

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

平成13年度研究報告書

食品から赤痢菌検出に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部

主任研究者 小 沼 博 隆

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

総括究報告書

食品から赤痢菌検出に関する研究

主任研究者 小沼博隆 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例（赤痢菌患者：30都道府県；160人）について、食中毒の発生時調査、流通食品の検査等に利用可能な検査方法を開発し、迅速な食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てることを目的に以下の調査研究を行った。

わが国では、食品から赤痢菌の検出に成功した事例はなかった。また、諸外国でも米国など一部の事例を除き成功した事例がほとんどなかったことなどから、各種食品からの赤痢菌分離に関して実績のあるFDA試験法と、汚染菌数が極少数でしかも冷凍損傷などを受けている可能性を考慮に入れたFDA改良試験法（今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法；FDA試験法の前段階に前培養を行う方法）の2試験法を用いて、それぞれの試験法の赤痢菌検出性能の優劣と再現性を確認するために、同一の標準検体を用いたコラボレイティブスタディー（参加試験研究・検査機関；21施設）を行い以下の成果を得た。

- 1) 全国21試験研究及び検査機関の協力の下で、食品から赤痢菌を検出・分離する試験法設定のためのコラボレイティブスタディーを実施し、*Shigella sonnei* の検出においては、試験法Ⅰ（FDA法）に比べ試験法Ⅱ（FDA改良法）が優れていることを実証した。
- 2) 試験法Ⅱを用いてわが国で初めて食品（カキ）から赤痢菌（*Shigella sonnei*）を分離することに成功し、輸入禁止措置などの行政対応に貢献することができた。
- 3) コラボレイティブスタディーの結果を基に、試験法Ⅱの試験法フロー図ならびに「赤痢菌（*Shigella sonnei*）の検査法解説」を作成した。

協力研究者

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）
宮原 誠（国立医薬品食品衛生研究所）
甲斐明美、松下 秀（東京都立衛生研究所）
小林一寛（大阪府公衆衛生研究所）
柳川敬子、斎藤章暢（埼玉県衛生研究所）
沖津忠行（神奈川県衛生研究所）
内村眞佐子（千葉県衛生研究所）
丹野憲二（財団法人日本食品分析センター）
田中廣行（財団法人日本食品分析センター）
中川 弘（財団法人東京顕微鏡院）
佐々木直（財団法人日本冷凍食品検査協会）

小川博美（広島県保健環境センター）
村瀬 稔（神戸市環境保健研究所）
片山 淳（山口県衛生研究所）
安形須雄（名古屋市衛生研究所）
斉藤紀行（宮城県保健環境センター）
山内昭則（三重県科学技術振興センター）
尾崎延芳（福岡市保健環境研究所）
八柳 潤（秋田県衛生科学研究所）
村上光一（福岡県保健環境研究所）
大友良光（青森県環境保健センター）
山口仁孝（長崎県衛生公害研究所）
小笠原邦敏（輸入食品・検査検査センター；横浜）

宮城和文（輸入食品・検疫検査センター；神戸）
仁科徳啓（東海大学）
田村和満、寺嶋 淳（国立感染症研究所）

A. 研究目的

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例（赤痢菌患者：30都道府県；160人）について、食中毒の発生時調査、流通食品の検査等に利用可能な検査方法を開発し、迅速な食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てることを目的として、各種食品からの赤痢菌分離に関して実績のあるFDA試験法と、汚染菌数が極少数でしかも冷凍損傷などを受けている可能性を考慮に入れたFDA改良試験法（今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法、すなわちFDA試験法の前段階に前培養を行う方法）の2試験法を用いて、それぞれの試験法の赤痢菌検出性能の優劣と再現性を確認するために、同一の標準検体を用いたコラボレイティブスタディー（参加試験研究・検査機関；21施設）を行った。

B. 研究方法

B-1 コラボレイティブスタディー

平成13年11-12月にかけて、西日本を中心に *Shigella sonnei* 赤痢患者が急増し、原因食材の特定が急がれていたが、国立医薬品食品衛生研究所が冷凍生カキから *Shigella sonnei* を検出したことにより原因食材が確定した。この時に用いた試験法は、既にB-1 依頼試験の項で述べたように米国で用いられてきた一段階増菌法ではなく二段階増菌法（新試験法）である。この試験法を用いた理由は、多くの自治体において原因食材と思われるカキが調べられたにもかかわらず赤痢菌が検出されなかったことから、検体が冷凍損傷などの損傷を受けている可能性があること、及び汚染菌数が微少であることなどが考えられたことから、発育抑制剤などの含まれる選択増菌培地による直接培養は避けることにした。そこで、前段階に選択剤等を含まない培

地で増菌培養を行い、汚染菌数が少なくても、また、赤痢菌が損傷菌として存在していても容易に修復、増殖させ、2段階目に選択増菌培地を用いることによって、なるべく赤痢菌のみを選択的に増殖させることを考えたわけである。

以上のような理由から考案された新試験法が既存の方法より検出率において真に優れた方法であるか否かを探るべく、食品からの検出実績のある米国 Bacteriological Analytical Manual（試験法 I）と、その試験法 I を改良した新試験法（試験法 II）とを比較検討する Collaborative study（研究室間共同研究）を実施した。

1) 検査材料

カキ検体は、加工用カキ35kgを購入し冷蔵保存した後、直ちにフードカッターを用いて細切したものを25gずつストマッカー400用バッグに計りとり、合計1400検体作製し、赤痢菌接種用サンプルとした。

ヤングコーン検体は、缶詰ヤングコーン140缶（固形量270g）38kgを購入し冷蔵保存した後、直ちにフードカッターを用いて細切したものを25gずつストマッカー400用バッグに計りとり、合計1400検体作製し、赤痢菌接種用サンプルとした。

2) 使用菌株

使用菌株は、国立感染症研究所より分与された *Shigella sonnei* No.603, 615 及び当研究室が生カキから分離した No.123 の3株を使用した。

3) 赤痢菌接種検体の作製方法

3種の菌株をTSB (Tryptic soy broth:Difco) にそれぞれ接種し、35℃・20時間培養し菌液を作製した。それぞれの培養液を混ぜ合わせた後、適宜10倍段階希釈し接種菌液を調製した。調製した菌液をカキ検体（25g入りストマッカー400用バッグ入り）に1袋ずつ接種した後、ヒートシールして密封した。接種した菌数は次のごとくである。すなわち、生カキの

低菌数接種群の接種菌数は 14CFU/25g (0.6CFU/g)、高菌数接種群の接種菌数は 140CFU/25g (6CFU/g)。ヤングコーンの低菌数接種群の接種菌数は 19.1CFU/25g (0.8CFU/g)、高菌数接種群の接種菌数は 191CFU/25g (8CFU/g)である。

試験法用検体は、試験法Ⅰ、Ⅱ法併せて合計 2, 520 検体を作製した。

4) サンプル送付方法と温度管理方法

1 施設の送付用カキ検体 (60 検体) を冷凍および冷凍保存用に区分けした後、再び新しいストマッカー 400 用バッグに入れヒートシールして二重包装とした。これら二重包装した検体を病原微生物汚染検体輸送用特殊コンテナ (金属製) に入れ、冷凍用にはドライアイス 6 kg、冷蔵用には保冷剤媒約 4 kg を入れた後、クールメモリー (サンヨー電気製) をそれぞれの容器に入れて密封した。クールメモリーとは、検体の輸送開始から各施設に到着するまでの検体の温度履歴を監視する自動温度記録機器である。

5) 検体の受け入れと検査方法

検体を受け入れた各施設では、冷凍検体は速やかに冷凍庫 (-18℃以下) に保管し、生カキ検体では3週間後、ヤングコーンでは当日の検査に備えた。冷蔵検体は、その日のうちに当該検体を試験法Ⅰと試験法Ⅱに区分けし、検査を行った。

