

D 考察

レタスに接種したサルモネラの回収を検討した結果、食衛法 (A, B, C および D) および FSIS の示す方法 (E, F, G および H) のうち、最も回収率が高かったものは、前増菌培地に BPW、選択増菌培地に RV、選択分離培地に DMLIA、BGS を使用する G 法および H 法であった。

RV が選択増菌培地として優れているとの報告は多い。この理由として、RV はサルモネラ以外の細菌の増殖を抑制する能力が高いことが明らかにされている。レタスに少量のサルモネラを接種した本研究でも、以前の報告と同様に RV が優れていた。レタスの生菌数が $10^6 \sim 10^7$ CFU/g の場合も、 $10^4 \sim 10^5$ CFU/g の場合と同じ回収率 (88%) を維持していたことから、RV は今回使用した他の選択増菌培地よりも選択性が高いことが確認された。

硫化水素非産生株の回収実験において、RV を使用する検出法が食衛法より優れてい

た (表 3、5) 理由として、単に RV と SC、SBG 間の選択性の差ばかりでなく、食衛法では選択分離培地として硫化水素産生によるコロニーの黒変を鑑別性状とする DHL、MLCB を用いたことも考えられる。しかし、共存細菌数が多いレタスからの硫化水素産生株の回収実験でも、RV を使用する H 法が有意に優れていたことから、RV の選択性が優れていることが示唆された。

TT は、他の血清型に比べ *S. Typhimurium* の検出能が低いとも指摘されている。硫化水素非産生株回収実験においては、TT の選択性は RV と同等であったが、硫化水素産生株の回収率は最も低かった。自然界に分布するサルモネラの大部分を占める硫化水素産生株の回収率が低かったことから、TT は一部の非産生株の検出には良いが、サルモネラ全体の選択増菌培地として適さないと考えられた。

表1.各検出法で用いる培地の組み合わせ

検出方法 ^{a)}	前増菌培地	選択増菌培地	選択分離培地
A	EEM	SC ^{b)}	MLCB
B	EEM	SC	DHL
C	EEM	SBG ^{c)}	MLCB
D	EEM	SBG	DHL
E	BPW ^{d)}	TT ^{e)}	DMLIA ^{f)}
F	BPW	TT	BGS ^{g)}
G	BPW	RV ^{h)}	DMLIA
H	BPW	RV	BGS

a)A~D: 食衛法、E~H: FSISに基づく方法

b)SC: Selenite cystine broth、 c)SBG: Selenite brilliant green broth

d)BPW: Buffered peptone water、 e)TT: Tetrathionate broth、

f)DMLIA: Double modified lysine iron agar、

g)BGS: sulfapyridine添加Brilliant green agar

h)RV: Rappaport-Vassiliadis broth

表2. 硫化水素産生サルモネラ接種レタスにおける検出方法別回収状況

回収率(%) = サルモネラを回収した回数 / 試行回数 ^{a)} × 100						
検出方法	接種菌数 ^{b)}				計	回収回数/ 試行回数
	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹		
当日レタスからの回収状況						
A	80	60	50	50	60	24/40
B	70	40	50	40	50	20/40 ^{c)}
C	60	60	60	50	58	23/40
D	50	40	60	40	48	19/40 ^{c)}
E	13	13	13	0	9	3/32 ^{c)}
F	38	50	0	13	25	8/32 ^{c)}
G	80	60	70	50	65	26/40 ^{c)}
H	80	70	70	80	75	30/40 ^{c)}
保存レタスからの回収状況						
A	60	50	5	10	43	17/40 ^{d)}
B	60	20	20	0	25	10/40 ^{d)}
C	80	60	60	20	55	22/40
D	50	50	50	20	12.5	17/40 ^{d)}
E	13	20	0	0	9	3/32 ^{d)}
F	0	25	13	0	9	3/32 ^{d)}
G	60	70	70	40	60	24/40 ^{d)}
H	70	80	80	30	65	26/40 ^{d)}

