

資 料

志賀毒素産生性大腸菌 O157 検査における前増菌培養の有効性の検討

村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 堀川和美, 高田 智

県内の診療施設の入院患者及び職員に、志賀毒素産生性大腸菌を病因物質とする食中毒が発生した。そこで、冷凍保存されていた72検体の食品残品を、2種類の培養法を用いて検査した。方法1では、検体を、9倍量の緩衝ペプトン水を用いて培養し、その後、ノボビオシンを添加した *modifide Escherichia coli* プイヨンで培養し、免疫磁気ビーズ法にて処理した後、寒天培地に画線培養した。方法2では、前増菌培養を実施せずノボビオシンを添加した *modifide Escherichia coli* プイヨンによる増菌培養から始めた。その結果、方法1では、志賀毒素産生性大腸菌 O157 : H7 は、分離されなかったが、方法2では、2種類の食品残品（マサドニアンサラダ及びおかか和え）から、当該細菌が検出された。

[キーワード : 食中毒, 志賀毒素産生性大腸菌O157, 検査法]

1 はじめに

食中毒を起す細菌の食品からの分離には、分離培地の使用の前段階で選択培地が多く用いられている。しかしながら、もし食中毒細菌による汚染があったとしても、冷凍された食品では、これらの細菌も損傷を受けており、選択培地中の選択剤（化学療法剤、胆汁酸塩等）が、これらの損傷を受けた食中毒細菌の検出を妨げることが知られている^{1, 2)}。このためサルモネラや赤痢菌の食品からの検出には、食品中の損傷された菌を修復するために、非選択性の培地、特に緩衝ペプトン水で前増菌することが一般的となりつつある^{3, 4)}。冷凍された食品中の志賀毒素産生性大腸菌の検出においても、非選択性の増菌培地にて前増菌し、その後、培養中の増菌培地に選択剤を添加して培養する方法の有効性が報告されている^{1, 2)}。実際の食中毒の検査では、学校、病院、福祉施設等で事件が起こった場合、原因食品や病因物質の検出のために、冷凍された保存食品を検査することが多い。今回、実際の食中毒事件において、選択剤の入っていない緩衝ペプトン水にて前培養した後、選択増菌した方法と、前増菌を用いず、直接選択増菌培地であるノボビオシンを添加した *modifide Escherichia coli* プイヨン (mEC-NB) にて培養した方法を併用したので、結果を報告する。

食中毒事件は、平成14年7月20日に県内の病院において他の診療施設から転院してきた患者が血便を呈し、検

査したところ志賀毒素産生性大腸菌 O157 が検出されたとの届出から探知された。その後の調査で、診療施設の入院患者及び職員に下痢等の消化器症状を呈しているものがあり、検査の結果、志賀毒素産生性大腸菌 O157 が検出された。そのため、この診療施設の給食が原因食品でないかと考えられ、当所にて検査を行った。

2 方法

7月2日から12日までの食品残品のうち、冷凍保存されていた魚のアーモンドフライや卵の花など72検体を検査した。方法1では、検体を25g 秤量し、9倍量の緩衝ペプトン水を加え、ストマッカー (Seward Medical) にて1分間処理した。これを16時間、37℃にて培養し、培養後、十分に混和し、培養物1ml を mEC-NB (sodium novobiocin: 20mg/l, 極東製薬工業) 10ml に添加し、37℃にて18時間培養した。培養後、Dynabeads Anti-*E. coli* O157 (Dynal) を用いて、免疫磁気ビーズ法にて処理し、その後、CHROMagar O157™ (CHROMagar) 及びソルビトールマッコンキー寒天培地に cefixime (0.05 mg / l), 及び亜テルル酸カリウム (2.5 mg / l) を添加した CT-SMAC 寒天培地に画線培養した。

方法2では、検体を25g 秤量し、9倍量の mEC-NB を加え、ストマッカーにて1分間処理し、これを18時間、37℃にて培養した。その後の処理は方法1と同様である。

	方法 1	方法 2
1日目	緩衝ペプトン水にて培養 (37℃16時間)	ノボビオシンを添加した modifide <i>E. coli</i> broth にて培養 (37℃18時間)
2日目	↓ ノボビオシンを添加した modifide <i>E. coli</i> broth にて培養 (37℃18時間)	↓ プレーティング (免疫磁気ビーズ法 処理後)
3日目	↓ プレーティング (免疫磁気ビーズ法処理後)	↓ 釣菌
4日目	↓ 釣菌	↓ 判定 (2検体より志賀毒素産生性 大腸菌 O157 検出)
5日目	↓ 判定 (O157 検出せず)	

図1 検査方法の比較と検査結果

3 結果及び考察

方法1では、いずれの検体からも志賀毒素産生性大腸菌は検出されなかった。しかし、方法2により、7月6日の献立「マサドニアンサラダ」（人参、ジャガイモ、キュウリ、ハム等からなる）及び7月9日の献立「おかか和え」（たまねぎ、かいわれ大根、おかか等からなる）から、大腸菌 O157 が分離された。分離された大腸菌 O157 は、志賀毒素（STX1及び STX2）を産生すること、及びそれらの遺伝子 *stx1* 及び *stx2* を保有することを、逆受身ラテックス凝集反応（デンカ生研、東京）及び Polymerase chain reaction 法にて、それぞれ確認した。また、パルスフィールド・ゲル電気泳動法を用いた菌の分子疫学的検討において、これら2検体の食品から分離された菌株は、患者由来菌株と同一のパルスフィールドパターンを示した。以上の結果から、この食中毒事件の原因食品は、診療施設における7月6日及び9日の給食であると断定された。

