

表20 殻付き卵中におけるS.Eの増殖性(冬場2/25~4/11)

産卵後2日目の卵にSE接種後20°Cで保存し、1週間ごとに10個ずつ検査					
保存期間	1週間	2週間	3週間	4週間	5週間
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.7E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
SE増殖菌数	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	3.3E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	1.7E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
SE増殖個数	2/10	0/10	0/10	1/10	0/10
SE生存個数	9/10	10/10	8/10	8/10	4/10
SE死滅個数	9/10	10/10	8/10	8/10	4/10

厚生科学研究費補助金（新興再興研究事業）

分担研究報告書

## リステリア菌検出方法の研究

分担研究者：山本茂貴

研究協力者：丸山務（麻布大学）、吉田徹也（長野衛生公害研究所）、仲真晶子（東京都衛研）、斉藤章暢（埼玉衛研）、寺尾道徳（新潟保健科学研）

自然汚染豚挽肉と同鶏挽肉を用いて、6種類の増菌方法と2種類の選択分離培地を組み合わせた方法によって、リステリア菌の分離を試みることによって、各方法を比較検討した。挽肉からのリステリア菌検出のための方法として、分離培地にBCM培地を用いた場合には、HalfFraser培地24時間—Fraser培地48時間の2段階増菌方法が最も優れていたが、分離培地としてPALCAM培地を用いた場合には、増菌方法間に大きな差異は認められなかった。

### I. 緒言

食品衛生分野におけるリステリアの検査は、食品などの材料から *Listeria monocytogenes* を分離・同定することであり、その為には増菌培養、分離培養、確認培養（同定）の手順が不可欠である。選択増菌及び分離培養法として、現在いくつかの方法があり、IDFのLovett増菌培地、また米国USDA/FSIS法で採用されており、肉での増菌に適しているとされているUVM培地さらにはFraser培地などが挙げられる。

しかしながら、これら増菌培地の性能を同時に評価した報告はない。そこで著者らは *L.monocytogenes* の汚染が高い生食肉を用いて、上記3種の選択増菌培地を5種類の培養法で比較検討した。また、一部の検体については非選択培地との比較も行った。

## II. 実験材料

### 1. 検査材料

1999年8月から同年10月までに、相模原市内のスーパーマーケットにおいて市販されているパック入りの挽き肉（鶏挽き肉20検体、豚挽き肉20検体）を検体とした。検査材料は、購入後15分以内に4℃に保管し同日中に使用した。

### 2. 使用培地

#### (1) リステリア菌増菌用培地

- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| ・ UVM 培地              | MERCK社 |
| ・ Lovett 増菌培地 (EB 培地) | MERCK社 |
| ・ half Fraser 培地      | MERCK社 |
| ・ Fraser 培地           | MERCK社 |

#### (2) リステリア菌選択分離培地

- |             |          |
|-------------|----------|
| ・ PALCAM 培地 | MERCK社   |
| ・ BCM 培地    | 栄研化学株式会社 |

#### (3) その他の培地

- |                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| ・ BRAIN HEART INFUSION BROTH 培地 | DIFCO社   |
| ・ 血液寒天培地                        | 栄研化学株式会社 |
| ・ PYP 基礎培地                      | 日水製薬株式会社 |
| ・ TRYPTOSE AGAR 培地              | DIFCO社   |

### 3. 血清型別用抗血清

- |                |       |
|----------------|-------|
| ・ リステリア型別用免疫血清 | デンカ生研 |
|----------------|-------|

### 4. PCR用試薬類

#### (1) PCR用調整試薬

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| ・ <i>Ex Taq</i> Buffer | TAKARA |
| ・ dNTP Mixture         | TAKARA |

- ・ *Ex Taq*
- ・ Primer Mono A・B
- (2)電気泳動用 Agarose1600
- (3)TBE
  - ・ TRIZMA BASE
  - ・ EDTA・2Na
  - ・ ホウ酸 特級
- (4)エチジウムブロマイド

T a K a R a  
T a K a R a  
和光純薬工業株式会社

S I G M A 社  
和光純薬工業株式会社  
和光純薬工業株式会社

### Ⅲ. 実験方法

#### 1. 検体の処理

検体は無菌的操作のもとに、25g をストマッカー袋に秤量し、この各々に half Fraser 培地、UVM 培地、Lovett 増菌培地(以下 EB 培地)及び BRAIN HEART INFUSION 培地(以下 BHI 培地)の 225ml を加えた。

