


---

# 腸炎ビブリオ簡易検出紙の 性能試験とその使用法

元 埼玉県衛生研究所食品衛生部長  
医学博士 渡 辺 昭 宣

 サン化学株式会社発行

---

# 目 次

はじめに .....	1
1. 使用目的と特長 .....	2
2. 検出紙の性能試験 .....	3
1) 実験方法 .....	3
2) 実験結果 .....	4
3. 腸炎ビブリオ簡易検出紙の結果に対する評価 .....	7
4. 腸炎ビブリオ簡易検出紙の使い方 .....	8
5. 滅菌綿棒の使用法 .....	10
6. 培養と判定 .....	11
7. 使用上の注意 .....	11
あとがき .....	12

元埼玉県衛生研究所食品衛生部長

医学博士 渡 辺 昭 宣

## はじめに

腸炎ビブリオ食中毒は、わが国で発生する細菌性食中毒のうち、最も発生頻度の高い食中毒である。

それは、腸炎ビブリオが海水、海底の泥土や砂、プランクトン及び魚介類などに広く分布する海水性細菌であるため、魚介類及びその加工品を多く副食とする日本人には当然のこと本菌による危害をうける割合が高いことになる。

とくに、海水温が20℃以上になると海水中での本菌生菌数が増加し、夏季に捕獲される魚介類でも、とくに近海魚の体表、エラ、腸などから高率に検出されるゆえんである。また、滝川博士が昭和30年の横浜国立病院内で発生した“キウリの塩漬け”による食中毒を報告した例では、魚介類を調理した器具で野菜を料理したためにおきた典型的二次汚染食中毒で、これは本菌の好塩性と発育分裂時間が約10分というサルモネラや大腸菌の約半分の時間で増殖するという特性があるからである。

本食中毒の予防は、第1に食品への汚染を防ぐことであるが、夏季には沿岸海水中に広く分布しているため新鮮な魚介類であっても本菌汚染の可能性は高く、汚染防止を完全にすることは不可能に近い。しかし、本菌は10℃以下では増殖しないことや加熱によって容易に死滅すること、また、水道水など真水中で死滅することなど予防対策はたてられるので、魚介類や調理器具に本菌が汚染していることを早期に発見することが肝要である。

そこで、営業者は自衛の立場から自主検査を頻繁に行って自社製品による事

故を未然に防ぐよう心掛けなければならない。

食品の衛生検査には公的研究機関や指定検査機関などがあるが、何れも経費や結果が判明するまでの日数などに色々な制約があり、頻回に検査を依頼するということは困難なようである。そこで、簡易で、迅速で、なおかつ経費が節約でき、しかも食品の安全性の確保の目安となる簡易検査が要求されるわけである。

今回、サン化学では、従来の大腸菌群用検出紙、ブドウ球菌用検出紙並びに一般細菌数用検出紙と同様の手法で検査ができる腸炎ビブリオ簡易検出紙を開発したので、その実用性について基礎的実験を行った。ここでは、その性能について紹介すると共に、実際に使用する場合の検査法及び結果の評価について述べることにする。

## 1. 使用目的と特長

腸炎ビブリオ簡易検出紙は極めて簡便に腸炎ビブリオが検出できる試験紙で、スクリーニングテストとして定性試験を目的に開発されたものであるが、熟練することによって、ある程度は定量的汚染度の目安を知ることができる。本検出紙は、従来腸炎ビブリオ分離培地であるTCBS培地に用いられている成分を基礎とした培地基や試薬を検出紙中に含有させているため、生培地では欠くことのできない培地の準備や、滅菌シャーレ、滅菌試験管、滅菌ピペットなどの器材は一切必要なく、この検出紙だけで簡単に検査ができるメリットがある。また、この検出紙の1枚には試料1 mlがしみこまれるように工夫されているため、ある程度の定量試験にも応用できるが、これはあくまでも目安として判断すべきものである。

そして、本検出紙は好塩性の細菌を発育させ青色集落(斑)を形成させるが、その他の細菌は発育を阻止するようにつくられており、腸炎ビブリオを含む好塩細菌の検出を容易に確認することができる。

また、従来標準法では、平板培地をそのまま長く保存することは困難であるが、この検出紙では陽性のものを70℃前後で乾燥するか、アイロンなどをかけておくとそのまま青色集落(斑)が残り、しかも生菌は殺菌されて定着

