報 文

麺および野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 損傷菌の
検出に関する検討

(平成 15 年 7 月 29 日受理)

田中啓子^{*1,†} 本井博文^{*1} 工藤由起子^{*2}Detection Method of Injured *Escherichia coli* O157 in Noodles and VegetablesKeiko TANAKA^{*1,†}, Hirofumi MOTO^{*1} and Yukiko HARA-KUDO^{*2}

(^{*1}Nisshin Seifun Group Inc., Research Center for Basic Science: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama 356-8511, Japan; ^{*2}National Institute of Health Science, Division of Microbiology: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

[†]Corresponding author)

An enrichment procedure and a polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of injured *Escherichia coli* O157 in foods were examined. Freeze-injured *E. coli* O157 inoculated in boiled spaghetti could be detected in 6-h culture within 12 h by the PCR method. Cells injured by heating in boiled spaghetti and cells injured by chlorine treatment in raw lettuce and carrot did not grow sufficiently to be detected in 6-h culture but were detected in 18-h culture using selective agar media. The injured cells could be also detected in 18-h culture within 24 h by the PCR method. Enrichment at 42°C in trypticase soy broth (TSB) was more effective than that at 42°C in modified EC broth with novobiocin. These results indicated that the usage of enrichment in TSB for 18 h at 42°C in combination with the PCR method is suitable for screening for *E. coli* O157 in boiled or chlorinated foods, even if the O157 cells are injured.

(Received July 29, 2003)

Key words: 検出 detection; 腸管出血性大腸菌 O157 *Escherichia coli* O157; 損傷菌 injured cell; 加熱 heat; 凍結 freeze; 塩素 chlorine; 増菌培養 enrichment culture

緒 言

腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157 と略す) は極めて少量の摂取菌量で発症すると考えられていることから、食品の衛生検査において少量の O157 を確実に検出するためには増菌培養が不可欠である。厚生省通知¹⁾ による O157 検査方法も増菌培養を含み、結果が判明するまでに 3~4 日を要する。このため結果が判明した時点ではすでに当該食品は消費されている場合もある。したがって食品中の O157 検査の迅速化は重要な課題となっており、増菌培養時間の短縮の検討など迅速化に関する報告も多い^{2)~4)}。

一方、食品中の細菌は製造段階の凍結・加熱処理などにより損傷状態にあるものが少なくない。損傷状態の O157 は選択性の強い培養条件では増殖が抑制されるが^{5)~8)}、さらに非損傷状態の O157 でも増菌培養条件によっては増殖

が抑制されることが報告されている^{4), 9), 10)}。これらのことから、厚生省通知法など選択性の強い O157 検査では食品に存在する少量の O157 を検出できない可能性が危惧される。

損傷状態の O157 の食品からの検出に関する報告には、18 時間または 24 時間増菌培養により凍結または加熱損傷菌を検出した例がある^{5), 6), 11), 12)} が、増菌培養時間を 6 時間として迅速検出した報告^{11), 13)} はごく少なく、限られた食品例しかない。また、生野菜の洗浄で頻繁に用いられる次亜塩素酸ナトリウム溶液処理によって損傷した O157 の検出についての報告例はない。食品中から細菌を検出する場合には、同一検出法であっても食品の種類によって検出効率が異なることが知られていることから、O157 損傷菌の検出においても、検査対象となる食品ごとに最適な検出法の検討を行うことが重要である。この観点から、本研究ではボイル済み冷凍スパゲティ、カットレタスおよびカットニンジンを対象食品として、凍結、加熱および次亜塩素酸ナトリウム溶液浸漬による O157 損傷菌の検出法の検討を行った。なお、その前提実験として O157 非損傷菌

[†] 連絡先

^{*1} (株)日清製粉グループ本社基礎研究所: 〒356-8511 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡 5-3-1

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

について対象食品からの検出法の検討も併せて行った。

実験方法

1. 試料

試料は、市販のボイル済み冷凍スパゲティ、生鮮レタスおよびニンジンを用いた。ボイルスパゲティは室温で解凍して用いた。レタスは可食部分を3 cm角程度にカットして、ニンジンは可食部分を千切りにして用いた。

2. 菌株

腸管出血性大腸菌 O157 は ATCC 35150 株 (H7, VT1・VT2 産生株) を用いた。

3. 増菌培地

Trypticase soy broth (TSB)(Difco)、ノボビオシン加 mEC 培地 (n+mEC) (栄研化学)、胆汁酸を除いた mEC 培地 (b-mEC) (栄研化学) を用いた。

