

平成10年度厚生科学研究新興再興感染症研究事業

食中毒菌の検出方法、食品汚染の実態と
その制御に関する研究

主任研究者
熊谷 進

目次

凍結損傷 O157:H7 の食品からの検出方法の研究 ・ 熊谷 進 他	1
食品からの腸管出血性大腸菌 O26 の検出方法の検討 ・ 熊谷 進 他	12
調理器具（スポンジ）の衛生管理 ・ 熊谷 進 他	20
水耕野菜種子保存中の食中毒菌生残の研究 ・ 熊谷 進 他	23
卵からのサルモネラ・エンテロティディスの検出方法の検討 ・ 小沼博隆 他	26
ハエ類による O157 伝播の実態解明に関する基礎研究 ・ 安居院宣昭 他	46
食品のリステリア菌汚染実態に関する研究 ・ 井上 智 他	61

凍結損傷O157:H7 の食品からの検出方法の研究

分担研究者 熊谷 進

凍結損傷O157:H7を接種した食材からは、ノボピオシン添加 mEC (mEC+n)増菌方法によって菌を検出することができなかったが、食材を3時間室温下に置いた後に増菌を行うことによって、野菜ジュース等の酸性食品以外の食材からは検出可能となった。これら酸性食品からは、非選択培地に3時間浸した後に増菌することによって検出できることが判った。

協力研究者

工藤由起子：感染研、池戸正成：(株)栄研化学、小高秀正：(株)日水、小沼博隆：医薬食衛生研、中川 弘：顕微鏡院、後藤公吉：新潟保健研、増田高志：静岡環境衛生研

1. 研究目的

前年度、O157懸濁ミリQ水を -20°C 下で保存した場合の損傷菌の存在比を調べた結果、24時間凍結により極めて高率に損傷菌ができることがわかった。本年度の目的は、種々の食材にこの条件で作出した凍結損傷菌を接種し、そこからの検出方法を究明することにある。

2. 研究方法

(1) 凍結損傷O157:H7

大腸菌O157:H7 (予研970056=愛知5株)をミリQ水に懸濁させ、 -20°C 下24時間凍結することによって作成した(図1)。TSA上のコロニー数とCT-SMAC上のコロニー数との差を損傷菌数とした。

(2) 増菌に及ぼす胆汁酸塩の影響

mEC基礎培地(mECから胆汁酸を除いた組成からなる培地)を作成し、それに胆汁酸塩No.3(Difco)を1.12 g/l添加したものを100%添加とし、以下80、60、40、20%添加した培地、およびそれら各々にノボピオシン(2 mg/l)を添加した培地を作成した。O157懸濁ミリQ水を各培地5本(5.2CFU/本)に接種し、 37 または 42°C 下で24または48時間培養し、発育の有無を試験管の混濁で判定した。

(3) 食材からの凍結損傷O157:H7の検出

各種食材10gに凍結損傷菌を $10^{1-2.2}$ CFU接種したものを検体とした(図2)。接種直後または室温に10分から3時間放置した後に、ノボピオシン加mEC培地またはmEC基礎培地90mlを加えストマッカー処理した後に、またはmEC基礎培地90mlを加えストマッカー処理し2-3時間室温に放置してから胆汁酸塩No.3(Difco、1.12 g/l)およびノボピオシン(2 mg/l)を添加した後に、それぞれ 42°C 下で18時間培

養した。各培養物は、免疫磁気ビーズで集菌してから、またはそのままCT-SMACまたはCHROMagar O157に塗抹し、37°C下で18時間培養した。平板上のコロニーについては、ラテックス凝集反応（UNI）およびCLIG agarを用いて大腸菌O157:H7であることを確認した（図3）。

