

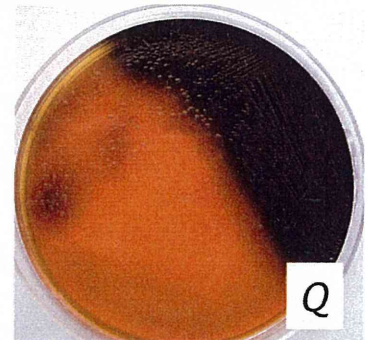
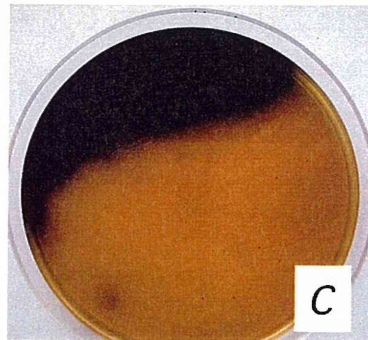
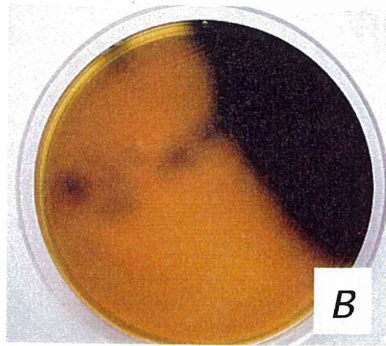
表 3. 分離菌株および対照O157菌株の各種濃度の没食子酸 (GA)
ディスク周囲の増殖阻止円の有無

大腸菌O157				糖発酵性細菌群				糖非発酵性細菌群			
菌株 番号	GAディスク濃度(mM)			菌株 番号	GAディスク濃度(mM)			菌株 番号	GAディスク濃度(mM)		
	12.5	25	50		12.5	25	50		12.5	25	50
A	-	-	-	T2	-	+	+	T1	-	+	+
B	-	-	-	T4	-	-	-	T3	-	+	+
C	-	-	-	T6	-	-	-	T5	-	+	+
D	-	-	-	T14	-	-	+	T7	-	-	+
E	-	-	-	T26	-	-	-	T8	-	-	-
F	-	-	-	T27	-	-	-	T10	-	-	-
G	-	-	-	T29	-	-	+	T11	-	-	+
H	-	-	-	T45	-	-	-	T12	-	-	+
I	-	-	-	T70	-	-	-	T13	+	+	+
J	-	-	-	T71	-	-	-	T15	-	+	+
K	-	-	-	T72	-	-	-	T28	-	+	+
L	-	-	-	T73	-	-	-	T30	-	-	-
M	-	-	-	T54	-	-	-	T46	-	+	+
N	-	-	-	T55	-	+	+	T47	-	+	+
O	-	-	-	T56	-	+	+	T48	-	+	+
P	-	-	-	T57	-	+	+	T49	-	+	+
Q	-	-	-	T58	-	+	+	T50	-	+	+
R	-	-	-	T59	-	-	-	T51	-	+	+
S	-	-	-	T60	-	+	+	T52	-	+	+
T	-	-	-	T61	-	-	+	T53	-	+	+
				T62	-	-	+	T65	-	+	+
				T63	-	+	+	T66	-	+	+
				T64	-	-	-	T67	-	+	+
								T68	-	+	+
								T69	-	+	+

