

## 水中の病原性細菌の定性的検出法

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	板屋, 民子 徳丸, 雅一 砂川, 誠 正木, 宏幸 青木, 敦子 柳川, 敬子
巻/号	40巻11号
掲載ページ	p. 801-804
発行年月	1987年11月

# 水中の病原性細菌の定性的検出法

## 塩化第二鉄による沈殿法の改良法の開発

板屋民子\*1) 徳丸雅一\*1) 砂川 誠\*1) 正木宏幸\*1) 青木敦子\*1) 柳川敬子\*2)

(昭和 62 年 9 月 18 日受理)

### An Improved Method for Isolation of Pathogenic Bacteria from Water : Modified Precipitation Method with Diatomaceous Earth

TAMIKO ITAYA (Saitama Institute of Public Health, Urawa, Saitama 338),  
YOSHIKAZU TOKUMARU, MAKOTO SUNAGAWA, HIROYUKI MASAKI,  
ATSUKO AOKI and KEIKO YANAGAWA

### SUMMARY

An improved method was developed from the conventional precipitation method for isolation of pathogenic bacteria from water.

Various kinds of bacteria grown in culture media were suspended in sterilized water. Ferric chloride and diatomaceous earth were added to the resulting suspension to a final concentration of 0.02 % and 0.1 %, respectively. The suspensions were adjusted to be neutral or slightly alkaline with 1 N sodium hydroxide solution. They were allowed to make precipitates for 90 minutes. Then the supernatants were removed. It was demonstrated that the precipitates held a majority of the bacteria. Furthermore, the bacteria could be recovered from the precipitate even if only a few bacteria (less than 100 cfu/liter) were suspended in the original water. This method is applicable to various kinds of water, such as drinking water, surface water, and drainage, if an adequate amount of diatomaceous earth is added to the water.

### 要 約

塩化第二鉄を用いる従来からの沈殿法を改良して、水中の病原性細菌を検出する方法を開発した。滅菌蒸留水に各種の細菌を混合し、塩化第二鉄 (0.02%) と補助剤としてケイソウ土 (0.1%) を加えて、1 N 水酸化ナトリウムで pH を中性～アルカリ側に調整した。90 分間静置後、上清を捨てて得た沈殿物中には、最初に混合した菌数がほぼ全量含まれていた。また、1 l あたり 100 個以下の微量の菌を回収することができた。

本法は、対象試料の汚れの程度によって、加えるケイソウ土の量を加減すれば、飲料水から汚れのひどい下水まで対象にでき、各種の菌の検出に利用できる優れた方法である。

1978 年に発生した鶴見川のコレラ菌汚染事件<sup>2)</sup>は、当時の世間を震撼させた。さらに、食中毒起因菌のひとつの *Vibrio cholerae*-non 01 にいたっては、本邦の河川に常時分布しているとされている<sup>7)</sup>。また、近年にわかに注目を集めている *Campylobacter jejuni/coli*、あるいは *Yersinia pseudotuberculosis* などの感染症では、飲料水が感染源として指摘される事例<sup>3, 6, 8)</sup>が多い。

これらのことで示されるように、河川水や湖沼水などの環境水あるいは飲料水から、病原性細菌を検出することは、感染源の特定や感染の予防など疫学上きわめて重要な意義を持っている。しかし、このような試料中では、

混在する病原細菌数は一般に少ないと予想されることから、一度に大量の試料を処理し、かつ目的の病原性細菌を確実に検出することが要求されている。

このため、各種の方法が考案されているが、各々一長一短がある。すなわち、フィルター法<sup>9)</sup>は夾雑物を含む試料では前処理 (prefiltration) が必要であり、塩化第二鉄 (以下  $\text{FeCl}_3$ ) で水酸化第二鉄の沈殿物を作る方法<sup>11)</sup>は、逆に夾雑物の少ない試料では沈殿物を形成し難い。また、タンポン法<sup>10)</sup>は、採水現場に最低 2 回出向かねばならないなどである。そこで、従来の  $\text{FeCl}_3$  を用いる方法を改良して、夾雑物の少ない環境水や飲料水から、病原性細菌を検出する方法を開発した。

