

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品での新たな病原大腸菌のリスク管理に関する研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

食品での統一的検査法の開発

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

協力研究報告書

食品での腸管毒素原性大腸菌の分離培養法の検討

工藤由起子

研究要旨

本研究では、(1)腸管毒素原性大腸菌の上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を対象として、食品、特に野菜からの分離培養における免疫磁気ビーズ法の効果を検討した。また、(2)腸管毒素原性大腸菌の選択分離培地の開発を目指して、平成 27 年度の研究成果から有用と考えられた抗生物質を寒天培地に添加し菌の検出性を検討した。加えて、寒天平板培地の培養温度を 42 に高めることでの選択性の向上効果を検討した。その結果、7 血清群の免疫磁気ビーズの有用性が確認され、特に、腸管毒素原性大腸菌の選択性が高い抗生物質を加えた SMAC を組み合わせることで格段に効率的な腸管毒素原性大腸菌の分離が行えることが期待された。また、42 での選択培地の培養は腸管毒素原性大腸菌の生育に抑制的であり、一般的には 37 での培養が良いと考えられた。本研究から、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な腸管毒素原性大腸菌の分離培養法が確立されることが考えられた。

研究協力者

埼玉県衛生研究所

大塚佳代子、門脇奈津子、星野梢、大阪美紗

藤沢市保健所

佐藤 健

倉敷市保健所

杉村一彦

大分県衛生環境研究センター

成松浩志

国立医薬品食品衛生研究所

都丸亜希子、寺嶋 淳

A. 研究目的

平成 24 年に感染症報告数集計において、下痢原性大腸菌（食中毒統計の病原大腸菌）の分類が新たな分類に改訂されたが、腸管出血性大腸菌以外の病原大腸菌についての食品での検査法は、これまで、国内外ともあまり検討されておらず、早急な確立が求められている。腸管毒素原性大腸菌（ETEC）はその病原性が明確であり、新たな病原大腸菌の判断基準に沿った食品での検査法を確立し、国の試験法の策定に貢献するだけでなく、諸外国からも参照される方法を確立することを目的とする。平成 27 年度には、増菌培養法を検討し、培地、培養温度および培養時間については、腸管出血性大腸菌の食品での検査法（食安監発 1120 第 1 号 平成 26 年 11 月 20 日発「腸管出血性大腸菌 026、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」、平成 27 年 3 月 24 日事務連絡）と共通して使用できることが明らかになった。今年度は、食品からの腸管出血性大腸菌(STEC)などの食中毒細菌の試験において、効率的な検査法のひとつとして用いられている免疫磁気ビーズ法を ETEC に応用することを検討することとした。また、免疫磁気ビーズ法の実施とともにビーズ濃縮液を ETEC 選択性に優れる分離培地に塗抹することによって分離効率の向上が考えられるため、平成 27 年度に得られた選択性に優れる抗生物質を添加した分離培地およ

び STEC の分離培地として開発・販売されている酵素基質培地を供試して、食品からの分離を検討することにした。

本研究で使用する ETEC7 血清群を対象とした免疫磁気ビーズは、東京都健康安全研究センターで自家作製されたものを使用した。本免疫磁気ビーズの作製については、別途、報告する（小西典子ら、協力研究報告「食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討」）。

B. 研究方法

(1) 各種寒天培地の 36 および 42 培養での ETEC コロニー形態の特徴

1) 供試菌株

供試菌株として、06(4 株)、025(2 株)、027(2 株)、0148(2 株)、0153(32 株)、0159(3 株)、0169(3 株)の 7 血清群、計 49 株の ETEC を用いた(表 1)。

2) 培養

室温下でカジトン培地に保存していた菌株を、ソルビトールマッコンキー(SMAC, オキシソイド)寒天培地 2 枚、クロモアガー-STEC 基礎培地(クロモアガー社)2 枚に画線した。1 枚は 37℃、1 枚は 42℃にて 24 時間培養し、コロニーを観察した。

(2) ETEC 主要 7 血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

検出感度を確認するための ETEC は、平成 27 年度(2015 年度)食中毒事件詳報や国立感染症研究所・感染情報センター

が公表する病原微生物検出情報（IASR、<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr.html>）から解析して決定した主要 7 血清群を対象とした。以下に方法を示す。また、そのフローを図 1 に示す。