4. ボイルスパゲティに接種した O157 の凍結、加熱による死滅、損傷率の測定法

凍結、加熱処理されたボイルスパゲティ中での O157 の死滅、損傷程度を確認するために、以下のボイルスパゲティへの O157 添加試験を行った。なお、ここでは選択分離培地の CT-SMAC 寒天培地に生育できる菌を非損傷菌とし、CT-SMAC 寒天培地には生育できないが非選択培地の標準寒天培地には生育できる菌を損傷菌と定義した。

TSB で 36℃、18 時間培養した O157 菌液 (菌数約 10^9 cfu/mL) 100 μ L をボイルスパゲティ 25 g に接種した。これを -20℃ に凍結して 1, 7, 18, 35 日後に室温にて解凍し、滅菌リン酸生理食塩緩衝液 (PBS) を加えてストマッカー処理した試料液を適宜希釈後、CT-SMAC 寒天培地 (日水製薬) と標準寒天培地 (栄研化学) に塗布して両培地上に出現した集落数から凍結後の生残菌数と生残菌に占める損傷菌割合を求めた。また、上述の O157 菌液 1 mL をボイルスパゲティ 300 g に接種し、蒸し器にて品温が 50~60℃ 程度となるように 6 分間加熱後、15 分間室温に放置したときの生残菌数および損傷菌割合を求めた。

5. 非損傷 O157 の検出

TSB で 36℃、18 時間培養した O157 培養液を PBS で約 50 個/mL 程度になるように希釈した。この菌液 100 μ L をストマッカー袋に 25 g ずつ量り採った食品に接種した。これに 36℃、42℃ で予備保温した TSB, n+mEC、または 25℃ で予備保温した b-mEC を 225 mL 加え 1 分間ストマッカー処理した。TSB または n+mEC を加えた検体は 36℃ または 42℃ で 6 時間培養したが、b-mEC を加えた検体は 25℃ で 2 時間放置後、n+mEC と同濃度になるようにノボビオシンと胆汁酸を加えてから 42℃ で 6 時間培養した (b-mEC(b,n))。培養液を CT-SMAC 寒天培地と標準寒天培地にコンラージ棒により 0.1 mL または 0.5 mL 塗布して培養液中の O157 数と一般生菌数を測定した。なお、CT-SMAC 寒天培地に生育した典型的な集落 O157 であることは大腸菌 O157 検出キット UNI (OXOID) および CLIG 培地 (極東製薬) にて確認

した。さらに、一部の培養液では以下の PCR 法によるベロ毒素遺伝子の検出も行った。

6. PCR

PCR は O-157 (ベロ毒素遺伝子) One Shot PCR Screening Kit (TaKaRa) を用い、その使用手順に準じて行った。5. で調製した培養液 1 mL を遠心後、沈殿物を PBS で 1 回洗浄してから 100 μ L の PBS で再懸濁して、沸騰水中で 5 分間加熱した後、その遠沈上清を鋳型 DNA として PCR に用いた。また、PCR による O157 の検出感度を調べるため、各食品 25 g に TSB または n+mEC を 225 mL 加え 1 分間ストマッカー処理した後、36℃ または 42℃ で 6 時間培養した培養液 1 mL に、TSB で 36℃、24 時間培養した O157 培養液を PBS で適宜希釈して 10^1 、 10^2 、 10^3 cfu/mL となるように加え、同様に PCR に供した。

7. モデル損傷菌の調製

損傷状態にある O157 検出の検討においては、検体に非損傷菌が含まれていた場合、損傷菌の回復・検出のみを厳密に評価することができない。そこで、損傷菌のみを含む検体で評価を行うために、凍結損傷菌、加熱損傷菌、次亜塩素酸ナトリウム水溶液浸漬による損傷菌のみを含む液をそれぞれ実験的に作製した。

