ノボビオシン (20 mg/L) 加 mEC 培地の検討

小高 秀正^{*1, 2}・水落 慎吾^{*1}・檜谷 総子^{*2}

(^{*1}日水製薬株式会社, ^{*2}東邦大学・医学部)

(受付 平成 13 年 8 月 1 日)

(受理 平成 14 年 8 月 7 日)

Studies for Modified EC Broth with Novobiocin at 20 mg/L

Hidemasa KODAKA^{*1, 2}, Shingo MIZUOCHI^{*1} and Fusako KASHITANI^{*2}

(^{*1}Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., 1075-2 Hokunanmoro, Yuki, Ibaraki 307-0036)

(^{*2}School of Medicine, Toho University, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540)

Modified EC broth (mEC) with novobiocin (20 mg/L) is widely used for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. The mEC with novobiocin at 20 mg/L (mEC+20n) is usually prepared by autoclaving mEC without novobiocin at 121°C for 15 min and then adding a filter sterilized aqueous solution of sodium novobiocin after cooling to produce a final concentration of 20 mg/L. In Japan, mEC containing 25 mg/L novobiocin [25n mEC-A (Eiken) and 25n mEC-B (Kyokuto)] autoclaved at 121°C for 15 min is used for the isolation of *E. coli* O157:H7 from foods.

We compared bacterial growth in 10 concentrations of novobiocin and mEC with inoculums of 10 cfu and 10⁵ cfu using 6 strains of *E. coli* O157:H7 at 42°C for 18 hr. At the 10 cfu inoculum level growth was inhibited in 25n mEC-A and mEC with novobiocin 25 mg/L (added after autoclaving).

We then compared 4 concentrations of novobiocin and mEC at recovering *E. coli* O157:H7 from food samples with both direct plating and IMS plating (immunomagnetic separation method). The eighteen food samples inoculated with *E. coli* O157:H7 (0.1~23.3 cfu/g or ml) were incubated at 42°C for 18 hr. *E. coli* O157:H7 was isolated from 18 (100%) with 20n mEC, 16 (89%) with mEC+20n, 15 (83%) with 25n mEC-A, and 16 (89%) with 25n mEC-B using the IMS plating.

The stability after 3 years storage of 20n mEC at 40°C, 30°C, room temperature, 10°C, and 4°C was examined for growth of *E. coli* O157:H7, for inhibition of other bacteria, for pH, and for moisture (%). The growth of *E. coli* O157:H7 and the inhibition of Gram-positive bacteria and *Serratia marcescens* on mEC with novobiocin plate were the same as the control medium. The pH and moisture after 3 years storage for 20n mEC were almost the same as the original medium under room temperature condition.

We have found 20n mEC is less selective than mEC+20n and more selective than mEC. The 20n mEC is easy to prepare without adding a filter-sterilized aqueous solution of sodium novobiocin to produce a final concentration of 20 mg/L after the medium cooled. The 20n mEC is a practical medium for screening large numbers of food samples as well as samples involved in disease outbreaks.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, Novobiocin, mEC, Enrichment, Medium

緒 言

1996 年, 堺市で発生した *Escherichia coli* O157:H7

による大規模な集団食中毒⁵⁾以来, *E. coli* O157:H7 は注目され, 重要な検査対象菌となっている. 厚生省は, 平成 9 年 (1997 年) 7 月 4 日, 厚生省生活衛生局長通知として腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について, 衛食第 207 号/衛乳第 169 号で通達した⁶⁾. その中で増菌培

*1 ☎307-0036 茨城県結城市北南茂呂 1075-2

*2 ☎143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16

地としてノボビオシン加 mEC 培地を示しているが、ノボビオシン濃度については明記されていない。mEC 培地は、1986 年、Szabo ら¹³⁾が食品から *E. coli* O157:H7 の分離において、従来の 0.5%NaCl が存在する EC 培地 (44.5°C 培養) では胆汁酸塩の濃度が高すぎることを見だし、胆汁酸塩添加量を従来の 0.15% から 0.112% に減らした培地として報告した。また、1987 年、Doyle ら¹⁾は選択増菌培地 (g/L: Trypticase soy broth 30, bile salts No. 3 1.5, K₂HPO₄ 1.5) にノボビオシンを 20 mg/L 添加することにより *E. coli* O157:H7 の分離率が向上すると報告した。これらの報告に基づき、1990 年、Okrend ら¹²⁾は、牛肉などの夾雑菌が多い食品からの *E. coli* O157:H7 分離に mEC 培地 (g/L: Tryptone 20, bile salts No. 3 1.12, lactose 5.0, K₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 1.5, NaCl 5.0) にノボビオシン (20 mg/L) を添加した培地が優れていることを報告した。

