

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

食中毒細菌の検出方法の開発と評価

所 属 国立感染症研究所 食品衛生微生物部
研究者 山本茂貴

分担研究者

栄研化学（株）微生物グループ R&D 池戸正成

要旨

前年度までに腸管出血性大腸菌血清型 O26 の特異的な性質を応用し作製した O26 選択分離培地を、今年度は実際の食品や食中毒事例検体からの分離において評価し、さらに分離性の向上のための改良を行った結果、優秀な O26 選択分離培地を開発できた。また、低栄養状態に暴露することによって通常の人工培地では培養不能である腸管出血性大腸菌 O157 を作製し、培養可能状態へ復帰する方法を検索した。

1. 研究目的

近年、世界的に腸管出血性大腸菌による食中毒が多発してきた。同菌による食中毒の原因食品とその汚染ルートを明らかにし、食品や環境中の汚染実態を明らかにすることは、腸管出血性大腸菌による食中毒を防除するために必須である。しかし、発症菌数が比較的低いこともあり、従来の検出方法によっては食品や環境から低菌数レベルの菌を検出できないことが多かった。したがって、特に腸管出血性大腸菌については、従来の方法では検出できない菌数レベルを対象とした高感度の検出方法を開発することが急務とされている。腸管出血性大腸菌の血清型 O157 は他ペロ毒素産生大腸菌と比べ特異的な性質が多くまた感染者数が多いことからその検出方法の開発・研究は盛んに行われ優れた方法が数種類示されている。しかし、O26 等の他血清型については研究が乏しくペロ毒素非産生の大腸菌と異なる性質がほとんど知られておらず検出が困難であり問題とされている。また、環境中に生存する菌は人に感染した状態とは異なることが知られている。汚染源となりうる水中等の低栄養状態に暴露した菌について性状の変化等を明らかにし、適した検出方法が示される必要がある。さらに、近年、環境中等で生きてはいるが培養できない状態（Viable But Non Culturable, VBNC）の細菌の存在が明らかになっており、このような病原細菌の分離についても検討する必要がある。

本研究は、これら検出が困難とされている腸管出血性大腸菌を高感度に検出する方法を見いだすことを目的とし、世界的にも患者数の多い血清型 O26 の検出方法と低栄養に暴露され培養が困難な状態の菌についての検出方法を検討することを行う。

2. 研究方法

2-1. 腸管出血性大腸菌 O26 検出培地

平成 10 年度および 11 年度で開発した発色酵素基質を用いた腸管出血性大腸菌血清型 O26(O26)の分離用培地(CT-O26)について、実検体を想定した評価と、外部の検査研究機関での評価を行った。評価結果より、便検体を対象とした場合、O26 以外の菌の抑制を高める必要があると思われたため、新たに培地処方の検討と評価を行った。

1) 実検体を想定した評価

O26 に汚染された食材からの検出を想定し、牛挽肉に O26 の保存株(No. 4331)を 5 colony forming units (CFU)/25g sample に接種した検体を作製した。検体はノボピオシン加 mEC 培地(N-mEC)で増菌培養した後、培養物の菌数を測定した。また対照培地として、同じ目的の培地として平松らの報告したラムノースマッコンキー培地(RMAC)とセフィキシム、亜テルル酸カリウム添加添加 RMAC 培地(CT-RMAC)を用いた。

RMAC はマッコンキー寒天培地の乳糖の代わりにラムノースを用いた培地で、ラムノース陰性の O26 は透明のコロニーを、その他のラムノース陽性菌は赤色のコロニーを形成する。次に、さらに汚染量が少ない食材を想定して、牛挽肉、牛レバー、アルファルファ、レタスに検体 25 g あたり 2 CFU になるように O26 の菌株を接種し、同様に N-mEC で増菌し、O26 の分離を行った。この実験では、接種菌量が少ないため検出感度を高める目的で、免疫磁気ビーズによる分離法(Immunomagnetic separation : IMS)を併用した。検体数は、それぞれの食材について 10 検体ずつ用い、対照培地として CT-RMAC を用いた。いずれも培養は 37℃、18~24 時間で行った。

2) 検査研究機関での評価

1 都 10 県の衛生研究所あるいは保健所、あわせて 15 施設に CT-O26 と対照培地として CT-RMAC それに IMS に用いる免疫磁気ビーズを配布した。各施設では、過去の事例で分離した菌株、保存検体あるいは人為的に汚染させた便検体を用いて、培地の性能の評価を行った。また、研究期間中に O26 による食中毒の事例があった施設では、その検体を用いて評価を行った。

3) 培地の選択性の検討

便検体を対象にした場合、現処方の CT-O26 では選択性が低いと思われたため、より選択性の高い培地処方の検討を行い、保存菌株と便を用いて性能の確認を行った。便中の O26 以外の腸内細菌を抑制する必要があるため、現在の培地に選択剤として使用している亜テルル酸カリウムの添加量を $0.5 \mu\text{g/ml}$ から EHEC O157 の選択培地に使用されている $2.5 \mu\text{g/ml}$ に増加した。また、マッコンキー寒天培地の処方を参考に、CT-O26 に使用しているラウリル硫酸ナトリウムに代えて、デスオキシコール酸ナトリウムを添加した培地(CT-O26(D))と、デスオキシコール酸ナトリウムとコール酸ナトリウムを添加した培地(CT-O26(DC))の 2 種類の培地を作製した。

