

平成 10 年度厚生科学研究費補助金  
(生活安全総合研究事業)

総括研究報告書

野菜等の農水産物からの汚染微生物等の検出法  
に関する調査研究

班長 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌部

## 目次

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要	
主任研究者 渡辺治雄	・・・ 1
2. 総括研究報告書	
野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究	
主任研究者 渡辺治雄	・・・ 4
3. 分担研究報告者	
(I) 細菌の検出法に関する研究	
分担研究者 島田俊雄	・・・ 9
(1) 貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌 O157 の各種増菌培地における増殖	
協力研究者 大澤 朗	・・・ 15
(2) 生食用野菜および果実に接種された <i>Salmonella</i> の回収方法の検討	
協力研究者 金子賢一	・・・ 22
(3) 生野菜と果実からの腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラの検出に関する研究	
協力研究者 宮原美知子	・・・ 24
(4) 免疫磁気ビーズ法と PCR 法による食品及び糞便中の <i>Salmonella</i> spp. の検出に関する研究	
協力研究者 上田成子	・・・ 28
(5)-1 腸管出血性大腸菌 O157 の新しい分離培地, SDS ソルビット寒天培地の開発	
協力研究者 島田俊雄, 大澤朗	・・・ 35
(5)-2 SDS ソルビット寒天培地の検討	
協力研究者 大澤朗, 島田俊雄	・・・ 37
(II) ヒトカリシウィルスの遺伝学的多様性とカキに濃縮されるウィルスの検出	
分担研究者 武田直和	・・・ 42
研究協力者: 名取克郎, 染谷雄一, 栄健司, 小林慎一, 篠崎邦子, 石子博昭, 橋本修, 鎌田公仁夫	
(III) 野菜等食品からのクリプトスポリジウム等原虫類囊子の検出に関する研究	
分担研究者 遠藤卓郎	・・・ 46
(IV) 輸入農作物の試験方法に関する研究	
分担研究者 外海泰秀	・・・ 56

## 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要板

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝生活安全総合研究事業

研究課題名＝野菜などの農水産物からの汚染微生物などの検出方法に関する調査研究

国庫補助金精算所要額＝17、400、000

研究期間（年度）＝1998－2000

主任研究者＝渡辺治雄（国感染症研究所）

分担研究者＝ 遠藤卓郎（国立感染症研究所）、島田俊雄（国立感染症研究所）、  
武田直和（国立感染症研究所）、外海泰秀（国立医薬品食品衛生研究所）

### 研究目的

最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、サイクロスポラ等、ウイルスではヒトカリシウィルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。当該食中毒の予防への対策および発生時における的確なる対処を行う為には、これらの農水産物の汚染状況を把握することが必要であるが、現在のところそれらの食材から正確に該当する微生物及び農薬を検出する方法論が確立されていない。本研究を行うことにより、野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立するとともに、必要な対策を検討するための基礎資料を作成する。

### 研究方法

1。細菌の検出：野菜、果実等の検体をストマッカーやミキサー処理をした場合、pHの酸性化や、乳化された検体成分中の抗菌作用物質の存在等のため、細菌の検出率の低下が考えられる。又、自然界には損傷菌として存在している可能性もあり、より検出率の低下が予想される。これらを解決するため、検体の

処理の仕方、検体の前培養に用いる培地の種類等の基礎的検討をさらに続け最適条件の確立を目指す。又、菌の存在をスクリーニングする方法として、免疫磁気ビーズ法を用いての菌の濃縮法、PCR等の分子遺伝学的技術も検討をさらに続ける。

2。原虫の検出：食材から原虫のオーシスト等を分離・濃縮する方法として、高速連続ローター遠心機による濃縮、及び比重差を利用した浮遊分離や磁気ビーズの利用法の検討を続け、更なる検出感度の向上を図る。標本中の微量のオーシストを検出するために、in situ hybridization等の分子レベルの染色方法を検討する。また、ポリトレオニン遺伝子を用いての分子疫学的解析について、例数を増やし、実際に分子疫学的マーカーとして利用可能かをさらに検討する。

3。冬期に多いウィルス性胃腸炎の大部分がヒトカリシウィルス(human calicivirus, HuCV)によるものであるが、ウィルスを増殖させるための適当な細胞培養系がない。そのため原因食品を特定するのが困難な場合が多い。食品から病因ウィルスを迅速かつ感度よく検出する新しい方法を確立する必要性が高い。又、患者便材料から増幅されるHuCVには多数の血清学的に異なる株が存在することがわかってきている。我が国のHuCV感染源の多くはカキであるので、カキからHuCVの遺伝子を効率よく増幅方法を確立する

#### 成果・考察

##### 1。汚染細菌の検出方法；

生野菜や果物に汚染した菌の分離に適する方法について検討を行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 の検出には、BPW(バッファード・ペプトン水)等の非選択培地での前培養後、サルモネラではTT(ハーナー・テトラチオネート・ブイヨン)あるいはRV(ラパポート・ヴァアジリアデス・ブイヨン)へ、O157ではNmECへの選択培地で培養するのが効率的であった。これは、「飢餓状態」の菌を用いたときに更に顕著であった。又、サルモネラの検出に免疫磁気ビーズで濃縮することにより、試料中10個以上の菌が存在すれば検出可能であり、その菌についてサルモネラ特異的遺伝子 *invA* でPCRを行えば、吊り上げた菌がサルモネラであることを迅速に確定できた。更に、腸管出血性大腸菌 O157 の新しい分離培地の検討を行い、汚染の少ない検体である時及びO157が損傷を受けているようなときにはSDSソルビット寒天培地が有用であることを示した。

2。ヒトカリシウィルスの解析； HuCVは主としてポリメラーゼ領域の塩基配列の比較から、Genogroup I(Norwalk-like), Genogroup II(Snow mountain-like), Genogroup III=Classical human calicivirus(Sapporo-like)の3種に分かれ、それぞれ5, 7及び3種類の血清型が存在する。我が国の冬

季に発生した食中毒患者由来 HuCV は、 Genogroup I, Genogroup II に属するものがほとんどであり、かつそれぞれ 5, 7 種類の血清型に属するものが全て検出されたことは、流行を起こす HuCV の多様性を表すものである。また、カキにおける HuCV の保有状況を検討した結果、40%近くが陽性であり、それらは患者から分離される血清型のどれかに分類された。さらに各血清型のウィルス構造蛋白を組み換えバキュロウィルスを用いて発現させ、患者回復期血清と反応することをウエスタンブロッティング法で確認した。今後これらの遺伝学的及び免疫学的方法を用い流行状況を更に詳細に解析すると同時に、新型ウィルスの出現の監視を行っていく予定である。

### 3. クリプトスポリジウム原虫類囊子の検出；

イチゴにオーシストを塗布した実験系において、オーシストの精製条件を検討した。攪拌洗浄あるいは超音波洗浄後、洗浄液を連続ローターも用いた遠心沈殿後のメンブランフィルター法あるいはフローサイトメーターによりオーシストの濃縮・精製を行った。超音波洗浄法は FDA のマニュアルに採用されているが、今回の実験では、攪拌法の方が高い検出率を示した。又、フローサイトメーターによる検出は、フィルター法の 60-70%程度であった。感度の低い原因として、オーシストに対する抗体の特異性の問題が考えられた。

