

## 腸内細菌分離用培地の改良に関する検討—第1報—

宗島 達也<sup>1)</sup> 村上 美子<sup>2)</sup> 矢崎 廣久<sup>3)</sup>Studies on a Selective Medium for Isolating *Shigella* and *Salmonella typhi*

Tatsuya MUNESHIMA, Yoshiko MURAKAMI and Hirohisa YAZAKI

## I はじめに

今日、腸内細菌の分離・同定用の培地は、非常に多くの種類が知られ、試験に供せられている。しかし、分離用培地については、その多くは*Shigella*及び*Salmonella*を目的に開発された培地が中心になっている。これは、臨床医学の分野で両菌群共、腸内病原菌として代表的存在であることから、常に優先的に検索の努力が払われて来たためであろう。従って、より有効な培地の改良は、分離を目的とした検査法開発の必須条件の一つである。

通常、被検材料から*Shigella*や*Salmonella*を分離するために、選択用分離培地としてSS寒天培地(SS培地)、DHL寒天培地、SSB寒天培地、DCLS寒天培地などが使用<sup>1-2)</sup>されているが、いずれの培地についても、類似菌の鑑別にはかなりの熟練を必要とする。例えば、従来から利用度の高いSS培地上で、*Shigella*や*Salmonella*、とりわけ*Salmonella* (*S.*) *typhi*を鑑別することは、類似の集落を呈する*Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*等の存在下では、選択性が困難であり熟練した技術が必要となる。さらに、*Shigella*がR変異を生じて発育した場合、出現集落を同一菌として識別するのは、特に困難なことである。

そこで著者らは、細菌の種類により集落のPHが類似の値を示す点に着目し、選択分離用培地としてのSS培地の長所を生かしながら、なお*Shigella*や*S. typhi*集落を呈色させることにより、分離鑑別能の優れた変法培地の作成を試みた。また、保存菌株を用いた培地試験を行い、その有用性を確かめた。

## II 実験材料及び方法

## 1. 材料

- 1) 千葉県八日市場保健所
- 2) 成田赤十字病院
- 3) 千葉県衛生研究所

寒天、チオ硫酸ナトリウム、クエン酸第二鉄;関東化学製、クエン酸ナトリウム、ニュートラルレッド、ブリアントグリーン、乳糖、白糖;和光純薬製、胆汁酸塩 No.2;栄研製、肉エキス;Oxoid製、ペプトン;Difco製、ブロムチモールブルー (BTB);Merck製、BTB PH試験紙;東洋ろ紙製、

## 2. 培地

## 1) 前培養

ハートインフュージョンブイヨン;日水製

## 2) 分離培地

SS培地;日水、栄研、極東製

## 3. 供試菌株

供試菌株は坂崎<sup>3)</sup>らにならい、標準菌株でなく、千葉県衛生研究所保存株を用いた。その内訳は以下の通りである。

<i>Shigella</i> ( <i>S.</i> ) <i>dysenteriae</i>	1株	59年人由来
<i>S. flexneri</i> 2a	1株	59年人由来
<i>S. flexneri</i> 4a	1株	59年人由来
<i>S. sonnei</i>	I相1株, II相1株	59年人由来
<i>S. typhi</i>	1株	59年人由来
<i>S. paratyphi</i> -A	1株	55年人由来
<i>S. paratyphi</i> -B	1株	55年人由来
<i>S. typhimurium</i>	1株	59年人由来
<i>Citrobacter</i> ( <i>C.</i> ) <i>freundii</i>	4株	58年人由来
<i>Morganella</i> ( <i>M.</i> ) <i>morganii</i>	3株	55年人由来
<i>Alkalescens-Dispar</i> (A-D)	6株	55年人由来

## 4. 方法

## 1) 培養方法

## (1) 菌液の調整

供試菌株は、いずれもハートインフュージョンブイヨンに37°C、一夜前培養の後、生理食塩水で10倍段階希釈を行い、10<sup>-2</sup>~10<sup>-8</sup>希釈液を調整し、接種用菌液とした。

## (2) 培養

培養は、すべてミスラの方法に準じておこなった<sup>3)</sup>。各段階の希釈液毎に平板それぞれ2枚ずつ、マイクロピペットを用いて、培地上の2ヶ所へ1滴ずつ滴下操作を

