腸炎ビブリオ検査用テルライト培地について

(昭和 39 年 4 月 20 日 受理)

藤原 喜久夫*   加 藤 博*   辰 己 和 世*
沢 田 文 枝*   土 屋 康 子*

A Selective Medium for the Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* (Tellulite Medium-TTGA Agar)

Kikuo FUJIWARA, Hiroshi KATOH, Kazuyo TATSUMI,
Fumie SAWADA, and Yasuko TSUCHIYA

(The Institute of Food Microbiology, Chiba University :
Okubo, Narashino-shi, Chiba-ken)

In the present report, a highly selective tellulite agar medium is described, which has a marked inhibitory effect on growth of many strains of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* and most vibrio but allows growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *El Tor Vibrio*. This medium was named TTGA agar and consists of: gelatin 10g/L, NaCl 30g/L, Na-taurocholate 5g/L, Na_2CO_3 1g/L, K-tellulite 10mg/L, and agar 15g/L.

The laboratory investigations detecting *Vibrio parahaemolyticus* in feces of food poisoning patients suggested that this medium is adequate for field trials.

(Received April 20, 1964)

I 緒 言

従来、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の選択培地としては、BTB 胆汁酸塩培地¹⁾を初めとして、Teepol 寒天培地²⁾、TCBS 培地³⁾、WA 寒天³⁾、BS 寒天³⁾ 培地等種々の培地が考案使用されているが、現在なお、腸炎ビブリオ以外の細菌の発育を十分に抑制しうるような培地はつくられていない。とくに回復後期患者糞便もしくは採取後検査まで長時間放置された検体のように、本来腸炎ビブリオの生残菌の少ないものを検査材料として、直接培養により検出しようとするような場合に、従来の培地を使用するとき少数の腸炎ビブリオの集落は、圧倒的多数の他種細菌群の集落によって覆われ、その結果腸炎ビブリオの検出、釣菌に支障をきたすことが多く、はなはだしきに至っては、実際には検体中に腸炎ビブリオが存在していたにもかかわらず、その証明が不可能に終ることすらしばしば経験されるところである。

他方また、生魚等の無加熱の食品について、そのなかに含まれている腸炎ビブリオを生菌数算定を試みようとする際にも一般に魚体中に共存する他種細菌の混入により、現在普通に行なわれている方法では、厳密な意味の

腸炎ビブリオ菌数は得られない。

ここにおいて著者らは、これらの諸問題を解決しようとして、きわめて選択性の高い腸炎ビブリオ検査用の新培地を考察したので以下に報告する。

II 実験材料および実験方法

Table 1 に示すとき組成を有する新培地(TTGA 培地と称する)を作成し、その諸種細菌に対する選択性を追及した。つぎにこれを、従来腸炎ビブリオ分離培地として使用されていた、BTB 胆汁酸塩培地、BTB-Teepol 寒天培地、TCBS 培地、WA 寒天培地、BS 寒天培地等と、その選択性について比較した。なお本実験においては、腸炎ビブリオの他に、*Vibrio comma* (新鮮分離株)を含む種々の *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 等の諸菌株について選択性の吟味を試みた。

また、選択性の検査法としては、各種の平板寒天上に被検菌の24時間培養(ブイヨン等の液体培養)1白金耳あてを放射状に接種し、37°(ただし *Pseudomonas* については27°)24時間培養後の発育の有無により判定を行なった。

* 千葉大学腐敗研究所：千葉県習志野市大久保町

Table 1. The Composition of TTGA Agar

Gelatin	10.0 g
Sodium chloride	30.0 g
Sodium taurocholate	5.0 g
Sodium carbonate	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

The medium was sterilized by autoclaving at 20 l b. pressure for 20 minutes, and potassium tellurite was added to a final concentration of 1 : 100,000 before pouring plates.

Table 2. Variation of TTGA Agar

Name Component	TTGA	T-1	T-2	T-3	T-4
Sod. taurochol.	5.0 g	10.0 g	5.0 g	10.0 g	5.0 g
Gelatin	10.0	10.0	10.0	10.0	5.0
Sod. chloride	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Sod. carbonate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agar	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Pot. tellurite	10.0mg	20.0mg	20.0mg	10.0mg	10.0mg

Table 3. Growth of *Vibrio parahaemolyticus* (1)
(patient origin strains)

O-Type	BTB-cholate Agar	TTGA Agar
1	4/4*	3/4**
2	5/5	5/5
3	2/2	2/2
4	5/5	5/5
5	2/2	2/2
6	2/2	2/2
7	3/3	3/3
8	3/3	3/3
9	3/3	3/3
10	1/1	1/1
11	1/1	1/1
12	1/1	1/1
Total	32/32	31/32

* Nos. of growth+/Nos. of strains tested.