6) 検査結果の統計処理

21カ所の施設からの検査成績を取りまとめ、試験法Ⅰと試験法Ⅱとの比較をするためにF検定で分散の検定を行った。分散が検出法により異なっていたため、正規分布での平均値の差の検定及び Welch の検定を行って比較した。

B-2 依頼検査

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例の原因究明のため、厚生労働省は全規模での疫学的

調査を行った結果、原因食材は韓国の特定海域のものと推定した。そこで厚生労働省は、同時期に韓国産かきから麻痺性貝毒が検出された事例で、輸入時検査の検体の残りが一部検査機関に残されていたことを突き止め、当該検査機関に対して発生が最も多かった時期 (11月中旬から下旬) に輸入された韓国産かきの保存サンプルの分与を依頼した。12月17日に得られたサンプルを国立医薬品食品衛生研究所に送付し、保存サンプルは冷凍状態で18日に衛生微生物部第2室に到着し冷凍保存された。

1) 検査材料

送付されてきた保存サンプル (冷凍カキ検体) の状態は、14cmX21cmジップロック付きプラスチックバッグに入った細切された17検体 (重量; 180~250g) である。

2) 検査方法

①検体処理と微生物検査方法

送付された冷凍カキ検体は、受入れ後速やかに冷凍庫 (-18℃) に保管し、その日のうちに当該検体の25gずつを解凍せずにストマフィルター400用バッグに無菌的に量り採り、滅菌した225ml BPW (Buffered Peptone Water; Merck) を注加し、時々バッグを軽くもみながら室温に10分間放置した後、36±1℃・20時間好気培養した (FDA改良試験法)。培養後、この培養液で、PCRによる ipaH と invE 遺伝子の検出を行った。さらに、その培養液1mlを0.5µg/ml ノボビオシン入り Shigella broth (自家調製;BAM) 10mlに接種し、44℃・24時間嫌気培養を行った。なお、嫌気環境はアネロパック (三菱ガス化学) を用いて作った。この段階の培養液についてもPCRの ipaH と invE 遺伝子の検出を行った。また、その培養液の1ループずつを後述の4種類の選択分離寒天平板培地上に画線塗抹し、好気条件下で36℃±1℃・24時間培養し、出現した赤痢菌と疑われるコロニーを標準菌株と比較しながら釣菌し、普通寒天斜面培地に接種

して保存株とした。4種類の選択分離寒天平板培は、MacConkey No.3(OXOID) (Mac)、CHROMagar O157TAM(CHROMagar社;関東化学)(CRT)、HEKTOEN ENTERIC AGAR (OXOID)(HEK)と Salmonella agar acc. to ONOZ (MERCK)(エネツ)を使用した。

②MPN 試験法

冷凍カキ検体中の *Shigella sonnei* の汚染菌数を計測するために、赤痢菌が検出された冷凍カキ検体を取り出し、B PWを用いた5本法MPNを行った。

③PCR 試験法

PCR試験のための検体DNA液調整は、TaKaRaの特殊細菌検出用Primer Set 添付Applicationに準じた。コロニーPCRでは、1.5mlチューブに100 μ l滅菌水を入れ、コロニーを白金線で採取懸濁させ、培養液での加熱から同様に処理した。PCRは次のように行った。TaKaRaのEx TaqとTaKaRa特殊細菌検出用Primer Set(赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 *invE* および *ipaH* 遺伝子検出用)を使用し、PCR試薬は、TaKaRa Ex Taq (RR001)を、Primer Setは、TaKaRa *invE* 遺伝子検出用Primer Set INV-1/2 (S016)とTaKaRa *ipaH* 遺伝子検出用Primer Set IPA-1/2 (S017)の2組のプライマーを使用した。DNA溶液は上記で調整した1 μ lを使用し、PCRは全量20 μ lで行った。PCRは、熱変性94 $^{\circ}$ C、30秒間、アニーリング、55 $^{\circ}$ C、30秒間、伸長72 $^{\circ}$ C、30秒間を35サイクル行い、その後、72 $^{\circ}$ C、7分間伸長後に4 $^{\circ}$ Cに温度を下げた。2%アガロース(エチジウムブロマイド0.5 μ g/mlを含む)による電気泳動の結果、目的の遺伝子INV-1/2 Primer Setによって293 bpの、IPA-1/2 Primer Setによって242 bpの長さのDNAバンドが出現したものを陽性と判定した。

④赤痢菌の同定試験

カキから分離した赤痢菌菌株の同定を行うために、TSI斜面寒天培地(日水)、LIM培地(栄研)、ブドウ糖加普通ブイヨン(ダーラム管入

り)、オルニチン培地(栄研)、シモンズクエン酸塩斜面寒天培地(栄研)およびアセテート斜面寒天培地などにそれぞれ接種し、生化学的性状を調べた。赤痢菌と同定された菌株は血清学的試験を行った。

B-3 赤痢菌検査法(暫定)と解説書の作成

平成13年12月21日に冷凍カキから赤痢菌を日本で初めて分離することができたことから、一刻も早く食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てるために、赤痢菌検査法フロー図ならびに検査検体の採取法、試料の調製法、赤痢菌の増菌培養法、検出・分離培地、嫌気培養法、同定試験法、血清学的試験法及びPCR試験法などを取りまとめた赤痢菌の検査法解説書を作成した。

C. 研究結果及び考察

1) コラボレイティブスタディーに用いた検体の微生物汚染状況

①カキ検体の微生物汚染状況

コラボに用いたカキは、加工用カキで産地は広島産と岡山産である。広島産及び岡山産カキともに一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^3$ /gの範囲、大腸菌は広島産カキ陽性が1検体みられた程度でカキとしてはかなり一般生菌数の低いものであった。

②ヤングコーン検体の微生物汚染状況

コラボに用いたヤングコーンは、タイ国産の缶詰(3社)である。一般生菌数は、缶詰のため菌は検出されないことが分かっていたので、意図的に雑菌を汚染させたところ、1検体のみ300/g以上でそれ以外は<300/g以下であった。

2) 検体輸送温度と培養温度の記録

①検体輸送温度の記録

返却されたクールメモリーの温度記録を確認した結果、21施設に送付した冷蔵検体すべてが4 $^{\circ}$ C以下で各施設へ送付されていた。冷凍検体では、輸送途中はすべてが-3.5 $^{\circ}$ C以下、各

施設に受入後は-11~-38.5℃の範囲(大部分は-15℃以下)で1週間保管されていた。

②培養温度の記録

返却されたクールメモリーの温度記録を確認した結果、21施設中3施設において、孵卵器の整備不良のためか選択増菌培養温度である指定培養温度(42-44℃)に対し数時間の逸脱が見られたため、それらの施設からのデータは採用しないことにした。そのため、以後のコラボのデータは18施設のものを使用して作成したものである。

3) コラボレイティブスタディーの結果

①冷凍・冷蔵保存別における赤痢菌の検出率

カキ及びヤングコーン検体共に冷凍検体は冷蔵検体に比べ、検出率が低く認められたことから、赤痢菌は冷凍保存することによって死滅もしくはVNC (Viable but nonculturable: 生残しているが発育できない状態) になりやすいのかもしれない。したがって、赤痢菌の場合も腸炎ビブリオ、コレラ菌および腸管出血性大腸菌 O157:H7 などと同様に汚染が疑われた食品の保管は冷蔵で、なるべく短い間に検査を実施することが重要であると考えられた。

②試験法 I における赤痢菌の検出率

試験法 I を用いたカキとヤングコーン検体の検出率合計は、1,080検体中PCRの inv E は356検体、ipaH は376検体(検出率; inv E 33.0%、ipaH 34.8%)であった。分離平板培地では、SS寒天培地395、CRT寒天培地413、DHL 388検体(検出率; SS寒天培地36.6%、CRT寒天培地38.2%、DHL 35.9%)であった。

