

平成 24 年度・衛生研究所研究費事業報告
毒素原性大腸菌の効率的な検出に関する研究
(計画年度：平成 24 年度)

研究代表者

食品媒介感染症担当 荒井公子

共同研究者

食品媒介感染症担当 門脇奈津子 星野梢 大塚佳代子 野口貴美子

目的

細菌性食中毒の原因究明のためには、患者便や原因推定食品から原因菌を分離し、細菌学的解析を行う必要があるが、汚染菌量が少なく夾雑菌が存在する場合、食品から目的とする菌を分離することは容易ではない。これまでに、担当当では迅速性や検出感度の優れるリアルタイム PCR による毒素原性大腸菌の病原遺伝子検出法を確立してきた。

今回は、食品からの効率的かつ迅速な毒素原性大腸菌 (ETEC) 分離を目的として病原遺伝子検出法と培養法を併用した検査法について検討するとともに、得られた検査法を用いて、市販食品について ETEC 汚染の実態を調査した。

成果概要

1 増菌培養法の検討

食中毒由来の ETEC 06, ETEC 0169 及び食品からの分離されることの多い大腸菌群 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, 及び *Hafnia alvei* について、Buffered pepton water (BPW), Universal preenrichment broth (UPB), mEC 培地における動態を確認した。BPW, UPB-35°C 培養では ETEC, 他の菌共に同様の動態を示した。mEC-42°C 培養では ETEC の発育は良好で *K. pneumoniae*, *E. cloacae* も同様の動態を示したが *H. alvei* の発育は抑制されたことから、増菌培養には ETEC の発育を妨げることなく、一部の夾雑菌の発育を抑制する mEC 培地-42°C 培養が適していると考えられた。

2 分離培養法の検討

ETEC 06, ETEC 025, ETEC 0169 と *K. pneumoniae* を 1:1, 1:10, 1:100 になるよう調整した混合菌液を、マッコンキー寒天培地, TTC 加ターゲットール 7 寒天培地, X-MG 寒天培地に画線塗抹し ETEC 分離を試みた。すべての培地で 1:1, 1:10 混合菌液では菌分離できたが、1:100 菌液では ETEC の独立集落を得られなかったことから、夾雑菌の量によって、菌分離が困難になることが確認された。

3 菌添加による検査法の検討

牛挽肉及び豚挽肉に mEC 培地を加え、42°C で 6 時間培養した。培養液に ETEC 06, ETEC 0169 をそれぞれ 10^2 , 10^3 cfu/ml となるよう添加し、16 時間培養した。菌添加直後の試料 (; 食品の 6 時間培養液) 及び菌添加後 16 時間培養の試料 (; 食品の 22 時間培養液) について病原遺伝子検出と菌分

離を試みた。病原遺伝子検出は 22 時間培養液のみすべて陽性であった。また、菌分離は、夾雑菌が多い豚挽肉に低菌量添加した培養液からはできなかったが、これを除く 6 時間及び 22 時間培養液からは可能であった。

以上のことから ETEC の検査法は、mEC 培地-42°C 22 時間培養液で病原遺伝子検出法を実施し、陽性であった場合、6 時間または 22 時間培養液を、複数種類の分離平板に塗抹培養する。また、菌の同定は培地上の典型的な 10 集落以上について病原遺伝子を確認した後、生化学的性状試験により実施することとした。

4 市販食品を用いた汚染調査

ETEC の病原遺伝子検出法では、野菜 30 検体、浅漬け 20 検体、牛レバー 25 検体からは病原遺伝子は検出されなかったが、挽肉 76 検体中豚挽肉 3 検体、鶏挽肉 5 検体から病原遺伝子が検出された。鶏挽肉 1 検体からのみ菌分離され、当検体はリアルタイム PCR で Ct 値が低く、遺伝子陽性の他の 7 検体に比して汚染菌量が多いことが示唆された。

今回、病原遺伝子検出法をスクリーニング検査とし菌分離の効率を上げるため、短時間の増菌培養を実施した。また、分離平板を複数種類用いて多角的に釣菌数を増やし、菌の同定において病原遺伝子検出を先行させることで、目的菌の判定時間を短縮し、ETEC の効率的な検査法を確立した。

しかし、食品からの菌分離の成否には目的菌の汚染菌量、夾雑菌量、釣菌数などが影響し、病原遺伝子が検出されても菌分離が難しくなることも再認識された。

今後の展望

今回検討した検査法を用いて、汚染リスクの高い食品を特定することは、食中毒を防止するために必要な方策であり、食品取扱業者に対する衛生管理の指導、消費者への食中毒予防の啓発など食品衛生行政の推進に寄与するものと考えられる。また、ETEC の病原遺伝子検出法は培養法に比べ、感度に優れており、菌の同定や病原性の確認等への利用のみならず、本検査法を培養法と同等の検査法として認知されることが期待される。そのためには、今後さらに食品の培養法と病原遺伝子検出法によるデータを継続的に積み重ねていくことが求められる。

公表等

第 25 回地研全国協議会 関東甲信静支部 細菌研究部会