

平成 18 年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成 18 年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「腸管出血性大腸菌の簡易・迅速検出システムの構築」

平成 19 年 2 月

国立医薬品食品衛生研究所
工藤 由起子 主任研究官

研究報告書

腸管出血性大腸菌の簡易・迅速検出システムの構築

分担研究者 工藤 由起子（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

腸管出血性大腸菌は 1996 年に大阪府で学校給食を原因として大規模な食中毒を発生して以来、本菌の感染者数は横ばいか漸増傾向が続いている。1999 年～2004 年の感染届出数は、約 3,000～4,000 であり、そのうち 70%前後を血清型 0157 が占め、20%前後を 026、数%を 0111 が占めており、残りをその他種々の血清型が占めている。このため、血清型 0157 を中心とするものの Vero 毒素（VT）産生大腸菌の検出が重要となる。現在の検出方法では、一連の試験に 4 日以上を要する。この方法は厳密に検出が必要な際には優れているが、食品製造工程での試験としては迅速性に劣る。また、製造現場で容易に操作できるより簡易な方法も求められる。そこで、VT を検出対象とし、試験時間の縮小と比較的操作が簡易である方法を組み合わせて検討した。菌株は VT 産生の腸管出血性大腸菌血清型 0157、026、0111、0128 および OUT を使用し、これらの菌を TSB、BPW、mEC および NmEC で 36 および 42℃ で 8 時間振盪培養を行い、VT の検出に適した培養条件について検討した。この条件を基に、菌を接種した食品について VT の検出に適した培養条件について検討した。また、VT の検出における前処理方法についても検討した。

その結果、NmEC での 42℃ 8 時間培養でも菌が十分に増殖し菌からの VT 放出処理であるポリミキシン処理または細胞破碎処理をすることによって簡易 VT 検出法で VT 検出が可能である事が明らかになった。しかし、OUT では定常期に達していても VT が検出されなかった。また、培養時間を 15 時間に延長することによって前処理なしでも VT が検出される血清型もあった。

1. 研究目的

腸管出血性大腸菌は 1996 年に大阪府で学校給食を原因として大規模な食中毒を発生して以来、本菌の感染者数は横ばいか漸増傾向が続いている。1999 年～2004 年の感染届出数は、約 3,000～4,000 であり、そのうち 70%前後を血清型 0157 が占め、20%前後を 026、数%を 0111 が占めており、残りをその他種々の血清型が占めている。このため、血清型 0157 を中心とするものの Vero 毒素（VT）産生大腸菌の検出が重要となる。現在の検出方法では、食品検体を 18 時間以上の選択増菌培養後、血清型に特異的な免疫磁気ビーズ法による濃縮操作を行う。この濃縮液を選択分離培地に塗抹し 18 時間以上の培養後に生育したコロニーのうち疑われるものについては生化学性状や VT 産生性の確定試験を行う。これら一連の試験は 4 日以上

を要する。この方法は厳密に検出が必要な際には優れているが、食品製造工程での試験としては迅速性に劣る。また、製造現場で容易に操作できるより簡易な方法も求められる。さらに血清型に特異的であり多種の血清型には対応が困難である。このため、VT を検出対象とし、試験時間の縮小と比較的操作が簡易である方法を組み合わせてシステム化することを目的とする。

2. 研究方法

1) 供試菌株

Escherichia coli 0157:H7 (VT1&2 産生)

Escherichia coli 026:H11 (VT1&2 産生)

Escherichia coli 0111 (VT1 産生)

Escherichia coli 0128 (VT1&2 産生)

Escherichia coli OUT (VT2 産生)

2) 供試食品

豪州および国産牛合い挽き肉を、試験当日に東京都内の小売店で購入し使用した。これら供試牛挽肉中の一般生菌数は概ね 10^5 cfu/g であり、大腸菌群数は概ね 10^3 cfu/g であった。

3) 供試培地

増菌培地には、非選択培地として Tryptone Soya Broth (TSB) および Buffered Peptone Water (BPW) を使用し、選択培地として modified EC (mEC) およびノボピオシン加 mEC (NmEC) を使用した。また、菌数測定には非選択培地として Tryptone Soya Agar (TSA) を使用し、選択培地として各血清型に合わせて以下の培地を使用した。血清型 0157 には CHROMagar 0157 TAM 寒天培地およびセフィキシム・亜テルル酸カリウム添加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC)、血清型 026 にはセフィキシム・亜テルル酸カリウム添加 RX 026 寒天培地 (CT-RX 026)、亜テルル酸カリウム・セフィキシム添加ラムノースマッコンキー寒天培地および CT-SMAC、血清型 0111 には CT-SMAC および CT-RX 026、血清型 0128 および OUT には CHROMagar 0157 TAM 寒天培地および CT-RX 026 を使用した。