蒸留水に、各濃度の  $\text{FeCl}_3$  あるいは硫酸アルミニウム

\*1) 埼玉県衛生研究所 (浦和市上大久保 639-1)

\*2) 埼玉県大宮保健所 (大宮市吉敷 1-124)

水中の病原性細菌の定性的検出法

カリウム（以下、カリミョウバン）を加え、これにこれら凝結剤の補助剤として、ケイソウ土あるいは酸性白土（以下、カオリン）などの陶土を、試料中の最終濃度が0.1%となるように添加後、1N水酸化ナトリウム液（以下NaOH）でpHを調整し、フロック形成能をみた（表1）。蒸留水に凝結剤を単独で加えた場合、FeCl<sub>3</sub>では0.04%以下、カリミョウバンでは0.05%以下においては、pHを調整してもフロックが形成されなかった。しかし、これらに補助剤として陶土を加えると、FeCl<sub>3</sub>は0.02%以下、カリミョウバンは0.015%以下の濃度でフロックが形成され、陶土を添加した場合はしない場合より、低濃度の凝結剤でもフロックが形成されることが判明した。FeCl<sub>3</sub>を用いる篠川<sup>11)</sup>の原法では、試料中のFeCl<sub>3</sub>濃度は0.005~0.01%であり、この濃度では夾雑物の少ない試料中でフロックを形成しないことは明白である。

また、表1の各種のフロックのうち、FeCl<sub>3</sub>・ケイソウ土の組み合わせによるものが、最も大きく速やかに沈降して安定であり、以後の取り扱いが容易であった。

他方、カリミョウバンではフロックを形成するpH域が狭く、pHが9.6以上になると一度生じたフロックが再び消失し、pH調整が難しかった。この点については、pH調整にアンモニア水を用いれば解決するが、アンモニア特有の刺激臭により、取り扱いが制限されるので、本試験のpH調整にはNaOHのみを用いた。

表1で作製したフロックが、細菌の生存性に影響するか否かを検討した。使用した菌株および培地を表2に示した。Y. pseudotuberculosisは、島根県衛生公害研究所から分与を受けた株であり、他は当所で分離、保存していた株である。各菌種の培養条件は常法に従った。

表2に示す各種細菌を菌液調整用培地で増殖させた

表1 凝結剤と補助剤によるフロックの形成  
〔FeCl<sub>3</sub>を凝結剤として用いた場合〕

補助剤 (陶土)	pH	FeCl <sub>3</sub> 濃度 (%)				
		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
—*	8.4~10.4	・	・	—	—	卍
ケイソウ土 0.1%	8.4~10.1	+	卍	卍	卍	卍
カオリン 0.1%	6.8~10.5	—	卍	卍	・	・

〔カリミョウバンを凝結剤として用いた場合〕

補助剤 (陶土)	pH	カリミョウバン濃度 (%)				
		0.01	0.015	0.025	0.05	0.1
—*	5.0~7.8	・	・	・	—	+
	9.6	・	・	・	・	—
ケイソウ土0.1%	5.1~8.7	—	卍	卍	卍	卍
	9.8~10.1	・	—	—	—	—
カオリン 0.1%	6.5~8.9	・	—	卍	・	・
	10.0	・	・	—	・	・

注) ・: 実施せず —: フロックが形成されない +: 軽度のフロック形成 卍: 十分量のフロック形成 \*: 補助剤を添加しない場合

後、滅菌生理食塩液（以下、生食液）で目的の菌数に調整し、V. cholerae 以外は滅菌蒸留水 200ml に混合した。

V. cholerae は、蒸留水中ではきわめて速やかに死滅するので、生食液 200 ml と混合した。これらに上記の凝結剤と陶土を加えて NaOH で pH 調整し、フロックを形成せさせて、経時的に生存菌数を、表2の選択培地を用いた平板塗抹法で計測した（表3）。

