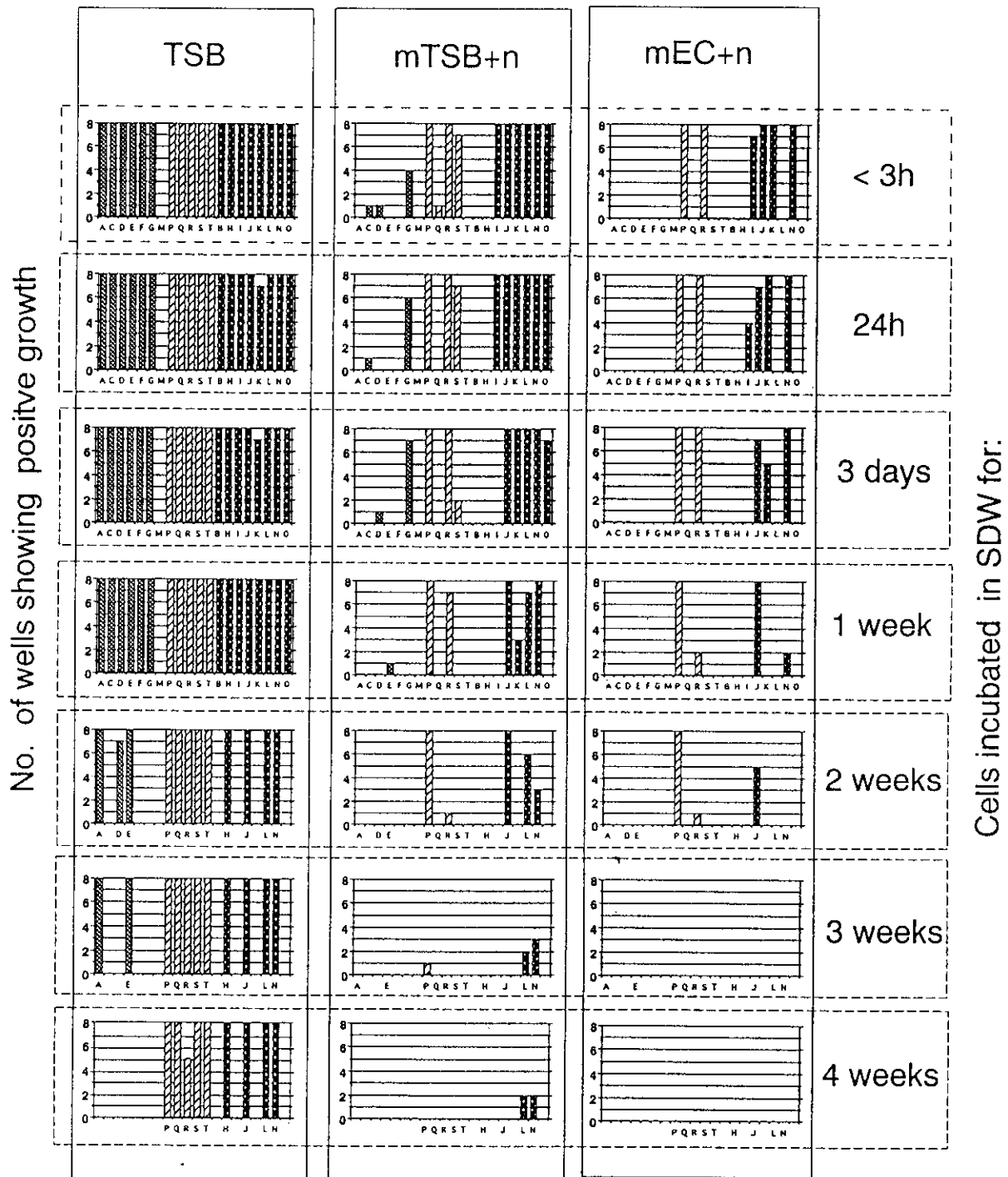


Enrichment liquid media tested

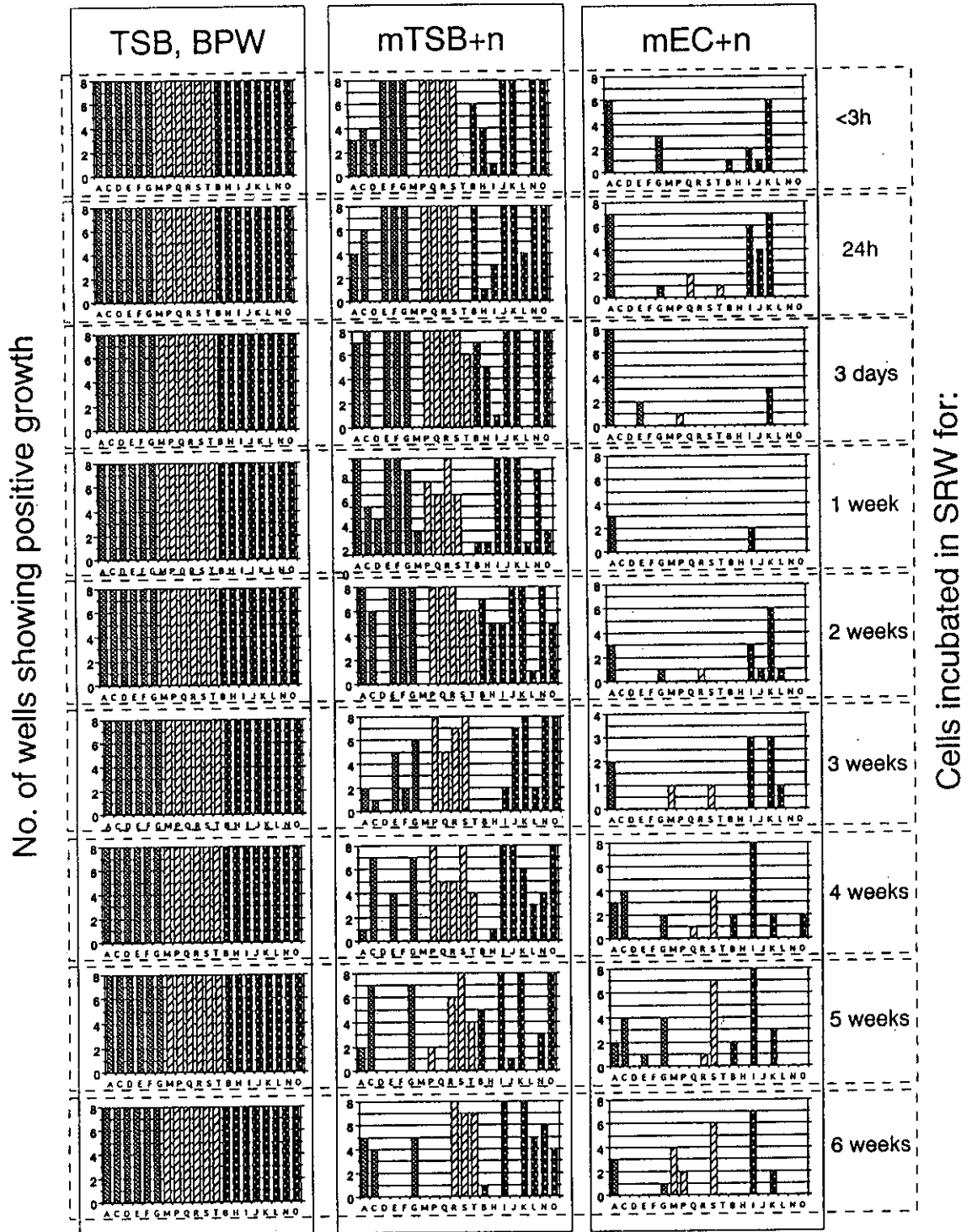


Panels of *E. coli* O157 strains tested

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

図4: 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42°Cにて培養した場合の増殖の有無

Enrichment liquid media tested

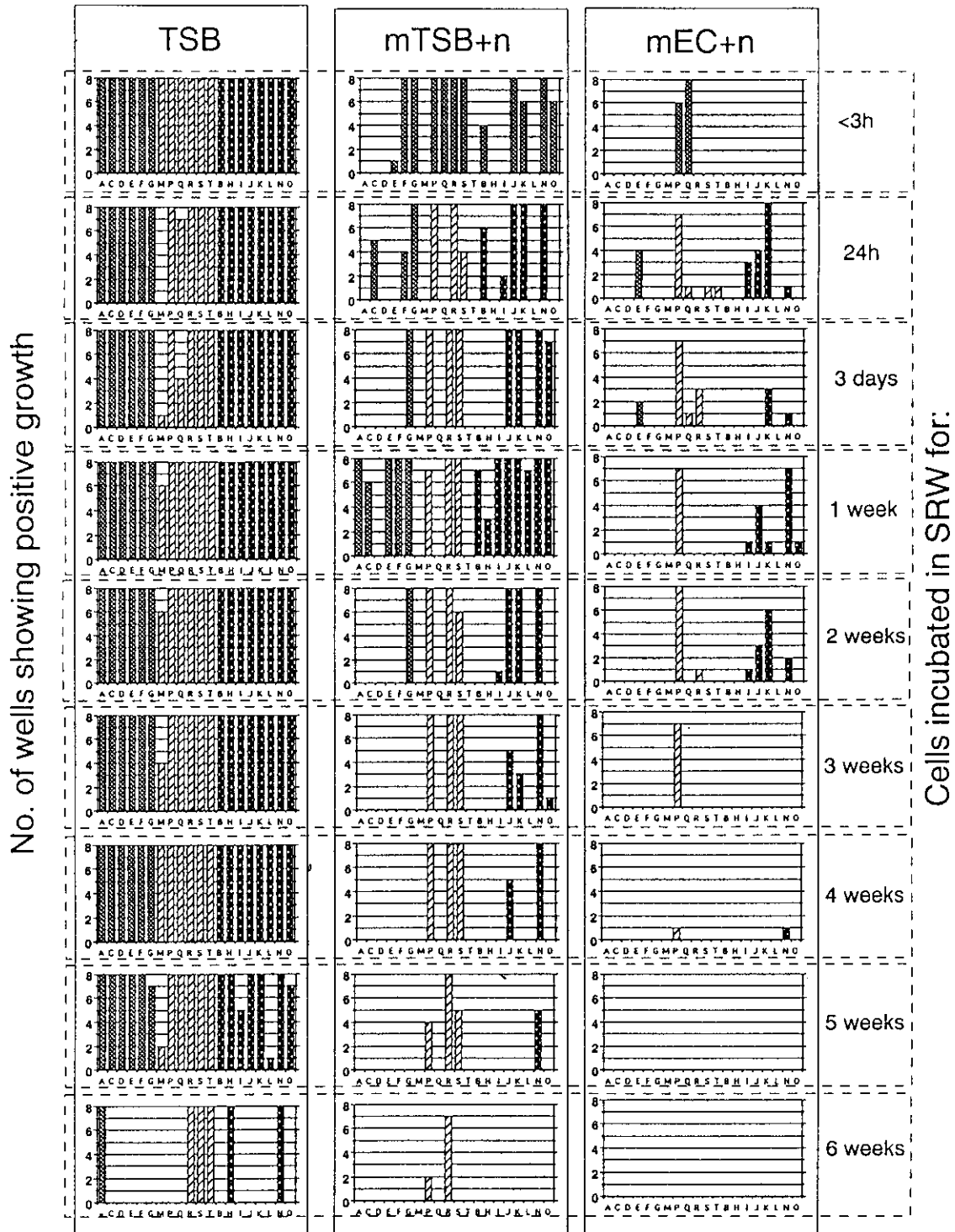


Panels of *E. coli* O157 strains tested

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

図5: 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

Enrichment liquid media tested



Panels of *E. coli* O157 strains tested

