

## 6. その他

平成 11 年度国立感染症研究所レファレンス委員会、衛生微生物技術協議会レファレンス委員会、国立感染症研究所寄生動物部 発行の「クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル」には、患者検体を対象とした原虫（オー）シスト検出法が記載されている。方法論的には共通するところが多いので比較・参照していただきたい。なお、遺伝子診断法は「診断マニュアル」に一括して記載した。

### 参考資料

Food and Drug Administration, 1995. Bacteriological Analytical Manual (8<sup>th</sup> Edition).

## 『野菜等食材からの原虫類（オー）シストの検査法マニュアル』 の 評価

野菜等の表面に付着する原虫類の（オー）シスト検査においては、《食材表面の洗浄》⇒《洗浄液中の原虫検出》という要約すれば2つの工程が必要となり、具体的には多量の洗浄液の効率的な濃縮と（オー）シストの分離・精製がキーポイントとなる。一方、調理された食材からの（オー）シスト検出は多量のご飯残渣からの分離であることから、糞便検査の手法が応用可能と考えられる。本報告書では前者では連続ローターを用いた濃縮法とショ糖密度勾配遠心法ならびに蛍光抗体染色の組み合わせ、後者は酢酸エチル集嚢子法の応用を提案した。以下に、検査法マニュアル作成にあたり根拠となった基礎データ及び検査結果を報告する。

### 1. 超音波洗浄法

葉菜やイチゴ類などの表面洗浄には超音波洗浄器が適している。超音波洗浄法は食材の破砕を抑えて、すなわち食材由来の固形物（残渣）を最小限に抑えながら洗浄効果を上げることができる点である。水流ポンプやスターラーなどを用いた攪拌洗浄では食材同士、あるいは洗浄槽内壁との衝突から試料が破砕されて多量の固形成分が生成される。なお、本報告にデータとして示さなかったが、予備実験において超音波洗浄器による長時間（～60分）処理ではクリプトスポリジウム オーシストの形態や蛍光抗体染色性、あるいは脱嚢活性に影響を与えないことが確認されている。ただし、同じ超音波発生装置であっても棒（ペン）型の発生装置の使用は推奨できない。本装置は細胞破砕装置として設計されたもので、裸出した振動棒から強力な超音波が発振され、短時間でオーシストを破壊する。

超音波洗浄に要する時間は試料と洗浄液の量的比が影響する可能性はあるが、30分処理において高い回収率が得られた（後述の表2参照）。さらに長時間の洗浄により検出率の向上は認められないこと、また、過度の超音波処理を防ぐ意味からもおおむね30分程度が妥当と判断された。

### 2. 流水洗浄法

キャベツなど衝撃に対して比較的強い食材に適用可能な方法であるが、衝撃に耐えない食材への適用は避けるべきである。一例を示すと、オーシストを $10^6$ 個/100g葉となるようにキャベツの最外葉に分散して付着させ、室内にて約5時間あるいは1日放置したものを検体とした。洗浄液を上述の一連の処理方法で処理し、顕微鏡下で計測した。洗浄工程の水温を常温とした場合、平均で48%のオーシスト回収率を得た。一方、理由は不明であるが水温を50℃に上昇させた場合に回収率が10%にまで低下したことから、洗浄水の温度管理は重要となり得ることが示された。

### 3. 連続遠心法の妥当性

連続遠心は特殊な構造のローター（連続ローター）を使用し、回転しているローターに連続的に試料液を注入し、ローター内に沈渣を集め、上清（遠心力が負荷された後の試料水）は廃液として機外へ排出する装置である。条件設定を誤ると検査対象の粒子が上清とともに排出される恐れがあることから、（オー）シスト回収のための条件設定が必要である。そこで予備的にオーシストにはほぼ匹敵する形状及び比重のプラスチック粒子を代替粒子として用い、代替粒子の捕捉条件の設定を行った。

一般に遠心機内の質量  $m$  の粒子に負荷される遠心力  $F$  ( $\text{gcm/sec}^2$ ) は、回転軸を中心とした試料の回転角速度を  $\omega$ 、回転軸から試料までの距離（回転半径）を  $r$  ( $\text{cm}$ ) とすると、次式で表される。

$$F = m r \omega^2 = 1.117 \times m r n^2 \times 10^{-5} \text{g} \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここで  $n$  を 1 分間の回転数 ( $\text{rpm}$ ) とすれば、 $\omega$  は  $2\pi n/60$  に置換できる。

連続ローターの場合の回転負荷時間はローター内の滞留時間となり、試料水の注入速度に依存（反比例）する。従って、連続ローターでは内容積（ローター内に貯えられる液量）が小さくなることで試料の滞留時間が短くなるという点を考慮する必要がある。実際に、濁質を含んだ試料水をスイングローターおよび連続遠心ローターで遠心分離し、上清の濁度の変化を測定することで遠心力と濁質の沈殿効率について検討した。今回使用した連続ローターの最大半径は  $5.8\text{cm}$ 、内容積  $80\text{ml}$  であった。この連続ローターに試料水を  $333$ 、 $250$ 、および  $167\text{ml/min}$  ( $10\text{L}$  の試料水を遠心濃縮するのに要する時間がそれぞれ  $30$  分、 $40$  分、 $60$  分に相当) の流速で注入した場合、試料水がローター内で遠心力の作用を受ける時間は  $0.24$  分、 $0.32$  分、 $0.48$  分と計算される。

遠心力と遠心時間の積算値 ( $S$ ) をスイングローター、連続ローターそれぞれで計算し、積算値と上清濁度との関係を図-1 にプロットした。この図ではスイングローターと連続遠心ローターの結果を同時に表示したが、両者とも積算値と上清濁度の関係は同一曲線上に分布していることが示され、連続ローターにより負荷され遠心力は上記の (1) 式で計算できることが示された。そこでさらに、 $S$  の逆数の平方根と濁度との関係を検討したところ、相関係数  $0.97$  の直線となり、両者に強い相関関係があることが確認された (図-2)。すなわち、用いるローターの形状に関係なく  $S$  値と上清の濁度、すなわち粒子の沈降との相関が成立していることが示された。したがって、通常のスイングローターで検討したオーシストの沈降条件 ( $S$  値) に合わせて連続ローターの運転条件を設定することとした。

ところで、スイングローターを用いた実験結果では  $280\text{g}$  以上の遠心力が必要で、 $80\%$  以上の回収率が確保されることが示された (表 1)。これらの結果に従い、スイングローター

と同等の S 値 (2,800) を満たす連続ローターの運転条件を計算すると、333 ml/min の流速 (30 分で 10 L の処理) では 13,000rpm の回転数が必要であると算出された。

