Incubation time (hr.)	
			24	48
<i>Escherichia coli</i>	129	CA	120(96.0) ^{b)}	123(98.4) ^{b)}
		Acet	119(95.2)	121(96.8)
		C-Cit	35(28.0)	112(89.5)
Isolates from feces of healthy people	130	CA	124(95.4) ^{a,b)}	127(97.7) ^{a)}
		Acet	108(83.1)	115(90.8)
		C-Cit	93(71.5)	122(93.8)

^{a)}Significantly different from Acet by chi-square test $p < 0.01$

^{b)}Significantly different from C-Cit by chi-square test $p < 0.01$

Table 3 Organisms isolated from feces of healthy people

Organisms	Number of isolated organisms
<i>Morganella</i> sp.	86
<i>Escherichia</i> sp.	52
<i>Enterobacter</i> sp.	51
<i>Hafnia</i> sp.	15
<i>Pseudomonas</i> sp.	5
<i>Plesiomonas</i> sp.	5
<i>Citrobacter</i> sp.	3
<i>Aeromonas</i> sp.	2
<i>Alcaligenes</i> sp.	1

食品関係従事者糞便由来株220株の発育状況を検討した結果, 220株中90株はCA培地, Acet培地およびC-Cit培地の3培地とも総て陰性であった。残り130株の発育状況をTable 2に示した。CA培地の陽性株数は, 24時間培養で124株(95.4%), 48時間培養で127株(97.7%)と高率に検出された。これに対し, Acet培地, C-Cit培地の陽性株数は低く, 24時間ではそれぞれ108株(83.1%), 93株(71.5%), 48時間では115株(90.8%), 122株(93.8%)と低く, χ^2 検定を実施した結果, CA培地は24時間培養ではAcet培地, C-Cit培地に対して, 48時間培養ではAcet培地に対して陽性率の有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

4. 食品関係従事者糞便由来株の同定成績

食品関係従事者糞便由来株220株の同定成績をTable 3に示した。主要菌種は*Morganella* sp. が86株と最も多く, 続いて, *Escherichia* sp. 52株, *Enterobacter* sp. が51株, *Hafnia* sp. 15株であった。なお, *Morganella* sp. 86株のうち85株, *Plesiomonas* sp. 5株はCA培地, Acet培地, C-Cit培地の3培地とも総て陰性であった株である。

5. 食品関係従事者糞便由来株の菌種による発育の比較

食品関係従事者糞便由来株130株のうち主要菌種*Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Hafnia* sp., および*Pseudomonas* sp. の123株の発育状況をTable 4に示した。*Enterobacter* sp. の51株, *Pseudomonas* sp. の5株は3培地ともほとんど同

Table 4 Growth of isolates from feces of healthy people on various differential media

Organisms	No. of tested	Differential media	No. of positive (%)	
			Incubation time (hr.)	
			24	48
<i>Enterobacter</i> sp.	51	CA	51	51
		Acet	50	50
		C-Cit	51	51
<i>Pseudomonas</i> sp.	5	CA	5	5
		Acet	5	5
		C-Cit	5	5
<i>Escherichia</i> sp.	52	CA	49	51
		Acet	47	49
		C-Cit	17	47
<i>Hafnia</i> sp.	15	CA	14	15
		Acet	2	6
		C-Cit	15	15

じ陽性株数を示した。*Escherichia* sp. の52株についてはCA培地, Acet培地の陽性株数はほとんど同じであったが, 24時間培養でのC-Cit培地の陽性株数は17株と極端に少なかった。これに対して, *Hafnia* sp. の15株はCA培地及びC-Cit培地の陽性株数はほとんど同じであったが, Acet培地の陽性株数は培養時間24, 48で2, 6株と極端に少なかった。