Salmonella typhimurium を対象に、4種類のフロック中での生存菌数の推移を検討したが、菌の生存性に対する影響はほとんどなく、各フロック間での差も認められなかった。そこで、以下の実験はすべて、最も安定したフロックを形成するFeCl<sub>3</sub> (0.02%) とケイソウ土 (0.1%) の組み合わせによったが、供試したC. jejuni などの各菌の生存性を低下させることは、ほとんどないと思われた。

表2 使用菌株および培地

菌種	由来*	菌液調整用培地	菌回収用培地	
			増菌培地**	選択培地
Sal. typhimurium	市販豚肉	ハートインフュージョン ブイヨン培地	EEM ブイヨン SBG スルファ培地	DHL 寒天培地
C. jejuni	集団下痢症 患者糞便	Brucella Broth	Preston medium	血液寒天培地 Butzler's medium
V. cholerae	海外旅行者下痢症 患者糞便	アルカリ性ペプトン水	アルカリ性ペプトン水	ビブリオ寒天培地 TCBS 寒天培地
Y. pseudotuberculosis	豚腸管内容	YCC 液体培地	YCC 液体培地	Schiemann's CIN medium
Str. faecalis	市販生食用魚肉	YCC 液体培地	0.1% Tween 80 加ハート インフュージョン液体培地	EF 寒天培地

注) \*: Y. pseudotuberculosis のみ分与株、他は当所の分離株 \*\* : 沈殿法においては2倍濃度のものを使用した

さらに, 3時間後に上清を捨て, 沈殿物を最初の試料の1/10容量にすると, 1 mlあたりの菌数は実験開始時の試料の約10倍となり, 沈殿したフロック中には, 混合した細菌の大部分が捕捉されることが示された。

次に, 実際に微量菌を1 lの滅菌蒸留水 (*V. cholerae*のみ生食液) に混合して, 新たに開発した沈殿法と従来か

らのフィルター法<sup>9)</sup>で回収し, 両者の成績を比較した(表4)。

沈殿法はフロックを形成させて90分間静置後, 上清を捨て, 残った沈殿物に表2の2倍濃度の増菌培地を等量加え, 増菌培養後, 同じく表2の選択培地で分離した。フィルター法はポアサイズ0.45 $\mu$ m (*C. jejuni*の一部は

表3 凝結剤および陶土を加えた蒸留水中での各種の菌の生存性

実験	菌種	pH	時 間 (分)					
			0	30	60	120	180	180'
I	<i>Sal. typhimurium</i>	8.8	$3.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$
II	<i>Sal. typhimurium</i>	7.1	$2.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$9.8 \times 10^4$
III	<i>Sal. typhimurium</i>	8.0	$1.3 \times 10^4$	$7.2 \times 10^4$	$7.5 \times 10^3$	$9.0 \times 10^3$	$3.1 \times 10^3$	$3.9 \times 10^4$
IV	<i>Sal. typhimurium</i>	8.4	$1.6 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$8.8 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$
V	<i>C. jejuni</i>	9.1	$2.0 \times 10^3$	$1.2 \times 10^4$	$6.1 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$
VI	<i>V. cholerae</i>	9.9	$3.5 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3$	$8.6 \times 10^3$
VII	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	9.8	$1.6 \times 10^2$	$4.8 \times 10^2$	$1.7 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	$3.6 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$
VIII	<i>Str. faecalis</i>	9.5	$8.6 \times 10^3$	.	$7.4 \times 10^3$	$4.3 \times 10^3$	$6.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^4$

