

19990644

平成 11 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. 分担研究報告書	
(I) 細菌の検出方法に関する研究	
分担研究者 島田俊雄 8
(1) 貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌O157	
菌株のチオグリコール酸添加増菌培地に置ける増殖	
研究協力者 大澤 朗 10
(2) レタスに実験的に接種された硫化水素産生・非産生	
サルモネラの回収方法の検討	
協力研究者 金子賢一 17
(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	
協力研究者 宮原美知子 25
(4) 免疫磁気ビーズとPCR法併用による食品および糞便中の	
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> O157:H7検出に関する研究	
研究協力者 上田成子 29
(5) 免疫磁気ビーズとPCR法併用による食品および糞便中の	
<i>Listeria monocytogenes</i> 検出に関する研究	
研究協力者 上田成子 35
(6) 生食用野菜(カイワレ大根)からの腸管出血性大腸菌O157	
の検出に関する研究	
研究協力者 藤沢倫彦, 山井志朗 44
(7) 細菌の発育に対する野菜・果物成分の影響について	
研究協力者 堂ヶ崎 知格 50
(II) ノーウォーク様ウイルスの遺伝学的多様性の解析とウイルス検出法の開発	
分担研究者 武田直和 58
協力研究者 名取克郎, 染谷雄一, 栄賢司, 小林慎一,	
篠崎邦子, 石古博昭, 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法に関する研究	
—汚染原虫の活性評価方法の確立—	
分担研究者 遠藤卓郎 65
協力研究者 八木田健司, 野原郁子, 泉山信司	
(IV) 輸入農作物の試験方法に関する研究	
—穀類中残留有機リン系農薬の測定時における分解とその対策—	
分担研究者 外海泰秀 79

平成11年度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、免疫磁器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切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。野菜等の農水産物からの汚染細菌を効率よく検出する方法の検討；

生野菜や果物に汚染した腸管出血性大腸菌 O157 が分離されにくい原因として、オキシダーゼ陽性の *Pseudomonas* 属の細菌が混入し、腸管出血性大腸菌 O157 より優勢に増殖してしまうことが挙げられる。増菌培養時に、還元剤（チオグリコール酸ナトリウム）を添加した培地（BPW;バファードペプトン水）を用いて嫌気培養することにより、*Pseudomonas* 属の細菌の増殖を抑制し、腸管出血性大腸菌 O157 を効率よく増殖させることができることが判明した。さらに、分離培地として、一般的に用いられている CT-SMAC よりも、改良した CT-SSMAC（1%サリシン及び 0.01%4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド加 CT-SMAC）を用いることで、O157 の分離率を飛躍的に高めることが出来た。そこに、PCR 法や磁気ビーズ法を併用すれば、材料中に 10 個以下の菌しかいなくても検出可能であった。また、カイワレダイコン抽出液中には、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラの発育を抑制する物質が存在することを、高速液体クロマトグラフィーを用いた成分分析で明らかにした。

2。ヒトカリシウイルスの解析；

ノーオーク様ウイルス (Norwalk-like virus, NLVs) の RNA ポリメラーゼの塩基配列の多様性を利用し、流行株の系統解析を行った。その結果、我が国

でこれまで解析された NLVs には、 Genogroup I(GI)が5種類、 Genogroup II(GII)が8種類あることが分かった。多量な検体を一度に解析しやすくするため、各 genogroup に属する構造蛋白質を GI は4種類、 GII は7種類、計11種類を用いて、抗体検出および抗原検出のための ELISA 系を確立した。今回開発した ELISA をもちいて、国内70の研究機関その評価を進行中である。この ELISA 系で陽性を示すためには、10の6乗のウイルス粒子を必要とする。RT-PCR に比べ感度が低い点が問題であり、今後、さらに感度を上げることを考慮中である。

3. 原虫の消毒・加熱処理等の殺菌処理の効果判定法；

ジアルジアのシストを用いて、消毒・加熱処理等の殺菌処理の効果判定法の検討を行った。消毒・加熱等の処理で、脱囊がどのぐらい阻止されるかをひとつの指標とした。脱囊の程度は、脱囊後にシスト壁特有の形態変化が起こることを種々の方法で測定することにより推定した。シスト壁の変化を蛍光抗体で染色した時の散乱光の程度により、形態変化をとらえる系を確立した。その系でシストを残留塩素濃度 1mg/ml で処理した場合、99%程度の脱囊阻止効果があることが分かった。

4. 輸入農作物の試験方法

マラチオンの一部が、試料調整の際に水を加えて放置する行程で、酵素分解することを見出した。現行の迅速分析法に記載されている水膨潤後アセトンで抽出方法では、マラチオンの正確な値が得難いと判断された。現行法の改良が必要と考えられる。

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11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、ジアルジア等、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。本研究は、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ことを目的としている。本年度も昨年度と同様に野菜、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の検討、②カリシウイルスの遺伝的多様性を利用した PCR 法及び構造蛋白質を対象とした抗原並びに抗体検出のための ELISA 法の開発、③ジアルジアの殺菌処理の効果判定法の開発、④農薬マラチオンの分析法に関し成果を得た。

分担研究者氏名・所属・職名

1. 遠藤卓郎（国立感染症研究所・寄生動物室 室長）
2. 島田俊雄（国立感染症研究所・腸管系細菌室長）
3. 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）
4. 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