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

図 6: 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菌株を各種液体増菌培地に接種し42°Cにて培養した場合の増殖の有無

協力研究報告書

(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）

研究要旨 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・ブイヨン）→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。

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。

表1. メロンおよびレタスに接種された *Salmonella* の検出方法別回収状況

検査材料	接種菌数	前増菌培地接種量	検出方法(回収回数/3試行) *							
			A	B	C	D	E	F	G	H
PBS	10^2	1ml	2	2	2	2	2	2		
	10^1		2	2	2	2	2	2		
	10^0		2	2	2	2	2	2		
メロン(市販カットメロンおよび菌接種直前に1/8カット: 一般生菌数 $<10^1$ 、 4.5×10^1 、 1.2×10^5 /g)										
	10^2	10g	3	3	3	3	1	2	3	3
	10^1		3	2	3	3	0	1	3	1
	10^0		1	1	2	2	0	0	3	1
	10^{-1}		0	0	1	1	0	0	2	1
メロン(1/8カット後、5°C2日間保存: 一般生菌数 8.0×10^1 、 8.0×10^3 、 2.0×10^5 /g)										
	10^2	10g	3	3	3	2	1	1	3	2
	10^1		2	2	3	2	0	0	3	1
	10^0		2	1	3	2	0	0	3	2
	10^{-1}		1	1	1	1	0	0	2	1
レタス(購入後菌接種直前に3~4cm角にカット: 一般生菌数 2.0×10^3 、 2.3×10^4 、 3.0×10^5)										
	10^2	10g	2	2	2	2	0	1	3	2
	10^1		1	0	2	1	0	1	3	2
	10^0		1	1	2	2	0	0	1	2
	10^{-1}		0	0	0	0	0	0	0	0
レタス(3~4cm角にカット後5°C2日間保存: 一般生菌数 1.7×10^3 、 3.2×10^5 、 3.5×10^5)										
	10^2	10g	2	3	3	3	1	0	3	2
	10^1		2	1	3	3	1	0	3	2
	10^0		2	1	3	2	0	0	3	2
	10^{-1}		1	0	1	1	0	0	1	1