③試験法 II における赤痢菌の検出率

試験法 II を用いたカキとヤングコーン検体の検出率合計は、1,080検体中PCRの inv E は503検体、ipaH は521検体(検出率; inv E 46.6%、ipaH 48.2%)であった。分離平板培地では、SS寒天培地499、CR

T寒天培地499、DHL 495検体(検出率; SS寒天培地46.2%、CRT寒天培地46.2%、DHL 45.8%)であった。

④試験法 I 及び II の赤痢菌検出率

試験法 II の検出率は試験法 I に比べ、PCR法及び分離培地共に高い結果が得られることが分かった。特に試験法 I の低菌数接種群PCR法の検出率は、分離培地の成績との間に差が見られ false negative が見られたが、試験法 II では、false negative はなく、両者の成績はよく一致していた。その理由としては、2段階増菌する試験法 II では、試験法 I より赤痢菌数が増菌するため false negative がなくなるためと考えられた。

⑤試験法 I 及び II の赤痢菌検出率 (統計学的分析の結果)

試験法 I 及び II の赤痢菌検出成績を統計解析するために分散のF検定を行った。それぞれの検出項目(inv E、ipaH、SS寒天、CRT寒天及びDHL寒天培地)で分散が大きく異なることから、正規分布での差の検定とウエルチ検定の両方法で検定を行った。その結果、ウエルチの検定では各検出項目の15/40は5%の有意差で試験法 I と試験法 II の間に差がありと分析され、試験法 II の検出率が優れていることが統計解析の結果からも証明された。

⑥分離平板培地別の赤痢菌検出率

試験法 I 及び II を合計した離平板培地別の赤痢菌検出率は、2,160検体中SS寒天培地894検体(41.4%)、CRT寒天培地912検体(42.2%)、DHL 883検体(40.9%)で、CRT寒天培地の検出率が最も高かった。CRT寒天培地は、開発後間もなく使用経験のないコラボ担当者が大部分であったにもかかわらず高い検出率が認められたことは、発色酵素基質の使用により、平板上の *Shigella sonnei* のコロニーはうす紫色に着色するため、他のコロニーとの区別が容易であったからだと推察された。

4) 依頼検査成績

依頼検体（冷凍生カキ17検体）中1検体から赤痢菌（*Shigella sonnei*）を分離することに成功した。

5) 赤痢菌検査法と解説書の作成

平成13年12月21日に冷凍カキから赤痢菌を日本で初めて分離することができたことから、一刻も早く食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てるために、赤痢菌検査法フロー図ならびに検査検体の採取法、試料の調製法、赤痢菌の増菌培養法、検出・分離培地、嫌気培養法、同定試験法、血清学的試験法及びPCR試験法などを取りまとめた赤痢菌の検査法解説書を作成した。これをもとに食品保健部監視安全課は、平成14年1月9日付けで事務連絡「赤痢菌の試験法について」を都道府県等各自治体に通知した。

D. 結論

- 1) 全国21試験研究及び検査機関の協力の下で、食品から赤痢菌を分離する試験法設定のためのコラボレイティブスタディーを実施し、*Shigella sonnei*の検出においては、試験法Ⅰ（FDA法）に比べ試験法Ⅱ（FDA改良法；今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法）が優れていることを実証した。
- 2) 試験法Ⅱを用いてわが国で初めて食品（カキ）から赤痢菌（*Shigella sonnei*）を分離することに成功し、輸入禁止措置などの行政対応に貢献することができた。
- 3) コラボレイティブスタディーの結果を基に、「赤痢菌の検査法解説」を作成した。
- 4) 検体の種類別では、ヤングコーンが生カキより検出率が高かった。
- 5) 保存方法別では、冷凍より冷蔵検体の検出

率が高かった。

6) 使用分離寒天培地は、CRT（CHROMagar 0157TAM）の検出率が最も高かった。

7) PCR法は、試験法Ⅱでは培地検出結果とよく一致したことから、迅速なスクリーニングテストとしても使用可能と考えられた。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、小沼博隆：輸入冷凍生カキより *Shigella sonnei* 赤痢菌の検出、防菌防黴誌、30, 299-302 (2002)

2. 学会発表（発表予定を含む）

宮原美知子、小沼博隆：各種検出分離寒天平板培地における *Shigella sonnei* 集落の生育性状、日本食品衛生学会第83回学術講演会（2002. 5. 16）

宮原美知子、小沼博隆：輸入冷凍生カキから赤痢菌の検出、日本防菌防黴学会第29回年次大会（2002. 5. 30）

宮原美知子、松下秀、甲斐明美、柳川敬子、沖津忠行、内村眞佐子、田中廣行、中川弘、佐々木直、小林一寛、小川博美、村瀬稔、片山淳、安形則雄、斉藤紀行、山内昭則、尾崎延芳、八柳潤、村上光一、大友良光、山口仁孝、小笠原邦敏、宮城和文、仁科徳啓、寺嶋淳、田村和満、宮原誠、小沼博隆：赤痢菌検査法の設定に関する研究 1. コラボレイティブスタディー結果について、第23回日本食品微生物学会学術総会（2002. 9. 23）、東京

宮原美知子、小沼博隆：赤痢菌検出における分離寒天平板培地の検討、日本食品衛生学会第84回学術講演会（2002. 11. 7）、大阪

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

食品から赤痢菌検出に関する研究

主任研究者 小沼博隆 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例（赤痢菌患者：30都道府県；160人）について、食中毒の発生時調査、流通食品の検査等に利用可能な検査方法を開発し、迅速な食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てることを目的に以下の調査研究を行った。

わが国では、食品から赤痢菌の検出に成功した事例はなかった。また、諸外国でも米国など一部の事例を除き成功した事例がほとんどなかったことなどから、各種食品からの赤痢菌分離に関して実績のあるFDA試験法と、汚染菌数が極少数でしかも冷凍損傷などを受けている可能性を考慮に入れたFDA改良試験法（今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法、すなわちFDA試験法の前段階に前培養を行う方法）の2試験法を用いて、それぞれの試験法の赤痢菌検出性能の優劣と再現性を確認するために、同一の標準検体を用いたコラボレイティブスタディー（参加試験研究・検査機関；21施設）を行い以下の成果を得た。

- 1) 全国21試験研究及び検査機関の協力の下で、食品から赤痢菌を検出・分離する試験法設定のためのコラボレイティブスタディーを実施し、*Shigella sonnei* の検出においては、試験法Ⅰ（FDA法）に比べ試験法Ⅱ（FDA改良法）が優れていることを実証した。
- 2) 試験法Ⅱを用いてわが国で初めて食品（カキ）から赤痢菌（*Shigella sonnei*）を分離することに成功し、輸入禁止措置などの行政対応に貢献することができた。
- 3) コラボレイティブスタディーの結果を基に、試験法Ⅱの試験法フロー図ならびに「赤痢菌（*Shigella sonnei*）の検査法解説」を作成した。

協力研究者

宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）
宮原 誠（国立医薬品食品衛生研究所）
甲斐明美、松下 秀（東京都立衛生研究所）
小林一寛（大阪府公衆衛生研究所）
柳川敬子、斎藤章暢（埼玉県衛生研究所）
沖津忠行（神奈川県衛生研究所）
内村眞佐子（千葉県衛生研究所）
丹野憲二（財団法人日本食品分析センター）
田中廣行（財団法人日本食品分析センター）
中川 弘（財団法人東京顕微鏡院）
佐々木直（財団法人日本冷凍食品検査協会）

