

19990469

平成11年度厚生科学研究報告書

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

腸管出血性大腸菌 O157：H7 の凍結損傷と損傷菌検出 熊谷 進, 工藤由起子, 小沼博隆, 池戸正成, 中川 弘	1
殻付き卵の保存中の SE 菌数の変化の研究 熊谷 進, 工藤由起子, 榊原芳恵	35
食品汚染腸炎ビブリオの検出方法 熊谷 進, 工藤由起子	59
卵の日付け表示に関する研究 小沼博隆, 宮原美知子	69
リステリア菌検出方法の研究 山本茂貴, 丸山 務, 吉田徹也, 仲真晶子, 斉藤章暢, 寺尾道徳	101
ハエ類による腸管出血性大腸菌 O157 伝播の実態解明に関する 基礎研究 II 安居院宣明, 小林睦生, 佐々木年則	117

腸管出血性大腸菌 O157:H7 の凍結損傷と損傷菌検出

分担研究者：熊谷 進（東京大学大学院農学生命科学研究科）

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）

池戸 正成（栄研化学）

中川 弘（東京顕微鏡院）

食材を長期間-20℃に保存することによって、とくにイチゴ、大根おろし、塩キャベツにおいて、食材中に存在する O157 が損傷を受け、選択培地上で増殖できない状態になることがわかった。このような食材からは、従来の増菌方法である選択材を含むブロス中では、損傷菌を死滅させることが考えられたため、まず選択材を含まないブロス中に食材を浸し、ついで選択的に O157 を増菌するために選択剤を添加したブロス中で培養することによって検出することを試みた結果、損傷菌のみが存在することが想定される食材から、選択増菌のみによる方法と比較して高率に菌が検出できることが判明した。以上の結果から、冷凍保存した食材からの O157 を検出するためには、選択材を含まないブロス中で損傷菌の回復を計った後に選択増菌培養を行う方法が適していることが判明した。

1. 研究目的

冷凍食品の普及にともなって、また食中毒調査検体としての食材の冷凍保存にともなって、凍結検体から食中毒細菌を検出しなければならない機会が増えてきた。その場合に懸念されることとして、凍結によって目標とする細菌が損傷を受け、その結果として選択剤を含む増菌培地中での増菌の過程においてこれら損傷菌が死滅して菌が検出できない可能性が考えられている。本研究の目的は、食品中に存在する腸管出血性大腸菌 O157:H7 が、冷凍保管中に損傷を受ける程度を明らかにすること、さらに損傷を受けた菌を効率良く検出する方法を見出すことにある。なお、損傷菌の検出方法として検討を加えた方法は、前年度の損傷菌接種検体からの検出を指標として見出した検出方法である。

2. 研究方法

(1) 冷凍保存中の損傷菌の出現

用いた菌株は、腸管出血性大腸菌 O157:H7 予研 1 2 6 株（実験 1、5）、同予研 2 1 2 株（実験 2）、同 9 7 0 0 5 6（実験 3、4）であり、各菌株を TSB 中で 37℃ 18 時間培養したも

のを接種菌液とした。菌液中の菌数は、希釈した菌液0.1ml ずつを TSA 平板10枚に塗抹後37℃一晚培養した後に集落数を数えることによって求めた。

検体として以下の食材を用いた。

実験1：牛ひき肉（赤身）、同（30%脂肪）、キャベツ（生）、トマト（生）、じゃがいも（加熱）、イチゴ（生）、キャベツ（3%塩）

実験2：大根おろし、きゅうり（うすぎり）、わかめ、牛乳、野菜ジュース（市販品）

実験3：トマト（生）、イチゴ（生）、キャベツ（生）、じゃがいも（加熱）、イチゴ（生）、キャベツ（3%塩）、牛ひき肉（30%脂肪）

実験4：牛ひき肉（赤身）、キャベツ（生）、トマト（生）、じゃがいも（加熱）、イチゴ（生）、キャベツ（3%塩）、大根おろし、きゅうり（うすぎり）、わかめ、牛乳、野菜ジュース（市販品）

実験5：大根おろし、きゅうり（うすぎり）、わかめ、牛乳、野菜ジュース（市販品）

ストマッカー袋中に入れた各検体25gに菌液0.1mlを接種し、-20℃冷凍庫内に保存した。逐時的に検体を取り出し、25g当たり0.1%ペプトン加PBSを225ml加え、ストマッカーでホモゲナイズしてから段階希釈し、その0.1mlをCT-SMACおよびレプリカフィルターをのせたTSA上に塗布し、37℃18時間培養後、集落数を数えた。なお、このCT-SMAC上の集落を損傷を受けていない菌の集落と考えた。TSAレプリカフィルター上に発育した集落は、フィルターごとクロモアガーO157上に移し、37℃6時間培養してからO157を示す紫色集落を、損傷菌も含めた菌の集落として計数した。