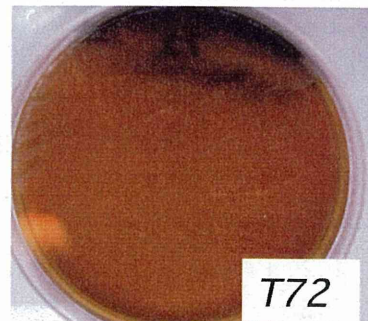
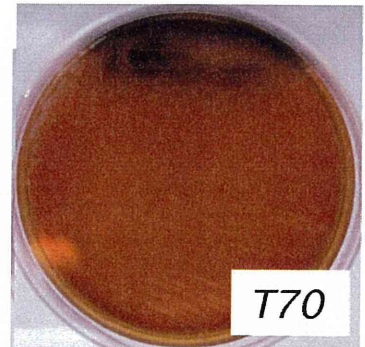
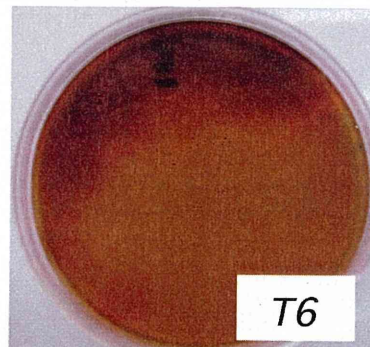
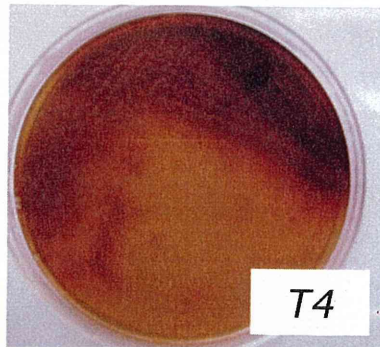
表 4. 各種選択平板培地での菌増殖の有無

大腸菌O157					糖発酵性細菌群					糖非発酵性細菌群				
菌株 番号	選択平板培地				菌株 番号	選択平板培地				菌株 番号	選択平板培地			
	CT- SMAC	培地I	培地II	培地III		CT- SMAC	培地I	培地II	培地III		CT- SMAC	培地I	培地II	培地III
A	+	+	+	+	T2	+	+	+	-	T1	+	+	-	-
B	+	+	+	+	T4	+	+	+	+	T3	+	+	+	-
C	+	+	+	+	T6	+	+	+	+	T5	+	-	-	-
D	+	+	+	+	T14	+	+	+	-	T7	+	+	-	-
E	+	+	+	+	T26	+	-	-	-	T8	+	+	+	-
F	+	+	+	+	T27	+	+	+	-	T10	+	+	+	-
G	+	+	+	+	T29	+	+	+	-	T11	+	+	+	-
H	+	+	+	+	T45	+	+	+	-	T12	+	+	+	-
I	+	+	+	+	T70	+	+	+	+	T13	+	+	+	-
J	+	+	+	+	T71	+	+	+	+	T15	+	+	+	-
K	+	+	+	+	T72	+	+	+	+	T28	+	-	-	-
L	+	+	+	+	T73	+	+	+	+	T30	+	+	+	-
M	+	+	+	+	T54	+	+	+	+	T46	+	+	+	-
N	+	+	+	+	T55	+	+	+	-	T47	+	+	+	-
O	+	+	+	+	T56	+	+	+	-	T48	+	+	+	-
P	+	+	+	+	T57	+	+	+	-	T49	+	+	+	-
Q	+	+	+	+	T58	+	+	+	-	T50	+	+	+	-
R	+	+	+	+	T59	+	+	+	+	T51	+	+	+	-
S	+	+	+	+	T60	+	+	+	-	T52	+	+	+	-
T	+	+	+	+	T61	+	+	-	-	T53	+	+	+	-
					T62	+	+	+	-	T65	+	+	+	-
					T63	+	+	+	-	T66	+	+	+	-
					T64	+	+	+	-	T67	+	+	+	-
										T68	+	+	+	-
										T69	+	+	+	-

E. coli O157株



生野菜由来分離株



河川水由来分離株



図2. 没食子酸/サリシン添加/Acidified CT-SDS培地上に増殖したコロニーと背景培地色調の変化

GAディスクを用いた感受性試験では糖発酵性分離株、非発酵性分離株共に増殖阻止されたが、後者においてより強い感受性が示された。この傾向はGAを添加したSDS培地での分離菌株の増殖の可否にも反映され、糖非発酵性分離株にいたってはまったく増殖しなかった。対照的に供試されたO157菌株（20株）すべてが本培地で増殖した。

培地Ⅲに添加したGA溶液は低いpH（pH5.5~6.0以下）で淡褐色であるが、pHが上がるに従って酸化が急速に進行し、茶褐色から緑色、黒色を呈する性状を持っている。したがって培地色を安定させるため培地初発pHを6.0に調整したものをを用いた。GA感受性の菌の増殖は選択的に阻止され、またサリシン・ソルビトールを分解できないO157の様な菌では培地周辺のpHがアルカリ側に向かい速やかに黒変する。他方上記の糖を分解・酸産生する菌であればコロニー周辺の培地のpHは低く保たれGAの酸化が抑制されるため培地色の黒変は遅延される。培地Ⅲはこのような仕組みで考案された新しいO157選択分離培地である。