1. 大澤朗（神戸大学大学院自然科学研究科）
2. 金子賢一（東京農工大学農学部）

3. 宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）
4. 上田茂子（女子栄養大学衛生学教室）
5. 藤沢倫彦、山井志朗（神奈川県衛生研究所細菌病理）
6. 堂ヶ崎知格（麻布大学環境保健学部）
7. 名取克郎、染谷雄一（国立感染症研究所ウイルス第二部）
8. 栄賢司、小林慎一（愛知県衛生研究所ウイルス部）
9. 篠崎邦子（千葉県衛生研究所ウイルス部）

10. 石古博昭, 橋本修 (三菱科学ピーシーエル研究第一部)
11. 鎌田公仁夫 (デンカ生研株式会社ウィルス試験製造部)
12. 八木田健司 (国立感染症研究所寄生動物部)
13. 野原有子 (水道技術研究センター)
14. 泉山信司 (池田理科つくばテクニカルセンター)

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、免疫磁器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

C. 成果・考察

1. 野菜等の農水産物からの汚染細菌を効率よく検出する方法の検討；

生野菜や果物に汚染した腸管出血性大腸菌 O157 が分離されにくい原因として、オキシダーゼ陽性の *Pseudomonas* 属の細菌が混入し、腸管出血性大腸菌 O157 より優勢に増殖してしまうことが挙げられる。増菌培養時に、還元剤（チオグリコール酸ナトリウム）を添加した培地（BPW; パファードペプトン水）を用いて嫌気培養することにより、*Pseudomonas* 属の細菌の増殖を抑制し、腸管出血性大腸菌 O157 を効率よく増殖させることができることが判明した。さらに、分離培地として、一般的に用いられている CT-SMAC よりも、改良した CT-SSMAC（1% サリシン及び 0.01% 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド加 CT-SMAC）を用いることで、O157 の分離率を飛躍的に高めることが出来た。そこに、PCR 法や磁気ビーズ法を併用すれば、材料中に 10 個以下の菌しかいなくても検出可能であった。また、カイワレダイコン抽出液中には、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラの発育を抑制する物質が存在することを、高速液体クロ

マトグラフィーを用いた成分分析で明らかにした。

2. ヒトカリシウィルスの解析；

ノーワーク様ウィルス (Norwalk-like virus, NLVs) の RNA ポリメラーゼの塩基配列の多様性を利用し、流行株の系統解析を行った。その結果、我が国でこれまで解析された NLVs には、Genogroup I(GI) が 5 種類、Genogroup II(GII) が 8 種類あることが分かった。多量な検体を一度に解析しやすくするため、各 genogroup に属する構造蛋白質を GI は 4 種類、GII は 7 種類、計 11 種類を用いて、抗体検出および抗原検出のための ELISA 系を確立した。今回開発した ELISA をもちいて、国内 70 の研究機関その評価を進行中である。この ELISA 系で陽性を示すためには、10 の 6 乗のウイルス粒子を必要とする。RT-PCR に比べ感度が低い点が問題であり、今後、さらに感度を上げることを考慮中である。

3. 原虫の消毒・加熱処理等の殺菌処理の効果判定法；

ジアルジアのシストを用いて、消毒・加熱処理等の殺菌処理の効果判定法の検討を行った。消毒・加熱等の処理で、脱囊がどのくらい阻止されるかをひとつの指標とした。脱囊の程度は、脱囊後にシスト壁特有の形態変化が起こることを種々の方法で測定することにより推定した。シスト壁の変化を蛍光抗体で染色した時の散乱光の程度により、形態変化をとらえる系を確立した。その系でシストを残留塩素

濃度 1mg/ml で処理した場合、99%程度の脱囊阻止効果があることが分かった。

4. 輸入農作物の試験方法

馬拉チオンの一部が、試料調整の際に水を加えて放置する行程で、酵素分解することを見出した。現行の迅速分析法に記載されている水膨潤後アセトンで抽出方法では、馬拉チオンの正確な値が得難いと判断された。現行法の改良が必要と考えられる。

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。

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

- (1) 大澤 朗（神戸大学大学院自然科学研究科）
- (2) 金子賢一（東京農工大学農学部）
- (3) 宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）
- (4) 上田茂子（女子栄養大学衛生学教室）
- (5) 藤沢倫彦、山井志朗（神奈川県衛生研究所細菌病理部）
- (6) 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菌株のチオグリコール酸添加増菌培地における増殖

野菜や水産物に付着して生残する腸管出血性大腸菌O157の「蘇生」増菌培養において障害となっていた*Pseudomonas*等の好気性細菌の混入増菌の問題を解消するべく、増菌培地にチオグリコール酸ナトリウムを添加し培地環境を嫌氣的として「飢餓状態」にあるO157菌細胞の培養を試みた。その結果、微量のO157（0.8-1.8 CFU/ml）初発菌数でも培養2-4時間後には 10^3 - 10^5 CFU/mlの濃度までに増菌可能であることが確認された。

(2) レタスに実験的に接種された硫化水素産生および非産生サルモネラの回収方法の検討

本研究では、野菜からのサルモネラの検出方法を確立することを意識して、硫化水素産生および非産生サルモネラを実験的に接種して、日本で採用されている食衛法と米国で採用されているFSIS法によるサルモネラの回収率を比較し、以下の結果を得た。

レタスに硫化水素産生サルモネラを少数（ 10^1 - 10^2 CFU/g）接種した場合、前増菌培地としてBuffered peptone water（以下BPW）、選択増菌培地としてRappaport-Vassiliadis broth（以下RV）、選択分離培地としてDouble modified lysine iron agar（以下DMLIA）およびスルファピリジン添加Brilliant green（以下BGS）を使用する方法（G法およびH法）が最も回収率が高かった。選択増菌培地としてTetrathionate brothを使用する方法の回収率は最も低かった。