1) 供試菌株

供試菌株として、06(STh、LT 陽性株)、025(STh 陽性株)、027(STp 陽性株)、0148(STh 陽性株)、0153(STh 陽性株)、0159(STp 陽性株)、0169(STp 陽性株) の 7 血清群を用いた（表 2）。

2) 供試菌株の培養

室温下でカジトン培地に保存していた供試菌 7 株を、それぞれトリプティケース・ソイ・ブロス(TSB、オキシイド) 10 ml に 1 エーゼ接種し、37 で 18 時間培養（約 1.0×10^9 cfu/ml）した。

供試菌株の計数には、各血清群の培養液（約 10^9 cfu/ml）0.1 ml をリン酸緩衝生理食塩水（ダルベッコ PBS(-)、日水製薬）0.9 ml にてそれぞれ 10 倍階段希釈して 10^{-6} （約 10^3 cfu/ml）希釈菌液を作製した。この希釈菌液 0.1 ml を 10 枚のトリプティケース・ソイ・アガー培地(TSA、オキシイド)に塗抹し、37 で 18~24 時間培養し、コロニー数を計測した。

3) 供試食品

供試食品は、東京都および埼玉県内のスーパーマーケットなど小売店で購入した生ワカメ（宮城県産）、キュウリ（高知県産および宮城県産）、根深ネギ（埼玉県産）、オオバ（茨城県産）、コネギ（大分

県産）を用いた。

各食品の一般生菌数および大腸菌群数の測定をするために、各食品を洗わず、滅菌したハサミおよびピンセットを用いて、食品の表面、内部など全体から採取した。そのうちの 10 g をストマッカー袋に秤量し、PBS 90 ml を加え 1 分間ストマッカー処理したもの（ 10^{-1} 希釈液）を PBS で $10^{-2} \sim 10^{-6}$ に 10 倍階段希釈した。一般生菌数については、各希釈液 0.1 ml を標準寒天培地(オキシイド)に塗抹し、 36 ± 1 で 24~48 時間培養し、コロニー数を計測した。大腸菌群数については、各希釈液 1 ml をシャーレに分注しデソキシコレート寒天培地（日水製薬）で混釈し、 36 ± 1 で 24~48 時間培養し、コロニー数を計測した。

4) 食品培養液の作製

3) と同様に食品の全体から採取した 25 g をストマッカー袋に秤量し、室温程度の mEC 培地(日水製薬) 225 ml をそれぞれに加え、ストマッカー処理を 1 分間行った後、 42 ± 1 で 20~24 時間培養した。

5) 試験に用いる ETEC 接種食品培養液の調整

2) の各血清群の ETEC 培養液（約 10^9 cfu/ml）0.1 ml を PBS 0.9 ml でそれぞれ 10^{-7} まで 10 倍階段希釈した。各血清群の ETEC について、 10^{-4} 希釈菌液（約 10^5 cfu/ml）0.1 ml を、食品培養液 0.9 ml（合計 1 ml）に接種し 10^{-5} 菌液接種食品

培養液(約 10^4 cfu/ml) を作製した。同様にして、各血清群の $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 希釈菌液(約 $10^4 \sim 10^2$ cfu/ml) 0.1 ml をそれぞれ食品培養液 0.9 ml に接種して $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 菌液接種食品培養液(約 $10^3 \sim 10^1$ cfu/ml) を作製した。

6) 免疫磁気ビーズ法

ETEC 接種食品培養液中の各血清群を東京都健康安全研究センターで作製した免疫磁気ビーズで濃縮した。なお、ビーズ作製の詳細については小西典子らの協力研究報告「食品を対象とした毒素原性大腸菌検出に用いる免疫磁気ビーズ作製方法の検討」に、別途記載する。

まず、食品培養液または ETEC 接種食品培養液($10^{-6} \sim 10^{-8}$ 菌液接種食品培養液、約 $10^4 \sim 10^1$ cfu/ml) の各 1 ml に対して、免疫磁気ビーズ 20 μ l ずつをマイクロチューブに加え、転倒混和を 2~3 回行い、10 分間室温で反応させた。これを 10 分間隔で 30 分間反応させた。つぎに、磁気スタンドにマイクロチューブをセットし、5 分間静置した。この間、チューブ内壁の 1 点に磁気ビーズが集まるように、磁気スタンドごと数回穏やかに転倒混和した。スタンドに置いたまま培地を短いトランファーパーペットで取り除き、新しいトランファーパーペットで PBS を 1 ml を加え、懸濁した。この PBS で洗う作業は 2 回繰り返す。0.1 ml の PBS に懸濁し、これを免疫磁気ビーズ濃縮液とした。