#### 2. 増菌培養

検体と培地は 30 秒間ストマッカー処理し、30℃で培養した。培養時間及び方法は、①half Fraser 培地 24 時間 + Fraser 培地 48 時間の 2 段階増菌、②UVM 培地 48 時間増菌、③EB 培地 48 時間増菌、④half Fraser 培地 24 時間増菌⑤UVM 培地 24 時間増菌、⑥BHI 培地 24 時間増菌の 6 通りとした。なお、Fraser の 2 段階増菌は、half Fraser 培地で 30℃、24 時間増菌後その 100 $\mu$ l を Fraser 培地 10ml に接種し 35℃、48 時間培養した。(図 1)

#### 3. 分離培養

各種増菌液 20 $\mu$ l を PALCAM 培地及び BCM 培地にそれぞれ画線塗抹し、いずれも 35℃で 48 時間培養を行った。

#### 4. *L.monocytogenes* の推定

PALCAM 培地上に出現した典型的な集落(Esculin を分解し、黒色ハローが見られる灰~濃茶褐色の凹型コロニー)を 10 個釣菌して BCM 培地に画線塗抹し、24 時間培養後、青色に発育するかを観察した。10 個全てが青色にならなかった場合には、さらに 10 個 PALCAM 培地から BCM 培地に画線塗抹し、観察を行った。

BCM 培地上における *L.monocytogenes* は青色発色するが、他の集落に埋まるなどして独立した集落にはならない場合はその集落をはじめに PALCAM 培地を用いて再分離し、典型的な集落を再び BCM 培地で青色に

発育するかを確認した。

#### 5. 同定

BCM 培地に画線培養を行い、青色の発育が確認されたものについては、 $\beta$ -溶血性、ラムノース分解性の観察によって *L.monocytogenes* の同定を行った。

$\beta$ -溶血性については、血液寒天培地に穿刺培養し、その溶血の程度を対照をおいて観察した。

ラムノース分解性については、1%ラムノース加 PYP 基礎培地に穿刺し、30℃、24 時間培養後黄色に培地が変色したものを陽性とした。

#### 6. PCR による確定

PCR のプライマーには MonoA・B を使用した。

BCM 培地に画線塗抹し、青色に発育した菌株を BHI 培地に接種、35℃、24 時間培養した。この菌液 500  $\mu$ l を滅菌チューブに取り、15000rpm で 2 分間遠心分離後、菌体を TE (Tris.EDTA) 200  $\mu$ l に浮遊させ、95℃10 分間煮沸し加熱処理菌は 15000rpm、2 分間遠心分離しその上清を鋳型 DNA とした。

1 サンプルあたり滅菌超純水 29.75  $\mu$ l、Buffer5.0  $\mu$ l、dNTP Mixture4.0  $\mu$ l、Primer MonoA・B 各 0.5  $\mu$ l、*Ex Taq*0.25  $\mu$ l、テンプレート 10  $\mu$ l によって PCR 反応をさせ、その後 1.5%アガロースゲルに PCR 増幅産物 5  $\mu$ l 注入し、TBE を用いて 20 分間電気泳動させた。そのゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイドを用いて 20 分間染色を行い、トランスイルミネーター (波長 305nm) を用いて観察を行い 371bp 付近にバンドが確認されたものを *L.monocytogenes* と確定した。

#### 7. 血清型別

*L.monocytogenes* と同定された菌株については、菌体抗原(O 抗原)と鞭毛抗原(H 抗原)のそれぞれの診断用因子血清を用いて血清型別を行った。

## IV. 実験結果

### 1. 選択増菌培地の比較・検討

豚及び鶏生挽き肉各 20 検体、合計 40 検体の BHI 増菌法を除く 3 種類・5 培養方法による *L.monocytogenes* 検出結果を表 1 に示した。選択分離培地の PALCAM 培地、BCM 培地の 2 法に分けて表示した。

*L.monocytogenes* の検出率が最も高かったのは、5 種類の増菌方法のうち分離培地に BCM 培地を用いた場合、halfFraser 培地 24 時間と Fraser 培地 48 時間の 2 段階増菌法が 40 検体中 22 検体と最も高く、次いで EB 培地 48 時間の 14 検体、halfFraser 培地 24 時間の 10 検体であった。分離培地に PALCAM 培地を用いた場合の陽性数は、5 種類の選択増菌培地に大差はなく、いずれも 17 から 20 検体であった。

分離培地に BCM 培地と PALCAM 培地の 2 種類の培地を併用した場合、*L.monocytogenes* の検出率が最も高かったのは、halfFraser 培地 + Fraser 培地による 2 段階増菌法が 24 検体で最も高く、次いで EB 培地 48 時間の 22 検体、UVM 培地の 24 時間の 21 検体であった。