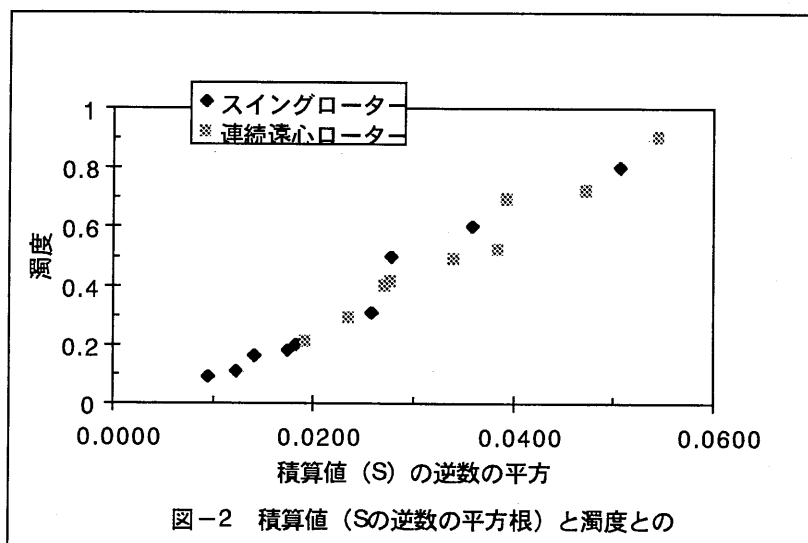
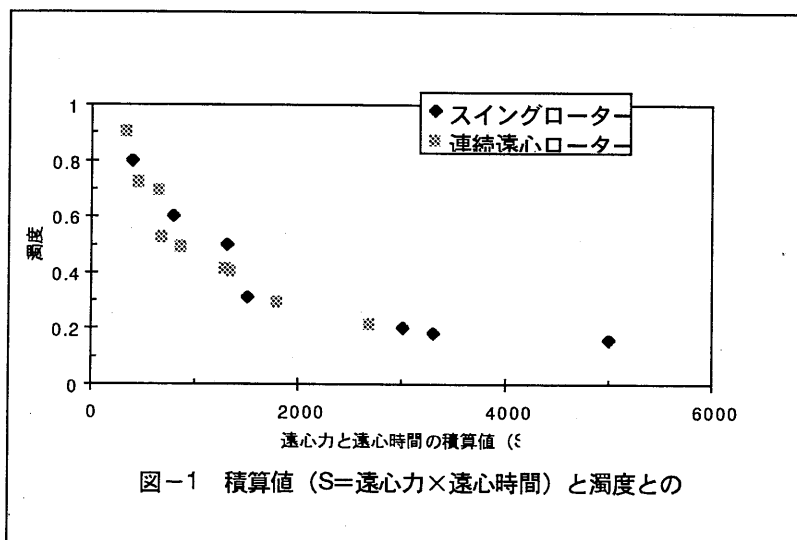


表1 スイングローターでの遠心力とオーシストの回収率

回転数 (rpm)	遠心力 (×g)	オーシスト数 (個/ml)	回収率 (%)
1,000	130	$1.8 \times 10^4$	64
1,500	280	$2.3 \times 10^4$	82
2,000	500	$2.5 \times 10^4$	89
2,500	790	$2.3 \times 10^4$	82
3,000	1,100	$2.4 \times 10^4$	86

代替指標のビーズを用いた回収実験では、安全側にシフトした運転条件を設定することとし、回転数を 13,000rpm、ローター内への送液量を 170ml/min に設定した。代替指標粒子は直径 5.0  $\mu$ m の蛍光ビーズ（蛍光色素（UVIT EX-EBR）標識のポリメチルメタアクリレートビーズ（PNMMA）；比重 1.19、綜研化学）を用いた。これを精製水に懸濁した試料水（ $1.2 \times 10^3$  個/ml、 $4.5 \times 10^2$  個/ml）を用意して、連続遠心の過程で排出液中に検出（漏出）される蛍光ビーズの数を継時的に測定した。その結果、表-2 に示したように蛍光ビーズの漏出は実験条件によって異なるものの遠心操作機関を通じて極めて少数で、平均で 0.6 ~7.2 個/ml と無視できる値であった。PNMMA ビーズの比重はオーシストよりも若干大きいことを考慮しても、十分な捕捉率が期待できるものと判断された。

表 2 連続ローターからの代替指標ビーズの漏出

		漏 出 ビ ー ズ	
		測定時期	粒子数 $\pm$ SD (/ ml)
実 験 1 ( $1.2 \times 10^3$ /ml)	0分*		1,194.4 $\pm$ 8.1
	3分		17.7 $\pm$ 8.7
	6分		10.4 $\pm$ 1.6
	9分		4.7 $\pm$ 0.8
	11分		7.2 $\pm$ 4.4
	平均		10.0 $\pm$ 6.4
実 験 2 ( $4.5 \times 10^2$ /ml)	0分*		442.6 $\pm$ 1.5
	3分		0.5 $\pm$ 0.7
	6分		1.0 $\pm$ 0.0
	9分		0.0 $\pm$ 0.0
	11分		1.0 $\pm$ 1.4
	平均		0.6 $\pm$ 0.8

\* 連続遠心操作に用いた試料水中の蛍光ビーズ数

実際のオーシストを用いた実験ではおおむね 70 - 80% の高い回収率を得た。典型例を示すが、予めイチゴ表面に *C. parvum* のオーシスト（ $1.5 \times 10^3$  個）を付着・乾燥させ、24 時間冷蔵庫保存したものを材料とし、超音波洗浄（7L の洗浄液使用）⇒ 連続遠心 ⇒ 蛍光抗体染色／微分干渉顕微鏡 観察 により検出を試みた。結果を表 3 に示したが、30 分以上の超音波洗浄によって高い回収率が得られた。

表 3 超音波処理と時間と *C. parvum* オーシストの回収率

実 験	超音波洗浄時間と回収率 (%)		
	10 min	30 min	60 min
1	56	80	80
2	65	88	67
3	51	64	62
平 均	57	77	70

予め連続ローターに高比重のショ糖液を加え、連続遠心とショ糖密度勾配遠心法を組み合わせた方法においても同様な回収率を得たが（表 4）、試料の回収操作が回収率に影響する傾向が見られ、回収率は 42 - 95 % と若干変動した。しかしながら、操作法への熟練度が増せば解決できる問題と考えられ、本方法は砂などの混入が多い試料に限らずすべての試料に適用可能と考えられた。本方法は遠心後の試料をただちに蛍光抗体染色に供することができる利点も備えている。ところで、現在市販されている連続ローターは小さなものでも内容積が 1,000ml 程度で、回収液の再沈殿が必要である。しかしながら、上述の連続遠心／ショ糖密度勾配遠心法の組み合わせを用いて（ショ糖液量を調整することで）、回収液量を減量することも可能と考えられる。