行った。滴下液の乾燥後、37°C、16～20時間培養して判定を行った。

## 2) 集落のPHの測定方法

培地上の集落のPHの測定は、集落をBTB・PH試験紙に塗抹し、PH試験紙上に現われた色調変化を、標準変色表と照し合わせて行った。

## 3) 市販SS培地を用いた変法培地の作成

本実験に用いた改良変法培地は、市販SS培地にBTB及び白糖を添加し、作成した。変法培地の処方は以下の通りである。

SS培地	60g
BTB	100mg
白糖	10g
精製水	1000ml
PH	7

変法培地の*Shigella*や*S.typhi*に対する選択性及び発育態度などについて、基礎的検討を行なうため、従来から汎用されているSS培地にBTB及び白糖を加える方法で検討を試みた。すなわち、これら2種類の培地に、*S.flexneri 2a*、*S.sonnei*、*S.typhi*を接種して、37°C、16時間培養後に集落の呈色状態を観察し、培養20時間で発育菌数並びに発育態度を観察した。

## 4) 変法培地の組成の検討

### (1) BTB及び白糖の添加量

変法培地の指示薬として用いたBTBの添加量が、培地上の菌株集落に及ぼす発色効果、並びに菌に対する発育抑制作用の有無を調べる目的で、濃度別のBTB添加試験を行なった。添加量は、SS培地1ℓあたりBTB20mg、40mg、60mg、80mg、100mg、120mg、150mgをそれぞれ添加し、これに供試菌として*S.flexneri 2a*、*S.sonnei*、*S.typhi*を接種し、37°Cで16、20、24時間培養の後、呈色に要する試薬量と培養時間、並びに出現した集落数を数え、各濃度毎の菌株の発育状況を観察した。

同様に、培地へ添加する白糖について、至適濃度を決めるため、次の実験を行なった。

あらかじめ、SS培地60gにBTB100mgを加え、精製水1ℓで調整したのち、白糖無添加、並びに0.5%、1%、2%、5%の割合で添加した培地を作成し、それぞれの培地に*S.flexneri 2a*、*S.typhi*、*S.typhimurium*の供試菌を接種、培養し、BTBの添加試験と同じ方法で検討した。

### (2) その他の培地成分

変法培地の構成素材のうち、栄養分及びBTB指示薬以外の添加物成分が、呈色反応並びに培地の選択性に与

える影響を調べるため、以下の操作を行なった。まず寒天13.5g、ペプトン5g、肉エキス5g、BTB100mgを精製水1ℓに溶解したものを基礎培地とし、これにクエン酸ナトリウム8.5g、チオ硫酸ナトリウム8.5g、胆汁酸塩No.2 8.5g、クエン酸第二鉄1.0g、ニュートラルレッド0.025g、ブリリアントグリーン0.00033g、乳糖10g、白糖10gをそれぞれ単独に、あるいは複数成分を漸次組み合わせを変えながら加え、加温溶解し、PHを7に調整後、室温で約2時間乾燥させたプレートに、供試菌液を接種し、37°C、16時間培養後観察を行った。

## 5) SS培地及び変法培地に現われる類似菌及び変異株に対する選択性

従来、SS培地上で*Shigella*、*Salmonella*、*S.typhi*類似集落を呈する*Proteus*、*Citrobacter*、*Morganella*等の類似菌について、変法培地及びSS培地を使った比較試験を行なった。

変法培地、並びに培地上に発育した種々の菌株の中で、*Shigella*と思われる集落、類似の呈色を示す集落、R変異集落及び硫化水素産生集落等について、集落のもつ透明度、色調、PHなど詳細に調査した。

同様に、R変異を生じた*Shigella*についての鑑別能を確めるため、*S.flexneri 2a*及び*S.sonnei*の変異株を用いて検討を行った。

## III 結果

### 1. 変法培地上の供試菌集落

本培地上で発育した*S.flexneri 2a*、*S.sonnei*、*S.typhi*は、ともに透明なS型露滴状の淡黄緑色集落として観察された。集落は、培養後約16時間でほぼ完全な呈色

表1. 変法培地の検討  
— 発育比較試験 —

培地	供試菌	<i>S. flexneri 2a</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. typhi</i>
変法培地		10×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	4×10 <sup>6</sup>
SS培地		11×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>

(37°C, 20時間培養・観察)

が認められ、24時間経過しても安定していた。

表1に示す通り、変法培地の発育菌数及び発育態度は、SS培地上の発育菌とほぼ同程度であった。また、市販のSS培地を原料に用いても、集落の呈色については、メーカーによる差異は認められなかった。

