

Table Specificity of various primers for detection of *L. monocytogenes*

bacteria		Primer ¹⁾					Hemolysis	
species	Type/serovar/source	1	2	3	4	5	Horse	Sheep
<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	-	+	+	+	+	+
Gram negative bacteria								
<i>E. coli</i>	1- EPEC 0127:H21	-	-	+	±	-	+	+
	2- ETEC 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	-	-	±	-	-	+	+
<i>K. aerogenes</i>	from food	-	±	±	-	-	+	+
<i>C. freundii</i>	from patient	-	-	-	-	±	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	from patient	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i>	from patient	±	-	±	-	-	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	from food	-	-	-	-	-	+	+
<i>Y. enterocolitica</i>	O3(biotype 4)	±	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966	-	-	-	+	-	+	+
Gram positive bacteria								
<i>S. aureus</i>	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	-	-	-	±	-	+	+
<i>B. cereus</i>	1- emetic type	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i>	2- diarrheal type	-	-	-	-	-	+	+
<i>B. cereus</i>	3- IFO 13484	-	-	±	-	-	+	+
<i>B. subtilis</i>	PCI 219	±	-	-	-	-	+	+
<i>B. licheniformis</i>	1- ATCC 43888	±	-	±	-	-	+	+
<i>B. pumilus</i>	from air	±	-	±	-	-	+	+
<i>C. botulinum</i>	E toxin producer	-	-	+	-	-	+	+
<i>C. perfringens</i>	Hobbs type 13	±	-	±	±	-	+	+

1) 1:C-D ,2:R1-2 ,3:MonoA-B ,4:hly1-2 and 5:prfA1-2 gene were used as primers

Table Specificity of various primers for detection of L. monocytogenes

No.	Serovar	Strain No.	Primer				
			1	2	3	4	5
1	1/2a	880278	+	-	+	+	+
2	1/2a	880575	+	-	+	+	+
3	1/2b	900638	+	-	+	+	+
4	1/2b	900418	+	-	+	+	+
5	1/2c	880282	+	-	+	+	+
6	1/2c	900616	+	-	+	+	+
7	4b	900208	+	-	+	+	+
8	4b	900226	+	-	+	+	+
9	4b	110571	+	-	+	+	+
10	4b	CH190	+	-	+	+	+
L. innocua SC11			-	-	-	-	-

1) 1:C-D , 2:R1-2 , 3:MonoA-B , 4:hly1-2 and 5:prfA1-2 gene were used as primers.

Table Detection of Listeria from vegetables inoculated with different levels of L. monocytogenes 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 Listeria from various types of foods inoculated with different levels of L. monocytogenes 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 Listeria from swabs ,blood and faeces inoculated with different levels of L. monocytogenes 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.

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 (神奈川県衛生研究所)

研究要旨：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（バッファード・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。

A. 研究目的

生食用の野菜には多くの大腸菌群の菌種やオキシダーゼ陽性のグラム陰性桿菌が存在しており、これらの細菌が腸管出血性大腸菌 O157 の分離に支障を及ぼすことが予想される。そこで本研究ではカイワレ大根を対象として、CT-SMAC 寒天培地に発育してくる O157 酷似の集落性状を示す菌株について、従来の増菌培地及び分離培地である CT-SMAC 寒天培地に若干の改良を加えて、従来の培地との比較検討を行った。

B. 研究方法

1) 増菌培地の検討

供試菌株

19 株の O157 並びにカイワレ大根より分離した 15 株の O157 以外のオキシダーゼ陰性及びオキシダーゼ陽性のグラム陰性桿菌を用いた。

増菌培地

バッファー・ドペプトン水(Oxoid、BPW) 及び 0.5%-チオグリコール酸ナトリウム添加 BPW (STG-BPW)を用いた。

実験方法

BPW にて一晚培養の供試菌株を滅菌生理食塩水にて 10^3 CFU / ml のオーダーとなるように希釈し、この希釈液の 0.1ml を 10ml の上記の 2 種類の増菌培地に接種して ($1 \sim 6 \times 10^4$ CFU / ml に調製)、 36°C 18 時間好気及び嫌気培養（アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学）後、ハートインヒュージョン寒天培地（栄研）を用いて菌数の測定を行った。また、O157 菌株については飢餓状態とした細胞における上記の実験も試みた。飢餓状態の菌細胞の作製は次の通りである。すなわち、トリプチケースソイブイオン（BBL）にて一晚培養した菌細胞を集菌、これを滅菌脱イオン水にて洗浄後、再び滅菌脱イオン水に浮遊させて 10^4 CFU / ml となるように調製し、 23°C で

3週間放置後、この菌液を 10^3 CFU / ml となるように希釈した後、その 0.1ml を 10ml の上述の増菌培地に接種し、上記の培養条件で培養後、菌数の測定を行った。

2) 分離培地の検討

供試菌株

19 株の O157 並びにカイワレ大根より分離した 101 株の O157 以外のオキシダーゼ陰性及びオキシダーゼ陽性のグラム陰性桿菌を用いた。

実験方法

供試菌株を BPW にて 36°C 18 時間培養した後、その 1 白金耳を下記の要領で作製された寒天培地 (CT-SSMAC) 及び CT-SMAC 寒天培地に塗抹摂取し、 36°C 20 ~ 22 時間培養後、集落性状を観察した。

CT-SSMAC 寒天培地

マッコンキーアガーベース (Difco)	40 g
D-ソルビトール (Difco)	10 g
サリシン (Difco)	10 g
4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド (Wako)	0.1 g
精製水	1 L

上記成分を加熱溶解した後、 121°C 15 分間滅菌を行う。滅菌後、約 55°C に冷やした後、亜テルル酸カリウム $2.5\text{mg} / \text{L}$ 及びセフェキシム $0.05\text{mg} / \text{L}$ を添加し、混和後、平板に固める。