1996 年の *E. coli* O157:H7 による食中毒事件時には、原因食品究明のためノボビオシン加 mEC 培地が使用された。しかし、多数の検体からの *E. coli* O157:H7 分離に際して、Okrend ら¹²⁾の推奨した 20 mg/L ノボビオシン加 mEC 培地 (mEC+20n 培地) が使用されたが、本培地の場合は培地滅菌後のろ過滅菌ノボビオシン添加が煩雑であった。このため、25 mg/L ノボビオシン加 mEC 培地 (25n mEC 培地) を 121°C, 15 分滅菌し、mEC+20n 培地と同等の効果があると見なして使用された。それ以来、25n mEC 培地は日本国内で *E. coli* O157:H7 の実験や研究などに広く使われてきている^{2,7,9)}が、日本国内で使用されている 25n mEC 培地と mEC+20n 培地における *E. coli* O157:H7 の検出性能についての比較結果については報告されていない。また、我々は Doyle ら¹⁾および Okrend ら¹²⁾の報告したノボビオシン添加量に注目し、20 mg/L ノボビオシン加 mEC 培地 (20n mEC 培地) (121°C, 15 分滅菌後使用) を製造し培地性能および培地性状の経時試験を行ってきた。今回、我々は現在市販されている 25n mEC 培地と 20n mEC 培地、および mEC+20n 培地の性能を比較検討し、若干の知見を得た。

材料および方法

1. ノボビオシン加 mEC 培地中での *E. coli* O157:H7 の増殖態度

ノボビオシン加 mEC 培地 42°C, 18 時間培養における *E. coli* O157:H7 の増殖態度を検討した。供試菌株は 6 株の *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150, ATCC 43888, ATCC 43889, ATCC 43890, ATCC 43894, ATCC 43895) を用いた。供試培地は、滅菌した mEC 培地 (日水製薬, 東京) にろ過滅菌したノボビオシンナトリウム塩 (力価 850 μg/mg) (ノボビオシン, SIGMA, 米国) をそれぞれ 100, 50, 25, 20, 12.5, 6.25, 3.13 mg/L になるように添加した。また、コントロールとして、mEC

培地単独、ノボビオシン (25 mg/L) 加 mEC 培地 [25n mEC-A 培地 (栄研化学, 東京), 製造番号 13102, 使用期限 2004 年 3 月および 25n mEC-B 培地 (極東製薬, 東京), Lot. No. AEN24901, 有効期限 2003 年 3 月], およびトリプトソーヤブイヨン (TSB, 日水製薬) を用いた。各培地 10 ml に、*E. coli* O157:H7 を 10 cfu と 10⁵ cfu レベルで接種、培養後発育の有無を肉眼で判定した。