3. 研究結果・考察

（1）増菌に及ぼす胆汁酸塩の影響

24または48時間の培養時間にかかわらず、42°C培養では胆汁酸存在下では菌の増殖が認められなかった。しかし胆汁酸が存在しない場合には、一部の試験管で増殖が認められ、ノボピオシン添加によって増殖が抑制される傾向がみられた。37°C培養では、胆汁酸20%添加培地においてノボピオシン存在下では増殖が認められなかったが、ノボピオシン非添加では増殖が認められた。胆汁酸の添加量が40%以上である場合には、ノボピオシン非存在下においても増殖は認められなかった（表1）。

以上の成績から、胆汁酸は、損傷菌の回復を妨げること、ノボピオシンも胆汁酸ほどではないがやはり損傷菌の回復を抑制する作用をもつことが判明した。

（2）食材からの凍結損傷O157:H7の検出

牛挽肉、茹でジャガイモ、ごはん、大根おろしに凍結損傷菌を接種し、室温下に10から180分間放置した後にノボピオシン加mEC培地で42°C下で18時間培養した場合には、牛挽肉、茹でジャガイモ、大根おろしについては室温に置くことによって菌を検出できるようになる傾向が認められたが、ごはんについてはこのような効果は認められなかった（表2）。凍結損傷菌を接種した検体を室温下に10から180分間放置した後にmEC基礎培地を加えさらに2時間室温下に置き、ついで胆汁酸塩No.3（Difco、1.12 g/l）およびノボピオシン（2 mg/l）を添加した後に42°C下で18時間培養した場合には、牛挽肉については検出率に改善が見られなかったが、他の食材についてはとくに磁気ビーズを併用することによってほぼ全ての検体から菌を回収することができた（表3）。

さらに多くの食材について、ノボピオシン加mEC培地で42°C下18時間培養による検出を試みたところ、10²CFU/10g接種検体については一部の食材からのみしか検出できなかった（表4）。しかし凍結損傷菌を接種してから食材を3時間室温下に放置することによって検出が容易となり、10²CFU/10g接種検体については磁気ビーズを併用することによって、たまねぎ、いちご、野菜ジュース以外の食材の全例から菌を検出することができた（表5）。

検出が困難であったいちごと野菜ジュースについては、mEC基礎培地を加え2時間室温下に置き、ついで胆汁酸塩No.3（Difco、1.12 g/l）およびノボピオシン（2 mg/l）を添加した後に42°C下で18時間培養することによって検出率が上昇した（表6）。

以上の成績から、酸性食品であるいちごや野菜ジュース等についてはmEC基礎培地による菌の回復を図ってから選択剤含有培地で増菌する方法が、またその他の食

品についてはその方法に加え、食品を室温下で3時間放置することによって菌の回復を図ってから同様に選択増菌する方法も、損傷菌の回復を図りつつ目的以外の汚染細菌の増殖を抑制して目的菌を増殖せしめる方法として優れていることがわかった。

4. 結論

酸性食品であるいちごや野菜ジュース等については非選択培地による菌の回復を図ってから選択培地で増菌する方法が、またその他の食品についてはその方法に加え、食品を室温下で3時間放置することによって菌の回復を図ってから同様に選択増菌する方法も、損傷菌の回復を図りつつ目的以外の汚染細菌の増殖を抑制して目的菌を増殖せしめる方法として優れていることがわかった。

5. 発表

口演発表

工藤由起子、小沼博隆、中川弘、小高秀正、池戸正成、小島禎、尾上洋一、熊谷進：食品の凍結保管中における腸管出血性大腸菌O157菌数の変動。19回日本食品微生物学会、平成10年10月、神戸。

小高秀正、後藤公吉、増田高志、池戸正成、中川弘、小沼博隆、工藤由起子、熊谷進：食品からの凍結腸管出血性大腸菌O157の検出法。19回日本食品微生物学会、平成10年10月、神戸。

小島禎、池戸正成、小高秀正、小沼博隆、中川弘、尾上洋一、工藤由起子、熊谷進：凍結、加熱処理による腸管出血性大腸菌O157の損傷について。日本食品衛生学会76回学術講演会、平成10年11月、新潟。