各検体については実験に先立ち、TSAとデソキシコレート培地を用いて一般生菌数と大腸菌群数を求めた。

(2) 冷凍保存食材からの菌の検出

菌を接種してから冷凍保存した検体25gに225mlのノボピオシン加mECプロス(mEC+n)、または胆汁酸とノボピオシンを除いたmEC(b-mEC)を添加し解凍してからホモゲナイズし、前者については42℃18時間培養してから、また後者については25℃2-3時間培養後に42℃18時間培養してから、そのまま、または免疫磁気ビーズで集菌し、CT-SMACとクロモアガーO157に塗抹し、37℃24時間培養後に疑われる集落数を計測し、そのうちの数個については確認のためにラテックス凝集反応とCLIGを行った。

3. 研究結果

(1) 実験1：接種菌数は 9.9×10^7 cfu/25gであった。検体中の一般生菌数(Log/g)と大腸菌群数(Log/g)はそれぞれ、牛ひき肉（赤身）：5.60；2.26、同（30%脂肪）：6.00；1.60、キャベツ（生）：2.48；0、トマト（生）：2.98；0、じゃがいも（加熱）：2.40；0、イチ

ゴ（生）：3.77；2.26、キャベツ（3%塩）：2.93；0であった。いずれの食材においても、56日目にはCT-SMAC上の集落数がTSA上よりも数桁少ないことが見いだされ、この保存期間で損傷を受ける菌が多数出現することがわかった。

実験2：接種菌数は 9.2×10^7 cfu/25gであった。検体中の一般生菌数（Log/g）と大腸菌群数（Log/g）はそれぞれ、大根おろし：3.74；0、きゅうり（うすぎり）：5.41；1.85、わかめ：5.83；1.00、牛乳：0；0、野菜ジュース（市販品）：0；0であった。野菜ジュースと大根おろしについては損傷菌が低率ではあるが出現したが、その他食材については出現しなかった。

実験3：接種菌数は 4.0×10^6 cfu/25gであった。検体中の一般生菌数（Log/g）と大腸菌群数（Log/g）はそれぞれ、トマト（生）：2.30；0、イチゴ（生）：3.26；0、キャベツ（生）：3.63；0、じゃがいも（加熱）：2.30；0、キャベツ（3%塩）：3.08；0、牛ひき肉（30%脂肪）：6.48；4.12であった。トマト、塩キャベツ、イチゴにおいて損傷菌の出現が認められた。

実験4：接種菌数は 6.0×10^7 cfu/25gであった。検体中の一般生菌数（Log/g）と大腸菌群数（Log/g）はそれぞれ、牛ひき肉（赤身）：8.01；7.59、キャベツ（生）：7.11；5.41、トマト（生）：6.17；4.96、じゃがいも（加熱）：4.29；0、イチゴ（生）：5.89；0、キャベツ（3%塩）：7.08；5.82、大根おろし：5.18；2.60、きゅうり（うすぎり）：6.94；5.38、わかめ：6.54；4.53、牛乳：0；0、野菜ジュース（市販品）：0；0であった。大根おろし、イチゴ、キャベツにおいて16週目までに損傷菌の出現が認められた。

実験5：接種菌数は 9.0×10^7 cfu/25gであった。検体中の一般生菌数（Log/g）と大腸菌群数（Log/g）はそれぞれ、大根おろし：2.36；0、きゅうり（うすぎり）：5.49；1.67、わかめ：2.96；0、牛乳：0；0、野菜ジュース（市販品）：0；0であった。いずれの食材においても64週目までに損傷菌の出現が認められた。

（2）損傷菌の出現頻度が比較的高いことが認められた食材であるイチゴ、大根おろし、塩キャベツ、および比較のために牛ひき肉に、前年度の研究により比較的損傷を受けやすい菌株970056を 10 cfu/25g接種してから、 -20°C に保存した後の各検体からのO157の検出を行った。その結果、イチゴと大根おろしについてはmEC+nよりもb-mECによる増菌方法の方が検出率が高かった。塩キャベツについては両方法の間に大きな差異は無かった。これら食材についてはいずれの場合も検出率が30%未満であった。この比較的低い検出率は、菌が保存期間中に死滅したことを反映したものと考えられる。牛ひき肉については、それら食材よりも長期間保存したにもかかわらず、両方法によって効率的に検出できた。

牛ひき肉に菌株212を 160 cfu/25g接種してから -20°C に2年7ヶ月保存した後に、mEC+nまたはb-mECで増菌した後に免疫磁気ビーズで集菌し、平板に塗抹する方法で検出を試みた結果、それぞれの増菌方法による検出率は4/16および13/15と、後者の方が明

