

事 務 連 絡
平成 1 4 年 1 月 9 日

各 { 都道府県
政 令 市
特 別 区 } 衛生主管部（局）
食品衛生担当課 御中

厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課
送信枚数 1 7 枚（本紙を含む）

赤痢菌の試験法について

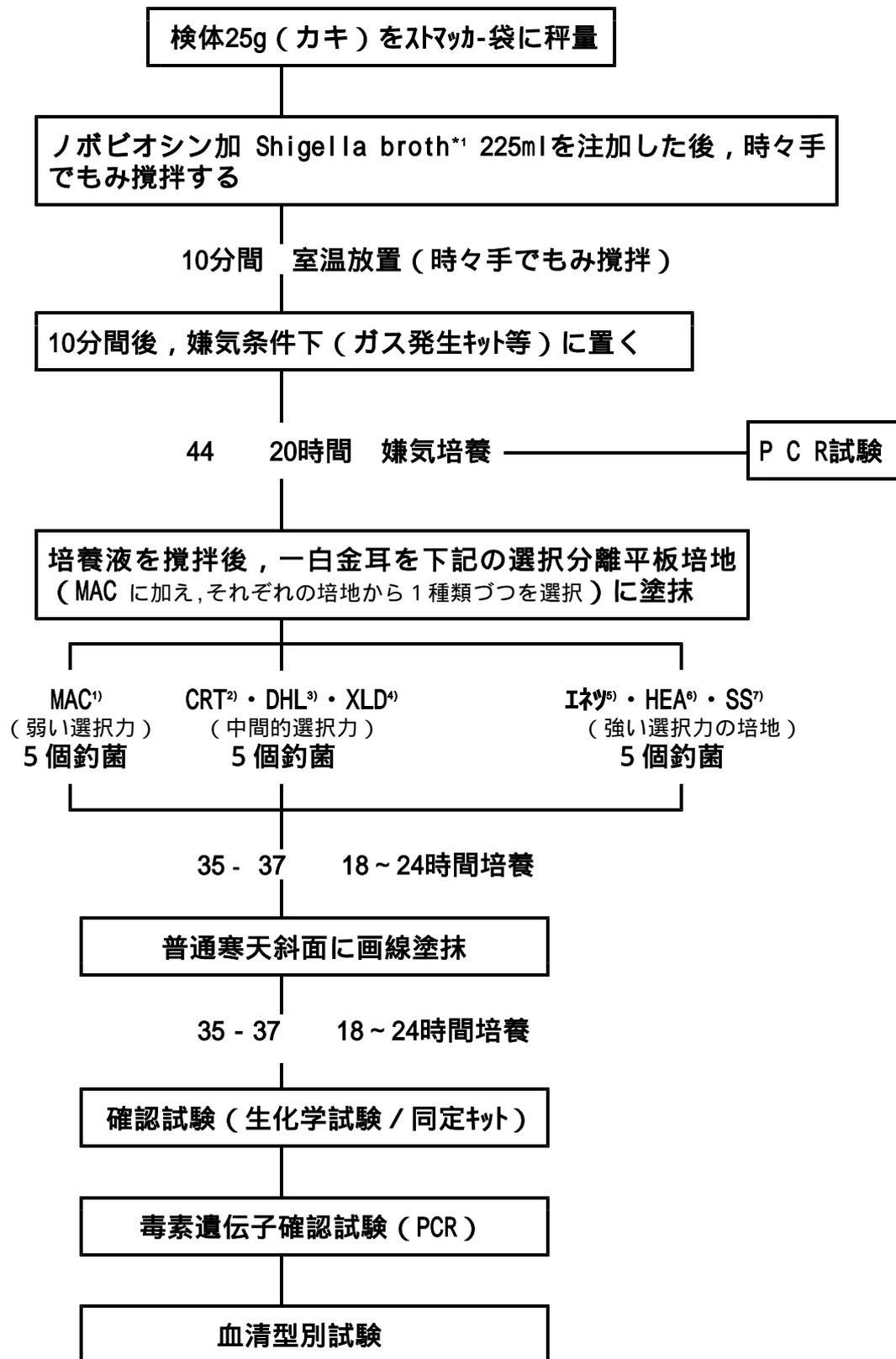
平成 1 3 年 1 1 月下旬から西日本を中心に、3 0 都道府県、1 5 9 名（同年 1 2 月 2 7 日午後 6 時現在）の赤痢菌患者の発生が報告され、当課から同月 2 8 日に患者が喫食したと考えられる韓国産かき及び患者から分離された赤痢菌と同一の P F G E パターンを有する赤痢菌が検出されたことをお知らせしたところです。

