ノート

挽き肉からの *Escherichia coli* O157:H7 の検出法の検討

(平成8年12月27日受理)

尾上 洋一^{*1} 古川 一郎^{*1} 寺西 大^{*1}
 長谷川幸江^{*1} 森 實^{*1} 小沼博隆^{*2}

Evaluation of Methods for the Isolation and Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from Minced Beef

Youichi ONOUE^{*1}, Ichiro FURUKAWA^{*1}, Hiroshi TERANISHI^{*1},
 Yukie HASEGAWA^{*1}, Minoru MORI^{*1}
 and Hirotaka KONUMA^{*2}

(^{*1}Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-1-1, Nakao, Asahi-ku,
 Yokohama 241, Japan; ^{*2}National Institute of Health Sciences:
 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan)

This study has evaluated enrichment and detection procedures for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into minced beef, i.e., 24 hr enrichment in modified EC broth containing novobiocin (mEC+n) followed by plating onto sorbitol IPA bile salt agar (SIB), sorbitol MacConkey agar (SMAC), cefixime-tellurite SMAC (CT-SMAC) and Rainbow O157 agar, or immunomagnetic separation (IMS) followed by plating onto these four kind of media. The recovery of *E. coli* O157:H7 was greater on CT-SMAC than SMAC, SIB or Rainbow O157 Agar. The protocol using mEC+n incubated at 42°C, followed by IMS and inoculation onto CT-SMAC was the most successful procedure. However, 24 hr enrichment in mEC+n followed by CT-SMAC was almost as effective as the IMS method for the isolation of *E. coli* O157:H7.

(Received December 27, 1996)

Key words: 挽き肉 minced beef; *Escherichia coli* O157:H7; 免疫磁気分離法 immunomagnetic separation; 培養条件 culture conditions

緒 言

腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli* O157:H7/H-) はヒトに出血性の腸炎や溶血性尿毒症を引き起こす菌として知られ、これまで我が国においては数事例の集団事例と多くの散発事例が発生してきたが、1996年には全国的に集団食中毒事例が多発し、1996年12月10日現在の全国の有症者累計は9,300人に上っている。これまでに *E. coli* O157 による食中毒の推定原因食品がいくつか報告されているが、我が国においては菌が検出されず原因食品が特定できない事例が多い^{1)~3)}。

一方、*E. coli* O157 の試験法に関しては増菌・分離培養法^{4)~8)} や増菌・分離培養法に免疫磁気分離法 (Immunomagnetic separation, IMS)^{9)~11)} を組み合わせた方法などが報告されている。厚生省が1996年8月に出した通知では、基本として増菌・分離培養法と、酵素免疫組み合法、IMS 組み合法の3検出法が示され、これらに用いられる分離培地としてソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC)、SIB 寒天培地などの選択培地が記載されている¹²⁾。

我が国においては *E. coli* O157 の分離用培地として、これまでソルビトール分解性を指標とする SMAC 又は SIB 培地が常用されてきた¹³⁾。しかし、これらの培地は *E. coli* O157 以外の *E. coli* や *Proteus* などの増殖が抑

^{*1} 神奈川県衛生研究所: 〒241 横浜市旭区中尾 1-1-1

^{*2} 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

制されないことから、多くのマイクロフローが発育し、汚染菌数の低い *E. coli* O157 の分離が困難であった。Willshaw ら¹⁴⁾ は英国でのビーフバーガーによる食中毒事例において、*E. coli* O157 数を MPN 法で測定し、2/25 g 以下であったことから、発症菌量は 10 organisms/ ヒト以下と推定している。このような少数菌で感染が成立することから食品中の少数の汚染菌を増菌し分離検出する手法が求められている。このため Zadik ら⁹⁾ はこれらのマイクロフローを低減させる効果を有する cefixime-tellurite SMAC (CT-SMAC) を報告した。また、少数の本菌を効率良く回収するための方法として、O157 抗体を結合させた Beads を用いて集菌する IMS が Okrend ら⁹⁾、Wright ら¹⁰⁾ によって報告されている。

本報告では軽度から高度にわたる種々のレベルの汚染を想定して、*E. coli* O157:H7 を接種した挽き肉について、培養法及び IMS の組み合わせによる有用な分離法を確立するために以下の実験を実施した。

方 法

1. 使用菌株

神奈川県衛生研究所で挽き肉より分離した *E. coli* O157:H7 (8-3 株, VT2 産生) をトリブチケースソイブロス (TSB, BBL) で 35°C, 18 時間培養し、挽き肉への接種試験に供した。