なお、検体種類別による *L.monocytogenes* 陽性数は豚挽き肉では 19 (47.5%)、鶏挽き肉では 14 (35.0%) であった。

### 2. 非選択培地における *L.monocytogenes* の増菌

非選択培地である BHI 培地の増菌効果を前記 5 種類の選択増菌法と比較検討した。豚、鶏各 5 検体合計 10 検体を用いて行ったところ、PALCAM 培地を分離培地に用いた場合、4 検体から検出されたが、選択増菌の合計では 7 検体であった。BCM 培地を用いる場合では選択増菌では 5 検体陽性に対して、BHI 培地では 0 であった。(表 2)

### 3. 増菌培地と選択分離培地の組み合わせによる *L.monocytogenes* の同定率

各増菌培地から PALCAM 培地と BCM 培地に分離し、それぞれから釣菌

した集落の数に対しそのうち *L.monocytogenes* と確認できた集落の数(%)を示した(表 3)。

6 種類の増菌方法における分離培地に PALCAM 培地を用いた時の釣菌した集落の数に対する *L.monocytogenes* と確認できた集落の数(%)には、どの方法による結果には大差はみられなかった。また、分離培地に BCM 培地を用いた場合にも大差はみられなかったが、PALCAM 培地での結果に比べて平均が 96.1%と著しく高かった。

なお、検体種類における増菌培養法での陽性率では、分離培地に PALCAM 培地を用いた場合に、豚挽き肉での釣菌した集落の数に対する *L.monocytogenes* と確認できた集落の数(%)の平均が 9.2%であるのに対し、鶏挽き肉では 32.0%であった。

#### 4. 分離菌株の血清型

*L.monocytogenes* が陽性であった各検体から分離した菌株の血清型別を表 4 に示した。



## V. 考察

リステリア菌の選択増菌培地である Fraser 培地、UVM 培地及び EB 培地の 3 種類によるそれぞれの規定する培養方法すなわち Fraser 培地は half Fraser 培地 30℃、24 時間増菌後 Fraser 培地で 35℃、48 時間の 2 段階増菌、UVM 培地は 30℃、48 時間増菌、EB 培地は 30℃、48 時間で生食肉 40 検体を増菌し、その後の分離培地に PALCAM 培地を用いた場合 *L.monocytogenes* の陽性数はそれぞれ 18 (45.0%)、19 (47.5%)、17 (42.5%) であった。また分離培地に PALCAM 培地を用いた場合、Fraser 培地、UVM 培地の培養方法及び培養時間を変えても、すなわち half Fraser 培地 24 時間のみ、及び UVM 培地 24 時間でも陽性数は 18 と 20 で検出率に大きな差は見られなかった (表 1)。

一方、分離培地に BCM 培地を用いた場合には増菌方法に大きな差が見られた。すなわち Fraser 培地の 2 段階増菌による陽性率が 22/40 (55.0%) で、他のいずれの増菌方法よりも高く、2 段階増菌の優秀性が確認された。その他の増菌方法による陽性数は 8~14 (20.0%~35.0%) で、PALCAM 培地のどの方法よりも低かった。

BCM 培地は *L.monocytogenes* の集落が青色に発色するので本菌の検出率が PALCAM 培地に比べて高くなることが予想できるが、実際には Fraser 培地の 2 段階増菌以外は PALCAM 培地の方がはるかに陽性率が高い結果であった。これは BCM 培地の選択性が低く、食肉のようにリステリア属及びその他の菌種によって濃厚に汚染されている場合、これらの夾雑菌に覆われて、特徴的な *L.monocytogenes* 集落を形成しなかったためと考えられる。Fraser 培地の 2 段階増菌が最も成績が良かったのは、選択増菌を繰り返すために、*L.monocytogenes* が選択された結果であると考えられる。一方、PALCAM 培地は *L.monocytogenes* のみの選択分離培地ではないが、リステリア属の選択性は高く、増菌液 20 $\mu$ l を塗抹しても独立した集落を形成しやすいために結果として *L.monocytogenes* の検出率が平均的に良くなったものと考えられる。

分離培地に PALCAM 培地と BCM 培地を併用した場合の

*L.monocytogenes* 陽性数は、当然のことながら単独よりも多くなった。Fraser 培地、UVM 培地、EB 培地による増菌ではそれぞれ 24、19、22、その他の培養方法でも 21~18 で、増菌法による特に著しい差は見られなかった。

非選択培地による増菌は、BHI 培地 35℃、24 時間培養の条件では選択培地に比較して *L.monocytogenes* の検出率は half Fraser 培地 24 時間を除いていずれの選択増菌よりも劣り、増菌培養方法として非選択培地を用いる必要性は全くみとめられなかった (表 2)。