a) 試行回数は10回。ただしE、Fのみ8回。

b) 数値はCFU/g

c) G、Hの回収率は、B、D、EおよびFのそれよりも有意に高かった(p < 0.05)。

d) G、Hの回収率はA、B、D、EおよびFのそれよりも有意に高かった(p < 0.05)。

表3.硫化水素非産生サルモネラ接種レタスにおける検出方法別回収状況^a

検出方法	回収率(%) = サルモネラを回収した回数 / 試行回数 ^{a)} × 100					計	回収回数/ 試行回数
	接種菌数 ^{b)}						
	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹			
当日レタスからの回収状況							
A	71	57	29	29	47	13/28	c)
B	57	43	43	29	43	12/28	c)
C	14	29	58	14	29	8/28	c)
D	43	29	29	14	29	8/28	c)
E	40	40	60	60	50	10/20	c)
F	100	40	60	60	80	16/20	
G	86	29	72	57	61	17/28	c)
H	86	71	86	86	82	23/28	c)
保存レタスからの回収状況							
A	29	43	29	14	29	8/28	d)
B	29	14	43	14	25	7/28	d)
C	14	29	57	14	29	8/28	d)
D	29	14	14	0	14	4/28	d)
E	60	60	60	80	65	13/20	d)
F	80	60	80	80	75	15/20	
G	72	71	71	86	75	21/28	d)
H	100	100	100	71	92	26/28	d)

a) 試行回数は7回。ただしE、Fは5回。

b) 数値はCFU/g

c) G、Hの回収率は、A、B、C、DおよびEのそれよりも有意に高かった(p<0.05)。

d) G、Hの回収率は、A、B、C、DおよびEのそれよりも有意に高かった(p<0.05)。

表4. 硫化水素産生サルモネラ接種レタスにおける生菌数別回収状況^{a)}

検出方法	回収率(%) = サルモネラを回収した回数 / 試行回数 ^{d)} × 100				計	回収回数 / 試行回数
	H ₂ S産生株接種菌数 ^{b)}					
	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹		
生菌数10 ³ ~10 ⁶ CFU/gのレタスからの回収状況						
A	80	70	30	30	53	21/40
B	80	30	30	20	40	16/40 ^{c)}
C	90	80	40	30	60	24/40
D	80	60	40	30	53	21/40
E	13	25	13	0	13	4/32 ^{c)}
F	13	25	0	0	9	3/32 ^{c)}
G	70	90	80	40	70	28/40 ^{c)}
H	70	80	70	60	70	28/40 ^{c)}
生菌数10 ⁶ ~10 ⁷ CFU/gのレタスからの回収状況						
A	60	40	30	30	40	16/40 ^{d)}
B	50	30	30	20	33	13/40 ^{d)}
C	50	40	40	30	40	16/40 ^{d)}
D	20	30	40	30	30	12/40 ^{d)}
E	13	13	13	0	9	3/32 ^{d)}
F	25	50	0	0	19	6/32 ^{d)}
G	80	40	80	40	60	24/40
H	80	70	70	60	70	28/40 ^{d)}

a) 10回試行。ただしE、Fは8回

b) 数値はCFU/g

c) G、Hの回収率は、B、EおよびFのそれよりも有意に高かった(p<0.05)

d) Hの回収率は、A、B、C、D、EおよびFのそれよりも有意に高かった(p<0.05)

表5. 硫化水素非産生サルモネラ接種レタスにおける生菌数別回収状況^{a)}

検出方法	接種菌数 ^{b)}				計	回収回数/ 試行回数
	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹		
生菌数10 ³ ~10 ⁵ CFU/gのレタスからの回収状況						
A	0	50	50	50	38	6/16 ^{c)}
B	75	25	100	50	63	10/16
C	0	50	100	0	38	6/16 ^{c)}
D	50	50	25	0	31	5/16 ^{c)}
E	0	0	0	25	13	1/8 ^{c)}
F	100	100	50	25	75	6/8
G	100	75	50	75	75	12/16 ^{c)}
H	100	75	100	75	88	14/16 ^{c)}
生菌数10 ⁶ ~10 ⁷ CFU/gのレタスからの回収状況						
A	70	50	20	10	38	15/40 ^{d)}
B	40	30	20	10	25	10/40 ^{d)}
C	20	20	40	20	25	10/40 ^{d)}
D	30	10	20	10	18	7/40 ^{d)}
E	63	63	75	75	69	22/32
F	88	75	75	75	78	25/32
G	70	40	80	70	65	26/40 ^{d)}
H	90	90	90	80	88	35/40 ^{d)}

a) 生菌数10³~10⁵CFU/gでは4回試行、ただしE、Fは2回。生菌数10⁶~10⁷CFU/gでは10回試行、ただしE、Fは8回。

b) 数値はCFU/g

c) G、Hの回収率は、A、C、DおよびEのそれよりも有意に高かった(p<0.05)。

d) G、Hの回収率は、A、B、CおよびDのそれよりも有意に高かった(p<0.05)。

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：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、もう一つ付け加えるならば、リステリアも同じ DNA サンプルから、25g 検体中に 10,000 個リステリアが存在すれば検出できることが分かった。