小川博美（広島県保健環境センター）
村瀬 稔（神戸市環境保健研究所）
片山 淳（山口県衛生研究所）
安形則雄（名古屋市衛生研究所）
斉藤紀行（宮城県保健環境センター）
山内昭則（三重県科学技術振興センター）
尾崎延芳（福岡市保健環境研究所）
八柳 潤（秋田県衛生科学研究所）
村上光一（福岡県保健環境研究所）
大友良光（青森県環境保健センター）
山口仁孝（長崎県衛生公害研究所）
小笠原邦敏（輸入食品・検疫検査センター；横浜）

宮城和文（輸入食品・検疫検査センター；神戸）
仁科徳啓（東海大学）
田村和満、寺嶋 淳（国立感染症研究所）

A. 研究目的

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例（赤痢菌患者：30都道府県；160人）について、食中毒の発生時調査、流通食品の検査等に利用可能な検査方法を開発し、迅速な食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てることを目的として、各種食品からの赤痢菌分離に関して実績のあるFDA/Bacteriological Analytical Manual（FDA試験法）と、汚染菌数が極少数でしかも冷凍損傷などを受けている可能性を考慮に入れたFDA改良試験法（今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法、すなわちFDA試験法の前段階に前培養を行う方法）の2試験法を用いて、それぞれの試験法の赤痢菌検出性能の優劣と再現性を確認するために、同一の標準検体を用いたコラボレイティブスタディー（参加試験研究・検査機関；21施設）を行った。

B. 研究方法

B-1 コラボレイティブスタディー

平成13年11-12月にかけて、西日本を中心に *Shigella sonnei* 赤痢患者が急増し、原因食材の特定が急がれていたが、国立医薬品食品衛生研究所が冷凍生カキから *Shigella sonnei*、を検出したことにより原因食材が確定した。この時に用いた試験法は、米国で用いられてきた一段階増菌法ではなく二段階増菌法（新試験法）である。この試験法を用いた理由は、多くの自治体において原因食材と思われるカキが調べられたにもかかわらず赤痢菌が検出されなかったことから、検体が冷凍損傷などの損傷を受けている可能性があること、及び汚染菌数が微少であることなどが考えられたことから、発育抑制剤（抗生物質等）などの含まれている選択増菌培地による直接培養は避けることにした。そこで、前段

階に選択剤等を含まない培地で増菌培養を行い、汚染菌数が少なくても、また、赤痢菌が損傷菌として存在していても容易に修復、増殖させ、2段階目に選択増菌培地を用いることによって、なるべく赤痢菌のみを選択的に増殖させることを考えたわけである（図1, 2, 9, 10）。

以上のような理由から考案された新試験法が既存の方法より検出率において真に優れた方法であるか否かを探るべく、食品からの検出実績のある米国FDA試験法（試験法I）と、その試験法Iを改良した新試験法（試験法II）とを比較検討する Collaborative study（コラボレイティブスタディー：研究室間共同研究）を実施した。

1) 検査材料

カキ検体は、加工用カキ35kgを購入し冷蔵保存した後、直ちにフードカッターを用いて細切したものを25gずつストマッカー400用バッグに計りとり、合計1,400検体作製し、赤痢菌接種用サンプルとした。

ヤングコーン検体は、缶詰ヤングコーン140缶（固形量270g）38kgを購入し冷蔵保存した後、直ちにフードカッターを用いて細切したものを25gずつストマッカー400用バッグに計りとり、合計1,400検体作製し、赤痢菌接種用サンプルとした。

2) 使用菌株

使用菌株は、国立感染症研究所より分与された *Shigella sonnei* No.603, 615 及び当研究室が生カキから分離したNo.123の3株を使用した。

3) 赤痢菌接種検体の作製方法

3種の菌株をTSB（Tryptic soy broth: Difco）にそれぞれ接種し、35℃・20時間培養し菌液を作製した。それぞれの培養液を混ぜ合わせた後、適宜10倍段階希釈し接種菌液を調製した。調製した菌液をカキ検体（25g入りストマッカー400用バッグ入り）に1袋ずつ接種した後、ヒートシールして密封した。接種した

菌数は次のごとくである。すなわち、生カキの低菌数接種群の接種菌数は 14CFU/25g (0.6CFU/g)、高菌数接種群の接種菌数は 140CFU/25g (6CFU/g)。ヤングコーンの低菌数接種群の接種菌数は 19.1CFU/25g (0.8CFU/g)、高菌数接種群の接種菌数は 191CFU/25g (8CFU/g)である。

これらの検体 (1群: 5検体) を冷凍保存と冷蔵保存ならびに低菌数と高菌数接種群とに分けて対照群 (5検体) を含めて1施設にカキ検体 30検体 (冷凍検体の内訳: 対照群 5検体、低菌数群 5検体、高菌数群 5検体、冷蔵検体の内訳: 対照群 5検体、低菌数群 5検体、高菌数群 5検) 計 30検体およびヤングコーン検体 30検体 (冷凍検体の内訳: 対照群 5検体、低菌数群 5検体、高菌数群 5検体、冷蔵検体の内訳: 対照群 5検体、低菌数群 5検体、高菌数群 5検) 計 30検体、合計 60検体を作製した。これと同様の検体を 21施設分、総合計 1, 260検体を作製し、試験法 I 用にした。試験法 II 用検体は、前述の試験法 I 用検体と同様に計 1, 260検体を作製し、試験法 I、II法併せて合計 2, 520検体を作製した。

4) サンプル送付方法と温度管理方法

1施設の送付用カキ検体 (60検体) を冷凍および冷蔵保存用に区分けした後、再び新しいストマッカー 400用バッグに入れヒートシールして二重包装とした (写真-1)。これら二重包装した検体を病原微生物汚染検体輸送用特殊コンテナ (金属製) に入れ、冷凍用にはドライアイス 6kg、冷蔵用には保冷剤 4kg を入れた後、クールメモリー (サンヨー電気製) をそれぞれの容器に入れて密封した。クールメモリーとは、検体の輸送開始から各施設に到着するまでの検体の温度履歴を監視する自動温度記録機器である (写真-2, 3)。

なお、クールメモリーは各施設に到着し、容器から取り出された後、検体と共に孵卵器に入れられ 18~24時間培養後に当研究所に郵送にて送付返却してもらい、発送から各施設の受入及び一次増菌培養終了までの一連の温度記録

を入手した。

5) 検体の受け入れと検査方法

検体を受け入れた各施設では、冷凍検体は速やかに冷凍庫 (-18℃以下) に保管し、生カキ検体では3週間後、ヤングコーンでは当日の検査に備えた。冷蔵検体は、その日のうちに当該検体を試験法 I と試験法 II に区分けし、検査を行った。

試験法 I では、1検体に対し滅菌 0.5 μg/ml ノボピオシン入り Shigella broth (自家調製; BAM) 22.5ml を注加し、44℃・24時間嫌気培養を行った。なお、嫌気環境はアネロパック (三菱ガス化学) で作った。培養後、その培養液の 1ループずつを以下の3種類の選択分離寒天平板培地上に画線塗抹し、好気条件下で 36℃±1℃・24時間培養し、出現した赤痢菌と疑われるコロニーを標準菌株と比較しながら釣菌し、普通寒天斜面培地に接種して保存株とした。3種類の選択分離寒天平板培地は、選択性の強い培地として SS 寒天 (栄研)、選択性の中等度の培地として CHROMagar O157TAM (CHROMagar 社; 関東化学) (CRT) および弱い選択性培地として DHL 寒天 (栄研) を使用した (図 1)。