TSB で 36℃、18 時間培養した約 10^9 cfu/mL の菌液 1 mL から遠心分離により菌体を回収し、滅菌超純水による洗浄を 3 回繰り返した後、滅菌超純水 1 mL に懸濁したものを洗浄菌液として以下の損傷菌調製に用いた。凍結損傷菌液は、100 倍希釈した洗浄菌液 1 mL を -20℃ で 24 時間凍結後、流水解凍することを 3 回繰り返して調製した。加熱損傷菌液は、54℃ に加温した滅菌超純水 10 mL に洗浄菌液 100 μ L を添加し 15 分間保持した後、氷上で冷却して調製した。次亜塩素酸ナトリウム水溶液浸漬による損傷菌液は、洗浄菌液 10 μ L を 0.02 ppm 次亜塩素酸ナトリウム (食品用試薬) 水溶液 990 μ L に加えて室温にて 1 分間保持した後、次亜塩素酸ナトリウムの活性を消去するため直ちに PBS にて 100 倍希釈して調製した。これら損傷菌液を適宜希釈後 CT-SMAC 寒天培地と標準寒天培地に塗布して両培地上に出現した集落数から生残菌数と生残菌に占める損傷菌割合を求めた。

8. 損傷 O157 の検出

1) 凍結損傷菌

ボイルスパゲティ 10 g にモデル凍結損傷菌を 10 cfu/10 g 程度接種し、4. で記述した方法により 6 時間培養した培養液を CT-SMAC 寒天培地と標準寒天培地に 0.1 mL または 0.5 mL 塗布して O157 数と生菌数を測定した。また、24 時間培養した培養液を CT-SMAC 寒天培地とクロモアガー O157 (関東化学) に画線後、培養して O157 の検出を試みた。さらに、凍結損傷菌については実際に食品中で凍結損傷させた菌の検出も検討した。ボイルスパゲティ 25 g に損傷状態でない O157 を 10 cfu/25 g 程度接種して -20℃ で凍結保存した後、5 日後、1 か月後にモ

デル凍結損傷菌の場合と同様にして O157 を検出した。

2) 加熱損傷菌

ボイルスパゲティ 25 g に加熱損傷菌を 10 cfu/25 g 程度接種し、6 時間培養した培養液の菌数を測定した。また、ボイルスパゲティ 25 g に加熱損傷菌を 10 cfu/25 g 程度接種し、18 時間培養後の培養液を CT-SMAC 寒天培地とクロモアガー O157 に画線後、培養して O157 を検出した（直接法）。また培養液 1 mL に免疫磁気ビーズ Dynabeads anti-*E. coli* O157（ベリタス）を 20 μ L 添加して説明書に従い処理した後、回収したビーズ懸濁液 10 μ L を各平板培地に画線後、培養して O157 を検出した（ビーズ法）。さらに各条件下で培養した培養液を用いた PCR 法およびイムノクロマト法キット Transia Card *E. coli* O157 (Diffchamb) による O157 の検出も行った。なお、1), 2) で用いたボイルスパゲティの一般生菌数は 1.6 log cfu/g 以下であった。

3) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液浸漬損傷菌

レタス、ニンジン各 20 g に次亜塩素酸ナトリウム水溶液浸漬による損傷菌を 10 cfu/20 g 程度接種し、6 時間培養した培養液の菌数を測定した。また、レタス、ニンジン各 25 g に次亜塩素酸損傷菌を 10 cfu/25 g 程度接種し、18 時間培養後の培養液から、直接法、ビーズ法、PCR 法、イムノクロマト法キットにより O157 を検出した。なお、一般生菌数はレタスが 5.8 log cfu/g、ニンジンが 4.4 log cfu/g であった。また、以上 1)~3) で用いたモデル損傷菌液はいずれも含まれる O157 菌の 99% 以上が損傷状態であった。

結果および考察

1. ボイルスパゲティに接種した O157 の凍結、加熱による死滅、損傷率

ボイルスパゲティに接種後凍結または加熱処理された O157 の生残菌割合とそれに占める損傷菌割合を Fig. 1 に示した。接種菌のうち凍結後に生残する菌の割合は凍結後 1 日目から 35 日目の間に 70% から 60% 弱に減少したが、生残菌に占める損傷菌の割合は 90% 程度であり、凍

Fig. 1. Survival rate of *E. coli* O157 and proportion of injured cells in boiled spaghetti after freezing or heating

結 35 日目までその割合には変化が見られなかった。一方、加熱後の生残菌は 15% でその 90% 程度が損傷状態であった。ボイルスパゲティを汚染した O157 は、凍結後にその多くが損傷菌として生残し、また穏やかな加熱後にも一部が損傷菌として生残する可能性が高いことが示された。したがって、加熱または凍結処理された食品からの O157 の検出に当たっては O157 損傷菌が検出できる検査法の採用が不可欠であることが確認できた。