なお、豚挽き肉及び鶏挽き肉の肉腫による明らかな差はみとめられなかった。

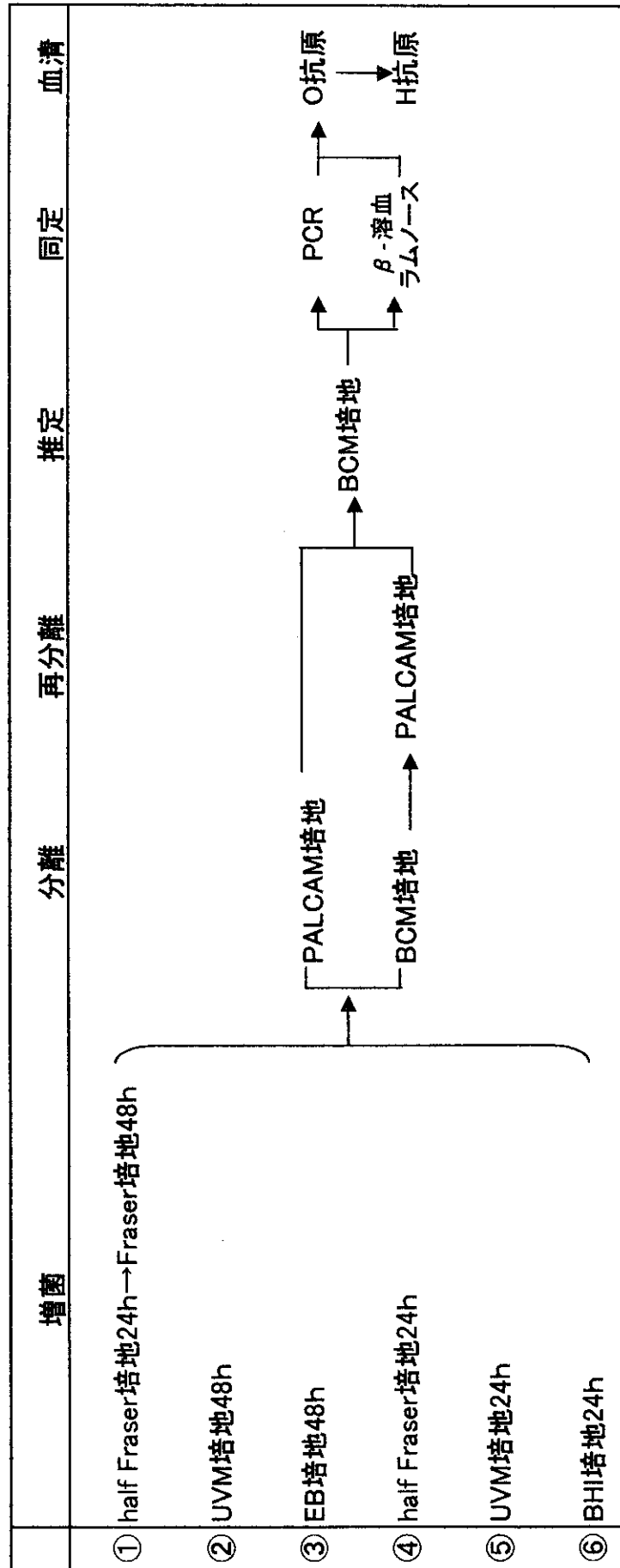


図1. *L.monocytogenes*増菌培養法の比較実験のフローチャート

表1. 各増菌培地と分離培地における*L.monocytogenes*陽性検体数①

	増菌培地及び方法	分離培地		
		BCM	PALCAM	BCM+PALCAM
豚挽き肉 20検体	①hF24h→F48h	12 (5) <sup>1)</sup>	8 (1) <sup>2)</sup>	13 (7) <sup>3)</sup>
	②UVM48h	4 (0)	12 (7)	11 (4)
	③EB48h	8 (4)	9 (5)	13 (4)
	④hF24h	5 (0)	8 (3)	8 (5)
	⑤UVM24h	5 (1)	13 (9)	15 (5)
	total	15 (7)	18 (14)	19 (11)

	増菌培地及び方法	分離培地		
		BCM	PALCAM	BCM+PALCAM
鶏挽き肉 20検体	①hF24h→F48h	10 (1) <sup>1)</sup>	10 (1) <sup>2)</sup>	11 (9) <sup>3)</sup>
	②UVM48h	4 (0)	7 (3)	7 (4)
	③EB48h	6 (1)	8 (3)	9 (5)
	④hF24h	5 (0)	10 (5)	10 (5)
	⑤UVM24h	3 (0)	7 (3)	6 (3)
	total	12 (2)	14 (9)	14 (11)

	増菌培地及び方法	分離培地		
		BCM	PALCAM	BCM+PALCAM
総検体 40検体	①hF24h→F48h	22 (6) <sup>1)</sup>	18 (2) <sup>2)</sup>	24 (16) <sup>3)</sup>
	②UVM48h	8 (0)	19 (10)	19 (8)
	③EB48h	14 (5)	17 (8)	22 (9)
	④hF24h	10 (0)	18 (8)	18 (10)
	⑤UVM24h	8 (1)	20 (11)	21 (8)
	total	27 (9)	32 (23)	33 (22)