### 4. 輸入農作物の試験方法

穀物。豆類中の残留農薬分析における既存の脱脂方法の検討を行った。ピレスロイドケイ系農薬分析時における脂質除去率は ExtrelutR/Sep-PakRC18 法が最もよく、n-ヘキサン・アセトニトリル分配法がこれに次ぎ、GPC は本条件下ではあまり良くなかった。

## 結論

野菜、果物等を汚染している微生物あるいは農薬の迅速なる検出法の開発、改良等の検討を行った。いくつかの効率よい方法の開発を手がけてきて新しい知見が得られてきている。今後更に発展させていく予定である。

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
総括研究報告書

野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部長

研究要旨：最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、サイクロスポラ等、ウイルスではヒトカリシウイルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立するとともに、必要な対策を検討するための基礎資料を作成することが必要である。今回、野菜、果物等を汚染している微生物あるいは農薬の迅速なる検出法の開発、改良等の検討を行った。その結果①サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 を検出するための培地条件、②カリシウイルスの遺伝的多様性の発見と PCR を用いてのその遺伝子の検出法、等にいくつかの新しい知見が得られてきている。

分担研究者氏名・所属・職名

遠藤卓郎（国立感染症研究所・寄生動物室 室長）

島田俊雄（国立感染症研究所・腸管系細菌室長）

武田直和（国立感染症研究所・ウイルス第二部腸管系ウイルス室長）

外海泰秀（国立医薬品食品衛生研究所・大阪支部食品試験部）

研究協力者

大澤朗（神奈川県衛生研究所細菌病理部）

伊東喜久治（東京大学農学部）

金子賢一（東京農工大学農学部）

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

上田茂子（女子栄養大学衛生学教室）

堂ヶ崎知格（麻布大学環境保健学部）

名取克郎，染谷雄一（国立感染症研究所ウイルス第二部）

栄健司，小林慎一（愛知県衛生研究所ウイルス部）

篠崎邦子（千葉県衛生研究所ウイルス部）

石子博昭，橋本修（三菱科学ピーシーエル感染症特別開発部）

鎌田公仁夫（デンカ生研株式会社ウィルス試験製造部）

## A.研究目的

最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、サイクロスポラ等、ウイルスではヒトカリシウイルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。当該食中毒の予防への対策および発生時における的確なる対処を行う為には、これらの農水産物の汚染状況を把握することが必要であるが、現在のところそれらの食材から正確に該当する微生物及び農薬を検出する方法論が確立されていない。本研究を行うことにより、野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立するとともに、必要な対策を検討するための基礎資料を作成する。

## B.研究方法

1。細菌の検出：野菜、果実等の検体をストマッカーやミキサー処理をした場合、pHの酸性化や、乳化された検体成分中の抗菌作用物質の存在等のため、細菌の検出率の低下が考えられる。又、自然界には損傷菌として存在している可能性もあり、より検出率の低下が予想される。これらを解決するため、検体の処理の仕方、検体の前培養に用いる培地の種類等の基礎的検討を行い、最適条件の確立を目指す。又、菌の存在をスクリーニングする方法として、免疫磁気ビーズ法を用いた菌の濃縮法及びPCR等の分子遺伝学的技術も検討する。

2。原虫の検出：食材から原虫のオーシスト等を分離・濃縮する方法として、高速連続ローター遠心機による濃縮、及び比重差を利用した浮遊分離や磁気ビーズの利用法の検討を行い、検出感度の向上を図る。

3。ヒトカリシウイルスの検出：冬期に多いウイルス性胃腸炎の大部分がヒトカリシウイルス(human calicivirus, HuCV)によるものであるが、ウイルスを増殖させるための適当な細胞培養系がない。そのため原因食品を特定するのが困難な場合が多い。食品から病因ウイルスを迅速かつ感度よく検出するPCR及びELISA等の新しい方法を確立する。又、患者便材料から増幅されるHuCVは遺伝学的に多様であることがわかってきている。我が国におけるHuCVの遺伝学的多様性の実態を塩基配列の解析から明らかにする。

4。農薬測定：穀類・豆類等の農作物に含まれる脂質はGC及びHPLCによる農薬の測定を妨害する。そのため脂質含有性農作物に含まれる残留農薬分析においては脱脂行程が不可欠である。どの様な脱脂行程がもっとも効率的かの比

較検討を行う。

### C.研究成果

#### 1. 汚染細菌の検出方法；

生野菜や果物に汚染した菌の分離に適する方法について検討を行った。生野菜等に塗布したサルモネラおよび腸管出血性大腸菌 O157 を検出する場合に、直接選択培地において分離するよりも、まず最初に BPW(バッファード・ペプトン水)等の非選択培地での前培養後に、サルモネラでは TT (ハーナー・テトラチオネート・ブイヨン)あるいは RV (ラパポート・ヴァアジリアデス・ブイヨン)へ、および腸管出血性大腸菌 O157 では NmEC への選択培地で培養するのが検出率において効率的であった。この結果は、「飢餓状態」の菌を汚染菌として用いたときに更に顕著に認められた。又、サルモネラの検出に免疫磁気ビーズ濃縮法を用いると、試料中 10 個以上の菌が存在すれば検出可能であり、その菌についてサルモネラ特異的遺伝子 *invA* で PCR を行えば、吊り上げた菌がサルモネラであることを迅速に確定できた。更に、腸管出血性大腸菌 O157 の新しい分離培地の検討を行い、汚染の少ない検体である時及び O157 が損傷を受けているようなときには SDS ソルビット寒天培地が有用であることを示した。

#### 2. クリプトスポリジウム原虫類嚢子の検出；

イチゴにオーシストを塗布した実験系において、オーシストの精製条件を検討した。汚染材料を攪拌洗浄あるいは超音波洗浄した後に、洗浄液を連続ローターを用いて遠心しその沈殿物をメンブランフィルター法あるいはフローサイトメーターによりオーシストの濃縮・精製を行った。超音波洗浄法は FDA のマニュアルに採用されているが、今回の実験では、攪拌法の方が高い検出率を示した。又、フローサイトメーターによる検出は、フィルター法の 60-70%程度であった。感度の低い原因として、オーシストに対する今回使用した抗体の特異性の問題が考えられた。

#### 3. ヒトカリシウィルスの解析；

HuCV は主としてポリメラーゼ領域の塩基配列の比較から Genogroup I(Norwalk-like), Genogroup II(Snow mountain-like), Genogroup III=Classical human calicivirus(Sapporo-like)の 3 種に分かれ、それぞれ 5, 7 及び 3 種類の血清型が存在する。我が国の冬季に発生した食中毒患者由来 HuCV は、Genogroup I, Genogroup II に属するものがほとんどであり、かつそれぞれ 5, 7 種類の血清型に属するものが全て検出されたことは、流行を起こす HuCV の多様性を表すものであった。また、カキにおける HuCV の保有状況を検討した結果、40%近くが陽性であり、それらは患者から分離される血清型のどれかに分類された。さらに各血清型のウィルス構造蛋白を組み換え