Fig. 2. Growth of *E. coli* O157 and detection of VT genes by PCR in various cultures of food inoculated with *E. coli* O157 after 6-h incubation
TSB: Trypticase soy broth, n+mEC: modified EC broth with novobiocin, b-mEC(b,n): modified EC broth without bile salts (bile salts and novobiocin added to the broth and sample mixtures after mixing and standing for 2 h)
+: VT gene detected by PCR; NT: not PCR tested
*: Statistically significant ($n=3$, $p<0.01$)

Table 1. Detection of VT Genes by PCR in 6-h Cultures of Food Added with *E. coli* O157

Food	Concentration of O157 in culture (log, cfu/mL)	Culture condition			
		TSB ^a		n+mEC ^b	
		36°C	42°C	36°C	42°C
Boiled spaghetti	1	1/3 ^c	2/3	0/3	0/3
	2	3/3	3/3	3/3	3/3
	3	2/2	2/2	2/2	2/2
Lettuce	1	1/3	2/3	3/3	3/3
	2	3/3	3/3	3/3	3/3
	3	2/2	2/2	2/2	2/2
Carrot	1	2/3	2/3	2/3	2/3
	2	3/3	3/3	3/3	3/3
	3	2/2	2/2	2/2	2/2

^a: Trypticase soy broth^b: Modified EC broth with novobiocin^c: Number of positive samples/number of tested samples

2. 6時間培養による非損傷 O157 の迅速検出および PCR 法での検出限界

損傷 O157 の検出方法を検討する前に、今回の供試食品からの非損傷 O157 の検出について基礎検討を行った。

非損傷 O157 を約 5 cfu/25 g となるように接種したボイルスパゲティ、レタス、ニンジンの 6 時間培養後の O157 数および O157 以外の生菌数を Fig. 2 に示した。いずれの培養条件でも O157 を検出でき菌数測定が可能であった。ボイルスパゲティでは TSB 42°C 培養での増殖量が最も多かった (Fig. 2(a))。一方、レタス、ニンジンでは TSB 42°C および n+mEC 42°C 培養で増殖した O157 菌量が同程度であった (Fig. 2(b), (c))。多くの培養液で O157 以外の細菌が多数増殖していたが、CT-SMAC 上ではそれらの細菌の増殖が抑制されたため CT-SMAC 培地からの O157 の検出が妨げられることはなかった。また、PCR 法による確認を行ったところ、いずれの食品でも 6 時間培養後の TSB 42°C および n+mEC 42°C 培養液から O157 を検出できた。

なお、これらの 3 食品において TSB または n+mEC 増菌後の O157 菌数と PCR 感度の関係を調べたところ、Table 1 に示すようにいずれの場合も培養液中に O157 が 2 log cfu/mL 以上含まれていれば PCR 法による確認が可能であった。

以上のことから、今回供試した食品中の O157 が損傷状態にない場合は、6 時間の増菌培養後 0.1 mL の培養液を選択分離培地に塗布することで検査開始翌日に O157 を検出でき、PCR 法を用いれば検査開始後約 12 時間以内に陽性検体の判定が可能であることが判明した。また、増菌培地および培養温度は、今回供試した食品に対しては TSB 42°C 培養が O157 検出条件として適していると考えられた。

3. 凍結損傷 O157 の迅速検出の検討

モデル的に凍結損傷させた後にボイルスパゲティに接種した O157、およびボイルスパゲティに接種後 5 日間または 1 か月間凍結して損傷させた O157 の 6 時間培養によ

る検出結果を Fig. 3 に示した。モデル凍結損傷 O157 をボイルスパゲティに接種した場合は、検討したすべての培養条件での 6 時間培養後に O157 を検出できた。培養液中で増殖した菌量は TSB 42°C 培養の 3 log cfu/mL が最も多く、n+mEC 42°C 培養の約 30 倍であった (Fig. 3(a))(n=3, $p<0.01$)。また、ボイルスパゲティに接種後凍結して損傷状態にさせた O157 は、凍結 5 日後では検討したすべての培養条件から O157 を検出でき、TSB 42°C 培養での菌量は 3 log cfu/mL 以上であった (Fig. 3(b))。さらに、凍結 1 か月後ではすべての培養条件において 5 検体中 4 検体で O157 が増殖して検出され、TSB 42°C または b-mEC(b,n) 42°C 培養で増殖した菌量は 3 log cfu/mL で n+mEC 42°C 培養の約 10 倍であった (Fig. 3(c))(n=4, $p<0.01$)。