食品からの赤痢菌の検出については、従来から困難とされているところですが、本事件において国立医薬品食品衛生研究所が実施した検査方法を参考までに送付しますので、同様の事件が発生した際には活用されるようお願いいたします。

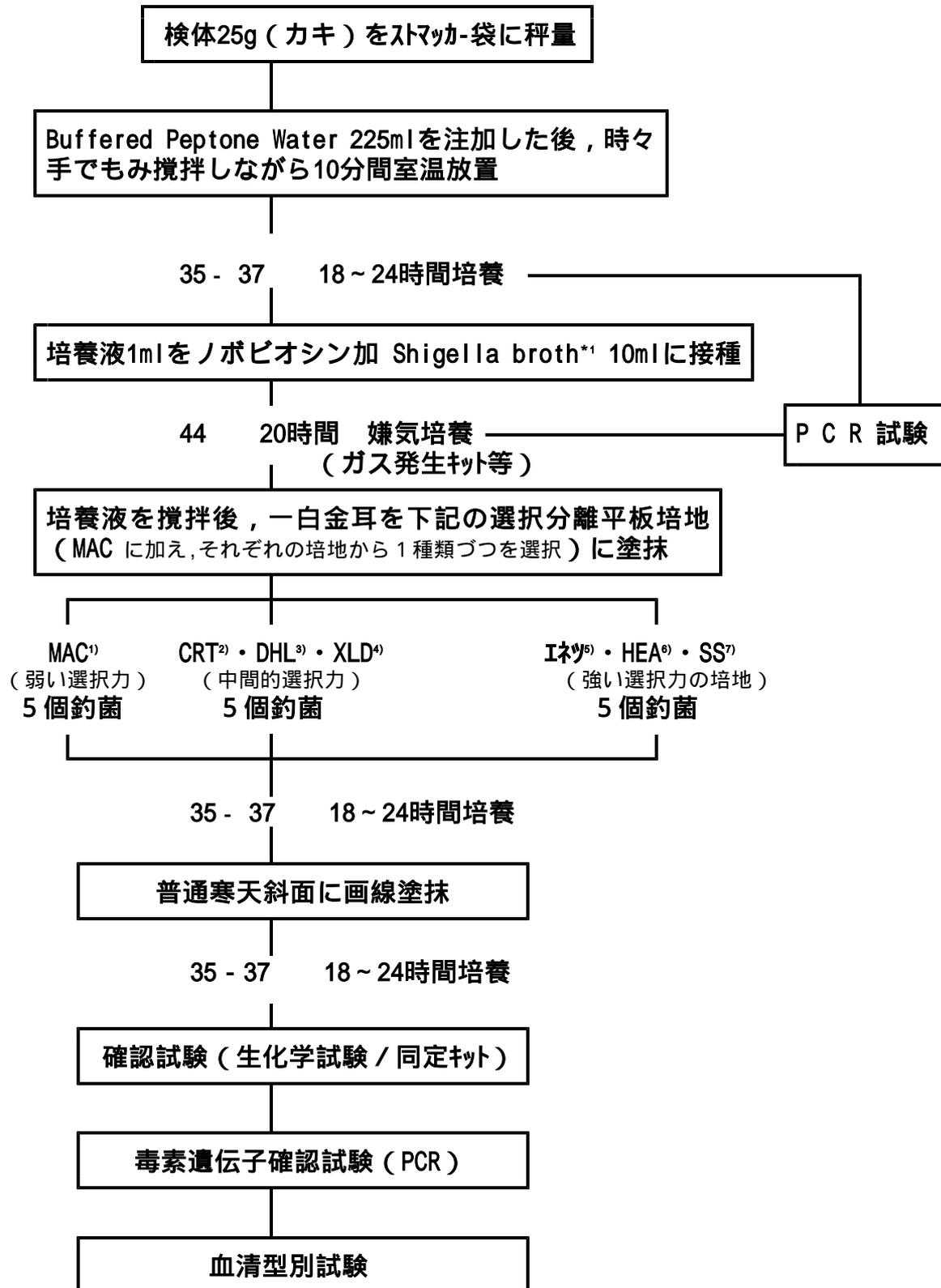
なお、食品中の赤痢菌の検出方法については、今年度の厚生科学研究でさらなる検討を行っているところであり、最終的な結論が提出された段階で、改めて各都道府県等に対して通知する予定です。