7) ETEC 接種食品培養液および免疫磁気

ビーズ濃縮液の選択寒天培地への塗抹・培養

ETEC 接種食品培養液を抗生物質加 SMAC 寒天培地 2 枚に 10 μ l ずつ画線した(直接塗抹法)。また、免疫磁気ビーズ濃縮液を SMAC 寒天培地 2 枚、抗生物質加 SMAC 寒天培地 2 枚およびクロモアガー STEC 基礎培地 2 枚の合計 6 枚に 10 μ l ずつ画線した(免疫磁気ビーズ塗抹法、IMS 塗抹法)。これら画線した 2 枚の培地のうち、1 枚は 37 で、もう 1 枚は 42 で 18~24 時間培養した。

8) 血清凝集試験

各寒天培地に生育したコロニーを観察し、ETEC と疑われるコロニーを培地から釣菌し、血清凝集反応試験を行った。ただし、血清群 06 と 0169 については、ETEC と疑われるコロニーを普通寒天培地や TSA など非選択培地に植菌し、37 で 18~24 時間培養した。培養後、コロニーを 50 μ l の PBS に懸濁し、121 で 1 時間、オートクレーブで加熱処理を行った。冷却後、5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去し、20 μ l の PBS に再懸濁した。これを加熱菌体浮遊液として血清凝集試験を行った。血清には、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研株式会社) の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を用いた。

C. 研究結果

(1) 各種寒天培地の 36 および 42 培

養での ETEC コロニー形態の特徴

SMAC およびクロモアガー-STE C 基礎培地に各供試菌 49 株を画線し、36 および 42 にて 24 時間培養した結果を表 1 に示す。両培地、両温度条件において、供試菌株の生育については、1 株を除き良好であった。

(2) ETEC 主要 7 血清群の免疫磁気ビーズの感度試験

1) キュウリ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合は、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法に供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 06 および 025 では IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC および直接塗抹法での抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0148 では IMS 塗抹法での SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 0159 および 0169 では IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC のみから分離された(表 3)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法での抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群(06、025、027、0153)、IMS 塗抹法での SMAC では 3 血清群(027、0148、0153)、IMS 塗抹法でのクロモアガー-STE C 基礎培地では 2 血清群(027、0153)であった(表 3)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合は、血清群 027 では IMS 塗抹

法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STE C 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0153 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 06 および 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 025 では IMS 塗抹法の SMAC のみ、血清群 0148 および 0169 では直接塗抹法の抗生物質加 SMAC からのみ分離された(表 3)。検出された血清群の数は、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 6 血清群(06、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群(06、027、0153、0159)、IMS 塗抹法の SMAC では 2 血清群(025、0153)、IMS 塗抹法のクロモアガー-STE C 基礎培地では 1 血清群(027)のみであった(表 3)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 の培養温度条件では、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC で抑制された。42 の培養温度条件では、37 より抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 025、0148 および 0169 では、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

2) 生ワカメ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養

した場合には、血清群 027、0153 および 0169 では IMS 塗抹法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の 3 寒天培地から分離され、血清群 06、025、0148 および 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離された(表 4)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 3 血清群(027、0153、0169)から分離されたが、IMS 塗抹法で供試した SMAC ではいずれの血清群も分離されなかった(表 4)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法に供試した抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 025 および 0148 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および IMS 塗抹法クロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法の SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0169 では IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の 2 寒天培地から分離された

(表 4)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC では 1 血清群(0159)のみであり、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 5 血清群(06、025、027、0148、0153)、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 5 血清群(025、027、0148、0153、0169)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 5 血清群(06、027、0148、0153、0159、0169)であった(表 4)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 2 血清群(0159、0169)で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

3) 根深ネギ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合には、血清群 025、027、0148、0153 および 0169 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法で供試した SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地から分離された(表 5)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 6 血清群

(025、027、0148、0153、0159、0169) が分離され、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では6血清群(06、025、027、0148、0153、0169)であった(表5)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 06、027 および 0153 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 4 寒天培地から分離され、血清群 025 では IMS 塗抹法の全 3 寒天培地から、血清群 0148、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地の 2 寒天培地から分離された(表5)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法で供試した SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地では全 7 血清群、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群(06、025、027、0153)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 3 血清群(06、027、0153)であった(表5)。