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及び集団感染が日本でも先進諸国でも増加するようになってきた。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とサルモネラの検出法を検討した。また、迅速簡便かつ正確な検査法を目指して検査法を検討した。

B. 研究方法

O157 とサルモネラの接種実験を行い、BPW による 24 時間、36℃培養液より 1ml をマイクロチューブで 5,000rpm、5 分間遠心し、上清を除去後、滅菌蒸留水 100 μ l を加えて、懸濁させ、これを 96℃、5 分間加熱し、11,000 rpm、10 分間遠心して、上清を PCR 用 DNA サン

プルとした。(図参照) PCR 試薬は O157 には ToYoBo の VT check をサルモネラとリステリアには TaKaRa Ex Taq を使用した。

C. 研究結果

O157 とサルモネラでは、接種実験にて検出されるよりも O157 では 1 日、サルモネラでは 2 日、そして、リステリアでは、3 日前にある程度の結果を知ることができた。(表参照) そしてその検出限界は O157 とサルモネラでは 25g 検体中の数個の菌を検出できることが分かった。リステリアでは 25g 検体中 1,000-10,000 個の菌を検出できることが分かった。

D. 考察

腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラは、検体 25g 中数個を検出できる系であることから検出法として有用であると思われる。リステリアに関しては感度はおちるが、3 種の主な病原性細菌を一括処理できる簡便、迅速かつある程度の感度を持つことから、良好な検出法であ

ると思われる。

E. 結論

この提案した系は、3種の病原性細菌を野菜や果物等の生食する農産物から検出するのに有用であると思われる。迅速な判断が必要なときには特に有用と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michiko Miyahara and Hirota
Konuma: *Escherichia coli* O157
Strains Which Caused Japanese
Outbreaks Have Residues of
Bacteriophage Sequences
Biol. Pharm. Bull., 22, 1372-1375
(1999).

2. 学会発表

日本防菌防黴学会第26回年次大会
(1999年5月): 宮原美知子、小沼博隆
農産物の病原微生物検査方法の検討
(腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネ
ラ)

113th AOAC International Annual
Meeting and exposition (1999年9月):
Michiko Miyahara, Koukichi Gotoh,
Hiroyuki Masaki, Akinobu Saitoh,
Seiji Kaneko, Takashi Masuda,
Hirota Konuma
Detection Methods for *Escherichia*
coli O157 and *Salmonella* From Fresh
Fruits and Vegetables

第20回日本食品微生物学会学術総会
(1999年10月8日): 宮原美知子、
後藤公吉、正木宏幸、斉藤章暢、金子誠

二、増田高志、小沼博隆
農産物の微生物汚染の検討

第22回日本分子生物学会年会(1999年
12月10日): 宮原美知子、小沼博隆
腸管出血性大腸菌 O157 志賀毒素産生遺
伝子とその下流域の DNA 塩基配列の検
討

サンプル番	サンプル	spc/g	O157		直接法		ピース法		VIDAS法		PCR	Now	直接法(RV)		ピース法		VIDAS		PCR
			CT-SMAC	CHROMAgar	CT-SMAC	CHROMAgar	CT-SMA	CHROMAgar	CT-SMA	CHROMAgar			CT-SMA	CHROMAgar	XLD	BGM	XLD	BGM	
C1	ほうれん草O157低菌量	8.10E+05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	ほうれん草O157低菌量	2.10E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C3	ほうれん草O157低菌量	8.60E+05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C4	ほうれん草O157低菌量	2.20E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C5	ほうれん草O157低菌量	4.60E+05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	ほうれん草O157高菌量	3.20E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	ほうれん草O157高菌量	1.90E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	ほうれん草O157高菌量	3.10E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	ほうれん草O157高菌量	5.40E+05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	ほうれん草O157高菌量	3.30E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C11	ほうれん草サルモネラ低菌量	3.40E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	ほうれん草サルモネラ低菌量	2.50E+06	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	ほうれん草サルモネラ低菌量	2.50E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	ほうれん草サルモネラ低菌量	1.10E+07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	ほうれん草サルモネラ高菌量	1.30E+07	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	ほうれん草サルモネラ高菌量	2.80E+07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	ほうれん草サルモネラ高菌量	7.60E+06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	ほうれん草サルモネラ高菌量	1.00E+07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C19	ほうれん草サルモネラ高菌量	1.20E+07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C20	ほうれん草サルモネラ高菌量	1.10E+07	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O157