監視安全課食品安全係
TEL:03-5253-1111(内 2478)
直通 TEL:03-3595-2337
FAX:03-3503-7964

Shigella sonneiの試験法（1）



冷凍カキの *Shigella sonnei* 試験法 (2)



赤痢菌 (*Shigella sonnei*) の検査法解説

1 . 検体の採取

1) 食品の場合は 200g以上を採取する . なお , 表面汚染が考えられる食品は , 表面部 300 ~ 500cm² を厚さ 0.2 ~ 0.3mm に削り検体とする .

2) 水の場合は , 蛇口をアルコール綿等で殺菌後 3 L 以上を採水する . 水槽から直接採水する場合は , 柄杓 (ヒシャク) 等を使用する . なお , 塩素消毒した水はチオ硫酸ナトリウムで中和する .

2 . 試料の調製

1) 食品

採取した検体の全体を細切 , 混和後 , その 25g をストマッカ - 袋 (ピペットが目詰まりするような検体ではフィルタ - 機能のあるものを使用) に秤量して試料とする .

2) 水

採取した検体の 3 L をメンブレンフィルタ - (ポアサイズ 0.45 μ m) により濾過する . フィルタ - が途中で目詰まりした場合は新しいフィルタ - を追加使用する . なお , 検水が成分の違い , 汚濁の状態などから 1 枚のフィルタ - ではろ過できない場合は , 水試料 (3 L) を適宜小分けする .

3) 陽性対照の作製方法と使い方

赤痢菌 (*Shigella sonnei*) 株 (普通寒天斜面保存株) の一白金耳を T S B (3mL) に接種 , 35 ~ 37 で 18 時間培養する . この培養液 1 mL を 0.1% ペプトン加滅菌生理食塩水 (9 mL) を用いて 10⁻⁵ 倍希釈する . この 10⁻⁵ 倍希釈液 1 mL を , さらに 40mL の 0.1% ペプトン加滅菌生理食塩水で希釈した菌液を試料とする . 本試料 200 μ L を検体 25g に接種し陽性対照とする . 陽性対照に用いる菌株は , P F G E (D N A パタ - ン) が確認されているものを用いること .

3 . 増菌培養

1) 食品

ストマッカ - 袋中の試料に増菌培地 225mLを注加した後，時々手揉みしながら 10 分間室温放置する（ストマッカ - 処理はしない）. 室温放置後，増菌培地が B P W の場合は，35～37 で 18～24 時間 好気培養 する．増菌培地が Shigella broth の場合は 44 で 18～24 時間 嫌気培養 する．ただし，食中毒検体の検査にあたっては，検査検体数を増やしたり，一次および二次増菌に加え，Shigella broth を用いた三次増菌やピ - ス法などの導入に加え，分離平板培地の種類を増やすなどの工夫が必要と思われる．