2. 接種食品からの *E. coli* O157:H7 の回収実験

食品検体として、牛肉 6 検体、豚肉 2 検体、豚レバー 1 検体、鶏肉 2 検体、生乳 4 検体、バセリ 2 検体、およびメロン 1 検体を用いた。ノボビオシン加 mEC 培地として、20n mEC 培地、mEC+20n 培地、25n mEC-A 培地、および 25n mEC-B 培地を用いた。供試した食品の一般生菌数は標準寒天培地 (日水製薬) を用いて、36°C, 48 時間培養後菌数を測定した。大腸菌群数はデゾキシコレート寒天培地 (日水製薬) を用いて、36°C, 24 時間培養後菌数を測定した。食品 7 種 18 検体をそれぞれ 4 枚のストマッカー袋 (エルメックス, 東京) に同一検体を 25 g または 25 ml ずつ量り採り、これに *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 を TSB で 36°C, 24 時間培養した菌液を希釈し、数個~数十個/ml になるよう調整した後、その 1 ml を接種した。4 つにとりわけた同一食品に各ノボビオシン加 mEC 培地を 225 ml 加え、ストマッカー (エルメックス) で 1 分間ストマッキングし、42°C で 18 時間培養した。増菌培養後の *E. coli* O157:H7 の分離方法は、直接塗抹法と免疫磁気ビーズ (IMS) 法を用いた。直接塗抹には、ソルビトールマッコンキー培地 (SMAC 培地, 日水製薬) 500 ml にソルビトールマッコンキー寒天 CT サプリメント 1 本 (セフキシム 0.025 mg, 亜テルル酸カリウム 1.25 mg, MAST DIAGNOSTICS, 英国) を加え調製した CT-SMAC 培地、クロモアガー O157 培地 (クロモアガー, フランス), および BCM O157 培地 (バイオシンス, スイス) を用い、各平板に 10 μl のループ (ヌンク, デンマーク) で塗抹し、36°C で 24 時間培養した。培養後、疑わしいコロニーを釣菌し、CLIG 培地 (極東製薬) での性状およびラテックス凝集キット (大腸菌 O157:H7 テスト「ニッスイ」, レメル社, 米国) で *E. coli* O157:H7 の確認を行った。IMS 法は、培養液 1 ml に対し、Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Dyna, ノルウエー) を用いて、説明書に従って行った。処理した免疫磁気ビーズ懸濁液は 50 μl ずつ CT-SMAC 培地とクロモアガー O157 培地に塗抹し、36°C で 18 時間培養した。*E. coli* O157:H7 の確認方法は、直接塗抹法と同様に行った。検出結果の判定は、いずれかの分離培地において *E. coli* O157:H7 が確認された場合、再分離できたと判定した。また、供試食品の *E. coli* O157:H7 自然汚染の有無は、mEC+20n 培地で 42°C, 18 時間培養後直接塗抹法および IMS 法を用いて接種実験と同様にして確認した。

3. 3年間保管した 20n mEC 培地の性能変化の検討

20n mEC 培地は、ボールミル（丸喜，愛知）で 30 kg 製造した後，培地用ボトルに 300 g ずつ分包してから，乾燥剤付蓋で密閉し 40℃，30℃，室温，10℃，4℃で 3 年間保管した．これらの培地を 1 年間隔で開封し，*E. coli* O157:H7 の発育性や他菌種に対する抑制性について調べた．供試菌株は，*E. coli* O157:H7 ATCC 35150，グラム陰性菌 6 株 (*Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *E. coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Serratia marcescens* ATCC 8100)，およびグラム陽性菌 3 株 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* JCM 1464, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) を用いた．同時に，ノボビオシンに対するオートクレーブ滅菌の影響を見るために，市販の mEC 培地に各濃度のノボビオシン (100～3.13 mg/L) を添加しオートクレーブ滅菌した培地と mEC 培地をオートクレーブ滅菌した後各濃度のろ過滅菌したノボビオシンを添加した培地の各菌種に対する抑制性を検討した．検討に際して，前述の培地に 15 g/L の寒天を加え平板として用いた．これに各供試菌株を TSB で 36℃，24 時間培養した菌液を滅菌生理食塩水で 100 倍希釈 (10^6 cfu/ml) し，マイクロプランター（佐久間製作所，東京）で接種した．培養条件は，ノボビオシンの効果を見るために，42℃ではなく 36℃で 24 時間培養し，発育の有無を観察した．

保管後，開封した培地の pH は，培地をオートクレーブ滅菌後，25℃に保ちガラス電極を使用して pH メーター（HM-60 V，東亜電波工業，東京）で測定した．乾燥減量は，培地 3 g を量り採り，電子式水分計（EB-340 MOC，島津製作所，京都）を用いて測定した．

結 果

1. mEC 培地中での *E. coli* O157:H7 の発育に及ぼすノボビオシン添加量の影響

E. coli O157:H7 の 6 株を 10 cfu レベルと 10^5 cfu レベルで，20n mEC 培地，mEC + 20n 培地，25n mEC-A 培地，および 25n mEC-B 培地に接種し 42℃で 18 時間培養したところ，Table 1 に示したとおり，10 cfu レベル接種において，滅菌した mEC 培地にろ過滅菌したノボビオシン (25 mg/L) を添加した培地では 6 株中 4 株の発育が認められなかった．25n mEC-A 培地では，10 cfu レベル接種で 6 株中 2 株に発育不良が認められた．mEC + 20n 培地では，供試した菌株の 10 cfu レベル接種ですべて発育を認めた．