また、ここで用いたすべての 6 時間培養液の培養を継続して 24 時間培養した培養液を画線後、培養したところ、6 時間培養後に検出できなかった凍結 1 か月後の検体を除くすべての検体から O157 を検出することができた (データ略)。

上記の結果から、ボイルスパゲティ中の凍結損傷 O157 は TSB 42°C、6 時間培養後に PCR 法によって検出可能な程度まで菌量が増殖し、6 時間培養液の PCR 法を用いて検査開始後約 12 時間以内に検出可能であることが示された。

4. 加熱損傷 O157 および次亜塩素酸ナトリウム水溶液浸漬損傷 O157 の迅速検出の検討

モデル的に加熱損傷させた O157 をボイルスパゲティに、モデル的に次亜塩素酸ナトリウムにより損傷させた O157 をレタスおよびニンジンに添加し、各種培養条件下で 6 時間または 18 時間培養した場合の検出結果を Table 2 に示した。

6 時間の増菌培養液からの検出を試みた場合は、いずれの培養条件においても検出できない検体が生じた。すなわち、加熱または次亜塩素酸による損傷状態にある O157 に対して 6 時間の増菌培養液を用いた検出は迅速検出法と

(a) Cells injured by freezing in water

(b) Cells injured by freezing for 5 days in boiled spaghetti

(c) Cells injured by freezing for 1 month in boiled spaghetti

Fig. 3. Growth of freeze-injured *E. coli* O157 in boiled spaghetti after 6-h culture

TSB: Trypticase soy broth, n+mEC: modified EC broth with novobiocin, b-mEC(b,n): modified EC broth without bile salts (bile salts and novobiocin added to the broth and sample mixtures after mixing and standing for 2 h)

*: Statistically significant ((a): $n = 3$, (c): $n = 4$, $p < 0.01$)

NT: not tested

して適当でないことが示された。

そこで、これらの損傷菌の検出についてはさらに 18 時間培養の検討を加えた。加熱損傷菌は、TSB 36°C または 42°C 培養のいずれでも直接法により 3 検体すべてから検出できた。b-mEC(b,n) 42°C 培養では 2 検体から検出できたが TSB 培養に劣る成績であった。n+mEC 36°C または 42°C 培養では 3 検体すべてで検出できなかった。また、次亜塩素酸損傷菌は、レタスでは TSB 42°C 培養、

n+mEC 42°C 培養により 3 検体すべてから検出できた。TSB 36°C 培養では CT-SMAC 寒天培地を用いたビーズ法により 3 検体から検出できた。ニンジンでは TSB 36°C 培養、b-mEC(b,n) 42°C 培養で 3 検体いずれからも検出できた。TSB 42°C 培養では直接法およびビーズ法でクロモアガー O157 を用いた場合に 3 検体から検出できた。n+mEC 42°C 培養で検出できたのは 1 検体のみであった。

O157 の増菌培養法に関する報告には、非損傷菌に対しては n+mEC 培養より TSB 培養が優れていたとする例^{3), 4), 9)}が多いが、n+mEC 培養の方が TSB 培養より検出率が高かったとする例¹⁴⁾もある。また、損傷菌に対しても TSB, n+mEC, 選択剤を後添加する mEC などを用いた培養法の比較、検討が行われている^{5), 6), 8)}。これらの報告を概括すると、O157 の増菌培養においては、培養液中の食品やふき取り検査液の有無など培養系の構成によって、さらに対象とする食品の種類によって、効率の良い培養法は異なっている。そこで、今回対象とした食品について、想定される損傷菌の検出に適した増菌培養法を見いだすため検討を行った結果、総体的には TSB 42°C 培養が有効であることが確認できた。ただ、供試食品の種類によって各増菌培養条件下での検出効率に差異が見られた。一般生菌数の少ないボイルスパゲティでは、夾雑菌の増殖に妨げられることなく TSB での培養によって O157 を効率的に検出できたが、選択剤添加培地では検出率が低かった。一方、一般生菌数が多いレタスおよびニンジンでは、選択剤を含む n+mEC または b-mEC(b,n) による 42°C 培養でも TSB での培養と同等の検出率が得られる場合があった。このように、食品によって各培養条件下での検出効率に差異が見られる理由は、食品の成分または夾雑菌の存在によって選択剤の作用が影響を受けるためと推察された。