### 2. 変法培地の組成に関する検討

#### 1) BTB及び白糖の添加量

BTB添加量と集落の呈色度合を表2に示した。培地あたりの添加量が40mg/ℓでは、16時間培養後の観察で全菌種に呈色はみられるものの、色調は淡く、60mg/ℓ以上添加された場合、色調の強さは常に安定していた。

表2. BTB添加量についての検討  
— 呈色試験 —

供試菌	BTB(mg/ℓ)						
	20	40	60	80	100	120	150
<i>S. flexneri</i> 2a	-	±	+	+	+	+	+
<i>S. sonnei</i>	-	±	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	-	±	+	+	+	+	+

- : 呈色しない (37°C, 16時間培養・観察)  
± : 呈色するが淡く弱い  
+ : 呈色する

表3. BTB添加量についての検討  
— 発育比較試験 —

供試菌	添加量(mg/ℓ)		
	0	80	150
<i>S. flexneri</i> 2a	$17 \times 10^7$	$15 \times 10^7$	$20 \times 10^7$
<i>S. sonnei</i>	$18 \times 10^7$	$21 \times 10^7$	$17 \times 10^7$
<i>S. typhi</i>	$12 \times 10^6$	$9 \times 10^6$	$15 \times 10^6$

(37°C, 20時間培養・観察)

表3は、BTB添加による発育抑制阻害をみた成績であるが、150mg/ℓ濃度においても供試菌に何ら影響はなかった。したがって、培地作成上の容易さも考慮に入れ、変法培地のBTB量は100mg/ℓとした。

白糖については、添加の有無により*Shigella*の発育性状に多少の差はみられるものの、無添加～5%添加のいずれの濃度でも、出現集落数に顕著な差は認められなかった。そこで、変法培地では、乳糖非分解又は遅分解菌で白糖分解のものについて、通常必要十分とされている1%濃度の白糖を加えることとした。

2) その他の培地組成

添加物的な性格を持つその他の培地組成を漸次組合せ添加した培地上で、菌株の発育状況並びに集落の色調を調べた結果、いずれも発育状況に顕著な差はみられなかったが、呈色効果はそれぞれ異っていた。表4に示す通り、*S. flexneri* 2a、*S. sonnei*、*S. typhi*が淡黄緑色(YGと略)を保つために、BTBのほかクエン酸ナトリウム、胆汁酸塩No.2及びチオ硫酸ナトリウムの必要性が明らかになった。

3. 培地上の類似菌及び変異株に関する選択性

SS培地上で無色透明な集落を生じる類似菌と*Shigella*

表4. 培地構成成分と集落の色調

B T B	Agar	Peptone	Meat extract	Sodium Citrate	Bile Salts No.2	Sodium Thiosulfate	Iron(III) Citrate	Neutral red	Brilliant green	Lactose	Saccharose	集 落 の 色 調		
												<i>S. flexneri</i> 2a	<i>S. sonnei</i>	<i>S. typhi</i>
■												※ YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												赤橙白色	赤橙白色	赤橙白色
■												黄緑色金属光沢	赤橙白色	青緑灰色
■												緑～緑青色	YG(濁)	緑青色
■												YG	青黄緑色	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												YG	YG	淡青～青色
■												赤橙白色	赤橙白色	赤橙白色
■												黄緑色金属光沢	赤橙白色	青緑灰色
■												緑青灰白色	赤橙白色	黄緑色濁

(37°C, 16時間培養・観察)

■ : 添加組合わされた培地成分  
※ YG : 淡黄緑色

及び*S. typhi*を、変法培地上で培養し、それらの集落が示す特徴を表5に掲げた。PH試験紙の実測値から明らか様な様に、これら類似菌集落のPHは、*Salmonella*も含め大部分7.0～7.5であったが*Shigella*及び*S. typhi*は

6.6を示した。

各菌株ごとにみられた集落の色調は、*S. paratyphi-A*、*S. paratyphi-B*を含む*Salmonella*が青色系を呈するのに対し、*Citrobacter*や*Proteus*は、無色又は灰

表5. 類似菌の検討  
— 発育した集落の特徴 —

菌名	区分	透明度	色調	集落のpH
<i>Shigella</i>		高	淡黄緑色	6.6
<i>S. typhi</i>		高～やゝ濁	淡黄緑色	6.6
<i>S. paratyphi</i> - A		高	淡青～青色	7.4
<i>S. paratyphi</i> - B		高	淡青～青色中心黒	7.4
<i>Salmonella</i> sp.		高	淡青～青色中心黒	7.4
<i>Citrobacter</i>		高	無色～淡青色中心黒	7.4～7.5
<i>Proteus</i>		濁	灰白～灰白青色	6.6～7.4
A - D		高	淡緑青～青緑色	7.0～7.2