2. 挽き肉への接種試験法

E. coli 8-3 株の TSB, 35°C, 18 時間培養液を 0.1% ペプトン加生理食塩水で希釈し、接種後の菌数が 1~10⁴/25 g レベルとなるようにストマッカー用ポリ袋中の挽き肉サンプル (25 g) 各 2 検体に接種した。接種菌数はハートインフュージョン寒天平板 (Difco) を用いて確認した。また、対照として *E. coli* 無接種検体についても検査を実施した。

接種した挽き肉は市販挽き肉 2 種類 (A 及び B 食肉販売店製) を用い、それぞれ細菌数 (標準寒天培地, 35°C, 48 時間培養法) 及び大腸菌群数 (デソオキシコレート培地, 35°C, 18 時間培養法) を測定した。

3. 検出方法

1) 増菌及び分離培養法

挽き肉サンプル (25 g) にノボピオシン加 mEC ブイヨン (mEC+n) 225 mL を加え、42°C, 24 時間、静置培養を行った⁷⁾。次いで、この mEC+n 培養液を SIB (極東製薬), SMAC(Difco), CT-SMAC(SMAC にセフィキシム 0.05 mg/L (Dynal), 亜テルル酸カリウム 2.5 mg/L 添加 (Dynal))⁹⁾、レインボーアガー O157 (Rainbow, Biolog) の各寒天平板に塗抹し、37°C 及び 42°C で 18~24 時間培養を行った。

2) 免疫磁気分離 (IMS)

mEC+n の増菌培養液の 1 mL をとり、ダイナビーズ Anti-*E. coli* O157 による IMS を行った^{9), 10)}。IMS 終了後、SIB, SMAC, CT-SMAC, Rainbow の各寒天平

板に塗抹し、37°C で 18~24 時間培養を行った。

3) *E. coli* O157 の性状確認

SIB, SMAC, CT-SMAC においてはソルビトール非分解集落を、Rainbow においては黒色集落を釣菌し、1% セロビオース加 LIG 培地 (極東製薬) に接種し、37°C, 18 時間培養した。高層部黄変、β-グルクロニダーゼ陰性、インドール陽性を示した菌について、セロバクト *E. coli* O157 ラテックススライド凝集テスト (Medvet Science) を行い O157 抗原の有無を確認した。

結果及び考察

A 販売店より購入した挽き肉の細菌汚染状況は細菌数 3.6×10⁴/g、大腸菌群数 1.1×10²/g であった。細菌数 10⁴/g は挽き肉としては細菌汚染度が低く、良好な製品と考えられた。B 販売店より購入した挽き肉の細菌汚染状況は細菌数 1.2×10⁶/g、大腸菌群数 7.0×10³/g であり、平均的な挽き肉の細菌汚染レベルであった。これらの細菌汚染レベルの挽き肉に *E. coli* O157 を接種し、IMS を使用しない培養法のみによる検出を試みた (Table 1)。*E. coli* O157 接種菌数が 10²/25 g 以上では、挽き肉 A, B とも SIB, SMAC, CT-SMAC, Rainbow の 4 培地のいずれの条件においても *E. coli* O157 がすべての実験系で 2 検体ずつ検出された。しかし、10¹/25 g では SMAC (42°C) においては 2 検体中 1 検体が発見できなかった。1~10¹/25 g では、挽き肉 A, B における 37, 42°C 分離培養条件の合計検体数に占める検出数をみると SIB 0/6, SMAC 2/6, CT-SMAC 4/6, Rainbow 2/4 となり、4 培地中 CT-SMAC が最も高い検出数を示した。これまで我が国では SIB や SMAC 培地などの選択培地が使用されてきたが¹³⁾、これらの培地はマイクロフローが抑制されにくい培地であり、このことも食品から *E. coli* O157 が検出されにくかった要因のひとつと考えられ、今後 CT-SMAC の使用により *E. coli* O157 の検出率の向上が図られることが期待される。しかし、セフィキシムは *E. coli* に対する抗生剤であることから、幅広く病原大腸菌を検索する際には他の培地との併用が必要であろう。Rainbow においてはノボピオシンを 10~100 mg/L 添加することによりマイクロフローを抑制できるとされており¹⁵⁾、1~10¹/25 g においてもノボピオシンの添加により CT-SMAC と同等の検出率が得られると推定される。