C. 研究結果

各増菌培地及び培養条件下での成績を表 1 に示した。O157 に関しては、すべての菌株ですべての条件において菌数に違いはみられなかった。一方、O157 以外の菌株については多くの菌株で培地及び培養条件による影響がみられた。特に、還元剤であるチオグリコール酸ナトリウムを含んだ培地において嫌気培養条件下で培養された場合に影響が強かった。

一方、CT-SSMAC 上での集落性状については、O157 菌株の色調は CT-SMAC と同一であったが、O157 以外の一部の菌株については色調に変化が認められ、無色から赤色に変化した。また、色調に変化のみられなかった菌株についても O157 が β -ガラクトシダーゼ陽性なのに対して、多くの菌株で陰性であり、これらのことを総合すると、CT-SMAC 上で O157 と鑑別のできなかつた 101 株のカイワレ大根由来株のうち 92 株 (91%) が CT-SSMAC 培地を用いることによって鑑別が可能となった (表 2 参照)。

D. 考察

カイワレ大根を含めて、生食用の野菜には大腸菌以外のオキシダーゼ陰性の大腸菌群の菌種や *Pseudomonas* 属等のオキシダーゼ陽性菌が優勢に存在していることが報告されており、これらの細菌が O157 の分離時に障害となることが考えられ、これら細菌

の抑制が O157 検出において大変重要となる。今回行った増菌培地及び分離培地の改良の検討結果から、これら O157 以外の細菌を O157 の発育に影響を及ぼすことなく鑑別及び抑制ができることが可能である方法が得られ、カイワレ大根からの O157 の検出に極めて効果的な方法であると考えられた。他の種類の生食用野菜についても本方法が応用できるかどうか興味を持たれる。

表 1. 各条件下での供試菌株の発育状況^a
菌株番号

菌株番号	由来	O時間 (CFU/ml)	36°C、18時間培養後の菌数(CFU/ml)		36°C、18時間培養後の菌数(CFU/ml)	
			BPW(好気)	STG-BPW(好気)	BPW(嫌気)	STG-BPW(嫌気)
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 2	ヒト糞便	1.8 × 10 ¹	2.4 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	4.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 2*		1.9 × 10 ¹	2.5 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 457	食品	1.3 × 10 ¹	3.8 × 10 ⁸	3.4 × 10 ⁸	4.0 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 457*		1.4 × 10 ¹	2.8 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 23	ヒト糞便	2.4 × 10 ¹	2.6 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	3.9 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 23*		2.5 × 10 ¹	3.1 × 10 ⁸	3.4 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 42	ヒト糞便	1.7 × 10 ¹	3.4 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 42*		1.7 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 437	ヒト糞便	1.7 × 10 ¹	2.6 × 10 ⁸	3.4 × 10 ⁸	3.8 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 437*		1.7 × 10 ¹	2.5 × 10 ⁸	3.5 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1124	ヒト糞便	1.9 × 10 ¹	2.7 × 10 ⁸	3.4 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1124*		2.0 × 10 ¹	3.1 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1856	食品	2.2 × 10 ¹	1.3 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1856*		2.3 × 10 ¹	2.5 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1646	食品	1.1 × 10 ¹	4.0 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1646*		1.1 × 10 ¹	2.6 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1496	ハエ	1.7 × 10 ¹	2.5 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 NIID 1496*		1.3 × 10 ¹	1.8 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-10	食品	1.6 × 10 ¹	2.7 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	3.4 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-10*		1.3 × 10 ¹	2.2 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-24	フキトリ	1.4 × 10 ¹	2.8 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	3.5 × 10 ⁸	1.7 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-24*		1.6 × 10 ¹	2.9 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-31	と場牛腸	1.8 × 10 ¹	2.0 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-31*		2.0 × 10 ¹	2.1 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:NM KE-87	フキトリ	1.8 × 10 ¹	2.6 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:NM KE-87*		2.0 × 10 ¹	2.6 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-114	食品	1.9 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-114*		1.8 × 10 ¹	2.0 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸

<i>E. coli</i> O157:H7 KE-149	と場フキトリ	2.3 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	4.0 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-149*		2.0 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	3.8 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-181	と場牛便	2.6 × 10 ¹	3.1 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-181*		1.4 × 10 ¹	3.4 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:NM KE-188	牛便	1.9 × 10 ¹	3.2 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	3.2 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:NM KE-188*		2.0 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-302	牛便	2.2 × 10 ¹	3.1 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-302*		2.1 × 10 ¹	2.9 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-373	牛便	1.6 × 10 ¹	2.7 × 10 ⁸	2.8 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7 KE-373*		1.9 × 10 ¹	3.0 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸	3.0 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸
Oxidase-negative strain 5f	カイワレ大根	1.2 × 10 ¹	2.7 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁵	2.4 × 10 ²	1.4 × 10 ²
Oxidase-negative strain 5c	カイワレ大根	1.7 × 10 ¹	2.5 × 10 ⁷	1.7 × 10 ⁵	7.2 × 10 ⁴	4.0 × 10 ²
Oxidase-negative strain 2E	カイワレ大根	1.0 × 10 ¹	1.8 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁷	7.2 × 10 ⁴	2.3 × 10 ⁴
Oxidase-negative strain 4E	カイワレ大根	5.4 × 10 ¹	5.0 × 10 ⁸	5.4 × 10 ⁸	7.0 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁷
Oxidase-negative strain 4X	カイワレ大根	2.8 × 10 ¹	3.4 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	3.1 × 10 ⁸	2.4 × 10 ⁸
<i>Hafnia alvei</i> X33	カイワレ大根	5.6 × 10 ¹	8.8 × 10 ⁸	6.8 × 10 ⁸	7.8 × 10 ⁸	3.6 × 10 ⁸
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ps1	カイワレ大根	1.6 × 10 ¹	1.9 × 10 ⁸	1.1 × 10 ⁸	7.6 × 10 ⁵	3.0 × 10 ⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> X41	カイワレ大根	2.2 × 10 ¹	1.3 × 10 ⁸	1.3 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁷	5.0 × 10 ⁵
Oxidase-positive strain 4aa	カイワレ大根	2.4 × 10 ¹	7.4 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁵	8.0 × 10 ³	4.0 × 10 ¹
Oxidase-positive strain 2c	カイワレ大根	1.1 × 10 ¹	5.5 × 10 ⁷	1.9 × 10 ⁷	5.6 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁵
Oxidase-positive strain 5a	カイワレ大根	2.6 × 10 ¹	3.8 × 10 ⁷	2.1 × 10 ⁸	2.3 × 10 ⁸	1.2 × 10 ⁸
Oxidase-positive strain 2a	カイワレ大根	3.0 × 10 ¹	1.0 × 10 ⁸	7.2 × 10 ²	4.0 × 10 ²	4.0 × 10 ¹
Oxidase-positive strain 3a	カイワレ大根	1.3 × 10 ¹	6.6 × 10 ⁷	2.5 × 10 ³	4.0 × 10 ²	4.0 × 10 ¹
Oxidase-positive strain 1i	カイワレ大根	5.6 × 10 ¹	1.1 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁵	1.9 × 10 ⁵
Oxidase-positive strain 1c	カイワレ大根	6.6 × 10 ¹	1.8 × 10 ⁸	9.6 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁶	2.7 × 10 ⁵