本培地は*Pseudomonas*属等の細菌の増殖を阻止する点でCT-SMAC培地より高い選択性が認められた。本培地に添加されたGAはアルカリ域において酸化され易いため強い還元力を持つ試薬である。したがってこの物質を添加した培地中の溶存酸素は非常に低いことから上記の選択性が表れたものと考えられる。しかしながら本培地でGA耐性でサリシン・ソルビトール発酵する菌とO157菌株が混合した場合、コロニーの色調・形態による両者の識別が本培地では依然として難しいという問題が残った。この問題点を解消すべく今後は両者の生化学性状の差異についてより詳細に検索し、本培地を改良する必要があると思われる。他方、対照菌株として供試したO157の20株すべてがGAに対して耐性を示したことは、翻ってO157がGAを含むタンニン成分の濃度の高い牛のルーメン環境に適応している可能性を示しており、今後この点についてもさらなる検討が望まれる。

D. 参考文献

文献1) Nelson, K.E., Thonney, M. L., Woolston, T. K., Zinder, S. H., and Pell, A. N. (1998). Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (10): 3824-3830.

文献2) Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S., and Shimada, T. (2000). Modification of sorbitol MacConky medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (4): 3117-3118.

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

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、さらに、最も回収率の高い検出方法を用いて市販野菜におけるサルモネラの検出を試み、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。

3) 市販の生で食する可能性のある野菜417例についてG法及びH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。

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、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。さらに、サルモネラの回収に最も優れた検出法を用いて市販の野菜におけるサルモネラの汚染状況の解明を試みた。

B 研究方法

1. 回収方法の検討

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℃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℃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℃24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MLCB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℃で18~24時間培養した。培養後のEEMをSC15mlおよびSBG15mlに1.5mlずつ接種し、43℃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℃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℃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℃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。

2. 市販野菜におけるサルモネラ検出法

1) 供試材料：供試材料として、1999年9月から2000年10月まで東京都内及び多摩地区の百貨店、スーパーマーケットおよび農家から生で食する可能性のある野菜417例(ニンジン71例：うち有機栽培のもの26例、ダイコン66例：うち有機栽培・泥つき30例、

ナガネギ48例：うち泥つきのもの24例、レタス28例、キャベツ25例、ナガイモ・ヤマイモ・ヤマトイモ22例、サラダ用ホウレンソウ16例、サニーレタス、キュウリともに13例、ミツバ12例、セロリ、タマネギともに11例、カイワレダイコン9例、バンノウネギ、ショウガともに8例、サニーレタス、サンチュともに7例、パセリ6例、クレソン、オオバ、レッドキャベツそれぞれ5例、ピーマン、ミョウガともに4例、セリ、コマツナ、ルッコラ、ツマミナそれぞれ2例、アルファルファモヤシ、グリーンリーフ、ズキニ、モロヘイア、ワケギそれぞれ1例)を購入した。購入に際しては、1店・1日・1野菜種を1材料とした。培養材料としてダイコン、ニンジン、ナガネギなどの野菜を洗わずに、表面を中心に10gを採取した。

2)サルモネラ検出方法：培養材料10gをBPW90mlに接種して35℃で18~24時間培養した。培養後のBPW0.5mlをRV10mlに接種し、42℃で20~24時間培養した。培養後のRVの1白金耳をDMLIAおよびBGSに塗抹、36℃で20~24時間培養し、接種菌の同定は定法に準じて行った。

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10⁴/ml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 $10^3\sim 10^6$ CFU/gと $10^6\sim 10^7$ CFU/gのレタスに分けて示したものである。生菌数 $10^3\sim 10^6$ CFU/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。 $10^6\sim 10^7$ CFU/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 $10^3\sim 10^6$ CFU/gおよび $10^6\sim 10^7$ CFU/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。

次にサルモネラの回収率が最も高かったG法及びH法により市販の野菜417例、特に生で食する可能性のある野菜を対象に泥などで表面や表皮が汚染されている部分を中心に検出を試みたが、すべて陰性であった。