試験法 II では、1検体に対し滅菌 22.5ml B PW (Buffered Peptone Water; Merck) を注加し、時々バッグを軽くもみながら室温に 10分間放置した後、36±1℃・20時間好気培養した。さらに、その培養液 1ml を 0.5 μg/ml ノボピオシン入り Shigella broth (自家調製; BAM³⁾) 10ml に接種し、44℃・24時間嫌気 (アネロパック) 培養を行った。培養後、その培養液の 1ループずつを以下の3種類の選択分離寒天平板培地上に画線塗抹し、好気条件下で 36℃±1℃・24時間培養し、出現した赤痢菌と疑われるコロニーを標準菌株と比較しながら釣菌し、普通寒天斜面培地に接種して保存株とした。3種類の選択分離寒天平板培地は、SS 寒天 (栄研)、CHROMagar O157TAM (CHROMagar 社; 関東化学) (CRT) および DHL 寒天 (栄研) を使用した (図 2)。

6) PCR 試験法

PCR 試験のための検体 DNA 液調整は、TaKaRa の特殊細菌検出用 Primer Set 添付 Application に準じた。コロニー PCR では、1.5 ml チューブに 100 μ l 滅菌水を入れ、コロニーを白金線で採取懸濁させ、培養液での加熱から同様に処理した。PCR は次のように行った。TaKaRa の Ex Taq と TaKaRa 特殊細菌検出用 Primer Set (赤痢菌および腸管侵入性大腸菌 invE および ipaH 遺伝子検出用) を使用し、PCR 試薬は、TaKaRa Ex Taq (RR001) を、Primer Set は、TaKaRa invE 遺伝子検出用 Primer Set INV-1/2 (S016) と TaKaRa ipaH 遺伝子検出用 Primer Set IPA-1/2 (S017) の 2 組のプライマーを使用した。DNA 溶液は上記で調整した 1 μ l を使用し、PCR は全量 20 μ l で行った。PCR は、熱変性 94 $^{\circ}$ C、30 秒間、アニーリング、55 $^{\circ}$ C、30 秒間、伸長 72 $^{\circ}$ C、30 秒間を 35 サイクル行い、その後、72 $^{\circ}$ C、7 分間伸長後に 4 $^{\circ}$ C に温度を下げて終了させた。2% アガロース (エチジウムブロマイド 0.5 μ g/ml を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子 INV-1/2 Primer Set によって 293 bp の、IPA-1/2 Primer Set によって 242 bp の長さの DNA バンドが出現したものを陽性と判定した。

7) 赤痢菌の同定試験

カキから分離した赤痢様菌株の同定を行うために以下の生化学的性状を調べた。普通寒天斜面培地の接種した新鮮株を基株としてグラム染色、チトクロームオキシダーゼおよびカタラーゼ試験を行った。また、普通ブイヨンに接種、培養後、本培養液を T S I 斜面寒天培地(日水)、L I M 培地 (栄研)、ブドウ糖加普通ブイヨン (ダーラム管入り)、オルニチン培地 (栄研)、シモンズクエン酸塩斜面寒天培地 (栄研) およびアセテート斜面寒天培地(自家調製 BAM) にそれぞれ接種し、35~37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。培養後、T S I 斜面寒天培地では高層部黄変、斜面部赤変 (黄変の場合あり) 硫化水素陰性、ブドウ糖からのガス産生陰性、L I M 培地では運動性なし、インドール陰性、硫化水素陰

性、リシンデカルボキシラーゼ陰性、オルニチン培地ではオルニチンデカルボキシラーゼ陽性、クエン酸塩培地陰性およびアセテート培地陰性の菌株を赤痢菌と確定し、血清学的試験を行った。

8) 血清学的試験

血清学的試験は次のように行った。基株から普通寒天平板培地に画線塗抹し好気培養した。その平板に発現した 5~6 コロニーを掻き取り、0.5 ml 生理食塩水に均一に浮遊させ抗原液として、スライド凝集法により検討を行った。さらに、多価血清で陽性と判定された場合は、その多価血清を構成する因子血清を用いて同様に試験した。赤痢菌の中には生菌で型別不能な株があり、赤痢菌と同定された株が多価血清で陰性の場合は、上記と同様に 5~6 コロニーを掻き取り、3 ml の生理食塩水に浮遊させた後、121 $^{\circ}$ C・15 分間、加熱処理後、再度、同様の試験を行った。

①スライド凝集法

ガラス鉛筆でスライドグラスあるいは窓用透明グラスを区分けし、区画毎に各多価血清及び生理食塩水 (30 μ L) 滴下する。それに抗原液の 1 白金耳 (またはマイクロピペットで 5~10 μ L) をおき、よく混和する。スライドグラスあるいは窓ガラスを前後に傾斜させながら凝集の有無を観察した。

②因子血清

多価血清で陽性と判定された場合は、その多価血清を構成する因子血清を用いて同様に試験を行った。

③結果の判定

凝集の観察は、透過光下で行い、最初に凝集抗原が生理食塩水との反応で凝集していないことことを確認してから凝集試験を行った。各血清との反応では、1 分間以内の強い凝集が観察されたものだけを陽性とした。なお、赤痢菌と同定された株が多価血清で陰性の場合、上記と同様に 5~6 集落を掻き取り、3 ml の生理食塩水に浮遊させた後、121 $^{\circ}$ C・15 分間加熱後、3000 回転 10 分間遠心後、上清を捨て、沈渣に

0.5mLの生理食塩水を加え均一に浮遊させ抗原液とした。その後の方法は、上記の方法に従った。また、複数の多価血清に陽性を示したり、複数の血清型に陽性を示した場合は、純培養菌であることを確認した後、生化学性状を再確認した後、加熱抗原を調整して再試験を行った。

9) 検査結果の統計処理

21カ所の施設からの検査成績を取りまとめ、試験法Ⅰと試験法Ⅱとの比較をするためにF検定で分散の検定を行った。分散が検出法により異なっていたため、正規分布での平均値の差の検定及びWelchの検定を行って比較した。

B-2 依頼検査

平成13年11月下旬から西日本を中心に患者が拡大している赤痢菌による食中毒事例の原因究明のため、厚生労働省は全規模での疫学的調査を行った結果、原因食材は韓国の特定海域のものとして推定した。そこで厚生労働省は、同時期に韓国産かきから麻痺性貝毒が検出された事例で、輸入時検査の検体の残りが一部検査機関に残されていたことを突き止め、当該検査機関に対して発生が最も多かった時期（11月中旬から下旬）に輸入された韓国産かきの保存サンプルの分与を依頼した。12月17日に得られたサンプルを国立医薬品食品衛生研究所に送付し、保存サンプルは冷凍状態で18日に衛生微生物部第2室に到着し冷凍保存された。

1) 検査材料

送付されてきた保存サンプル（冷凍カキ検体）の状態は、14cmX21cmジップロック付きプラスチックバッグに入った細切された17検体（重量；180～250g）である。

2) 検査方法

①検体処理と微生物検査方法

送付された冷凍カキ検体は、受入れ後速やかに冷凍庫（-18℃）に保管し、その日のうちに当該検体の25gずつを解凍せずにストマ

フィルター400用バッグに無菌的に量り採り、滅菌した225mlBPW（Buffered Peptone Water；Merck）を注加し、時々バッグを軽くもみながら室温に10分間放置した後、36±1℃・20時間好気培養した。培養後、この培養液で、PCRによるipaHとinvE遺伝子の検出を行った。さらに、その培養液1mlを0.5μg/mlノボピオシン入りShigella broth（自家調製；BAM）10mlに接種し、44℃・24時間嫌気培養を行った。なお、嫌気環境はアネロパック（三菱ガス化学）を用いて作った。この段階の培養液についてもPCRのipaHとinvE遺伝子の検出を行った。また、その培養液の1ループずつを後述の4種類の選択分離寒天平板培地上に画線塗抹し、好気条件下で36℃±1℃・24時間培養し、出現した赤痢菌と疑われるコロニーを標準菌株と比較しながら釣菌し、普通寒天斜面培地に接種して保存株とした。4種類の選択分離寒天平板培は、MacConkey No.3(OXOID)（Mac）、CHROMagar O157TAM(CHROMagar社；関東化学)（CRT）、HEKTOEN ENTERIC AGAR (OXOID)（HEK）とSalmonella agar acc. to ONOZ (MERCK)（エネツ）を使用した（図9、10）。