*BPW: パップアード・ペプトン水、STG-BPW: 0.5%チオグリコール酸ナトリウム加パップアード・ペプトン水

* 飢餓状態としたO157菌株

表 2. 各試験培地上における試験菌株の集落性状

菌株	供試菌株数	CT-SMAC培地		CT-SSMAC培地		
		無色の集落 ^a	赤色集落	β-ガラクトシダーゼ陰性の無色の集落	β-ガラクトシダーゼ陽性 ^b の無色の集落	β-ガラクトシダーゼ陽性 ^b の無色の集落
<i>Escherichia coli</i> O157	19	19(100) ^c	0(0)	0(0)	19(100)	19(100)
<i>Hafnia alvei</i>	2	2(100)	0(0)	0(0)	2(100)	2(100)
Oxidase-negative strains	25	25(100)	21(84)	2(8)	2(8)	2(8)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10(100)	0(0)	10(100)	0(0)	0(0)
Oxidase-positive strains	64	64(100)	0(0)	59(92)	5(8)	5(8)
O157 以外の供試菌株数	101	101(100)	21(21)	71(70)	9(9)	9(9)

^aうすいピンク色の集落を含む。

^bUVランプの照射により集落の周囲に蛍光が観察される。

^c菌株数(%)

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 堂々崎 知格 (麻布大学)

<研究要旨>

野菜および果実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* O-157:H-7 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実の 10 倍乳剤を調製し、 $0.45\mu\text{m}$ 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 10^6 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°C 、24 時間培養後にそれぞれ生菌数を測定した。また、野菜および果実抽出液の代わりに 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、O-157 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、 260nm 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。今後は、抗菌性ないしは菌の発育抑制に関与する活性本体を検索するために、UV 吸収の認められたこれら成分のピークを手がかりに解析をさらに進めてゆくことにした。

<はじめに>

平成8年8月に、病原性大腸菌 O-157 によって発生した堺市学童集団下痢症の原因究明についての厚生省の中間報告において、「カイワレダイコンが原因食材とは断定できないが、その可能性も否定できない。」と公表されたことや野菜及びその加工品、特に生野菜を介した食中毒が増加する傾向にあり、野菜類に対する細菌検査の必要性が高まってきている。しかし、野菜や果物成分の中には抗菌ないしは発育抑制成分が含まれるケースも多く、細菌の発育に対する影響に関して情報は必ずしも多くない。また、現在の細菌検査の試験方法は主に動物性食品を対象とした試験法が準用されていることから、野菜・果物成分の細菌への影響を再検討する必要があると考えられるようになってきた。そこで今回は、無菌的に調製した野菜抽出液に感作させた細菌の発育を経時的に調査し、その影響を検討することとした。供試菌として、食中毒等が近年増加傾向にあり、それらを原因とする食中毒等の予防対策が急がれる、*Escherichia coli* O-157 および *Salmonella enteritidis* (S.E) を用いた。また、試験に供した野菜は、過去に発生した学童集団下痢症の原因食材と考えられたカイワレダイコンおよび同じくアブラナ科に属するキャベツ、並びにリンゴ、ミカンおよびバナナの3種の果物を用いた。

<実験材料および方法>

1.実験材料

野菜類：カイワレダイコン

キャベツ

果物類：リンゴ、ミカン、バナナ

いずれも市販品を用いた。

供試菌株

① *Escherichia coli* O-157:H7

② *Salmonella enteritidis* (S.E)

試薬類

① 1/15M 磷酸塩緩衝生理食塩水 (PBS)：リン酸一カリウム (KH_2PO_4) 1.2 g、リン酸二ナトリウム 8.23g (Na_2HPO_4)、塩化ナトリウム (NaCl) 9g を蒸留水に溶解し、1,000ml としたものを 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌した。

② 希釈液：生理食塩水を 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌し、供試菌の希釈に用いた。

③ 培地：ブレイン・ハート・インフュージョンブイヨン (BHI) を供試菌株の前培養に用いた。また、普通寒天粉末 10.5 g を蒸留水 300 ml に溶解し、121℃、15 分間高圧蒸気滅菌して調製した普通寒天培地を菌数測定に用いた。

高速液体クロマトグラム (日本分光)

ポンプ PU-1580 型、UV/フォトダイオードアレイ検出器 (MD-1510 ; 195 nm~650 nm)