表 4 連続遠心とショ糖密度勾配遠心法を組み合わせた方法による  
*C. parvum* オーシスト回収実験

実験	添加オーシスト数	回収オーシスト数	回 収 率
1	15,000	11,460	76.4
2	5,000	3,241	64.5
3	5,000	4,760	95.2
4	68	30	44.1
5	102	51	50.0
6	102	43	42.2
7	102	61	59.8
平 均	-	-	61.7 (42-95)

#### 4. ポテトサラダからの（オー）シスト回収実験

調理の過程での汚染を想定して、サラダからの *C. parvum* オーシスト回収法を検討した。検査手技は 試料の粉碎（ペースト化）⇒ 洗浄液へ懸濁 ⇒ 酢酸エチル遠心法 ⇒ ショ糖密度勾配遠心法 ⇒ 蛍光抗体染色／微分干渉顕微鏡 観察 の工程とした。食材の一部は冷蔵／冷凍保存し、保存試料からの検出もあわせて検討した。

表 5 ポテトサラダからの *C. parvum* オーシスト回収試験（冷蔵庫保存試料）

実験	オーシスト 添加量/10 g	各保存期間における回収率 (%)				
		0日	1日	2日	3日	7日
1	124	78.2	68.5	69.3	-	-
2	110	113	75.5	71.8	-	-
3	92	85.1	96.7	-	-	43.1
4	143	69.5	-	-	62.0	57.3
平均	-	86.5	82.8	70.6	62.0	50.2

サラダなどを検査材料とした場合、オーシストの回収にあたっては多量の固形物（食物残渣）と油性成分への対策が要点と考えられる。したがって、検査法の開発にあたっては、油性成分に対しては試料液を酢酸エチルと懸濁すること、また、多量の食物残渣の排除にはショ糖密度勾配遠心法を採用した。

検出結果を表 5 および 6 に示したが、冷蔵あるいは冷凍保存した試料からのオーシスト検出は総じて良好で、本方法は十分に使用可能と判断された。原因は不明であるが試料の冷蔵保存の期間が長くなるのにつれて回収率が若干低下する傾向が見られた。この結果が単なる実験誤差なのかあるいは保存による損耗なのかは明らかではないが、冷凍庫保存試料での検出結果とあわせ考えれば、むしろこの程度の実験誤差が生ずるものと考えられた（表 6）。

表 6 冷凍保存ポテトサラダからの *C. parvum* オーシスト回収実験

実験	オーシスト 添加量/10 g	各保存期間における回収率 (%)				
		0日	1日	2日	3日	7日
1	105	107.3	43.2	-	-	69.8
2	66	71.2	71.2	-	-	44.4
平均	-	89.3	57.2	-	-	57.1

## 考 察

本研究事業において、食品からの原虫類（オー）シストの検査マニュアルの作成をおこなった。葉菜類やイチゴ類表面に付着する（オー）シストに関しては《超音波洗浄》⇒《連続遠心法による洗浄液の濃縮》⇒《ショ糖密度勾配遠心法による分離・精製》⇒《蛍光抗体法による特異染色》⇒《顕微鏡観察》という一連の操作法が優れているものと判断された。マニュアルに沿った検査結果では総じて高い回収率が示された（表 2、3）。ここで示された回収率は米国 FDA の編集による《Bacteriological Analytical Manual (8<sup>th</sup> Ed.)》と比較して、格段の回収率となっている。相違点を比較すると Bacteriological Analytical Manual では当初の洗浄液に界面活性剤を約 7.6% ホルマリン水（2.5% formaldehyde）に添加した液を用いていること、密度勾配遠心法ではフェノール入りのショ糖高比重液（Sheather's fluid）を用いていること、および染色液としてヨード-ヨードカリ染色（Lugol's iodine）を用いている点である。洗浄液にホルマリン水を用いるのは検査担当者に対するバイオハザード対策と考えられるが、ホルマリンの固定作用は原虫類の（オー）シストを他の夾雑物に付着固定する作用がある。染色法として Lugol's iodine は多くの原虫類（オー）シストや寄生虫卵を染色することは知られているが、同時に夾雑物も染色され、褐色の背景の中で褐色に染まった小さな粒子（（オー）シスト等）を分別するのは非常に難しい作業である。

これに対して当該マニュアルでは蛍光抗体染色を用いており、この点が格段の検出力の向上につながっているものと判断される。ちなみに、クリプトスポリジウム、ジアルジアに対する蛍光抗体試薬は市販されており、購入可能である（検査試薬として未承認のため、保険適用外）。また、他の原虫類に対する蛍光抗体染色試薬は販売されていないものの、サイクロスポラ、イソスポラのオーシストは自家蛍光を発することから同じく蛍光顕微鏡による観察が可能である。赤痢アメーバのシストについては DAPI 染色により、シスト内の核（4核）が蛍光顕微鏡下で明瞭に観察できる。当該マニュアルでは操作の煩雑さ、特に遠心操作の繰り返しを避ける目的で連続遠心機を使用しているが、これも回収率の向上につながっているものと考えられる。すなわち、遠心操作を繰り返せば、回収率が 100% でない限り、回収率の低下に通じる（例えば、回収率 90% であっても、5 回の反復で回収率は  $0.9^5 = 0.59$ （59%）に低下）。すなわち、作業工程の簡素化はそれだけで回収率の向上につながるものと考えている。なお、本研究事業では単純に比重 1.20 のショ糖液を用いて密度勾配遠心法を行っており、フェノール添加の Sheather's fluid の使用結果との比較は行わなかった。また、ポテトサラダからの分離実験において、冷蔵（凍）保存試料からの回収率は 43.2~82.8%（表 5、6）と、実験により測定誤差が見られたが、手技の問題とするよりも検査方法への熟練により向上がはかれるものと判断している。



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）

研究要旨

- (1) 市販生野菜から分離されCT-SMAC培地上で腸管出血性大腸菌O157とコロニー形態の類似する細菌群の検索・同定と新たなO157選択分離培地の考案

市販の生鮮野菜より大腸菌O157分離用免疫磁気ビーズによって捕捉され、CT-SMAC培地上でO157ではないが、これと同様のコロニー性状を示す細菌について、その生化学性状、薬剤感受性等を明らかにし、菌種の同定を試みた。その結果、分離された総計37株の内、12株は糖発酵性細菌、25株は糖非発酵性細菌であった。前者で同定された主な菌は*Enterobacter*属、後者では*Pseudomonas*属の菌であった。またラテックスを用いての凝集テストですべての菌株が非特異的凝集を示した。他方、糖非発酵性細菌の大半が嫌氣的培養条件で発育が抑制された。16種の薬剤に対する感受性試験の結果より、上記の分離菌株全てが感受性で、かつ対照のO157菌株（20株）が全て非感受性であるような薬剤は認められなかったが、別途行った試験では没食子酸に対して多くの分離株が感受性を示した。この所見より、新たに没食子酸を添加したSDS寒天培地を考案し、菌増殖の有無を調べた結果、対照のO157菌株は増殖したが大半の分離菌株（特に糖非発酵菌株）の増殖が阻止された。本培地がCT-SMAC培地に代わる新たなO157選択分離培地として有用であることが示された。