1) *L.monocytogenes*がBCM培地のみ陽性で、PALCAM培地では検出されなかった検体数

2) *L.monocytogenes*がPALCAM培地のみ陽性で、BCM培地では検出されなかった検体数

3) *L.monocytogenes*がBCM培地とPALCAM培地いずれの培地からも検出された検体数

表2. 各増菌培地と分離培地における*L.monocytogenes*陽性検体数②

(BHI培地の比較も行った10検体のみについて)

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
豚挽き肉 5検体	①hF24h→F48h	4	3
	②UVM48h	0	3
	③EB48h	2	4
	④hF24h	1	1
	⑤UVM24h	1	4
	①～⑤のtotal <sup>3)</sup>	4	5
	* BHI24h	0	4

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
鶏挽き肉 5検体	①hF24h→F48h	0	1
	②UVM48h	0	1
	③EB48h	1	1
	④hF24h	0	1
	⑤UVM24h	1	1
	①～⑤のtotal <sup>3)</sup>	1	2
	* BHI24h	0	0

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
総検体 10検体	②hF24h→F48h	2	4
	④UVM48h	3	4
	⑤EB48h	5	5
	①hF24h	4	2
	③UVM24h	0	5
	①～⑤のtotal <sup>3)</sup>	5	7
	* BHI24h	0	4

1) BCM培地に出現した青色集落をPALCAMで再分離。独立した典型的集落をBCMで青色発色を確認。PCRで*L.monocytogenes*と確認できた検体数。

2) PALCAM培地上に出現した典型的集落をPCRで*L.monocytogenes*と確認できた検体数。

3) ①から⑤のすべての方法における、検体別にみた陽性検体数。

表3. 各増菌培地と分離培地における*L.monocytogenes*陽性集落数の割合

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
豚挽き肉 20検体	①hF24h→F48h	59/63(93.7%)	14/280(5%)
	②UVM48h	16/20(80%)	25/300(8.3%)
	③EB48h	40/40(100%)	30/236(12.7%)
	④hF24h	25/25(100%)	27/246(11.0%)
	⑤UVM24h	25/25(100%)	25/257(9.7%)
	①~⑤のtotal <sup>3)</sup>	165/173(95.4%)	121/1319(9.2%)
	* BHI24h(5検体)	0/0(-)	9/37(24.3%)

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
鶏挽き肉 20検体	①hF24h→F48h	44/48(91.7%)	53/211(25.1%)
	②UVM48h	20/20(100%)	55/167(32.9%)
	③EB48h	30/30(100%)	53/154(34.4%)
	④hF24h	25/25(100%)	59/163(36.2%)
	⑤UVM24h	15/15(100%)	43/126(34.1%)
	①~⑤のtotal <sup>3)</sup>	134/138(97.1%)	263/821(32.0%)
	* BHI24h(5検体)	0/0(-)	0/6(0%)

	増菌培地及び方法	分離培地	
		BCM <sup>1)</sup>	PALCAM <sup>2)</sup>
総検体 40検体	①hF24h→F48h	103/111(92.8%)	67/491(13.6%)
	②UVM48h	36/40(90%)	80/467(17.1%)
	③EB48h	70/70(100%)	83/390(21.3%)
	④hF24h	50/50(100%)	86/409(21.0%)
	⑤UVM24h	40/40(100%)	68/383(17.8%)
	①~⑤のtotal <sup>3)</sup>	299/311(96.1%)	384/2140(17.9%)
	* BHI24h(10検体)	0/0(-)	9/43(20.9%)

1) BCM培地に出現した青色集落をPALCAMで再分離。独立した典型的集落をBCMで青色発色を確認。

PCRで*L.monocytogenes*と確認できたコロニー数。

2) PALCAM培地上に出現した典型的集落をPCRで*L.monocytogenes*と確認できたコロニー数。

3) ①から⑤のすべての方法における、検体別にみた陽性コロニー数。

表4. 各増菌培地でのPALCAM培地とBCM培地における釣菌結果

検体No	①ECMに塗沫 ②PALCAMに塗沫	h-F→F48h		UVM48h		EB48h		h-F24h		UVM24h		BHI24h	
		BCMでの確認	PCR	BCMでの確認	PCR	BCMでの確認	PCR	BCMでの確認	PCR	BCMでの確認	PCR	BCMでの確認	PCR
1(c)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
2(c)	① ②	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3(p)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4(p)	① ②	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
5(p)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6(c)	① ②	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7(c)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8(c)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9(p)	① ②	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
10(p)	① ②	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
11(p)	① ②	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
12(p)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
13(p)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14(c)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
15(c)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16(c)	① ②	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17(c)	① ②	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
18(c)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
19(p)	① ②	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
20(p)	① ②	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-