2.実験方法

①野菜・果物抽出液の調製

野菜 10g をホモジナイザーカップに取り、PBS 90ml を加えて 1000rpm、15min ホモジナイズして 10 倍乳剤を調製した。次いで、3500rpm、10min 遠心分離し、得られた上清をミリポアフィルター (0.45 μm) でろ過滅菌し、抽出液とした。

②細菌の発育抑制試験または抗菌試験

抽出液に、 10^6 CFU/ml となるように前培養した供試菌を接種して感作させた後、この 1 ml

を経時的（0、1、6、12、24および36時間後）に採取して滅菌シャーレに取り、あらかじめ45℃～50℃に保温しておいた普通寒天培地約20mlを無菌的に注いで混釈し、36℃、24時間培養後に生菌数を測定した。また、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。

③高速液体クロマトグラフィーによる成分分析

フォトダイオードアレイ検出器を用い、そのピークの吸収スペクトルと保持時間から成分の検出を試みた。分析条件は、カラム：Mightysil RP-18, 150-4.6 (5 μm)、移動相：メタノール/酢酸 (pH 3.0) = 10/90 (v/v)、温度：30℃、流量：0.5 ml/minであった。

<結果および考察>

カイワレダイコン抽出液においては図1に示すとおり、*E. coli* 0-157 に対しては感作時間が12時間目までは菌の漸近的な減少が観察され、12時間目以降から36時間目に至るまで菌の発育はほぼ停止した状態で観察された。一方、S.Eの場合には、感作時間が24時間目まで菌の発育は抑制された状態にあり、それ以降、36時間目にかけてPBSの場合とほぼ同程度の菌数に達した。PBSではいずれの菌においても感作時間の経過と共に菌数の増加が観察されたことやアブラナ科同属のキャベツにおいて（図2）、PBSの場合と同程度の発育菌数かまたはむしろPBSより菌数が感作時間の経過と共に増加傾向にあったことなどを考慮すると、カイワレダイコン抽出液に観察された抗菌性ないしは菌の発育抑制効果はカイワレダイコンに特有の現象であることが示唆された。また、同時におこなった3種類の果物（リンゴ、ミカン、バナナ）抽出液のいずれも、供試菌に対してカイワレダイコンで観察されたような顕著な影響は認められなかった（図3）。

以上より、カイワレダイコンの成分が今回供した菌に抗菌ないしは抑制効果を示すことがわかったが、付着しただけないしは付着した菌がカイワレダイコンのホモジネートにともなって乳剤中に混在したとしても、食品衛生法に基づく通常の短い時間内で検査される限り、検出菌数に大きな影響はないかまたは影響は小さいことが示唆された。しかしながら、カイワレダイコン成分と選択培地等を用いた際のそれぞれの菌への影響についてはさらに検討が必要になると考える。

次いで、抗菌性ないしは菌の発育抑制効果を示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により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った。その結果、カイワレダイコン抽出液では、260 nmの検出波長において最も分離が良好であり、数ピークが高感度に検出されることがわかった（図4）。また、キャベツ抽出液における各ピークとはそれぞれ異なることが明確であり（図5）、これらピークの中に活性成分が存在する可能性が強く示唆された。アブラナ科の野菜ではワサビやカラシなどに抗菌活性が認められることは周知であり、特にワサビなどの香りと辛味の本体は、配糖体として存在するシニグリンがすりおろされる時に水分存在下でミロシナーゼの作用を受けて分解、生成した含硫化合物のアリシルイソシアネートが既知の代表的な抗菌成分として上げられる。また、カラシの辛味成分もアリシルイソシアネートであり、配糖体のシニグリンやシナルピンに由来する。生のダイコンの辛味成分本体も同様の含硫化合物であることから、カイワレダイコンにおいてもこれら含硫化合物の存在が第一に疑われる。

今後は、抗菌性ないしは菌の発育抑制効果に関与する活性本体を特定するにあたり、UV吸収の認められたこれら成分のピークを手がかりに解析をさらに進める必要があると考える。

