

Q11-1 1月の1世帯当り生玉子食用個数

全 体	全 体	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	25	30	買 た い
1 人	100.0	41.0	4.9	9.8	3.3	3.3	3.3	6.6	1.6	3.3	2	8.2	0.3	-	-	-	3.3	3.3	-	-	9.8
2 人	100.0	38.6	5.7	7.1	5.7	5.7	5.7	4.3	4.3	2.9	2.9	5.7	-	-	-	-	4.3	4.3	-	-	2.9
3 人	100.0	33.3	-	6.1	3.0	4.5	1.5	19.7	6.1	1.5	-	6.1	-	-	-	-	3.0	4.5	-	-	3.0
4 人	100.0	26.8	2.8	4.2	7.0	1.4	4.2	11.3	1.4	1.4	-	19.7	1.4	-	-	-	4.2	5.6	2.8	2.8	1.4
5 人	100.0	21.4	-	2.4	4.8	2.4	4.8	21.4	2.4	-	2.4	26.2	-	-	-	-	2.4	4.8	-	4.8	-
6 人	100.0	31.4	-	1	5.7	2.9	5.7	8.6	2.9	5.7	-	25.7	-	-	-	-	2.9	5.7	-	5.7	-
7 人	100.0	33.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	44.4	-	-	-	-	11.1	11.1	-	11.1	-
8 人	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 人以上	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2人以上 計	100.0	31.0	2.0	4.4	5.1	3.4	3.7	12.6	3.4	1.7	2.0	16.0	0.3	-	-	-	3.7	5.1	0.7	2.0	1.7
合計	294	91	6	13	15	10	11	37	10	5	6	47	1	-	-	-	11	15	2	6	5
生玉消費量別																					
ハビュ-ザ-	100.0	-	-	-	-	-	-	11.4	-	2.9	2.9	34.3	-	-	-	-	20.0	14.3	5.7	5.7	-
ミドルユ-ザ-	100.0	2.4	1.2	6.0	2.4	7.2	8.4	22.9	7.2	6.0	3.6	16.9	1.2	-	-	-	4.8	4.8	-	2.4	-
ライトユ-ザ-	100.0	16.2	8.1	10.8	14.9	5.4	2.7	14.9	1.4	-	1.4	20.3	-	-	-	-	1.4	1.4	-	-	-
ノンユ-ザ-	100.0	62.6	1.2	3.7	2.5	1.2	2.5	4.3	2.5	0.6	0.6	6.7	-	-	-	-	0.6	3.1	-	1.2	6.7
大都市 (100万人以上)	100.0	32.9	1.4	5.7	5.7	2.9	2.9	12.9	2.9	1.4	2.9	14.3	1.4	-	-	-	1.4	4.3	-	1.4	5.7
大都市 (15万人以上)	100.0	27.7	5.4	5.4	5.4	3.6	3.6	13.4	2.7	1.8	1.8	12.5	-	-	-	-	4.5	6.3	0.9	1.8	1.8
中都市 (5万人以上)	112	31	6	6	6	4	4	15	3	2	2	14	-	-	-	-	5	7	1	2	2
小都市 (5万人以上)	100.0	39.5	1.2	6.2	4.9	3.7	4.9	9.9	3.7	2.5	-	9.9	-	-	-	-	6.2	3.7	1.2	-	2.5
都市規模	100.0	81	1	5	4	3	4	8	3	2	-	8	-	-	-	-	5	3	1	-	2
5万人未満都市・郡部	100.0	32.6	1.1	4.3	3.3	3.3	3.3	9.8	3.3	2.2	2.2	21.7	-	-	-	-	2.2	2.2	-	3.3	3.3
	92	30	1	4	3	3	3	9	3	2	2	20	-	-	-	-	2	2	-	3	3

		全 体	平 均
全 体		100.0 344	1856.10 5.40
年 齡 別	小学生以下	-	-
	中学生～19歳以下	-	-
	20代	10.8 37	202.60 5.48
	30代	18.9 65	371.50 5.72
	40代	25.9 89	436.00 4.90
	50代	19.2 66	382.50 5.80
	60代	11.3 39	284.50 7.29
	20～60代 計	86.0 296	1677.10 5.67
	中学生～60代 計	86.0 296	1677.10 5.67
	70代以上	14.0 48	179.00 3.73
性 別	男 性	9.9 34	105.00 3.09
	女 性	90.1 310	1751.10 5.65
小学生以下		-	-
地 域 別	北海道・東北	11.9 41	199.60 4.87
	関 東	33.7 116	624.00 5.38
	東海・北陸	17.2 59	363.50 6.16
	近 畿	14.0 48	244.00 5.08
	中国・四国・九州	23.3 80	425.00 5.31