2) 水

濾過したフィルタ - を必要に応じ細切し，中試験管など適当な滅菌容器に入れ，増菌培地が B P W の場合は培地 15mL を注加して 35～37 で 18～24 時間 好気培養 する．増菌培地が Shigella broth の場合は培地 15mL を注加して 44 で 18～24 時間 嫌気培養 する．

4 . 増菌用培地

1) B P W (Buffered Peptone Water) (OXOID, MERCK, 栄研, その他)

ペプトン	10.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸 2 ナトリウム	4.0g*
リン酸 1 カリウム	1.5g*
蒸留水	1,000mL

pH 7.2 ± 0.1

: 121 で 15 分間滅菌後 40 程度に冷却し使用する．*リン酸緩衝剤の配合は，培地メ - カ - によってまちまちであるが，担当者の好みで選択しても差し支えない．

2) Shigella broth (自家調製, OXOID)

組成：

トリプトン	20.0g
リン酸水素二カリウム	2.0g
リン酸二水素カリウム	2.0g
塩化ナトリウム	5.0g

グルコース	1.0g
Tween80	1.5mL
ノボピオシン	0.5mg
精製水	1000mL
pH	7.0 ± 0.2

：ノボピオシン以外のすべての組成（31.5g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて溶解する．121 °C・15 分間オートクレーブする．ノボピオシン 50mg を 1 L の精製水に溶解し，0.2 μm のメンブランフィルターでろ過滅菌する．調製したノボピオシン溶液は，滅菌した培地 225mL に 2.5mL の割合で添加する（ISO ではノボピオシン 25.0mg を 1 L の精製水で溶解し，5 mL を添加する事になっている）．Tween80 の比重は 1.08 であるため 1.5g/L の添加でも良い．

嫌気培養

- ・嫌気ジャー（OXOID, MERCK, BBL, 三菱化学, その他）
- ・嫌気性菌用ガス発生キット（OXOID, BBL, 三菱化学, その他）

嫌気ジャーを用いた嫌気培養

嫌気性菌用ガス発生キットを嫌気ジャーにセットする．触媒が必要な場合はこれも同時にセットする事．

培養する検体を嫌気ジャーに入れる．

嫌気性指示薬を嫌気ジャーにセットする．

嫌気性菌用ガス発生キットを活性化し，嫌気ジャーにセットする．

ジャーを密閉し，インジケータの色で，嫌気となっている事を確認してから，44 °C で 20 時間培養する．

5 . 分離培養

一般に，標的菌（赤痢菌：*Shigella sonnei*）を分離しようとする場合には，多くの単離集落が出現するように塗抹することである．また，使用する分離培地の種類や平板数を増やしたり，あるいは増菌培養液を希釈するなどの操作を行うことが重要である．釣菌する集落は，疑わしい集落をできる限り多く釣菌しないと，標的菌を得ることは難しい．分離用培地としては，以下のものが利用できるが，培地組成はメ - カ - により若干異なっているので，それ

それぞれの研究室あるいは検査室で日常使い慣れた培地を用いることを薦める。はじめて使用するところでは、標準菌を各分離培地に接種して、集落の大きさ、色調、形状などを確認しておくこと。

1) MAC : MacConkey Agar No.3 (OXOID, Difco, 栄研, 日水, その他)

組成

ペプトン	20.0g
乳糖	10.0g
胆汁酸塩 No.3	1.5g
塩化ナトリウム	5.0g
ニュートラルレッド	0.03g
クリスタルバイオレット	0.001g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL
pH	7.1 ± 0.2

: すべての組成 (51.5g/L) をフラスコに入れ、1 L の精製水を加えて加温溶解する。溶解後、121 °C・15 分間オートクレーブした後、50 °C ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する。

2) CRT : CHROMagarO157TAM (CHROMagar; 関東化学)

組成

ペプトンと塩化ナトリウム	31.5g
カンテン	12.0g
特殊色素混合物	1.0g
精製水	1000mL
pH	7.2

: すべての組成 (44.5g/L) をフラスコに入れ、1 L の精製水を加えて加温溶解する。溶解後、50 °C ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する。オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない。