注) 実験VIの試料の基質のみ生食液を使用

実験IおよびV~VIIIは  $\text{FeCl}_3$  0.02%+ケイソウ土 0.1%

実験IIは  $\text{FeCl}_3$  0.02%+カオリン 0.1%

実験IIIはカリミョウバン 0.015%+ケイソウ土 0.1%

実験IVはカリミョウバン 0.015%+カオリン 0.1%

180'の成績は, 上清を捨て残った沈殿物を実験開始時の試料の1/10容量にして得た菌数

表4 蒸留水に微量混合した各種の菌の回収法比較

実験	菌種	方 法*	pH	各菌数/1000 mlにおける回収成績**					
				$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	$10^0$	$10^{-1}$
I	<i>Sal. typhimurium</i>	沈 殿 法	7.6~9.3	$+(5.0 \times 10^4)$ $(1.5 \times 10^4)$	$+( \cdot )$ $(4.4 \times 10^3)$	+	+	.	.
		フ ィ ル タ ー 法	6.6	+	+	+	+	.	.
II	<i>Sal. typhimurium</i>	沈 殿 法	7.8~8.4	.	$+(8.0 \times 10^3)$ $(5.0 \times 10^3)$	+	+	+	.
		フ ィ ル タ ー 法	7.5	.	+	+	+	+	.
III	<i>Sal. typhimurium</i>	沈 殿 法	7.7~8.3	.	.	.	+	-	-
		フ ィ ル タ ー 法	.	.	.	+	+	+	.
IV	<i>C. jejuni</i>	沈 殿 法	7.5~9.6	+	+	-	+	.	.
		フ ィ ル タ ー 法	7.0	-	-	-	-	.	.
V	<i>C. jejuni</i>	沈 殿 法	7.4~9.5	+	+	+	.	.	.
		フ ィ ル タ ー 法	.	+	+	-	.	.	.
VI	<i>C. jejuni</i>	沈 殿 法	7.5~9.8	.	.	+	+	+	.
		フ ィ ル タ ー 法	6.0	.	.	+	+	-	.
VII	<i>V. cholerae</i>	沈 殿 法	6.1~9.9	.	.	+	+	+	+
		フ ィ ル タ ー 法	6.4	.	.	+	+	+	+
VIII	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	沈 殿 法	7.0~9.0	.	.	.	+	+	+
		フ ィ ル タ ー 法	6.0	.	.	.	+	+	+
IX	<i>Str. faecalis</i>	沈 殿 法	6.5~9.0	+	+	+	+	.	.
		フ ィ ル タ ー 法	6.0	+	+	+	+	.	.

注) \*: 実験VIIの試料の基質のみ生食液使用。沈殿法は  $\text{FeCl}_3$  を 0.02% ケイソウ土を 0.1% 加え, pH調整後90分静置して集めた沈殿物を用いた。フィルター法は, 実験VおよびVIではポアサイズ0.20 $\mu$ mフィルターを使用した。その他は全て0.45 $\mu$ mフィルターを使用した。90分静置後の試料を, ろ過した後のフィルターを用いた。

\*\* : ( ) 内数字は混合直後の試料 1000 ml 中の菌数/実験終了時の沈殿物 50 ml 中の菌数を示す。

0.20 $\mu$ m) のフィルターで、菌を混合した試料を吸引透過し、フィルターを表2の増菌培地で増菌培養後、選択培地で分離した。

両方法とも 1l あたり 100 個以下の微量菌をも回収した。表4の実験 I, II で示されるように、実験開始時の 1l 中の *Sal. typhimurium* のほとんどが、上清を捨てた後の沈殿物 50 ml 中に補足されており、本沈殿法は優れた方法であった。

*C. jejuni* をフィルター法で水性試料から分離する際には、ポアサイズ 0.45 $\mu$ m のフィルターを用いることが、一般に推奨されている<sup>12)</sup>。しかし、該菌菌体の大きさは 0.2~0.5 $\times$ 0.5~5 $\mu$ m であり、*C. jejuni* の多くがポアサイズ 0.45 $\mu$ m フィルターを通過することが懸念された。BLASER と CODY<sup>1)</sup> はポアサイズ 0.6 $\mu$ m フィルターで、水中の *C. jejuni* の 90% を捕捉できるとしているが、GOOSSENS<sup>4)</sup> は、該菌をポアサイズ 0.45 $\mu$ m フィルターを通過させた後、分離している。表4の実験 IV~VI の成績は、*C. jejuni* がポアサイズ 0.45 $\mu$ m フィルターを通過することを示しており、本菌検出のためには、ポアサイズ 0.20 $\mu$ m のものを用いる必要があると考えられた。