するので、後日の資料としてそのままの姿で保存でき、現場検査の教育材料として活用することができる。

しかし、保存を必要としない検査済みの検出紙は危険防止上必ず焼却するようにならなければならない。

## 2. 検出紙の性能試験

腸炎ビブリオの定性試験用検出紙が試作されたので、本検出紙の検出感度と出現集落色調などの性能を実験室内で分離保存菌株を用いて行った。

### 1) 実験方法

#### a) 供試菌株

- i) *Vibrio parahaemolyticus* (V-p と略す)
- ii) *Vibrio alginolyticus* (V-a と略す)
- iii) *Vibrio fluvialis* (V-f と略す)
- iv) *Escherichia coli* (E-c と略す)
- v) *Citrobacter freundii* (C-f と略す)
- vi) *Klebsiella pneumoniae* (K-p と略す)

#### b) 供試菌液の調製

供試菌株 i ~ iii) については 3 % NaCl 加普通寒天培地、iv ~ vi) については普通寒天培地を用い、保存菌株を 35 ~ 37 °C で 24 時間培養を 2 ~ 3 回くり返えし継代したのち、前者 3 菌種は 3 % NaCl 加普通ブイヨンに、後者 3 菌種は普通ブイヨンに、それぞれ 1 白金耳ずつ接種し、35 ~ 37 °C に 18 時間培養したものを試験菌液 (原液) とした。

これら原液からの希釈液には、ビブリオ 3 菌種は 2 % NaCl 加 0.1 % ブイヨン液を、大腸菌群 3 菌種は 0.85 % NaCl 加 0.1 % ブイヨン液を用いた。希釈は 10 段階希釈法で  $10^{-9}$  まで系列希釈し実験に供した。

#### c) 菌数測定

上記系列希釈液のうち、実験に供したものは  $10^{-4}$  ~  $10^{-9}$  までのものを用いた。

平板法では各希釈液の1 mlずつを、それぞれ滅菌シャーレ2枚に採取し、ビブリオ3菌種については3% NaCl 加標準寒天培地を、大腸菌群3菌種については標準寒天培地を用い、各々高圧滅菌したのち、予め50℃に保持しておいたものを約15 mlずつ無菌的に注ぎ、よく混釈し、冷却凝固したのち35~37℃で48時間培養し出現集落数を算出した。

検出紙については、平板法に用いた各希釈液について、1希釈液毎に検出紙2枚を用い、1枚ずつ希釈試験管内に挿入し、菌液をよく含浸させたのち、余分の菌液を落とし、ユニパックに入れ35~37℃24時間培養したのち、検出紙上における青色の集落(斑)の呈色反応をもって判定した。

## 2) 実験結果

### a) 平板法と検出紙との比較

供試6菌種の $10^{-4}$ ~ $10^{-9}$ 希釈液における1 ml中の菌数を平板法で測定した3回の実験結果は表1に示すとおりである。

表1 標準平板法による供試菌液中の細菌数

菌名	希釈段階 実験回数	- 4	- 5	- 6	- 7	- 8	- 9
V - p	1	300 以上	300 以上	300 以上	85. 99	7. 7	0. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	173. 161	14. 19	1. 0
	3	300 以上	300 以上	300 以上	49. 52	5. 4	0. 0
V - a	1	300 以上	300 以上	300 以上	152. 138	19. 20	1. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	160. 164	29. 18	1. 3
	3	300 以上	300 以上	300 以上	98. 79	11. 7	0. 0
V - f	1	300 以上	300 以上	300 以上	95. 86	4. 7	0. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	128. 119	13. 15	1. 1
	3	300 以上	300 以上	300 以上	98. 79	10. 11	2. 1
E - c	1	300 以上	300 以上	300 以上	39. 57	3. 6	0. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	73. 80	11. 14	0. 1
	3	300 以上	300 以上	300 以上	62. 55	4. 5	0. 0
C - f	1	300 以上	300 以上	300 以上	49. 50	5. 6	0. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	66. 67	5. 7	0. 0
	3	300 以上	300 以上	300 以上	36. 33	5. 4	1. 0
K - p	1	300 以上	300 以上	300 以上	47. 51	5. 2	0. 0
	2	300 以上	300 以上	300 以上	66. 56	9. 4	1. 0
	3	300 以上	300 以上	300 以上	37. 35	2. 2	1. 0

すなわち、6菌種とも $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 希釈液ではすべて300個以上の菌数を示したが、 $10^{-7}$ 希釈液ではビブリオ3菌種では最高173、最低49であった。大腸菌群3菌種では最高80、最低33であった。 $10^{-8}$ 希釈液ではビブリオ3菌種では最高29、最低4、大腸菌群3菌種では最高14、最低2であった。また、 $10^{-9}$ 希釈液ではビブリオ3菌種は最高3、最低0、大腸菌群3菌種は最高1、最低0の菌数を測定した。