2. *Escherichia coli* O157:H7 接種食品からの各種ノボビオシン加 mEC 培地を用いた *E. coli* O157:H7 回収実験

18 検体の食品に *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 を接種し，分離した結果を Table 2 に示した．直接塗抹法と免疫磁気ビーズ (IMS) 法による回収を比較すると，IMS 法の方が良かった．直接塗抹法における各増菌培地での回収件数を比較すると，20n mEC 培地が最もよく 18 検体中 17 検体 (94%) から *E. coli* O157:H7 を分離できた．その他の培地の回収件数は mEC + 20n 培地は 12 検体 (67%)，25n mEC-A 培地は 11 検体 (61%)，25n mEC-B 培地は 12 検体 (67%) であった．IMS 法での回収件数は，20n mEC 培地は 18 検体 (100%)，mEC + 20n 培地は 16 検体 (89%)，25n mEC-A 培地は 15 検体 (83%)，25n mEC-B 培地は 16 検体 (89%) であった．結果を示していないが CT-SMAC 培地，クロモアガー O157 培地，および BCM O157 培地における *E. coli* O157:H7 の分離性能を比較すると，CT-SMAC 培地が最も良かった．なお，供試した食品検体において，*E. coli* O157:H7 の自然汚染は認められなかった．

Table 1. Growth of *E. coli* O157:H7 inoculated at the 10 cfu and 10^5 cfu levels after 18 hr incubation in mEC with various concentration of novobiocin

Strain tested	Inoculation levels (cfu)	Concentration of novobiocin + mEC (mg/L)								25n mEC-A	25n mEC-B	TSB
		100	50	25	20	12.5	6.25	3.13	0			
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	10	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+
	10^5	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888	10	—	—	—	+	+	+	+	+	—	W	+
	10^5	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43889	10	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^5	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	10	—	—	—	+	+	+	+	+	W	+	+
	10^5	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	10	—	—	—	+	+	+	+	+	W	W	+
	10^5	—	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	10	—	—	W	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^5	—	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+

W: weakly grow.

Table 2. Isolation of *E. coli* O157:H7 from food inoculated at various levels of *E. coli* O157:H7 using mEC broth with novobiocin

Food	APC (cfu)	Coliforms (cfu)	Inoculum size (cfu)	Recovery with direct plating			Recovery with IMS plating					
				Add novobiocin (20 mg/L) before autoclaving	Add novobiocin (20 mg/L) after autoclaving	25n mEC-A	25n mEC-B	Add novobiocin (20 mg/L) before autoclaving	Add novobiocin (20 mg/L) after autoclaving	25n mEC-A	25n mEC-B	
Beef	1.2×10 ⁷ /g	1.3×10 ⁶ /g	23.2/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	3.0×10 ⁷ /g	3.5×10 ⁴ /g	3.8/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	1.2×10 ⁷ /g	1.3×10 ⁶ /g	2.2/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	2.0×10 ⁹ /g	2.7×10 ⁶ /g	2.0/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	3.0×10 ⁷ /g	3.5×10 ⁴ /g	0.3/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	2.0×10 ⁹ /g	2.7×10 ⁶ /g	0.1/g	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Pork	8.0×10 ⁹ /g	1.6×10 ⁹ /g	2.6/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pork liver	7.8×10 ⁷ /g	1.7×10 ⁷ /g	1.2/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pork	8.0×10 ⁹ /g	1.6×10 ⁹ /g	0.3/g	+	+	+	+	+	+	—	—	—
Chicken	3.3×10 ⁹ /g	6.0×10 ⁸ /g	2.1/g	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Chicken	3.3×10 ⁹ /g	6.0×10 ⁸ /g	0.3/g	—	+	—	—	—	+	+	+	+
Raw milk	1.9×10 ⁷ /ml	8.8×10 ⁵ /ml	10.0/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raw milk	1.1×10 ⁵ /ml	1.7×10 ⁴ /ml	3.5/ml	+	—	—	—	—	+	+	+	—
Raw milk	1.9×10 ⁷ /ml	8.8×10 ⁵ /ml	1.0/ml	+	+	—	+	+	+	+	+	+
Raw milk	1.1×10 ⁵ /ml	1.7×10 ⁴ /ml	0.4/ml	+	—	—	—	—	+	—	—	+
Parsley	8.0×10 ⁴ /g	5.0×10 ² /g	2.4/g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Parsley	8.0×10 ⁴ /g	5.0×10 ² /g	0.2/g	+	—	—	—	—	+	—	—	+
Melon	6.0×10 ⁵ /g	9.0×10 ⁴ /g	3.8/g	+	—	—	—	—	+	+	+	+

APC: aerobic plate count.