②MPN試験法

冷凍カキ検体中の*Shigella sonnei*の汚染菌数を計測するために、赤痢菌が検出された冷凍カキ検体を取り出し、BPWを用いた5本法MPNを行った。

③PCR試験法

PCR試験のための検体DNA液調整は、TaKaRaの特殊細菌検出用Primer Set添付Applicationに準じた。コロニーPCRでは、1.5mlチューブに100μl滅菌水を入れ、コロニーを白金線で採取懸濁させ、培養液での加熱からと同様に処理した。PCRは次のように行った。TaKaRaのEx TaqとTaKaRa特殊細菌検出用Primer Set（赤痢菌および腸管侵入性大腸菌invEおよびipaH遺伝子検出用）を使用し、PCR試薬は、TaKaRa Ex Taq (RR001)を、Primer Setは、TaKaRa invE遺

伝子検出用 Primer Set INV-1/2 (S016) と TaKaRa ipaH 遺伝子検出用 Primer Set IPA-1/2 (S017) の 2 組のプライマーを使用した。DNA 溶液は上記で調整した 1 μ l を使用し、PCR は全量 20 μ l で行った。PCR は、熱変性 94 $^{\circ}$ C、30 秒間、アニーリング、55 $^{\circ}$ C、30 秒間、伸長 72 $^{\circ}$ C、30 秒間を 35 サイクル行い、その後、72 $^{\circ}$ C、7 分間伸長後に 4 $^{\circ}$ C に温度を下げて終了させた。2% アガロース (エチジウムブロマイド 0.5 μ g/ml を含む) による電気泳動の結果、目的の遺伝子 INV-1/2 Primer Set によって 293 bp の、IPA-1/2 Primer Set によって 242 bp の長さの DNA バンドが出現したものを陽性と判定した。

④ 赤痢菌の同定試験

カキから分離した赤痢様菌株の同定を行うために以下の生化学的性状を調べた。普通寒天斜面培地の接種した新鮮株を基株としてグラム染色、チトクロームオキシダーゼ試験およびカタラーゼ試験を行った。また、普通ブイヨンに接種、培養後、本培養液を T S I 斜面寒天培地 (日水)、L I M 培地 (栄研)、ブドウ糖加普通ブイヨン (ダーラム管入り)、オルニチン培地 (栄研)、シモンズクエン酸塩斜面寒天培地 (栄研) およびアセテート斜面寒天培地 (自家調製 BAM) にそれぞれ接種し、35~37 $^{\circ}$ C で 18~24 時間培養した。培養後、T S I 斜面寒天培地では高層部黄変、斜面部赤変 (黄変の場合あり) 硫化水素陰性、ブドウ糖からのガス産生陰性、L I M 培地では運動性なし、インドール陰性、硫化水素陰性、リシンデカルボキシラーゼ陰性、オルニチン培地ではオルニチンデカルボキシラーゼ陽性、クエン酸塩培地陰性およびアセテート培地陰性の菌株を赤痢菌と確定し、血清学的試験を行った。

⑤ 血清学的試験

血清学的試験は次のように行った。基株から普通寒天平板培地に画線塗抹し好気培養した。その平板に発現した 5~6 コロニーを掻き取り、0.5 ml 生理食塩水に均一に浮遊させ抗原液として、スライド凝集法により検討を行っ

た。さらに、多価血清で陽性と判定された場合は、その多価血清を構成する因子血清を用いて同様に試験した。赤痢菌の中には生菌で型別不能な株があり、赤痢菌と同定された株が多価血清で陰性の場合、上記と同様に 5~6 コロニーを掻き取り、3 ml の生理食塩水に浮遊させた後、121 $^{\circ}$ C・15 分間、加熱処理後、再度、同様の試験を行った。

B-3 赤痢菌検査法と解説書の作成

平成 13 年 1 月 21 日に冷凍カキから赤痢菌を日本で初めて分離することができたことから、厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課と協議の結果、一刻も早く食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てるために、赤痢菌の分離ができた検査方法とその解説書を作成する必要があるという結論に達したため、著者は赤痢菌検査法フロー図ならびに検査検体の採取法、試料の調製法、赤痢菌の増菌培養法、検出・分離培地、嫌気培養法、同定試験法、血清学的試験法及び PCR 試験法などを取りまとめた赤痢菌の検査法解説書の作成を試みた。

C. 研究結果及び考察

1) コラボレイティブスタディーに用いた検体の微生物汚染状況

① カキ検体の微生物汚染状況

コラボに用いたカキは、加工用カキで産地は広島産と岡山産である。広島産及び岡山産カキともに一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^3$ / g の範囲、大腸菌は広島産カキ陽性が 1 検体みられた程度でカキとしてはかなり一般生菌数の低いものであった (表 1)。

② ヤングコーン検体の微生物汚染状況

コラボに用いたヤングコーンは、タイ国産の缶詰 (3 社) である。一般生菌数は、缶詰のため菌は検出されないことが分かっていたので、意図的に雑菌を汚染させたところ、1 検体のみ 300 / g 以上でそれ以外は < 300 / g 以下であった (表 2)。

2) 検体輸送温度と培養温度の記録

①検体輸送温度の記録

返却されたクールメモリーの温度記録を確認した結果、21施設に送付した冷蔵検体すべてが4℃以下で各施設へ送付されていた。冷凍検体では、輸送途中はすべてが-3.5℃以下、各施設に受入後は-1.1~-3.8.5℃の範囲(大部分は-1.5℃以下)で、生カキ検体では3週間保管されていた(資料-2)。

クールメモリーとは、検体の輸送開始から各施設に到着するまでの検体の温度履歴を監視する自動温度記録機器である(資料-2)。

②培養温度の記録

返却されたクールメモリーの温度記録を確認した結果、21施設中3施設において、孵卵器の整備不良のためか選択増菌培養温度である指定培養温度(4.2-4.4℃)に対し数時間の逸脱が見られたため、それらの施設からのデータは採用しないことにした。そのため、今後のコラボのデータは18施設のものを使用して作成したものである(資料-2)。

3) コラボレイティブスタディーの結果、

①冷凍・冷蔵保存別における赤痢菌の検出率

検体の保管状態による赤痢菌の検出率を調べたところ、カキでは冷蔵検体は、540検体中PCRで144~157検体(検出率26.7~29.1%)、分離平板培地で148~156検体(検出率27.4~28.9%)であった。しかし、冷凍検体では、540検体中PCRで59~69検体(検出率10.9~12.8%)、分離平板培地で74~85検体(検出率13.7~15.7%)と冷蔵検体の検出率の半数以下の検出率であった(表3)。

ヤングコーンでは、冷蔵検体は、540検体中PCRで354~360検体(検出率65.6~66.7%)、分離平板培地で360検体(検出率66.7%)であった。しかし、冷凍検体では、540検体中PCRで302~311検体(検出率55.9~57.6%)、分離平板培地で307~310検体(検出率56.