分離平板の培養温度について、Okrend は平板を 37°C よりも 42°C で培養することにより *E. coli* O157 の出現数を維持する一方、肉に由来するマイクロフローを下げるできると報告している⁷⁾。本実験においては両培養温度間のマイクロフローの影響は認められず、42°C より 37°C において *E. coli* O157 検出件数の高い場合も認められた。これは Okrend の増菌法は 35°C であるのに対して、本実験は 42°C 増菌培養法であることから、42°C の増菌の段階で競合するミクロ

Table 1. Recovery of *Escherichia coli* O157:H7 Inoculated in Two Lots of Minced Beef by Eight Methods without IMS^a

Inoculum CFU/25 g	Minced beef	Trials	No. of positive by method:							
			mEC+n ^b -SIB ^c (37°C)	mEC+n -SIB (42°C)	mEC+n -SMAC ^d (37°C)	mEC+n -SMAC (42°C)	mEC+n -CT-SMAC ^e (37°C)	mEC+n -CT-SMAC (42°C)	mEC+n -Rainbow ^f (37°C)	mEC+n -Rainbow (42°C)
1~10 ¹	A ^g	2	0	0	1	1	2	1	1	1
	B ^h	2	0	NT ⁱ	0	NT	1	NT	NT	NT
10 ¹ ~10 ²	A	2	2	2	2	1	2	2	2	2
	B	2	2	NT	2	NT	2	NT	NT	NT
10 ² ~10 ³	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	B	2	2	NT	2	NT	2	NT	NT	NT
10 ³ ~10 ⁴	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	B	2	2	NT	2	NT	2	NT	NT	NT
10 ⁴ ~10 ⁵	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	B	2	2	NT	2	NT	2	NT	NT	NT

^a IMS: Immunomagnetic separation^b mEC+n: Modified EC broth^c SIB: Sorbitol IPA bile salts agar^d SMAC: Sorbitol MacConkey agar^e CT-SMAC: Cefixime-tellurite-sorbitol MacConkey agar^f Rainbow: Rainbow agar O157^g Minced beef A showed a standard plate count of 3.6×10^4 /g and the presence of 1.1×10^2 /g coliforms.^h Minced beef B showed a standard plate count of 1.2×10^6 /g and the presence of 7.0×10^3 /g coliforms.ⁱ NT: Not tested

Table 2. Recovery of *Escherichia coli* O157: H7 Inoculated in Two Lots of Minced Beef by four Methods with IMS^a

Inoculum CFU/25 g	Minced beef	Trials	No. of positive by method:			
			mEC+n ^b -IMS-SIB ^c	mEC+n -IMS-SMAC ^d	mEC+n -IMS-CT- SMAC ^e	mEC+n -IMS-Rainbow ^f
1~10 ¹	A ^g	2	2	2	2	2
	B ^h	2	1	1	2	NT ⁱ
10 ¹ ~10 ²	A	2	2	2	2	2
	B	2	2	2	2	NT
10 ² ~10 ³	A	2	2	2	2	2
	B	2	2	2	2	NT
10 ³ ~10 ⁴	A	2	2	2	2	2
	B	2	2	2	2	NT
10 ⁴ ~10 ⁵	A	2	2	2	2	2
	B	2	2	2	2	NT

Abbreviations are the same as Table 1.

Agar plates such as SIB, SMAC, CT-SMAC and Rainbow were incubated at 37°C.

ローラの数が低減しているため分離培養の温度による効果が生じなかったものと思われる。

次に、従来の培養法に IMS を併用した際の検出率について検討した (Table 2)。分離培養は 37°C 培養のみで行った。IMS を組み合わせることにより接種菌数 10¹/25 g 以上では実施した SIB, SMAC, CT-SMAC 培地のいずれの培地においても *E. coli* O157 を全検体から検出することができた。