白色～淡い青色系の混濁集落として、A-Dは、淡い緑青色集落として観察された。

R変異を生じた*Shigella*は、変法培地上で同菌のS型集落を脱水・濃縮した様な形態で、扁平、不透明な淡黄緑色集落を示した。

一方、変法培地上で類似色集落を生じた*M.morganii*は、検出頻度の低い菌ではあるが、黄緑色不透明な集落として認められ、R変異*Shigella*と同様の呈色をした。しかし、同菌の集落は*Shigella*より小さかった。

#### IV 考察

今回試作した変法培地は、SS培地にスルホンフタレイン系PH指示薬BTBを添加し、集落のPHが共に6.6の値を示す*Shigella*及び*S. typhi*を呈色させて、分離鑑別効果のある培地<sup>19)</sup>とした。さらに、これらの菌株に淡黄緑色の集落を発現させる原因物質は、BTBだけでなく、クエン酸ナトリウム、胆汁酸塩No.2及びチオ硫酸ナトリウムも関与していることが判明した。従来から、これらの成分は、胆汁酸塩の主成分であるデオキシコール酸塩との相乗作用により、グラム陽性菌等の発育阻害を生じて、培地の選択性を高める物質と考えられていた。ところが、今回これらの物質は、BTB指示薬の発色に際しては、緩衝剤として呈色安定性に寄与していることが推察された。

ニュートラルレッドは、本来培地構成々分としてSS寒天培地に含まれているが、これを原料に用いた変法培地についても、乳糖・白糖分解菌を赤変するのに役立つ、その鑑別能は元のSS培地とほぼ同等であった。

また、変法培地では、添加した白糖の影響で、大腸菌の一部に抑制力が弱まる傾向がみられたが、逆に*Shigella*は、発育が良くなるものも認められた。

#### V まとめ

細菌の種類により、集落のPHが類似の値を示す点に着目し、*Shigella*や*S. typhi*などが特異的な淡黄緑色集落に呈色する変法培地を作成した。変法培地の処方、SS培地60g、BTB100mg、白糖10gを精製水1ℓに溶し、PH7に調整した。作成培地は、集落の透明度、発色度合、菌株の発育態度など調べたところ、特に良好な分離鑑別能を示した。また本培地は、選択用分離培地としてのSS培地の長所を持ちながら、なお*Shigella*や*S. typhi*集落の呈色により、SS培地上では類似の集落を生ずる*Proteus*、*Citrobacter*、*Morganella*及び*Salmonella*等の菌株との鑑別は容易であり、さらにR変異を生じた*Shigella*も識別できた。

#### 謝辞

本研究の一部は、昭和59年度千葉県衛生研究所特別研修として行なわれた。研修受講の尊い機会を賜った、千葉県衛生部医務課の御厚意に感謝いたします。

本研究を行なうにあたり、貴重な御助言・御校閲をいただいた、衛生研究所、太田原美作雄所長、七山悠三次長、また終始あたたかい御支援をいただいた銚子保健所、渡辺 佐所長、銚子土木事務所、林 利次長、及び八日市場保健所、関係職員の皆様に深謝いたします。更に、供試菌株の収集及び培地調製にあたり、献身的な御援助・御協力をいただいた衛生研究所細菌研究室、室員の方々、成田赤十字病院、武田雅子氏、武田玉子氏、並びに日水製薬㈱、藤村重晴博士、庭野清司博士に深く感謝いたします。

文献

- 1) 坂崎利一, 1978: 新細菌培地学講座(上, 下), (1版), 近代出版(東京), PP850.
- 2) 坂崎利一, 1979: 腸内細菌(I~IV), 近代出版(東京), PP696.
- 3) 坂崎利一, 1965: 培地学総論, 一成堂(東京), P71~80.
- 4) 宗島達也: 腸内細菌分離培地とその処方, 特許庁公開公報, 42553号, 1980.
- 5) 宗島達也: 腸内細菌分離用培地(TM寒天培地)の検討(第1報), 第19回関東甲信臨床衛生検査学会抄録集, P39, 1982.
- 6) 宗島達也: 腸内細菌分離用培地(TM寒天培地)の検討(第2報), 第20回関東甲信臨床衛生検査学会講演集, P105, 1983.