保存菌株は O26 の 2 株を含む 7 株(Table 5)を用いて Miles & Misra の surface count 法で選択能と発育支持力を試験した。試験は McFarland 0.5 の濁度に調整した試験菌懸濁液を 10^{-2} ~ 10^{-6} に希釈し、各々 $10 \mu\text{l}$ ずつ培地表面に接種した。また、健康人の便に O26 を接種した検体を作製し、白金耳で約 10mg 培地に塗抹接種し、O26 とそれ以外の菌の発育を観察した。接種した菌量は、 5×10^2 と 5×10^3 CFU/g の 2 段階で 2 検体を試験した。いずれも培養は 37℃、18~24 時間で行った。

2-2 低栄養に暴露された菌について

腸管出血性大腸菌 O157:H7 は臨床由来の 10 株を用いた。まず VBNC 化のための条件として、菌液の保存温度、溶媒、保存菌液の初期菌数および菌の培養時間について検討した。菌株は 1/2 濃度に調製した標準寒天高層培地に植菌し、37℃一晩培養したものを室温、暗所にて保存し、VBNC の調整のために用いた。保存培地から、Tryptic Soy Broth (TSB) (DIFCO)あるいは LB medium に植菌し、37℃で一晩前培養した菌液をさらに新しい培地に接種し 37℃で培養した。この培養液を遠心して得られた菌体を保存に用いる溶媒あるいは滅菌ミリ Q 水で洗浄を 3 回繰り返して得られた菌液を、溶媒に適切な初期菌数となるように懸濁して、一定温度で保存した。VBNC 化の確認は培養可能菌数を Trypticase Soy Agar(TSA) (DIFCO)平板培地上に生育したコロニー数(cfu)として測定し、生菌数は Live/Dead BacLight bacterium viability kit(Molecular Probes Europe)による蛍光染色法あるいは小暮法(ナリジクス酸添加イーストイクトラクト溶液中での菌の伸張と Diamino-2-phenylindole による菌の蛍光染色像を顕微鏡下で観察する方法)を用いて測定した。

VBNC から培養可能状態への復帰のための条件検討として、生体内での復帰を見るために BALB/c マウス(♀)に作成した VBNC 化菌液を経口投与した。1 週間後に安楽死させ、摘出した腸管および腸管内容物を直接、あるいは TSB 中で 37℃で一晩培養した液を O157 免疫抗体ビーズ法を用いて O157 選択培地に塗抹し、37℃、一晩培養して O157 のコロニー形成の有無を調べた。また、in vitro での復帰では、嫌気/好気培養、生体成分あるいは無機塩類等を添加しての培養あるいは培養温度、時間、使用培地等の検討を行った。

3. 研究成果

3-1 腸管出血性大腸菌 O26 検出培地

1) 実検体を想定した評価

牛挽肉に、検体あたり 5 CFU の O26 を接種した 5 検体すべてから、CT-O26 で O26 が分離することができた(Table 1)。CT-O26 での菌数は、 1.2×10^4 ~ 3.8×10^4 CFU/ml であり、対照に用いた RMAC もほぼ同数であったが、CT-RMAC では O26 の発育がやや抑制され、CT-O26 の 6~35%のコロニー数であった。CT-O26 上の O26 のコロニーは暗青色に着色し、他の菌と容易に鑑別できた。RMAC 上での O26 のコロニー

はピンク色に着色し、他の菌と区別が困難なものがあり、CT-RMAC では褐色に着色したコロニーを作り、ラムノース発酵との鑑別がしにくいものがあった。これら 3 種類の培地に発育した O26 以外の菌のコロニー数は、CT-O26 と CT-RMAC はほぼ同様で、RMAC はこれら 2 種の培地より多かった。接種菌量を 2 CFU とした 4 種類の食材からの O26 の検出実験結果を Table 2 に記載した。増菌培養物を直接培地に塗抹した実験では、CT-O26 で検出できたのは、供試した 10 検体のうち牛挽肉、牛レバー、アルファルファ、レタスでそれぞれ、5、6、2、7 例であったが、CT-SMAC では牛レバーで 3 例、レタスで 7 例であり、他の 2 食材からは検出できなかった。IMS を用いた方法では、CT-O26 での検出率は向上したが、CT-RMAC では大きく改善できなかった。

2) 検査研究機関での評価

培地、試薬等を配布した 15 施設のうち、10 施設から評価結果を得た。その内容は、過去の事例で分離した保存菌株を用いた評価(7 施設)、健常人の便に O26 を接種した検体からの回収実験(2 施設)、過去の事例での保存便を用いた評価(3 施設)であった(施設数は評価項目の重複を含む)。研究期間中に O26 による食中毒の事例が 2 施設あり、便検体および食材、環境材料からの O26 の検出に配布した培地を使用した。

a) 保存菌株を用いた評価：保存菌株を用いた評価は、7 施設から合計 148 株の成績が得られた (Table 3)。供試した 122 株のベロ毒素産生 O26 はすべて CT-O26 に発育し、特徴ある暗青色～青紫色のコロニーを形成し、容易に鑑別ができた。ベロ毒素非産生の血清型 O26 大腸菌 7 株のうち、2 株は青紫色であったが他の 5 株は緑色であった。血清型 O26 以外の EHEC は、血清型 O119 と O161 の 2 株が O26 と同様青紫色になり、O157 の 3 株と O111 は緑色であった。EHEC 以外の大腸菌と他の腸内細菌は、微小な緑色コロニーを形成するか、発育が抑制され、容易に O26 との鑑別ができた。対照に用いた CT-RMAC では 122 株のベロ毒素陽性 O26 のうち 13 株が発育を抑制されたが、他の菌株は O26 の特徴である透明なコロニーを形成した。血清型 O26 以外の EHEC については、CT-O26 と CT-RMAC は同様の成績であった。EHEC 以外の大腸菌と腸内細菌は CT-O26 では緑色のコロニーを形成するか発育を抑制され、O26 と容易に鑑別することができた。