D 考察

レタスに接種したサルモネラの回収を検出した結果、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、 $10^3\sim 10^6$ 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。

また、市販野菜については、有機栽培あるいは泥つき野菜などの細菌汚染の高度なものも対象に入れて、サルモネラの検出を試みたが、全て陰性に終わっていることから日本の野菜におけるサルモネラの汚染の程度はかなり低いと考えられた。

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)}

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	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 ^{a)} × 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 ⁵ 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	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			
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10³~10⁵ CFU/gでは4回試行、ただしE、Fは2回。生菌数10⁶~10⁷ CFU/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： 腸管出血性大腸菌 O157(O157 と以下略)とサルモネラの検出法に関して、主に PCR での検出を主な検討の対象とした。さらに、O157 の Stx (shiga toxin) 2 産生遺伝子の一部及びそれに続く下流域に関し遺伝子配列を検討した。

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ものと思われていた。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討した。

また、カイワレ大根種子の DNA 抽出液より、O157 病原因子の遺伝子配列を検討した。

B. 研究方法

今回は野菜の洗い水に注目して、洗い水における両菌、及びリステリアの一括検査法を検討した。各洗い水は、三つの病院の給食施設での洗い水槽の液を採取した。その検査法は本年度にいたるまでに検討した方法を元にして決定した。(図参照) また、PCR での検討は今まで、O157、サルモネラとリステリアそれぞれの相当するプライマプライマーを用いて行っていた。今回は検査法の迅速簡便化をすすめるために、一括

PCR 検査法の取り入れについて検討を行った。一括 PCR を行うために、プライマーを annealing 温度が 55°C で行えるものを中心に選定した。O157 プライマーとして、TaKaRa の EVC-1/2, サルモネラはプライマーとして TaKaRa SIN-1/2 を使用した。それぞれバンドは 171 と 378 bp のバンドが出現すれば、陽性の結果である。PCR サイクルとしては、denature 94°C, 30 秒間、annealing 55°C, 30 秒間、extension 72°C, 30 秒間を 35 サイクル、その後 72°C, 7 分間後に PCR を終了して、4°C で保存とした。

実際の洗い水検体は 3 つの病院の給食施設より採取した。

また、O157 の Stx2 産生遺伝子とその下流域の DNA 塩基配列についての検討を行った。さらに、O157 の O 抗原性因子 orf2 についての解析も行った。1995 年産カイワレ大根種子より抽出した DNA 溶液を検討検体とした。

C. 研究結果

プライマー同士を混合させた PCR 混合液で反応を行っても、それぞれに次のような検出感度を得た。O157 で 2.3×10^4 , サルモネラで 2.7×10^5 cfu/ml であった。これらのことより、BPW による 24 時間培養

を行えば、PCR 検出によって十分な感度が得られることが分かった。

実際に検討を行った3施設の結果では全て陰性の結果であった。(表参照)

また、カイワレ種子の抽出液からBP933W(アメリカ1982年食中毒事件の起因菌から引き出されたバクテリオファージ)と同様の配列が一部並んでいることが分かった。ただし、塩基配列の確定できたものは長さにおいては *stx2* の一部とその下流域の約180 bp 分だけであった。また、O157のO抗原特異遺伝子 *orf2* は、検出は困難であったが、一部194 bp だけ塩基配列が一致している抽出DNA液を見いだした。種子が収穫されてから2年後のDNA液の抽出とさらに3年間の4℃での抽出液の保存と検体の状態はあまり良くなかったため、短い塩基配列しか確認できなかったと思われる。

D. 考察

O157とサルモネラについて果物及び野菜について検出法の検討を行った。提案した検出法でのPCR検出法は、BPW(buffered peptone water)での24時間培養を行うことにより、両菌株とも発育が妨げられている冷凍処理した菌やVNC(viable but non-culturable)状態に近いと考えられる野菜や果物に付着した場合においても検出可能であろうと考えられる。しかしながら、この検査方法によって検討した267果物および野菜検体において1検体もO157とサルモネラは検出されなかった。日本のスーパーや市場にでてくる野菜はO157やサルモネラ汚染が進んではいないことを意味していると思われる。ただし、後述するが、私どもと同方式での他研究所