*検出方法:A, EEM→SC(セライトシステム)→MLCB; B, 同左→同左→DHL;
 C, 同上→SBG(セライトフッ素リアクトグリン)→MLCB; D, 同左→同左→DHL;
 E, BPW(ハップファートペプトンウォーター)→TT(ハーナーテトラチオネートブイオン)→DMLIA(タフルモチファイ
 トリジン鉄寒天); F, 同左→同左→BGS(フッ素リアクトグリンスルファヒトリジン寒天);
 G, 同上→RV(ラムホートウァジリヂスブイオン)→DMLIA; H, 同左→同左→BGS
 PBSについては2回試行したなかで、サルモネラを回収した回数を示した。

(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

研究協力者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨：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最良の方法を検討した。O157 検出は従来の 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、現在検討中ではあるが、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 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を示すのではないかと検討中である。

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。培養菌そのままでの添加と、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 CHROMagarO157TAM 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 25 g 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、CHROMagarO157TAM 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りと考えられた。

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

1. 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)

2. 学会発表

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

日本食品衛生学会第76回学術講演会：
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（1998年11月）

第21回日本分子生物学会年会：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（1998年12月）

日本薬学会第119年会：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（1999年3月）

表 1

結果

検出率

検体番号	添加菌数	凍結処理	培養液	CT-SMAC	TAM
Control	無し	無し	BPW- NmEC	0/1	0/1
1-5	H	無し	BPW- NmEC	5/5	5/5
6-10	M	無し	BPW- NmEC	5/5	1/5
11-15	L	無し	BPW- NmEC	2/5	0/5
16-20	H	無し	NmEC	5/5	5/5
21-25	M	無し	NmEC	5/5	5/5
26-30	L	無し	NmEC	4/5	2/4
31-35	H	有り	BPW- NmEC	5/5	5/5
36-40	M	有り	BPW- NmEC	4/5	1/5
41-45	L	有り	BPW- NmEC	1/5	0/5
46-50	H	有り	NmEC	5/5	1/5
51-55	M	有り	NmEC	5/5	3/5
56-60	L	有り	NmEC	2/5	1/5

H: 58, M: 5.8, L: 2.4 平均 cfu/ 0.1 ml 添加

表 2

No. 培養液	検体名	直接法エーゼ			直接法コンラージ			直接法			ビーズ法 30 μ l			ビーズ		
		判定	0.1mL	PCR	判定	0.1mL	PCR	判定	0.1mL	PCR	エーゼ	MLCB	DHL	エーゼ	MLCB	DHL
1	EEM-SBG	ほうれん草	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	EEM-SBG	ほうれん草-L	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	EEM-SBG	ほうれん草-H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	EEM-SBG	メロン-L	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	EEM-SBG	メロン-H	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
6	EEM-SBG	メロン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	BPW-RV	ほうれん草	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	BPW-RV	ほうれん草-L	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	BPW-RV	ほうれん草-H	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10	BPW-RV	メロン-L	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
11	BPW-RV	メロン-H	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
12	BPW-RV	メロン	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(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 女子栄養大学助教授

研究要旨：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。

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菌種を用いるとともに *E. coli* 0127:H21 (EPEC), *E. coli* 0124:HNM (EIEC), *E. coli* ST< (ETEC), *E. coli* 0157:H7 (VT1 & VT2) (EHEC) *K. aerogenes*, *S. rubidaea*, *V. parahaemolyticus*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* 021, *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トマト、キャベツ、かひれ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約1/10に *S. Enteritidis* を6 Log of cfu/1g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(リソ製)である。⑥PCR試験に用いたPrimerは組織侵入性遺伝子である。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、トリス/イ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：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。しかしながら従来の公定法は迅速・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

1. 論文発表
2. 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)

表 1 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾ 法併用による各種食品に接種した *S. Enteritidis* の検出