4) 接種用菌液の調製

カジトン培地で保存してある供試菌株を TSB 10 ml に 1 白金耳接種し、37°C で 18 時間培養した。これをリン酸生理食塩水で 10 倍階段希釈し、菌数が 100、1,000 および 10,000 cfu/ml となるように調整し、接種用菌液とした。

5) 検体の調製および増菌培養

① 純培養における増菌培養

200 ml 容三角フラスコに TSB、BPW、mEC および NmEC を 100 ml 加え、100cfu/ml に調整した接種用菌液を 0.1 ml 接種した。これを Water bath shaker personal-11(タイテック)で 36 および 42°C で 8 時間振盪 (110 rpm) させながら培養した。

② 菌接種した食品における増菌培養

ストマフィルターに牛挽肉を 25 g 採取し、接種用菌液を 0.1 ml 接種した。菌液をなじませた後、ヒートシーラーで密閉し、4°C で 3 日間の冷蔵保存および -25°C で 1 週間の冷凍保存をした。増菌培養は室温に戻した検体に 36°C に温めておいた TSB、mEC および NmEC を 225 ml 添加し、1 分間ストマッカー処理後、ストマッカー袋ごと振盪機 Shaker-LR (タイテック) を設置した恒温器にて 36 または 42°C で 8 および 15 時間振盪させながら培養した。

6) 菌数測定

① 純培養における増菌培養

増菌培養液をリン酸生理食塩水で 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、各希釈液を TSA に 0.1 ml 塗抹し、37°C で 24 時間培養後コロニー数を計測し、菌数を算出した。

② 菌接種した食品における増菌培養

増菌液をリン酸生理食塩水で 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、各希釈液を各血清型に対応した平板培地に 0.1 ml ずつ塗抹し、37°C で 24 時間後典型コロニーを計測し、菌数を算出した。

7) イムノクロマトグラフィーによる VT 検出

腸管出血性大腸菌の VT 検出用イムノクロマトグラフィーキットとしてキャピリア VT を使用した。テストプレート上の試料滴下部に増菌培養液 0.1 ml を滴下し、室温で 15 分間反応させた後に判定部に現れる赤紫色のラインの濃さで判定を行い、わずかでもラインが認められたものを陽性とした。(図 1)。また、VT の放出を強化することを目的に増菌培養液中の菌からの VT 放出方法を検討した。増菌培養液 180 μ l に 50,000 U/ml のポリミキシン溶液を 20 μ l 添加し、37°C で 10 分間反応させた後に検出を行った。また、ガラスビーズ 0.1 g に増菌培養液を 300 μ l 添加し、細胞破碎装置で 1 分間破碎処理し、氷上で 1 分間静置させ、再度 1 分間破碎処理後に検出を行った。

3 結果および考察

1) 純培養菌の増菌培養条件の比較

TSB で 36℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても 10^8 cfu/ml 以上であったが、VT が検出されたのは血清型 0157 および 026 のみであった(図 2)。TSB で 42℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても約 10^9 cfu/ml であり、すべての血清型で VT が検出された(図 3)。BPW で 36℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても 10^7 cfu/ml 以上であったが、血清型 0157 および 026 のみ VT が検出された(図 4)。BPW で 42℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても 10^7 cfu/ml 以上であったが、血清型 0157 および 0111 のみ VT が検出された(図 5)。mEC で 36℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても 10^7 cfu/ml 以上であり、OUT 以外の血清型で VT が検出された(図 6)。mEC で 42℃培養した培養液では血清型 0157 および 026 の菌数が 10^6 cfu/ml 以下であり、VT は検出されなかった。その他の血清型の菌数は 10^7 cfu/ml 以上であり、血清型 0111 および 0128 で VT が検出された(図 7)。NmEC で 36℃培養した培養液の菌数はいずれの血清型においても 10^6 cfu/ml 以下であり、VT は検出されなかった(図 8)。NmEC で 42℃培養した培養液では血清型 026 の菌数が約 10^3 cfu/ml であり、VT は検出されなかった。血清型 0157 および 0111 の菌数は約 10^6 cfu/ml であったが VT が検出された。その他の血清型は 10^7 cfu/ml 以上であったが VT は検出されなかった(図 9)。血清型 OUT はいずれの培養条件においても供試した血清型の中で菌数が最も多く増殖しているにもかかわらず、VT は検出されなかった。

これらのことから、純培養では供試した培養条件のうち TSB 42℃、mEC 36℃ および NmEC 42℃培養が優れていることが明らかになった。また、血清型の違いによって VT の産生量が異なることや、同じ血清型でも培地や培養温度の違いによって VT の産生量が異なることが示された。