レタスに硫化水素非産生サルモネラを少数（ 10^1 - 10^2 CFU/g）接種した場合、BPWで前増菌、さらにRVで選択増菌後、BGSで選択分離する方法（H法）の回収率が最も高かった。

(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

昨年度に引き続き腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの一括迅速検出法の検討を行った。BPWで検体を一括前培養する方法により、検査の効率化が図れるばかりでなく、24時間後のBPWの培養液から、PCR用DNAサンプルを調製すればO157とサルモネラは25g検体中に数個の菌があったとしてもPCRにより検出できることが分かった。また、リステリアも同じDNAサンプルから、25g検体中に1000個リステリアが存在すれば検出できることが分かった。

(4) -1 免疫磁気ビーズ法とPCR法を併用による食品および糞便中のEnterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 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Enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 (VT1 & VT2)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。従来の検出法はほぼ6日間を要したが、本報告法は2日間で検出可能であった。

(4) 2 免疫磁気ビーズ法とPCR法を併用による食品および糞便中の*Listeria monocytogenes*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*Listeria monocytogenes*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、免疫ビーズ法は*L.monocytogenes*以外の*Listeria spp.*の吊り上げが見られるが、Prf A1-A2遺伝子Primerの使用によるPCR法では*L.monocytogenes*のみを検出することができ、従来の検出法はほぼ6日間を要したが、本報告法は2日間で検出可能であった。

(5) 生食用野菜（カイワレ大根）からの腸管出血性大腸菌O157の検出に関する研究

食品からの腸管出血性大腸菌O157検出用としてこれまで用いられてきた増菌培地及び分離培地であるCT-SMAC寒天培地について、カイワレ大根からの本菌の分離に供するために若干の改良を行った。その結果、カイワレ大根より優勢に分離され、O157の検出に支障となりうるオキシダーゼ陽性菌については増菌培養時に還元剤（チオグリコール酸ナトリウム）を加えた増菌培地（バフアードペプトン水）を用いて嫌気培養を行うことによりその発育を抑制させることができた。また、CT-SMAC寒天培地上においてO157の集落性状に酷似したカイワレ大根由来菌株については、今回改良されたCT-SSMAC（1%サリシン及び0.01% 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド加CT-SMAC）寒天培地を分離培地として用いることにより、供試菌株の91%をO157と鑑別することが可能になった。

(6) 細菌の発育に対する野菜・果物成分の影響について

野菜および果物の細菌に対する影響を検討するために以下の実験をおこなった。野菜材料としてカイワレダイコン、キャベツを、並びに果実材料としてリンゴ、ミカンおよびバナナを用いた。また、供試菌として*Escherichia coli* O157:H7および*Salmonella* Enteritidis (S.E)を用いた。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて野菜および果物の10倍乳剤を調製し、0.45 μmでろ過滅菌して得られた抽出液に、前培養した供試菌をそれぞれ10⁶ CFU/mlとなるように接種して感作させた後、この一定量を経時的（0、1、6、12、24、36時間後）に採取し、36℃、24時間培養後にそれぞれ生菌数を測定した。また、野菜および果物抽出液の代わりにPBSを用いて同様に操作した場合を対照として菌の発育に対する影響を観察した。その結果、カイワレダイコン抽出液に関しては、O157では感作時間が12時間目までは菌の減少が漸近的に観察され、12時間目以降は36時間目に至るまで菌の発育がほぼ停止したままであった。一方、S.Eでは感作時間が12時間から24時間において菌の発育が抑制され、36時間目にはPBSの場合と同程度の菌数に達した。このことから、カイワレダイコン抽出液には抗菌性ないしは菌の発育抑制効果があることが示唆された。また、キャベツ並びに3種の果物抽出液のいずれも両供試菌に対して、カイワレダイコンの場合のような顕著な影響は認められず、PBSの場合と同程度の発育またはむしろ菌数が増加傾向にあった。次に、抗菌性ないしは菌の発育抑制効果をもたらしたカイワレダイコン抽出液中の活性成分を検索するために、高速液体クロマトグラフィーを用いて抽出液の成分分析を行った。また、対照試料として菌の発育に影響が顕著に認められなかったキャベツ抽出液についても同時に分析をおこない、検出ピークを比較検討したところ、260 nmの検出波長において、カイワレダイコン抽出液成分の分離が最も良好で、数ピークが高感度に検出された。これらのピークは、キャベツ抽出液とはそれぞれ異なるピークであることがわかった。

貧栄養環境に生残する腸管出血性大腸菌O157菌株の
チオグリコール酸添加増菌培地における増殖

研究協力者 大澤 朗 (神戸大学大学院自然科学研究科)

研究要旨 野菜や水産物に付着して生残する腸管出血性大腸菌O157の「蘇生」増菌培養において障害となっていた*Pseudomonas*等の好気性細菌の混入増菌の問題を解消すべく、増菌培地にチオグリコール酸ナトリウムを添加し培地環境を嫌氣的として「飢餓状態」にあるO157菌細胞の培養を試みた。その結果、微量のO157 (0.8~1.8 CFU/ml) 初発菌数でも培養24時間後には $10^3 \sim 10^5$ CFU/mlの濃度までに増菌可能であることが確認された。