3) DHL Agar (日水, 栄研, OXOID, MERCK, その他)

組成

肉エキス	3.0g
------	------

ペプトン	20.0g
乳糖	15.0g
白糖	10.0g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0g
チオ硫酸ナトリウム	2.3g
クエン酸ナトリウム	1.0g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0g
ニュートラルレッド	0.03g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL
pH	7.0 ± 0.2

：すべての組成（63.3g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，50 ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する．オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない．

4) XLD Agar (OXOID, 栄研, Difco, MERCK, その他)

組成

酵母エキス	3.0g
乳糖	7.5g
白糖	7.5g
キシロース	3.75g
塩酸リジン	5.0g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム	6.8g
クエン酸鉄アンモニウム	0.8g
フェノールレッド	0.08g
カンテン	12.5g
精製水	1000mL
pH	7.4 ± 0.2

：すべての組成（52.9g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，50 ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する．オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない．

5) エネツ : Salmonella Agar acc. to Onoz (MERCK)

組成

酵母エキス	3.0g
肉エキス	6.0g
肉ペプトン	6.8g
乳糖	11.5g
白糖	13.0g
胆汁酸塩混合物	3.825g
クエン酸ナトリウム	9.3g
チオ硫酸ナトリウム	4.25g
L-フェニルアラニン	5.0g
クエン酸鉄	0.5g
硫酸マグネシウム	0.4g
ブリリアントグリーン	0.00166g
ニュートラルレッド	0.022g
アニリンブルー	0.25g
メタクロムイエロー	0.47g
リン酸水素二ナトリウム	1.0g
カンテン	15.0g
精製水	1000mL

pH 7.1 ± 0.2

: すべての組成 (80.5g/L) をフラスコに入れ , 1 L の精製水を加えて加温溶解する . 溶解後 , 50 ぐらいまで冷却し 20mL ずつ滅菌シャーレに分注する . オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない . 本培地は溶けにくいので注意すること .

6) HEA : Hektoen Enteric Agar (OXOID, Difco, その他)

組成

プロテオースペプトン	12.0g
酵母エキス	3.0g
乳糖	12.0g
白糖	12.0g

サリシン	2.0g
胆汁酸塩 No.3	9.0g
塩化ナトリウム	5.0g
チオ硫酸ナトリウム	5.0g
クエン酸鉄アンモニウム	1.5g
酸性フクシン	0.1g
プロモチモールブルー	0.065g
カンテン	14.0g
精製水	1000mL
pH	7.5 ± 0.2

：すべての組成（76.0g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，50 ぐらいまで冷却し 20mL づつ滅菌シャーレに分注する．オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない．本培地は溶けにくいので注意すること．

7) SS Agar : Salmonella Shigella Agar(OXOID ,日水 ,栄研 ,MERCK , Difco)

組成

肉エキス	5.0g
ペプトン	5.0g
乳糖	10.0g
胆汁酸塩	8.5g
クエン酸ナトリウム	8.5g
チオ硫酸ナトリウム	8.5g
クエン酸鉄	1.0g
ブリリアントグリーン	0.00033g
ニュートラルレッド	0.025g
カンテン	13.5g
精製水	1000mL
pH	7.0 ± 0.2

：すべての組成（60g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，50 ぐらいまで冷却し 20mL づつ滅菌シャーレに分注する．オートクレーブを用いた滅菌は行ってはいけない．