2) 食品の増菌培養条件および VT 放出強化方法の検討

- (1) 菌液接種後、冷凍保存した牛挽肉の 8 時間培養液について、mEC での 36℃培養では血清型 0157 を 1,000 cfu 接種した検体のみ VT が検出された(表 1)。NmEC での 42℃培養では血清型 0111 を 1,000 cfu 接種した検体、また血清型 0157 および 026 を 100 cfu 接種した検体において VT が検出された。TSB での 42℃培養では血清型 026 および 0111 を 1,000 cfu 接種した検体、また血清型 0157 を 100 cfu 接種した検体において VT が検出された。しかし、血清型 0128 および OUT は最も高い接種菌数である 1,000 cfu 接種においてもいずれの培養条件でも VT が検出されなかった。また、10 cfu 接種ではいずれの血清型および培養条件でも VT が検出されなかった。これは牛挽肉が雑菌で汚染されており、対象菌の増殖が阻害されたためと考えられた。以上のことから設定した培養条件のうち、NmEC 42℃培養が優れていると考えられた。
- (2) 牛挽肉 25 g あたり 10 cfu 接種後、冷蔵保存した検体について NmEC での

42℃ 8 時間培養した結果、血清型 0157、026 および 0111 の菌数は約 10^6 cfu/ml であり、VT は検出されなかった（表 2）。血清型 0128 および OUT の菌数は 10^7 cfu/ml 以上であったが VT は検出されなかった。しかし、ポリミキシン処理をすることによって血清型 OUT 以外の血清型において VT が検出された。また細胞破碎処理をすることによって血清型 0157、026 および 0111 において VT が検出された。冷凍保存した検体について NmEC での 42℃ 8 時間培養した結果、血清型 026 および 0111 の菌数は約 10^6 cfu/ml であり、血清型 0157 の菌数は約 10^7 cfu/ml であった。血清型 0128 および OUT の菌数は 10^7 cfu/ml 以上であった。培養後無処理で VT の検出を行った結果はいずれの血清型においても VT は検出されなかったが、ポリミキシンまたは細胞破碎処理をすることによって血清型 OUT 以外において VT が検出された（表 3）。

これら冷蔵保存および冷凍保存における培養後の菌数にはほとんど差は見られなかった。また、VT の判定結果にもほとんど差は見られなかった。これらのことから 8 時間培養後にポリミキシンまたは細胞破碎処理を行うことによって血清型 OUT 以外において VT の検出が可能であることが明らかとなった。

(3) 牛挽肉 25 g あたり 10 cfu 接種後、冷蔵保存した検体について NmEC での 42℃ 15 時間培養した結果、血清型 0157、026 および 0111 において VT が検出された（表 4）。また、ポリミキシン処理をすることによって血清型 0128 でも VT が検出された。冷凍保存した検体について NmEC での 42℃ 15 時間培養した結果、菌数はいずれの血清型においても約 10^9 cfu/ml であった。血清型 0157、026 および 0111 において VT が検出された（表 5）。またポリミキシンまたは細胞破碎処理をすることによって血清型 0128 でも VT が検出された。

これら冷蔵保存および冷凍保存における VT 判定結果にはほとんど差は見られなかった。培養時間を 15 時間に延長することによって 8 時間培養よりも菌数が増加し、定常期に達したと考えられた。VT 判定結果は 8 時間培養の時よりもラインが濃く、判定が容易であった。これは菌数の増加に伴い VT の産生量が増加したためと考えられた。血清型 OUT については菌数が定常期に達していてもいずれの VT 放出強化処理においても VT の検出が認められなかったため、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上の結果から、腸管出血性大腸菌の主要な血清型である 0157、026、0111 および 0128 についての牛挽肉からの検出には、NmEC で 42℃ 8 時間培養後にポリミキシンまたは細胞破碎処理による菌からの VT 放出強化によって簡易 VT 検査キットを使用する迅速法が有用であると考えられた。

陽性



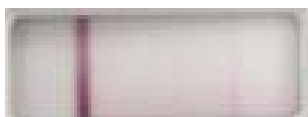
＋：(はっきりと見える)



w：(薄く見える)

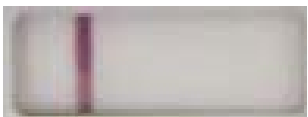


ww：(とても薄く見える)



±：(よく見ると見える)

陰性



－：(何も見えない)