b) O26 を接種した健常人の便を用いた評価：健常人の便に O26 を接種した検体を用いた評価結果が 2 施設から各 1 例ずつ得られた。いずれも CT-O26 で O26 が分離、確認できた。O26 は CT-O26 で特徴ある暗紫色のコロニーを形成し、他の菌と容易に鑑別することができた。

c) 食中毒事例の検体を用いた評価：O26 による食中毒が疑われる下痢発症者および接触者、および過去の事例での保存便を用いた評価結果を Table 4 にまとめた。Case 1 では発症者(1 名)とその接触者 4 名の便材料を試験し、CT-O26 で発症者便から O26 様の青紫色のコロニーを分離した。接触者の 4 検体からは疑わしい菌は分離されなかった。発症者からの分離菌は、同定の結果ベロ毒素産生の大腸菌であったが、O 血清型は特定できなかった。対照として用いた CT-RMAC も同様の結果であった。Case 2 では、48 の便検体を試験した結果、CT-O26 および CT-RMAC の両培地で検出されたのは、11 検体であり、CT-O26 のみで検出できた検体が 1 例、CT-RMAC のみが 2 例あった。同時に、食材 12 検体、ふき取り材料 20 検体を試験したが、いずれも O26 の検出はできなかった。Case 3、4 はいずれも過去の食中毒事例検体を用いた評価で、Case 3 では、N-mEC、トリプトソイブイオン(TSB)、TSB で増菌後 N-mEC に接種、BGLB の 4 種の増菌培養を行い、CT-O26、CT-RMAC で分離を行った結果、この 3 種類の培地でいずれの増菌培地から O26 が検出できた。Case 4 は、15 検体を用いて、直接あるいは N-mEC で増菌して、CT-O26 と CT-RMAC で分離培養をした結果、CT-RMAC ではすべての検体から O26 が検出されたが、CT-O26 では直接塗抹で 2 例、増菌培養法で 3 例からのみ検出された。Case 5 は、O26 が確認された保存便 19 検体を直接塗抹、培養し、すべての検体から CT-O26、CT-RMAC で O 大腸菌 O26 が検出された。この施設では、保存食材 182 検体について、N-mEC で増菌し直接あるいは IMS を用いて試験したが、CT-O26、CT-RMAC のいずれからも O26 は検出できなかった。

3) 培地の選択性の検討

Miles & Misra の surface count 法で、現処方 CT-O26 と選択性を高めた 2 処方の培地、CT-O26(D)、CT-O26(DC)の選択性を試験した成績を Table 5 にまとめた。供試した O26 の 2 菌株は 3 種類の培地間で発育およびコロニー色に差が認められなかった。血清型 O26 以外の非病原性の大腸菌(No. 675)と *Citrobacter freundii* (No. 389)は CT-O26 ではほとんど発育を抑制されていないが、処方を変更した 2 種類の培地では、最も菌量の多い接種量でも発育は認められなかった。*Enterobacter cloacae* (No. 606)と *Pseudomonas aeruginosa* (No. 5166)も現処方と比較して発育が抑制された。

健常人の便に O26 の菌株を接種した検体からの O26 の検出実験では、 5×10^3 CFU/g の菌量の検体では 3 種類の培地とも O26 の検出はできなかった(Table 6)。 5×10^5 CFU/g では、3 種類の培地すべてで O26 の確認ができた。O26 以外の菌の発育は、現処方の培地では O26 の接種、未接種にかかわらず、塗抹した部分

に多くの菌の発育を認めたが、選択性を高めた 2 種類の培地では完全に発育を抑制できないが、便検体の接種量が多い部分のみにわずかに発育を認めた。

3-2 低栄養に暴露された菌について

VBNC 化における培養可能菌数(cfu)については、実験に用いた 10 株の O157 はいずれも 1cfu/ml 以下に減少するまで 1~5 ヶ月以上かかった (Fig.1)。保存温度は 4℃よりも 10℃で早く減少した。保存菌液の初期菌数は菌数が低いほど早く減少した。また、保存に用いる菌の生育段階は対数増殖期初期あるいは後期の菌よりも中期あるいは死滅期の菌で早く減少した。溶媒として用いたミリ Q 水、燐酸緩衝生理的食塩水(pH7.0)中において 1cfu/ml 以下に減少するまで 15 ヶ月以上を要し、河川水中において cfu は非常にゆっくりと減少した。また、生菌数については、比較的速やかに培養できなくなる菌株では、培養出来なくなった直後 (1cfu/ml 以下) で蛍光染色法において $10^4 \sim 10^6$ cells/ml の生菌が確認され (Fig. 2)、この状態を VBNC と判断した。しかし、小暮法における生菌数は検出限界以下 (10^4 cells/ml 以下) であった。