Table 3. Inhibition effects of three years storage mEC+novobiocin (20 mg/L) comparing with mEC added novobiocin before and after autoclaving for Gram negative and positive bacteria

Strains tested	Storage temperature for three years					mEC added novobiocin (mg/L) before auoclaving								mEC added novobiocin (mg/L) after auoclaving								mEC	TSB		
	40°C		30°C	R	10°C		4°C																		
	100	50			25	20		13	6.3	3.1	100	50	25	20	13	6.3	3.1								
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Gram negative bacteria																									
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>E. coli</i> ATCC 8739	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	+	+	W	W	W	−	−	−	−	W	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+			
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+			
Gram positive bacteria																									
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+			
<i>M. luteus</i> JCM 1464	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+			
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+			

W: weakly grow.

Concentration of bacteria inoculated: 10⁶ cfu/ml.

R: room temperature.

3. 各種環境条件で3年間保管した20n mEC培地の性能および性状

20n mEC 培地を 40°C, 30°C, 室温, 10°C, および 4°C で 3 年間保管した培地の性能を Table 3 に示した. *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 の発育は, いずれの保管培地においても良好であった. *P. mirabilis* ATCC 29906 に対する抑制性は, 用時調製の mEC+20n 培地と比べると劣っていた. 40°C および 30°C 保管培地では, *P. mirabilis* ATCC 29906 を全く抑制しないのに対して, 室温, 10°C および 4°C 保管培地においては, 用時調製培地の抑制性と比べると劣るものの, 各培地での *P. mirabilis* ATCC 29906 の発育は非常に弱く, 明らかに抑制していることが認められた. また, ノボビオシンを mEC 培地に添加してオートクレーブ滅菌すると, オートクレーブ滅菌後にろ過滅菌したノボビオシンを添加した培地より *P. mirabilis* ATCC 29906 に対する抑制性が若干低下した (Table 3). *C. freundii* ATCC 8090, *E. cloacae* ATCC 13047, *E. coli* ATCC 8739, および *K. pneumoniae* ATCC 13883 に対する抑制効果は, 用時調製の培地と 3 年間保管培地において差は認められなかった. *S. marcescens* ATCC 8100 は, mEC 培地では発育するものの, ノボビオシンが 6.25 mg/L 以上添加されていれば抑制されることを認め, この抑制効果は 3 年間保管した 20n mEC 培地でも確認できた. *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* JCM 1464, および *S. aureus* ATCC 6538 のグラム陽性菌 3 株に対する抑制は, 胆汁酸塩 (1.12 g/L) だけで十分であり, 3 年間保管した 20n mEC 培地でも抑制効果が確認できた.

保管した 20n mEC 培地の pH の経時変化を Table 4 に示した. 保管開始時が 7.03 であったのに対して, 3 年後の 40°C, 30°C, 室温, 10°C, および 4°C 保管培地の pH は, それぞれ 6.88, 6.93, 6.96, 7.02, および 7.01 と

Table 4. The pH and moisture (%) of mEC+novobiocin (20 mg/L) medium changing at various temperature during three years storage

Storage temperature		Period of storage (Years)			
		0	1	2	3
pH	4°C	7.03	7.04	7.03	7.01
	10°C	7.03	7.03	7.04	7.02
	R	7.03	7.03	7.00	6.96
	30°C	7.03	7.01	6.98	6.93
	40°C	7.03	7.00	6.94	6.88
Moisture (%)	4°C	2.7	2.6	2.6	2.9
	10°C	2.7	2.7	2.7	2.8
	R	2.7	2.7	2.8	2.9
	30°C	2.7	2.4	2.4	2.3
	40°C	2.7	2.5	2.2	2.0

R: room temperature.

なった. 40°C で 3 年間保管において, pH が 0.15 低下した. 培地の乾燥減量は, 保管開始時が 2.7% であったのに対して 3 年後の 40°C, 30°C, 室温, 10°C, および 4°C で保管した培地の乾燥減量は, それぞれ 2.0%, 2.3%, 2.9%, 2.8%, および 2.9% となった (Table 4). 培地における pH および乾燥減量は室温以下の温度で 3 年間安定していた.