図-1 イムノクロマトグラフィーキットの判定条件

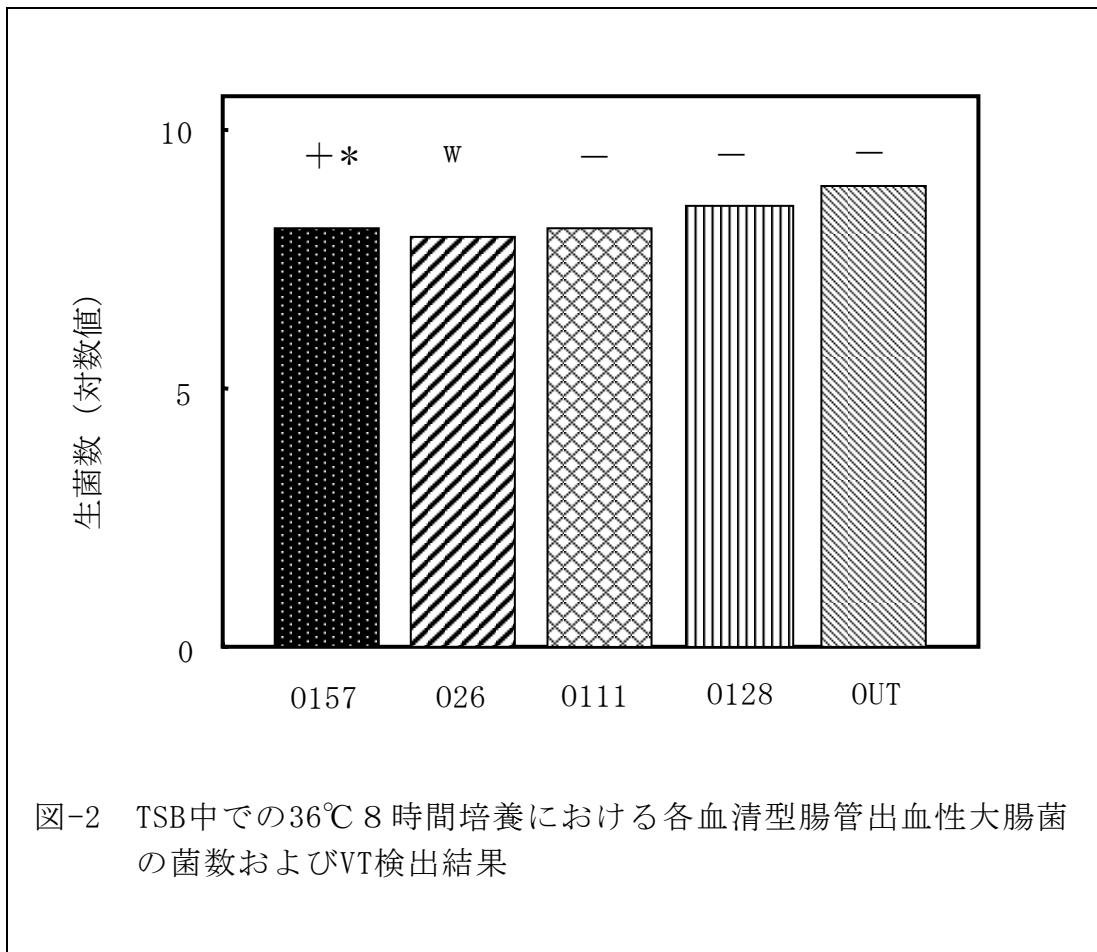
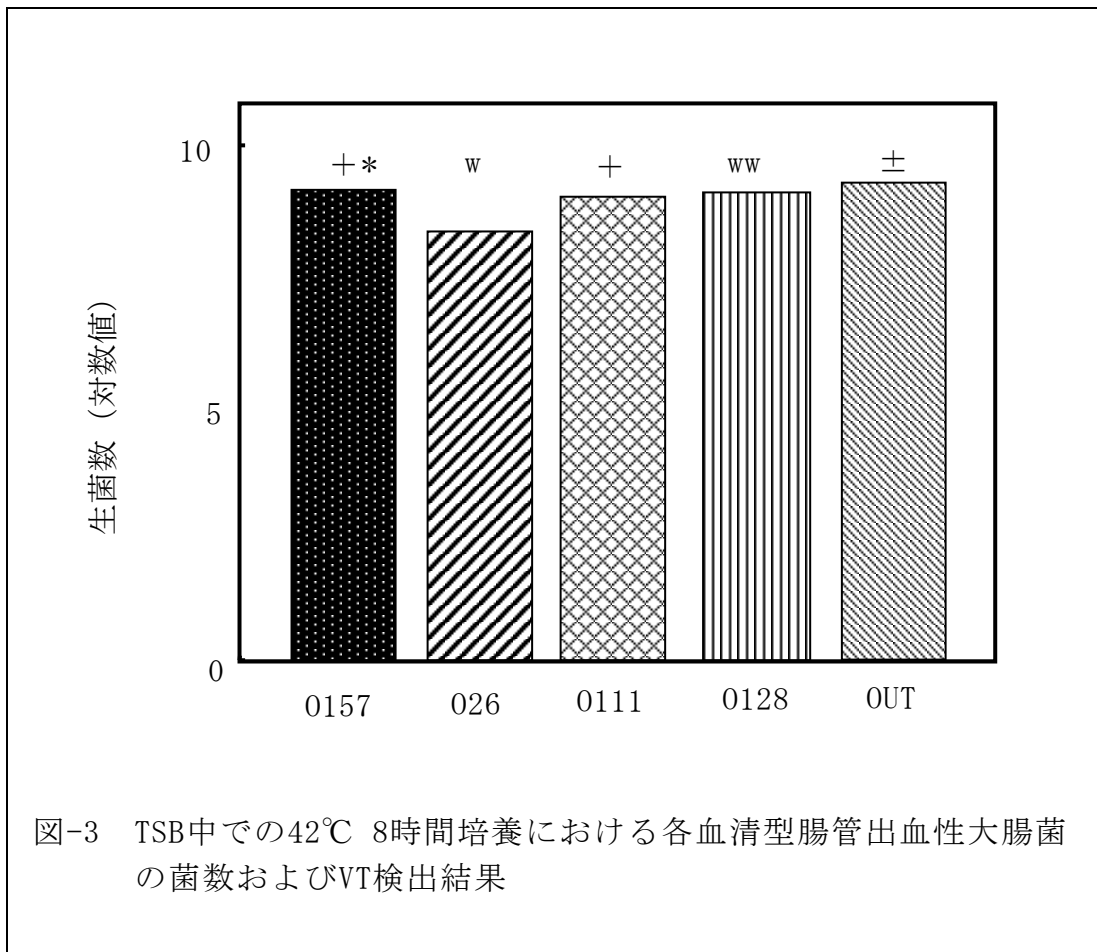