バキュロウィルスを用いて発現させ、患者回復期血清と反応することをウエスタンブロット法で確認した。今後これらの遺伝学的及び免疫学的方法を用い流行状況を更に詳細に解析すると同時に、新型ウィルスの出現の監視を行っていく予定である。

#### 4. 輸入農作物の試験方法：

穀物。豆類中の残留農薬分析における既存の脱脂方法の検討を行った。ピレスロイド系農薬分析時における脂質除去率は ExtrelutR/Sep-PakRC18 法が最もよく、n-ヘキサン・アセトニトリル分配法がこれに次ぎ、GPC は本条件下ではあまり良くなかった。

#### D. 考察：

食中毒発生時あるいは食中毒を未然に防止するための検査時に、食品等から病原微生物を感度よく検出する方法の確立が要求されている。今回の研究においては、主な食中毒原因病原微生物として、細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌、ウィルスではヒトカリシウィルス、原虫ではクリプトスポリジウム原虫を対象にして検討を行った。汚染原因物質として細菌においては、最近、野菜等の農作物が食中毒の汚染原因物質と同定されることが多いので、それを対象にした。特に野菜等の場合には汚染菌量が少ない場合には、検出できない場合が想定されるので、検出感度をあげることが出来る方法論の検討を行った。その結果、非選択培地で前培養を行うこと、また免疫磁気ビーズを併用することにより検出感度をあげられることがわかった。野菜等に存在する菌は、直接選択培地に塗布する分離が難しいことから、ストレスな条件では増殖が困難な状態になっているものと考えられる。そのことは「飢餓状態」の菌を被検菌として用いたときによりはっきりした結果が得られたことにより裏付けられた。

ヒトカリシウィルスは分離培養が困難である。又、我が国の食中毒患者から検出されるウィルスには、かなり多くの血清型が存在する事がはっきりしてきた。今回の遺伝学的研究により得られた成果を応用するためには、塩基配列の決定を行わなければならないのでどこでも簡単に出来るとは限らない。現在、ヒトカリシウィルスの血清型を規定する表面抗原の多量発現系を開発中であり、その成果に基づいた ELISA 系の開発を行っている。その ELISA を使用することにより、迅速簡便な方法論の開発に結びつき、更に広範な疫学調査に応用できると考えられる。

わが国においては、野菜等に付着したクリプトスポリジウム原虫の嚢子(オーシスト)の検査法に関しての基準となる方法がない。そのため、原虫類汚染による感染の実態は不明である。今回イチゴに付着したオーシストの濃縮分離法を検討したが、良い方法が得られるまでには至っていない。いくつかの問題点、

及び検討課題が出てきた。今後は、オーシストに対する特異性の高い抗体の開発、その抗体を用いての検体中からの濃縮法の開発を更に検討する予定である。

#### E. 結論

野菜、果物等を汚染している微生物あるいは農薬の迅速なる検出法の開発、改良等の検討を行った。対象とする各微生物により、方法論に特徴がある。細菌類の検出には、前培養として非選択培地を用いることが検出感度を高めるために重要であることがわかった。カリシウイルスには、かなり多くの血清型が存在することが判明し、それを検出するための ELISA 法の開発が今後の課題である。クリプトスポリジウム原虫の嚢子(オーシスト)の検査法の確立に向けて、更に検討を加える予定である。

## 分担研究報告書

### 野菜等の農水産物からの汚染微生物等の検出方法に関する調査研究 細菌の検出方法に関する研究

分担研究者 島田俊雄 国立感染症研究所細菌部腸管系細菌室長

#### 研究協力者

大澤朗（神奈川県衛生研究所細菌病理部）

伊藤喜久治（東京大学農学部）

金子賢一（東京農工大学農学部）

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

上田茂子（女子栄養大学衛生学教室）

堂ヶ崎知格（麻布大学環境保健学部）

#### 研究要旨

##### (1) 貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌O157の各種増菌培地における増殖

野菜や水産物に付着する水に生残する腸管出血性大腸菌O157を検出する最も適切な手法確立のために、実験的に水環境で「飢餓状態」とした菌細胞の各種選択・非選択増菌培養法での増殖状況を調べた結果、選択培養法では大半の菌が増殖しなくなることが明かとなり、上記検体からの菌検出には非選択増菌培養が必要不可欠であることが強く示唆された。

##### (2) 生食用野菜および果物に接種された *Salmonella* の回収方法の検討

青果物に付着する病原細菌の検出方法を確立する一環として、今回レタスおよびメロンにサルモネラを接種して、日本ならびに米国食品安全局で採用されている検出方法合せて8通りの方法により回収効率を検討した。その結果、BPW（バッファード・ペプトン水）→RV（ラパポート・ヴァアジリアデス・ブイオン）→DMLIA（ダブルモディファイド・リジン寒天培地）の系で接種菌が最も効率よく回収された。

##### (3) 生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの検出に関する研究

生野菜と果物からの微生物汚染に対して、従来他の食品からの検査法との比較実験を行いながら従来のNmEC培養法との比較実験を行った。サルモネラの検査法はEEM-SBG培養法との比較を行った。その結果、現在のところO157とサルモネラの検出法として、BPWでの一括前培養後にO157ではNmECへ、サルモネラではTT（ハーナー・テトラチオネート・ブイオン）とRVへと選択培養する方法が効率的かつ良好な検査結果が得られた。

##### (4) 免疫磁気ビーズ法とPCR法による食品および糞便中の *Salmonella* spp. の検出に関する研究

免疫磁気ビーズ法とPCR法を併用した系による食品および糞便中の *Salmonella* spp. の検出方法の有効性について基礎的検討を行った。食品、糞便およびふきとり試料では何れも10個以上の菌数が存在すれば検出可能であった、また、ビーズ吊り上げ後の選択培地上での *Salmonella* spp. 疑似コロニーも組織侵入性遺伝子 (*Salmonella* invasion gene; *invA*) Primerの使用によるPCR法での検出は、より迅速に検出可能であった。

##### (5) 腸管出血性大腸菌 O157 の新しい分離培地、SDSソルビット寒天培地の開発

下痢原性大腸菌や赤痢菌の中には胆汁酸塩によって、発育が抑制される菌株もかなり存在することは、以前から知られている。特に、野菜等に生残する腸管出血性大腸菌O157等の菌細胞はかなり損傷を受けている可能性があり、胆汁酸塩等を含む選択培地では発育が抑制されることが予想されることから、O157菌株の迅速診断のための胆汁酸塩を含まない新しい分離培地 SDSソルビット寒天培地を考案した。SDSソルビット寒天培地と従来使用されているCT-SMAC寒天培地、SIB寒天培地、DHL寒天培地とを比較検討したところ、本培地はO157の分離培地としては従来のものと同等の性能を示したが、汚染の少ない検体やO157菌体が損傷を受けている場合の検出に適しているものと考えられる。