- (2) レタスに実験的に接種されたサルモネラの回収方法の検討および市販野菜におけるサルモネラの汚染状況

野菜からのサルモネラの検出方法を確立するため、硫化水素産生および非産生サルモネラを実験的に野菜に接種し、わが国の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（BPW）、選択増菌培地としてRappaport-Vassiliadis broth（RV）、選択分離培地としてDouble modified lysine iron agar（DMLIA）およびスルファピリジン添加Brilliant green（BGS）を使用する方法が最も回収率が高かった。また、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の回収率が最も高かった。

市販の生で食する野菜417例について上記の方法により、サルモネラの検出を試みたが、すべて陰性であった。

(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

腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの検出法に関して、主にPCRでの検出を検討した。さらにO157のStx (Shiga toxin)2産生遺伝子の一部およびそれに続く下流域に関し遺伝子配列を検討した。野菜と果物等のO157とサルモネラの検出方法として、BPWによる24時間培養後の一括PCRでの判定により、少数菌あるいは選択培養液では発育の遅いあるいは生育できない菌でも検出できるものとする。

(4) 生食用野菜からの腸管出血性大腸菌O157の検出に関する研究

生食用野菜からの腸管出血性大腸菌O157の検出のために有用な増菌培地および分離培地の検討を試みた。

増菌培地としてチオグリコール酸ナトリウム加PBWを、分離培地としてCT-SMACを用いた組み合わせが、検出率が最も高かった。

前年度報告した分離培地CT-SSMACと市販のCT-SMAC上に出現する集落を比較検討した。CT-SSMACでは、CT-SMACでO157の検出の障害となる無色集落を形成する菌株の出現が、半数の検体で発育を阻止された。

(5) 堆肥有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究

発酵製造過程10日目の検体に下痢原生大腸菌O146:H21、原材料コーン、大豆ダストから組織侵入性大腸菌O28ac:HUT、屠場汚泥から下痢原生大腸菌O125:H19および毒素原生大腸菌O8:HUTが検出された。これらのことから、野菜、果物等に用いる堆肥の製造、生産においては十分な発酵および十分な発酵熱が必要であることが強調される。

(6) 有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について

各種有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子の保有について調べた。

VCM (バンコマイシン) およびTEIC (テイコプラニン) の高度耐性遺伝子Van Aを保有する腸球菌 (VRE) が検出された。今後、これらの菌株の生野菜、果物等への二次汚染も否定できず、生野菜、果物のVREの実態調査が必要である。

(7) PCR法による食品および糞便中の病原性Yersinia enterocolitica検出に関する研究

PCR法による食品および糞便中の病原性Yersinia enterocolitica検出方法の有効性について基礎的検討を試みた。プライマーハ細胞付着性遺伝子ailが最も効果的であった。病原性Yersinia enterocoliticaは6時間増菌培養後、 $10^{3.5}$ 個/ml存在すればPCR法で検出可能である。

## 研究協力者 研究報告書

## 市販生野菜から分離されCT-SMAC培地上で腸管出血性大腸菌O157とコロニー形態の類似する細菌群の検索・同定と新たなO157選択分離培地の考案

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：市販の生鮮野菜より大腸菌O157分離用免疫磁気ビーズによって捕捉され、CT-SMAC培地上でO157ではないが、これと同様のコロニー性状を示す細菌について、その生化学性状、薬剤感受性等を明らかにし、菌種の同定を試みた。その結果、分離された総計37株の内、12株は糖発酵性細菌、25株は糖非発酵性細菌であった。前者で同定された主な菌は *Enterobacter* 属、後者では *Pseudomonas* 属の菌であった。またラテックスを用いての凝集テストですべての菌株が非特異的凝集を示した。他方、糖非発酵性細菌の大半が嫌氣的培養条件で発育が抑制された。16種の薬剤に対する感受性試験の結果より、上記の分離菌株全てが感受性で、かつ対照のO157菌株（20株）が全て非感受性であるような薬剤は認められなかったが、別途行った試験では没食子酸に対して多くの分離株が感受性を示した。この所見より、新たに没食子酸を添加したSDS寒天培地を考案し、菌増殖の有無を調べた結果、対照のO157菌株は増殖したが大半の分離菌株（特に糖非発酵菌株）の増殖が阻止された。本培地がCT-SMAC培地に代わる新たなO157選択分離培地として有用であることが示された。

## A. 研究目的

様々な食品検体からの腸管出血性大腸菌O157(以下O157と略)の選択分離平板としてはソルビトール加マッコンキー培地に垂テルル酸およびセフィキシムを添加した培地（CT-SMAC培地）が一般の検査室で使用されている。近年、より効率的な選択分離を目指した酵素基質含有の新しい平板培地（Chromoagar, Rainbow agar等）が開発され市販されるようになったが、これら培地はコスト面での問題があるため、その使用に関して通常の検査ルーティンに安易に組み込めない現状である。またこれらの培地を駆使しても平板状でO157とコロニー形態の類似する紛らわしい菌が増殖し、依然として検査効率向上の大きな障害となっている。

本研究初年度（平成10年度研究報告参照のこと）で我々はCT-SMAC培地に変わる新しい培地、SDS培地を考案し、この培地で形成されたO157コロニーはCT-SMAC培地上で形成されたコロニーよりも抗O157抗体との特異的凝集が明瞭に確認できることを示した。しかしながら、同培地を用いて生野菜検体について調べると、上記と同様にO157ではないがそのコロニー形態が非常に類似した菌が頻繁に分離されることも経験し、考案されたSDS培地についてその選択性・識別性に依然として改良すべき必要が確認された。本研究2年度（平成11年度研究報告参照のこと）で、研究協

力者の藤沢ら（文献1）は従来のCT-SMAC培地にサリシンおよび4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトピラニドを添加しO157に対するコロニー識別性を向上させたCT-SSMAC培地を考案したが、糖非発酵性のオキシダーゼ陽性菌（例えば *Pseudomonas* 属）の増殖が依然として野菜検体からのO157の検出を妨げていることを報告している（文献2）。