図-2 TSB中での36°C 8時間培養における各血清型腸管出血性大腸菌の菌数およびVT検出結果

*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果



*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果

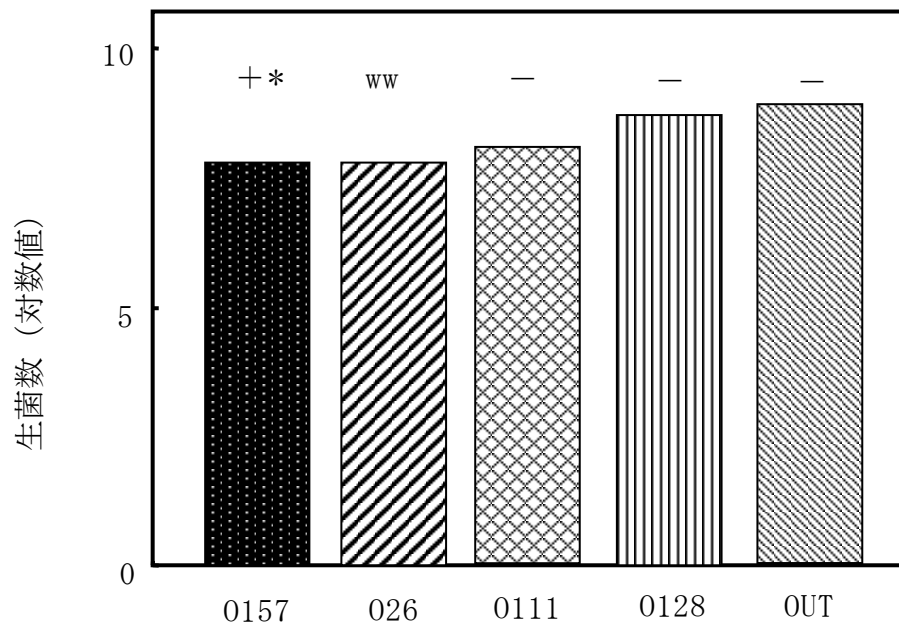


図-4 BPW中での36°C 8時間培養における各血清型腸管出血性大腸菌の菌数およびVT検出結果