なお、BLASER と CODY<sup>1)</sup> らは濾過後のフィルターを増菌培地を用いて培養する方法は、フィルターを直接選択培地にはりつけて培養する方法より検出感度が劣るとしているが、これは、彼らの増菌培養時間が短すぎたためと思われる。表4の実験 IV~VI の成績は、48 時間培養後のものであり、沈殿法、フィルター法のどちらも 24 時間では、検出されない事例が多かった。著者らは既報<sup>5)</sup>で、本菌検出のための増菌培養時間は 24 時間が適当であるとした。しかし、最近行った埼玉県内の河川水調査で、4 例から *Campylobacter* を分離したが、このうちの 2 例は 48 時間増菌培養の後分離された (未発表)。試料中の混在菌が少なく、*Campylobacter* 数も少ないと予測される場合、48 時間まで増菌培養を試みるべきであろう。

予備実験で、*V. cholerae* は蒸留水に対する抵抗性がきわめて低いことが認められた。相当高濃度の菌液を混合しても、ただちに 3~5 オーダー菌数が低下したので、

生食液を用いて本実験を行った。生食液中でも  $FeCl_3 \cdot$  ケイソウ土の組み合わせで蒸留水中と同様にフロックを形成し、混合した微量の *V. cholerae* を回収することができた。すなわち、本沈殿法は海水中の病原性細菌検出にも適用できると思われた。

本実験では凝結剤と補助剤を秤量し、pH 調整もガラス電極式水素イオン濃度計で計測しながら実施した。しかし、実際には  $FeCl_3$  量は厳格である必要はなく、むしろ多めであればフロックをより形成しやすい(表1)。ケイソウ土量も対象試料の混濁度に応じて加減すればよく、pH 調整も pH 試験紙 (東洋) を用いれば十分である。

すなわち、著者らが本論文で紹介した沈殿法は、簡便、簡易、確実、安価で特殊な器具を必要とせず、添加するケイソウ土の量を加減すれば、飲料水から高度に汚染された水性試料を対象に、各種の菌の検出に利用できる優れた方法である。

稿を終るにあたり、菌株を分与していただいた、鳥根県衛生公害研究所の福島 博博士に深甚なる謝意を表します。

#### 引用文献

- 1) BLASER, M. J. and CODY, H. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 312~315 (1986).
- 2) 福見秀雄: 日本医事新報, 2822, 12~17 (1978).
- 3) FUKUSIMA, H., et al.: *Zbl. Bact. Hyg., I. Abt. Orig.*, B180, 515~527 (1985).
- 4) GOOSSENS, H., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 24, 840~843 (1986).
- 5) 板屋民子, ほか: 日獣会誌, 37, 435~440 (1984).
- 6) LARS-OROF MENTZING: *Lancet*, 352~354 (1981).
- 7) 毎日新聞報道 (1981, 9, 1).
- 8) 長尾章郎: 食品衛生研究, 34, 13~36 (1984).
- 9) 日本細菌学会教育委員会編: コレラ菌と毒素原性大腸菌の検査法, 第1版, 24~27, 菜根出版, 東京 (1981).
- 10) 西尾隆昌, ほか: 日本公衛誌, 22, 313~323 (1975).
- 11) 篠川 至: 衛生検査, 20, 251~258 (1971).
- 12) 吉崎悦郎: 食中毒Ⅱ—新たに認定された食中毒菌一, 坂崎利一編. 第1版, 253, 中央法規出版, 東京 (1983).