A. 研究目的

報告者らのこれまでの研究^{文献1)}によって、現在多くの検査室で用いられている胆汁酸や抗生物質を添加した液体培地、あるいは高温 (> 42 °C) 培養等の選択性の高い増菌培養法では長期間栄養の乏しい水環境に放置された飢餓状態となった大腸菌O157はほとんど増殖しないことが明かにされた。さらに検体での糖非分解性のグラム陰性菌 (*Pseudomonas*等) の混在によってO157の検出効率が低下する問題も新たに提示された^{文献2)}。これら問題を解消すべく神奈川県衛生研究所の研究者らは本年度の分担研究の成果として増菌培地にチオグリコール酸ナトリウム (sodium thioglycolate; 以下STGと略) を添加して培地環境を嫌氣的 (還元的) にすることによってO157の増殖を妨げないで好気性の*Pseudomonas*菌群の増殖を抑えられることを報告した。他方、栄養あるいは温度ストレスを受けたO157細胞は好気条件下で増殖しなくなることから、平板培地にカタラーゼあるいはピルビン酸ナトリウム (sodium pyruvate; 以下SPと略) を添加して細菌細胞が「蘇生」する方法も報告されている^{文献3)}。そこで我々は増菌用液体培地にSTGとSPを添加した培地に飢餓状態となったO157細胞を微量接種し、その増殖状況を検討することによってこのようなストレス状態にあるO157菌細胞を選択的に「蘇生」するための前増菌法を検討した。

B. 研究方法

使用菌株:

* 人の糞便より分離されたO157株、C, F, Gの
3株

* 食品検体より分離されたO157株, B, I
計5株を供試した。

増菌培地:

- * Buffered Pepton Water
[以下BPWと略; Oxoid社]
- * BPWにSPを0.1%添加した培地
[以下BPW+SPと略]
- * BPWにSTGを0.5%添加した培地
[以下BPW+STGと略]
- * BPWにSPとSTGをそれぞれ0.1%,
0.5%添加した培地
[以下BPW+SP+STGと略]

* 生菌数算定用培地: ハートインヒュージョン
寒天平板培地 (以下HIAと略; 栄研化学)

実験方法:

(1) BPWにて一晚培養したO157菌細胞を集菌し、これを滅菌脱イオン水 (sterile deionized water; 以下SDWと略) にて3回洗浄し、最終的に $2 \sim 8 \times 10^5$ CFU/mlにした被験菌液 (30ml) を準備した。これを遮光、23°Cの条件で培養し、培養開始直後、2週間、3週間、4週間目にその一部を10倍段階希釈したものをHIAに塗布し、37°Cにて48時間培養し、培養後HIA上に形成されたコロニー数より被験菌液に生残するO157菌の数を算定した。

(2) SDW培養開始直後、2週間、3週間、および4週間目の被験菌液を生菌として約10個含むように滅菌SDWにて調整した菌液を0.1ml、または「死滅」したとされる菌液については被験菌液

そのままを0.1 ml、上記の4種の増菌培地(10ml)に接種し、37°Cで48時間培養した。この培養時間中に経時的にその増殖程度を培地の濁度(660nmでの吸光度)にてモニターした。

(3) 上記の経時実験において培養8時間および24時間後の培養液中1mlを10倍段階希釈したものをHIAに接種しcolony forming units(以下CFUと略)/mlを算定した。

C. 実験結果

(1) SDW中のO157生菌数の推移

図1に供試したO157株をSDW中に放置、室温(23°C)培養した時の、培養直後から4週間目までの生菌数の推移を示した。菌株F, G, Iの3株の生菌数は時間経過につれて減少し3週間目すべてが「死滅」した状態となった。菌株B, Cも同様に菌数が減少し、3週間目の 10^2 CFU/mlのレベルで生残していたが4週間目には同様に「死滅」状態となった。

(2) 飢餓細菌細胞の各種増菌培地での増殖(培養液濁度測定による)

図2 a, b, cにSDW放置培養後2週間目まで「生残」が確認されたO157菌株、F, G, Iを上記4種の増菌培地(BPW, BPW+SP, BPW+STG, BPW+SP+STG)に接種し37°Cにて48時間静置培養した際の経時的増殖曲線を示した。

各増菌培地における3株の菌の増殖パターンは概ね類似したものであった。すなわちBPWにおいてはSDW放置直後と放置2週間目の細胞は後者において若干の増殖の「立ち遅れ」が認められたが、いずれも培養後11時間から16時間で可視的に増殖が確認された。同様にBPW+SPでも培養後11時間から16時間で増殖が認められたが、それ以降の増殖は顕著に旺盛となり培養24時間後の増殖は濁度としてほぼ2倍であった。またSDW放置直後と放置2週間目の細胞の増殖パターンにほとんど差異は認められなかった。これらとは対照的にSTGを添加したBPWでの菌の増殖は顕著に抑制され可視的に増殖が認められたのはSDW放置直後の細胞で培養開始24~26時間後であり、また放置2週間目の細胞ではこれより更に遅れて26~30時間後であった。またSPを添加にすることにより菌の増殖量(濁度として)は培養48時間後でほぼ2倍であった。

図2 d, eはSDW放置培養後3週間目まで「生残」

が確認されたO157菌株、B, C、を上記4種の増菌培地(BPW, BPW+SP, BPW+STG, BPW+SP+STG)に接種し37°Cにて48時間静置培養した際の経時的増殖曲線である。