低菌量平均 3.2cfu/0.1ml
高菌量平均 30.4cfu/0.1ml

サルモネラ

低菌量平均 1.8cfu/ml
高菌量平均 18.2cfu/ml

分離寒天平板上での判定基準
- : コロニーにより不検出と判定
+ : コロニーにより検出と判定
(+) : コロニーにより検出としたが、その後の確認試験により誤った判断であったことを確定したものを。

O157とサルモネラ検出法の検討 接種実験

O157とサルモネラ検出法の検討 接種実験

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 *E. coli* 0157:H7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Enterohemorrhagic *E. coli* 0157: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。

A. 研究目的

下痢原性大腸菌の一つである腸管出血性大腸菌 Enterohemorrhagic *E. coli* 0157 は、わが国において1996年に本菌による爆発的集団発生がみられて以来、菌学的特徴、発症機構、治療法等に関して多くの研究をがなされてきた。本菌は宿主の抵抗力や腸管構造の発達状況により10 cfu程度でも感染し、重篤な症状を発し、時には死に至らしめることが知られている。このような感染症起因菌の検出あるいは感染経路の追究のためには、正確性、鋭敏性、迅速性、簡便性が要求される。培養操作の繰り返しとなる公定法は、結果判明までに数日を要し、迅速性に欠ける。このことが、鋭敏で迅速に検出が可能な免疫磁気ビーズ法(IMS) と Polymerase Chain Reaction(PCR)法を併用する検出法(IMS-PCR) の有効性を明らかにするために基礎的検討を行った。

B. 研究方法

①使用菌株：*E. coli* 0157:H7(VT1+VT2:VTEC)を食品材料等への接種・回収試験に用いた。これに加えて、免疫磁気ビーズ(Dynal製)の特異性を検討するために *E. coli* 0127:H21(EPEC), *E. coli* 124:HNM(EIEC), *E. coli* ST & LT(ETEC), *E. coli* 0157:H7(VT2:VTEC), *E. coli* 0111:HNM(VT2 & VT1:VTEC), *E. coli* 026:HNM(VT1:VTEC)等の*E. coli*株、それに *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *V. parahemolyticus*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila*, *S. aureus*, *B. cereus*等の菌株を用いた。②免疫磁気ビーズ法(IMS) による分離後の平板培地の選択：BHI agarを対照として11種の腸管出血性大腸菌分離用培地を使用して分離用最適培地を検討した。③PCR 法：VT1 遺伝子検出用EVT-1,2(349BP)、VT2 遺伝子検出用EVS-1,2(404bp)およびVT遺伝子検出用EVC-1,2(171bp)の3セットのPrimerを用いて、Takaraテクニカルサポートラインに従ってPCR 法を実施した。④IMS-PCR 併用法の感度：各種食品材料、拭き取り材料、糞便・血液材料の10倍乳剤に*E. coli* 0157:H7(VTEC) を $10^1 - 10^3$ cfu/ml 接種してIMS-PCR 法の検出感度を検討した。

C. 結果および考察

免疫磁気ビーズにより分離した*E. coli* 0157:H7(VTEC) を回収するための平板培地について検討した結果、回収用培地としてRainbow 培地が妥当であると考えられた。免疫磁気ビーズ法の特異性を確認するために、*E. coli* 以外のグラム陰性菌およびグラム陽性菌の懸濁液からの免疫磁気ビーズで吊り上げRainbow 培地で分離した結果、0157のみが分離され、この系の特異性が確認された。既に、VTECを確認する手段として演者らはPCR 法の有効性を報告しているが、本報告ではさらに各種食品材料(野菜類およびその調理食品、果実加工品、卵とその調理食品、乳製品、食肉およびその調理食品等の計34材料) および糞便材料の10倍乳剤に $10 - 10^3$ cfu/ml のVTEC 0157:H7株を接種し、また拭き取り材料液および全血についても同様にして、IMS-PCR 系での検出感度を検討した結果、いずれの接種材料からも検体材料mlあたりVTECが10 cfuのオーダーにあれば、この系で検出可能であることが示された。