Q11.1

	全 体	平 均
全 体	100.0 344	1856.10 5.40
小学生以下	-	-
中学生～ 19歳以下男性	-	-
20・30代男性	4.9 17	62.00 3.65
40・50代男性	4.4 15	27.00 1.80
60代以上男性	0.6 2	16.00 8.00
20～60代男性	9.6 33	89.00 2.70
中学生～60代男性	9.6 33	89.00 2.70
中学生～ 19歳以下女性	-	-
20・30代女性	24.7 85	512.10 6.02
40・50代女性	40.7 140	791.50 5.65
60代以上女性	24.7 85	447.50 5.26
20～60代女性	76.5 263	1588.10 6.04
中学生～60代女性	76.5 263	1588.10 6.04
70代以上 (男女計)	14.0 48	179.00 3.73
20・30代 未婚男性	4.9 17	62.00 3.65
20・30代 未婚女性	0.6 2	0.60 0.30
20・30代 既婚男性	-	-
20・30代 既婚女性	24.1 83	511.50 6.16
性×年齢別		

	全 体	平 均
全 体	100.0 344	1856.10 5.40
1 人	16.0 55	160.60 2.92
2 人	19.8 68	262.00 3.85
3 人	18.6 64	315.00 4.92
4 人	20.3 70	493.50 7.05
5 人	12.2 42	307.50 7.32
6 人	10.2 35	232.50 6.64
7 人	2.6 9	75.00 8.33
8 人	0.3 1	10.00 10.00
9人以上	-	-
2人以上 計	84.0 289	1695.50 5.87
同居家族人数別		
ヘビ-ユーザー	10.2 35	490.50 14.01
ミドルユーザー	24.1 83	625.50 7.54
ライトユーザー	21.5 74	327.60 4.43
ノンユーザー	44.2 152	412.50 2.71
生季子消費量別		
大都市 (100万人以上)	19.2 66	327.50 4.96
中都市 (15万人以上)	32.0 110	651.10 5.92
小都市 (5万人以上)	23.0 79	365.00 4.62
都市規模	25.9 89	512.50 5.76
5万人未満都市・郡部		







		全 体	平 均
全 体		100.0 344	633.80 1.84
小学生以下		-	-
中学生～19歳以下		-	-
20 代		10.8 37	79.60 2.15
30 代		18.9 65	93.40 1.44
40 代		25.9 89	118.90 1.34
50 代		19.2 66	126.20 1.91
60 代		11.3 39	111.60 2.86
20～60代 計		86.0 296	529.70 1.79
中学生～60代 計		86.0 296	529.70 1.79
70代以上		14.0 48	104.10 2.17
性 別			
男 性		9.9 34	105.00 3.09
女 性		90.1 310	528.80 1.71
小学生以下		-	-
地 域 別			
北海道・東北		11.9 41	64.80 1.58
関 東		33.7 116	212.30 1.83
東海・北陸		17.2 59	104.00 1.76
近 畿		14.0 48	83.80 1.75
中国・四国・九州		23.3 80	168.90 2.11



		全 体	平 均
全 体		100.0 344	633.89 1.84
小学生以下		-	-
中学生～		-	-
19歳以下男性		-	-
20・30代男性		4.9 17	62.00 3.65
40・50代男性		4.4 15	27.00 1.80
60代以上男性		0.6 2	16.00 8.00
20～60代男性		9.6 33	89.00 2.70
中学生～60代男性		9.6 33	89.00 2.70
中学生～		-	-
19歳以下女性		-	-
20・30代女性		24.7 85	111.00 1.31
40・50代女性		40.7 140	218.10 1.56
60代以上女性		24.7 85	199.70 2.35
20～60代女性		76.5 263	440.70 1.68
中学生～60代女性		76.5 263	440.70 1.68
70代以上 (男女計)		14.0 48	104.10 2.17
20・30代 未婚男性		4.9 17	62.00 3.65
20・30代 未婚女性		0.6 2	0.60 0.30
20・30代 既婚男性		-	-
20・30代 既婚女性		24.1 83	110.40 1.33
性×未婚別			

	全 体	平 均
全 体	100.0 344	633.80 1.84
1 人	16.0 55	160.60 2.92
2 人	19.8 68	131.70 1.94
3 人	18.6 64	105.20 1.64
4 人	20.3 70	124.00 1.77
5 人	12.2 42	61.50 1.46
6 人	10.2 35	38.90 1.11
7 人	2.6 9	10.60 1.18
8 人	0.3 1	1.30 1.30
9 人以上	-	-
2人以上 計	84.0 289	473.20 1.64
生 活 費 別		
ハイユーザー	10.2 35	202.10 5.77
ミドルユーザー	24.1 83	215.20 2.59
ライトユーザー	21.5 74	92.70 1.25
ノンユーザー	44.2 152	123.80 0.81
都 市 規 模		
大都市 (100万人以上)	19.2 66	117.40 1.78
中都市 (15万人以上)	32.0 110	226.80 2.05
小都市 (5万人以上)	23.0 79	147.50 1.87
5万人未満都市・郡部	25.9 89	142.10 1.60