中川弘、小島禎、池戸正成、小高秀正、尾上洋一、小沼博隆、工藤由起子、熊谷進：凍結損傷を受けた腸管出血性大腸菌O157の回復と増菌の条件。日本食品衛生学会76回学術講演会、平成10年11月、新潟。

工藤由起子、中川弘、小高秀正、池戸正成、小島禎、増田高志、後藤公吉、尾上洋一、小沼博隆、熊谷進：腸管出血性大腸菌O157の食品中での凍結損傷とその検出方法の検討。72回細菌学会、平成11年3月、東京。

Hara-Kudo Y., Ikedo M., Kodaka H., Nakagawa H. Goto K., Masuda T., Konuma H., Kojima T., Kumagai S. (2000) Selective Enrichment with Resuscitation Step for Isolation of Freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. in press.

図 1.

凍結損傷菌の作製方法

供試菌: *Escherichia coli* 0157:H7 予研970056 (愛知)

↓
Trypticase Soy Agar(BBL)

↓ 35℃ 18時間

↓
集落を滅菌綿棒でかきとる

↓
ミリQ水(ミリポア)で3回洗浄

↓
ミリQ水に浮遊 -20℃で保管

図2

検体の作製法

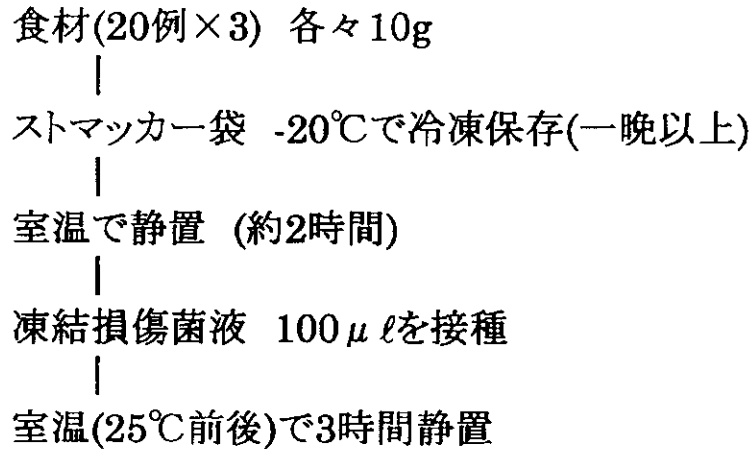


図3.