これに対し、同様希釈液を検出紙にしみ込ませ培養したところ表2の結果をえた。

表2 検出紙における供試菌液毎の呈色反応

菌名	希釈段階 実験回数	-4	-5	-6	-7	-8	-9
V-p	1	++	++	++	+(*)	-	-
	2	+++	+++	++	++	-	-
	3	+++	+++	++	+	-	-
V-a	1	+++	+++	++	++	-	-
	2	+++	+++	++	+	-	-
	3	+++	+++	++	++	-	-
V-f	1	++	++	++	+	-	-
	2	++	++	++	+	-	-
	3	+++	++	++	+	-	-
E-c	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
C-f	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
K-p	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

(\*)+++：試験紙の1/2以上の変色。  
 +++：試験紙の1/4以上1/2以下の変色。  
 ++：試験紙の1/4以下の変色。  
 +：試験紙に変色の見られなかったもの。

すなわち、 $10^{-4} \sim 10^{-7}$  希釈液ではビブリオ 3 菌種は何れも色調に強弱はあるけれども検出紙はよく青色に変色した。しかし、 $10^{-8} \sim 10^{-9}$  希釈液では呈色反応はみられなかった。また、大腸菌群 3 菌種は最も希釈度の低い  $10^{-4}$  希釈液でも呈色反応は起らなかった。

b) 検出紙の呈色反応と菌量との相関性

上記実験結果から、平板法による菌量と検出紙における呈色反応との関係を示すと表 3 のようになる。

表 3 検出紙の呈色反応の度合いとビブリオ菌数との相関

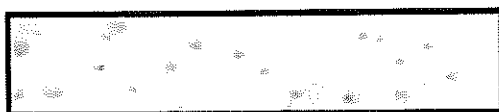
生菌数範囲 (/ml)	0 ~ 50	50 ~ 100	101 ~ 300	301 以上
検出紙の呈色反応 V-p	-	+	++	+++ ~ ++++ (*)
V-a	-	+	++	+++ ~ ++++
V-f	-	+	++	+++ ~ ++++

(\*)表 2 と同じ

すなわち、ビブリオ 3 菌種は、ともに試料液中の菌量が 1 ml 中に 50 個以下の場合には検出紙では呈色しなかったが、50 ~ 100 個の範囲では検出紙の  $\frac{1}{4}$  以下に点状又は斑状の呈色を示した(+)。また、101 ~ 300 個の範囲では検出紙の  $\frac{1}{4}$  以上  $\frac{1}{2}$  以下の部分に呈色反応がみられた(++)。また、300 個以上の菌量では検出紙の  $\frac{1}{2}$  以上又は全面に呈色反応がみられた(+++)。その呈色の度合いと判定の基準の 1 例を図 1 に示した。

図 1 検出紙の呈色反応と判定方法

サンコリテップ上に培養された腸炎ビブリオ及び類似菌は青色に検出される。



活性度の強い菌 (++)



弱い菌の検出状態 (++)



これらの結果から、本検出紙は検体中にビブリオ属の細菌が1 ml中に50個以上存在する時は青変を生ずるが、それ以下の微量菌量の場合には反応をおこさなかった。この事は、検出紙では一般に抑制力を強くしてあるため、微量の場合は非選択菌であっても抑制され陰性と判定されることがある。

しかし、汚染指標菌である大腸菌群に対しては、多量の菌数が検体中に含まれていても検出紙には全く反応しないことが認められた。

一方、腸炎ビブリオと他の白糖分解性の非病原ビブリオとの区別は、この検出紙では出来ない所にまだ問題点が残されている。

### 3. 腸炎ビブリオ簡易検出紙の結果に対する評価

この腸炎ビブリオ簡易検出紙の利用は、食品工場や一般店舗などで、魚介類及びその加工品を取扱う場合に、食品や調理器具などに腸炎ビブリオが汚染しているか否かを簡単に、かつ迅速に検査できることが特長である。

しかし、本検出紙による結果は、試験室内における標準検査法と同じ評価を下すものではない。標準法における選択培地でも、他の細菌の発育を抑制する因子を加えて目的の腸炎ビブリオのみを発育させるように作られているが、検出紙では選択性を保ちながら、なおかつ乾燥させる工程が入るため、その抑制力は強くなるか、逆に弱くなるか、また水分をとることによって起る成分の変性が微妙におこるものと思われ、平板法に比べ微量の菌まで発現させるということは非常に困難のようである。