VBNC 化した菌の培養可能状態への生体内での復帰については、経口投与後、マウス腸管あるいは腸管内容物および回収した糞便中からも O157 は検出できなかった (Table 7)。in vitro での復帰については、嫌気/好気培養によらずコロニー数の増加すなわち培養可能状態への復帰は認められなかった。生体成分としてウシあるいはヒトアルブミン、胃由来ムチンおよび胆汁を添加し、直後あるいは 37℃または 20℃でインキュベートした後、TSA 培地に塗抹、培養したが、コロニー数の増加は認められなかった。Mg, K, Ca, Zn を添加した培地上でもコロニー数の増加は認められなかった。さらに、土壤中の VBNC 状態にある細菌を培養可能状態へ誘導する作用が示唆されている電解水 (アルカリ性水) を添加あるいはあらかじめ培地に塗抹しておいた場合にもコロニー数の増加は認められなかった。また、VBNC 化 O157 を培養可能状態へ復帰させることが報告されている catalase やピルビン酸によってもコロニー数の増加は認められなかった。また、20℃、25℃または 37℃のいずれの温度においてもコロニー数の増加は認められなかった。一晚一週間まで培養したがコロニー数の増加は認められなかった。液体培地、固体培地いずれの場合も VBNC 化 O157 の培養可能状態への復帰は認められなかった。Brain Heart Infusion agar(BBL, DIFCO), Desoxycholate agar(Nissui), DHL agar(Eiken, Nissui), GAM agar(Nissui), MacConkey Agar(Nissui, OXOID), Nutrient Agar(Nissui), Solbitol MacConkey Agar(OXOID), Standard Method Agar(Eiken), Trypticase Soy Agar(Eiken, DIFCO) 計 13 種類のいずれの培地においてもコロニー数の増加は認められなかった。

4. 考察

4-1 腸管出血性大腸菌 O26 検出培地

血清型 O26 の腸管出血性大腸菌(O26)による食中毒が報告されているが、そのほとんどの事例で汚染源となった食材等の特定が出来ていない。その原因の一つとして、本菌に対する検出法が確立されていないことがあげられる。本研究では O26 の検出のための分離培地の開発と評価を行い、発色酵素基質を用いた O26 の分離用培地(CT-O26)を開発した。本年度はこの開発培地の性能を、実検体を想定して食材を用いた評価と、外部の試験機関での評価を行い、その結果より培地の処方の変更を試みた。

食材を用いた評価では、O26 の発育支持力とそれ以外の菌の抑制力は満足できるものであった (Table 1, 2)。汚染量が少ない検体では、培地の選択性が検出に大きく影響することが確認でき、本培地と IMS の併用で検出率が高めることができた (Table 2)。外部の研究機関で保存菌株を使用した評価では、昨年度の報告と同様、CT-O26 では、培地上に発育した O26 を容易に鑑別することができた (Table 3)。しかし、多量の腸内細菌叢が存在する便を検査対象にした場合、CT-O26 で O26 が検出できない例があった (Table 4, Case 4)。この原因は O26 以外のラムノース陽性株が優性に発育し、培地全体の pH が低下して黄色に呈色したため、O26 が特徴ある暗青色~暗紫色のコロニーを形成できなかったと考えられた。そのため便のような腸内細菌の多数存在する検体では、これらの菌の発育を抑制する必要があると思われた。その対応として、亜テルル酸カリウムの添加量を変更し、選択剤として用いているラウリル硫酸ナトリウムの代わりにデオキシコール酸ナトリウムやコール酸ナトリウムのような胆汁酸塩を用いることで、O26 の発育を阻害することなく他の腸内細菌の発育を抑制し選択性を高めることができた (Table 5, 6)。

食中毒の事例から分離された菌株を中心に血清型 O157 以外のベロ毒素産生大腸菌の一部でも O26 と同様のコロニーを形成する菌株があり (Table 3)、実際の食中毒の事例でも同様の菌株が分離された (Table 4, Case 1)。一方、血清型 O26 であるがベロ毒素を産生しない 7 菌株中 5 株がラムノースを発酵し、CT-O26 で緑

色になった。こうした結果は、平松らの報告にも見られ、ベロ毒素産生能とラムノース発酵能に何らかの関連があることが示唆された。

4-2 低栄養に暴露された菌について

O157 は多菌株において低栄養、低温の模擬環境条件下で長期間生存可能であった。VBNC 化と判断した菌は生体内あるいは *in vitro* いずれの実験系においても培養可能状態への復帰が認められず、VBNC 化 O157 を培養可能状態へ復帰させるとの報告がある catalase やピルビン酸によっても復帰は認められず、catalase やピルビン酸による復帰は菌株特異的な例であることが考えられた。また、VBNC 化菌の調整の際に、培養可能菌数(cfu)の測定に使用する培地によって cfu が異なる傾向がみられたこと、生菌数が測定方法によって大きく異なったことから、VBNC 化の判定には、異なる培地を用いて cfu を測定すること、確実な生菌数測定法を検討する必要性が考えられた。本研究で VBNC と判断した菌は比較的死滅に近い状態と考えられた。

5. まとめ

大腸菌 O157:H7 以外の腸管出血性大腸菌として血清型 O26 の菌(O26)の検出用に開発した選択鑑別培地(CT-O26)の評価を行った。食材からの O26 の検出を想定した評価では、試料 25g あたり数個の O26 の菌量でも、増菌培養と IMS を組み合わせることで検出が可能であることが確認できた。便検体では、検体中の腸内細菌の種類と菌量により、検出ができない例があり、便検体を対象にする場合は、選択性の高い培地を使用する必要があると思われた。衛生研究所あるいは保健所 7 施設で、食中毒の事例から分離した保存菌株を用いた評価では、平成 12 年度に行った評価結果と同様、O26 は CT-O26 で特徴あるコロニーを形成し、それ以外の菌と容易に鑑別できることが確認できた。

現処方では選択剤として使用している亜テルル酸カリウムの添加量の増加、およびラウリル硫酸ナトリウムを胆汁酸塩に変更することで O26 の発育に影響を与えず、選択性を高めることができた。