6 . 確認培養

分離平板培地上に発育した赤痢菌 (*Shigella sonnei*) と疑われる集落を釣菌して普通寒天斜面培地に接種し, 35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養する. この培地を基株としてグラム染色, チトクロ - ムオキダ - ゼおよびカタラ - ゼ試験を行う. また, 普通ブイヨンに接種, 培養後, 本培養液を T S I 斜面寒天培地, L I M 培地, ブドウ糖加普通ブイヨン (ダ - ラム管入り), オルニチン培地 (メラ -), シモンズクエン酸塩斜面寒天培地およびアセテ - ト斜面寒天培地にそれぞれ接種し, 35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養する. 培養後, T S I 斜面寒天培地では高層部黄変, 斜面部赤変 (黄変の場合あり) 硫化水素陰性, 糖からのガス産生陰性 (T S I で糖からのガス産生の有無を判定することもできるが, 糖の種類を特定するのは困難), ブドウ糖からのガス産生陰性, L I M 培地では運動性なし, インド - ル陰性, 硫化水素陰性, リシンデカルボキシラ - ゼ陰性, オルニチンデカルボキシラ - ゼ陽性, クエン酸塩培地陰性およびアセテ - ト培地陰性の菌株を赤痢菌陰性と確定し, 血清学的試験を行う.

赤痢菌 (*Shigella sonnei*) の主な生化学性状

グラム染色	(-)
チトクロ - ムオキダ - ゼ	(-)
カタラ - ゼ	(+)
運動性	(-)
インド - ル	(-)
リシンデカルボキシラ - ゼ	(-)
ブドウ糖からのガス産生	(-)
乳糖分解性 (-) 陽性の場合あり	(-)
白糖分解性 (-) 陽性の場合あり	(-)
硫化水素産生	(-)
オルニチンデカルボキシラ - ゼ	(+)
クエン酸塩	(-)
アセテ - ト培地	(-)

インド - ル試験 (コバックの方法):

培養を終了したLIM培地で運動性およびリシンデカルボキシラゼの陽性陰性を観察，記帳した後，LIM培地にクロロホルム約1mLを重層する（浸透してはならない）．次に，コバックの試薬約1mLを滴下する．陽性の場合にはクロロホルム層が赤色となる．大腸菌は陽性であるが，赤痢菌は陰性で赤変しない．

コバックの試薬は，パラジメチルアミノベンツアルデヒド5gをアミルアルコールまたはイソアミルアルコール75mLに溶かし，さらに濃塩酸25mLを加えてつくる．冷蔵庫で保存すれば長期間使用できる．

チトクロムオキシダゼの確認法：

寒天平板培地上の赤痢菌と思われる集落を楊子で釣菌し，その菌苔を精製水でわずかに湿らせた試験用濾紙上にこすり付着させる．チトクロムオキシダゼ陽性菌は，1分以内に被検菌の付着部分が深青色を呈する．陰性菌は変化しない．色の変化が明確で無い場合は，楊子またはガラス棒を用いて再度行う．

- ・ オキシダーゼ鑑別用スティック（OXOID：関東化学 No.714064-1）
100本 定価 6,800円
- ・ オキシダーゼテスト（BBL：No.261181）50個 定価 7,500円

カタラゼ試験法：

寒天平板培地上の赤痢菌と思われる集落を楊子で釣菌し，その菌苔をスライドグラスあるいは窓ガラス用ガラスに付着させる．付着させた部分に3%過酸化水素水をガラスのキャピラリーチューブあるいは注射器（1mL）で吸い上げ一滴滴下する．カタラゼ陽性菌は，気泡を産生するが陰性菌は気泡の産生がない．

A) LIM培地（日水，栄研，MERCK，その他）

組成

ペプトン	12.8g
酵母エキス	3.0g
ブドウ糖	1.0g
L-リジン塩酸塩	10.0g
L-トリプトファン	0.5g
ブロムクレゾールパープル	0.02g
カンテン	2.7g

pH 6.8 ± 0.1

：すべての組成（30g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．小試験管に分注し，121 °C・15 分間オートクレーブ後，急冷し高層培地とする．