Q12 おだんの玉子購入場所

全 体	全 体	パート	スーパーの 品出し	スーパー以外の 品物	コンビニ エンストア	一般料品店	その他	買わない 玉子は
小学生以下	-	-	-	-	-	-	-	-
中学生～19歳以下	-	-	-	-	-	-	-	-
20代	100.0 38	-	44.7 17	28.9 11	-	13.2 5	10.5 4	2.6 1
30代	100.0 66	-	39.4 26	40.9 27	-	6.1 4	12.1 8	1.5 1
40代	100.0 92	3.3 3	39.1 36	33.7 31	1.1 1	8.7 8	10.9 10	3.3 3
50代	100.0 66	1.5 1	54.5 36	31.8 21	-	3.0 2	9.1 6	-
60代	100.0 40	2.5 1	52.5 21	20.0 8	2.5 1	2.5 1	17.5 7	2.5 1
20～60代計	100.0 302	1.7 5	45.0 136	32.5 98	0.7 2	6.6 20	11.6 35	2.0 6
中学生～60代計	100.0 302	1.7 5	45.0 136	32.5 98	0.7 2	6.6 20	11.6 35	2.0 6
70代以上	100.0 53	-	43.4 23	30.2 16	-	5.7 3	11.3 6	9.4 5
男性	100.0 39	2.6 1	38.5 15	35.9 14	-	2.6 1	7.7 3	12.8 5
女性	100.0 316	1.3 4	45.6 144	31.6 100	0.6 2	7.0 22	12.0 38	1.9 6
小学生以下	-	-	-	-	-	-	-	-
北海道・東北	100.0 41	2.4 1	43.9 18	26.8 11	2.4 1	9.8 4	14.6 6	-
関東	100.0 118	2.5 3	44.9 53	33.1 39	0.8 1	5.1 6	11.9 14	1.7 2
東海・北陸	100.0 61	-	55.7 34	21.3 13	-	9.8 6	9.8 6	3.3 2
近畿	100.0 50	-	38.0 19	38.0 19	-	4.0 2	16.0 8	4.0 2
中国・四国・九州	100.0 85	1.2 1	41.2 35	37.6 32	-	5.9 5	8.2 7	5.9 5



Q12 あなたの王子購入場所

	全 体	デ バ ー ト	食 品 パ ー ク の 食 品 外 の 売 場	食 品 パ ー ク の 売 場	エ ン ト レ ス タ ン ト	一 般 食 料 品 店	そ 他	王 子 は い
全 体	100.0 355	1.4 5	44.8 159	32.1 114	0.6 2	6.5 23	11.5 41	3.1 11
1 人	100.0 61	1.6 1	44.3 27	34.4 21	-	4.9 3	4.9 3	9.8 6
2 人	100.0 70	1.4 1	45.7 32	31.4 22	1.4 1	4.3 3	12.9 9	2.9 2
3 人	100.0 66	1.5 1	47.0 31	28.8 19	-	10.6 7	9.1 6	3.0 2
4 人	100.0 71	1.4 1	40.8 29	39.4 28	-	2.8 2	14.1 10	1.4 1
5 人	100.0 42	2.4 1	50.0 21	28.6 12	2.4 1	7.1 3	9.5 4	-
6 人	100.0 35	-	45.7 16	28.6 10	-	8.6 3	17.1 6	-
7 人	100.0 9	-	22.2 2	22.2 2	-	22.2 2	33.3 3	-
8 人	100.0 1	-	100.0 1	-	-	-	-	-
9 人 以 上	-	-	-	-	-	-	-	-
2 人 以 上 計	100.0 294	1.4 4	44.9 132	31.6 93	0.7 2	6.8 20	12.9 38	1.7 5
生 き 字 消 費 者 別								
ハ ビ ー ユ ー ザ ー	100.0 35	-	45.7 16	40.0 14	2.9 1	5.7 2	5.7 2	-
ミ ド ル ユ ー ザ ー	100.0 83	3.6 3	47.0 39	27.7 23	-	9.6 8	12.0 10	-
ラ イ ト ユ ー ザ ー	100.0 74	1.4 1	44.6 33	33.8 25	-	4.1 3	16.2 12	-
ノ ン ユ ー ザ ー	100.0 163	0.6 1	43.6 71	31.9 52	0.6 1	6.1 10	10.4 17	6.7 11
都 市 規 模								
大 都 市 (100万 人 以 上)	100.0 70	2.9 2	44.3 31	32.9 23	1.4 1	-	12.9 9	5.7 4
中 都 市 (15万 人 以 上)	100.0 112	0.9 1	40.2 45	31.3 35	0.9 1	12.5 14	12.5 14	1.8 2
小 都 市 (5万 人 以 上)	100.0 81	2.5 2	45.7 37	40.7 33	-	2.5 2	6.2 5	2.5 2
5万 人 未 満 都 市 都 部	100.0 92	-	50.0 46	25.0 23	-	7.6 7	14.1 13	3.3 3

## 平成10年度分担研究報告書

### 農産物の微生物汚染実態に関する研究

分担研究者 小沼博隆 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

協力研究者 宮原美知子 (国立医薬品食品衛生研究所)

金子誠一 (東京都衛生研究所)

正木宏幸, 齋藤章鳴 (埼玉県衛生研究所)

増田高志 (静岡県環境衛生科学研究所)

後藤公吉 (新潟県保健環境科学研究所)

#### 研究要旨

本研究事業は、平成8年5～7月にかけて岡山、広島、大阪（堺市）の小学校を中心に勃発した腸管出血性大腸菌O157食中毒等食品由来の新興・再興感染症による健康被害を防止し、国民の不安を解消して安全な食生活の確保を図ることを目的としている。

わが国では、カイワレ、メロン、オカカサラダ、レタスサラダ、ポテトサラダおよびキャベツサラダといった農作物を含む食材によって健康被害が発生している。また、欧米諸国でもレタス、アルファルファなどの生野菜やアップルジュースといった今まであまり問題にされていなかった農産物が腸管出血性大腸菌O157やサルモネラ食中毒の原因食品として疑われ、その危険性が指摘されている。しかし、その実態は明らかでないことから、各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにすることが急務である。しかしながら、農産物から腸管出血性大腸菌O157やサルモネラを簡易・迅速に、しかも効率よく検出する試験法は確立されていない。そこで、農産物中の腸管出血性大腸菌O157やサルモネラを簡易・迅速・正確に検出することのできる検査法を確立し、その検査法を用いて今まで知られていなかった各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにするために調査研究を行い、以下の結果を得た。

1. 新たに考案した腸管出血性大腸菌O157試験法（一括増菌培養法）は、厚生省改良法と同等に腸管出血性大腸菌O157を検出できることがわかった。
2. 新たに考案したサルモネラ試験法（一括増菌培養法）は、従来法（EEM→SBG）に比べ検出率で優れていることがわかった。
3. BPWで増菌する一括増菌培養法は、同一検体から腸管出血性大腸菌O157とサルモネラを効率よく検出することができた。
4. 野菜の一般細菌数汚染は、検査した野菜の約60%が $10^6$ CFU/g 以上であった。特に一般細菌数汚染の多い野菜( $10^6$ CFU/g)は、モヤシ、包菜、ニラ、ルッコラ、豆苗およびモロヘイヤであった。大腸菌の検出された野菜は27種類あり、1,050検体中116検体(11.1%)に検出された。その中でも特に大腸菌汚染率が高かった野菜は、もやし、オクラ、あさつきおよびミニトマトであった。
5. 野菜1,050検体について腸管出血性大腸菌O157およびサルモネラ汚染を調べた結果、両菌種ともに検出されなかった。
6. 農産物に使用される肥料中の腸管出血性大腸菌O157ならびにサルモネラ汚染を調べた結

果、腸管出血性大腸菌O157は検出されなかったが、サルモネラ汚染は、51検体中35検体(68.6%)に検出され、その汚染菌量は、1g中0.03~11個と病原菌汚染菌量としてはかなり高いものもみられた。

以上、調査した農産物からは腸管出血性大腸菌O157およびサルモネラは検出されなかったが、今回の調査は微生物学的に問題の少ない冬期の調査結果であるため、夏期における汚染実態調査が必要である。大腸菌汚染のみられた野菜については、定量試験を行う必要がある。また、肥料からサルモネラが多量に検出されたことから、これら病原菌に汚染された肥料が水耕栽培、ビニール栽培および路地栽培に用いられた時に病原菌が野菜に汚染していくのかどうかの挙動を調べる必要があると考える。

## 1. 研究の目的

本研究事業は、平成8年5~7月にかけて岡山、広島、大阪(堺市)の小学校を中心に勃発した腸管出血性大腸菌O157食中毒等食品由来の新興・再興感染症による健康被害を防止し、国民の不安を解消して安全な食生活の確保を図ることを目的としている。

わが国では、カイワレ、メロン、オカカサラダ、レタスサラダ、ポテトサラダおよびキャベツサラダといった農作物を含む食材によって健康被害が発生している。また、欧米諸国でもレタス、アルファルファなどの生野菜やアップルジュースといった今まであまり問題にされていなかった農産物が腸管出血性大腸菌O157やサルモネラ食中毒の原因食品として疑われ、その危険性が指摘されている。しかし、その実態は明らかでないことから、各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにすることが急務である。しかしながら、農産物から腸管出血性大腸菌O157やサルモネラを簡易・迅速に、しかも効率よく検出する試験法は確立されていない。そこで、農産物中の腸管出血性大腸菌O157やサルモネラを簡易・迅速・正確に検出することのできる検査法を確立し、その検査法を用いて今まで知られていなかった各種農産物の病原菌汚染実態を明らかにする。

## 2. 材料および方法

### 1) 使用菌株

### 腸管出血性大腸菌O157 (*Escherichia coli*

O157:H7) は、堺212株(食中毒由来株)、サルモネラは、*Salmonella* Enteritidis E930448(PT4)株(食中毒由来株)を用いた。

### 2) 検査材料

調査対象野菜・果物等の種類は、1) あさつき、2) アルファルファ、3) エシャレット、4) おおば、5) おくら6) かぶ(ラディッシュを含む)、7) クレソン、8) サニーレタス、9) サラダ菜、10) サンチュ、11) 春菊、12) 食用菊、13) ズッキーニ、14) セロリ、15) チシャ菜、16) ちんげん菜、17) つまみ菜、18) 白菜、19) パセリ、20) ほうれん草、21) マッシュルーム、22) みつば、23) ミニトマト、24) もやし、25) モロヘイヤ、26) やまいも、27) ルッコラ、28) わけぎ、29) いちごなど生で喫食するものを中心に選定し、全体では48種類である。

### 3) 研究協力施設

東京都衛生研究所(都衛研)、埼玉県衛生研究所(埼玉衛研)、静岡県環境衛生科学研究所(静岡衛研)、新潟県保健環境科学研究所(新潟保健環境研)および当国立医薬品食品衛生研究所の5施設である。

### 4) 一般細菌数試験

各種野菜検体25gをストマッカー400

用バッグにそれぞれ量り採り，そこに滅菌したBuffered Peptone Water (BPW) 225mlを加えてストマッカー処理(30秒間)したものを試料原液とした。方法は，試料原液を適宜10倍段階希釈する標準寒天培地混釈法で行い，35℃・48時間培養後，菌数計測を行った。

#### 5) 大腸菌検出試験

試料原液1mlをダーラム管入りECbroth(9ml)に接種し，44.5℃・48時間培養する。培養後，ガス発生のみられたものは，その1白金耳をEosin Methylene Blue (EMB) 平板培地に画線塗抹し35℃・24時間培養後，大腸菌の定型的集落を釣菌してシモンズクエン酸ナトリウム斜面寒天培地と普通寒天斜面培地に接種し35℃・24時間培養する。培養後，無変化(クエン酸ナトリウムを利用できない)のものを大腸菌陽性と推定し，合い対の普通寒天斜面培地に発育した菌をATB GN(自動同定装置)を用いて同定した。

#### 6) 腸管出血性大腸菌O157検出法の比較試験

腸管出血性大腸菌O157検出法の比較試験は，厚生省が示した腸管出血性大腸菌O157試験法(平成9年7月4日付，衛食第207号・衛乳第199号「腸管出血性大腸菌O157の検査法について」)，いわゆる厚生省法(図1)に改良を加え腸管出血性大腸菌O157損傷菌に対する配慮をした試験法(厚生省法改良法；工藤由起子，小沼博隆，熊谷 進ら：腸管出血性大腸菌O157の食品中での凍結損傷とその検出方法の検討，日本細菌学雑誌，54，190(1999))と新たに考案した試験法で行った(図2)。厚生省法改良とは，食品が冷凍保存や加熱処理，乾燥などによって腸管出血性大腸菌O157が食品中で損傷を受けている場合であっても菌の損傷を回復させ，正常な検出・分離を可能にした方法である。培地組成は，厚生省法の検体増

菌培地(ノボピオシン加 mEC broth)から損傷菌の発育増殖に抑制的に働くノボピオシンと胆汁酸塩を取り除いたものである。その増菌培養方法は，検体を本増菌培地に投入後室温(25℃前後)で2時間培養し，損傷菌を回復させた後，所定の濃度のノボピオシンと胆汁酸塩を添加してさらに16～22時間培養するもので，それ以降の試験方法は厚生省法と同様である(図2)。なお，胆汁酸とノボピオシンの添加量は，前者1.12mgと後者0.02mg/mlである。

新たに考案した試験法とは，検体をBuffered Peptone Water (BPW)で前増菌培養(36±1℃・6時間)後，その培養液1mlを10mlノボピオシン加 mEC broth (NmEC broth)に接種し，42℃・20～24時間培養するもので，それ以降の試験方法は厚生省法と同様，セフェキシムアテルル酸塩加ソルビトールマッコンキー寒天培地(CT-SMAC)に画線塗抹後，培養するものである。

両試験法の比較試験は，以下の方法に従って行った。ほうれん草25gずつ5検体を1群として，腸管出血性大腸菌O157・堺212株のTSB(Tryptic Soy Broth(Difco))18時間培養菌を適宜希釈し，0.1ml当たり平均5.8CFU(高菌数群(H))，平均5.8CFU(中菌数群(M))および平均2.4CFU(低菌数群(L))をそれぞれ接種した。

#### 7) サルモネラ検出法の比較試験

サルモネラ検出法の比較試験は，従来法(食品衛生検査指針 微生物編(1990))と米国FSIS法(The Food Safety and Inspection Service)で行った(図3と図4)。

日本の従来法とは，検体25gを22.5ml Enterobacteriaceae Enrichment Mannitol Broth (EEM) 前増菌培養(35℃，18時間)後，1.5ml Selenite Brilliant Green Broth (SBG)あるいはSelenite Cystine



Broth (S C) 中にその培養液1.5 mlを接種し43°C・18時間選択増菌培養する。培養後、その1白金耳を選択分離寒天平板培地であるMannitol Lysine Crystal violet Brilliant Green Agar(M L C B)およびDeoxycholate Hydrogen sulfide Lactose Agar (DHL) 寒天平板培地に画線塗抹し35°C・24時間培養を行い、定型的集落を釣菌してTriple Sugar Iron Agar (T S I) 斜面寒天に接種し35°C・24時間培養する。培養後、T S Iの斜面部 赤変、高層部 黄変・黒変・ガス発生による寒天の亀裂などサルモネラと推定される性状のみられたものは更なる詳細な生化学性状試験および血清学的試験を行いサルモネラと同定するものである。

F S I S法とは、USDA (米国農務省)のThe Food Safety Inspection Service (食品安全検査局) が主に食肉のサルモネラ検出を目的として定めた方法である (Federal Register Vol. 61. No. 144 / Thursday, July 25, 1996 / Rule and Regulations 38917-38927)。本試験方法は、検体25gを225ml Buffered Peptone Water (BPW) で前増菌培養 (36±1°C・20~24時間) 後、その培養液0.5mlづつを10ml Tetrathionate Broth (T T) 培地、10ml Rappaport-Vassiliadis Enrichment broth (R V) 培地にそれぞれ接種し、42°C±0.5°Cの温度で22時間±2時間培養する。培養後、その培養液の1白金耳量を2種類の分離平板培地 (硫化水素の産生により判定する培地及び硫化水素非産生性であってもサルモネラと判定できる培地) にそれぞれ画線塗抹し、36°C±1°Cの温度で18~24時間培養する。培養後、各分離平板培地に発育・増殖した定型的集落を釣菌して、T S I培地、Lysine Indole Motility Medium (L I M培地) あるいは Lysine Iron Agar (L I A (リジン鉄寒天) 培地) 等に接種し、36°C±1°Cの温度で18~24時間培養する。培養後、

T S I培地にあつては斜面部が赤変、高層部黄変・黒変・ガス産生 (高層部における気泡又は亀裂の発生) したものを、L I M培地にあつては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性 (まれに陰性あり) のものを、L I A培地にあつては培地全体が紫変、高層部黒変のものをサルモネラと判定し、血清学的試験ならびに生化学的試験 (同定用キットの使用も可) を行いサルモネラ と同定するものである。

上記両試験法の比較は、ほうれん草とメロンに *Salmonella* Enteritidis E930448 (PT4) 接種し実験を行った。低菌数群(L)には 平均5 CFU/1 検体、高菌数群(H)では平均192 CFU/1検体を接種した。検体25gにそれぞれの菌液を接種した後、-20°Cで一晩凍結保存を行い、翌日、室温へ戻した後に各前増菌培地225mlを加えて上記各試験方法に従って実験を行った (図5)。また、サルモネラの検出性能を高める目的でビーズ法 (ヤマトロン社製) とPCR法を追加検討した。

ビーズ法は、各選択増菌培養液10mlに免疫磁気ビーズ30μlを添加し、サルモネラを集菌した (詳細は参考資料参照)。

PCR法の試料は、選択増菌培養後に1mlの培養液より、遠心後、上清を捨て滅菌水を加えて懸濁させ、96°Cで5分間熱抽出を行い、その遠心上清をDNAサンプルとしてPCR試験を行った。

さらに、培養時間については次のように検討を行った。BPW 36°Cでの増菌培養時間を6時間と24時間で比較した。それらの培養液(0.5ml)を10ml R Vに接種して42°C・24時間培養を行った。実験方法は、ほうれん草を検体として接種実験を行った。接種した菌は前実験と同様のS Eで、接種菌数は平均1.0 CFU/0.1ml/1検体であった。検出用分離平板寒天培地には Mannitol Lysine Crystal violet Brilliant Green Agar (M L C B寒天培地) を使用し、その他検出用にP C

R法も行った(図6).

#### 8) 腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの一括増菌培養法の検討

同一検体から腸管出血性大腸菌O157とサルモネラを効率よく検出することを目的として一括増菌培養法を考案した(図7). 本方法が有効であるかどうかを検討するために2施設{埼玉衛研と国立衛研(国立医薬品食品衛生研究所)}による接種実験を行った. 接種菌には*Escherichia coli* O157:H7堺212株と*Salmonella* Enteritidis E930448(PT4)を用いた. 接種菌量は, 腸管出血性大腸菌O157では高菌量30-60CFU, 低菌量3-6CFU/1検体である. サルモネラでは高菌量10-50CFU, 低菌量1-5CFU/1検体である. 検出用分離寒天培地としては, 腸管出血性大腸菌O157用にはCT-SMAC, CHROMO agar157とCHROM agar TAMを, サルモネラ用にはXLD, BGM, RainbowとRambachを用いた. また, 国立衛研においては分離用にビーズ法とminiVIDAS(ピオメリユー社製)による特異抗体での濃縮を行って検討を進めた. また, 簡易・迅速検出法として, 両施設ともにアイアフォス(Foss社製)による自動ビーズELISA法による検出とNOW EH *E. coli* O157(binax社製)のイムノクロマト法による検出を行った(詳細は参考資料参照). アイアフォス用サンプルは培養液を10分間煮沸し, そのまま冷却後-20°Cで保存とした. 数日間の保存後に検出試験を行った. さらに, 国立衛研ではPCR法による検出を行うため, BPW 20-24時間培養後に1mlの培養液を遠心濃縮し上清を捨て, 滅菌水を加えて懸濁液を作製して96°Cで5分間熱抽出を行い, その遠心上清をDNAサンプルとした. 腸管出血性大腸菌O157はTOYOBO VTチェック(東洋紡社製)のキットで, サルモネラではTakaraのサルモネラ侵入性因子のプライマーを使ったEx TaqによるPCR法を行った.

#### 9) 農産物の腸管出血性大腸菌O157およびサルモネラ検査方法

農産物から腸管出血性大腸菌O157およびサルモネラを効率よく検出することのできる試験方法を用いて, 生食野菜を中心にその汚染実態を調査した(図7). 農産物の入手は, 市場, スーパーマーケットおよび小売店で購入した. 購入にあたっては, すべての施設で上記の1)~29)すべての異なる産地のものを3~5検体ずつになるよう配慮した. 調査検体数は1,000検体を目標とした. また, 2) アルファルファ, 8) サニーレタス, 14) セロリ, 20) ほうれん草, 23) ミニトマト, 26) やまいも, 27) ルッコラについてはminiVIDASを使用した. 国立衛研においてはビーズ法もminiVIDASとともに分離濃縮操作として比較実験を行った. 調査項目は図7に示したように一般生菌数, 大腸菌の有無, 腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの検出の有無である. 腸管出血性大腸菌O157検出分離用寒天培地として, CT-SMACとCHROMagar O157の2種類の寒天培地を用いたが, そのほか試験的にCHROMagar O157 TAMも用いた. 検出試薬としては簡易・迅速な腸管出血性大腸菌O157検出キット「UNI」, *E. coli* O157(Serobact社), イムノクロマトのNow EH *E. coli* O157 test kit(アスカ純薬)や*E. coli* O157 directワコー(和光)等による判定も併せて行った.

サルモネラ検出分離用寒天培地としては, 平板上に発育・増殖した硫化水素産生菌を検出マーカーとするXylose Lactose Deoxycholate medium(XLD寒天培地(Oxoid))を, 硫化水素非産生サルモネラ検出にはBrilliant Green Agar(Modified)(BGM寒天培地(Oxoid))を必ず用いることに決めた. その他には, 硫化水素産生サルモネラ検出用にはRainbow-Salmonella(グンゼ産業)やESサルモネラ(栄研)など

を参考に用いた。また、硫化水素非産生のサルモネラでも検出できるものとして、CHROMagar Salmonella (関東化学), SMID (ピオメリュー) やランバック (関東化学) などを参考に用いた。また、サルモネラの判定にはTSI培地 (日水), 検出試薬として, Salmonella Latex test (Serobact), Salmonella Latex test (Oxoid) や Path-Stik (Lumac) 等を用いて確認試験を行った。更に詳細な同定試験は, ATB32 (ピオメリュー社製) も使用した。大腸菌検出としては, Escherichia Coli broth (EC培地 (栄研)) 44.5°C培養を行い, ガスの産生の見られたものは, その培養液の1白金耳をEosin Methylene Blue Agar (EMB寒天培地 (栄研)) に画線塗抹し, 金属様光沢の見られた定型的集落をシモンズクエン酸ナトリウム培地と Cellobiose Lactose IPA  $\beta$ -D-Glucuronidase medium (CLIG培地 (極東)) に接種・培養後, 斜面寒天培地の変化を観察して大腸菌または出血性大腸菌O157かどうかを判定した。国立衛研ではさらにATB32 (ピオメリュー社製) による菌同定を行った。

#### 10) 肥料中の腸管出血性大腸菌O157ならびにサルモネラ検出法

農産物に使用される肥料中の腸管出血性大腸菌O157ならびにサルモネラ汚染を調べるために食肉センター2施設 {長岡食肉センター (A施設), 下越食肉センター (B施設)} で製造された肥料 (A施設: 製造工程1, 2, 3, 4, 5, 6, B施設: 製造工程1, 2) 69検体について検査した。検体の採取法は, A施設では, 製造工程ごとに6工程から3検体ずつ採取し, 3回にわたって計51検体を検査した。B施設では, 製造工程ごとに2工程から6検体ずつ採取し, 3回にわたって計18検体を検査した。サルモネラ陽性の検体は, MPN法を用いその汚染菌数を計測した。