これらの結果から、原因食品の検査には、検体を増菌培養後、直接あるいは IMS 処理をして本研究で開発した CT-O26 に接種することで効率よく O26 の検出ができることが確認できた。他の菌の混在量が多い便のような検体の場合は、亜テルル酸カリウムの添加量を増加し、胆汁酸塩を使用したより選択性の高い培地の使用あるいは併用が有効であると思われた。

腸管出血性大腸菌 O157:H7 は菌の生育段階、菌数あるいは保存温度によって若干の差は認められたものの、低栄養、低温の模擬環境条件下において長期間生存可能であることが多数の菌株で認められ、環境中の大腸菌 O157:H7 の汚染源としての危険性が示された。また、VBNC から培養可能状態への復帰は生体内あるいは *in vitro* いずれの実験系においても認められなかった。さらに、培養可能菌数(cfu)は培地により異なり、生菌数は測定法により異なったことから、大腸菌 O157:H7 に関して VBNC の定義、判定方法についてさらに検討を重ね、確立する必要があると思われた。

6. 研究発表

- ・ Hara-Kudo Y., Miyahara, M. and Kumagai S : Loss of O157 O antigenicity of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 surviving under starvation condition. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 5540-5534 (2000)
- ・ 池戸正成、小松 理、工藤由起子、山本茂貴、熊谷 進 : 発色酵素基質を用いた腸管出血性大腸菌 O26 の選択分離培地に関する検討. *感染症学雑誌*. 75: 291-299 (2001).
- ・ Hara-Kudo Y., Ikedo, M., Komatsu, O., Yamamoto, S. and Kumagai, S : Evaluation of a Chromogenic agar medium for isolation of *Escherichia coli* O26. *Food Control*, (印刷中).

7. 知的所有権の取得状況

特許申請を行なった。

謝辞

ご多忙の中にもかかわらず、CT-O26 分離培地の評価にご協力をいただいた下記の施設、先生方に深謝いたします。

名古屋市衛生研究所 安形先生、富山県衛生研究所 刑部先生、埼玉県衛生研究所 倉園先生、広島県三次保健所 新谷先生、沖縄県中央保健所 平良先生、岡山県環境保健センター 中嶋先生、長崎県衛生公害研究所 野口先生、沖縄研衛生環境研究所 久高先生、静岡市衛生研究所 北條先生、静岡県環境衛生科学研究所 増田先生 (五十音順)

Table 1 Detection of *Escherichia coli* O26 on three selective media

	Detection of <i>E. coli</i> O26 from cultured mEC with novobiocin ^a		
	O26 agar	RMAC	CT-RMAC
Ground beef 1	1.2×10 ⁴	1.3×10 ⁴	4.3×10 ³
Ground beef 2	3.8×10 ⁴	4.3×10 ⁴	2.3×10 ³
Ground beef 3	3.5×10 ⁴	3.6×10 ⁴	6.2×10 ³
Ground beef 4	1.8×10 ⁴	1.7×10 ⁴	5.3×10 ³
Ground beef 5	3.3×10 ⁴	3.2×10 ⁴	4.1×10 ³

a; colony forming units /ml

Table 2 Isolation of EHEC O26 from food artificially inoculated with the organism

	Direct plating		Plating after IMS	
	O26 agar	CT-RMAC	O26 agar	CT-RMAC
Ground beef	5/10 ^a	0/10	10/10	1/10
Liver	6/10	3/10	10/10	3/10
Alfalfa	2/10	0/10	0/10	0/10
Lettuce	7/10	7/10	9/10	8/10

a; The number of samples positive for EHEC O26/tested sample number

Table 3 The List of 133 strains used, and their colony morphology on O26 agar and CT-RMAC

Name	O antigen	VT*	Number	Colony morphology on	
				O26 agar	CT-RMAC
<i>Escherichia coli</i>	O26	+	116	blue black	clear (103) or non-growth (13)
<i>Escherichia coli</i>	O26	-	7	blue black(2) or green (5)	clear(2) or red(5)
<i>Escherichia coli</i>	O119	+	1	blue black	clear
<i>Escherichia coli</i>	O161	+	1	blue black	clear
<i>Escherichia coli</i>	O157	+	2	green	red
<i>Escherichia coli</i>	O111	+	1	green	red
<i>Escherichia coli</i> (non EHEC)		-	2	green	non-growth
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1	green	non-growth
<i>Proteus mirabilis</i>			1	green	non-growth
<i>Citrobacter freundii</i>			1	non-growth	non-growth

*; Vero toxin production

Table 4 Detection of EHEC O26 from feces specimens

Case	No. of speimen	No. of positive by		Comment
		O26 agar	CT-RMAC	
1	4 (patient;1, contacts;4)	0	0	VT positive strain isolated from patient feces by both media, but its O antigen was non-typable
2	48	12	13	was by O26 agar and two were by CT-RMAC individually
3	1	1	1	Freezed specimen, inoculated after enrichment culture
4	15	3	15	Freezed specimens, inoculated after enrichment culture

Table 5 Comparison of bacterial numbers and colony color testd by Miles & Misra surface count method