らかに高かった。

以上の結果から、食材を長期間−20℃に保存することによって、とくにイチゴ、大根おろし、塩キャベツにおいて、食材中に存在する O157 が損傷を受け、選択培地上で増殖できない状態になることがわかった。このような食材からは、従来の増菌方法である選択材を含むブロス中では、損傷菌を死滅させることが考えられた。そこで、こうした損傷菌を回復させるために、まず選択材を含まないブロス中に食材を浸し、ついで選択的に O157 を増菌するために選択剤を添加したブロス中で培養することによって検出することを試みた結果、損傷菌のみが存在することが想定される食材から、選択増菌のみによる方法と比較して高率に菌が検出できることが判明した。以上の結果から、冷凍保存した食材からの O157 を検出するためには、選択材を含まないブロス中で損傷菌の回復を計った後に選択増菌培養を行う方法が適していることが判明した。

3. 結論

食材を長期間−20℃に保存することによって、とくにイチゴ、大根おろし、塩キャベツにおいて、食材中に存在する O157 が損傷を受け、選択培地上で増殖できない状態になることがわかった。このような冷凍保存した食材からの O157 を検出するためには、選択材を含まないブロス中で損傷菌の回復を計った後に選択増菌培養を行う方法が適していることが判明した。

4. 発表

誌上発表：

Hara-Kudo Y., Ikedo M., Kodaka H., Nakagawa H., Goto K., Masuda T., Konuma H., Kojima T. & Kumagai S. (2000) Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2866-2872.

Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Kojima, T., Ikedo, M., Kodaka, H., Konuma, H. and Kumagai, S. Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. *International Journal of Food Microbiology*. in press.

口演発表

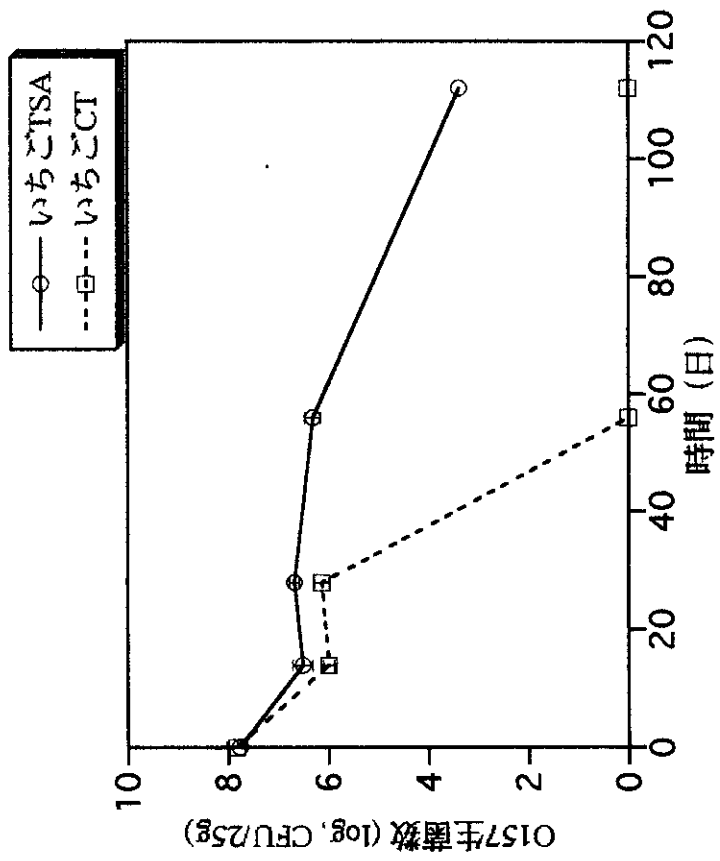
Yukiko Hara-Kudo, Hirotaka Konuma, Hiroshi Nakagawa, Hidemasa Kodaka, Masanari Ikedo, Tadashi Kojima, Takashi Masuda, Kokichi Goto and Susumu Kumagai : Enrichment Procedures for Non-stressed and Freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 Isolation from Foods. Sixth Annual Congrece of Food Safety ' Foodborne Illuness', Porto, Poltugal, May, 1999.