E. 結論

免疫磁気ビーズ法とPCR 法の併用系でのEnterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7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

上田成子、峰野純一、桑原祥浩：PCR 法による食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出法の検討、防菌防黴誌、27(7)、441-446(1999)

2. 学会発表

上田成子、桑原祥浩：免疫磁気ビーズ法とPCR 法による食品および糞便中のEnterohemorrhagic *E. coli* の検出に関する研究
日本衛生学会抄録集・55(1)、842(2000)

Table Recovery of VTEC from different selective media.

Medium	Mean recovery
BHI(control)	100 %
SIB agar (KYOKUTO)	88
TC SMC agar (KOGIN)	29
CT SMAC agar (EIKEN)	11
BCM agar (EIKEN)	8
CHROMO agar 0157 (KANTO)	44
CHROMO agar ECC (KANTO)	50
CHROMO agar E.coli (KANTO)	44
RAINBOW ager (BIOLOG)	127
DHL agar (EIKEN)	68
DESOXICLIRATO (EIKEN)	74
EMB (EIKEN)	74

Table Detection of VTEC by IMS-plating
on Rainbow agar assay.

Strains	Type/serovar/source / No.	
Enterohemorrhagic		
<u>E. coli</u>	VTEC 0157:H7(VT1)	+
	VTEC 0157:H7(VT1, 2)	+
	VTEC 0111:HNM(VT1, 2)	-
	VTEC 026 :HNM(VT1)	-
Gram negative bacteria		
<u>E. coli</u>	1- VTEC 0157:H7 ATCC4388(non VT)	+
	2- EPEC 0127:H21	-
	3- EIEC 0124:HNM	-
	4- ETEC ST & LT	-
	5- V517	-
	6- IFO 3301	-
	7- ATCC 43888	-
	8- from food	-
<u>K. aerogenes</u>	from food	-
<u>C. freundii</u>	from patient	-
<u>S. Enteritidis</u>	from patient	-
<u>S. Typhimurium</u>	from patient	-
<u>V. parahaemolyticus</u>	from food	-
<u>Y. enterocolitica</u>	03(biotype 4)	-
<u>A. hydrophila</u>	ATCC 7966	-
Gram positive bacteria		
<u>S. aureus</u>	1- Ent A producer	-
	2- B producer	-
	3- C producer	-
	4- D producer	-
	5- E producer	-
	6- H producer	-
	7- TSST-1 producer	-
	8- MRSA	-
<u>B. cereus</u>	1- emetic type	-
<u>B. cereus</u>	2- diarrheal type	-
<u>B. cereus</u>	3- IFO 13484	-
<u>B. subtilis</u>	PCI 219	-
<u>B. licheniformis</u>	1- ATCC 43888	-
<u>B. pumilus</u>	from air	-
<u>C. botulinum</u>	E toxin producer	-
<u>C. perfringens</u>	Hobbs type 13	-

Table Detection of VTEC from vegetables inoculated with different levels of VTEC 0157:H7(VT1,2) by immunomagnetic separation-PCR assay system.

Food	level of inocula*				Food	level of inocula			
	0	10 ¹	10 ²	10 ³		0	10 ¹	10 ²	10 ³
Lettuce	-	+	+	+	Vegetable salad	-	+	+	+
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	-	+	+	+

* CFU/ml of 10% suspension of material.

Table Detection of VTEC 0157:H7(VT1,2)
 from various types of foods
 inoculated with different levels
 of VTEC by immunomagnetic separation
 -PCR assay system.

Food	level of inocula*			
	0	10 ¹	10 ²	10 ³
Liquid egg	-	+	+	+
Thick grill egg	-	+	+	+
Milk	-	+	+	+
Yoghurt	-	+	+	+
Cheeses	-	+	+	+
Hamburger	-	+	+	+
Roast beef	-	+	+	+
Raw liver	-	+	+	+
Raw beef	-	+	+	+
Raw pork	-	+	+	+
Raw chicken	-	+	+	+

* CFU/ml of 10% suspension of material.