そこで今回の研究では我が国で生食される頻度の高い生鮮野菜検体（貝割れ大根・サニーレタス・キャベツ）より免疫磁気ビーズで捕捉され、かつCT-SMAC平板上でO157と類似するコロニー形態を示す細菌を分離し、それらの形態および生化学性状を調べ同定を試みた。さらに分離株について各種抗生物質およびフェノール酸の一種である没食子酸に対する感受性テストを行い、その結果より得られた知見よりSDS培地に改良を加えた新たな選択平板培地を考案したので報告する。この感受性テストの項目に没食子酸を加えた理由は、反芻獣のルーメンから分離された大腸菌が植物に含まれる没食子酸などの多種のフェノール酸・タンニン等に特異的な耐性を示すことが近年報告されたこと（文献2）にヒントを得、牛のルーメンに頻繁に生息するとされるO157も同様の耐性を有するのではないか？という可能性に着目したからである。

## B. 研究方法

### 1) 菌の分離

平成12年4月10月の期間において国内で店頭市販されている貝割れ大根6検体、サニーレタス3検体、キャベツ3検体より菌の分離を試みた。滅菌したカップに検体約10gを入れ、滅菌したハサミで細分・攪拌した後100mlの緩衝ペプトン水 (Buffered Peptone Water、以下BPWと略) を加え、37°Cにて8時間静置し増菌培養した。

培養後、培養液を滅菌したマイクロ遠心管に1ml分注し、Dynabeads O157 (Dyna社) の免疫磁気ビーズ法を用いて標的細菌の捕捉を行った。捕捉・濃縮された検液 (50 $\mu$ l) をソルビトールマッコンキー培地 (オキソイド社) に亜テルル酸カリウム (2.5mg/L) およびセフィキシム (0.05mg/L) を添加して作製したCT-SMAC培地に塗布し、37°Cにて18時間培養した。培養後、各平板よりO157のコロニーと類似した灰白色コロニーを最大3個任意に釣菌しこれを分離株とした。また生鮮野菜のO157の二次汚染の原因となりうる物質、すなわち国内の河川水4検体と牛新鮮糞便8検体についても同様の分離処置を行った。ただし河川水検体については10mlを100mlのBPWに加えて37°Cにて8時間増菌し、また牛検体については糞便1gをそれぞれ100mlのBPWに加えて37°Cにて6時間増菌した培養液を用いた。

### 2) 対照菌株

分離菌株とO157との性状の差異を比較検討するために、人糞便由来のO157の6株、牛糞便由来の6株、食品およびふき取りサンプル由来の8株、計20株 (A-T株) を供試した。なお分離菌株、対照菌株の保存にはハートインヒュージョン寒天培地 (栄研化学/以下HIAと略) を用いた。

### 3) コロニーおよび菌形態・染色性

CT-SMAC平板上での分離菌株のコロニーの色調・形状を肉眼にて観察するとともに、グラム染色にて菌株の染色性および形態を光学顕微鏡 (倍率 $\times$ 1000) にて観察した。

### 4) 分離菌株の性状確認および同定

HIAで培養した新鮮分離菌株をTriple Sugar Iron寒天斜面培地 (日水製薬/以下TSIと略) に接種し、37°Cにて18時間培養した。培養後、TSIの高層に黄変の確認されたものは、糖発酵性の菌として市

販の腸内細菌同定キット、API20E (ピオメリュ社) に供試した。一方TSIの高層・斜面部いずれも黄変しなかったものは、糖非発酵性の菌として市販の非腸内細菌同定キット、API20NE (ピオメリュ社) に供試した。菌の運動性についてはBPWに接種した後、可視的に混濁が確認される程度まで増殖した培養液を用いて懸滴法の顕微鏡観察 (倍率 $\times$ 400) にて確認した。これらの同定キットで決定された性状成績をAPI社提供のコンピューター同定システム入力し菌種の同定を試みた。また菌株をHIAに接種したものをアネロパック (三菱ガス化学) にて嫌気培養 (37°Cにて $<$ 72時間) して、菌の嫌気条件での増殖能を確認した。さらに分離菌株のO157との抗原交叉の有無をO157抗体で感作したラテックスと未感作ラテックスのキット (オキソイド社) にて確認した。

### 5) 薬剤感受性テスト

ディスク法を用いて分離菌株および対照O157菌株の薬剤感受性を調べた。供試した薬剤ディスク (栄研化学/KBディスク) は下記のごとくの16種類であった。

クラブラン酸・アモキシリン (ACV)  
セフィキシム (CFI)  
セフスロジン (CFS)  
ホスホマイシン (FOM)  
アンピシリン (ABP)  
セフェゾリン (CEZ)  
セフトジジム (CAZ)  
ゲンタマイシン (GM)  
シプロフロキサシン (CIP)  
スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST)  
カナマイシン (KM)  
テトラサイクリン (TC)  
トブラマイシン (TOB)  
クロラムフェニコール (CP)  
エリスロマイシン (EM)  
バンコマイシン (VCM)

なお、本試験に使用した平板培地はミューラーヒントンII寒天培地 (BBL社) であった。

### 6) 没食子酸感受性テスト

没食子酸 (和光純薬・一水和物/Gallic acid; 以下GAと略) の濃度が50mM, 25mM, 12.5mMと3段階に異なるリン酸緩衝液 (pH 6.0) を作製し、これらの水溶液に抗生物質検定用のペーパーディスク (東洋濾紙/厚手直径8mm) を浸し、ディス

ク周囲の余液を十分除いたものを上記の薬剤感受性テストと同様に調整された各菌液 (McFarland標準濁度0.5)を塗布したミューラーヒントンII寒天培地 (BBL社) に置き、37°Cにて18時間培養した。培養後、ディスクの周囲に形成された増殖阻止帯の有無を観察した。

#### 7) 選択分離培地の検討

分離菌株および対照O157菌株をBPWにて37°Cにて18時間培養した後、その1白金耳を下記の組成で作製された3種の寒天培地に塗抹接種し37°Cにて20時間培養し、培養後の増殖の有無および集落性状を観察した。

##### 培地I: Salicin+ SDS 寒天培地

"ラブレムコ" 粉末 (オキソイド社)	5g
酵母エキス (オキソイド社)	5g
ポリペプトン (BBL)	10g
NaCl	5g
ソルビトール	5g
サリシン	5g
0.02% ブロムチモールブルー溶液	20ml
0.02% フェノールレッド溶液	20ml
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.2g
寒天	15g
精製水	960ml
(pH 7.2)	

上記培地を加熱溶解した後、約55°Cに冷やし、亜テルル酸カリウム2.5mg/Lおよびセフィキシム0.05mgを添加し、混和後平板として固めた。

##### 培地II: Acidified Salicin+ SDS 寒天培地

培地IからフェノールレッドおよびブロムチモールブルーのpH指示薬を添加せず、pHを6.0に調整し、平板として固めた。

##### 培地III: Acidified GA+Salicin +SDS 寒天培地

培地IIにGA溶液を50mM/Lの最終濃度になるように添加したものを平板として固めた。(没食子酸溶液は8M/LのNaOH溶液予めpH 6.0に調整して、培地が約55°Cに冷した時点で添加した)。