増菌および検出法

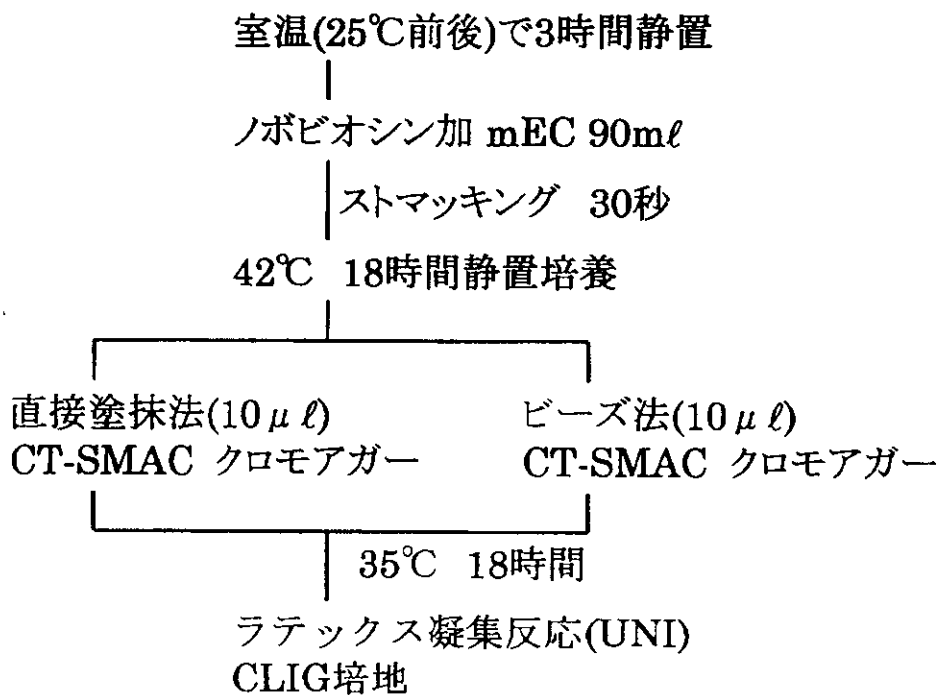


表 1.

凍結損傷大腸菌O157に対する胆汁酸塩の影響
(菌接種培地5本中の発育試験管数)

培地	Bile salts No.3	35°C		42°C	
		novobiocin		novobiocin	
		添加	未添加	添加	未添加
mEC基礎培地	0%	2	5	1	3
	20%	0	5	0	0
	40%	0	0	0	0
	60%	0	0	0	0
	80%	0	0	0	0
	100%	0	0	0	0
TSB		ND	5	ND	3

ND : Not done

接種菌株 予研970056 5.2CFU/10mL tube
mEC基礎培地に Bile salts No.3及びnovobiocin を添加
Bile salts 100%= 1.12g/L

5.5 CFU

表2.

mEC+n	N=3			
	CT-SMAC		クロモアガー	
	直接	ビーズ	直接	ビーズ
牛挽肉	0	0	0	0
	10	0	0	1
	60	0	3	2
	120	0	2	0
	180	0	0	0
白飯	0	0	0	0
	10	0	0	0
	60	0	0	0
	120	0	0	0
	180	0	0	0
ジャガイモ	0	0	0	0
	10	2	2	2
	60	2	2	2
	120	2	2	3
	180	3	3	3
大根おろし	0	0	0	0
	10	1	0	0
	60	0	0	0
	120	0	1	0
	180	2	3	2

表 3.

mEC-(b+N)	N=3				
	CT-SMAC		クロモアガー		
	直接	ビーズ	直接	ビーズ	
牛挽肉	0	0	0	0	0
	10	0	1	0	0
	60	1	1	0	0
	120	1	3	0	0
	180	0	1	0	0
白飯	0	3	3	3	3
	10	3	3	2	3
	60	2	2	2	3
	120	2	2	2	2
	180	3	3	3	3
ジャガイモ	0	3	3	3	3
	10	3	3	3	3
	60	3	3	3	3
	120	3	3	3	3
	180	3	3	3	3
大根おろし	0	3	3	3	3
	10	3	3	3	3
	60	3	3	3	3
	120	3	3	3	3
	180	3	3	3	3

食材の細菌汚染

	一般生菌数	大腸菌群数	E.coli 0157
牛挽肉	2.0×10^5	2.7×10^2	陰性
白飯	<300	陰性	陰性
じゃがいも	<300	陰性	陰性
大根おろし	<300	陰性	陰性
接種菌数	5.5cfu/100 μ l(10枚平均)		

表 4.

Detection of E.coli O157 by enrichment culture with mEC+n

Food	110 CFU/10g*		15 CFU/10g	
	Direct**	IMS**	Direct	IMS
Ground chicken	2***	2		
Ground beef	1	1	2	2
Butter	0	3		
Shrimp	1	1		
Scallop	1	1		
Squid	3	3		
Surimi	1	1		
Tuna	1	3	0	1
Grated yam	0	0		
Rice	3	3	0	0
Green soybeans	0	0		
Potato	1	1	0	0
Carrot	1	1		
Onion	0	0		
Melon	0	0		
Strawberry	0	1		
Orange	0	3		
Vegetable juice	0	0		

*:Inoculated cell number.

** :Direct, direct plating of cultured broth; IMS, plating of cultured broth after IMS

***:Number of detected samples among 3 inoculated samples.

表5.