また、食品からの損傷 O157 の検出において増菌培養の時間短縮を試みた報告としては、それぞれ特定の食品について、凍結損傷菌を 6 時間の増菌培養の後検出した例¹³⁾、加熱損傷菌を対象とした検出において 6 時間の増菌培養は不十分であったとする例がある¹¹⁾。本研究では、凍結、加熱損傷菌に加え、次亜塩素酸ナトリウムによる損傷菌も併せて検討したところ、6 時間の増菌培養は凍結損傷菌に対しては有効であったが、加熱、次亜塩素酸ナトリウムによる損傷菌に対して 6 時間の増菌培養は不十分であり 18 時間の増菌培養が必要であった。

また、増菌培養液を用いた PCR 法およびイムノクロマト法キットによる検出の比較では、直接法またはビーズ法で陽性であったにもかかわらず PCR 法で陰性となった検体はニンジンの 1 検体のみであったが、イムノクロマト法キットで陰性となったのは 6 検体 (Table 2) であった。このことから、イムノクロマト法キットは操作が簡便で迅速性に優れているが、PCR 法の方が精度良く陽性検体を検出できることが分かった。

以上の結果から、加熱損傷したボイルスパゲティ中の O

Table 2. Detection of *E. coli* O157 in Cultures of Food Inoculated with Heat or Chlorine-Injured *E. coli* O157 after 6-h and 18-h Incubation

Injury treatment	Food	Culture condition	Incubation time	Screening assay		Direct ^d		IMS ^e	
				PCR	Transia card	CT-SMAC	CHROMagar	CT-SMAC	CHROMagar
Heat	Boiled spaghetti	TSB ^a at 36°C	6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			18	3/3 ^f	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		TSB ^a at 42°C	6	NT	NT	2/3	NT	NT	NT
			18	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		b-mEC(b,n) ^b at 42°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3	2/3
		n+mEC ^c at 36°C	6	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			18	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		n+mEC ^c at 42°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Chlorine	Lettuce	TSB ^a at 36°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	3/3	1/3	1/3	2/3	3/3	2/3
		TSB ^a at 42°C	6	NT	NT	1/3	NT	NT	NT
			18	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		b-mEC(b,n) ^b at 42°C	6	NT	NT	3/3	NT	NT	NT
			18	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3	2/3
		n+mEC ^c at 36°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	2/3	1/3	1/3	0/3	2/3	1/3
		n+mEC ^c at 42°C	6	NT	NT	1/3	NT	NT	NT
			18	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Chlorine	Carrot	TSB ^a at 36°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		TSB ^a at 42°C	6	NT	NT	1/3	NT	NT	NT
			18	3/3	2/3	2/3	3/3	2/3	3/3
		b-mEC(b,n) ^b at 42°C	6	NT	NT	2/3	NT	NT	NT
			18	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		n+mEC ^c at 36°C	6	NT	NT	0/3	NT	NT	NT
			18	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3
		n+mEC ^c at 42°C	6	NT	NT	1/3	NT	NT	NT
			18	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3

^a: Trypticase soy broth^b: Modified EC broth without bile salts (bile salts and novobiocin added to the broth and sample mixtures after mixing and standing for 2 h)^c: Modified EC broth with novobiocin^d: Direct plating of cultured broth^e: Plating cultured broth after immunomagnetic separation^f: Number of positive samples/number of tested samples

NT: not tested

157 あるいは次亜塩素酸ナトリウムにより損傷したレタスまたはニンジン中の O157 の検査法としては、TSB 42°C、18 時間培養後に PCR 法を用いる方法が適当であり、検査開始後 24 時間以内に陽性検体を判定可能であることが分かった。

ま と め

損傷 O157 の検出を目的として増菌培地、培養温度、培養時間を検討した。ボイルスパゲティに接種した凍結損傷 O157 は 6 時間の増菌培養後に PCR 法を用いることに