Food	<i>S. Enteritidis</i> counts ²⁾				Food	<i>S. Enteritidis</i> counts			
	0	1	2	3		0	1	2	3
Lettuce	-	+	+	+	Raw vegetables	-	+	+	+
Parseley	-	+	+	+	Spinach soak	-	+	+	+
Cabbage	-	+	+	+	Spinach butter sate	-	+	+	+
Sprouts	-	+	+	+	Okaka salad	-	+	+	+
Leek	-	+	+	+	Pumpkin salad	-	+	+	+
Welsh onion	-	+	+	+	Sea food salad	-	+	+	+
Turfed stone leek	-	+	+	+	Potatoe salad	-	+	+	+
Carrot	-	+	+	+	Mashed potatoe	-	+	+	+
Tomatoes	-	+	+	+	Vegetables soup	-	+	+	+
Watermelon	-	+	+	+	Apples juice	-	+	+	+
Melons	-	+	+	+	Orange juice	-	+	+	+
					Sea food sauces	-	+	+	+

1) SIN is *Salmonella* invasion tissue gene.

2) Log of cfu/g

表 2 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾法併用
による各種食品に接種した
S. Enteritidis の検出

Food	<u>S. Enteritidis</u> counts ²⁾			
	0	1	2	3
Liquid egg	-	+	+	+
Thick grill egg	-	+	+	+
Milk	-	+	+	+
Yougulto	-	+	+	+
Hamburger	-	+	+	+
Roast beef	-	+	+	+
Liver	-	+	+	+
Raw beef	-	+	+	+
Raw pork	-	+	+	+
Raw chicken	-	+	+	+

1) SIN is Salmonella invasion tissue gene.

2) Log of cfu/g

表3 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾ 法併用
によるふきとり試料と糞便に接種
した S. Enteritidis の検出

	<u>S. Enteritidis</u> counts ²⁾			
	0	1	2	3
ふきとり	-	+	+	+
糞便	-	+	+	+

- 1) SIN is Salmonella invasion tissue gene.
2) Log of cfu/g

表 4 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾ 法併用
による保菌患者糞便からの
S. Enteritidis の検出

患者		血清型
1	+	08:H
2	+	09:H
3	+	09:H
4	+	09:H
5	+	07:H
6	+	07:H
7	+	09:H
8	+	016:H

- 1) SIN is Salmonella invasion tissue gene
- 2) Log of cfu/g

表 5 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾ 法併用
による自然汚染した液卵からの
の S. Enteritidis の検出

液卵		血清型
1	+	09:H
2	+	09:H
3	+	09:H

- 1) SIN is Salmonella invasion tissue gene.
- 2) Log of cfu/g

表6 磁気免疫ビーズ法と PCR¹⁾ 法併用
 によるホウレンソウに接種した
S. Enteritidis の検出

自然光 放置 (days)	Total aerobes ²⁾	<u>S. Enteritidis</u> counts ²⁾	Detected
0	6.5	4.7	+
4	9.3	7.9	+

- 1) SIN is Salmonella invasion tissue gene.
- 2) Log of cfu/g

協力研究報告書

(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（国立感染症研究所）、大澤朗（神奈川県衛生研究所）

研究要旨 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ダメージ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。

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 5g
酵母エキス 5g
ポリペプトン 10g
塩化ナトリウム 5g
ソルビット 10g
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.2g
寒天 15g
ブロムチモールブルー 0.04g
フェノールレッド 0.04g

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60℃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も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。

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。

協力研究報告書

(5) -2 SDSソルビット寒天培地の検討

協力研究者 大澤朗（神奈川県衛生研究所）、島田俊雄（国立感染症研究所）

研究要旨 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で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。

A. 研究目的

SDSソルビット寒天培地のO157の分離培地としての性能を（選択性、識別性、増殖抑制等）をCT-SMAC等の分離培地との検討を行った。

B. 研究方法

1) 選択性、識別性について

O157菌株およびその他の供試菌株（表参照）をマックファランド1に調整した菌液の10倍希釈液の20 μ lをSDSソルビット寒天培地、CT-SMAC等に塗抹し、その発育性、識別性を観察した。対照培地としてハートインフュージョン（HI）寒天培地を用いた。