の検査結果でサルモネラが検出されてきたことや、結果に示したようにカイワレ種子抽出液からO157の病原性因子の産生遺伝子 *stx2* が検出されたことと *orf2* の配列の一部が確認産れたことなどを考えると両菌による汚染は低いけれど常に存在すると思えなくてはならない。同時に検査している一般生菌数と大腸菌検査においても平均1g当たり10の7乗個一般生菌数であることのほかに、10の8乗個の一般生菌数を持つものや、大腸菌も冬場で10%、夏場で13.3%の検出率であった。このことから、今のところはO157とサルモネラの汚染率は低いけれど、将来に検出率が増加する衛生上の素地があるように思われる。

さらに、PCRと培養分離検出法を比較検討すると、培養分離検出法では、検体25g中に1個でも菌があれば、2次選択培養後には正しい判定が肉眼的に可能であった。けれども、2次選択培養には時間も、費用も、手間もかかることから、BPW24時間培養後のPCR結果を待って、2次選択培養を行うかどうかを判断する方法も今後検討の価値があると思われる。1999年頃、FDAにおいて野菜等の調査で、培養の後にイムノクロマトで判定し、そこで陰性の結果であったものはそれで検査を終了するという話を担当者の一人から伺った。イムノクロマトの検出感度も $10^{4.5}$ であることを考えるとBPW24時間培養後のPCR判定も妥当であると思われる。イムノクロマトは、1検体1,000円位で、2種類で2,000円となり、一括PCRとすれば、より経済的であるとも考えられる。

洗いや水の調査においては、全て陰性であり、洗いや水に期待した、濃縮された菌液は

とらえることができなかった。PCR での結果も同様に陰性であった。ただし、他研究所における同じ protocol による結果において、40 の洗浄水検査でサルモネラ (*Salmonella Infantis*) が大根とゴボウの洗浄槽から検出されたことより、検出方法として洗浄槽の水を検査する方法も間違いではなかったと思われる。洗浄水槽での洗い方は、流水を用いており、水槽の栓がしてあった訳であるが、底に菌が沈んでいると言うことはなかったと思われる。また、野菜を洗う場合には、土などが付いているものでは、栓をしていない水槽で最初に洗い流してしまった後に、栓を閉めて、水をいっぱいにしてから流水で洗うという手順であり、洗浄効果があった検体を採取したものである。

E. 結論

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、少量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と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yukiko Hara-Kudo, Michiko Miyahara
and Susumu Kumagai:

Loss of O157 Antigenicity of
Verotoxin-Producing *Escherichia coli*
O157:H7 Surviving under Starvation
Conditions

Appl. Environ. Microbiol., 66,
5540-5543 (2000).