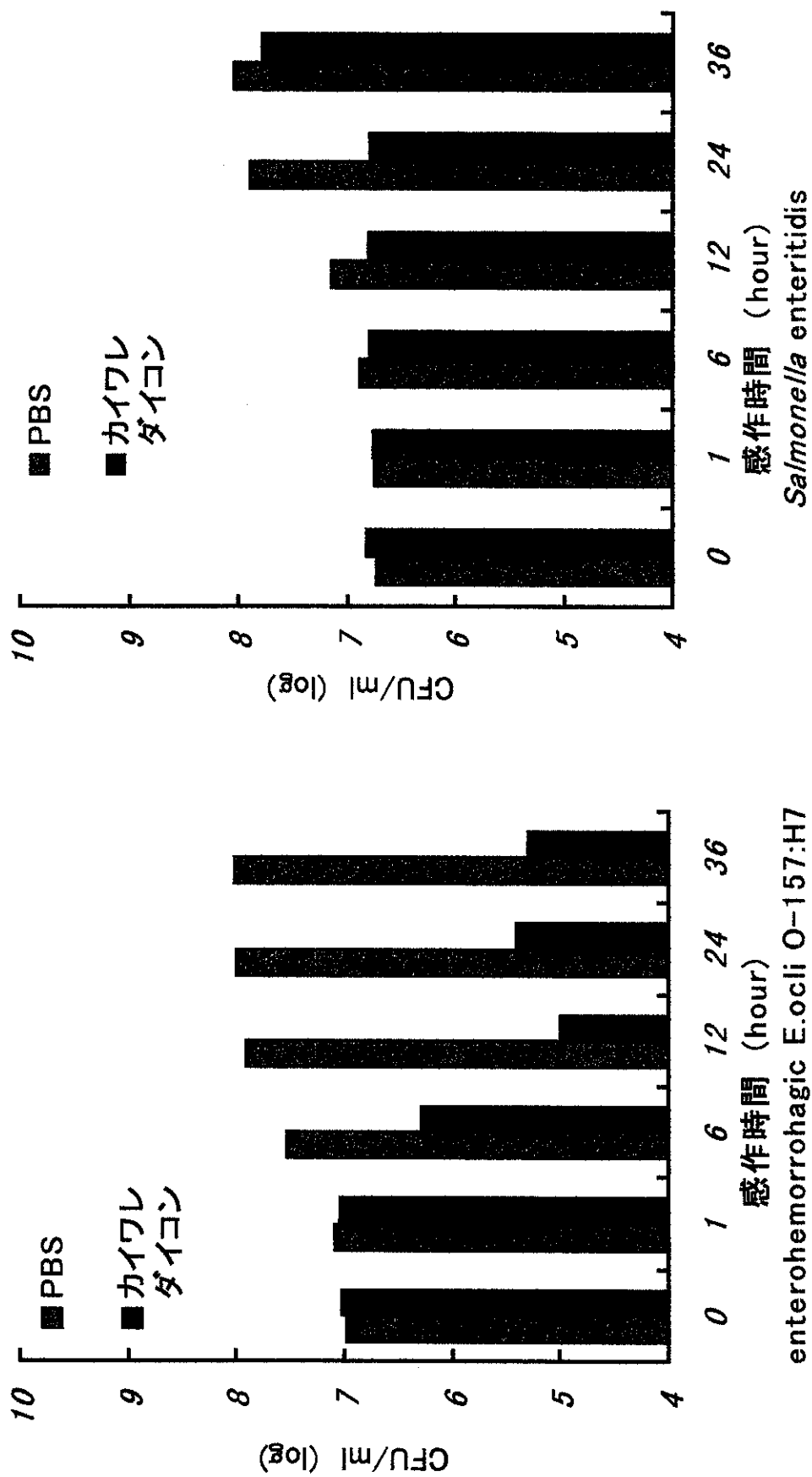


図1. カイワレダイコン抽出液に感作させた供試菌の発育の経時的変化

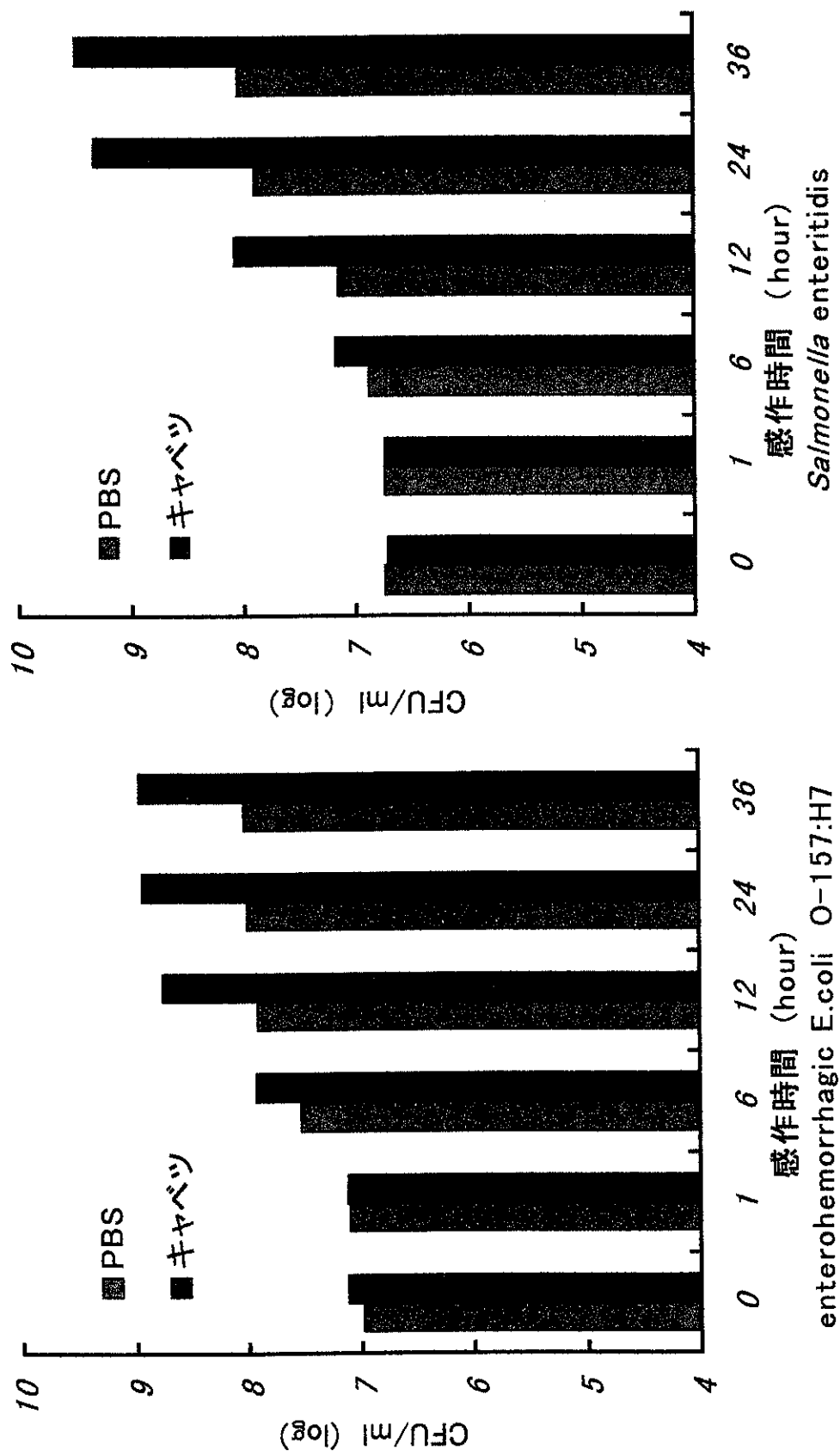


図 2.キヤベツ抽出液に感作させた供試菌の発育の経時的変化