Table Detection of VTEC 0157:H7(VT1,2)
 from swabs ,blood and faeces
 inoculated with different levels of
 VTEC by immunomagnetic separation
 -PCR assay system.

Materials	level of inocula*			
	0	10 ¹	10 ²	10 ³
Swabs	-	+	+	+
Blood	-	+	+	+
Faeces	-	+	+	+

* CFU/ml of 10% suspension of material.

免疫磁気ビーズとPCR 法併用による食品および糞便中の *Listeria monocytogenes* 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 *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、免疫磁気ビーズ法は *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、従来の検出方法はほぼ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。

A. 研究目的

*Listeria*はヒト・動物に関連する環境中に極く普遍的に分布する。1997年のWHO の報告では、ヒト *Listeriosis* の罹患率は人口100 万あたり2.2 ~13人でありその死亡率は20~50% と高い。欧米を初めとしてFood borne *Listeriosis*が多々報告されているが、日本では報告事例はない。しかしながら日本の食糧事情を見た場合カロリーベースで46% が輸入に依存している。このことを考慮した場合、本菌によるFood borne infection の可能性は否定しがたい。本症のような重篤な感染症の原因追究のためには正確・鋭敏・迅速・簡便な検査法が要求される。しかしながら、公定法による検出は判定までに6 日間を要し迅速性に欠ける。このことから鋭敏・迅速に測定可能な免疫磁気ビーズとPCR 法(Polymerase Chain Reaction) 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行った。

B. 研究方法

①各種食品、ふきとり材料、糞便および血液への接種実験に使用した菌は *L. monocytogenes* 4bである。免疫磁気ビーズ(Dynal製：ペリタス)の *Listeria* spp. 間での特異性を検討するために用いた菌株は *L. monocytogenes* 1/2a 2菌株、1/2b 2 菌株、1/2c 2菌株、4b 3 菌株それに *Listeria*属の6 種菌株の16菌株である。また、各種腸管病原菌は：Enteropathogenic *E. coli* 0127:H21、Enteroinvasive *E. coli* 0124:HNM、Enterotoxigenic *E. coli* ST<、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7(VT1 & VT2)、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7(VT2) をはじめとする14種の大腸菌、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Y. enterocolitica*、*A. hydrophila*、*S. aureus*(毒素型 A、B、C、D、E、H、TSST-1およびMRSA)、*B. cereus*をはじめとする芽胞形成桿菌8 種の合計35菌株を用いてその有効性を検討した。②PCR 試験に用いたPrimerは1(C-D:161 bp)、2(R1-R2:702 bp)、3(MonoA-MonoB:371 bp)、4(hly1-hly2:234 bp)、5(prf A1-prf A2:467 bp)の5 種である。これらPrimerを用いTakaraのクオカクソ-ライのApplication 3 に準拠しPCR を検討した。③免疫磁気ビーズでの吊り上げ後の平板培地の検討：Oxoid(FDA)寒天(Oxoid 製)、Oxoid(UVM)寒天(Oxoid製)、Oxford Medium Base寒天(Difco 製)、Oxford Palcam 寒天(Difco 製)、BCM 寒天(Biosynth 製)、Primary Enrichment寒天(合成)、Primary Secondary Enrichment寒天培地(合成)

などの7 種を用いて最適培地を検討した。④接種試験に用いた食品はゆず、かぼ、かゆ、かゆ、等の野菜やその調理品、果実加工品の23種、卵および卵調理品2 種、牛乳、チーズ、ヨーグルトの3 種、食肉およびその調理加工品6 種の計34種を10% 乳剤とし、それぞれに *L. monocytogenes* を1、2、3 Log of cfu/ml接種し試験した。⑤糞便は10% 乳剤としそれぞれに *L. monocytogenes* を接種して試験した。また全血に糞便と同様本菌を接種して試験した。