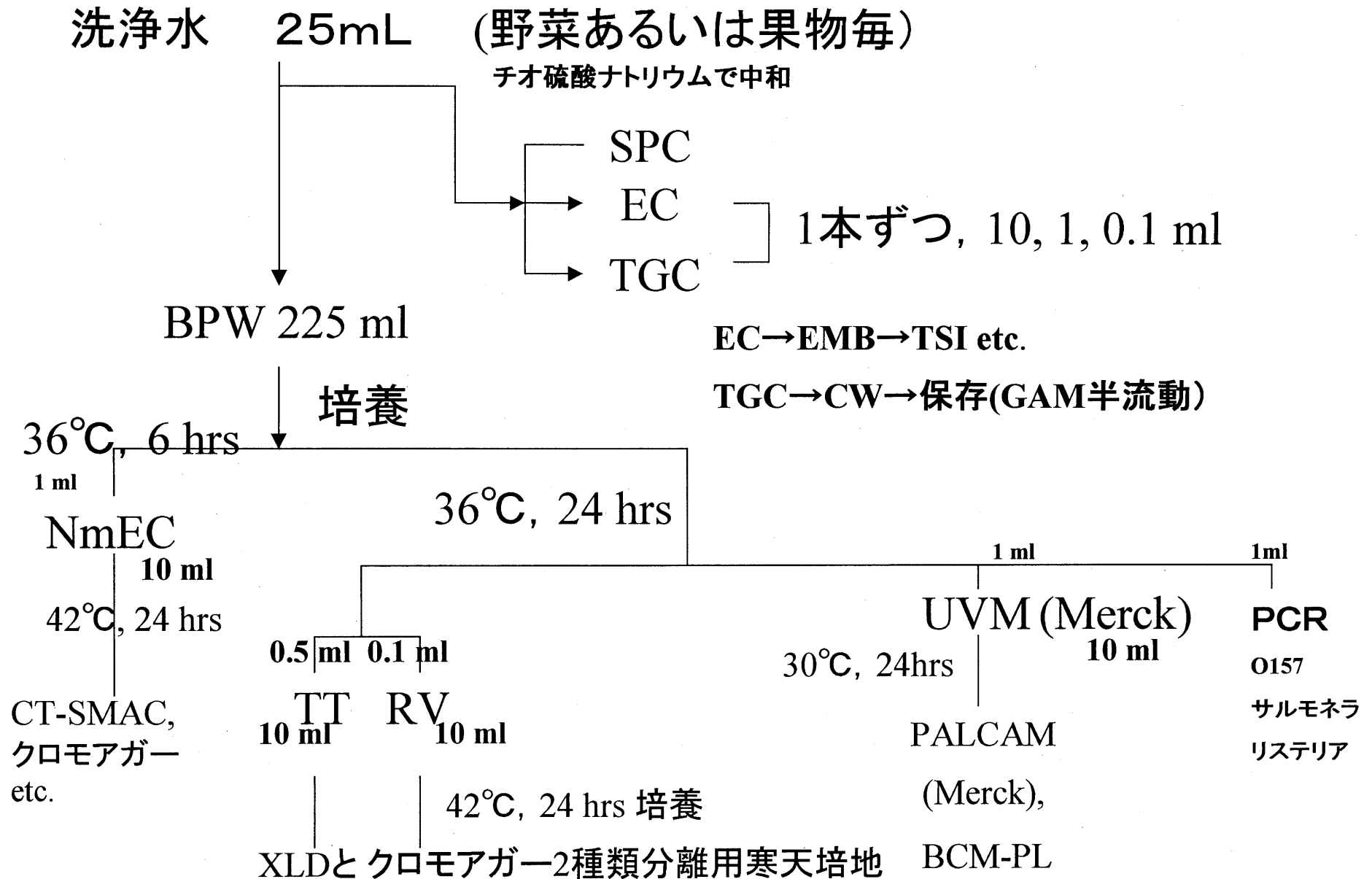
2. 学会発表

第 73 回日本細菌学会総会(2000 年 5 月):
宮原美知子、小沼博隆

腸管出血性大腸菌志賀毒素 2 (Stx2) 産生
遺伝子及びその下流域の DNA 配列によ
る解析

4th International Symposium and
Workshop on "Shiga Toxin
(Verocytotoxin)-Producing *Escherichia*
coli Infections (2000 年 11 月): Michiko
Miyahara, Konuma Hiroataka
Japanese EHEC O157:H7 Strains
having similar DNA Sequences to that
of Bacteriophage 933W