III. 考 察

赤痢菌および*E. coli*は炭素源として酢酸を利用できるが, 赤痢菌の栄養要求はかなりきびしく, 多くの菌株はトリプトファンおよび発育素としてニコチン酸を要求し, アンモニウム塩を唯一の窒素源としている純合成培地では発育できない⁵⁾。これを両者の鑑別に利用した培地がAcet培地である⁷⁾。一方, 赤痢菌および*E. coli*は炭酸源としてクエン酸を利用できないが, *E. coli*はブドウ糖の存在下では細胞膜の透過性が変化し, クエン酸を炭素源として利用できる。これを両者の鑑別に利用した培地がC-Cit培地である⁶⁾。新たに考案したCA培地は合成培地に酢酸, クエン酸, ブドウ糖を同時に加え, 酢酸及びブドウ糖存在下のクエン酸の炭素源としての利用性を同時に測定することを目的とした培地である。

C-Cit培地はもともと*E. coli*の鑑別を目的とした培地ではないが, ブドウ糖存在下の細胞膜の

透過性も、菌株によりかなり異なり、*E. coli* でも C-Cit 培地に発育しない株が多くある⁴⁾⁵⁾。本報での保存株および食品関係従事者糞便由来株の *Escherichia* sp. 株を用いての検討でも同様な成績であり、特に、培養24時間での陽性率が低い点は、赤痢は法定伝染病でありその確定に迅速性が要求されることを考慮すると必ずしも赤痢菌一次鑑別培地としての適性を備えているとは言えない。

Acet 培地は Trabulsi ら⁷⁾が赤痢菌と *E. coli* との鑑別用に Simmons の培地を改良した合成培地で坂崎らの報告では *E. coli* の陽性率も 89.0% と高い⁹⁾。本報での保存株および食品関係従事者由来株の *Escherichia* sp. 株を用いての検討でも、培養24時間での陽性率が90%を越えており、迅速性の点でも優れている。

新たに考案した CA 培地は保存株および食品関係従事者由来株の *Escherichia* sp. 株を用いての検討で、有意の差こそ認められなかったが、Acet 培地の陽性率より少し優れていた。このことは、酢酸、クエン酸、ブドウ糖の同時添加は *E. coli* に関しては陽性率上昇にはつながらなかったが、互いに阻害的には作用しないことが推測された。

保菌者検索検便の SS 寒天平板上に発育してくる集落で、集落の性状からは赤痢菌が疑われる菌株の菌種は、本報の食品関係従事者由来株での成績では、*Morganella* sp. が最も多く、続いて、*Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Hafnia* sp., *Pseudomonas* sp. 等であった。このことは、赤痢菌との鑑別菌種として *E. coli* は勿論重要であるが、その他の菌種も十分考慮する必要があることを示唆している。

Morganella sp. は Acet 培地にも CA 培地にも発育しなかったが、赤痢菌の一次鑑別培地として用いられている TSI 寒天培地のブドウ糖からのガス産生、LIM 培地の運動性で赤痢菌と鑑別できる¹⁰⁾。

Enterobacter sp., *Pseudomonas* sp. も *Morganella* sp. 同様ブドウ糖からのガス産生や運動性で赤痢菌と鑑別できるが、本報の食品関係従事者由来株を用いての検討では、C-Cit 培地、CA 培地、Acet 培地のどれを用いても容易に赤痢菌と鑑

別できることが実証された。

小川らは *Hafnia* sp. は 37°C で培養すると TSI 寒天培地でガス非産生、乳糖・白糖非分解、SIM 培地でインドールが陰性で非運動性の性状を示す株があるのでさらに詳細に鑑別するよう指摘している⁴⁾。本報の15株の成績では CA 培地と C-Cit 培地の陽性率は24時間培養ですでに93.3%、100%であったが、Acet 培地の陽性率は24時間で13.3%、48時間培養でも40%と低く、Acet 培地は *Hafnia* の鑑別には適していないことが実証された。

CA 培地は *Escherichia* sp. の鑑別では従来から常用されている Acet 培地とは優劣は出なかったが、*Hafnia* sp. の鑑別では断然優れており、食品関係従事者由来株130株での成績では CA 培地は Acet 培地に対し24時間培養でも、48時間培養でも有意の差が認められたことから、赤痢菌の一次鑑別培地として TSI 寒天培地、LIM 培地とともに用いれば鑑別率も高まると考える。