## 分担研究報告書

### 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

分担研究者 安居院 宣昭 国立感染症研究所昆虫医科学部  
共同研究者 小林 睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部  
佐々木 年則 国立感染症研究所昆虫医科学部

#### 研究要旨

平成11年度の当該研究事業においては、ハエ類が腸管出血性大腸菌 O157（以下 O157 と略す）伝播に際して、どの程度の菌数で食品を汚染するか、その実態を解明するために以下の研究を実施し、その成果を O157 による食品汚染防止に資することを目的とした。

#### 1. O157 汚染イエバエによる食品汚染の解明（新規）

O157 を摂食感染させたイエバエを、感染後 3, 24, 48 時間後に、茹でたジャガイモ、牛肉、キャベツを 30 分間摂食させ、その間にハエが食品表面に排泄した排泄物の汚染部位（排泄物 1 個とその周辺部を含む）の O157 菌数を調べた。さらに、30 分間ハエに摂食させた食品を 29℃で一晩（15～16 時間）保存した後に、排泄物汚染部位の菌数を調べた。

その結果、 $10^9$  個/ml の菌液を摂食させたハエを 3 時間後に摂食させた食品の汚染部位では、ジャガイモで平均  $2 \times 10^5$  個、牛肉で  $7 \times 10^5$  個の O157 が検出された。これらの食品を一晩保存した場合には、ジャガイモで  $1 \times 10^7$  個、牛肉で  $5.8 \times 10^7$  個の O157 が検出され、明らかに保存中に菌数の増加をみた。 $10^6$  個/ml の菌液を摂食させたハエでは、3 時間後の汚染部位から O157 は検出されなかったが、一晩保存したキャベツからは  $5 \times 10^5$  個、牛肉からは  $8 \times 10^2$  個の O157 が検出された。

摂食後 24 時間の調査では、 $10^9$  個/ml の菌液を摂食ハエで、ジャガイモの汚染部位に平均  $2 \times 10^2$  個、牛肉では平均  $4 \times 10^4$  個の O157 が検出され、一晩保存された牛肉からは  $1 \times 10^7$  個、ジャガイモからは  $4.4 \times 10^8$  個の O157 が検出された。摂食後 48 時間の調査でも、 $10^9$  個/ml の菌液摂食ハエによる汚染部位から、ジャガイモで  $2 \times 10^5$  個、牛肉で  $2 \times 10^2$  個の O157 が検出された。一方、菌数が  $10^6$  個/ml の菌液摂食の場合では、ほとんどの食品の汚染部位から直接 O157 を検出することが出来なかったが、一晩保存した場合には汚染部位から  $10^6$  個以上の菌が検出された。

これら結果から、ハエ由来の少数の菌による食品汚染でも、保存時間や温度によっては食品汚染は増幅される事が明らかになり、食品上にハエがとまらないような衛生害虫対策が強く望まれることが示唆された。

## A. 研究目的

イエバエが腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157 と略す)の伝播に深く関わっている可能性が、患者が集団発生した施設周辺の疫学調査および実験室内におけるイエバエへの O157 の摂食実験ですでに明らかになっている。また、原因食品が特定された事例においても、O157 の保有動物であるウシと接点のない食品が相当多く含まれている事も明らかとなってきた。さらに、実験的に O157 を摂食させたイエバエの排泄物中には多数の菌が存在する事、摂食後 3 日間は消化管内に O157 が検出できる事、また、イエバエ口器の微細空間に多数の O157 が付着し、活発に分裂をしている事などを既に報告している。そこで、イエバエに O157 を摂食させて、経時的に食品を与え、その食品上のハエ排泄物部位の菌数およびイエバエが摂食した食品を 29 °C で一晚保存した後、排泄部位の菌数を調べた。これらの解析を通じて、イエバエの排泄物によって汚染された食品上に O157 がどの程度存在するか、また、それらが一晚保存されることによってどの程度増殖するかを明らかにする。

## B. 研究方法

実験には昆虫医科学部で継代されているイエバエ (PR 系統)を用いた。羽化後 3 - 6 日令の雌成虫 20 または 40 匹を 6 個の小型ケージ (20 × 20 × 20cm) に入れ、摂食行動を活発にさせるために約 3 時間絶食させて実験に供試した。腸管出血性大腸菌 O157:H7 は VT2 の産生菌で、TSB 培地で一晚増菌したものを用い、菌数は希釈法で求めた。10<sup>9</sup> CFU/ml と 10<sup>6</sup>CFU/ml の菌数に調製された液体培地にエオシン色素を添加し、30 分間自由に摂食させた。その後、3 時間、24 時間、48 時間と経時的に牛