Effect of standing inoculated samples at room-temperature for 3 hr on the detection of *E.coli* O157:H7 by enrichment culture with mEC+n

Food	130 CFU/10g *		15 CFU/10g	
	Direct	IMS	Direct	IMS
Ground chicken	3	3		
Ground beef	3	3	3	3
Butter	3	3		
Shrimp	3	3		
Scallop	3	3		
Squid	3	3		
Surimi	3	3		
Tuna	3	3	3	3
Grated yam	3	3		
Rice	3	3	3	3
Green soybeans	3	3		
Potato	3	3	3	3
Carrot	3	3		
Onion	2	2		
Melon	3	3		
Strowberry	0	1		
Orange	0	3		
Vegetable juice	0	1		

*:Inoculated cell number.

** :Direct, direct plating of cultured broth; IMS, plating of cultured broth after IMS

***:Number of detected samples among 3 inoculated samples.

表 6.
mEC+nで増菌

食材	Direct		IMS	
	CT-SMCA Chrom		CT-SMAC Chrom	
カステラ	2	2	3	3
イチゴ	0	0	0	1
野菜ジュース	0	0	0	0

N=3

mEC、2h(b、n)で増菌

食材	Direct		IMS	
	CT-SMCA Chrom		CT-SMAC Chrom	
カステラ	3	3	3	3
イチゴ	2	2	2	2
野菜ジュース	3	3	3	3

N=3

損傷菌接種3時間後mEC+nで増菌

食材	Direct		IMS	
	CT-SMCA Chrom		CT-SMAC Chrom	
カステラ	3	3	3	3
イチゴ	0	0	0	0
野菜ジュース	0	0	0	0

N=3

食品からの腸管出血性大腸菌 O26 の検出方法の検討

分担研究者 熊谷 進 国立感染症研究所食品衛生微生物部長

O157 増菌に適していることが報告されている既知の 5 種類の培地を用いて、さらに培養温度および培養時間を変えて O26 の適切な増菌条件を検討した。その結果、食品からの O26 分離には食材によっては TSB での 37℃ 6 時間培養が優れているが、食材を特定せずに検出する場合には mEC+n42℃18 時間培養が効果的な増菌方法であることが判明した。

研究協力者

工藤由起子、国立感染症研究所

小沼博隆、国立医薬品食品衛生研究所

中川 弘、東京顕微鏡院

後藤公吉、新潟保健環境研究所

増田高志、静岡環境衛生研究所

1. 研究目的

我が国において現在、腸管出血性大腸菌による食中毒の原因菌として O157:H7 について高頻度に見い出されている O26 の食材からの検出方法として広く認められている妥当な方法は未だ見い出されていない。同菌を含め、食品を汚染している病原細菌は少数であることが多いため、検出には増菌培養が必須であり、また検出の成否を決める重要な点であることから、本研究ではとくに増菌培養方法について検討を加えた。腸管出血性大腸菌の検査においては、O157 をターゲットとすることが多いことから、O157 と同一の培地で増菌できることが効率良いと考え、O157 増菌に適していることが報告されている既知の 5 種類の培地を用いて、さらに培養温度および培養時間を変えて O26 の適切な増菌条件を検討した。

2. 研究方法

1) 試験管内実験 (図 1)

試験管中で増菌を行なうことで多数の条件を同時に比較検討した。培地 9 ml に食品の代替えとしてその抽出液 1 ml を添加したものを検体とした。接種菌は 2 菌株 (O26:H11、O26:H-) を用い、おのおの T S B にて 18 時間培養した後に、P B S で希釈したものを菌液を各検体に加えた。接種菌量は 1 試験管当り約 6.4 個であることを TSA 平板 10 枚を用いて確認した。5 種類の増菌培地を用い、37 または 42℃ で 6 時間または 18 時間培養した後に、各培養物を、ノボビオシン (10mg/l) を添加したレインボーアガー O157 平板培地に塗抹し 24 時間培養した。紫色に発色したコロニーについて、O26 血清による凝集反応により確認した。