### C. 研究結果

#### 1) 菌分離状況

免疫磁気ビーズ法によって捕捉され、CT-SMAC平板上で灰白色コロニーを形成する菌株が供試したすべての生野菜検体および河川水検体から分離

された。一方、牛の新鮮糞便8検体からはそのようなコロニー性状の菌株は全く分離されなかった。分離された菌のCT-SMAC平板上でコロニーの外観は、O157菌株コロニーと非常に類似するものから、灰白色様に見えるがコロニーサイズが明らかに微小なものまでであった(図1)。

#### 2) 分離菌株の形態・生化学性状および同定

すべての検体からの分離株中TSI培地にて糖発酵性であった23菌株(野菜由来株12株、河川水由来株11株)の生化学性状およびAPI20Eによる同定結果を表1aにまとめた。また糖非発酵の25菌株については表1bにまとめた。分離された菌株はすべてグラム陰性桿菌であった。

糖発酵性の野菜由来12株中、API20Eによってその属・種が同定されたのは7株で、その内訳は *Enterobacter agglomerans*, *Ent. sakazakii*, *Acinetobacter calcoaceficus*, *Aeromonas hydrophilla*であった。河川水由来11株中で同定されたのは10株で *Ent. sakazaki*, *Ent. cloacae*, *A. hydrophilla*, *Vibrio fluminalia*であったが、同定不可のものは1株だけであった。糖非発酵性の野菜由来25株中、API20NEによってその属・種が同定されたのは14株で、その内訳は *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. aureofaciens*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Flavobacterium indologenes*, *Ochrobacterium anthropi*であった。河川水4検体から糖非発酵性の菌株は全く分離されなかった。

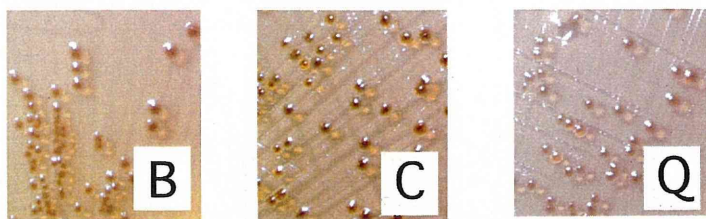
野菜由来のすべての分離株は抗O157血清で感作したラテックスだけでなく未感作のラテックスをも凝集し、非特異的凝集能があることが判明した。また河川水由来の11株中9株が同様の非特異凝集能を示した。糖発酵性の分離菌株すべてが嫌氣的培養条件でも旺盛なる増殖を示したのに対して、糖非発酵性の分離株の大半が増殖不能あるいは微弱な増殖を示した。

#### 3) 分離菌株の薬剤感受性

分離菌株および対照O157菌株の16種の薬剤ディスク周囲の増殖阻止円の直径を2mmごとに区分けして表2にまとめた。分離菌株の中には対照菌株よりも薬剤に対してより感受性である菌株もあったが、その逆に対照菌株よりも強い耐性を示すものも多々あり、分離菌株の株個々の各種薬剤に対する感受性が対照菌株よりもより広範であることが判明した。CT-SMAC平板の添加薬剤であるCFI