## (1) 貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌 O157の各種増菌培地における増殖

研究協力者 大澤 朗（神奈川県衛生研究所）、  
伊藤喜久治（東京大学農学部）

### A. 研究目的

ヒトの糞便由来の大腸菌は河川、井戸、下水等の水環境に長期間放置されると、多くの菌細胞が「飢餓状態」となり、このような細胞は界面活性剤や抗生物質に対する感受性が高まることが知られている。このことから水環境中の大腸菌は上記の薬剤等を含む選択培地で容易には増殖できないことが予想された。そこで実験的に「飢餓状態」とした腸管出血性大腸菌O157菌細胞について、既存の選択・非選択増菌培地での増殖状況を比較検討した。

### B. 研究方法

使用菌株：計20株の腸管出血性大腸菌O157を供試した（O157の人糞便由来の6株、牛糞便由来の6株、食品およびふき取りサンプル由来の8株）。

増菌培地：4種の液体培地を使用した。

Trypticase soy broth (BBL社) [TSB]

Buffered peptone water (Oxoid社) [BPW]

modified TSBにnovobiocin (20mg/L)を添加したもの [mTSB+n]

modified E. coli brothにnovobiocin (20mg/L)を添加したもの [mEC+n]

### 実験方法：

TSBにて一晚培養のO157菌細胞を集菌、これを滅菌脱イオン水(SDW)にて3回洗浄し、最終的にSDWあるいはフィルター滅菌した河川水(SRW)に $3 \sim 4 \times 10^5$  CFU/mlに調整し滅菌した容器に分注した。これを遮光、23℃で放置し、この菌液の一部を下記試験時毎に採取し、SDWにて希釈しCFUとして20~200個程度(0.1mlあたり)含むように調整したものを接種菌液とした。放置開始直後(正確にはSDWあるいはSRW放置3時間以内)、1日目、3日目、1週間目、2週間目、3週間目、4週間目またSRW放置サンプルについてはさらに5週間目、6週間目に上記のごとく調整した菌液0.1mlを2倍濃度の上記増菌培地0.1ml(あらかじめマイクロプレートに分注しておいた)に接種し、十分混和したのち、36℃および42℃にて24時間培養し、増殖の有無をウェル内の培地の混濁によって判定した。

### C. 研究結果

SDW, SRWの水環境に放置した菌株は非選択増菌培地(TSB, BPW)では全試験期間を通じて増殖したが、選択増菌培地(mTSB+n, mEC+n)では放置開始直後から全く増殖しない株が見られ、また放置期間が長くなるにつれて増殖しない菌株数が増えた。この増殖抑制・阻害の傾向は36℃よりも42℃の培養温度においてより顕著に認められた。(詳細は添付の図を参照のこと)

### D. 考察

栄養の乏しい水環境に放置されることにより「飢餓状態」となった大腸菌O157が付着あるいは混入した野菜・水産物等の検体から選択性の強い増菌培養法を用いて本菌を検出することは困難であることから、このような検体からの菌検出には非選択増菌培養が必要不可欠であることが強く示唆された。

### F. 研究発表

Ohsawa, R. et al. : Growth of Starved *Escherichia coli* O157 Cells in Selective and Non-selective Media. *Microbiology and Immunology*, 1999、43巻、No.3、印刷中。

## (2) 生食用野菜および果物に接種された *Salmonella* の回収方法の検討

研究協力者 金子賢一（東京農工大学農学部）

### A. 研究目的

最近消費者の健康意識が高まると共に生食用野菜および果物の消費量が増大している。このことに伴い、生食用野菜および果物を介した経口感染症の発生が問題となっている。生食用野菜などにおける汚染菌数は小数であることから、乳肉などの動物性食品を対象に考案された従来の検査法では対応が困難と考えられる。そこで、一般生菌数の汚染が高度で病原細菌の汚染菌数が少ない生食用野菜などから病原細菌を検出する方法を開発する一環として、今回は、日本で従来から採用されている検出方法ならびに米国食品衛生局で新たに採用された方法を用いて、レタスおよびメロンに接種したサルモネラの回収効率を比較検討した。

## B. 研究方法

供試菌株：Salmonella Typhimurium ATCC13311株を用いた。

供試青果物：市販レタス、市販メロンおよびカットメロン

実験方法：Trypticase soy agar (BBL)において、37℃ 24時間培養後、供試菌をPBSにより希釈して接種菌数を調整した。市販レタスを購入直後に3～4cm角にカット直後、市販メロンについては1/8にカット直後、市販カットメロンについてはそのままのものに供試菌液を10g当たり接種菌数が1～1000になるように接種して、10gを直ちに前増菌培地(EEMおよびBPW)に接種して、35℃で18～24時間前増菌培養後、前増菌培養液を9倍量の増菌培地(SC, SBG, TTおよびRV)に接種して42～43℃で18～24時間増菌培養した。なお、EEMの場合は1.5mlを15mlの、BPWの場合は0.5mlを10mlの増菌培地に接種した。その後分離培地(DHL, MLCB, DMLIAおよびBGS)に塗抹し、35℃で20～24時間分離培養後、接種菌の回収を試みた。さらに、上記3種類の青果物をカット後5℃2日間保存後、供試菌液を接種して同様に接種菌の回収を試みた。接種菌の同定は抗血清（デンカ生研）により行った。

## C. 研究結果

表1に示すように、PBSに接種した場合前増菌培地に供試菌1個でも、6通りの方法すべてにおいて回収に成功した。

カットメロンおよびカットレタスに接種した場合、増菌培地としてTTを用いた検出方法は最も回収効率が悪かったのに対し、BPW→RV→DMLIAの系で接種菌が最も効率よく回収された。

## D. 考察

低温保存したカットレタスにサルモネラを接種した場合、保存しない時よりも回収率が高くなったことについて、低温保存による中温菌の減少などが原因として考えられたが、この点を含めて一般生菌数とサルモネラの回収率の関係など今後も検討を重ねて行きたい。

## (3) 生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌 O157とサルモネラの検出に関する研究

研究協力者 宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）

### A. 研究目的

食中毒は、従来、生野菜や果物の摂取によっては起きにくいと思われていた。ところが、消費者の嗜好の変化、生産から消費までの時間が長くなったこと、病気に対する抵抗力の弱い人の増加などによると考えられる生野菜や果物摂取による食中毒および集団感染が日本で増加した。その中でも特に、ここ数年来頻発し、少量菌でも発症することが知られている腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの検出法を検討した。

### B. 研究方法

O157添加実験を行った。ほうれん草を検体として25g、培養液を225mlとして、ストマッカーでのホモジナイズを行った。添加菌量を2.4, 5.8と58 cfu/0.1ml/1検出の3段階とした。以後、各菌濃度をL, M, Hと表示する。培養系をBPW-NmECとmEC 2時間室温放置後、ノボピオシンと胆汁酸添加する二つの系を比較した。培養菌そのままの添加と、検体に菌を添加して一晩-20度で保存後に検出する比較実験も行った。分離用検出寒天培地としてCT-SMACとCHROM agar O157 TAMを使った。