考 察

1996 年, 日本で大規模な *E. coli* O157:H7 による食中毒が発生したとき, ノボビオシン加 mEC 培地が食品検体からの *E. coli* O157:H7 の分離時に使用されて以来広く国内で使われている. 特に, 国内で市販されている 25n mEC 培地がよく使われている. しかし, 25n mEC 培地と Okrend ら¹²⁾ の mEC+20n 培地の比較評価はされていない. 今回, 我々は 25n mEC 培地と mEC+20n 培地の培地性能の評価をするとともに, 20n

mEC 培地の評価も併せて行った。

今回検討したノボビオシン (25 mg/L) 加 mEC 培地で、*E. coli* O157:H7 の中で発育が良くない株が認めれた。成松ら¹⁰⁾は枝肉ふき取り検査の検討で 25n mEC-A 培地を 36°C, 24 時間培養において、供試した 13 株のベロ毒素産生性大腸菌 O157 の中で 4 株しか十分な発育を認めなかったと報告している。これらのことは、前原ら⁸⁾も述べているように *E. coli* O157:H7 の mEC 培地における発育にノボビオシンの濃度が影響力を持つことによると考えられる。また、岡崎ら¹¹⁾は、mEC+20n 培地を用いて 42°C で *E. coli* O157:H7 を培養するとき、5 株中 3 株の増殖が阻止されたが 36°C で培養すると 5 株中 5 株が増殖したことを報告している。我々の今回の検討では、mEC+20n 培地において 42°C で供試菌株すべての発育を認めたが、36°C と 42°C による発育の比較をしていない。また、菌の発育の有無は肉眼判定のみで菌数の確認は行っていない。mEC+20n 培地を用いた 42°C での *E. coli* O157:H7 の発育に対する我々の結果と岡崎ら¹¹⁾の結果の違いは、判定方法の違いによるものと考えられた。

現在市販されているノボビオシン 25 mg/L 加 mEC 培地よりノボビオシン 20 mg/L 加 mEC 培地の方が、*E. coli* O157:H7 に対するダメージが弱いのは明らかで、我々が行った食品接種実験での *E. coli* O157:H7 の回収の比較でも、20n mEC 培地が mEC+20n 培地、25n mEC-A 培地、および 25n mEC-B 培地より良い結果を得た。しかし、*E. coli* O157:H7 による食中毒事例⁴⁾で、25n mEC-A 培地が 42°C で使用され、分離されている事実を踏まえると、ノボビオシン添加量は培地と同時滅菌のときには 25 mg/L で問題ないかもしれない。

mEC 培地に添加したノボビオシンの力価はオートクレーブ滅菌することにより低下し、ノボビオシンを滅菌後に添加した mEC 培地と比べると *P. mirabilis* と *K. pneumoniae* に対する抑制性が下がることを 36°C, 24 時間培養の条件で認めた。今回は、*E. coli* O157:H7 以外の菌に対するノボビオシンの抑制効果を見るために 42°C での培養を行っていないが、*Klebsiella* などに対する抑制性はさらに増すものと考えられる³⁾。

以上のことから、ノボビオシンを mEC 培地滅菌後添加する必要がない 20n mEC 培地は室温で 3 年間安定で mEC+20n 培地と比べて、他菌種に対する抑制性が若干劣るものの mEC 培地より強いことから、食品検体を多数処理する際の *E. coli* O157:H7 の分離には、有用であると考えられた。

要 約

Escherichia coli O157:H7 を食品から分離するために使用されるノボビオシン (20 mg/L) 添加変法 EC (mEC) 培地のノボビオシン添加方法、濃度などについて比較検討し、以下の結論を得た。

1. 10 種類のノボビオシン濃度の mEC 培地における *E. coli* O157:H7 の発育を 6 株の純培養菌を 10 cfu レベルおよび 10⁵ cfu レベルで接種した場合の 42°C, 18 時間培養後に比較した結果、*E. coli* O157:H7 の純培養菌を 10 cfu レベルで接種した場合、mEC 培地にノボビオシン 25 mg/L の割合で後添加した培地と 25 nmEC 培地で、発育が抑制された菌株があった。