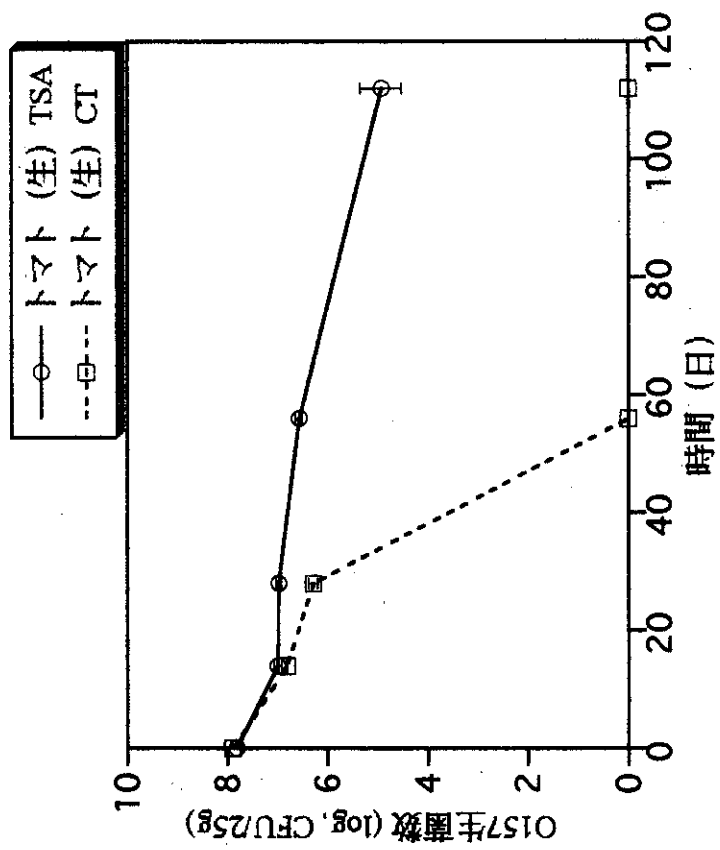
Yukiko Hara-Kudo, Hirotaka Konuma, Hiroshi Nakagawa, Hidemasa Kodaka, Masanari Ikedo, Tadashi Kojima, Takashi Masuda, Kokichi Goto and Susumu Kumagai. Selective enrichment for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. World Veterinary Congress, Paris, Sep., 1999.

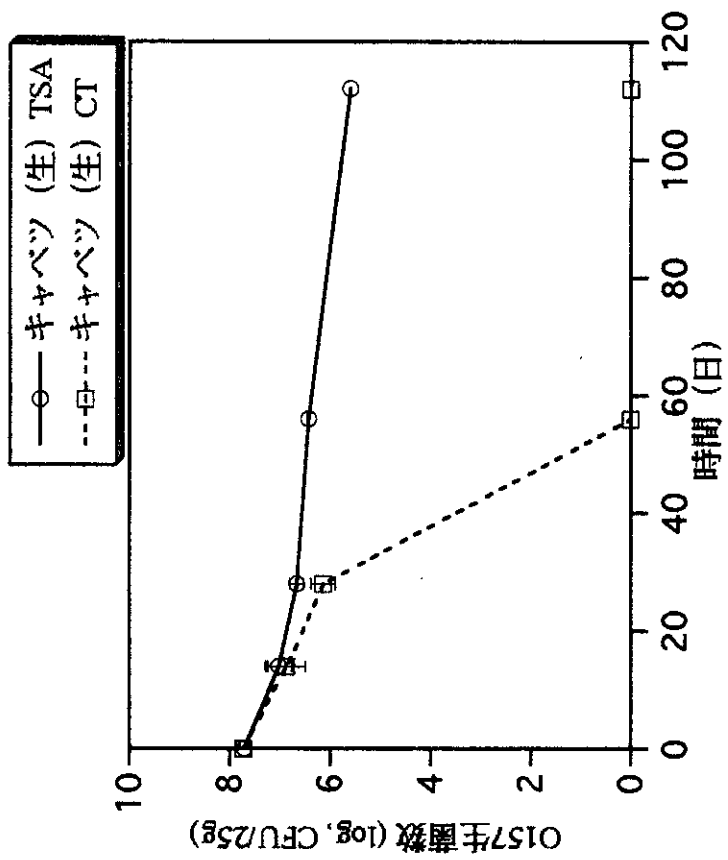
工藤由起子、中川 弘、小高秀正、池戸正成、小島 禎、増田高志、後藤公吉、尾上洋一、小沼博隆、熊谷 進：腸管出血性大腸菌 O157 の食品中での凍結損傷とその検出方法の検討。第 72 回日本細菌学会、平成 11 年 3 月、東京。