2) HI寒天を基準として発育集落数を比較した。各菌株のHIブイヨン培養菌液を希釈し、各培地3枚にコンラージ棒で塗抹する。1夜培養後、出現した集落数を数える。

3) ビーズ法使用時の釣菌率について

CT-SMACと比較した。牛挽肉（25g）に少量（100個）のO157菌を接種し、TBS（225ml）6時間培養後、ビーズ法を用いて釣菌率で比較した。

釣菌率=O157の集落数/他の菌の集落数+O157の集落数

C. 研究結果

1) 選択性、識別性について

O157の菌株はSDSソルビット寒天およびCT-SMACで同様に発育したが、菌株によってSDSソルビット寒天の方が若干阻止が弱いものがみられた（表1）。

集落の大きさは、SDSソルビット寒天の方がやや大きい傾向がある。

2) 抑制について

HI寒天を基準とした場合、SDSソルビット寒天はO157に対する抑制が従来分離培地に比べ弱い傾向にある（図1）。

3) ビーズ法使用時の釣菌率について

実験を行った4系列とも同様の結果が得られた。O157以外の集落数は4系列ともにSDSソルビット寒天培地の方が高い数値を示した（図2、表2）。

D. 考察

SDSソルビット寒天培地はO157の分離培地としては従来のもので同様の性能を示したが、他の菌に対する抑制はやや弱い傾向にある。したがって、汚染の少ない検体やO157菌体が損傷を受けている場合などからのO157菌株の検出に適した培地と考えられる。

表1

SDSソルビット寒天培地およびCT-SMAC平板上での
0157株およびその他の関連株の発育

血清型		VT型	菌株番号 (KEナバ ⁻)	由来	SDS(菌濃度, CFU/ml)		CT-SMAC(菌濃度, CFU/ml)	
0	H	VT1/VT2			10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶
157	7	+ / +	4	ト(横須賀)	+	+	+	+
			19	ト(小田原)	+	+	+	+
			23	7ナリ	+	+	+	+
			24	7ナリ	+	+	+	+
			31	と場牛腸	+	+	+	+
			70	ト(秦野)	+	+	+	+
			101	ト(茅ヶ崎)	+	+	+	+
			149	と場7ナリ	+	+	+	+
			154	と場7ナリ	+	+	+	+
		+ / -	212	米, ハナ ⁻ グ ⁻	+	+	+	+
		- / +	1	ト(三崎)	+	+	+	+
			10	食品	+	+	+	+
			56	ト(横須賀)	+	+	+	+
			95	ト(相模原)	+	+	+	+
			108	ト(藤沢)	+	+	+	+
	121		ト(大阪)	+	+	+	+	
	127		ト	+	+	+	+	
	181		と場牛便	+	+	+	+	
	210		ト(藤沢)	+	+	+	+	
	214		と場7ナリ	+	+	+	+	
	MN		59	ト(三崎)	+	+	+	+
			22	ト(相模原)	+	+	+	+
		83	ト(相模原)	+	+	+	+	
		87	7ナリ	+	+	+	+	
		90	ト(相模原)	+	+	+	+	
	- / -	55	ト(大和)	WK	WK	WK	-	
		134	と場7ナリ	WK	WK	-	-	
		186	ト(鎌倉)	WK	WK	-	-	
		196	ト(藤沢)	WK	WK	WK	WK	
		231	と場牛枝	WK	WK	WK	WK	
		232	と場7ナリ	WK	WK	WK	-	
		34	と場豚ハ ⁻	+y	+y	+r	+r	
39		と場豚腸	+y	+y	+r	+r		
48		と場豚腸	+y	+y	+r	+r		
50		と場豚腸	+y	+y	+r	+r		
12	132	と場7ナリ	WK	WK	WK	-		
16	195	ト(藤沢)	WK	WK	-	-		
19	159	A2株(予研)	-	-	+	+		
40	136	と場7ナリ	WK	WK	WK	-		
45	2	ト	WK	WK	WK	WK		
1	20	+ / -	95001	ト(厚木)	WK	WK	-	-
6	16	ST, LT	95036	ト	-	-	-	-
8	7		98	ト(秦野)	+	+	WK	WK
6	11		143	ト(鎌倉)	WK	WK	WK	WK
28			169	ト(鎌倉)	+y	+y	+r	+r
			174	牛便	-	-	WK	WK
			X-6	食品(牛肉)	+g	+	+g	+
			X-7	食品(牛肉)	+y	+y	+r	+r
			X-9	食品(牛肉)	+g	+	+	+
			OD-24	ト(小田原)	-	-	-	-

増殖の表記 : +旺盛に増殖(SDSソルビット寒天培地では暗紫色、CT-SMACでは白色)

-全く増殖せず

WK微細コロニーが100個以下で増殖

y黄色

r赤色

g灰白色