また、*V. parahaemolyticus*、*V. fluvialis* などの食中毒起因菌と、*V. alginolyticus* など好塩性非病原菌との区別をすることは、現段階での検出紙では不可能のようである。

従って、これらの性質をよく理解して使用すれば、経費的にも軽減され、頻繁に検査をすることができる。

そして、本検出紙により青色の呈色がみられたならば、一応、海水細菌がまだ汚染していることを目安として、加熱又は洗浄を十分に行い、腸炎ビブ

リオによる食中毒予防の対策を行うことが出来るところに意義があるのではないかと考える。

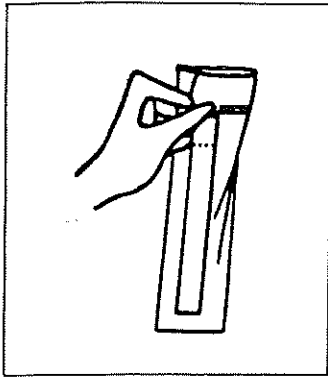
何れにしても、腸炎ビブリオの発育速度は他の細菌より速いことから、他の食中毒起因菌に対する検査より回数を多くし、常に衛生管理の思想をもつことが大切であり、専門の検査機関と十分相談して、自社の製品に対する検出紙の反応度を理解しておく必要がある。

#### 4. 腸炎ビブリオ簡易検出紙の使い方

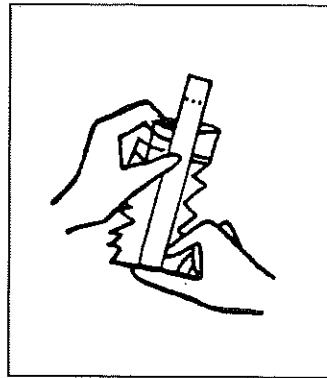
本検出紙の使用法は、従来からの大腸菌群用検出紙などの使用法と基本的には同じである。(図2)

- ① 手を清潔にした後、ユニパックのチャックをよじって口を開ける。
- ② ユニパック中のペーパーをパックの外側から押し上げ、ミシンの部分を外に出す。
- ③ ミシン線の上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す。
- ④ ミシン線より下の部分を用意した検体中にそのまま浸漬し、すぐ取り出し、余分の試料液をおとす。(浸漬する場合、一気に試料中にペーパーを浸漬するのが「コツ」である)
- ⑤ ミシン線の部分がチャックより下になるようにユニパックに入れる。
- ⑥ ペーパーを袋の上から押えて、ミシン線より上の部分を指できりとる。
- ⑦ そのまま平らに置き、指で押しながら袋の中の空気をぬき、ペーパーと袋を密着させてチャックを閉じる。
- ⑧ 密封した後35～37℃のふ卵器に入れて24時間培養する。
- ⑨ 培養後ふ卵器から取り出し、袋の上からペーパーの表面及び裏面を観察し青色集落又は呈色部分の範囲をみて判定する。