各条件下での寒天培地上の雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件ともに夾雑菌数が少なかった。特に、37 の培養温度条件での IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地では 1 血清群(06)、直接塗抹法の抗生物質加 SMAC では 2 血清群(0153、0159)で、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 3 血清群(0148、0159、0169)、直接塗抹法の抗生物質加 SMAC では 4 血清群(025、0148、0159、0169)で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

4) オオバ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合には、血清群 027 および 0148 では IMS 塗抹法で供試した SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 06、025、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0153 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離された(表6)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 6 血清群(06、025、027、0148、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群(027、0148、0153)であり、IMS 塗抹法のクロモアガー STEC 基礎培地からは分離されなかった(表6)。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合には、血清群 027 および 0159 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 06 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から、血清群 0148 および 0153 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離されたが、血清群 025 は全ての寒天培地からは分離されなかった(表6)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹

法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 6 血清群(06、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 4 血清群 (027、0148、0153、0159)、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 4 血清群 (06、027、0159、0169) であり、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地からは分離されなかった (表 6)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制されていた。特に、42 の培養温度条件での直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では 2 血清群 (025、0148) で、夾雑菌および ETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

5) コネギ培養液

塗抹した各種寒天培地を 37 で培養した場合は、血清群 025 および 0153 では IMS 塗抹法で供試した全 3 寒天培地から分離され、血清群 06 では IMS 塗抹法の SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から、血清群 027、0148、0159 および 0169 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地の 2 寒天培地から分離された (表 7)。検出された血清群の数は、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では全 7 血清群、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 6 血清群 (025、027、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群 (06、025、0153)

であり、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC からは分離されなかった。

塗抹した各種寒天培地を 42 で培養した場合は、血清群 027 および 0153 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0148 では IMS 塗抹法の SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から、血清群 0159 では IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 3 寒天培地から分離され、血清群 025 および 0169 では IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地および直接塗抹法の抗生物質加 SMAC の 2 寒天培地から分離され、血清群 06 では直接塗抹法の抗生物質加 SMAC からのみ分離された (表 7)。検出された血清群の数は、直接塗抹法による抗生物質加 SMAC では全 7 血清群、IMS 塗抹法のクロモアガー-STECC 基礎培地では 5 血清群 (025、0148、0153、0159、0169)、IMS 塗抹法の SMAC では 3 血清群 (027、0148、0153)、IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC では 3 血清群 (027、0153、0159) であった (表 7)。

各条件下での寒天培地上の夾雑菌の生育は、37 および 42 の両培養温度条件で抗生物質による夾雑菌の増殖は抑制される傾向であった。特に、42 の培養温度条件での IMS 塗抹法の抗生物質加 SMAC

では4血清群(06、025、0148、0169)で、夾雑菌およびETEC、いずれのコロニーも検出されなかった。

6) 食品培養液中の夾雑菌の生育

抗生物質加SMACではSMACおよびクロモアガー-STECC基礎培地と比較して、37℃培養で生ワカメ、オオバで夾雑菌の生育の抑制が認められ、42℃培養では夾雑菌の生育していなかった根深ネギを除いて、全ての食品で夾雑菌の生育の抑制が認められた(表8)。37℃と42℃培養を比較すると、SMACおよびクロモアガー-STECC基礎培地では夾雑菌の生育の差が認められないが、抗生物質加SMACでは、キュウリ、オオバ、コネギで夾雑菌の生育が42℃培養で抑制され、抗生物質に加え温度の効果が認められた(表8)。

D. 考察

IMSによるETEC分離率の向上効果を確認するために、IMS塗抹法と直接塗抹法の両方に使用した寒天培地である抗生物質加SMACの結果について、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計し表9に示した。血清群06では、37℃においても、両塗抹法とも非検出であったコネギ以外の4食品で直接塗抹法のほうが優れており、42℃培養においても、いずれの食品でも直接塗抹法にてETECが回収され、IMS塗抹法によってむしろ検出性が低下し、IMSによる分離率向上の効果は認められなかった。この理由として、夾雑菌の生育が