各増菌培地において菌株B, Cともに同様の増殖パターンが見られた。すなわちBPWにおいてはSDW放置直後と放置2週間後の細胞では増菌培地に接種してから12時間程度で可視的に増殖が認められたが、放置3週間後の細胞は可視的に認められる増殖がこれより2~3時間遅れた。BPW+SPに置いても同様に3週間放置細胞で増殖の「立ち遅れ」が認められたが培養24時間後の菌量は濁度としてほぼ2倍となった。BPW+STGで可視的な増殖が認められたのはSDW放置直後の細胞では24時間培養後であったが、放置2週間、3週間の細胞についてはこれに2時間から4時間おくれて可視的な増殖が認められた。BPW+SP+STGについても同様な増殖パターンが認められたが48時間後の増殖菌量は濁度でBPW+STGのその約1.5倍となった。

図2 a, b, c, d, eでは被験菌液(原液)をHIA上に接種したにもかかわらずまったくコロニーが形成されない所謂「死滅」した状態の細胞を上記の増菌培地に接種したが、48時間の培養時間内に「蘇生」したものは全く無かった。

(3) 飢餓細菌細胞の各種増菌培地での増殖(寒天平板コロニー数測定による)

各種増菌培地に初発菌数濃度(0.8~1.8 CFU/ml)で微量接種し、37°Cで8時間および24時間静置培養後の菌数を対数表示として表1に示した。

SDWに3週間放置培養した菌株B, Cの細胞ではBPWとBPW+SPの8時間培養で他の処理細胞の増殖の1%以下の増殖しか見られなかった。BPW+STGとBPW+SP+STGでの8時間培養ではすべての菌細胞について10 CFU/mlを越す増殖は認められなかったが、24時間培養するとSDW放置直後の細胞では 10^6 CFU/mlのレベルの増殖、SDW放置2週間目、3週間目の細胞では顕著に増殖が抑制されるものの 10^3 ~ 10^5 CFU/mlのレベルの増菌が認められた。

D. 考察

今回の実験は飢餓状態となったO157菌細胞を0.8~1.8CFU/mlという極く微量接種したという

点で、より現実に近い、すなわちそのような状態の細菌細胞が混入した水が野菜等からの菌検出に有用な情報を提供するものと思われた。以前の我々の報告^{文献1)}では貧栄養状態のO157菌細胞の増菌培養には非選択的な液体培地(BPW, Trypticase soy broth等)を用いることが必須であることが示された。しかしながらその選択の弱さがゆえに検体中に混入するO157以外のバックグラウンドフローラも増菌されてしまい、菌の検出をより困難にしてしまう問題点があった。近年開発された免疫磁気ビーズ法によってこの問題は大幅に軽減されるに至ったが^{文献2)}、分離用平板(例:セフェキシム・亜テルル酸添加ソルビトールマッコンキー寒天平板)でO157とコロニー形態が酷似する*Pseudomonas*等^{文献2)}の混入は検出効率を著しく低下しているのが現状である。STG添加したBPWを用いての増菌培養は菌細胞の増殖速度を著しく低下させるものの、以前報告された^{文献1)}ノボピオシン添加mEC培地のような飢餓細胞に対しての完全な増殖抑制はなく、1 mlに1個の菌量でO157が混入している検体でも培養24時間で少なくとも1,000個以上にスケールアップ可能で、かつ問題の*Pseudomonas*等の増殖も確実に抑制する点で有望な増菌培養法であると考えられる。今後は飢餓状態のO157菌細胞で実験的に汚染した野菜検体を用いて、既存の増菌培養法とこの新しい増菌培地での増菌培養による菌検出率の比較検討を行うことが必要と思われる。

F. 引用文献

文献1 : Sata, S., Osawa, R., Asai, Y., and S. Yamai (1999). Growth of starved *Escherichia coli* O157 cells in selective and non-selective media. *Microbiology and Immunology* 43 (3): 217-227.

文献2 : Sata, S., Osawa, R., Furukawa, I., and S. Yamai (1999). A comparison of sensitivity between direct plate culture immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Japanese Journal of Bacteriology* 54 (3): 669-665.

文献3 : Mizunoe, Y., Wai, S. N., Takeda, A., and S. Yoshida (1999). Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂-degrading compounds. *Archives of Microbiology* 172: 63-67.

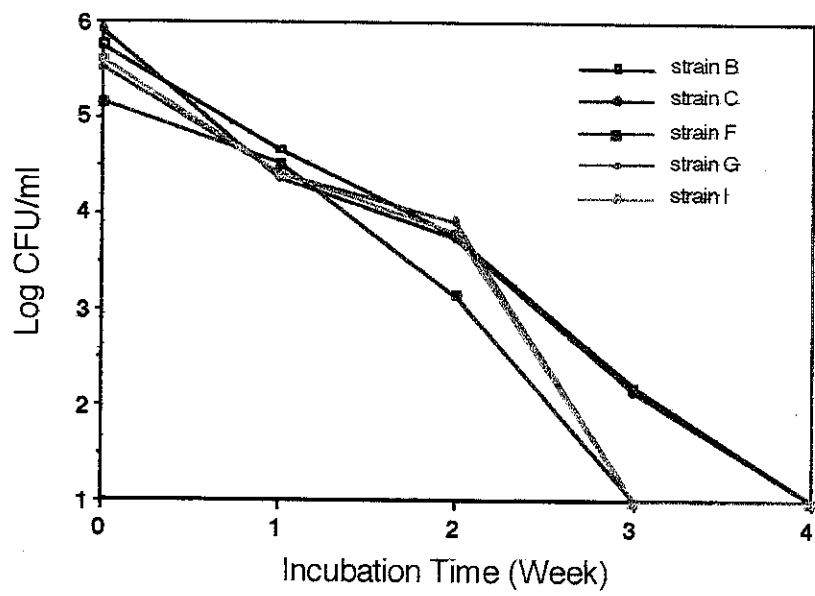


図1. SDW中に放置培養されたO157菌株の生残菌数 (CFU/ml)