9~57.4%)と冷蔵検体に比べ、10%程度低い検出率であった。これらの成績から、カキ及びヤングコーン検体共に冷凍検体は冷蔵検体に比べ、検出率が低く認められたことから、赤痢菌は冷凍保存することによって死滅もしくはVNC(Viable but nonculturable:生残しているが発育できない状態)になりやすいのかもしれない。しかし、今回の試験では冷蔵検体は検体作成後の翌日に全施設とも検査を実施しているが、生カキ検体は3週間冷凍保存後に検査を実施しているため、保管中の死滅なども考えられた。したがって、赤痢菌の場合も腸炎ビブリオ、コレラ菌および腸管出血性大腸菌O157:H7などと同様に汚染が疑われた食品の保管は冷蔵で、なるべく短い間に検査を実施することが重要であると考えられた。

②試験法Iにおける赤痢菌の検出率

試験法Iを用いたカキ検体の検出率は、低菌数接種群(L)では、180検体中PCRのinvEは6検体、ipaHは8検体(検出率; invE 3.3%、ipaH 4.4%)であった。分離平板培地では、SS寒天培地10、CRT寒天培地16、DHL13検体(検出率; SS寒天培地5.6%、CRT寒天培地8.9%、DHL 7.2%)であった。高菌数接種群(H)では180検体中PCRのinvEは25検体、ipaHは35検体(検出率; invE 13.9%、ipaH 19.4%)であった。分離平板培地では、SS寒天培地52、CRT寒天培地62、DHL42検体(検出率; SS寒天培地28.9%、CRT寒天培地34.4%、DHL 23.3%)であった(表4)。また、低菌数接種群(L)、高菌数接種群(H)及び陰性対照群を合計した成績では、540検体中PCRのinvEは31検体、ipaHは43検体(検出率; invE 5.7%、ipaH 8.0%)であった。分離平板培地では、SS寒天培地62、CRT寒天培地78、DHL42検体(検出率; SS寒天培地11.5%、CRT寒天培地14.4%、DHL 7.8%)であった。

一方、試験法Iを用いたヤングコーン検体の

検出率は、低菌数接種群 (L) では、180検体中PCRの invEは146検体、ipaHは151検体 (検出率; invE 81.1%、ipaH 83.9%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地153、CRT寒天培地155、DHL153検体 (検出率; SS寒天培地85.0%、CRT寒天培地86.1%、DHL 85.0%) であった。高菌数接種群 (H) では180検体中PCRの invEは178検体、ipaHは180検体 (検出率; invE 98.9%、ipaH 100%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地180、CRT寒天培地180、DHL180検体 (検出率; SS寒天培地100%、CRT寒天培地100%、DHL 100%) であった。陰性対照群において陽性反応を示したPCR法は、invEは1検体、ipaHは2検体にみられたが、分離培地ではみられなかった (表4)。

低菌数接種群 (L)、高菌数接種群 (H) 及び陰性対照群を合計した成績では、540検体中PCRの invEは325検体、ipaHは333検体 (検出率; invE 60.2%、ipaH 61.7%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地333、CRT寒天培地335、DHL 333検体 (検出率; SS寒天培地61.7%、CRT寒天培地62.0%、DHL 61.7%) であった。

試験法Iを用いたカキとヤングコーン検体の検出率合計は、1,080検体中PCRの invEは356検体、ipaHは376検体 (検出率; invE 33.0%、ipaH 34.8%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地395、CRT寒天培地413、DHL 388検体 (検出率; SS寒天培地36.6%、CRT寒天培地38.2%、DHL 35.9%) であった。

③試験法IIにおける赤痢菌の検出率

試験法IIを用いたカキ検体の検出率は、低菌数接種群 (L) では、180検体中PCRの invEは57検体、ipaHは65検体 (検出率; invE 31.7%、ipaH 36.1%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地54、CRT寒天培地53、DHL 49検体 (検出率; SS

寒天培地30.0%、CRT寒天培地29.4%、DHL 27.2%) であった。高菌数接種群 (H) では180検体中PCRの invEは113検体、ipaHは115検体 (検出率; invE 62.8%、ipaH 63.9%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地111、CRT寒天培地111、DHL 112検体 (検出率; SS寒天培地61.7%、CRT寒天培地61.7%、DHL 62.2%) であった。陰性対照群において陽性反応を示したPCR法は、invEは2検体、ipaHは3検体にみられたが、分離培地ではみられなかった (表4)。また、低菌数接種群 (L)、高菌数接種群 (H) 及び陰性対照群を合計した成績では、540検体中PCRの invEは172検体、ipaHは183検体 (検出率; invE 31.9%、ipaH 33.9%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地165、CRT寒天培地164、DHL 161検体 (検出率; SS寒天培地30.6%、CRT寒天培地30.4%、DHL 29.8%) であった。

一方、試験法IIを用いたヤングコーン検体の検出率は、低菌数接種群 (L) では、180検体中PCRの invEは150検体、ipaHは155検体 (検出率; invE 83.3%、ipaH 86.1%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地154、CRT寒天培地155、DHL 154検体 (検出率; SS寒天培地85.6%、CRT寒天培地86.1%、DHL 85.6%) であった。高菌数接種群 (H) では180検体中PCRの invEは180検体、ipaHは180検体 (検出率; invE 100%、ipaH 100%) であった。分離平板培地では、SS寒天培地180、CRT寒天培地180、DHL 180検体 (検出率; SS寒天培地100%、CRT寒天培地100%、DHL 100%) であった。陰性対照群において陽性反応を示したPCR法は、invEは1検体、ipaHは3検体にみられたが、分離培地ではみられなかった (表4)。

低菌数接種群 (L)、高菌数接種群 (H) 及び陰性対照群を合計した成績では、540検体中PCRの invEは331検体、ipaHは338

検体（検出率；invE 61.7%、ipaH 62.6%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地334、CRT寒天培地335、DHL 334検体（検出率；SS寒天培地61.9%、CRT寒天培地62.0%、DHL 61.9%）であった。

試験法Ⅱを用いたカキとヤングコーン検体の検出率合計は、1,080検体中PCRのinvEは503検体、ipaHは521検体（検出率；invE 46.6%、ipaH 48.2%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地499、CRT寒天培地499、DHL 495検体（検出率；SS寒天培地46.2%、CRT寒天培地46.2%、DHL 45.8%）であった。

④試験法Ⅰ及びⅡの赤痢菌検出率

試験法Ⅰの検出率は、低菌数接種群（L）では、360検体中PCRのinvEは152検体、ipaHは159検体（検出率；invE 42.2%、ipaH 44.2%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地163、CRT寒天培地171、DHL 166検体（検出率；SS寒天培地45.3%、CRT寒天培地47.5%、DHL 46.1%）であった。高菌数接種群（H）では360検体中PCRのinvEは203検体、ipaHは215検体（検出率；invE 56.4%、ipaH 59.7%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地232、CRT寒天培地242、DHL 222検体（検出率；SS寒天培地64.4%、CRT寒天培地67.2%、DHL 61.7%）であった（表4）。また、低菌数接種群（L）、高菌数接種群（H）及び陰性対照群を合計した成績では、720検体中PCRのinvEは355検体、ipaHは374検体（検出率；invE 49.3%、ipaH 51.9%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地395、CRT寒天培地413、DHL 388検体（検出率；SS寒天培地54.9%、CRT寒天培地57.4%、DHL 53.9%）であった。

一方、試験法Ⅱの検出率は、低菌数接種群（L）では、360検体中PCRのinvEは2

07検体、ipaHは220検体（検出率；invE 57.5%、ipaH 61.1%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地208、CRT寒天培地208、DHL 203検体（検出率；SS寒天培地57.8%、CRT寒天培地57.8%、DHL 56.4%）であった。高菌数接種群（H）では360検体中PCRのinvEは293検体、ipaHは295検体（検出率；invE 81.3%、ipaH 81.9%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地291、CRT寒天培地291、DHL 292検体（検出率；SS寒天培地80.8%、CRT寒天培地80.8%、DHL 81.1%）であった（表4）。また、低菌数接種群（L）、高菌数接種群（H）及び陰性対照群を合計した成績では、720検体中PCRのinvEは500検体、ipaHは515検体（検出率；invE 69.4%、ipaH 71.5%）であった。分離平板培地では、SS寒天培地499、CRT寒天培地499、DHL 495検体（検出率；SS寒天培地69.3%、CRT寒天培地69.3%、DHL 68.8%）であった。