** Growth negative strain dose not liquefy gelatin.

腸炎ビブリオ以外のビブリオ菌群に対するこの培地の選択性は Table 5 にみられるごとくであり、*El Tor* コレラ菌のみは、その大部分が本培地上に増殖するが、他種の菌株はほとんど完全に発育が阻害されることを

また、上記の TTGA 培地中のタウロコール酸ソーダ、ゼラチン、亜テルル酸カリの 3 成分について、おのおの独立に増減せしめて Table 2 のごとき 4 種の変法の組合せをつくり、それぞれの培地上における腸炎ビブリオの増殖の状態を検討した。

さらに TTGA 培地を用いて、腹痛、下痢、発熱等を主訴とする食中毒、急性胃腸炎症患者由来の糞便 195 検体について、BTB-Teepol 寒天培地を併用しながら、腸炎ビブリオの分離検出を行ないその成績を比較した。

III 実験成績

1. TTGA 培地上における諸種細菌群の増殖は Table 3, Table 4 に示すごとく、定型的腸炎ビブリオは患者由来株、非患者由来株ともにそのほとんど全菌株が明瞭に増殖することを認めたが、海水由来の腸炎ビブリオ類似菌株においては、その 2/3 が全く発育せず、残りの 1/3 もきわめて弱い増殖がみられるにすぎない。なお、O-1 群の 1 株のみが TTGA 培地上に発育しないのは、本菌株が藤野教授の最初に分離したものであり、長期間の継代培養中に生化学的性状の変化が起り、ゼラチン分解能を失っているために、このような現象が現われたものではないかと思われる。

Table 4. Growth of *Vibrio parahaemolyticus* (2)
(Strains in nature)

O-Type	Origin	BTB-cholate Agar	TTGA Agar
1	Sea water	1/1	1/1
2	Plankton sea mud	3/3	3/3
3	Sea mud	1/1	1/1
4	Plankton sea mud	1/1	1/1
5	Sea mud	1/1	1/1
6	Sea mud	1/1	1/1
8	Food	1/1	1/1
Total		11/11	11/11
Unclassified	Sea water	15/15	9/15(-) 6/15(+)

ノ知った。

また、ビブリオ以外の諸菌群に対する本培地の発育抑制作用は Table 6 に示すごとく、きわめて厳しいものであり、グラム陰性、陽性の諸菌種ともにその増殖を許さなかった。

2. 他種培地との選択性の比較

Table 7 にみられるごとく、TTGA 培地以外の諸培地においては、*Proteus* に対する発育抑制作用が不十分であり、またその他の腸内細菌群についても菌種により相当数の増殖可能な菌株がみられる。これに反して TTGA

Table 5. Growth of *Vibrio* Strains

Strains	BTB-cholate Agar	TTGA Agar
Inaba	2/2	0/2
Ogawa	1/2	0/2
<i>V. mestchnikovi</i>	0/1	0/1
<i>V. proteus</i>	0/1	0/1
<i>V. tyrogenus</i>	0/1	0/1
Water Vibrio	0/1	0/1
<i>El Tor</i> (Inada)	2/2	1/2
<i>El Tor</i> (Ogawa)	10/10	8/10
<i>El Tor</i> (Hikojima)	1/1	1/1
<i>El Tor</i> Total	13/13	10/13

Table 6. Growth of Non-vibrio Groups

Strains	BTB-cholate Agar	TTGA Agar
<i>Staphylococcus aureus</i>	8/8	0/8
<i>Escherichia coli</i>	3/3	0/5
<i>E. freundii</i>	3/3	0/3
<i>E. intermedia</i>	4/4	0/4
<i>Aerobacter aerogenes</i>	4/4	0/4
<i>Salmonella typhimurium</i>	2/2	0/2
<i>Shigella flexneri</i>	0/1	0/1
<i>Proteus vulgaris</i>	3/3	0/3
<i>Prot. rettgeri</i>	3/3	0/3
<i>Prot. mirabilis</i>	3/3	0/3
<i>Prot. morganii</i>	3/3	0/3

Table 7. Comparison of Inhibition Effect

Strains	TTGA	BTB-cholate	BTB-teepol	TCBS	WA	BS
<i>V. parahaem.</i> (Patient-origin)	31/32	32/32	5/9	7/9	7/9	9/9
<i>V. parahaem.</i> (Non-patient-origin)	11/11	11/11	9/10	9/10	10/10	10/10
<i>V. comma</i> and other <i>Vibrio</i>	10/21	16/21	0/2	1/2	0/2	1/2
<i>Salmonella</i>	0/2	2/2	1/2	0/2	1/1	1/2
<i>Shigella</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
<i>Proteus</i>	0/12	12/12	5/7	5/7	6/7	6/7
<i>Escherichia</i>	0/12	10/10	3/4	0/4	4/4	0/4
<i>Aerobacter</i>	0/5	4/4	2/2	0/2	2/2	0/2
<i>Staphylococcus</i>	0/8	8/8	0/3	3/3	0/3	0/3
<i>Bacillus</i>	0/9	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3
<i>Pseudomonas</i>	0/5	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2