B) TSI 培地（OXOID, 日水, 栄研, MERCK, その他）

組成

肉エキス	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
ペプトン	15.0g
乳糖	10.0g
白糖	10.0g
ブドウ糖	1.0g
クエン酸第二鉄	0.2g
チオ硫酸ナトリウム	0.2g
フェノールレッド	0.02g
カンテン	15.0g

pH 7.4 ± 0.2

：すべての組成（61.4g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，小試験管に分注し 121 °C・15 分間オートクレーブした後，斜面培地とする．

C) オルニチン培地（メラー）（栄研, その他）

組成：

ペプトン	5.0g
肉エキス	5.0g
リン酸ピリドキサール	5.0mg
ブドウ糖	0.5g
L-オルニチン塩酸塩	10.0g
ブロムクレゾールパープル	0.02g
クレゾールレッド	0.01g

pH 6.0 ± 0.1

：すべての組成（60g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，小試験管に2～3mL分注し121・15分間オートクレーブする．

D) シモンズ・クエン酸培地（栄研,OXOID,MERCK,日水,その他）

組成：

リン酸二カリウム	1.0g
リン酸一アンモニウム	1.0g
クエン酸ナトリウム	2.0g
硫酸マグネシウム	0.2g
塩化ナトリウム	5.0g
ブロムチモールブルー	0.024g
カンテン	15.0g

pH 6.7 ± 0.1

：すべての組成（24.2g/L）をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．小試験管に分注し121・15分間オートクレーブした後，斜面培地とする．

E) Acetate agar（自家調整）

組成：

酢酸ナトリウム	2.0g
塩化ナトリウム	5.0g
硫酸マグネシウム(7水塩)	0.2g
リン酸一アンモニウム	1.0g
リン酸水素二カリウム	1.0g
ブロムチモ - ルブル -	0.08g
寒天	20.0g
蒸留水	1,000mL

p H 6.7 ± 0.1

：硫酸マグネシウムを除いた全ての組成をフラスコに入れ，1 L の精製水を加えて加温溶解する．溶解後，硫酸マグネシウムを加えp H 6.7 に調整する．作製した Acetate agar を8 mL ずつ中試験管に分注・綿栓(シリコ栓，モルトン栓，その他)し121・15分間オ - トクレ - ブした後，斜面部が5cm

になるように斜面寒天にする。

Acetate agar 陽性菌 (*E. coli*) および陰性菌 (*S. sonnei*) を本培地斜面に接種し、35～37℃・24～72 時間培養する。培養後、陽性菌は斜面部あるいは培地面全体が濃青色(藍色)となる。陰性菌では変化しない。

：35～37℃・24～72 培養後、変化がみられない場合でも即、陰性とせずに7日間培養することを薦める。

7.血清学的試験

赤痢菌は、1949年のEwingの提案を基礎とする国際腸内細菌型別小委員会勧告(1984年)に従って、生化学的性状と菌体抗原(O抗原)を用いた血清学的性状によって分類され、志賀赤痢菌(*Shigella dysenteriae*, A亜群)、フレキシネル赤痢菌(*Shigella flexneri*, B亜群)、ボイド赤痢菌(*Shigella boydii*, C亜群)およびソンネ赤痢菌(*Shigella sonnei*, D亜群)の4種類に分けられている。

さらに、*S. dysenteriae* は型抗原により12血清型に、*S. flexneri* は型抗原と群抗原により6血清型・13亜型に、*S. boydii* は型抗原によって18血清型に分けられている。

S. sonnei の血清型は1種である、いわゆるO抗原のS-R変異に伴い 相(スム-ス：S型)と 相(ラフ：R型)に区別される。

試験方法

生化学的試験により赤痢菌と同定された菌株を普通ブイヨンに接種し、35～37℃・18～24時間で好気培養後、普通寒天平板培地に画線塗抹し同様に好気培養し純培養菌であることを確認する。その平板から5～6集落を掻き取り、0.5mL生理食塩水に均一に浮遊させ抗原液とする。

スライド凝集法

ガラス鉛筆でスライドガラスあるいは窓用透明ガラスを区分けし、区画毎に各多価血清及び生理食塩水(30μL)滴下する。それに抗原液の1白金耳(またはマイクロピペットで5～10μL)をおき、よく混和する。スライドガラスあるいは窓ガラスを前後に傾斜させながら凝集の有無を観察する。