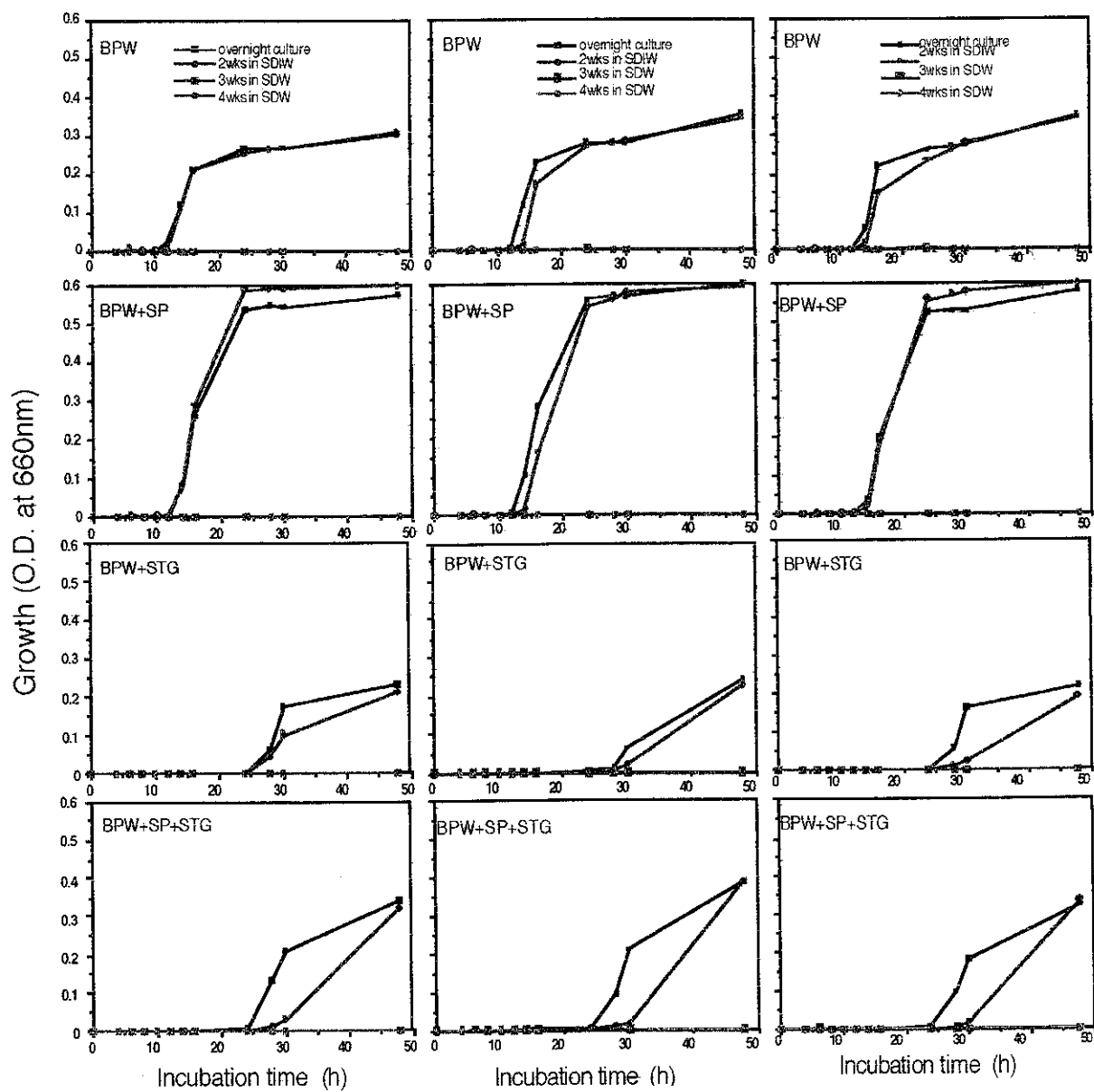


图2a. O157菌株F

图2b. O157菌株G

图2c. O157菌株I

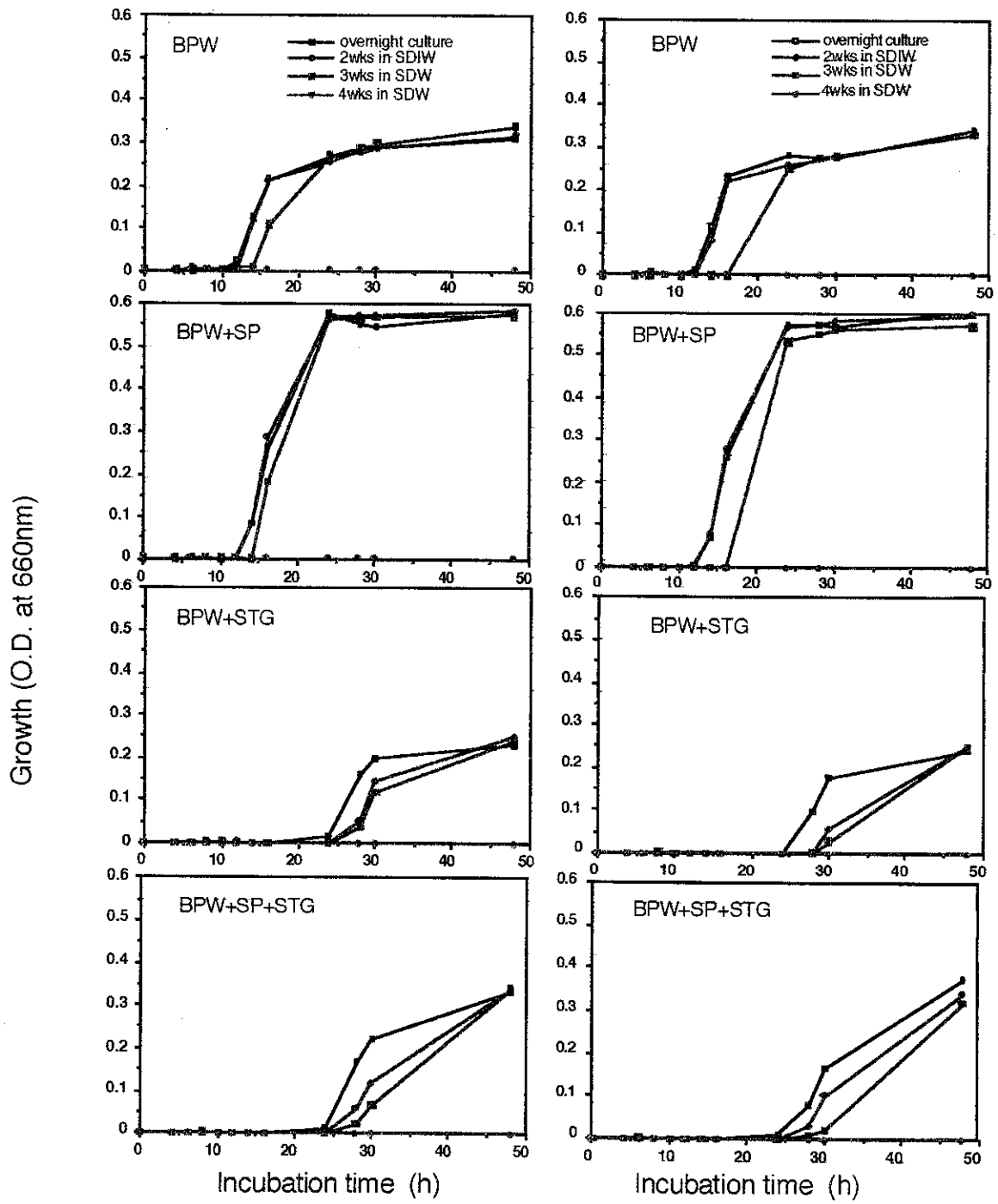


图2d. O157菌株B

图2e. O157菌株C

表1. 貧栄養ストレスの異なるO157菌細胞の各種増菌培地での増殖

O157菌株		B			C			F		G		I	
増菌培地	培養時間 (hr)	放置直後	放置2週間	放置3週間	放置直後	放置2週間	放置3週間	放置直後	放置2週間	放置直後	放置2週間	放置直後	放置2週間
BPW	8	6.4	6.3	4.2*	6.3	6.2	3.6*	6.4	6.3	6.2	5.9	5.9	5.7
	24	8.5	8.4	8.4	8.4	8.3	8.3	8.5	8.4	8.4	8.4	8.5	8.3
BPW+SP	8	6.5	6.4	4.1*	6.2	6.2	3.6*	6.5	6.4	6.3	6.2	6.3	6.3
	24	8.8	8.7	8.8	8.8	8.6	8.8	8.8	8.6	8.9	8.8	8.8	8.6
BPW+STG	8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	24	6.8	5.1*	5.0*	6.0	4.9*	4.4*	6.3	3.9*	6.1	3.8*	6.2	4.0*
BPW+SP+STG	8	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