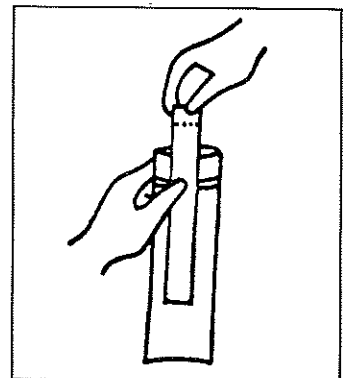
図2. 腸炎ビブリオ検出紙の使用手順



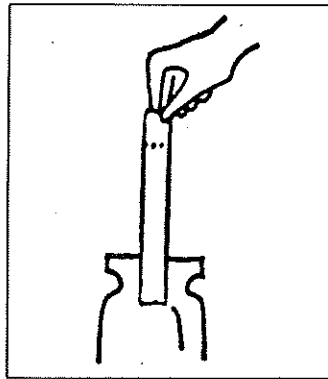
① サンパックのチャックをよじって口を開ける。



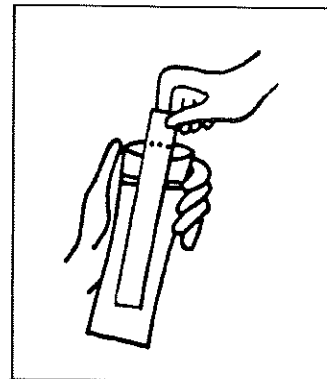
② 中のペーパーを押し上げミシンの部分を外に出す。



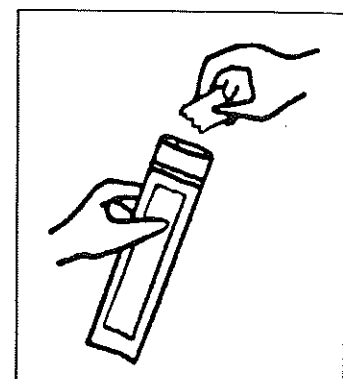
③ ミシンの上の部分を指でつまんでペーパーを引き出す。



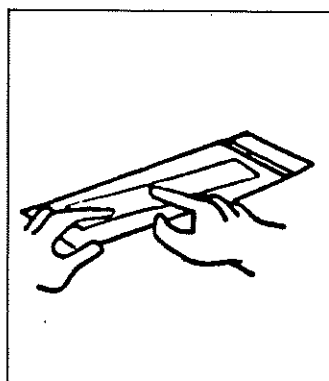
④ ミシンより下の部分を検体に浸漬したらすぐ取り出し



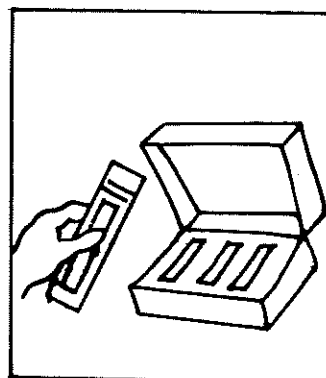
⑤ ミシンの部分がチャックより下になるように入れる。



⑥ ペーパーを袋の上から押さえて、ミシンの上の部分を指できりとる。



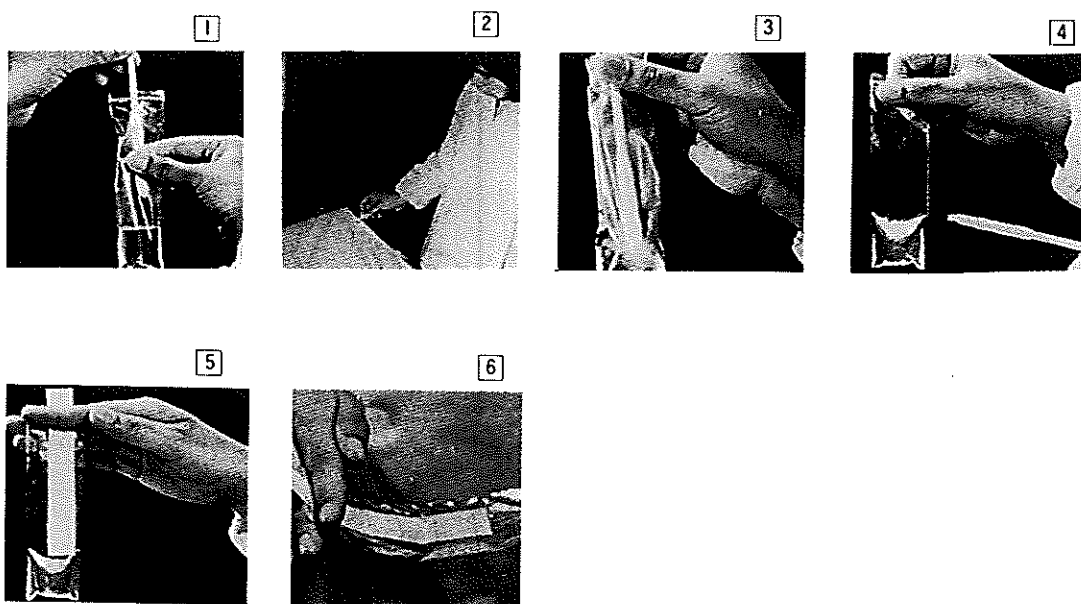
⑦ 平らにおき指の腹でなぜるように空気をぬきペーパーと袋を密着させてチャックを閉じる。