*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果

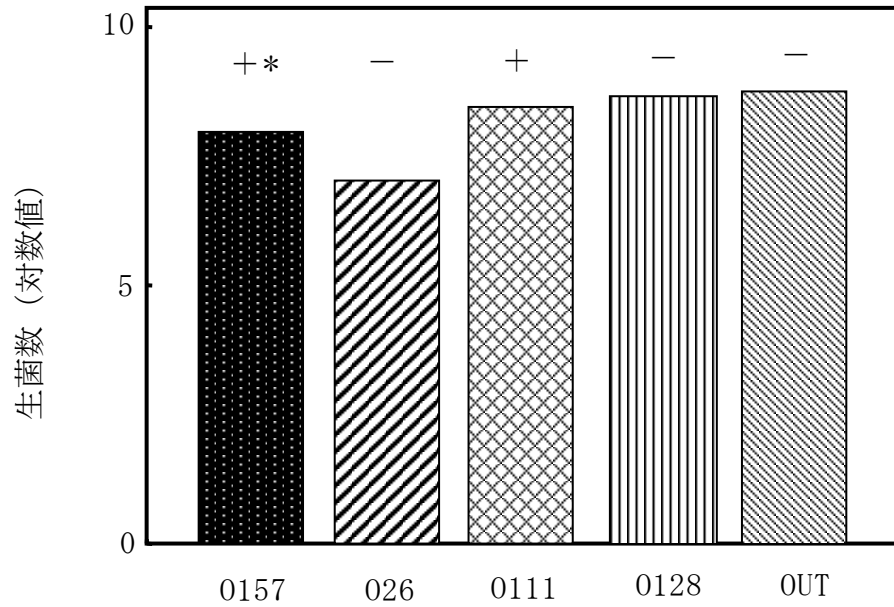


図-5 BPW中での42℃ 8時間培養における各血清型腸管出血性大腸菌の菌数およびVT検出結果

*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果

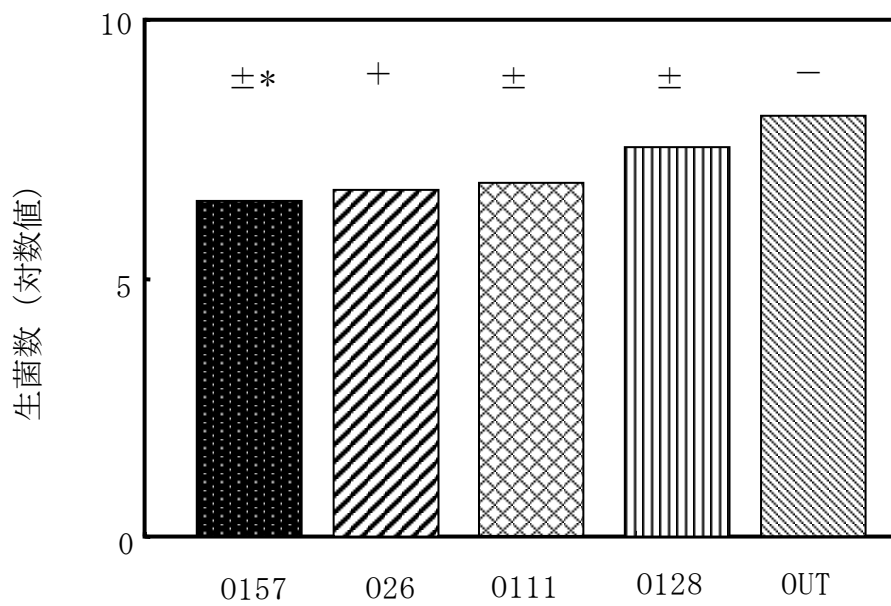