No.	Strain Name	Medium	Dilution					color
			10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
4331	<i>Escherichia coli</i> O26	O26(D) agar ^a	++ ^c	++	++	+	5	dark blue
		O26(DC) agar ^b	++	++	++	+	11	dark blue
		O26 agar	++	++	++	+	7	dark blue
4332	<i>Escherichia coli</i> O26	O26(D) agar	++	++	++	+	6	dark blue
		O26(DC) agar	++	++	++	+	5	dark blue
		O26 agar	++	++	++	+	5	dark blue
675	<i>Escherichia coli</i> non O26	O26(D) agar	-	-	-	-	-	
		O26(DC) agar	-	-	-	-	-	
		O26 agar	++	++	++	+	5	green
389	<i>Citrobacter freundii</i>	O26(D) agar	-	-	-	-	-	
		O26(DC) agar	-	-	-	-	-	
		O26 agar	++	++	++	+	6	green
436	<i>Proteus mirabilis</i>	O26(D) agar	-	-	-	-	-	
		O26(DC) agar	-	-	-	-	-	
		O26 agar	-	-	-	-	-	
606	<i>Enterobacter cloacae</i>	O26(D) agar	+	36	8	-	-	green
		O26(DC) agar	+	+	27	-	-	green
		O26 agar	++	++	+	4	-	green
5166	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	O26(D) agar	++	+	+	-	-	clear
		O26(DC) agar	++	+	-	-	-	clear
		O26 agar	++	++	+	+	-	clear

a; replace sodiium lauryl sulfate with sodium desoxicholate

b; replace sodiium lauryl sulfate with sodium desoxicholate and sodium cholate

c;

No. of colonies	Reports as
0~30	Actual count
30~100	+
confluent growth	++

Table 6 Growth of O26 and other bacteria on two modified media and O26 agar from feces artificially inoculated with the organism

No.	Inoculum size (CFU/g)	O26(D) agar ^a		O26(DC) agar ^a		O26 agar	
		O26	Non O26	O26	Non O26	O26	Non O26
1	0 (control)	-	+(Tr) ^b	-	+(Tr)	-	+
	5×10	-	+(Tr)	-	+(Tr)	-	+
	5×10 ³	+	+(Tr)	+	+(Tr)	+	+
2	0 (control)	-	+(Tr)	-	+(Tr)	-	+
	5×10	-	+(Tr)	-	+(Tr)	-	+
	5×10 ³	+	+(Tr)	+	+(Tr)	+	+

a; same as Table 5

b; trace of growth

Table 7 VBNCから増殖可能状態への復帰のための条件検討
 <生体内(O157経口投与マウス)での増殖可能状態への復帰>

O157検出対象	検出方法	投与菌数 (cfu/マウス)	嫌気・好気	結果	cfu/ml	生菌数 (個/ml)	全菌数 (個/ml)
腸管 および 腸管内容物	直接塗抹法	0.5	好	—	<5		
	TSB一晚培養液、直接塗抹法	<1			<10		
糞便 (投与1,2日間)	直接塗抹法	<1	好	—	<10	1.2x10 ⁶	2.1x10 ⁶
	O157免疫抗体ビーズ法	1.5			30		
	TSB一晚培養液、直接塗抹法	4.5			10		
	〃、O157免疫抗体ビーズ法	1.1			7.5	1.1x10 ⁶	1.8x10 ⁶
		110			730	3.1x10 ⁵	4.2x10 ⁵

<in vitroでの増殖可能状態への復帰>

添加剤	終濃度	培養条件	嫌気・好気	結果	cfu/ml	生菌数 (個/ml)	全菌数 (個/ml)
カタラーゼ	2000U/p*	25°C、一週間	好	—	<3~<10	1.8~4.0x10 ⁵	6.7~7.8x10 ⁵
ピルビン酸	0.1%						
カタラーゼ	2000U/p	20°C、一週間	好	—	<2	nd	nd
ピルビン酸	0.1%				<10	1.2x10 ⁶	2.1x10 ⁶
カタラーゼ	2000U/p	37°C、一週間	嫌	—	<2	nd	nd
ピルビン酸	0.1%				<10	1.2x10 ⁶	2.1x10 ⁶
カタラーゼ	2000U/p	37°C、一晚	好	—	1.3x10 ²		
ピルビン酸	10000U/p				~4.3x10 ³		
カタラーゼ	2000, 10000U/p	37°C、3日	好	—	8.5x10 ⁴		
ピルビン酸	0.1%, 1%				~1.7x10 ⁵		
カタラーゼ	2000U	25°C、2日	好	—	<3	2.8x10 ⁵	6.7x10 ⁵
ピルビン酸	0.1%	(菌液と混合して 25°C、2日保温後、平板培地に塗抹)			<10		
アルブミン(ウシ, ヒト)	5%	37°C、一晚	好	—	<2	1.1~1.8x10 ⁶	4.5~5.0x10 ⁶
ムチン	6%	(菌液と混合して37°C、一晚保温後、			120	2.9x10 ⁶	4.6x10 ⁶
胆汁酸(pH6.0, pH7.0)	10%	平板培地に塗抹)			2.6x10 ⁶	5.2x10 ⁵	9.6x10 ⁵
アルブミン(ウシ, ヒト)	5%	37°C、3日	好	—	<2		
ムチン	6%	(菌液と混合して20°C、一晚保温後、			25		
胆汁酸(pH6.0, pH7.0)	10%	平板培地に塗抹)			1.7x10 ³		
アルブミン(ウシ, ヒト)	5%	37°C、一晚	好	—	<2		
ムチン	6%	(菌液と混合して37°Cで0,1.5, 3, 5時間保温後、					
胆汁酸(pH7.0)	0.5%	平板培地に塗抹)					
アルブミン(ウシ)	5%	37°C、3日	好	—	10~22	3.1x10 ³ ~2.4x10 ⁶	4.2x10 ³ ~4.6x10 ⁶
ムチン	6%	(菌液を45,70°Cで15,30,60秒加熱処理後、添加剤を			3.9x10 ³	1.3x10 ⁵	1.2x10 ⁵
胆汁酸(pH7.0)	0.5%	混合して37°C、1時間保温後、に平板培地に塗抹)			<2	1.1x10 ⁶	1.8x10 ⁶
アルカリ性電解水**	1, 5, 10倍容	37°C、3日 (菌液と混合後、平板培地に塗抹)	好	—	1.7x10 ⁵		
	0.1,0.5,1.5,10倍容	37°C、一晚 (菌液と混合後、平板培地に塗抹)	好	—	1.3x10 ²		
	0.1, 0.5, 1.0ml/p	37°C、3日 (アルカリ性電解水を塗抹した平板培地に菌液を塗抹)	好	—	~4.3x10 ³		
	0.1, 0.5ml/p	37°C、3日 (アルカリ性電解水を塗抹した平板培地に菌液を塗抹)	嫌・好	—	30	1.6x10 ⁶	4.8x10 ⁶
					60	1.5x10 ⁶	4.6x10 ⁶
					10	2.4x10 ⁶	4.6x10 ⁶
	1ml/p	37°C、一晚 (アルカリ性電解水を塗抹した平板培地に菌液を塗抹)	好	—	10~10 ⁵		
Mg	5, 25mM	37°C、一晚	好	—	1.7x10 ⁵		
	5, 25mM	37°C、3日	好	—	1.3x10 ²		
					~4.3x10 ³		
Ca	5, 25mM	37°C、3日	嫌・好	—	30	1.6x10 ⁶	4.8x10 ⁶
K	〃				60	1.5x10 ⁶	4.6x10 ⁶
Mg	〃				10	2.4x10 ⁶	4.6x10 ⁶
Zn	〃						
Ca, K, Mg, Zn	各5mMずつ						