サルモネラの添加実験は次のように行った。ほうれん草とメロンを検体とした。培養液はEEM-SBGとBPW-RVの2系統を検討した。ストマッカー袋に25gの検体を入れ、菌を添加して、-20度で一晩保存を行った。添加菌は濃度5 cfu/0.1 ml(Lと表示)の低濃度と192 cfu/0.1 ml(Hと表示)高濃度菌液の2段階を検討した。翌日にEEMまたはBPW培養液225 mlを加えて、ストマッカーでホモジナイズを行って24時間培養後に各1 ml(EEM-SG, BPW-RV)をそれぞれの培養液15 mlに加えて、更に24時間選択培養を行った。分離用検出寒天培地として、MLCBとDHLを使用した。さらに、ビーズとPCR法についても検討を行った。

### C. 研究結果

O157の添加実験については表1にまとめた。BPW-NmECとNmECの両系ともに良好な検出結果が得られた。凍結処理を行ったものについてもほぼ同等の結果が得られた。分離用寒天培地は、CHROM agar O157 TAMはCT-SMACよりも検出されにくいこ

とがわかった。TAM培地での検出には培養時間をCT-SMACよりも長くする必要があるものと考えられた。

サルモネラの添加実験結果は表2にまとめた。EEM-SBG系よりもBPW-RV系の方が検出結果は良好であった。このサルモネラの添加実験は凍結処理をしたもので比較した実験系であるがビーズやPCR法を併用してもEEM-SBG系では検出はうまくいかなかった。

#### D. 考察

以上の実験からBPW前培養を行った後にO157やサルモネラ用のそれぞれの選択培養に進めても十分な結果が得られることがわかった。

#### E. 結論

O157とサルモネラの一括前培養の検出系を試みることにした。今後、この検出方法の検討を行っていく予定である。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

宮原美知子、小沼博隆：PCR法による食肉からの腸管出血性大腸菌O157ベロ毒素産生遺伝子の検出について。食衛誌、39、315-317 (1998)

##### 学会発表

Michiko Miyahara and Hiroataka Konuma: Trial for classification of shiga-like toxin II producing gene. 112th AOAC International Annual Meeting.

宮原美知子、小沼博隆：生野菜・果物からサルモネラの検出方法の検討。日本食品衛生学会第76回学術講演会（1998年11月）。

宮原美知子、小沼博隆：腸管出血性大腸菌O157におけるベロ毒素産生遺伝子。第21回日本分子生物学会年会（1998年12月）。

宮原美知子、小沼博隆：生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの簡易検出法の検討。日本薬学会第119年会（1999年3月）。

#### (4) 免疫磁気ビーズ法とPCR法による食品および糞便中のSalmonella spp.の検出に関する研究

研究協力者 上田成子（女子栄養大学）

##### A. 研究目的

サルモネラ食中毒は1991年から患者数が毎年7,000～16,000人と細菌性食中毒のうち最大の患者数を占め、乳幼児、高齢者および基礎疾患を有するヒトは易感染、重症化しやすい。感染原因食品や感染源究明のためには本菌の検出は重要な課題である。公定法による検出法はほぼ5日間を要し、その検出法も煩雑である。そこで、検出感度も高く、迅速・簡便に検出可能な免疫磁気ビーズ法とPCR (Polymerase Chain Reaction) 法の系を用いた検出法の有効性を明らかにするために基礎的検討をおこなった。

##### B. 研究方法

1. 試験に使用した菌株：各種食品、ふきとり試料および糞便への接種実験に使用した菌はS. Enteritidis phage type 4である。Salmonellaに対する特異性を確認するためにS. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Infantis等の55菌株を用いるとともにE. coli O12:H21 (EPEC)、E. coli O124:HNM (EIEC)、E. coli ST&LT (ETEC)、E. coli O157:H7 (VT1 & VT2) (EHEC) K. aerogenes、S. rubidae、V. parahaemolyticus、Y. enterocolitica、A. hydrophila O21、L. monocytogenesの10菌株と食中毒事例菌株のC. freundii 10菌株の計20菌株を用いた。

2. 免疫磁気ビーズでの吊り上げ後の平板培地の検討

3. 試験に用いた食品はレタス、キャベツ、カイワレ等の野菜やその調理品、果実加工の23種、卵、牛乳、食肉およびその調理加工品10種の計33種を10%乳剤とし、それぞれにS. Enteritidisを1、2、3 Log of cfu 接種し試験した。また、糞便についても同様の試験を行った。

4. S. Enteritidis保有患者糞便およびハウレンソウにS. Enteritidisを6 Log of cfu/lg 接種・4日間自然光に放置し、試験に用いた。なお、保有患者糞便から分離したSalmonella spp.はのせガラス凝集法および試験管凝集法によりサルモネラ免疫血清（生研製）を用い血清型別を行った。

5. 免疫磁気ビーズはSalmonella spp.のO抗原をコートしたビーズ（ベリタス製）である。

6. PCR試験に用いたPrimerはサルモネラ組織侵入性遺伝子 (Salmonella invasion gene; invA: Galan et al.,

J. Bacteriol., 174, 4338-4349) である。PCR増幅条件は94℃で1分(変性)、55℃で1分(アニーリング)、72℃で1分(伸長)の35 cycleである。PCR増幅産物は電気泳動後、トランスイルミネーター下で写真撮影を行った。

### C. 研究結果

1. 免疫磁気ビーズでの交差試験により、試験した腸内細菌のうち食中毒由来の*C. freundii*株に交差反応やDHL培地上に疑似のコロニーが検出されたが、PCR試験で(-)となり、確実な結果を得ることができた。また、食中毒由来試験*Salmonella* spp. 55菌株は全菌株とも1 Log of cfuで検出することができた。

2. 免疫磁気ビーズ吊り上げ後の平板培地について検討した結果、DHL寒天やDMLIA寒天培地は*Salmonella*の成育が他の培地と比して旺盛であり、本菌の回収率は99~86%であった。

3. 食品およびその調理加工品、ふきとり試料、糞便での*Salmonella*の検出は、全検体とも1 Log of cfuで検出可能であった。

### D. 考察

重篤な食中毒症状を示す場合、特に患者の糞便、血液や推定原因食品から迅速・簡便・鋭敏に検出し、感染源を特定する必要がある。しかしながら、従来公定法は迅速・簡便・鋭敏性が欠如し、患者対応および予防対策が迅速に行えず、時として生命の危険性を生ずる。免疫磁気ビーズ法とPCR法は生菌を検出することができ、迅速・有効な検出手法と考えられた。