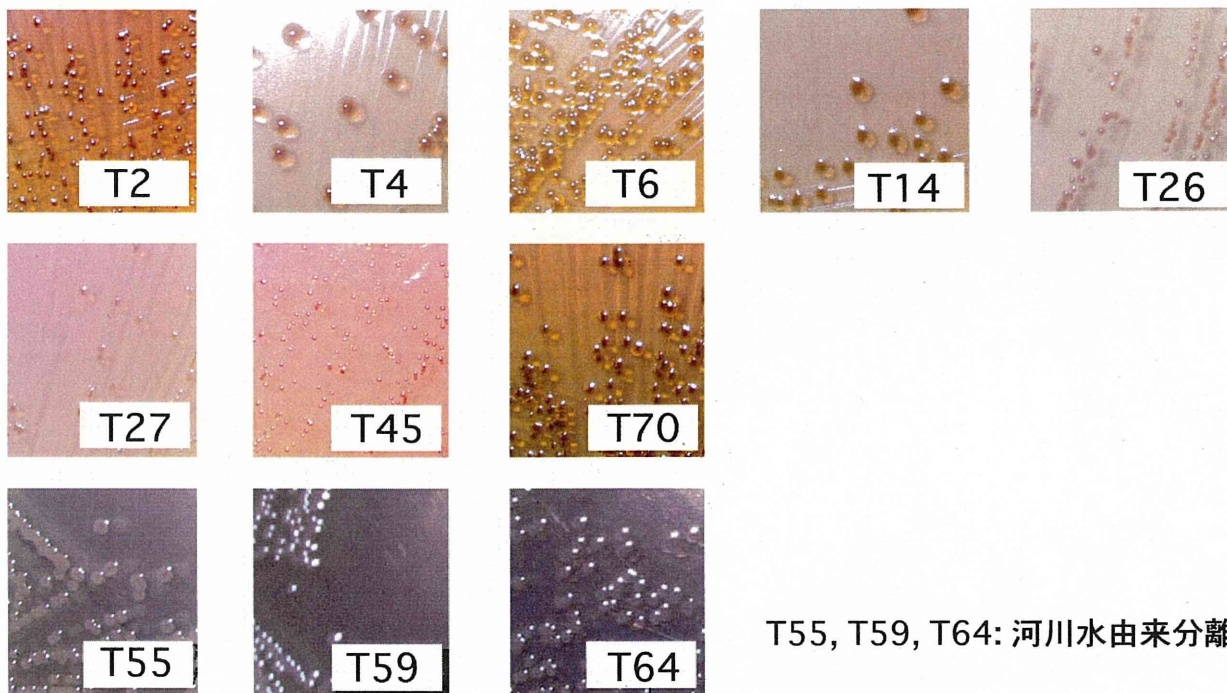


## *E. coli* O157:H7



B: 人糞便由来分離株  
C: 食品由来分離株  
Q: 牛糞便由来分離株

## 糖発酵分離菌株



T55, T59, T64: 河川水由来分離株

## 糖非発酵分離菌株

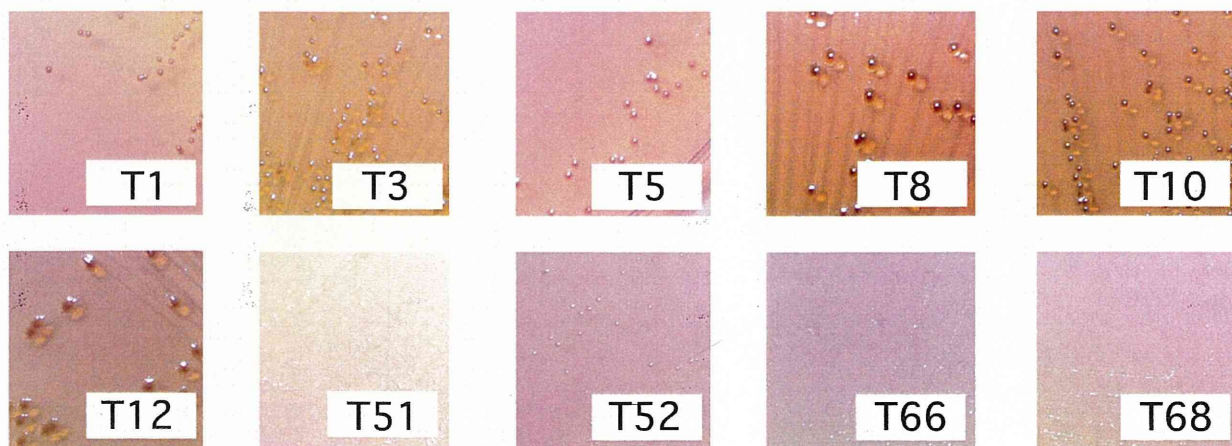


図1. CT-SMAC平板上に形成された大腸菌O157, 生鮮野菜および河川水由来分離株のコロニー形態

表 1 a. 生鮮野菜および河川水検体より分離された糖発酵性細菌群の性状

菌株番号	検体品目	検体番号	CT-SMAC 上での コロニー 形態	グラム 染色性	菌 形態	TSI での 性状	API 20 Eでの性状																				ラテックス 非特異的凝 集の有無	嫌気培養 条件下 での増殖							
							ON PG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA			OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF-O	OF-F
T2	RS	RS1	⊙g	-	桿菌	-/AG	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Hafnia alvei</i>	+	+	
T4	RS	RS2	⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	unidentifiable	+	+
T6	RS		⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	unidentifiable	+
T14	RS	RS5	⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+
T26	RS	RS6	⊙mw	-	桿菌	A/A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>Act. calcoaceticus</i>	+	+	
T27	RS		○c	-	桿菌	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Ent. agglomerans</i>	+	+	
T29	RS		⊙g	-	桿菌	A/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Ent. agglomerans</i>	+	+	
T45	SL	SL1	○c	-	桿菌	A/A	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	<i>Ent. sakazakii</i>	+	+	
T70	C	C3	⊙g	-	桿菌	-/A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CDC enteric group 41	+	+	
T71	C		⊙g	-	桿菌	-/A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CDC enteric group 41	+	+	
T72	C		⊙g	-	桿菌	-/A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	CDC enteric group 41	+	+	
T73	C		⊙g	-	桿菌	-/A	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>Ent. agglomerans</i>	+	+	
T54	R	R1	⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>Ent. sakazakii</i>	+	+		
T55	R		⊙mp	-	桿菌	A/A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>Vibrio flumiialia</i>	+	+	
T56	R	R2	⊙mp	-	桿菌	A/A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	<i>Vibrio flumiialia</i>	+	+	
T57	R		⊙mp	-	桿菌	A/A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	<i>Vibrio flumiialia</i>	+	+	
T58	R		⊙mp	-	桿菌	A/A	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Vibrio flumiialia</i>	+	+	
T59	R	R3	⊙mw	-	桿菌	A/A	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	<i>Ent. cloacae</i>	+	+		
T60	R		⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+		
T61	R	R4	⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	<i>Vibrio flumiialia</i>	+	+		
T62	R		⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+		
T63	R		⊙g	-	桿菌	A/A	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+		
T64	R		⊙g	-	桿菌	A/A	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	unidentifiable	+	+	
0157(A~T)			⊙g	-	桿菌	A/A	+	-	±	±	-	-	-	±	-	-	+	+	-	-	±	±	±	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>	-	+	

左表の表記注釈

検体品目: RS, 貝割れ大根; SL, サニーレタス; C, キャベツ; R, 河川水  
コロニー形態:

- ◎, 直径0.5mm以上、中心部に黒色の芯を有するよう見えるコロニー
- , 直径0.5mm以下、水滴状コロニー
- g, 灰白色; mw, 乳白色; mp, 薄桃白色; c, 透明

TSIでの性状: A/AG, 斜面部・高層部共に黄変、ガス産生

A/A, 斜面部・高層部共に黄変

-/A, 高層部のみ黄変

-/-, 斜面部・高層部共に黄変せず

API20Eでの性状:

ONPG:  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 / ADH: アルギニンジヒドロラーゼ活性 /  
LDC: リジンデカルボキシラーゼ活性 / ODC: オルニチンデカルボキシラーゼ活性 /  
CIT: クエン酸の利用性 / H<sub>2</sub>S: 硫化水素産生 / URE: ウレアーゼ活性 /  
TDA: トリプトファンデアミナーゼ活性 / IND: インドール産 /  
VP: アセトイン産生 / GEL: ゲラチナーゼ活性

以下の糖からの酸産生

GLU: ブドウ糖; MAN: D-マンニトール; INO: イノシット;

SOR: D-ソルビトール; RHA: L-ラムノース; SAC: 白糖; MEL: D-メリビオース;

AMY: D-アミグダリン; ARA: L-アラビノース

OX: オキシダーゼ

NO<sub>2</sub>: 硝酸塩の亜硝酸塩への還元能 / N<sub>2</sub>: 硝酸塩の窒素ガスまでへの還元能

MOB: 運動性

McC: マッコンキー培地での増殖

OF-O: ブドウ糖の酸化的分解能 / OF-F: ブドウ糖の嫌氣的発酵能

Identification: 同定結果 (API LABソフトによる / 85%以上が「acceptable identification」);  
属名略称 Aci.; *Acinetobacter* / Ent.; *Enterobacter*

ラテックス非特異的凝集: オクソイド社製O157感作ラテックスおよび  
未感作ラテックスのいずれも凝集

嫌気培養条件下での増殖: ハートインヒュージョン寒天培地にて37°C、  
48時間培養後の菌の増殖で判定

+\*: 培養24時間後に後れて酸産生

±: O157株 (A~T)で成績が不定のもの





左表の表記注釈

API2ONEでの性状:

NO<sub>3</sub>: 硝酸塩の還元

TRP: インドール産生

GLU: 酸化的分解能

ADH: アルギニンジヒドロラーゼ活性

URE: ウレアーゼ活性

ESC: エスクリン加水分解能

GEL: ゼラチン加水分解能

PNG: β-ガラクトシダーゼ活性

以下の糖・有機酸等の同化能

GLU: ブドウ糖; ARA: L-アラビノース; MNE: D-マンノース;

MAN: D-マンニトール; NAG: N-アセチル-D-グルコサミン;

MAL: マルトース; GNT: グルグルロン酸カリウム; CAP: n-カプリン酸;

ADI: アビジン酸; MLT: d1-リンゴ酸; CIT: クエン酸ナトリウム;