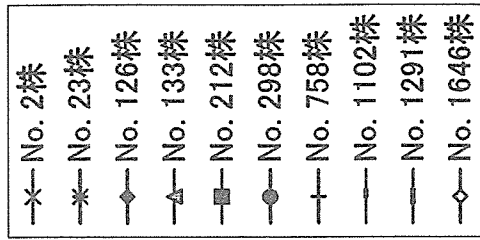
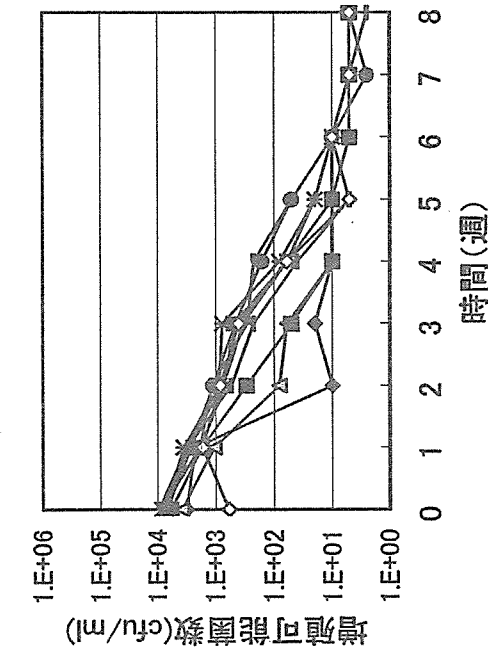
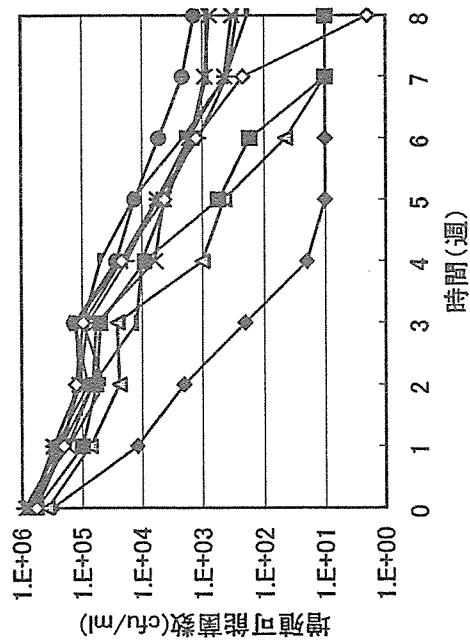
* U/pは平板培地1枚に塗抹したカタラーゼの酵素量

** アルカリ性電解水は5mMKCl水溶液を5分間電解して生成したもの(pH10~11)を使用した。

ml/pは平板培地1枚に塗抹したアルカリ性電解水の容量。

Fig. 1 腸管出血性大腸菌O157 各被検菌株のcfuの推移

a) PBS(pH7.0), 4°C保存下における10株のcfuの推移



b) PBS(pH7.0)中保存下のNo. 126, No. 133, No. 212株のcfuの推移

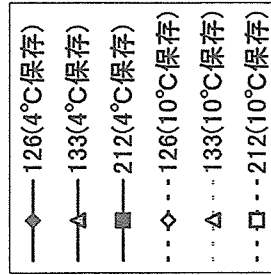
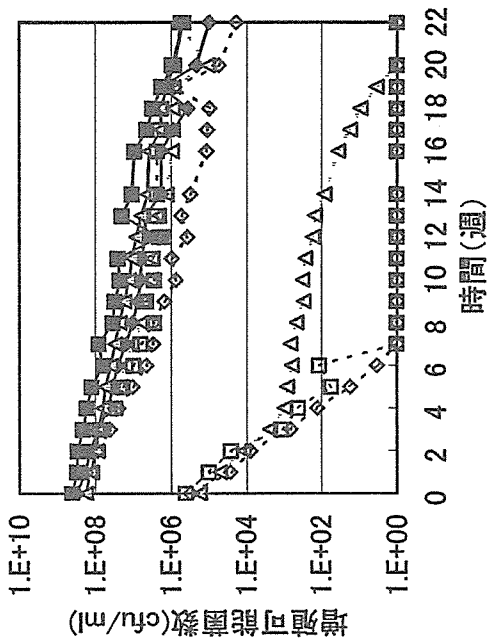
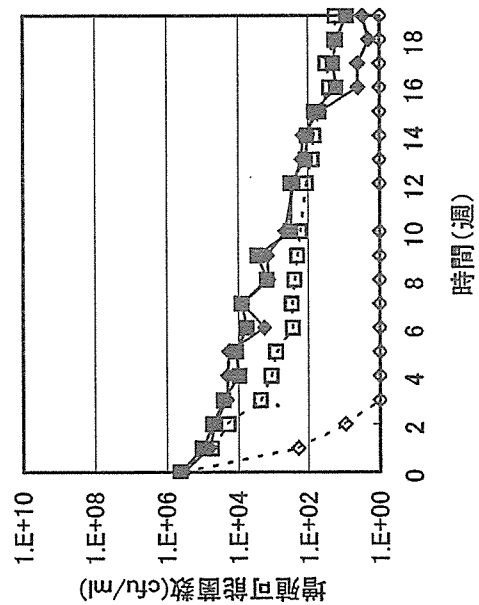
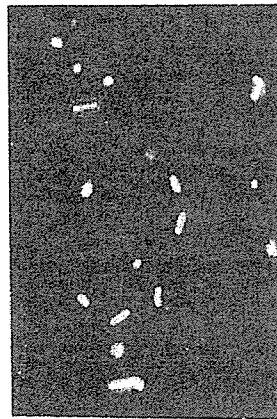


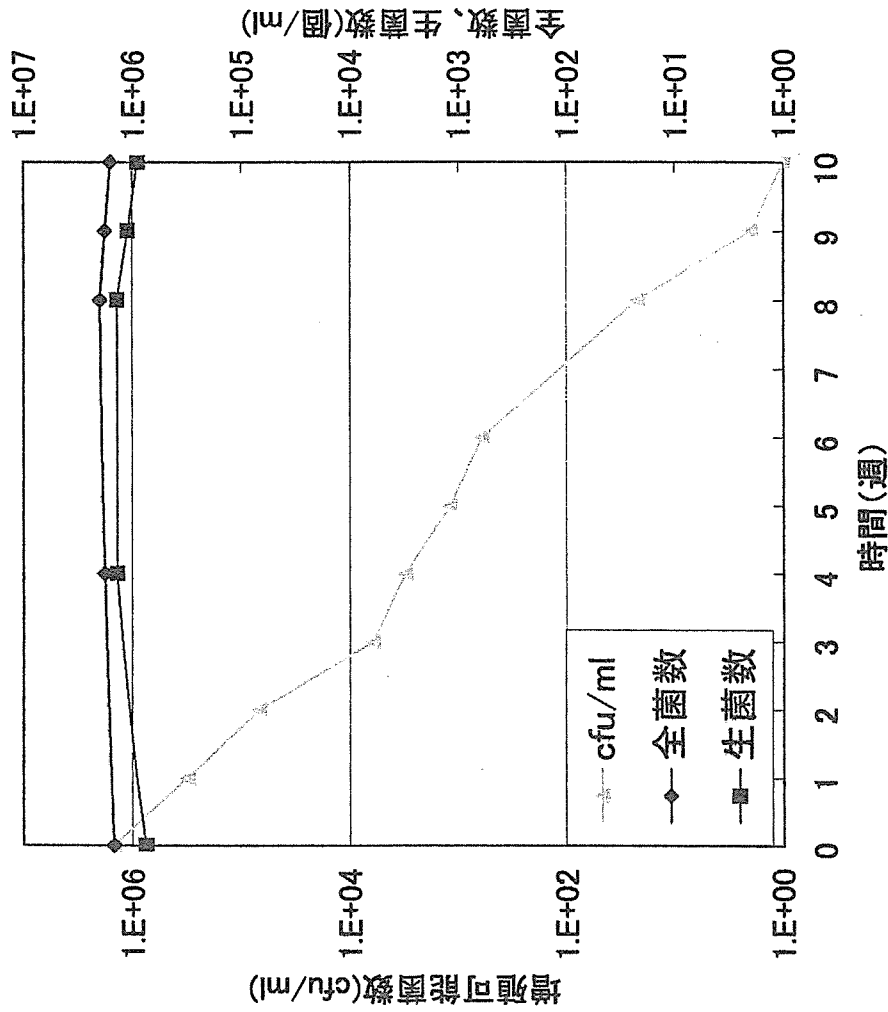
図2 cfu、全菌数、生菌数の推移 (126株, 10°C保存)

a) 蛍光顕微鏡下におけるLive/Dead染色による保存菌液中の菌の様子



緑: 生菌
赤: 死菌
全菌 = 生菌 + 死菌

b) cfu、全菌数、生菌数*の推移



* 全菌数、生菌数はLive/Dead Bacilight bacterium viability kit (Molecular Probes Europe)を用いた蛍光染色法により決定。但し、小暮法による生菌数は検出限界以下($<10^4$ 個/ml)であった。

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社