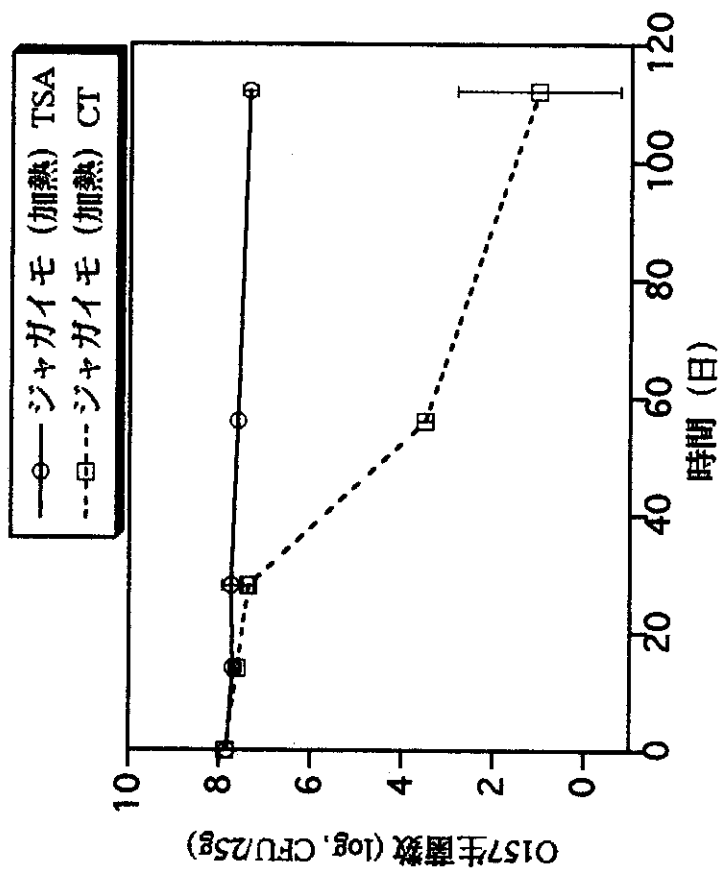
中川弘、小島禎、池戸正成、小高秀正、尾上洋一、小沼博隆、工藤由起子、熊谷進：凍結損傷を受けた腸管出血性大腸菌 O157 の食品中での回復と増菌方法の検討。第 127 回日本獣医学会、平成 11 年 4 月、相模原。