	24	6.7	4.9*	3.7*	6.6	4.4*	3.5*	6.9	4.3*	6.0	3.3*	6.1	3.2*

*SDW放置直後の増殖菌数の10%未満の増殖を示す。

レタスに実験的に接種された硫化水素産生・非産生サルモネラの回収方法の検討

金子賢一 東京農工大学農学部

本研究では、野菜からのサルモネラの検出方法を確立することを意識して、硫化水素産生および非産生サルモネラを実験的に接種して、日本で採用されている食衛法と米国で採用されているFSIS法によるサルモネラの回収率を比較し、以下の結果を得た。

1) レタスに硫化水素産生サルモネラを少数($10^1 \sim 10^2$ CFU/g)接種した場合、前増菌培地としてBuffered peptone water(以下BPW)、選択増菌培地としてRappaport-Vassiliadis broth(以下RV)、選択分離培地としてDouble modified lysine iron agar(以下DMLIA)およびスルファピリジン添加Brilliant green(以下BGS)を使用する方法(G法およびH法)が最も回収率が高かった。選択増菌培地としてTetrathionate brothを使用する方法の回収率は最も低かった。

2) レタスに硫化水素非産生サルモネラを少数($10^1 \sim 10^2$ CFU/g)接種した場合、BPWで前増菌・RVで選択増菌後、BGSで選択分離する方法(H法)の回収率が最も高かった。