文 献

- 1) 厚生省：赤痢対策の推進について（赤痢防疫対策実施要領）。衛発，672号，1959。
- 2) 厚生省：赤痢集団発生対策の強化について。衛発，538号，1963。
- 3) 厚生省食品保健課，乳肉衛生課，食品化学課：食品衛生関係規集，p. 101—123，中央法規出版株式会社，東京，1978。
- 4) 小川正之，中村武雄：微生物検査必携，細菌・真菌検査。第3版，p. D14—D29，日本公衆衛生協会，1987。
- 5) 坂崎利一：腸内細菌(III)。各論2。p. 1—124，近代出版，東京，1977。
- 6) Christensen, W.B.: Hydrogen sulfide production and citrate utilization in the differentiation of enteric pathogens and coliform bacteria. Res. Bull. Weld County Health Dept., 1: 3—9, 1949.
- 7) Trabulsi, L.R. & Ewing, W.H.: Sodium acetate medium for differentiation of *Shigella* and *Escherichia*. Pub. Health Lab., 20: 137—143, 1962.
- 8) 善養寺浩，坂井千二，寺山 武，工藤泰雄，伊藤武：腸管系病原菌の検査法。第4版，p. 154—170，医学書院，1985。
- 9) 坂崎利一：医学細菌同定の手びき。第2版，p. 105—164，近代出版，1975。
- 10) Noel, R.K. & John, G.H.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. p. 140—601, Williams & Wilkins, London, 1984.

An Improved Differential Medium, CA Medium, for Differentiating *Shigella*

Mitsuo TOKORO, Isao NAGANO & Kiichi GOTO

Gifu Prefectural Institute of Public Health

Akira NAKAMURA

Gifu Research Center for Public Health

We devised a Citrate-Acetate (CA) medium for rapidly differentiating *Shigella*. The medium consisted of 3.0 g of sodium citrate, 2.0 g of sodium acetate, 0.2 g of glucose, 1.0 g of dipotassium phosphate, 1.0 g of mono ammonium phosphate, 0.2 g of magnesium sulfate, 5.0 g of sodium chloride, 0.08 g of brom thymol blue, 15.0 g of agar, and 1000 ml of distilled water. An evaluation was made of the CA medium, for the rapid differentiation of 23 *Shigella* strains, 129 *Escherichia coli* strains and 130 isolates, that formed colourless colonies suspected to be *Shigella* on SS agar plate, from feces of healthy people.

The results obtained were as follows

- 1) On the CA medium, all *Shigella* strains did not grow and there was no change in colour.
- 2) Positive growth rates of *E. coli* strains after incubation for 24 hr at 37°C on CA medium, sodium acetate medium (Acet) and Christensen citrate medium (C-Cit) were 96.0%, 95.2% and 28.0%, respectively. Therefore, the positive growth rate of *E. coli* strains after incubation for 24 hr on CA medium was significantly higher ($p < 0.01$) than that on C-Cit medium.
- 3) Positive growth rates of isolates after incubation for 24 hr at 37°C on CA medium, Acet medium and C-Cit medium were 95.4%, 83.1% and 71.5%, respectively. Therefore, the positive growth rates of isolates after incubation for 24 hr on CA medium was significantly higher ($p < 0.01$) than that on Acet medium and C-Cit medium.
- 4) The genus of tested isolates were *Escherichia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Aermonas*, *Alcaligenes* and *Morganella*.
- 5) It was found that sodium acetate, and sodium citrate and glucose incorporated into the CA medium had enhanced the growth of *Escherichia* and *Hafnia*, respectively.

From the above results, the CA medium is recommend as a differential medium for use in the rapid differentiation of *Shigella* and organisms that formed colourless colonies suspected to be *Shigella* on SS agar plate in the routine examinations.