抗生物質加SMAC上で抑制されることに加え、血清群06がこの培地上での生育に優れるため直接塗抹法でも十分に検出できることが考えられた。加えて、免疫磁気ビーズに使用した抗06抗体の血清群06菌体との吸着が芳しくないことが考えられた。他の血清群では、両培養温度ともにIMS塗抹法のほうが直接塗抹法よりも検出性が優れる食品が多かった。特に、37℃培養においては全ての血清群および食品において検出された。全血清群を総合すると、IMSを行い、抗生物質加SMACに塗抹して37℃で培養することによって、食品培養液中のETECが約 10^4 CFU/mlの濃度以上であれば、ETECを分離することが可能であることが示された。

また、クロモアガー-STECC基礎培地はIMS塗抹法において使用されたため、IMS塗抹法に使用された他の2種類の寒天培地であるSMACおよび抗生物質加SMACと比較することとし、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計した(表10-1および表10-2)。37℃培養においては、クロモアガー-STECC基礎培地でND(ETECと思われるコロニーがなかったため非分離であったもの)の場合が多く見られ、抗生物質加SMACのほうがETEC分離に優れていた。その理由として、クロモアガー-STECC基礎培地は抗生物質加SMACよりも食品の夾雑菌を抑制する選択性に乏しいことが考えられた。一方、42℃培養においては、37℃培養に比べて検出が多少向上す

る傾向が認められたが、抗生物質加 SMAC に比べると 37 培養と同様に劣っていた。42 培養による ETEC の選択分離は期待されなかった。なお、SMAC との比較においては、クロモアガー-STE C 基礎培地のほうが血清群 0169 において検出性が優れていたが、他血清群では食品によって結果は異なり総合すると同等程度と考えられた。全体的に ETEC の選択分離に有用とは考えられなかった。今後、選択性を強めることを検討することによって、優れた選択分離培地となることが考えられた。

また、抗生物質を SMAC に加えることでの選択性向上の効果を確認するために、SMAC と抗生物質加 SMAC の結果を、血清群ごとに、また、培養温度ごとに集計した(表 11-1 および表 11-2)。血清群 0169 以外の血清群では、両培養温度ともに抗生物質を加えることで SMAC に比べてどの血清群においても検出性が向上する食品が多く認められた。37 培養において、その傾向は強かった。特に、SMAC では ND (ETEC と思われるコロニーがなかったため非分離であったもの)であったものが抗生物質加 SMAC では分離される場合が多数認められ、本研究で供試された抗生物質が ETEC 分離に優れた選択性を有することが示された。

以上のことから、血清群および食品を総合的に考えて方法を比較したところ(表 12-1 および表 12-2) 免疫磁気ビーズ法を行い抗生物質加 SMAC に塗抹し、

37 で培養する方法が ETEC の分離に優れており、血清群 06 では直接塗抹法によっても優れた結果が得られることが期待される。

E. 結論

本研究では、(1) ETEC の上位 7 血清群の 06、025、027、0148、0153、0159、0169 を対象として、食品、特に野菜からの分離培養における免疫磁気ビーズ法の効果を検討した。また、(2) ETEC の選択分離培地の開発を目指して、平成 27 年度の研究成果から有用と考えられた抗生物質を寒天培地に添加し菌の検出性を検討した。加えて、寒天平板培地の培養温度を 42 に高めることでの選択性の向上効果を検討した。その結果、7 血清群の免疫磁気ビーズの有用性が確認され、特に、ETEC の選択性が高い抗生物質を加えた SMAC を組み合わせることで格段に効率的な ETEC の分離が行えることが期待された。また、42 での選択培地の培養は ETEC の生育に抑制的であり、一般的には 37 での培養が良いと考えられた。本研究から、免疫磁気ビーズ法および抗生物質を加えた分離培地を使用することによって、効率的な ETEC の分離培養法が確立されることが考えられた。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Otsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, Y., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y., and Terajima, J. An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *Int. J. Food Microbiol.* 230:81-88, 2016.

2. 学会発表

森 哲也、長尾清香、岸野かなえ、難波豊彦、伊藤武、工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌検出における DNA 抽出と遺伝子検出法の検討. 第 111 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 28 年 5 月 19、20 日. 東京.

Lee, K., Kobayashi, N., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Tsubone, H., Kumagai, S. and Hara-Kudo, Y. 2016. Spread and change in stress resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 on food-related fungal colonies, International Symposium of Mycotoxicology 2016, Tokyo, Japan.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし