

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4334067号
(P4334067)

(45) 発行日 平成21年9月16日(2009.9.16)

(24) 登録日 平成21年7月3日(2009.7.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/20 A

C 1 2 R 1:19

C 1 2 Q 1/04

請求項の数 3 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-186010
 (22) 出願日 平成11年6月30日(1999.6.30)
 (65) 公開番号 特開2001-8679(P2001-8679A)
 (43) 公開日 平成13年1月16日(2001.1.16)
 審査請求日 平成18年6月23日(2006.6.23)

(73) 特許権者 000120456
 栄研化学株式会社
 東京都台東区台東4丁目19番9号
 (72) 発明者 池戸 正成
 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内
 (72) 発明者 小松 理
 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社野木事業所内
 審査官 左海 匡子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 大腸菌O26分離用培地

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラムノース、フェノールレッド、酵素発色基質、亜テルル酸塩およびセフィキシムを含有する培地であって、酵素発色基質がX-Glcおよび／またはX-Galであることを特徴とする大腸菌O26分離用培地。

【請求項2】

さらに胆汁酸塩および／またはラウリル硫酸ナトリウムを含有することを特徴とする請求項1に記載の大腸菌O26分離用培地。

【請求項3】

培地 1, 000mLあたり、ペプトン5-15g、酵母エキス2-5g、塩化ナトリウム0.1-10g、ラウリル硫酸ナトリウム0.05-0.5g、X-Glc0.05-0.5gおよび／またはX-Gal0.05-0.5g、ラムノース1-20g、亜テルル酸カリウム1-5mg、セフィキシム0.005-0.1mg、フェノールレッド0.01-0.1g、寒天10-20gを含有する大腸菌O26分離用培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は食中毒菌である腸管出血性大腸菌血清型O26（大腸菌O26）の分離用培地に関するものである。

【0002】

なお、本発明では次の略語を使用することがある。また、－G l cで表される酵素発色基質は、グルクロン酸体および適当な塩を含むものとする。

【略語表】

X－G l c：5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucopyranoside

X－G a l：5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

B l u o－G l c：5-Bromo-3-Indolyl-β-D-Glucopyranoside

B l u o－G a l：5-Bromo-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

M U－G l c：4-Methyl-Umbelliferyl-β-D-Glucopyranoside

M U－G a l：4-Methyl-Umbelliferyl-β-D-Galactopyranoside

O N P－G l c：o-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranoside

10

O N P－G a l：o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside

M a g e n t a－G l c：5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucopyranoside

M a g e n t a－G a l：5-Bromo-6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

S a l m o n－G l c：6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucopyranoside

S a l m o n－G a l：6-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside

【0003】

【従来の技術】

大腸菌O26は腸内細菌科に属し、グラム陰性、通性嫌気性の無芽胞桿菌であり、菌体表面にある抗原構造によって通常の大腸菌と区別される。大腸菌O26による食中毒は、本菌に汚染された食肉、牛乳、卵及びこれらの加工食品を摂取し、腸管内で増殖することによって起こる感染型食中毒で、大腸菌O26食中毒は増加の傾向にあるとされている。

20

【0004】

大腸菌O26の検出は一般的には以下のように行われている。まず、検体をマッコンキー寒天培地(MAC)、デソキシコーレイト寒天培地(DESO)などの腸内細菌選択培地に塗抹する。37℃、18～24時間培養し、平板培地上の集落を観察する。さらに平板培地上の大腸菌と思われる集落を釣菌し、大腸菌同定キットや生化学性状検査鑑別培地に接種し、37℃、18～24時間培養し同定する。大腸菌と同定されたのち、これらの集落や増菌された菌を用いて、抗血清による免疫学的試験により血清型O26であることを確認する。菌数の少ない場合は、分離培養の前にmodified EC(mEC)培地やEC培地による増菌培養を行う場合がある。

30

【0005】

このように従来の大腸菌O26検出法は熟練された技術と3～5日間の長時間が必要であるという問題があった。また、前述した各種の選択分離培地は大腸菌のみの選択分離を目的としたものではなく、そのほとんどの培地では多くの腸内細菌が発育する。

それ故、このような選択分離培地から大腸菌を疑う菌株を鑑別するには熟練と経験が必要であり、大腸菌と確認された後さらに血清型を特定する必要がある。通常検査される材料中には食中毒の原因となる大腸菌O26と同時に通常の大腸菌が混在している場合が多く、そのため多くの集落を釣菌して確認する必要がある、原因菌の特定は困難を極めている。従って、大腸菌O26のみを鑑別できる選択分離培地での所見で大腸菌O26の有無が判断できれば、汚染された食材や食品を早期に排除でき、また食中毒患者の早期診断が可能になる。大腸菌O26を短時間で検出し、汚染された食品や加工原料を排除することは、食品会社や一般消費者にとって重要な問題であり、また食中毒患者の糞便等の検体より、原因菌を迅速に発見することは、患者の早期治療の一助となる。

40

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明の目的は、食品をはじめとする種々の検体中の大腸菌O26を、特殊な熟練や技術を必要とせず、短時間にかつ容易にまた正確に検出できる特定の培地組成物を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

50

従来、細菌の識別にその菌が保有する酵素を利用する方法が知られている。それはその酵素により分解され、色素を発生する酵素発色基質を用いる方法である。

例えば、1975年、1976年に発表された文献[1][2]には、細菌由来の酵素により分解されて黄色の色素であるオルトニトロフェノールを発生するONP-GalやONP-Glc、蛍光性色素であるメチルウンベリフェロンを発生するMU-GalやMU-Glcを酵素発色基質として添加した酵素発色基質培地の記載があり、大腸菌等の微生物の識別に用いられている。

また、米国特許3870601号、特開昭64-2596号、特開平4-51900号等にはMagenta-Gal、X-Glc、Blueo-Gal、X-Gal等の酵素発色基質を添加した腸内細菌識別用培地が記載されている。

しかしながら、酵素発色基質を大腸菌O26の分離用・鑑別用に用いた培地の例は未だ報告されていない。

[1] J. Clin. Pathol. (1975), 28(8), 686-7

[2] ACTA PATHOL. MICROBIOL. SCAND. SECTION B, (1976 Oct) 84B (5) 245-51.

【0008】

かかる実状において本発明者は、大腸菌O26は他の大腸菌と同様にグルコシダーゼおよびガラクトシダーゼを保有するが、大腸菌O26は他の大腸菌とは異なりラムノース分解能を有さないことに注目し、この性質とpH指示薬および酵素発色基質とを組み合わせることにより、鋭意努力の結果、本発明を完成した。つまり、大腸菌O26では、培地中のラムノースが分解されないため、pH指示薬は中性色を示し、また、保有している酵素により、酵素発色基質は分解され発色するが、見かけ上の色はpH指示薬の中性色と基質の発色との相加された発色となる。

通常の大腸菌では、培地中のラムノースが分解され酸を生成するため、pH指示薬は酸性色を示し、保有している酵素により、酵素発色基質は分解され発色するが、見かけ上の色はpH指示薬の酸性色と基質の発色との相加された発色となる。

この2者の相加された発色の違いにより本発明では大腸菌O26を分離鑑別する。

本発明に用いる基礎培地としては糖分解能によって腸内細菌を鑑別するSS寒天培地、マッコンキー寒天培地、DHL寒天培地、デソキシコーレート寒天培地等が使用可能である。

【0009】

(1)本発明はラムノース、pH指示薬、および酵素発色基質を含有する大腸菌O26分離用培地である。

(2)pH指示薬としては中性色と酸性色が異なる指示薬が本発明に使用可能であり、フェノールレッド、ニュートラルレッド、プロモフェノールパープル、プロモチモールブルー、プロモフェノールレッド、クロロフェノールレッドよりなる群から選ばれるpH指示薬が本発明には適している。

(3)その中でもpH指示薬としてはフェノールレッドが最適である。

(4)酵素発色基質はグルコピラノシド誘導体またはガラクトピラノシド誘導体より選ばれ、グルコピラノシド誘導体はグルクロニダーゼにより分解され、ガラクトピラノシド誘導体はガラクトシダーゼにより分解され、発色が起こる。なお、本発明では発蛍光性の基質、例えばMU-Gal、MU-Glcも酵素発色基質として取り扱う。

(5)また酵素発色基質としてインドリル誘導体も本発明には有用である。インドリル誘導体は酵素により分解され酸化され、対応するインドリル色素、例えばX-Gal・X-Glcであれば、青色のプロモクロロインジゴを発生する。

(6)酵素発色基質はX-Glc、X-Gal、Blueo-Glc、Blueo-Gal、MU-Glc、MU-Gal、ONP-Glc、ONP-Gal、Salmon-Glc、Salmon-Galよりなる群より選ばれ、1種でも複数でも構わない。

(7)さらに本発明の培地に炭素数が10～30のアニオン性界面活性剤を1種または2種以上を添加すると本発明の選択性が増す。

(8)アニオン性界面活性剤としては胆汁酸塩類およびアルキル硫酸塩類より選ばれ、よ

10

20

30

40

50

り具体的には胆汁末、コール酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム等が本発明には好ましい。

(9)さらに選択剤として亜テルル酸塩を添加すると本発明の選択性が増す。

(10)さらに選択剤としてセフィキシムを添加すると本発明の選択性が増す。

(11)より具体的には本発明は、培地 1, 000 mLあたり、ペプトン5-15 g、酵母エキス2-5 g、塩化ナトリウム0.1-10 g、ラウリル硫酸ナトリウム0.05-0.5 g、X-Glc 0.05-0.5 gおよび／またはX-Gal 0.05-0.5 g、ラムノース1-20 g、亜テルル酸カリウム1-5 mg、セフィキシム0.005-0.1 mg、フェノールレッド0.01-0.1 g、寒天10-20 gを含有する大腸菌O26分離用培地である。

10

X-Glc/X-Galは単独で使用しても良いし、両方を使用しても良い。

【0010】

【作用】

本発明の培地の作用を上記(11)記載の培地組成に従って説明する。

本発明は大腸菌O26の有するラムノース非分解能、ガラクトピラノシド分解能およびグルコピラノシド分解能を利用し、pH指示薬としてフェノールレッドを用いることで暗緑色から暗紫色の集落の有無により大腸菌O26を鑑別すること原理としている。

【0011】

血清型O26以外の大腸菌の多くは培地に添加したラムノースを分解して酸を産生する。通常使用される培地のpHは中性(7)付近であり、pH指示薬として添加したフェノールレッドにより培地色は朱～赤色を呈している。ラムノースを分解する大腸菌は培地中のラムノースを分解し、培地のpHを低下させるため、それらの菌の集落及び集落周辺部は黄色に変色する。

20

しかし、大腸菌O26のようなラムノース非分解菌は酸を産生しないため培地pHの低下はなく、むしろ菌の発育による培地中のペプトンの分解物によりpHが上昇することから、集落はより赤色が強くなり、集落周囲の培地色も赤色にとどまる。

添加するラムノース量は培地1 Lあたり1-20 gが適当であり、フェノールレッド量は0.01-0.1 gが適当である。

【0012】

一般に血清型O26を含む大腸菌は、ガラクトシダーゼおよびグルクロニダーゼを保有し、酵素発色基質を分解し、色素を発生させる。本発明に用いるX-Glcは、血清型O26を含む大腸菌により特異的に分解され、青色を呈する。同様にX-Galも血清型O26を含む大腸菌群の菌により特異的に分解され青色を呈する。この場合、上述のように大腸菌O26はラムノースを分解しないため集落と集落周囲の培地色は赤色になり、この色の上にX-GalあるいはX-Glcの分解による青色が重なり、集落色は暗緑色から暗紫色を呈する。一方、大腸菌O26以外の大腸菌の集落及び集落の周囲の色は黄色になり、この黄色にX-GalあるいはX-Glcの分解による青色が重なり淡緑色から緑色の集落を呈する。また、大腸菌以外のX-GalあるいはX-Glcを分解できない菌はその菌のラムノース分解能の有無により、黄色あるいは赤色の集落になり、大腸菌O26と容易に鑑別ができる。つまり、本発明の培地上では、大腸菌O26、その他の大腸菌、ラムノース分解菌、ラムノース非分解菌でそれぞれのコロニーの発色が異なるので、各菌の分離鑑別が容易である。X-Gal、X-Glcは単独でも併用しても良い。添加するX-Gal、X-Glcの量は培地1 Lあたり0.05-0.5 gが適当である。

30

40

【0013】

本発明では培地中にアニオン性界面活性剤を添加することにより、バチラス等のグラム陽性菌の発育を抑制している。本培地に有用なアニオン性界面活性剤としては、デスオキシコール酸等の胆汁酸塩類、及びラウリル硫酸ナトリウム等のアルキル硫酸塩が挙げられる。

【0014】

50

本培地では選択剤亜テルル酸カリウムの添加で、血清型O26以外の大腸菌の発育を抑制している。なお、本培地に添加する亜テルル酸カリウム量は培地1Lあたり1～5mgが適当である。

【0015】

本培地では選択剤セフィキシムの添加で、腸内細菌であるプロテウス属菌の発育を抑制している。なお、本培地に添加するセフィキシム量は培地1Lあたり0.005～0.1mgが適当である。これ以下ではプロテウス属菌の発育を抑えられず、またこれ以上では大腸菌O26も抑制される。

【0016】

以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明する。なお、下記実施例は単に説明のためのものであり、本発明を何ら限定するものではない。

10

【実施例】

【0017】

実施例1 本培地および従来培地の作成

以下に示す組成の本発明の培地（本培地）、デソキシコーレイト寒天培地（DESO）、ラムノース加マッコンキー寒天培地（R-MAC）を作成した。各組成に精製水を加え全量を1000mLとした。加熱溶解後、約50℃に冷却しシャーレに20mLずつ分注し、平板を作成した。

【0018】

【組成1】

20

本培地の組成（培地1，000mLあたり）

ペプトン	12g
酵母エキス	3g
塩化ナトリウム	5g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.1g
X-Gal	0.1g
X-Glc	0.1g
ラムノース	10g
亜テルル酸カリウム	2.5mg
セフィキシム	0.01mg
フェノールレッド	0.05g
寒天	15g

30

pH 7.2 ± 0.2

【0019】

【組成2】

DESO培地組成（培地1，000mLあたり）

ペプトン	10g
乳糖	10g
デソキシコール酸ナトリウム	1g
塩化ナトリウム	5g
リン酸二カリウム	2g
クエン酸塩鉄アンモニウム	2g
中性紅	0.033g
寒天	15g

40

pH 7.2 ± 0.2

【0020】

50

【組成 3】

R-MAC 培地組成 (培地 1, 000 mL あたり)

ペプトン	20 g
ラムノース	10 g
胆汁酸塩 No. 2	1.5 g
塩化ナトリウム	5 g
中性紅	0.03 g
クリスタルバイオレット	0.001 g
寒天	15 g

10

pH 7.0 ± 0.2

【0021】

実施例 2 本培地および従来培地による大腸菌 O26 の分離

(1) 試験菌

社内保存の血清型 O26 の大腸菌 9 菌株、その他の血清型の大腸菌 5 菌株および大腸菌以外の腸内細菌 8 菌種 10 株を用いた。使用した菌種名と各培地での集落の発色は「表 1」に記載した。

(2) 接種及び判定

ハートインフュージョンブイヨンで 1 夜培養した試験菌を実施例 1 で作成した各培地に 1 白金耳量塗抹し、37℃で 16 時間培養後、出現した集落を観察した。結果を表 1 に示した。

20

【0022】

(3) 結果

【表 1】

		集落色		
菌名 (菌株番号)	本培地	DES O	R-MAC	
大腸菌 O 2 6				
(4331)	暗紫色	赤色	透明	10
(4332)	暗紫色	赤色	透明	
(4333)	暗紫色	赤色	透明	
(4334)	暗紫色	赤色	透明	
(4335)	暗紫色	赤色	透明	
(4336)	暗紫色	赤色	透明	
(4337)	暗紫色	赤色	透明	
(4338)	暗紫色	赤色	透明	20
(4339)	暗紫色	赤色	透明	
その他の大腸菌				
(0645)	緑色	赤色	赤色	
(0705)	緑色	赤色	赤色	
(3087)	淡緑色	赤色	赤色	
(3832)	緑色	赤色	赤色	
(4038)	緑色	赤色	赤色	30
腸内細菌				
<u>Citrobacter freundii</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>C. freundii</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>Klebsiella oxytoca</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>K. pneumoniae</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>Serratia marcescens</u>	赤色	透明	透明	
<u>Proteus mirabilis</u>	発育せず	透明	透明	40
<u>P. vulgaris</u>	発育せず	透明	透明	
<u>Enterobacter cloacae</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>E. cloacae</u>	黄色	赤色	赤色	
<u>E. aerogenes</u>	黄色	赤色	赤色	

表1より、試験した大腸菌O26はすべて本培地上で暗紫色の集落を形成し、O26以外の血清型の大腸菌および大腸菌以外の腸内細菌とはそれぞれ発色が異なり、鑑別がついた。

デソキシコーレイト寒天培地（DESO）では、乳糖非分解性のセラチア、プロテウス以外の菌は全て赤色集落を形成し、大腸菌O26の鑑別はできなかった。

ラムノース分解能を利用したラムノース加マッコンキー寒天培地（R-MAC）では、大腸菌O26とその他の大腸菌の鑑別はできたが、大腸菌以外の腸内細菌のうちラムノース非分解菌（*Serratia marcescens*、*Proteus mirabilis*、*P.vulgaris*）は透明の集落を形成し、大腸菌O26との鑑別はできなかった。

【0024】

実施例3 食材からの大腸菌O26の検出

大腸菌O26の汚染を想定した牛挽肉4検体を使用した。牛挽肉25gをmECブロス225mLと混和し、35℃18時間前培養し、その培養液を本培地、デソキシコーレイト寒天培地、およびラムノース加マッコンキー寒天培地に1白金耳量塗抹し、37℃で16時間培養後、出現した集落を観察し、各培地で大腸菌O26と思われる集落を釣菌した。具体的には本培地では暗紫色の集落を、デソキシコーレイト寒天培地では乳糖分解菌を大腸菌として釣菌した。ラムノース加マッコンキー培地ではラムノース非分解菌として透明の集落を釣菌した。

各培地から釣菌した1～10個の集落をそのまま用いて、生化学性状検査および抗血清検査を行い、大腸菌O26の同定を行った。

判定は釣菌した集落のほとんどが大腸菌O26であった場合をA、大腸菌O26として同定するのにいくつかの集落の試験が必要で、釣菌した集落のうち一部が大腸菌O26と確認されるように検出が困難であった場合をB、大腸菌O26を検出できなかった場合をCとして判定を行った。結果を表2に示す。

【0025】

【表2】

判定	検体数		
	本培地	DESO	R-MAC
A	4	0	1
B	0	1	3
C	0	3	0

【0026】

得られた集落を生化学性状検査および大腸菌O26抗血清で確認したところ、本培地で大腸菌O26と思われた集落から釣菌した菌株はすべて大腸菌O26であった。

ラムノース加マッコンキー寒天培地（R-MAC）でもすべての検体から本菌を検出することができたが、そのうち3検体は判定Bを示し、釣菌した菌の大部分が大腸菌O26以外の菌であった。

デソキシコーレイト寒天培地（DESO）では1検体のみから大腸菌O26を検出でき（判定B）、この場合も釣菌した菌の大部分が大腸菌O26以外の菌であった。デソキシコーレイト培地上で大腸菌O26を疑って釣菌したにもかかわらず大腸菌O26ではなかった菌（判定C）は、その後の確認試験の結果より、他の血清型の大腸菌であった。

従って、本発明の培地の使用により、1回の選択分離培養で食材由来の大腸菌O26が検出可能となった。

【0027】

【発明の効果】

従来の大腸菌O26の検出は熟練された技術と3～5日間の長時間が必要であった。これは大腸菌O26用の選択分離培地はなく、一般の腸内細菌あるいは大腸菌の検出を目的とした培地を使わざるを得なく、このような培地では大腸菌O26のみではなく、O26以外の大腸菌を含む多くの腸内細菌が発育するためであった。そのため従来の選択分離培養では、疑わしい集落を出来るだけ多く釣菌し、確認培地や同定キットあるいは抗血清試験により大腸菌O26のスクリーニングあるいは同定を行い、大腸菌O26を疑う集落を鑑別するには多くの経験と熟練が必要であった。

10

しかし、本培地を用いることでそうした経験などを必要とせず非常に高い確率で大腸菌O26の検出が可能になり、また、大腸菌O26以外の菌の試験に要していた試薬類、操作の手間と時間も削減できる。

【0028】

さらに本培地では一回の選択分離培養により、暗緑色から暗紫色集落の有無で大腸菌O26の存在が簡単に判断できるので、汚染された食材や食品を早期に排除でき、また品質管理期間の短縮により賞味期間も延長可能で食品流通の経済性に大きく貢献できる。

また、糞便検査や嘔吐物の検査に用いれば、大腸菌O26による食中毒患者の早期診断が可能になることから、早期に有効な治療の一助ともなる。

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:19

(56)参考文献 特表平09-501314 (JP, A)
道衛研所報, 1998年, 第48集, pp.61-63
感染症学雑誌, 1999年 5月20日, 第73巻 第5号, pp.407-413
札幌市衛研年報, 1996年, Vol.23, pp.64-70

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC
C12N 1/20
C12Q 1/04
DB名
CiNii
JMEDPlus(JDreamII)
JSTPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)
PubMed
Science Direct