⑧ 密封したペーパーを35～37℃のふ卵器に入れる。

## 5. 滅菌綿棒の使用法

- イ) 綿棒入り袋の口を開いた後、3%滅菌食塩水（以下液という）20ml（袋の1目は10ml）を綿棒の柄の上部にかからないように静かに入れる。
- ロ) 綿棒を少し持ちあげて、液に浸ったガーゼを袋の外から指で軽くおさえて綿棒を回すように取出すと、ガーゼの液は軽く絞れる。（下図1）
- ハ) 取出した綿棒のガーゼ部分で検体の面をよく拭取る。（下図2）
- ニ) 拭取った綿棒を元の袋に入れ、すでに入っている液でよく振るか、または袋の外からガーゼの部分を指でもみ出すようにして検体をすすぎ出す。（下図3）
- ホ) よくすすぎ出したら、ガーゼの部分を袋の外から強くおさえて絞るようにして取出す（綿棒は1回毎に捨てる）。（下図4）
- ヘ) 綿棒を取出したあとの袋にペーパーを入れ、袋の口のところを、人指ゆびと中ゆびで両面からはさむようにして、水を傾けるとペーパーに浸漬するから、それを静かに取出し、余液をおとし、腸炎ビブリオ簡易検出紙の使い方に従って検査を行う。（下図5、6）
- ト) 袋の液は口を封じ、口の部分を立掛けて上にしておけばこぼれないからまた次のペーパーを入れて、同様の操作ができる。



## 6. 培養と判定

- (イ) 密封したペーパーは35～37℃のふ卵器に入れ24時間培養する。
- (ロ) 腸炎ビブリオを含む好塩細菌類はブルーテトラゾリウムにより青色の点状又は斑点を形成するので、検出紙の表裏面から観察し青変した度合いをもって判定する。
- (ハ) 検出紙の $\frac{1}{2}$ 以上青変したものは300個/ml以上を推定し+++とする。  
検出紙の $\frac{1}{4}$ 以上 $\frac{1}{2}$ 以下の青変は101～300個/mlを推定し++とする。  
検出紙の $\frac{1}{4}$ 以下の青変は50～100個/mlを推定し+とする。  
検出紙が変色しないものは陰性か或は50個以下/mlを推定する。

## 7. 使用上の注意

- (イ) 検出紙を操作する時は、あらかじめ指先をアルコール（70%消毒用）綿でよく消毒する。
- (ロ) 検出紙は無菌的に取り扱わなければならない。ミシン目の上部以外は直接手を触れてはならない。
- (ハ) 検出紙は約1mlの試料を吸着するよう工夫されているので、検体、試料原液に浸漬したら、余分な液をよく落して吸着量を常に一定（1ml）に保つよう留意する。
- (ニ) 試料を吸着させた検出紙は袋にもどした後、検出紙面と袋のビニール面が十分密着するよう、圧して空気をぬき、口のシールを閉じ、中がなるべく嫌気状態に近くなるようにする。
- (ホ) 検出紙は光に敏感なTTCを含んでいるので、操作中直射日光にさらされないように、また保管は冷暗所に置くように注意する。
- (ヘ) 検出紙を試料原液に浸漬するかわりに滅菌ピペットで試料原液1mlを検出紙にしみ込ませてもよい。

## あ と が き

従来、営業者は自社製品の衛生管理や規格基準の適否に対しては、取締られるという観念が強く、保健所の食品衛生監視員が検査にくるから、今日は気をつけようという気配りをしていた傾向がみられる。

しかし、近年、交通事故や食品事故に対する保障金も増大し、一度事故を起すと立ち直れないほどの高額保障金を支払わなければならなくなっている。

このような観点から、食品衛生法の中でも自主検査を強調しているが、検査手数料も高く、そう頻繁に検査を依頼するわけにはいかないというのが実情のようである。

今までに簡易検査法として一般細菌数用、大腸菌群用及びブドウ球菌用の検出紙が開発され実用化の域に達し、多くの業界が自主検査の手段として用いられているが、わが国で最も食中毒の発生率が高い腸炎ビブリオについては開発されていなかった。

今回、腸炎ビブリヲ簡易検出紙が開発されたことで、理論的にはまだ問題点は残されていると思うが、本検出紙を使うことによって、腸炎ビブリオの存在を一早くみつけ、予防対策を立てる一助になれば、本検出紙の目的は十分に活かされるものと考ええる。

とくに、魚介類及びその調理器具類は、原料の個体によって汚染度は個々に異なり、また、気候によって腸炎ビブリオの増殖は早いことから、夏季においては毎日検査を実施しても、まだ完全とは云えない食品で、魚介類と腸炎ビブリオとは人間に対する危害度分析からみても危険率の高い病原細菌と食品に該当するものである。

将来、残された問題点について解決する努力が必要であるが、食品の自主管理の物差しとして本検出紙の利用は十分評価されるものと考ええる。