肉、茹でたポテト、千切りキャベツを直径 60mm のプラスチックシャーレに入れてケージ底板に設置した。イエバエが摂食した食品は 30 分後にケージから取り出され、排泄物由来の色素で汚染された食品表面部分をコルクボーラー (内径 5mm) を用いて採取した。採取サンプルは 1.5ml のチューブ内に移し、300 μl の PBS を加えてホモジェネートし、その一部を段階希釈法で希釈して ChromoAgar プレート上に播き、37 °C のインキュベーター内で一晚培養して菌数を算定した。また、29 °C で一晚 (15 ~ 16 時間) 放置された食品に関しても、色素に汚染された部分より採取し、同様の操作で菌数を算定した。なお、茹でたジャガイモ上では、エオシン色素が容易に確認できたが、キャベツと牛肉では、排泄された部分の特定が白色ランプ光下では困難であったため、蛍光ランプを用いて排泄物を特定した。

なお、イエバエへの O157 摂食感染実験は全て P3 レベルの封じ込めの実験室にネットを張って実施した。

## C. 研究結果

### 1. O157 汚染イエバエが食品に接触した直後の汚染程度

10<sup>9</sup> CFU/ml の菌液を与えたイエバエを摂食後 3 時間後に食品に接触させた場合、排泄汚染部位に検出された O157 菌数は、牛肉、ジャガイモ共に排泄物当たり数 10 万個以上が検出された。さらに、O157 摂食後 24 時間後および 48 時間後の実験区では、牛肉で平均 4 × 10<sup>4</sup> から 2 × 10<sup>2</sup> 個に検出菌数は減少し、ジャガイモでは平均 2 × 10<sup>3</sup> から 2 × 10<sup>5</sup> へと菌数の増加をみた (表 1 参照)。

10<sup>6</sup> CFU/ml 菌液を与えたイエバエを摂食後 3 時間後に牛肉、ジャガイモ、キャベツ

接触させた場合、接触直後の全ての食品から菌が分離されなかった。24 時間後に食品と接触させた場合、ジャガイモのみから平均  $2 \times 10^2$  個の菌が検出された。48 時間後に食品と接触させた場合には、いずれの食品からも O157 は検出されなかった（表 2 参照）。2 回目の実験でも、ほぼ同様の結果が得られた。

#### 2.O157 汚染イエバエが接触後一晩保存した食品からの O157 の分離

O157 汚染イエバエに 2～3 種の食品を与え、各々の食品を回収後一晩 29 °C で保存して菌数を調べた。 $10^9$  CFU/ml の菌液摂食後 3 時間の実験区では、牛肉から平均  $5.8 \times 10^7$  個が、ジャガイモから平均  $2.6 \times 10^5$  個の菌が検出された（表 1 参照）。 $10^6$  CFU/ml の菌液摂食後 3 時間の実験では、牛肉から平均  $8 \times 10^2$  個、キャベツから平均  $4 \times 10^5$  個の菌が検出された（表 2 参照）。

菌液摂食後 24 時間の実験では、 $10^9$  CFU/ml の菌液実験区の牛肉から平均  $1.1 \times 10^7$  個の O157 が検出された（表 1 参照）。一方、 $10^6$  CFU/ml の菌液実験区でも、牛肉から平均  $1.9 \times 10^8$  個が、ジャガイモから平均  $8 \times 10^8$  個の菌が検出され、摂食後 48 時間の実験では牛肉から平均  $2.2 \times 10^7$  個の O157 が検出された（表 2 参照）。このように、 $10^6$  CFU/ml の菌液を摂食したイエバエが接触した食品上の排泄物から直接菌を分離した率は低かったが、一晩保存した食品からは高率かつ大量に O157 が確認された。

#### D. 考 察

昨年の本研究事業では、イエバエの食品嗜好性を調べるために、寿司類、生野菜類、果物類、ゆでた野菜類、肉類、乳製品などを 6 グループの食品をイエバエに与え選択

させる実験を行った。一連の実験の結果から、タンパク質性の食品により高い嗜好性が見られたが、生野菜類や茹で野菜にも高い嗜好性が認められた。今回は、イエバエの排泄物中に存在する O157 が食品の生産現場、流通過程および最終消費段階において食品を汚染する可能性を考えて、食品上に排泄された排泄物中にどの程度菌が存在するか調査した。また、それら汚染された食品が夏季の室温で保存された場合に、どの程度菌数が増加するかを明らかにするために、昨年の食品嗜好実験の結果を参考にし、3 種類の食品（牛肉、茹でたジャガイモ、千切りキャベツ）を用いて実験を行った。