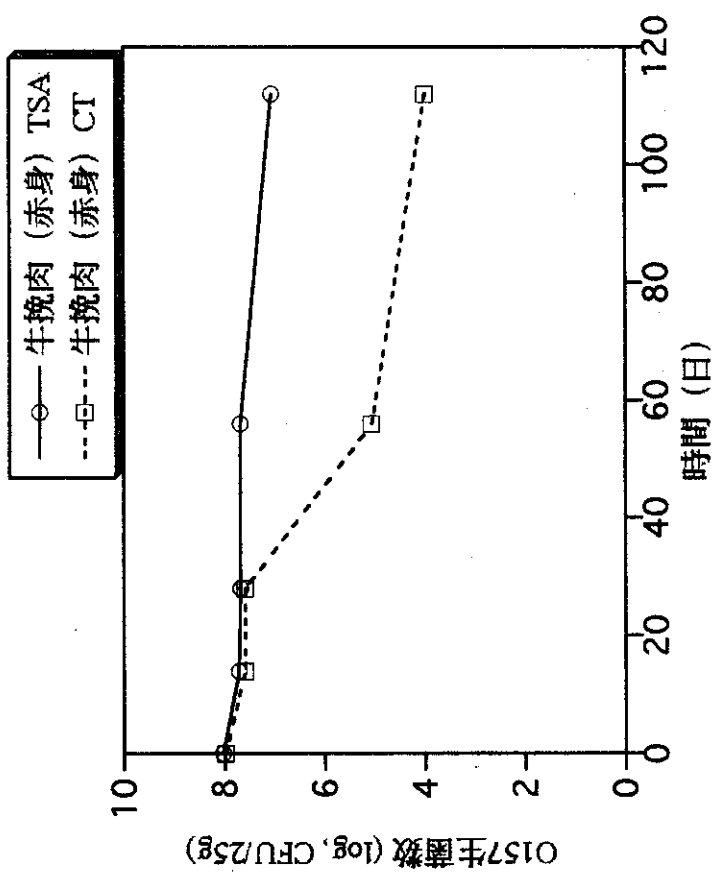
実験 1

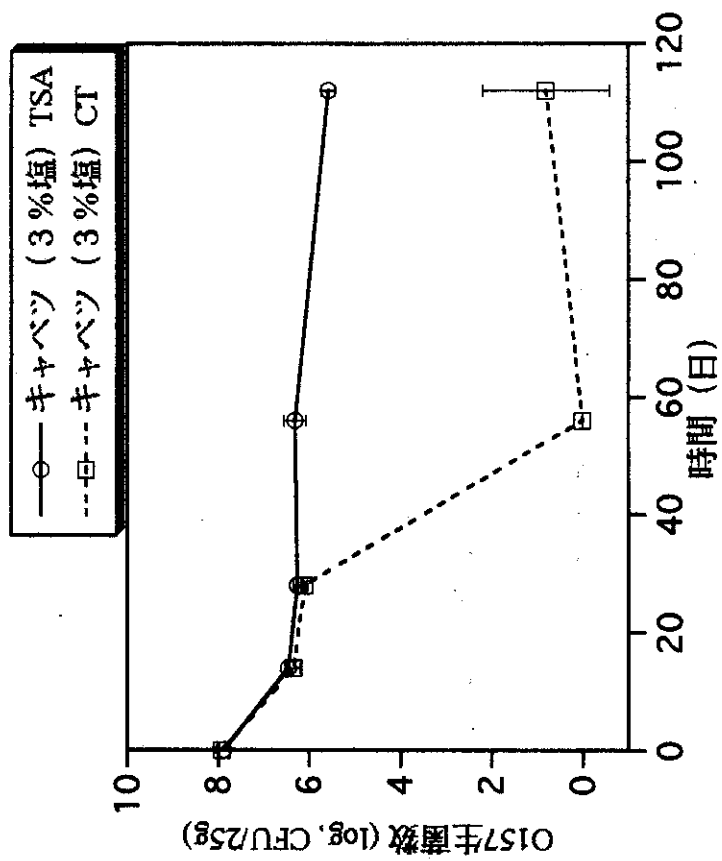


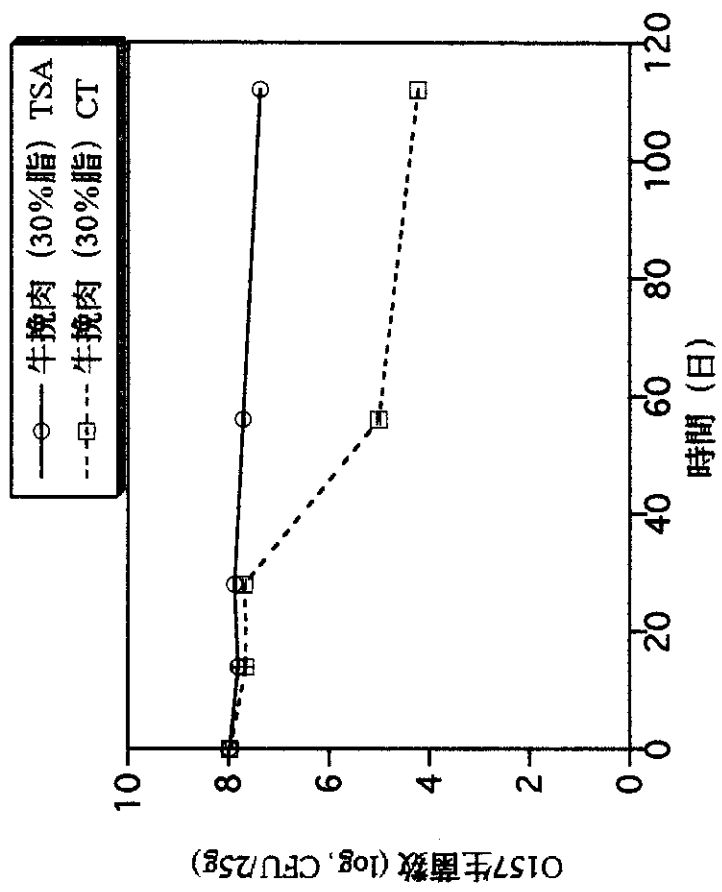