PAC: 酢酸フェニル

OX: オキシダーゼ

MOB: 運動性

注) 他の表記は前表と同様

表 2. 分離菌株と対照O157菌株の薬剤感受性分布表 (ディスク法による)

阻止円の直径 (mm)	ACV		CFI		CFS		FOM		ABP		CEZ		CAZ		GM		CIP		ST		KM		TC		TOB		CP		EM		VCM	
	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157	0157	non-0157		
阻止円無し	13		14	2	3	7	1	26	31			1					9	1	3	2	1	5		9	20	42						
<8	5		2		2	2		1	3	1										1		1	3	4								
<10	2		2	12	7	2		2	1							1						3	7	6	3							
<12	4		4	4	11	6		2							1							3	8	8								
<14	5		1	2	3	2		3	1	1	1										2	1	1	5								
<16	1	4		3		6	5	3	9		2	1	3	1	3			1	1	4		4	1	5	4	1	7					
<18	4		1	2		8	1	2	11	1		3	1	4	5	10			4	4	4	2	4	7	2		2		3			
<20	14	5	8	7		3		2	4	3	2	7	2	4	10	7	1	2	9	11	7	11	11	6	5	1						
<22	1	4	8	6		1	6	1			2			6	4	4	2	2	3	2	6	11	10	4	10	3	5		3			
<24	3	3	3		1	9	5			9		3	10		3		7		9	1	8	4	6		4	6	3		3			
<26	3		4		3	4	2			7		7	7		7		8	5	1		5	2	3			7	8					
<28						2	1					5	5				4	8	5			4			4	1						
<30						3						1	1	1	3	6	2	3	1	2		2		2	2	2						
<32						1							2				4	7	1			3	3	3	3	1						
<34												1	1	2	1	1					2			1								
<36						2							2	9	5								2		4							
<38						1							3	2	3				3													
>40						3							3	1	6		4					5		4								

(セフィキシム: 5 $\mu$ g力価) に対して対照菌株より感受性の高い分離株が4株であったのに対して、CFS(セフスロジン: 30 $\mu$ g力価) に対して対照菌株よりも強い感受性を示した分離菌株が22株あったこと、またABP(アンピシリン: 10 $\mu$ g力価) の薬剤ディスクに対して感受性を全く示さなかったものが1株、同様にTC(テトラサイクリン: 30 $\mu$ g力価) の薬剤ディスクについて3株あったことを付記する。

#### 4) 没食子酸(GA)に対する感受性

50mM/Lの濃度のGA溶液を二倍段階希釈しその4段階の濃度溶液を含むディスク周囲の増殖阻止円の有無を、対照O157菌株群、糖発酵性分離菌株群、糖非発酵性分離菌株群に区分して表3に示した。対照菌株群については試みられたいかなる没食子酸濃度に対しても増殖抑制は見られなかったが、50mM/Lの濃度のディスクの周囲で糖発酵性分離菌株群ではその半数近い菌株、また糖非発酵細菌群では3株以外のすべての菌株に明かな増殖阻止が認められた。

#### 5) GA・サリシン添加SDS寒天培地の選択性

CT-SMAC培地と今回供試された3種の改変SDS寒天培地(培地I, 培地II, 培地III)での対照O157菌株群、糖発酵性分離菌株群、糖非発酵性分離菌株群の増殖の有無を表4にまとめた。培地Iでは糖発酵性分離菌株の1株、非発酵性分離菌株の2株の増殖が阻止された以外、対照菌株も含めすべての菌株で増殖が認められた。なお糖発酵性分離菌株で本培地に増殖したもののコロニーの色調は黄色であった。このことよりこれらの分離菌株はサリシンを分解して酸を産生する性状を持つものであることが確認された。

培地IのpHを6.0まで下げた培地IIでは糖発酵性分離菌株で新たに1株、非発酵性菌株で新たに2株の増殖阻止が認められた。培地IIにGAを50mM/Lの濃度で添加した培地IIIでは糖発酵の大半の株が、また非発酵分離菌株群の株は全て増殖抑制された。これに対して対照O157菌株群のすべての菌株がこの培地で増殖した。

培地III上で形成されたO157株および糖発酵性分離菌株のコロニー自体の色調は灰白色で、コロニー形態による両者の識別は困難であったが、コロニー密集部分の培地背景色の顕著な黒変がO157株に、中程度の黒変がT70, T71, T72, T73に、また褐変がT4, T6, T54, T59株に認められた(図2)

#### D. 考察

供試された生野菜、河川水、牛糞便のいずれの検体からもO157は全く分離されなかったが、CT-SMAC平板上でO157のコロニーと外観が類似するものは多数分離された。分離菌株では*Enterobacter*および*Pseudomonas*属の菌が頻りに分離されたが、その分類学的に未知の菌も分離された。菌の分布において興味深い点は糖発酵性の野菜由来分離株と河川水由来分離株に共通な菌種(*Aeromonas*属、*Enterobacter*属等)が見られること、また牛の糞便からはそのような菌が全く分離されなかったことである。限られた検体数での所見ではあるが、野菜に付着する細菌群は牛の糞便由来ではなく、河川水や下水に由来する細菌群であると推測される。

分離菌株の大多数に共通した性状は抗原・抗体反応と関係なくラテックスを凝集する、すなわち「粘着性」の強いことである。菌分離にあたって免疫磁気ビーズ法が用いられたわけであるが、この粘着性によってその抗原性とは無関係にO157抗体で感作した磁気ビーズに菌が吸着されたものと考えられる。

糖非発酵性の分離菌株の多くが嫌気条件で増殖抑制されることは、検体の前増菌培養に嫌気的な培養法を採用することの有用性(平成11年度研究報告参照のこと)を改めて支持する所見であるが、嫌気培養によって糖発酵性の夾雑細菌の増殖を抑制することはできない。この技術的問題を解消すべく研究協力者である藤沢・山井ら(神奈川県衛生研究所)は先ず野菜検体を嫌気的に増菌培養し糖非発酵の菌の増殖を抑制した上で、この培養液をO157に対するコロニー識別性を向上させたCT-SSMAC培地(従来のCT-SMAC培地にO157は分解できないが*Enterobacter*属の菌の多くは分解して酸を産生するサリシンを添加したもの)に接種する方法を推奨している(平成11年度研究報告参照のこと)。

今回行った薬剤感受性テストの結果では、対照O157菌株群と分離菌株群とを明確に仕分けする適当な薬剤を見出すことはできなかった。しかしながらCT-SMAC培地に添加されているセフィキシムよりもセフスロジンに対して分離株がより高い感受性を示したことから、前者の薬剤の代りに後者の薬剤をSMAC培地に添加するか、あるいは両者を添加した培地をすることによってより高い選択性が期待できるかもしれない。