$10^9$  CFU/ml の菌液を摂食したイエバエに与えた 3 種の食品上から、摂食 3 時間後では排泄物当たり 2～8 万個の菌が検出され、摂食 24 時間後でも、牛肉上の排泄物 1 つ当たりから 1.2 万個の菌が分離された。一方、 $10^6$  CFU/ml の菌液を摂食したイエバエでは、摂食 24 時間後に与えられたポテト上の排泄物から 200 個の菌が検出されたのみで、その他からは O157 は検出されなかった。一方、これら食品を一晩保存した場合には、 $10^9$  CFU/ml 摂食群でも、 $10^6$  CFU/ml 摂食群でも高率に、また、非常に多数の菌が検出された。特に、興味深いことは、O157 の摂食後の経過時間にかかわらず、一晩の保存後には、食品上の排泄物汚染部位から  $10^8$  個を越す多くの菌が検出されたことである。菌液摂食 48 時間後に牛肉と接触させ、その後一晩保存した牛肉上の排泄物汚染部位から  $10^7$  個を越す O157 が検出された。

これらの結果は、O157 の増殖に適した食品上に同菌を保有したイエバエが排泄をした場合には、排泄物中の菌数がたとえ少数でも、保存状態いかんで相当増殖し、危険な食品汚染源となる事を意味している。

今回の実験に用いた、O157の菌数(10<sup>9</sup>および10<sup>6</sup> CFU/ml)は自然環境に存在する菌数より高い傾向がある。しかし、最近の報告では、下痢を起こしている肥育牛の糞便から4×10<sup>7</sup> CFU/gのO157:H7が検出されており(病原微生物検出情報 21(5):96-97,2000)、一概に今回の実験での菌数が高いとは言えない。

今までの本研究事業では、卵発育期のイエバエ雌の排泄頻度は特に高く、6～7分に1回の頻度で排泄する事を既に報告している。このようなイエバエの生理・生態的特性から、ハエが30分間ある食品上に留まって摂食を続けると、食品上には4～5回の排泄が想定される。このように、イエバエの食品接触はO157の食品汚染を考える上で大変重要なファクターと考えられる。また、関連研究事業において屠畜場で採集された複数のイエバエよりO157が検出されており、イエバエの連続した摂食行動を考えると関連施設でのイエバエを含む衛生昆虫対策を徹底的に行う必要性が再確認された。

## E. 結論

イエバエの食品嗜好性の実験結果をふまえ、予めO157菌液を摂食させたイエバエに3種の食品(牛肉、茹でたジャガイモ、千切りキャベツ)を与え、摂食中に食品上に排泄したの排泄物からO157がどの程度検出されるか検討した。また、それら食品を29℃で一晩保存し、それらの食品から同様に菌の検出を試みた。その結果、10<sup>6</sup> CFU/mlの菌液を摂食したイエバエが摂食した食品からの菌の検出率が低かったが、10<sup>9</sup> CFU/mlの菌液摂食群では高率に、また、多数の菌が検出された。また、O157汚染イエバエが摂食した食品を一晩保存した場合には、イエバエの摂食菌数に関わら

ず、これら食品には100万個以上の菌が排泄物汚染部位から検出された。これらのことから、食材が流通経路を通じて、あるいは調理の際に少数のO157に汚染されると、その保存状態いかんで大規模な食中毒を引き起こすに十分な菌量が生産される事が示された。特に食品関連施設において、細菌類の伝播者としてのイエバエに対する衛生対策が重要である事が強く示唆された。

## F. 研究発表

\*安居院宣昭：ハエ類による腸管出血性大腸菌O157伝播に関する総合研究、平成8、9年度厚生科学研究事業研究報告書、平成10年3月。

\*小林睦生：消化器感染症における昆虫の関与、「消化器における感染症・寄生虫症」、松田 肇・藤盛孝博 監修、新興医学出版社、34-38、1998。

\*Moriya, K., Fujibayashi, T., Yoshihara, T., Matsuda, A., Sumi, N., Umezaki, N., Kurahashi, H., Agui, N., Wada, A., Watanabe, H.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection transmitted by the House fly. *Medical and Veterinary Entomology*, 13:214-216, 1999

\*Kobayashi, M., Sasaki, N., Saito, N., Tamura, K., Suzuki, K., Watanabe, H., Agui, N.: Houseflies are not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(4):625-629, 1999.

\*小林睦生・安居院宣昭：媒介昆虫・動物、「栄養士のための食中毒」、臨床栄養(臨時増刊号)、94(7):787-792, 1999.

\*Sasaki, T., Kobayashi, M., Agui, N.: The epidemiological potential of excretion and tasting by houseflies in dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food.

(*Journal of Medical Entomology*: 投稿中)