図 野菜洗浄水の微生物検査プロトコール



結果表

検体番号	検体採取日	検体採取施設名	施設のCAPACITY	1日の処理回数	作業人数	シンクの大きさ	洗い水の種類	残留塩素量(ppm)	野菜の種類	野菜重量(Kg)	産地	下処理法	細菌数(/ml)	大腸菌			大腸菌判定ATB判定	C. perfringens TGC			CW判定	
														(10ml)	(1ml)	(0.1ml)						
1	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.1	(1番を300ml濾過)	30-40本	徳島	皮むき	2.10E+07	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	じゃがいも	20-30個	北海道	そのまま(泥付き)	9.80E+07	+	+	-	-	-	-	-	-	
3	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	ほうれん草		奈良	切った後、根は捨て	1.60E+07	+	-	-	-	-	-	-	-	
4	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	排水(洗浄)				1.80E+07	+	+	+	E. Coli	-	-	-	-	
5	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	排水(調理)				1.20E+07	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	シンク二次				9.50E+06	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L		0.1	長芋	40本		た後、塩素水につける	1.60E+03	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L		0.3	じゃがいも	15kg	北見	洗うときに皮もむく	6.90E+06	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L		0.7	ガイモ、カット野菜など				1.30E+07	-	-	-	-	+	-	-	-	
10	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L		0.1	青梗菜	15kg	浜松	カット後洗浄後	5.30E+06	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L			汚水(食後食器洗浄水)				2.70E+07	+	+	-	Serratia or K. pneumonia	-	-	-	-	
12	H12年3月16日	N病院		3回	5名	150L			なばな			カット後洗浄後	5.40E+04	-	-	-	-	+	+	-	+	
13	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.1	(1番を300ml濾過)	30-40本	徳島	皮むき										
14	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	ほうれん草(3番を50ml濾過)		奈良	切った後、根は捨てる										
15	H12年3月16日	T病院	750-820名分	3回	9名	300L	流水	0.5	排水(調理)(5番を150ml濾過)													
16	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L		0.1	じゃがいも	20kg	JAようてい	皮をむきながら	4.00E+07	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L		0.1	小松菜	23kg	西船橋	カット後洗浄後	6.20E+04	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L		0.1	白菜	29.5kg	茨城	カット後洗浄後	7.00E+04	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L			汚水			全ての場所から	1.60E+05	+	+	+	-	-	-	-	-	
20	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L		0.1	キャベツ	20kg	JAたばら町		1.80E+05	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L		0.1以下	きゅうり	14kg	埼玉		8.40E+04	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L			小松菜A	300g		根を含む5cm位	1.80E+07	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L			小松菜B	300g		根を含む5cm位	3.90E+07	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	H12年4月18日	C病院	600名	3回	4名	150L			きゅうり	294g		両端1cm位	2.80E+07	-	-	-	-	-	-	-	-	

結果表

検体番号	E. coli	ChromoAgar	Salmonella	ChromoAgar	ATB判定	Salmonella	ChromoAgar	Listeria	Palcam	BCM-PL	顕微鏡下判定	一括PCR
	O157:H7		TT			RV						
1	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
2	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
3	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
4	-	-	XLD	-	Ps. putida	XLD	-	-	-	-		-
5	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
6	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
7	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
8	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
9	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
10	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
11	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
12	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
13	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
14	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
15	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
16	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
17	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
18	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
19	-	-	XLD	+		XLD	+	-	-	-		-
20	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
21	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	+	-	-
22	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
23	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-
24	-	-	XLD	-		XLD	-	-	-	-		-

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

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：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及び分離培地の検討を行った。増菌培地としてのチオグリコール酸ナトリウム加 BPW にカイワレ大根検体及びカイワレ大根由来の O157 以外の菌株ならびに O157 菌株の培養液を加えて種々の条件下で培養し、その検出状況を、分離培地として CT-SMAC を用いて検討したところ、他の増菌培地 (BPW または mEC+n) を用いて同様の実験を行った場合と比べてその検出率は高かった。また、各種生食用野菜の BPW 培養液を既に報告した分離培地 (CT-SSMAC) 及び CT-SMAC に塗抹接種して出現する集落を比較検討したところ、CT-SSMAC では、CT-SMAC で O157 の分離検出の障害となる無色の集落が出現した野菜の 50%において無色集落が不検出となるかあるいは数の減少がみられた。

A. 研究目的

生食用野菜に存在して腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) の分離に支障を及ぼすと考えられる大腸菌群の菌種やオキシダーゼ陽性のグラム陰性桿菌に対して、O157 の発育を抑制することなくこれらの菌の発育を阻害する検出法を検討した。

B. 研究方法

1) 増菌培地の検討

供試菌株

5 株の O157 ならびにカイワレ大根より分離した 6 株の O157 以外のオキシダーゼ陽性のグラム陰性桿菌を用いた (表 1)。

増菌培地

バッファード・ペプトン水 (Oxoid, BPW)、0.5%チオグリコール酸ナトリウム加 BPW (STG-BPW) およびノボビオシン加 mEC 培地 (栄研、mEC+n) を用いた。

実験方法

試験管レベルでの各種増菌培養法の比較

BPW にて一夜培養の供試菌株を滅菌生理食塩水にて 10^3 / 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 3 種類の増菌培地に接種し、36 °C または 42 °C で 18 時間好気あるいは嫌気培養 (アネロパク・ケンキ、三菱ガス化学) 後、ハートインフュージョン寒天培地 (栄研) に塗抹接種し、36 °C、20 ~ 22 時間培養した。培養後、発育した集落数を測定した。

滅菌および未滅菌カイワレ大根を用いての各種増菌培養法の比較