因子血清

多価血清で陽性と判定された場合は、その多価血清を構成する因子血清を用いて同様に試験する。

結果の判定

凝集の観察は，透過光下で行う．最初に，凝集抗原が生理食塩水との反応で凝集していないことを確認する．各血清との反応では，1分間以内の強い凝集が観察されたものだけを陽性とする．

：赤痢菌の中には生菌で型別不能な株がある．赤痢菌と同定された株が多価血清で陰性の場合には，上記と同様に5～6集落を掻き取り，3mLの生理食塩水に浮遊させた後，121・15分間，または100・60分間加熱処理をする．加熱後，3000回転10分間遠心後，上清を捨て，沈渣に0.5mLの生理食塩水を加え均一に浮遊させ抗原液とする．その後の方法は，上記の通りとする．

複数の多価血清に陽性を示したり，複数の血清型に陽性を示した場合は，純培養菌であることを確認した後，生化学性状を再確認した後，加熱抗原を調整して再試験すること．また，多価血清のみで赤痢菌の推定を行わないこと．

8. 赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子のPCRによる検出

ipaH 遺伝子は，ゲノムあるいはプラスミドのいずれかに存在すると言われており，ほとんどの赤痢菌株はこの遺伝子が陽性であるが，その機能はわかっていない．*InvE* 遺伝子はプラスミド上にある侵入性遺伝子ですので，脱落する場合がある．*ipaH* 遺伝子陽性株のうち，約50%が *invE* 遺伝子陽性株と言われている．また，これらの遺伝子を検出しても，赤痢菌と大腸菌の区別はつかないので，他の生化学的性状での判定が必要である．

PCRのための検体DNA液調整

ブロスによるPCR

培養液1mLを1.5mLチューブに採取し，5,000rpmで2分間遠心後，上清を捨て（感染性ある場合もあるので分離した液は滅菌すること，ピペット等で培養液をできるだけ取り去ること），滅菌蒸留水100μLを加えて，攪拌後，95℃，5分間加熱後，13,000rpmで10分間遠心し，上清液を分離使用する．

コロニーでのPCR

1.5mLチューブに100μL滅菌水を入れ，コロニーを白金線で採取懸濁させ，95℃の加熱からと同様に処理する．

PCR のやり方

TaKaRa の Ex Taq と TaKaRa 特殊細菌検出用 Primer Set(赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 *invE* および *ipaH* 遺伝子検出用)を使用する .

PCR 試薬

TaKaRa Ex Taq (RR001)

Primer Set

TaKaRa *invE* 遺伝子検出用 Primer Set INV-1/2 (S016)

TaKaRa *ipaH* 遺伝子検出用 Primer Set IPA-1/2 (S017)

反応液組成

X10 Ex Taq 添付 Buffer	2 μ L
添付 dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ L
primer INV-1	0.2 μ L
primer INV-2	0.2 μ L
primer IPA-1	0.2 μ L
primer IPA-2	0.2 μ L
Ex Taq	0.1 μ L
滅菌蒸留水	14.1 μ L
Template DNA (検体 DNA 液*)	1 μ L

*上記 , 検体 DNA 液調整 , で調整した検体 DNA 液を使用 .

PCR 条件

熱変性	94	30 秒間
アニーリング	55	30 秒間
伸長	72	30 秒間

以上を 35 cycles . その後 , 72 7 分間伸長後に 4 に温度を下げて終了 .

結果判定

2%アガロースによる電気泳動の結果 , 目的の遺伝子 INV-1/2 Primer Set によって 293 bp の , IPA-1/2 Primer Set によって 242 bp の長さの DNA バンドが出現したものを陽性とする . *ipaH* は赤痢菌及び腸管侵入性大腸菌の存在を , 病原因子では *invE* の存在が必要であることから , 判定材料として考える .