また、これら食品の検査に加えて同時に実施した原因施設の拭き取り材料39検体からは、志賀毒素産生性大腸菌 O157:H7 は分離されなかった。

今回の検討において、選択剤の添加していない緩衝ペプトン水を前増菌に用い、その後選択増菌培地にて増菌する方法では、志賀毒素産生性大腸菌は検出できなかったが、前増菌を用いずに直接選択培地にて増菌する方法では菌が検出された。

志賀毒素産生性大腸菌の検出には、選択剤が入った培

地である mEC-NB にて増菌し、その後、免疫磁気ビーズ法を組み合わせ、分離用寒天平板培地に画線培養する方法が一般的である³⁾。しかし、冷凍等により菌が損傷を受けている場合には、菌を損傷から回復させるために、非選択性の増菌培地の使用が有用であることが報告されている。Hara-Kudo ら¹⁾は、選択剤の入っていない **modifide** *Escherichia coli* プイヨン (mEC) にて2時間、25℃で前増菌し、その後、培養中の mEC に選択剤を添加して培養する方法が、野菜を含めた冷凍した食品中の志賀毒素産生性大腸菌 O157:H7 の検出に有効であったことを報告している。また、同様の報告が Nakagawa らによってもなされている²⁾。

今回の検討では、選択剤の入っていない増菌培地で前増菌するよりも、前増菌なしで選択増菌の方が検出率がよかった。このことは Hara-Kudo¹⁾ らや Nakagawa²⁾ らの報告と矛盾する。この原因については、緩衝ペプトン水を前増菌に用いたことが不適切、あるいは、緩衝ペプトン水による前増菌の時間が長すぎたなどの要因が考えられる。しかし、志賀毒素産生性大腸菌 O157:H7 の一般的な検出における緩衝ペプトン水の有効性について Foster ら⁶⁾は、ウシの糞便を用いた実験で報告しており、Weagant と Bound⁷⁾もアルファルファを用いた実験で、緩衝ペプトン水に選択剤を添加した増菌培地がトリブチケースソイブロスや mEC 培地に選択剤を添加した培地よりも有用であったことを報告している。Sata ら⁸⁾は、チオグリコール酸塩を添加した緩衝ペプトン水が

radish sprout からの O157 の検出に有効であったことを報告している。この様に緩衝ペプトン水を用いることは O157 の検出に問題とはならないと考えられる。そのため、今回の検討では、緩衝ペプトン水による前増菌の時間が長すぎたため、目的とする菌を検出できなかったとも考えられるが、選択剤を含まない培地による前増菌の有効性については異なる意見もある。Reinders ら⁹⁾ は、modified tryptone soya broth にノボジオシンを添加した培地で選択増菌培養する方が、選択剤を含まない緩衝ペプトン水で6時間前増菌し、その後選択増菌培養する方法よりも優れていたと報告している。いずれにせよ、今回の検討をもって、比較した検出方法の良否にまで言及することは困難である。しかしながら、検出方法の良し悪しを検討する場合、殆どが人工的に細菌を添加した検体を用いて実験がなされているなかで、今回は実際の食中毒事例において検出方法の比較を行ったものであり、われわれにとっては、重要な結果であった。食品の種類によっても最適な検出（培養）方法は異なる²⁾が、実際の食中毒事件で、多数の検体を前に、多種類の検出方法を同時に行うのは現実的でない。限られた時間的、人的条件の中で多数の検体をより効率的、より高精度に検査するための方法については、更なる検討が望まれる。

今回の報告を行うに当たり、貴重な資料をご提供いただきました福岡県保健福祉部生活衛生課梅崎誠治係長はじめ生活衛生課の関係各位、並びに嘉穂保健福祉環境事務所多田俊助衛生課長はじめ関係各位に深謝いたします。

文献

- 1) Y. Hara-Kudo *et al.* : Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2866-2872, 2000
- 2) H. Nakagawa *et al.* : Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. *Int. J. Food. Microbiol.*, 60, 107-110, 2000.
- 3) 村上光一ら : 鶏の液卵のサルモネラ検査法解説 培地写真集, 福岡県報告書. 2000.
- 4) 小沼博隆ら : 食品から赤痢菌検出に関する研究, 厚生科学究費補助金(厚生科学特別研究事業)平成13年度研究報告書. 2002.
- 5) 堀川和美ら : 牛挽肉, ポテトサラダおよび野菜のドレッシング和えからの腸管出血性大腸菌 O157 の検出における培養法, 免疫磁気ビーズ, イムノクロマト系簡易キットの有効性. *日食微誌*, 19, 187-194, 2002.
- 6) G. Foster. *et al.* : A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* O157 from bovine faeces. *J. Appl. Microbiol.* 95, 155-159, 2003.
- 7) S. D. Weagant and A. J. Bound : Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 87-92, 2001.
- 8) S. Sata *et al.* : An improved enrichment broth for isolation of *Escherichia coli* O157, with specific reference to starved cells, from radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1858-1860. 2003.
- 9) R. D. Reinders *et al.* : Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1015-20, 2002.