### E. 結論

免疫磁気ビーズ法とPCR法の併用系での*Salmonella* spp.検出は迅速・簡便・鋭敏に実施できることが明らかであった。

### F. 研究発表

学会発表

免疫磁気ビーズ法とPCR法による食品および糞便中の*Salmonella* spp. (第19回日本食品微生物学会抄録集・1998年10月14~15)

## (5) 腸管出血性大腸菌 O157 の新しい分離培地、SDSソルビット寒天培地の開発

研究協力者 島田俊雄(国立感染症研究所)、大澤 朗(神奈川県衛生研究所)

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 の検査には、発見患者の迅速かつ適切な治療と防疫措置のために、遅滞のない正確な結果が要求される。これまで腸管出血性大腸菌 O157 の選択分離培地にはマッコンキー・ソルビトール寒天培地、DHL ソルビトール寒天培地、SIB 寒天培地などが広く用いられている。腸管出血性大腸菌 O157 の分離培地である前述のマッコンキー・ソルビトール寒天培地等には、グラム陽性菌の発育を阻止する目的で、胆汁酸塩が添加されているので、培地上の集落から直接スライド凝集テストを行った場合、非特異反応が起こり易く、誤同定の原因となることがある。また、下痢原性大腸菌や赤痢菌の中には胆汁酸塩によって、発育が抑制される菌株もかなり存在することは、以前から知られている。

今回、O157 菌株の迅速診断のための胆汁酸塩を含まない新しいO157分離培地 SDS ソルビット寒天培地を考案した。

### B. 研究方法

SDS ソルビット寒天培地の組成および培地の作り方は次のとおりである。

#### 基礎培地

“ラブレムコ” 粉末	5 g
酵母エキス	5 g
ポリペプトン (BBL)	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ソルビット	10 g
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.2 g
寒天	15 g
プロムチモールブルー	0.04 g
フェノールレッド	0.04 g
精製水 1L	

pH 7.2

基礎培地を加熱溶解した後、pHを7.2に修正する。基礎培地を約55℃に冷やし、亜テルル酸カリウム2.5 mg/L およびセフィキシム0.05mg/Lを添加し、よく混和後、平板に固める。本培地は、高圧滅菌する必要がない。

添加物には、市販品としてCTサプリメント（1L用、マスト・ダイアグノスチックス、アスカ純薬）があり、1バイアル容量を滅菌水に溶解後、添加する。

一般にSDSを含む培地の表面は乾き難いので、孵卵器でよく乾燥させる。

### C. 研究結果

SDS ソルビット寒天培地上での、腸管出血性大腸菌 O157 はマッコンキーソルビット寒天培地上の集落よりも大きい（直径約2mm）、暗紫色の集落を形成する。また、ソルビットを分解する大腸菌やその他の腸内細菌などの黄色集落を作る菌とはその色調によって容易に鑑別することができる。グラム陽性菌はほとんど完全に発育を阻止されるが、腸球菌には菌株によって発育するものもある。しかし、その集落は小さく、白色でやや乾燥しており、識別は容易である。プロテウス菌株の多くのは発育を阻止され、発育してもスォーミングしない。エンテロバクターやクレブシエラ菌株の中には発育するものも見られるが、その集落は黄色で、暗紫色の O157 菌株と簡単に鑑別できる。

一方、マッコンキー・ソルビット寒天培地上の O157 菌の集落は、培地に含まれる胆汁酸塩の影響でやや粘稠性を帯びるが、SDS ソルビット寒天培地上の O157 菌株の集落は、マッコンキーソルビット寒天培地上のそれよりも遥かに大きく、またまったく粘稠性がないので、O157 抗血清に対し極めて明瞭な凝集を示し、かつその凝集性も強い。

### D. 考察

この考案の基礎は、グラム陽性菌の発育阻止剤として、胆汁酸塩に代えて、より大腸菌の発育に影響が少ないドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いたことである。SDS を選択剤として用いた寒天培地は、胆汁酸塩を含む培地と比較して、培地上に発育した集落が大きく、さらに普通寒天培地上の菌苔と全く同じ様に、抗血清に極めて凝集し易く、かつその凝集性も強い。また、腸管出血性大腸菌 O157 菌株以外の細菌を抑制する目的として、セフィキシムおよび亜テルル酸カリウムを加えたことである。

SDSソルビット寒天培地と従来使用されているCT-SMAC寒天培地、SIB寒天培地、DHL寒天培地とを比較検討したところ、本培地はO157の分離培地としては従来のものと同等の性能を示したが、汚染の少ない検体やO157菌体が損傷を受けている場合の検出に適しているものと考えられる。

腸管出血性大腸菌 O157 菌株の同定に際しては、

行政上迅速性が要求される。従って、SDS ソルビット寒天培地上の O157 が疑われる暗紫色集落について、先ず病原性大腸菌 O157 抗血清でスライド凝集テストを行い、強く凝集が見られたら、その集落の残りの菌苔を用いて、ベロ毒素遺伝子を PCR 法で検査する。両テストが陽性の場合には腸管出血性大腸菌 O157 と推定同定し、速やかにその後の行政措置をとり、同時に生化学的性状の確認およびH抗原の同定を並行して行う方法が現状では有利と思われる。



(1) 貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌O157  
の各種増菌培地における増殖

研究協力者 大澤 朗（神奈川県衛生研究所）伊藤喜久治（東京大学農学部）

研究要旨 野菜や水産物に付着する水に生残する腸管出血性大腸菌O157を検出する最も適切な手法確立のために、実験的に水環境で「飢餓状態」とした菌細胞の各種選択・非選択増菌培養法での増殖状況を調べた結果、選択培養法では大半の菌が増殖しなくなることが明かとなり、上記検体からの菌検出には非選択増菌培養が必要不可欠であることが強く示唆された。

A. 研究目的

ヒトの糞便由来の大腸菌は河川、井戸、下水等の水環境に長期間放置されると、多くの菌細胞が「飢餓状態」となり、このような細胞は界面活性剤や抗生物質に対する感受性が高まることが知られている。このことから水環境中の大腸菌は上記の薬剤等を含む選択培地で容易には増殖できないことが予想された。そこで実験的に「飢餓状態」とした大腸菌O157菌細胞について、既存の選択・非選択増菌培地での増殖状況を比較検討した。

B. 研究方法

使用菌株：計20株のO157を供試した。

- \*O157の人糞便由来の6株
- \*牛糞便由来の6株
- \*食品およびふき取りサンプル由来の8株

増菌培地：4種の液体培地を使用した。

- \*Trypticase soy broth (BBL社) [TSB]
- \* Buffered peptone water (Oxoid社) [BPW]
- \*modified TSBにnovobiocin (20mg/L)を添加したもの [mTSB+n]
- \*modified E. coli broth にnovobiocin (20mg/L)を添加したもの [mEC+n]

実験方法：

TSBにて一晩培養のO157菌細胞を集菌、これを滅菌脱イオン水(SDW)にて3回洗浄し、最終的にSDWあるいはフィルター滅菌した河川水(SRW)に $3 \sim 4 \times 10^5$  CFU/mlに調整し滅菌した容器に分注した。これを遮光、23°Cで放置し、この菌液の一部を下記試験時毎に採取し、SDWにて希釈しCFUとして20~200個程度(Q.1mlあたり)含むように調整したものを接種菌液とした。放置開始直後(正確にはSDWあるいはSRW放置3時間以内)、

1日目、3日目、1週間目、2週間目、3週間目、4週間目またSRW放置サンプルについてはさらに5週間目、6週間目に上記のごとく調整した菌液0.1mlを2倍濃度の上記増菌培地0.1ml(あらかじめマイクロプレートに分注しておいた)に接種し、十分混和したのち、36°Cおよび42°Cにて24時間培養し、増殖の有無をウェル内の培地の混濁によって判定した。

C. 研究結果

SDW, SRWの水環境に放置した菌株は非選択増菌培地(TSB, BPW)では全試験期間を通じて増殖したが、選択増菌培地(mTSB+n, mEC+n)では放置開始直後から全く増殖しない株が見られ、また放置期間が長くなるにつれて増殖しない菌株数が増えた。この増殖抑制・阻害の傾向は36°Cよりも42°Cの培養温度においてより顕著に認められた。(詳細は添付の図を参照のこと)

D. 考察

栄養の乏しい水環境に放置されることにより「飢餓状態」となった大腸菌O157が付着あるいは混入した野菜・水産物等の検体から選択性の強い増菌培養法を用いて本菌を検出することは困難であることから、このような検体からの菌検出には非選択増菌培養が必要不可欠であることが強く示唆された。

F. 研究発表

Growth of Starved *Escherichia coli* O157 Cells in Selective and Non-selective Media (Microbiology and Immunology, 1999, 43巻No.3 掲載予定)