培地は前述のごとく、ビブリオ以外の被検菌に対してはほとんど完全な発育阻害作用を示している。

3. TTGA 培地の組成の検討

Table 8 の成績のごとく、腸炎ビブリオは、一般に TTGA 原法のものに最もよい発育を示し、変法培地にはいずれも増殖不良である。とくに O-1 群、O-5 群のものは変法培地にはほとんど発育しない。また、ゼラチン量を原法の 1/2 (5 g/L) に減少せしむるときは被検菌株は全菌株ともに発育不能となることは興味あるところである。

すなわち、タウロコール酸ソーダ 0.5%、ゼラチン 1%、亜テル酸カリ 0.001% の組合せが最も良好な結果を示した。

4. TTGA 培地により患者材料よりの腸炎ビブリオ検出

総数 195 検体の直接培養検査において、BTB-Teepol 寒天培地による腸炎ビブリオの検出数は 31 検体であるのに対し、TTGA 培地を使用した場合の検出数は 35 検体である。また、同一検体群を一応増菌して (3% 食塩加ベ

Table 8. Growth of *V. parahaemolyticus* (patient origin) on Variation Mediums of TTGA Agar

O-Type	TTGA	T-1	T-2	T-3	T-4
1	3/4	0/2	0/2	0/2	0/2
2	5/5	2/2	2/2	1/2	0/2
3	2/2	1/1	1/1	1/1	0/1
4	5/5	2/4	2/4	1/4	0/4
5	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2
Total	17/18	6/11	5/11	3/11	0/11

トン水を用いて 37°, 24 時間培養を行なう) その後腸炎ビブリオの分離を試みた結果、50 検体に陽性の成績を得たので、この検体数を本来の陽性検体数と見なすならば、BTB-Teepol 寒天培地の使用時には 62%、TTGA 培地によるときは 70% の検出率となり、TTGA 培地は BTB-Teepol 寒天培地に比較してすぐれるとも劣らないものであるといえよう。

なお、TTGA 培地上においては、BTB-Teepol 寒天上の集落のごとく、各種の好塩性および非好塩性の細菌の増殖がほとんどないので、一見純培養状にみられ、また釣菌に際し集落選択の必要なく、したがって分離菌の雑菌混入率もきわめて低い。

IV 考察および総括

腸炎ビブリオ分離用の選択培地として従来使用されてきた培地は、いずれも、その組成としてペプトン類を有するために種々の細菌発育阻害物質を添加してもなお、他種の細菌の増殖を許すことが多い。しかるに、著者らの実験の結果、腸炎ビブリオの発育には必ずしもペプトン類の存在を必要とせず、培地中にゼラチンを1%の割に含ませることにより充分旺盛な増殖をみることができたのでさらにこれに、タウロコール酸ソーダ、亜テルル酸カリ等の選択力を併用して新培地(TTGA 培地)を考案した。また本培地を使用して実際に患者材料より腸炎ビブリオの検出を行なっても、従来の培地に比べて、その検出率においてもなんら劣るところなく、むしろ若干高率となることを知った。

しかしながら、ここにおいて、一つの問題となるのは、上述のごとくペプトン類物質の全くないところで果して腸炎ビブリオが発育可能であろうか、という疑問である。この点について検討を進めるために、市販のゼラチン(Difco の製品および本邦製品)をそのままペーパークロマトグラフィーにかけた結果、きわめて少量ではあるがなお若干の種類のアミノ酸類の混在を認めたので、恐らくは、この微量のアミノ酸類によって腸炎ビブ

リオの最初の発育が開始され、それに続いてゼラチンが分解されて行くものではないかと推察される。したがって、アミノ酸類およびペプトン類を全く含有しないゼラチンを用いた場合についてはなお検討を要するが、現在普通に市販されている程度の純度のゼラチンを使用する場合には常にきわめて良好な発育を認めうるものであり、実用上には支障をきたすことはないものと思われる。

V 結 論

著者らはゼラチン1%、食塩3%、タウロコール酸ソーダ0.5%、炭酸ソーダ0.1%、寒天1.5%、亜テルル酸カリ0.001%の組成を有する新培地(TTGA 培地)を考案し、その選択性について検討した結果、腸炎ビブリオ、El Tor コレラ以外の細菌はほとんど完全にその発育を抑制されることを認めた。また、この培地を使用して、実際に、下痢腸炎患者の糞便等の材料について腸炎ビブリオの検出率を従来の BTB-Teepol 培地と比較したが、この新培地は満足すべき成績を示した。

最後に貴重な菌株の御分与を賜った東京水産大学堀江進博士並びに東京検疫所長尾正己博士に深甚なる謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 相磯和嘉, 松野仁, 清水潮, 加藤博, 辰己和世: モダンメディア 7, 91 (1961).
- 2) 秋山昭一, 滝沢金次郎, 一戸治江, 榎本省二, 小林俊一, 坂崎利一: 神奈川県衛生研究所年報 12, 7 (1962).
- 3) 厚生省: 病原性好塩菌食中毒検査要領 (1963).