よって検査開始後 12 時間以内に検出可能であることが示された。ボイルスパゲティに接種した加熱損傷 O157、レタスまたはニンジンに接種した次亜塩素酸による損傷 O157 は 6 時間の増菌培養後では増殖量が少ないため検出効率が低かったが、18 時間の増菌培養後では選択分離培地によって検出できた。この場合、PCR 法を用いれば検査開始後 24 時間以内に陽性検体の判定が可能であった。したがって、ボイルスパゲティからの加熱損傷 O157、野菜からの次亜塩素酸損傷 O157 の検出には、まず、6 時間培養液について PCR でのスクリーニングを行い、PCR 陰

性の場合には 18 時間培養液について選択分離培地法または PCR 法を行うのが最も効率的であることが判明した。また、培養条件は、本研究で取り上げた食品では TSB 42°C 培養を用いることで非損傷菌と損傷菌のいずれの O157 も検出することが可能であった。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長, 乳肉衛生課長通知“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 199 号 (1997).
- 2) Tsai, W., Miller, C. E., Richter, E. R., Determination of the sensitivity of a rapid *Escherichia coli* O157:H7 assay for testing 375-gram composite samples. Appl. Environ. Microbiol., **66**, 4149–4151 (2000).
- 3) Narimatsu, H., Kobayashi, T., Seko, S., Mikami, K., Okuma, S., Gotou, Y., Kimoto, S., A rapid screening method for the detection of VTEC and *Salmonella* from swab specimens of flayed carcasses by multiplex PCR. Nihon Shokuhin Biseibutu Gakkai Zasshi (Jpn. J. Food Microbiol.), **18**, 21–25 (2001).
- 4) Ueda, S., Mineno, F., Kuwabara, Y., Evaluation of the PCR method for the detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in foods and other materials. Boukin Boubai (J. Antibact. Antifung. Agents), **27**, 441–446 (1999).
- 5) Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Kojima, T., Ikeda, M., Kodaka, H., Konuma, H., Kumagai, S., 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).
- 6) Hara-Kudo, Y., Touketsushokuhin Ni Okeru Choukansyukketsusei Daichoukin O157 No Sonsyou To Sono Kensyutsu (Induction and detection of freeze-injury *Escherichia coli* O157 : H7 in frozen foods), Boukin Boubai (J. Antibact. Antifung. Agents), **30**, 111–115 (2002).
- 7) Ohsawa, R., Syokusuikei Kentai Karano Choukansyukketsusei Daichoukin O157 No Kensyutsu Wa Naze Muzukashiinoka (Why is so difficult the detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in foods and water samples?), Boukin Boubai (J. Antibact. Antifung. Agents), **30**, 91–94 (2002).
- 8) Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Shimizu, Y., Fukuyama, M., Basic examination of the enrichment culture for *Escherichia coli* O157 : H7 injured by heating. Nihon Shokuhin Biseibutu Gakkai Zasshi (Jpn. J. Food Microbiol.), **19**, 65–69 (2002).
- 9) Ozaki, N., Suzuki, R., Sata, S., Ohsawa, R., Watanabe, Y., Yamai, S., Wada, A., Watanabe, H., Studies on enrichment broth for Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157. Nihon Saikingaku Zasshi, **52**, 505–511 (1997).
- 10) Maehara, T., Nakamoto, N., Morikouchi, I., Ikawa, H., Studies of selective enrichment and isolation by immunomagnetic separation for *Escherichia coli* O157. Nihon Shokuhin Biseibutu Gakkai Zasshi (Jpn. J. Food Microbiol.), **16**, 181–185 (1999).
- 11) Zhao, T., Doyle M. P., Evaluation of universal preenrichment broth for growth of heat-injured pathogens. J. Food Prot., **64**, 1751–1755 (2001).
- 12) Masuda, T., Kawamura, A., Miwa, N., Akiyama, M., Miyamoto, H., Terai, K., Epidemiological examination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157. Shizuokaken Kankyouseiseikagaku Kenkyusho Houkoku (Bulletin of Shizuoka Institute of Environ. and Hyg.), **42**, 41–48 (1999).
- 13) Suzuki, M., Kitazume, H., Yamada, M., Matsumoto, Y., Muto, T., Fujii, K., A study of enrichment culture for the detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from foods. Yokohama Eiken Nenpou (Ann. Rep. Yokohama Inst. Health), **39**, 71–74 (2000).
- 14) Hara-Kudo, Y., Onoue, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Kumagai, S., Comparison of enrichment procedures for isolation of *Escherichia coli* O157 : H7 from ground beef and radish sprouts. Int. J. Food Microbiol., **50**, 211–214 (1999).