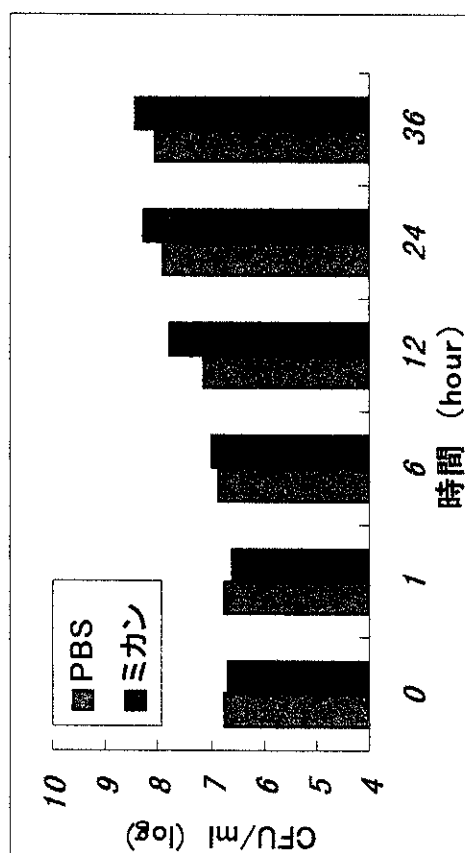
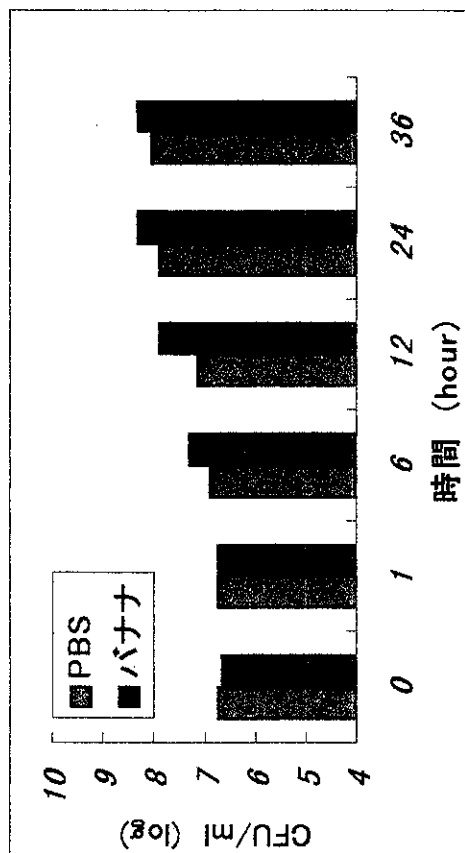
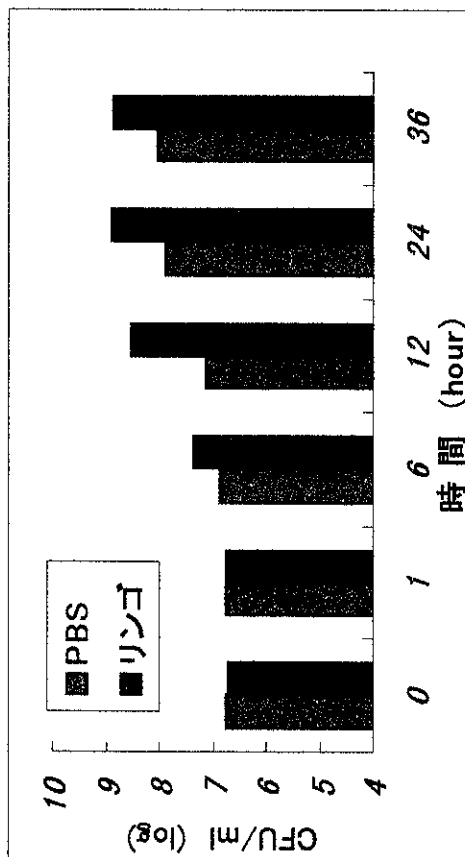
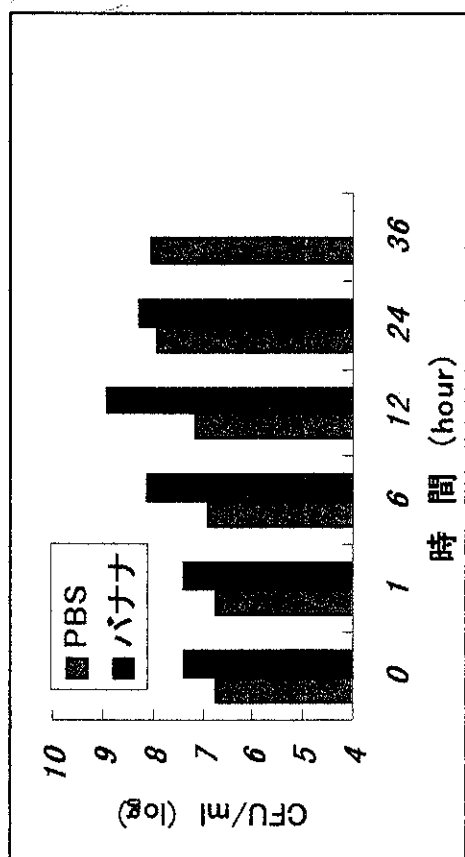