A 研究目的

食肉からのサルモネラの回収方法については既に検討されているが⁹⁾、サルモネラの汚染菌数が少ない野菜からの回収方法については十分な検討がされていない。そこで、今回の研究では、野菜からサルモネラを検出する方法の確立を目的に、近年諸外国で食品汚染が指摘されている硫化水素非産生サルモネラの検出も意識して、サルモネラを少数接種した野菜について日本の食品衛生検査指針法(食衛法)と米国のFSIS法の比較を試みた。

B 研究方法

1. 供試材料：供試材料として府中市内のスーパーマーケットおよび青果店にて購入したレタスを用いた。3~4cm角に切り、よく混和した後5°Cで2日間保存して、レタスの葉表面に付着している細菌が均一になるよう実験当日にも更に混和した(保存レタス)。また実験当日に購入したレタスを同様によく混和した(当日レタス)。

2. 生菌数の測定：標準寒天培地(栄研)で混釈し、25°Cで48時間培養後、定法により行った。

3. 供試菌株：供試菌株として、

Salmonella Typhimurium ATCC13311株(硫化水素産生株)および

S. Typhimurium(硫化水素非産生株)を用いた。

4. 菌液の作製および接種方法：供試菌株をTrypticase soy agar(BBL、以下TSA)に塗抹し、37°C24時間培養後、白金耳でコロニーを集菌し、約 10^8 CFU/mlになるよう、リン酸緩衝液(PBS)10mlに浮遊させ、これを接種菌原液とした。この原液をPBSで希釈しレタス10g当たり(10^3 、 10^4 、 10^5 および 10^6)になるように接種した。

5. 供試培地 1) 食衛法：前増菌培地としてEEMブイヨン(日水、以下EEM)を、選択増菌培地としてセレナイトシスチン基礎培地(日水、以下SC)およびセレナイトブリリアントグリーン基礎培地(日水、以下SBG)の2種を、選択分離培地としてMLOB寒天培地(日水)およびDHL寒天培地(日水)の2種を使用した。

2) FSIS法：前増菌培地としてBuffered peptone water(Difco、以下BPW)を、選択増菌培地としてTetrathionate

broth (Difco、以下TT)および Rappaport-Vassiliadis broth (Difco、以下RV)の2種を、選択分離培地としてDouble modified lysine iron agar (以下DMLIA) およびスルファピリジン添加 Brilliant green agar (以下BGS) の2種を使用した。

6. サルモネラ培養方法：EEMおよびBPWについては35°Cで18~24時間培養した。培養後のEEMをSC15mlおよびSEG15mlに1.5mlずつ接種し、43°Cで18時間培養した。培養後のBPW0.5mlをRV10mlおよびTT10mlに接種し、42°Cで20~24時間培養した。培養後のEEMおよびSCの1白金耳をMLCBおよびDHLへ塗抹し、35°Cで24時間培養した。RVおよびTTも同様にしてDMLIAおよびBGSに塗抹、36°Cで20~24時間培養し、接種菌の同定は定法に準じて行った。

なお、8種類のサルモネラ検出法で用いた培地の組み合わせを表1に示した。

C 研究結果

表2は、硫化水素産生株を接種したレタスからのサルモネラ回収結果を示したものである。各検出法ごとに、それぞれの接種菌数について回収をE法およびF法を除き10回試行した。選択増菌培地としてRVを使用するG法およびH法は、最も回収率が高かった。特にH法では10⁶の菌液を接種した当日レタスから8回(80%)回収され、合計でも75%の回収率であった。さらに、保存レタスでも合計の回収率は65%で、8方法中最も高かった。選択増菌培地としてTTを使用するE法およびF法は当日レタスおよび保存レタスにおける合計回収率は最も低かった。

表3は、硫化水素非産生株を接種したレタスからのサルモネラ回収結果を示している。各検出法ごとにそれぞれの接種菌数に

ついて回収はE法およびF法を除き7回試行した。

硫化水素産生株の場合と同様、選択増菌培地としてRVを使用するH法が当日レタスおよび保存レタスのいずれでも最も回収率が高かった。一方、TTを使用するE法およびF法は、硫化水素産生株を接種したレタスの場合よりも、回収率が高くなっていた。このことは特に選択分離培地としてDMLIAを用いたE法よりも、BGSを用いたF法に顕著な傾向であった。食衛法(A、B、CおよびD)は当日レタスおよび保存レタスのいずれでもFSIS法(E、F、GおよびH)より回収率が低かった。

本研究では、硫化水素非産生株を回収する際、コントロールとしてDHLおよびMLCB上に接種した硫化水素非産生サルモネラのコロニーと比較して、疑わしいコロニーを釣菌した。しかし、DHLおよびMLCB上では、サルモネラの黒変を鑑別性状にしない限り他の菌との区別が困難であり、A、B、CおよびD法のいずれも、硫化水素非産生株の回収率は硫化水素産生株の場合よりも低下していた(表3)。

表4は硫化水素産生サルモネラの回収結果を生菌数10³~10⁶CFU/gと10⁶~10⁷CFU/gのレタスに分けて示したものである。生菌数10³~10⁶CFU/gの場合は、RVを用いるG法およびH法の回収率が最も高かった。10⁶~10⁷CFU/gの場合は、H法の回収率が他の選択増菌培地を用いる方法より有意に高かった(P<0.05)。

表5は、硫化水素非産生サルモネラの回収状況を表4と同様の生菌数のレタスに分けて示したものである。レタスの生菌数10³~10⁶CFU/gおよび10⁶~10⁷CFU/gの場合ともに、RVおよびBGSを用いるH法の回収率が最も高かった。