使用した増菌培地の詳細は以下のとおりである。

1. Tryptic Soy Broth (Difco)

Tryptic Soy Broth 30 g

D. W. 1000 ml

2. mTSB (Padhye and Doyle Appl. Environ. Microbiol. 1991 p2693-)

Tryptic soy broth (Difco) 30 g

Bile salts No.3 1.5 g

K₂HPO₄ 1.5 g

D.W. 1000 ml

121℃、15 分

室温に戻した後、Noboviocin sodium salt 20 mg (Noboviocin sodium salt 10mg/ml を 2 ml) 添加。

3. TSB-CTV (Kudva et al. Appl. Environ. Microbiol. 1995 p1363-)

Tryptic soy broth (Difco) 30 g

D.W. 1000 ml

121℃、15 分

室温に戻した後、Cefixime 50 mg (Cefixime 50 mg/ml を 1 ml)、

Potassium tellurite 2.5 mg (Potassium tellurite 5 mg/ml を 0.5ml)、

Vancomycin hydrochloride 40 mg (Vancomycin hydrochloride 40 mg/ml を 1 ml) 添加。

4. mEC+n

ノボピオシン加 mEC (栄研化学) 36.6g

D.W. 1000 ml

5. MTSB-VCC(Weagant et al.)

Tryptic soy broth (Difco) 30 g

D.W. 1000 ml

121℃、15分

室温に戻した後、Cefixime 50 mg (Cefixime 50 mg/ml を 1 ml)、

Bile salts No.3 1.5 g、Cefsulodin 10 mg、

Vancomycin hydrochloride 8 mg (Vancomycin hydrochloride 40 mg/ml を 1 ml) 添加。

2) ストマッカー内実験 (図2)

増菌培地として、試験管内実験において分離成績の良かった T S B、m T S B、T S B-C T Vを用いた。またこれらに加え厚生省が示した O157 の検査方法であるノボピオシン添加 mEC 培地での 42℃18 時間培養も行なった。1) と同様に菌液を調整し約 5.9 個の菌を食品 25 g に接種した。直ちに増菌培地 225ml を加え 37℃または 42℃で 6 時間または 18 時間培養した。分離は 1) と同様にノボピオシン添加レインボーアガー O157 平板培地への直接塗抹による方法とデンカ生検で試作した O26 免疫磁気ビーズを用いて菌を濃縮して塗抹した方法で行なった。

3. 研究結果

1) 試験管内実験

表 1 に成績を示した。表中++は2菌株とも分離できたことを+は2株中1株でしか分離できなかったことを-は両株とも分離できなかったことを示している。牛挽肉抽出液では多くの条件で2株とも分離できたが、P B Sではノボピオシン加 mEC でいずれの培養条件でも分離できず、またカイワレ大根抽出液ではT S BとT S B-C T Vでいずれの培養条件でも分離できるという結果が得られた。これら3つの添加液の全てについて2株とも分離できたのは 37℃ 6 時間ではT S B、m T S B、T S B-C T V、37℃18 時間ではT S BとT S B-C T V、42℃6 時間ではT S BとT S B-C T V、42℃18 時間ではT S B、

mTSB、TSB-CTVであった。

2) ストマッカー内実験

分離結果は牛挽肉とカイワレ大根で異なった。牛挽肉では直接分離法でTSB-CTV42℃で6時間培養で7検体と最も多く分離されたが、他の条件でも6検体から分離された。またビーズを用いるとさらに検出検体数が増え、特にTSB37℃6時間で9検体全てから検出された。カイワレ大根では全体に検出数が少なく直接塗抹法ではTSBとノボピオシン添加mEC培地での42℃18時間培養で分離されたのみで他は全く分離されなかった。しかしビーズを用いるとノボピオシン添加mEC培地での42℃18時間培養で9検体全てから分離された。