### 3. 結果および考察

#### 1) 腸管出血性大腸菌O157検出法の比較試験

腸管出血性大腸菌O157検出法である厚生省改良法と新たに考案した試験法 (一括増菌培養法) を生鮮ほうれん草に腸管出血性大腸菌O157をスパイクして比較したところ, 低菌数スパイク群 (平均2.4CFU/0.1ml) における一括増菌培養法の検出率は厚生省改良法に比べやや低い結果を示した (表1)。しかし, 中菌数スパイク群 (平均5.8CFU/0.1ml) および高菌数スパイク群 (平均58CFU/0.1ml) では厚生省改良法と同様に検出できることがわかった。低菌数スパイク群において一括増菌培養法の検出率が厚生省改良法よりやや劣っていた原因は不明であるが, 著者らは接種菌を検体にスパイクする場合は, 同時に寒天平板培地にも接種 (スパイク量と同量) している。その結果は表1下部に示したようにスパイクする菌数が低い場合は, 接種菌数のバラツキにより菌液は接種されているが, 実際には寒天平板培地に菌が接種されていない場合があったため, 被検サンプルに菌がスパイクされなかった可能性もある。

#### 2) サルモネラ検出法の比較試験

サルモネラ検出法の比較試験は, 従来法 (EEM→SBG) とFSIS試験法の1つであるBPW→RV法で行った (図3と図4)。

上記両試験法の比較は, ほうれん草とメロンに *Salmonella* Enteritidis (SE) を1検体当たり平均5個 (低菌数群(L)), 平均192個 (高菌数群(H)) を接種して実験を行った (図5)。また, サルモネラの検出性能を高める目的でビーズ法 (ヤトロン社製) とPCR法を追加検討した (図6)。

その結果, サルモネラの検出は従来法 (EEM→SBG) に比較しFSIS法 (BPW→RV) の成績が良いことがわかった (表2)。特に, 従来法はほうれん草での成績が劣って

いた。塗沫方法別では、エーゼ直接塗沫法、コンラージ直接塗沫法およびビーズ集菌後エーゼ法ともに同様の成績を示したが、PCR法はやや成績が悪かった。

次に、成績の良かったF S I S法（BPW→RV）を用いて培養時間の検討を行った（表3）。その結果、BPWでの増菌時間は直接法ならびにビーズ法ともに6時間では検出不可能な場合が多く不十分であったが、20-24時間増菌した場合は十分検出できることが分かった。したがって、BPWで増菌する方法は腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの両菌を一括して培養できることから、同一検体から腸管出血性大腸菌O157とサルモネラを検出できることになる。そこで、この試験法が真に上記のような成績をもたらせるのかを確認するために、同様の実験を2施設（埼玉県衛生研究所、国立医薬品食品衛生研究所）で実施したところ、高菌数および低菌数接種群ともに両菌種を効率よく検出することができた（表4、5）。以上の結果から、本方法は異なる検査施設においても同様の結果をえられることが確認できたと同時に、少量菌（O157とサルモネラの両菌の検出において）においても検出が可能である結果を得た。しかし、本検査法には、腸管出血性大腸菌O157の選択分離培地に厚生省法で推奨されているCHROMagarO157を用いたため、本寒天培地上に出現するサルモネラ（SE）の集落が腸管出血性大腸菌O157の集落と同様の色調を示すため、両者を区別することが困難であったことである。この問題はビーズ法やminiVIDASを使った方法においてもCHROMagarO157寒天培地を用いた場合は同一色調の集落が出現し、両者を区別することは困難であった。この原因は、本培地に含まれる酵素基質（*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside：ONPG）と乳糖類を含む特殊培地で培養すると、大腸菌は乳糖分解に関与する酵素である $\beta$ -ガラクトシダーゼ

を産生する。この酵素が基質（ONPG）の結合を切断すると発色するように作製されている。このような酵素基質の特徴と特定菌の産生酵素の有無などを利用して平板培地上に出現する集落の色調を調整しているため、腸管出血性大腸菌O157とサルモネラ エンテリテイディスは共に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは産生するが $\beta$ -グルクロニダーゼを産生しないため、同様な色調の集落を形成したものと考えられる。ちなみに $\beta$ -グルクロニダーゼは、4-Umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronideの結合を切断する。現在ではこの結果を基に腸管出血性大腸菌O157の選択分離培地にはサルモネラとの区別が可能であるCHROMagarO157TAMが開発され使用されるようになっている。しかし、本培地は開発間もない製品であったため本実験では試供品程度にしか使用していないことを付記しておく。なお、CHROMagarO157TAMはサルモネラの硫化水素産生を検出すると黒色のコロニーとなって藤色のO157とは区別して検出されるので、硫化水素非産生菌の区別はできないと考えられる。

アイアフォスビーズELISA法による腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの検出成績は、埼玉衛研の結果では腸管出血性大腸菌O157とサルモネラの両菌とも検出結果は一致していた。しかし、国立衛研の結果では腸管出血性大腸菌O157ではよく一致していたが、サルモネラでは僅かながら不一致の部分があったため、アイアフォスビーズELISA法によるサルモネラの検出には更に検討が必要と思われた。ただし、今回実施した腸管出血性大腸菌O157ならびにサルモネラの検出法は、Fossの推奨する方法（培地や培養温度、時間等）を取り入れてはいないので、アイアフォスによるビーズELISA法が劣る方法であるとはいえないと考えられる。

### 3) 野菜の一般細菌数および大腸菌汚染実態調