しかし、1~10¹/25 g では細菌数が 10⁶/g、大腸菌群数 10³/g を示した挽き肉 B については、SIB 及び SMAC の両分離培地とも 2 検体中 1 検体からの検出であったが、セフィキシムと亜テルル酸により選択性を強化した CT-SMAC では 2 検体から検出された。このことは IMS 組み合わせ法においても細菌数や大腸菌群汚染が高い場合には、*E. coli* O157 数 1~10¹/25 g が検出限界であることを示している。Bolton はビーフバーガーなどに *E. coli* O157 を 10~100/25 g 接種し、従来法、遠心法、IMS を用いて回収試験を実施し、その結果 IMS が最も有効であったと報告している¹¹⁾。Weagant は増菌培地及び分離培地としてそれぞれ EEB, CT-SMAC を用いて、IMS 使用の効果を食品への接種回収試験により比較検討している¹⁰⁾。それによれば、IMS の組み合わせの有無による検出率は *E. coli* O157 接種菌数 0.1/g では IMS 有 34% と無 33% であり、IMS の効果は認められなかったが、菌数 1/g においては検出率は有 29%、無 23% となり、また菌数 10/g では有 32%、無 27% となったことから、IMS 組み合わせにより検出率に数%の上昇効果が生じたと報告している。更に、凍結損傷を与えて同様に実験を行い、凍結損傷菌接種菌数 0.1/g においては IMS 組み合わせ法では *E.*

coli O157 を検出できなかったことを報告している。現在、学校給食施設の検食が冷凍保存されていることから、損傷菌の検出を考慮する場合には、IMS 組み合わせ法のみで検査を実施することは *E. coli* O157 の存在を見逃す恐れがあると考えられる。

更に、増菌培養における振とう培養と静置培養の効果について、Bennett は SMAC を CT-SMAC に置き換えて用いれば、mEC+n の振とう培養法と静置培養法における *E. coli* O157 の検出に差がないと報告し、これは CT-SMAC が平板上に混在するソルビトール発酵性の菌を大きく減少させるためであるとしている⁹⁾。また、非運動性の株においては静置培養が有効であると述べている。Okrend は mEC+n-SMAC の培養法を用い、接種菌数が 0.6/g と 5.0/g の場合に 6 時間振とう培養法と 24 時間静置培養を比較し、0.6/g では 24 時間静置培養法が有効であったとしている。

このようなことから食品中の *E. coli* O157: H7/- の汚染菌数は Willshaw らのハンバーガーの事例のように 1~10/25 g と考えられ、この汚染菌数に対しては mEC+n, 42°C, 24 時間静置培養後、CT-SMAC を分離培地として用いることにより、従来法による分離培養においても IMS 組み合わせ法とほぼ同等の検出が可能であるとともに、損傷菌に対しても考慮することができる。

文 献

- 1) 花岡正季: 食品と微生物 9, 121~125 (1992).
- 2) 病原大腸菌 O157 対策本部: 食品衛生研究 46(12), 7~28 (1996).
- 3) 篠田純男: 防菌防黴, 24, 701~706 (1996).
- 4) March, S. B., Ratnam, S.: J. Clinical Microbiol. 23, 869

- ～872 (1986).
- 5) Szabo, R. A., Todd, E. C. D., Jean, A.: J. Food Protect. **49**, 768～772 (1986).
 - 6) Bennett, A. R., MacPhee, S., Betts, R. P.: Lett. Appl. Microbiol. **20**, 375～379 (1995).
 - 7) Okrend, A. J. G., Rose, B. E., Bennett, B.: J. Food Protect. **53**, 249～252 (1990).
 - 8) Zadik, P. M., Chapman, P. A., Siddons, C. A.: J. Med. Microbiol. **39**, 155～158 (1993).
 - 9) Okrend, A. J. G., Rose, B. E., Lattuada, C. P.: J. Food Protect. **55**, 214～217 (1992).
 - 10) Wright, D. J., Chapman, P. A., Siddons, C. A.: Epidemiol. Infect. **113**, 31～39 (1994).
 - 11) Bolton, F. J., Crozier, L., Williamson, J. K.: Lett. Appl. Microbiol. **23**, 317～321 (1996).
 - 12) 厚生省生活衛生局通知: “病原性大腸菌 O157 に係る食品等の汚染実態調査の実施について” 平成 8 年 7 月 18 日, 衛食第 195 号, 衛乳第 174 号 (1996).
 - 13) 大野 章: モダンメディア **42**(8), 39～43 (1996).
 - 14) Willshaw, G. A., Thirlwell, J., Jones, A. P., Parry, S., Salmon, R. L., Hickey, M.: Lett. Appl. Microbiol. **19**, 304～307 (1994).
 - 15) BIOLOG: Rainbow Agar O157 (1996) Biolog, Inc., Hayward, CA.
 - 16) Weagant, S. D., Bryant, J. L., Jinneman, K. G.: J. Food Protect. **58**, 7～12 (1995).