C. 結果

①免疫磁気ビーズでの交差試験：試験した *Listeria* spp. では全菌株が免疫磁気ビーズで吊り上げることができたが、これら吊り上げた菌株のうちPCR 法では *L. monocytogenes* のみを検出することができ、確実な結果を得ることができた。②免疫磁気ビーズ吊り上げ後の平板培地：試験したいずれの培地も *L. monocytogenes* の検出には有効であった。③食品およびその調理加工品、ふきとり、糞便および血液での *L. monocytogenes* の検出：全試験検体とも1 Log of cfu/ml で検出可能であった。

D. 考察

以上の結果、免疫磁気ビーズ法とPCR 法の系での *L. monocytogenes* 検出は迅速・簡便・鋭敏に実施できることが明らかとなった。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 *L. monocytogenes* 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

1. 上田成子、桑原祥浩、丸山務：免疫磁気ビーズ法とPCR 法による食品および糞便中の *Listeria monocytogenes* の検出に関する研究(第77回日本食品衛生学会抄録集・1999年5 月)
2. 上田成子、桑原祥浩、丸山務：PCR 法による食品および糞便中の *Listeria monocytogenes* 検出に関する研究(第20回日本食品微生物学会抄録集・1999年5 月)

Table Recovery of L. monocytogenes
from different selective media.

Medium	Mean recovery
BHI(control)	100 %
OXOID(FDA) agar	100
OXOID(UVM) agar	100
OXFORD MEDIUM BASE agar	100
OXFORD PALCAM agar BASE	100
BCM agar	100
Primary Enrichment agar	100
Secondary Enrichment agar	100
Primary-Secondary Enrichment agar	100

Table Detection of Listeria by IMS-plating on Oxford assay.

Strains	Type/serovar/source / No.	
<u>Listeria</u> spp.		
<u>L. monocytogenes</u>	1/2a	880278 +
	1/2a	880575 +
	1/2b	900638 +
	1/2b	900418 +
	1/2c	880282 +
	1/2c	900616 +
	4b	900208 +
	4b	900226 +
	4b	110571 +
	4b	CH190 +
<u>L. innocua</u>		SC11 +
Gram negative bacteria		
<u>E. coli</u>	1- EPEC	0127:H21 --
	2- EIEC	0124:HNM --
	3- ETEC	ST & LT --
	4- VTEC	0157:H7 --
	5- VTEC	0157:H7 --
	6- VTEC	0157:H7 --
	7- VTEC	0111:HNM --
	8- VTEC	026 :HNM --
	9- V517	--
	10- IFO	3301 --
	11- ATCC	43888 --
	12- from food	--
<u>K. aerogenes</u>	from food	--
<u>C. freundii</u>	from patient	--
<u>S. Enteritidis</u>	from patient	--
<u>S. typhimurium</u>	from patient	--
<u>V. parahaemolyticus</u>	from food	--
<u>Y. enterocolitica</u>	O3(biotype 4)	--
<u>A. hydrophila</u>	ATCC 7966	--
Gram positive bacteria		
<u>S. aureus</u>	1- Ent A producer	--
	2- B producer	--
	3- C producer	--
	4- D producer	--
	5- E producer	--
	6- H producer	--
	7- TSST-1 producer	--
	8- MRSA	--
<u>B. cereus</u>	1- emetic type	--
<u>B. cereus</u>	2- diarrheal type	--
<u>B. cereus</u>	3- IFO 13484	--
<u>B. subtilis</u>	PCI 219	--
<u>B. licheniformis</u>	1- ATCC 43888	--
<u>B. pumilus</u>	from air	--
<u>C. botulinum</u>	E toxin producer	--
<u>C. perfringens</u>	Hobbs type 13	--

Table Oligonucleotide primers used to indentify L.monocytogenes by immunomagnetic separetion-PCR assay system.

primer No.	name	sequence(5' - 3')	molecule weight(bp)
1-1	C	TTA CGA ATT AAA AAG GAG CG	161
2	D	TTA AAT CAG CAG GGG TCT TT	
2-1	R-1	CCT AAG ACG CCA ATC GAA	702
2	R-2	GAG CAG TTG CAA GCG CTT	
3-1	Mono A	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT	371
2	Mono B	GCA CTT GAA TTG CTG TTA TTG	
4-1	hly 1	CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG	234
2	hly 2	CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT	
5-1	prf A1	ACC AAT GGG ATC CAC AAG A	467
2	prf A2	CAG CTG AGC TAT GTG CGA T	