図-6 mEC中での36℃ 8時間培養における各血清型腸管出血性大腸菌の菌数およびVT検出結果

*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果

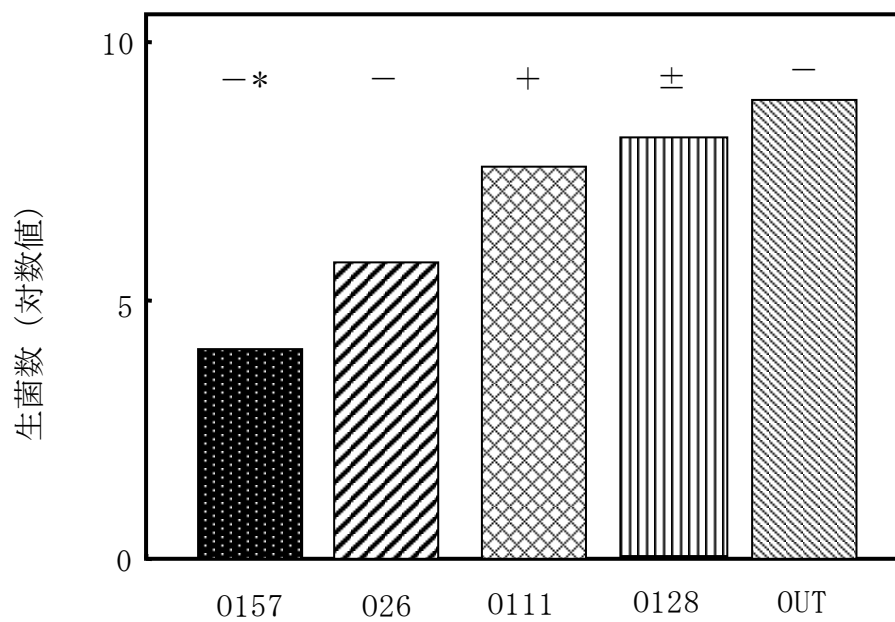
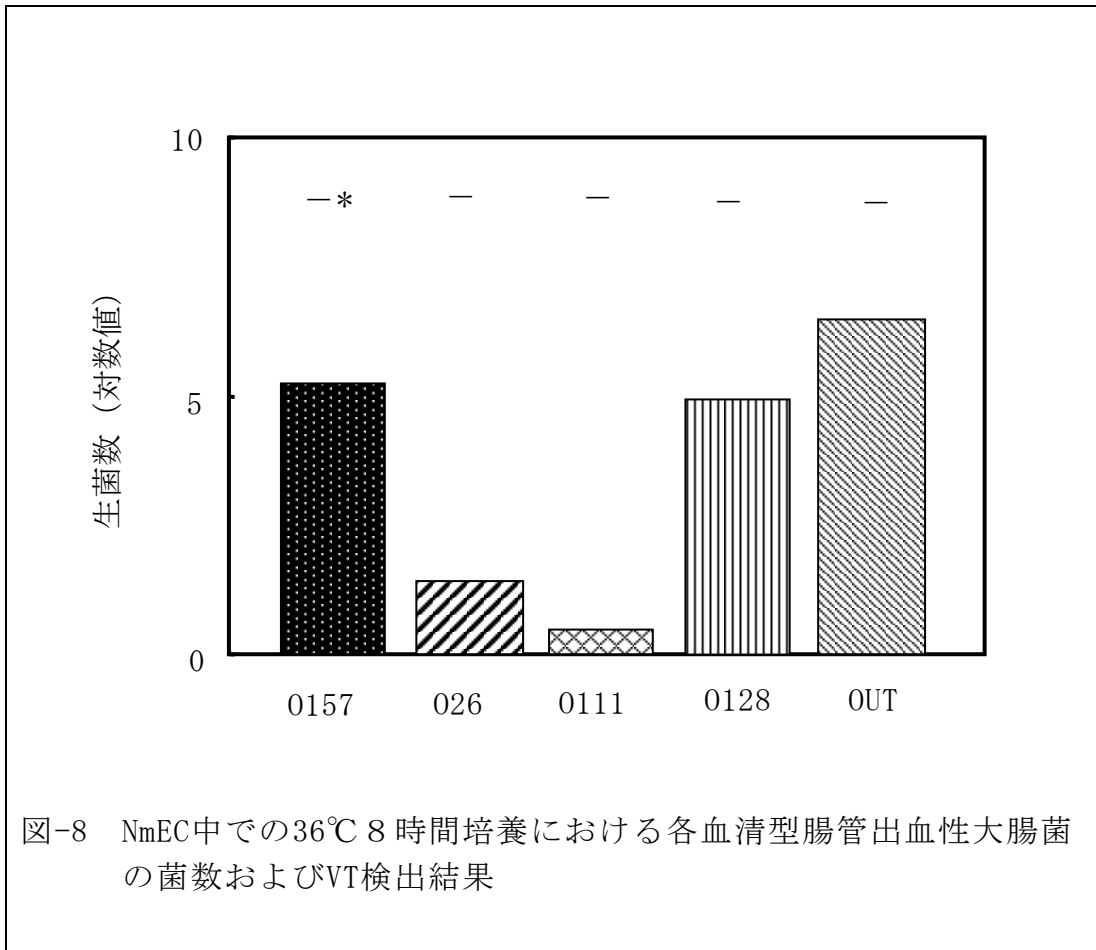
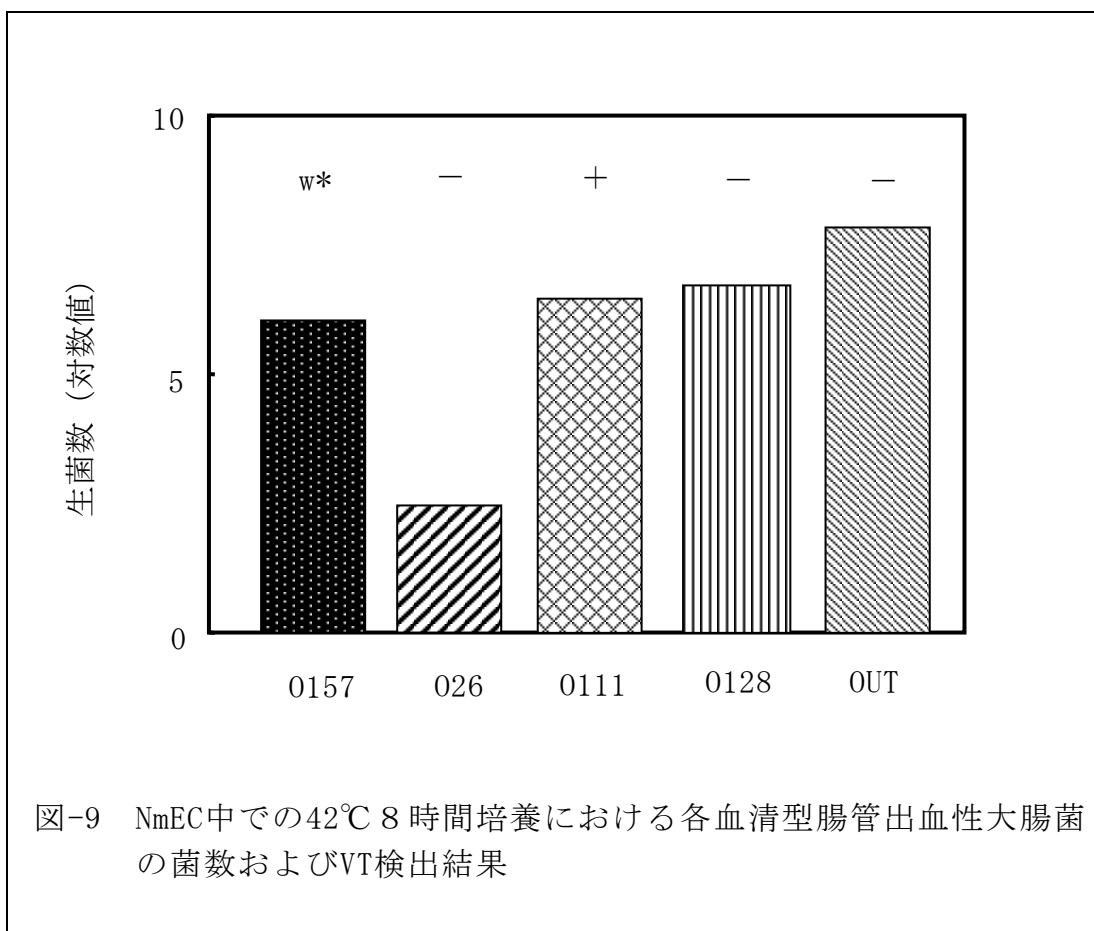