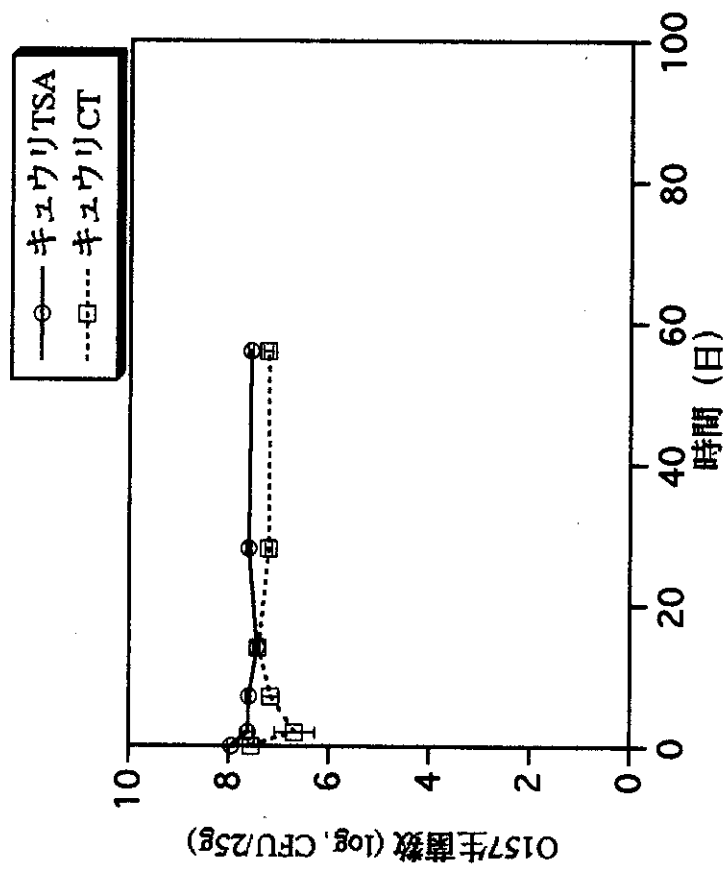


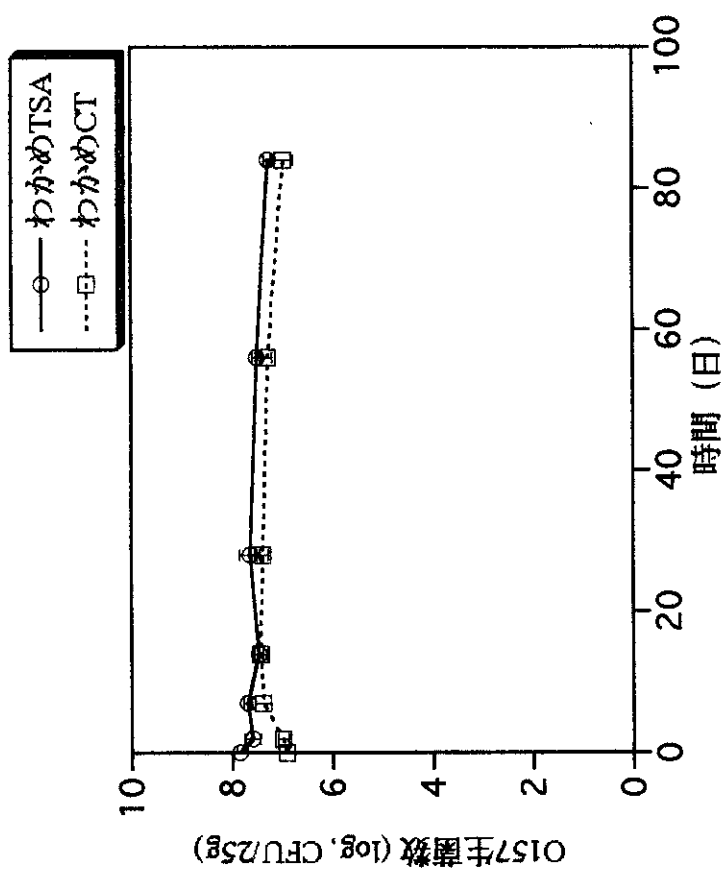


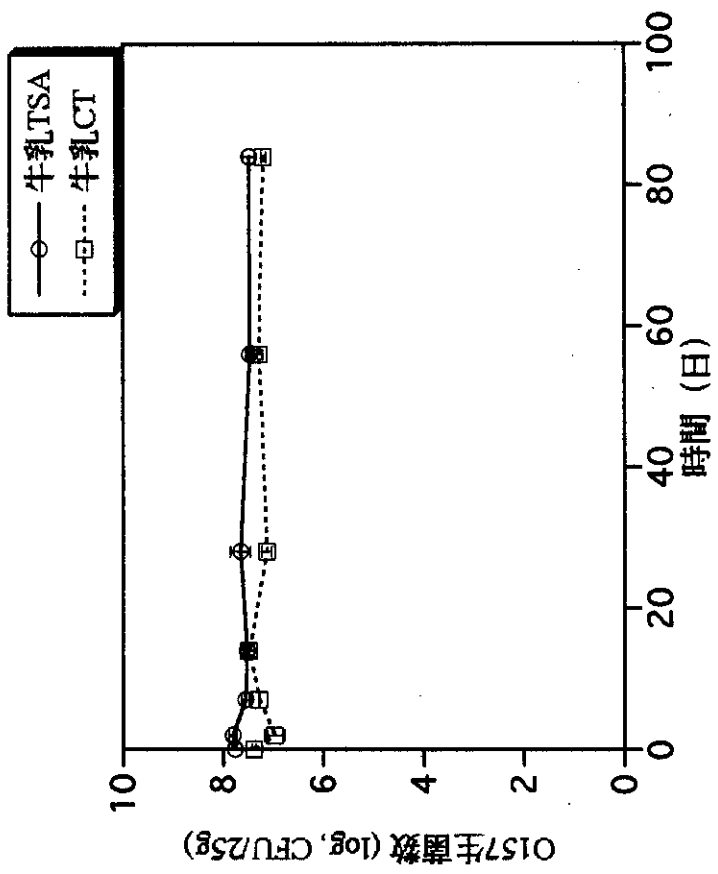