4. 考察

以上の結果から、食品からのO26分離には食材によってはTSBでの37℃6時間培養が優れているが、食材を特定せずに検出する場合にはmEC+n42℃18時間培養が効果的な増菌方法であると考えられた。平板培地については今後の検討が必要であろう。

5. 結論

食品からのO26分離には食材によってはTSBでの37℃6時間培養が優れているが、食材を特定せずに検出する場合にはmEC+n42℃18時間培養が効果的な増菌方法であることが判明した。

6. 発表

誌上発表

Yukiko Hara-Kudo, Hirotaka Konuma, Hiroshi Nakagawa, Kokichi Goto, Takashi Masuda and Susumu Kumagai (2000) *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. Lett.Appl.Microbiol. in press.

講演発表

工藤由起子 他：食品からの腸管出血性大腸菌O26の検出方法の検討。第127回日本獣医学会。平11年4月。

図 1,

増菌方法の検討 (試験管中)

培地 9 ml

- TSB
- mTSB
- mTSB-VCC
- TSB-CTV
- mEC+n

食品 (牛挽肉またはカイワレ大根) エキス*
または P B S 1 ml の添加

菌液** 0.1 ml (平均 6.4 CFU) の添加

*エキス作製法:
食品と同量の滅菌
ミリQ水を加えて
ホモジネートし濾
過したもの

**供試菌株:
2株
No. 26004
No. 26011

37℃または42℃
18時間培養

分 離

直 接 塗 抹 法

ノボピオシン添加レインボーアガーO157

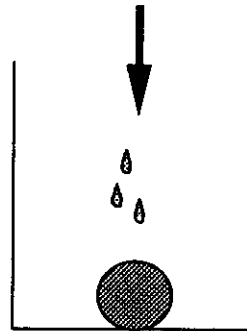
図 2.

増菌方法の検討（ストマッカー袋中）

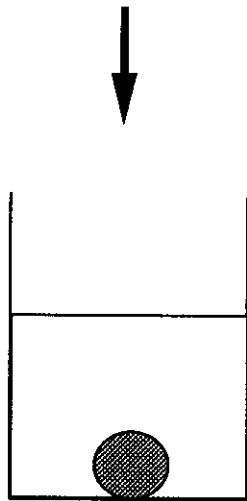
TSB
37℃18時間
培養液

希釈

菌液 1 ml
(平均 5.9 CFU)



食品 (25 g)
・牛挽肉
・カイワレ大根



増菌培地 (225 ml)
・ TSB
・ mTSB
・ TSB-CTV
・ mEC+n

37℃または42℃
18時間

分 離

直接塗抹法または免疫磁気ビーズ分離 (IMS) 法
ノボピオシン添加レインボーアガーO157

Table 1. Detection of two strains of *Escherichia coli* O26 (O26:H11 and O26:H7) under various enrichment conditions in test tubes

Incubation temperature	Incubation time	Ground beef extract						Radish sprout extract								
		TSB	mTSB	mEC+n	mTSB-VCC	TSB-CTV	TSB	mTSB	mEC+n	mTSB-VCC	TSB-CTV	TSB	mTSB	mEC+n	mTSB-VCC	TSB-CTV
37°C	6 h	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	+	-	++
	18 h	++	++	++	++	++	++	+	++	-	-	++	++	++	-	++
42°C	6 h	++	++	+	++	++	++	+	++	-	-	++	++	-	-	++
	18 h	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+	++

TSB: Tryptic soy broth, mTSB: modified TSB, mEC+n: modified EC broth with novobiocin, mTSB-VCC: mTSB (without novobiocin) with vancomycin, cefixime and cefsulodin, TSB-CTV: TSB with cefixime, potassium tellurite and vancomycin.

++: both strains were detected in 2 of 2 trials, +: one strain was detected in 2 of 2 trials, -: both strains were not detected in 2 of 2 trials.