図3. 果物抽出液に感作させた供試菌の発育の経時的変化

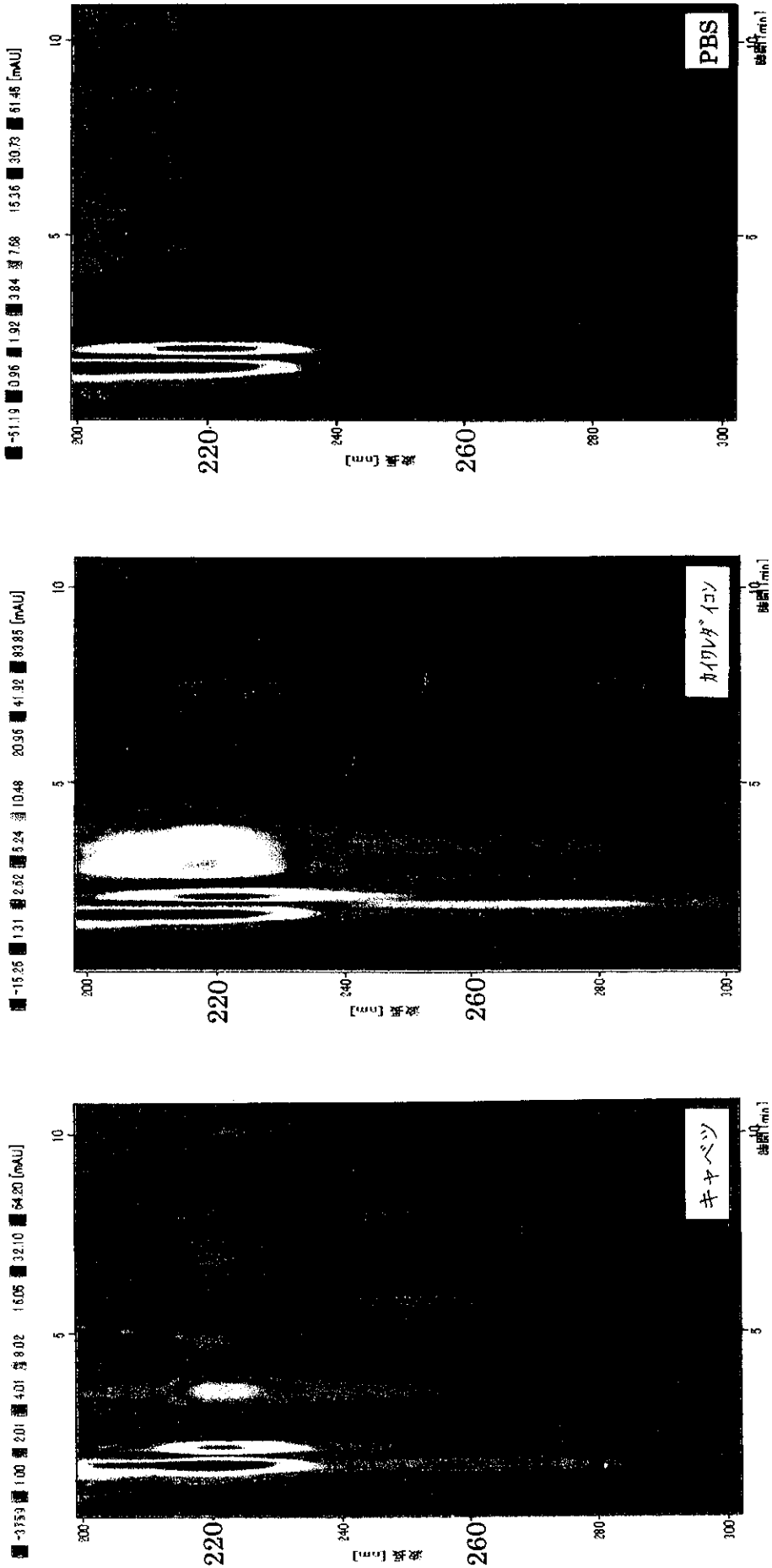


図4. 各抽出液におけるフォトダイオードアレイ検出等高線データ

分析条件

カラム : Mightysil RP-18 150-4.6 (5 μ m)

温度 : 30 $^{\circ}$ C

移動層 : メタノール / 酢酸 (pH 3) = 10 / 90 (v/v)

検出器 : フォトダイオードアレイ (195~650nm)