図-7 mEC中での42℃ 8時間培養における各血清型腸管出血性大腸菌の菌数およびVT検出結果

*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果



*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果



*イムノクロマトグラフィーキットでの判定結果

表-1 各血清型腸管出血性大腸菌を接種し、冷凍保存した牛挽肉についての8時間培養によるVT検出結果

血清型	mEC 36°C*			NmEC 42°C			TSB 42°C		
	10**	100	1000	10	100	1000	10	100	1000
0157	—	—	w	—	+	+	—	±	+
026	—	—	—	—	±	+	—	—	+
0111	—	—	—	—	—	w	—	—	w
0128	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OUT	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 培養条件

** 検体25 gあたりに接種した菌数 (cfu)

表-2 菌接種冷蔵牛挽肉検体のNmEC中での42℃ 8時間培養液からのVT検出の効率化のための処理方法の検討

血清型	無処理	ホリキシン 処理	破砕処理
0157	—	±	±
026	—	±	±
0111	—	w	±
0128	—	±	—
OUT	—	—	—

接種菌数：10 cfu/25g

表-3 菌接種冷凍牛挽肉検体のNmEC中での42℃ 8 時間培養液からのVT検出の効率化のための処理方法の検討

血清型	無処理	ホリキシン 処理	破砕処理
0157	—	±	ww
026	—	w	±
0111	—	w	ww
0128	—	±	ww
OUT	—	—	—

接種菌数：10 cfu/25g

表-4 菌接種冷蔵牛挽肉検体のNmEC中での42℃15時間培養液からのVT検出の効率化のための処理方法の検討

血清型	無処理	ポリキシン 処理	破碎処理
0157	+	NT	NT
026	+	NT	NT
0111	+	NT	NT
0128	-	±	NT
OUT	-	-	NT

接種菌数：10 cfu/25g

表-5 菌接種冷凍牛挽肉検体のNmEC中での42℃15時間培養液からのVT検出の効率化のための処理方法の検討

血清型	無処理	ポリミキシン 処理	破砕処理
0157	+	NT	NT
026	+	NT	NT
0111	+	NT	NT
0128	-	±	+
OUT	-	NT	-

接種菌数：10 cfu/25g

以 上