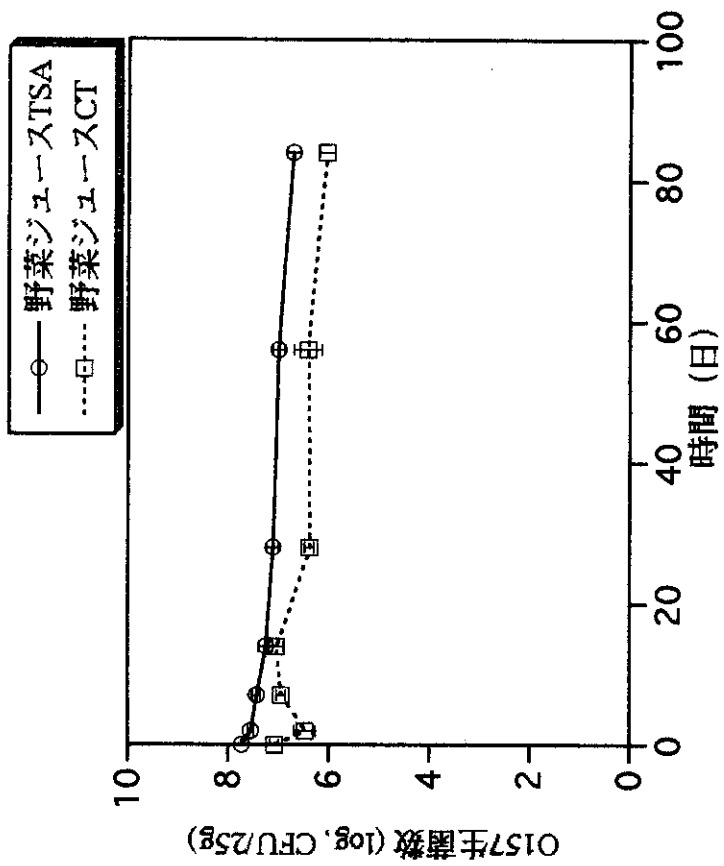


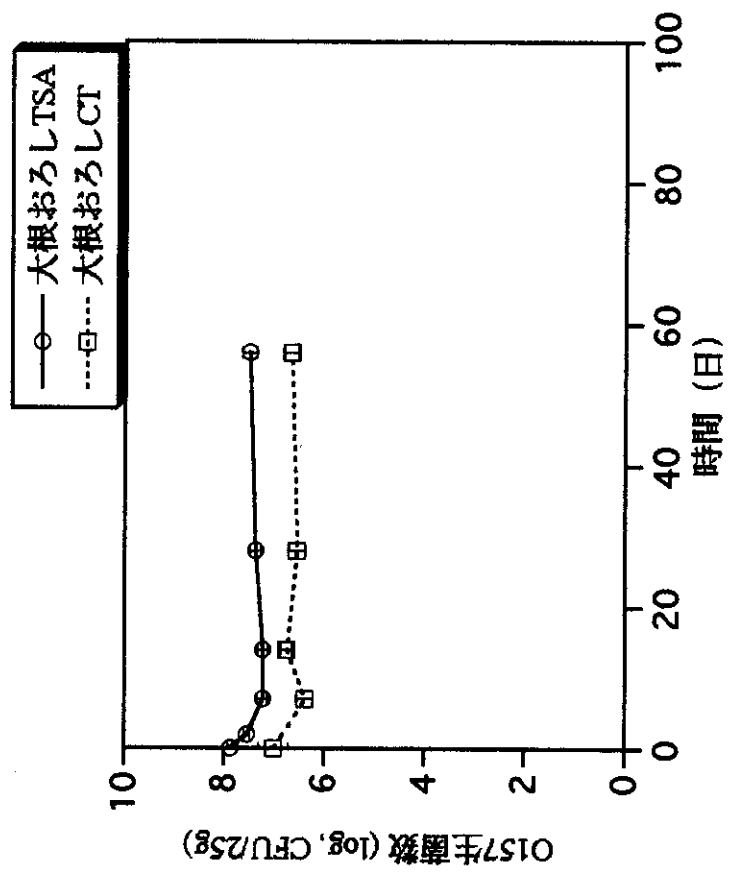
実験 2











実験 3

—■— ジャガイモTSA
····□···· ジャガイモECT

-20°C 損傷菌2/10+