流量 : 0.5ml / min

測定波長 : 195~300nm

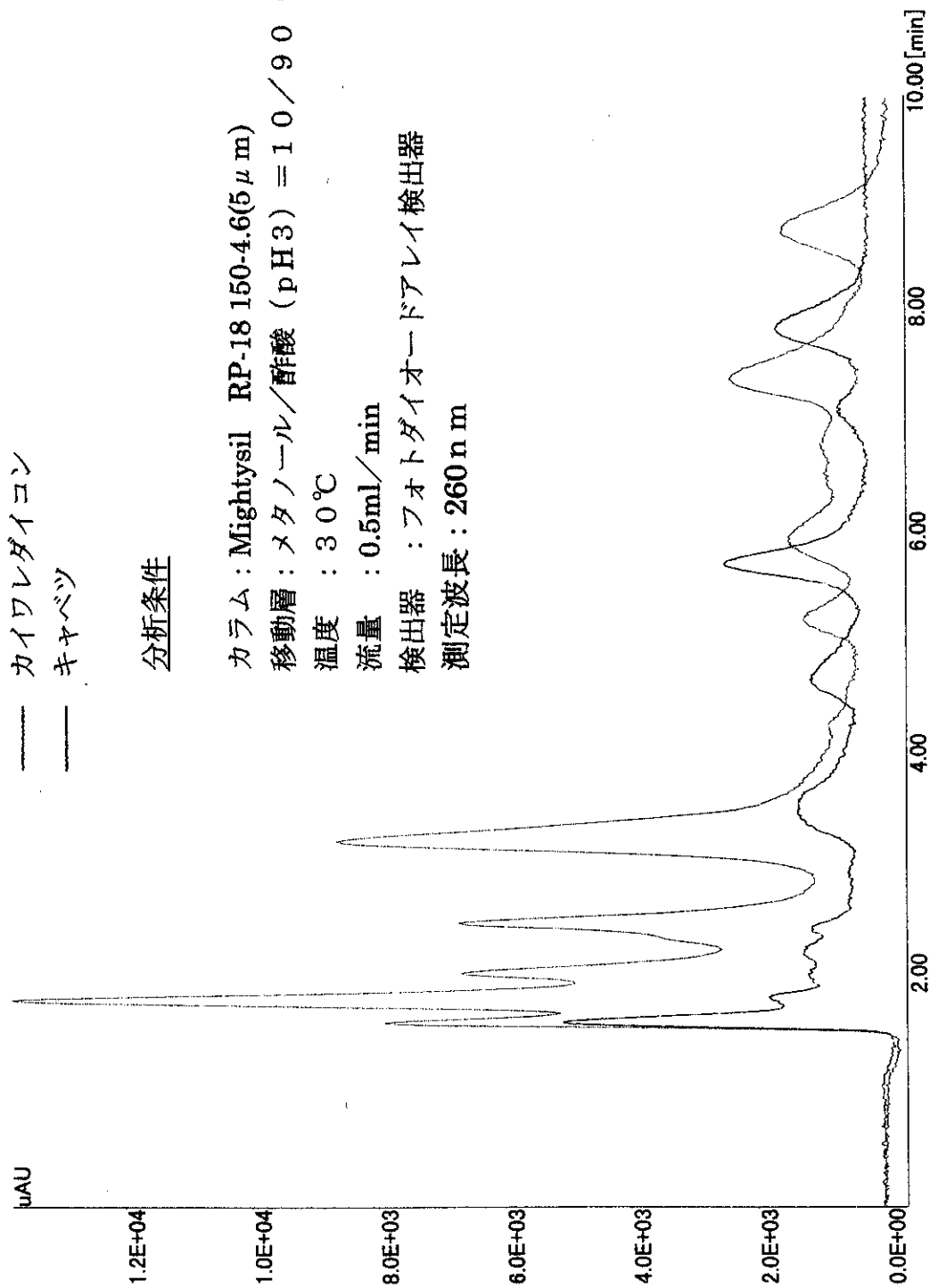


図5. HPLCによるカイワレダイコンおよびキヤベツ抽出液のクロマトグラム

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

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	国立感染症研究所ウイルス第二部
協力研究者	名取克郎 染谷雄一	国立感染症研究所ウイルス第二部
	栄 賢司、小林慎一	愛知県衛生研究所ウイルス部
	篠崎邦子	千葉県衛生研究所ウイルス科
	石古 博昭、橋本 修	三菱化学ピーシーエル研究第一部
	鎌田公仁夫	デンカ生研株式会社ウイルス試薬製造部

研究要旨 GenBank、EMBL、DDBJからノーウォーク様ウイルス（Norwalk-like viruses、NLVs）の配列を抽出し遺伝学的な多様性を解析しデータベースを更新した。わが国で分離されたNLVsのRNA依存性RNAポリメラーゼ領域の塩基配列を解読し、流行株の系統解析を行った。大部分がGenogroup II（GII）のCamberwell/Lordsdale/Bristol virusに類似の配列をもっていた。また、構造蛋白の5'末端のプライマーで増幅される領域の塩基配列解析によって、わが国でこれまでに解析されたNLVsは明確にGenogroup I（GI）の5種類とGIIの8種類に分類された。カキ中腸腺からも高頻度でNLVsの遺伝子が検出された。NLVs構造蛋白を発現するために、GIに属する4種類、GIIに属する7種類、合計11種類のウイルスで組換えバキュロウイルスを作製した。大量に産生された蛋白はウイルス様中空粒子（Virus-like particles、VLPs）の構造であった。11種類のVLPsについて、これらを抗原に用いた抗体検出ELISAを確立した。7種類のVLPsについて、これらを免疫して得られた高力価血清を用いた抗原検出ELISAを確立した。

A. 研究目的

ノーウォーク様ウイルス（Norwalk-like viruses、NLVs）による急性胃腸炎は1970年代初頭にその病原体が確認されたと言う意味で新興感染症の範疇の疾患である。NLVsは全世界に日常的に存在し、先進国、発展途上国を問わず小児を中心に毎年数百万人ないし数千万人の患者発生をみるありふれた疾患である。ウイルス性下痢症の中でも、わが国では1、2月をピークとするウイルス性急性胃腸炎が毎年全国的に発生して注目をあびてきている。夏期にピークをむかえる細菌性下痢症とは異なり、ウイルス性胃腸炎は12月から翌年3月の冬季に頻発するのが特徴である。日本において食中毒事件の約10%は非細菌性食中毒とされているが、RT-PCR法で患者糞便材料から遺伝子を増幅し塩基配列を調べてみると、大部分がNLVsによるものであることが判明してきた。ウイルス性食中毒として届け出があるときの患者はほとんどの場合大人で、しかも複数である。NLVsは冬季に報告が急増する小児のウイルス性

胃腸炎の原因ウイルスでもあるが、この場合は散発的に発生する。食中毒の場合には原因食品を推定することは従来行われてきたが、このウイルスは現在においても増殖させるための培養細胞系や実験動物系がないウイルスであるため、原因食品を特定するのが困難な状況がいまだに続いている。また、感染源となる食品中には極めて微量のウイルスしか含まれないため、患者糞便で用いられる電子顕微鏡法を用いることができない。したがって原因食品を迅速に特定するためには、食品中からNLVsを迅速かつ感度良く検出する方法を新たに確立することが急務の課題と考えられる。また患者糞便材料から増幅後、解析された塩基配列から、NLVsは大きくGenogroup I（GI）とGenogroup I（GI）の二つのグループに分かれ、それぞれには遺伝学的に異なる多数の株が存在していることが明らかになってきた。これらを迅速に検出するためには本ウイルスの遺伝学的、血清学的な多様性を解析する必要がある。一方、非細菌性胃腸炎の実態調査から、食中毒のかなりの部分