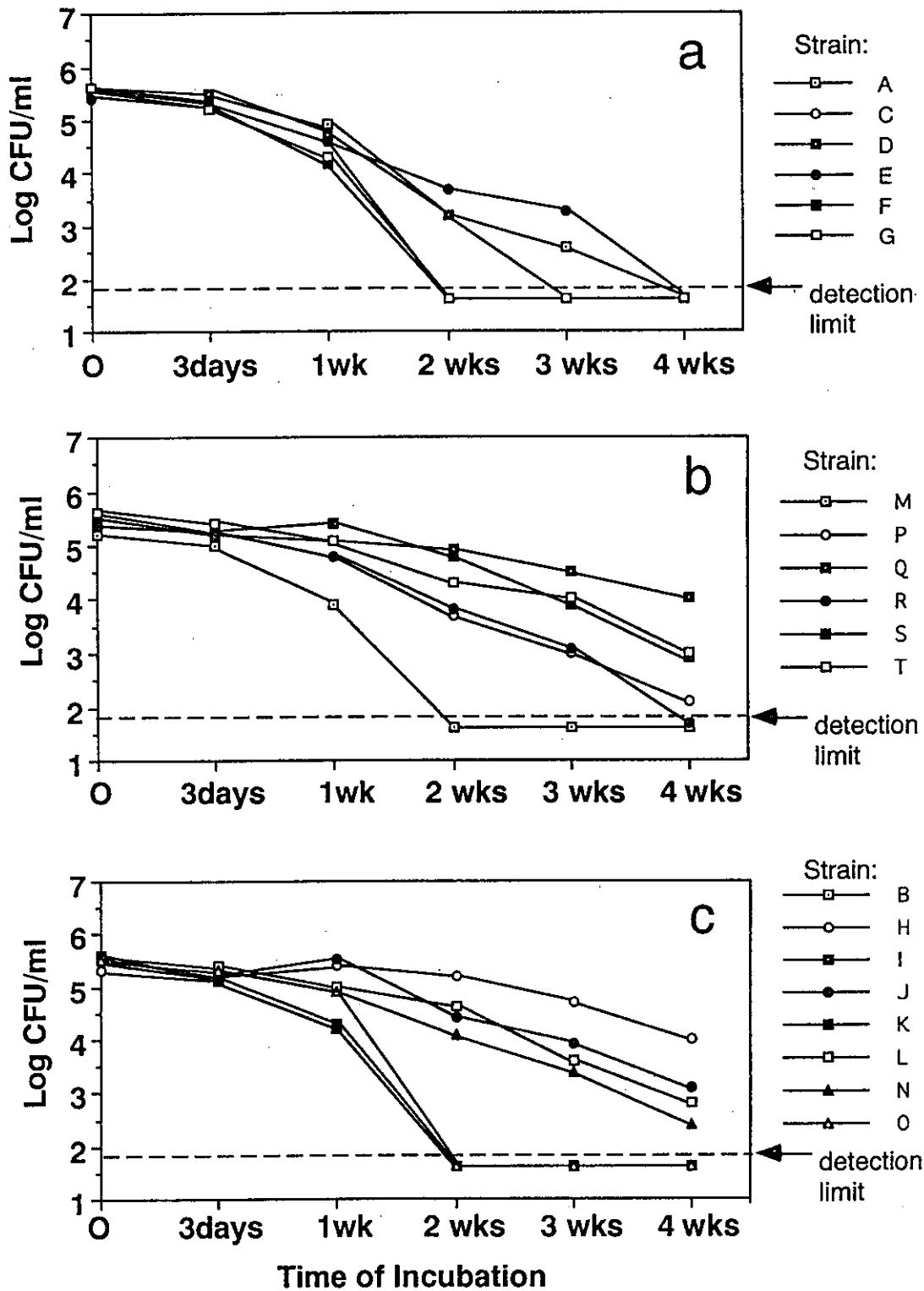


図 1: 23°Cにて脱イオン水中に4週間放置されたO157菌株の生残性の推移  
 (a)人糞便由来株, (b)牛糞便由来株, (c)環境・食品由来株

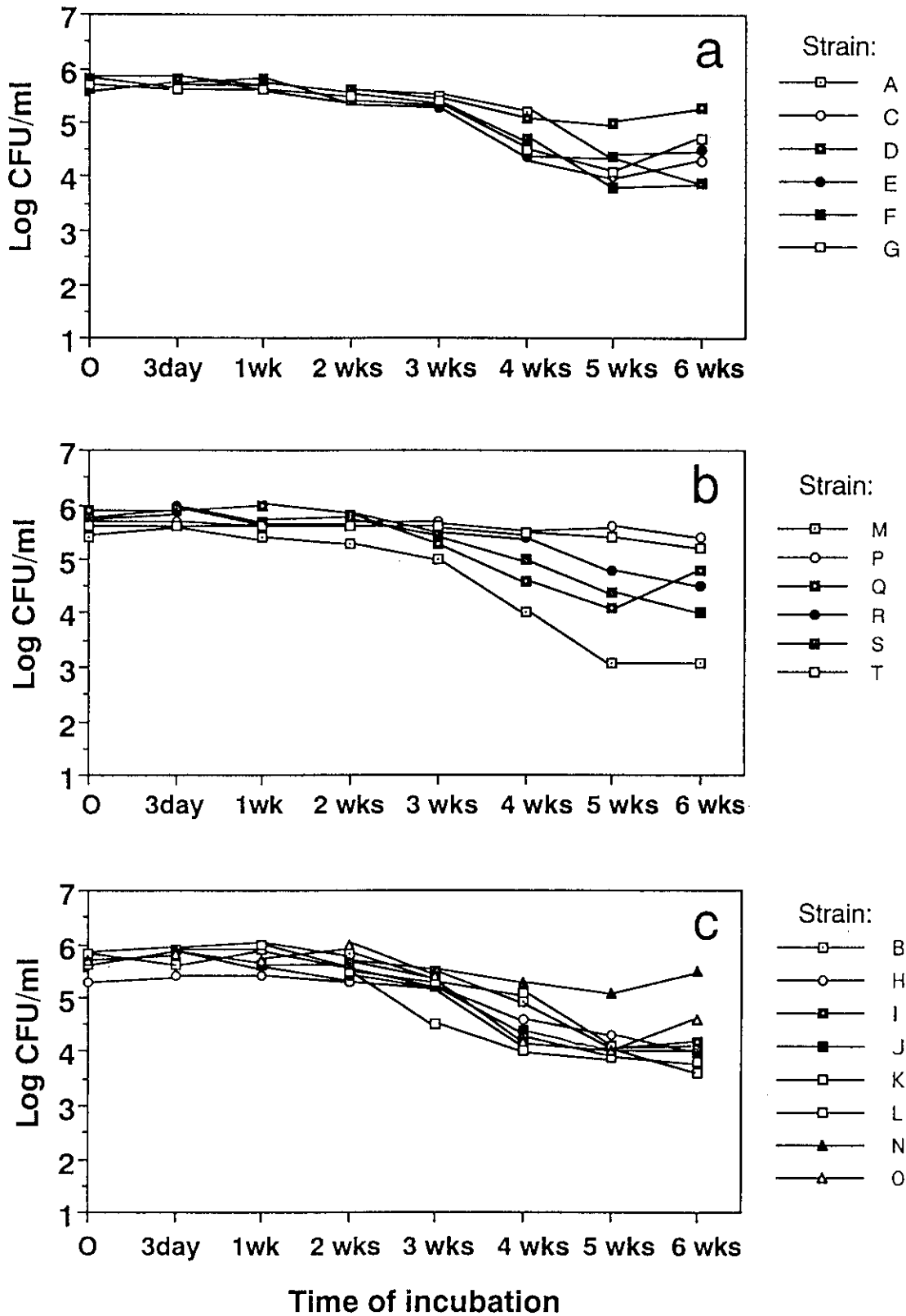
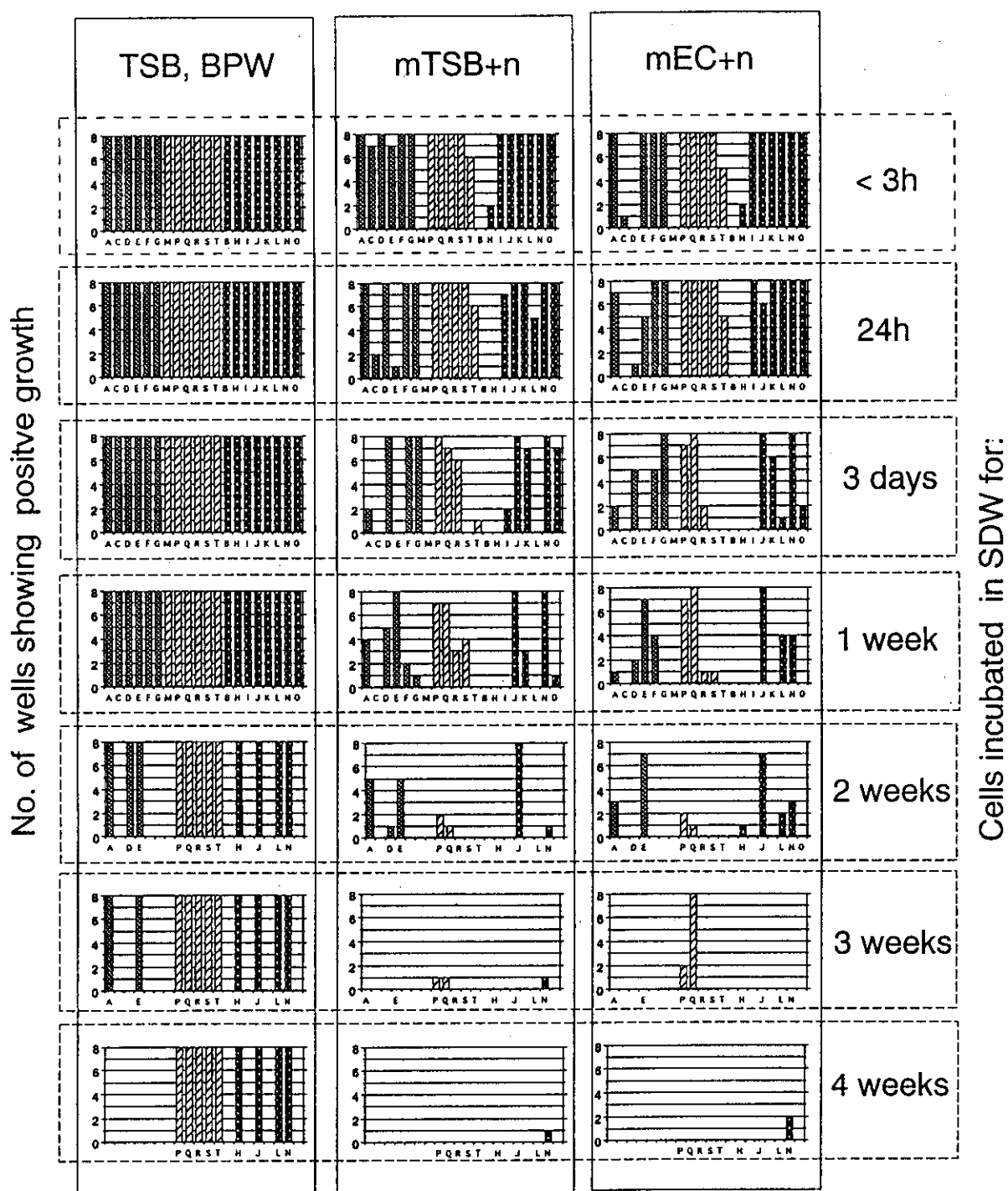


図2: 23°Cにてフィルター滅菌河川水中に6週間放置されたO157菌株の生残性の推移  
 (a)人糞便由来株, (b)牛糞便由来株, (c)環境・食品由来株

Enrichment liquid media tested



Panels of *E. coli* O157 strains tested

■, human fecal isolates; ▨, bovine fecal isolates; ▩, food and environmental isolates

図3：23°Cにて脱イオン水中に4週間放置されたO157菌株を各種液体増菌培地に接種し37°Cにて培養した場合の増殖の有無