2. 4 種類のノボビオシン加 mEC 培地について食品検体からの *E. coli* O157:H7 の回収性を直接塗抹法と免疫磁気ビーズ法を用いて比較した。その結果、*E. coli* O157:H7 を接種 (0.1~23.2 cfu/g または ml) した食品 18 検体からの回収実験で免疫磁気ビーズ法を用いたとき、20n mEC 培地では 18 検体 (100%)、mEC+20n 培地では 16 検体 (89%)、25n mEC-A 培地では 15 検体 (83%)、25n mEC-B 培地では 16 検体 (89%) から *E. coli* O157:H7 を回収できた。

3. 20n mEC 培地を 40°C, 30°C, 室温, 10°C, および 4°C で 3 年間保管し培地の安定性を確認した成績では、3 年間保管培地の性能は、*Proteus mirabilis* に対する抑制性が劣化したものの、*E. coli* O157:H7 に対する発育支持能およびグラム陽性菌ならびに *Serratia marcescens* に対する抑制性は良好であった。また、20n mEC 培地の pH および乾燥減量の大きな変化は室温以下の保管条件では認められなかった。

以上のことから、20n mEC 培地は mEC+20n 培地と比べて、他菌種に対する抑制性が若干劣るものの抑制性は mEC 培地より強いことを認めた。

なお、本報の要旨の一部は第 22 回日本食品微生物学会・学術総会 (2001 年 10 月、大阪市) において発表した。

謝 辞

本研究に当たり、ご助言をいただきました東邦大学医学部細菌学教室 山口恵三教授に深謝いたします。また、英文要旨および表の校閲をしていただきました米国疾病管理センター (Centers for Disease Control and Prevention) の Arnold Steigerwalt 氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Doyle, M. P. and Schoeni, J. L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2394-2396 (1987).
- 2) 奏昌紫子, 檀上博子, 檀原真弓, 吉村由美, 井上正直: 食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出法に関する検討. *日食微誌*, **15**, 119-123 (1998).
- 3) 伊藤 武, 甲斐明美, 尾畑浩魅, 貫名正文, 黒木 学, 仲西寿男: 食品からの腸管出血性大腸菌 O157 検出. *日食微誌*, **13**, 205-219 (1997).
- 4) 国立感染症研究所, 厚生省保健医療局結核感染症課: 〈情報〉「イクラ」からの腸管出血性大腸菌 O157:H7 の検出

- 神奈川県. 病原微生物検出情報, **19**, 204-205 (1998).
- 5) 国立予防衛生研究所, 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課: 〈速報〉腸管出血性大腸菌 O157:H7 の集団発生, 1996. 病原微生物検出情報, **17**, 180-181 (1996).
 - 6) 厚生省生活衛生局長: 腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について. 平成 9 年 7 月 4 日, 衛食第 207 号/衛乳第 169 号 (1997).
 - 7) 工藤由起子, 小西良子, 春日文子, 伊藤嘉典, 岩城正昭, 斎藤典子, 小沼博隆, 熊谷 進: 腸管出血性大腸菌 O157:H7 によって実験的に汚染した野菜種子に関する研究. 日食微誌, **17**, 201-205 (2000).
 - 8) 前原智史, 中本成彦, 森河内 巖, 井川久史: 腸管出血性大腸菌 O157 の増菌方法および免疫磁気ビーズによる分離法の検討. 日食微誌, **16**, 181-185 (1999).
 - 9) 中島和英, 三浦和行, 清水義治, 福山正文: BAX™ スクリーニングシステムおよびその増菌培養法の改良による食肉の腸管出血性大腸菌 O157:H7 検査法の高感度化・迅速化の検討. 日食微誌, **16**, 111-115 (1999).
 - 10) 成松浩志, 小林貴廣, 世古庄太, 三上賢一, 大隈 滋, 後藤祐司, 木元正一: 枝肉ふき取り検査における VTEC・サルモネラ迅速同時スクリーニング法の検討. 日食微誌, **18**, 21-25 (2001).
 - 11) 岡崎則男, 鈴木理恵子, 佐多 辰, 大沢 朗, 渡辺祐子, 山井志朗, 和田昭仁, 渡辺治雄: ペロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) O157 の増菌培養に関する基礎的検討. 細菌学雑誌, **52**, 505-511 (1997).
 - 12) Okrend, A. J. G., Rose, B. E. and Bennett, B.: A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. J. Food Prot., **53**, 249-252 (1990).
 - 13) Szabo, R. A., Todd, E. C. D. and Jean, A.: Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food. J. Food Prot., **49**, 768-772 (1986).