これらの成績から、試験法Ⅱの検出率は試験法Ⅰに比べ、PCR法及び分離培地共に高い結果が得られることが分かった。特に試験法Ⅰの低菌数接種群PCR法の検出率は、分離培地の成績との間に差が見られfalse negativeが見られたが、試験法Ⅱでは、false negativeはなく、両者の成績はよく一致していた。その理由としては、2段階増菌する試験法Ⅱでは、試験法Ⅰより赤痢菌数が増菌するためfalse negativeがなくなるためと考えられた。

⑤試験法Ⅰ及びⅡの赤痢菌検出率（統計学的分析の結果）

試験法Ⅰ及びⅡの赤痢菌検出成績を統計解析するために分散のF検定を行った。それぞれの検出項目（invE、ipaH、SS寒天、CRT寒天及びDHL寒天培地）で分散が大きく異なることから、正規分布での差の検定とWelch検定の両方法で検定を行った。その結果、Welchの検定では各検出項目の15/40

は5%の有意差で試験法Ⅰと試験法Ⅱの間に差がありと分析され、試験法Ⅱの検出率が優れていることが統計解析の結果からも証明された(資料3)。

⑥分離平板培地別の赤痢菌検出率

試験法Ⅰ及びⅡを合計した離平板培地別の赤痢菌検出率は、2,160検体中SS寒天培地894検体(41.4%)、CRT寒天培地912検体(42.2%)、DHL883検体(40.9%)であった。陰性対照720検体を除いた1,440検体中の分離平板培地別の赤痢菌検出率は、SS寒天培地894検体(62.1%)、CRT寒天培地912検体(63.3%)、DHL883検体(61.3%)で、CRT寒天培地の検出率が最も高かった。しかしながら、CRT寒天培地は、従来から一般的に使われてきたSSやDHL寒天培地と違い、開発後間もなく使用経験のないコラボ担当者が大部分であったにもかかわらず高い検出率が認められたことは、発色酵素基質の使用により、平板上の*Shigella sonnei*のコロニーはうす紫色に着色するため、他のコロニーとの区別が容易であったからだと推察された。

4) 依頼試験成績

依頼検体(冷凍生カキ17検体)中1検体から赤痢菌(*Shigella sonnei*)を分離することに成功した。冷凍カキから分離した赤痢菌と思われた菌株10株について生化学的性状、PCR試験及び血清学的試験を行った結果、すべての菌株は赤痢菌(*Shigella sonnei*)と同定された(表5)。

5) 赤痢菌検査法と解説書の作成

平成13年12月21日に冷凍カキから赤痢菌を日本で初めて分離することができたことから、厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課と協議の結果、一刻も早く食中毒防止対策及び予防体制の構築に役立てるために、赤痢菌の分離ができた検査方法とその解説書を作成する必要があるという結論に達したため、赤痢菌

検査法フロー図(図1、2、9、10)ならびに検査検体の採取法、試料の調製法、赤痢菌の増菌培養法、検出・分離培地、嫌気培養法、同定試験法、血清学的試験法及びPCR試験法などを取りまとめた赤痢菌の検査法解説書を作成した(資料1)。これをもとに食品保健部監視安全課は、平成14年1月9日付けで事務連絡「赤痢菌の試験法について」を都道府県等各自治体に通知した。

D. 結論

1) 全国21試験研究及び検査機関の協力の下で、食品から赤痢菌を分離する試験法設定のためのコラボレイティブスタディーを実施し、*Shigella sonnei*の検出においては、試験法Ⅰ(FDA法)に比べ試験法Ⅱ(FDA改良法;今回、輸入カキから赤痢菌を検出・分離した試験法)が優れていることを実証した。

2) 試験法Ⅱを用いてわが国で初めて食品(カキ)から赤痢菌(*Shigella sonnei*)を分離することに成功し、輸入禁止措置などの行政対応に貢献することができた。

3) コラボレイティブスタディーの結果を基に、「赤痢菌の検査法解説」を作成した。

4) 検体の種類別では、ヤングコーンが生カキより検出率が高かった。

5) 保存方法別では、冷凍より冷蔵保存検体で検出率が高かった。

6) 分離寒天培地は、CRT(CHROM agar 0157TAM)の検出率が最も高かった。

7) PCR法は、試験法Ⅱでは培地検出結果とよく一致したことから、迅速なスクリーニングテストとしても使用可能と考えられた。

E. 参考文献

- 1) Hartman, A. B., Venkatesa, M., Oaks, E. V., and Buysse, J. M. (1990) Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, ipaH, of *Shigella flexneri*. J. Bacteriol., 172, 1905-1915.
- 2) Watanabe, H., Arakawa, E., Ito, K., Kato, J., and Nakamura, A. (1990) Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-lac transposon and identification of a second positive regulator gene, invE, for cell invasion of *Shigella sonnei*: Significant homology of InvE with ParB of plasmid Pl. J. Bacteriol., 172, 619-629.
- 3) Anonymous (2001) Bacteriological Analytical Manual Online, January 2001, Chapter 6 *Shigella* (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-6.html).
- 4) 松下秀、有松真保、高橋正樹、横山敬子、小西典子、柳川義勢、山田澄夫、諸角聖(2000) 東京において最近5年間(1995~1999年)に分離された輸入および国内事例由来赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性, 感染症学雑誌, 74, 834-840.
- 5) 霜鳥翔一, 小島夫美子, 東島弘明, 天児和暢 (1990) 海産生鮮魚介類を対象とした赤痢菌検査法の検討, 感染症学雑誌, 64, 1337-1344.
- 6) Uyttendaele, M., Bagamboula, CF., De Smet, E., Van Wilder S., Debevere, J. (2001) Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Int. J. Food Microbiol., 70, 255-265.
- 7) 坂崎利一訳(1974) 医学細菌同定の手びき第2版, pp.143-145, 菜根出版, 東京.
- 8) Anonymous (1993) Interpretation of biochemical results. ISO 6579, 9.4.2.9 Table 1.

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、小沼博隆：輸入冷凍生カキより *Shigella sonnei* 赤痢菌の検出、防菌防黴誌、30, 299-302 (2002)

2. 学会発表 (発表予定を含む)

宮原美知子、小沼博隆：各種検出分離寒天平板培地における *Shigella sonnei* 集落の生育性状、日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002. 5. 16)

宮原美知子、小沼博隆：輸入冷凍生カキから赤痢ソネ菌の検出、日本防菌防黴学会第29回年次大会 (2002. 5. 30)

宮原美知子、松下秀、甲斐明美、柳川敬子、沖津忠行、内村眞佐子、田中廣行、中川弘、佐々木直、小林一寛、小川博美、村瀬稔、片山淳、安形則雄、斉藤紀行、山内昭則、尾崎延芳、八柳潤、村上光一、大友良光、山口仁孝、小笠原邦敏、宮城和文、仁科徳啓、寺嶋淳、田村和満、宮原誠、小沼博隆：赤痢菌検査法の設定に関する研究 1. コラボレーティブスタディ結果について、第23回日本食品微生物学会学術総会 (2002. 9. 23)、東京

宮原美知子、小沼博隆：赤痢菌検出における分離寒天平板培地の検討、日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11. 7)、大阪

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

表1 加工用生力キの微生物汚染状況

広島県海域採取,加工日'02. 3			岡山県		
No.	一般生菌数(g)	<i>E.coli</i> MPN(100g)	No.	一般生菌数(g)	<i>E.coli</i> MPN(100g)
1	4.2×10^2	<20	1	9.9×10^2	<20
2	1.2×10^3	<20	2	1.3×10^3	<20
3	1.3×10^3	<20	3	5.3×10^2	<20
4	1.2×10^3	<20	4	7.4×10^2	<20
5	3.9×10^2	* 20	5	1.2×10^3	<20
6	2.5×10^3	<20	6	7.5×10^2	<20
7	5.4×10^2	<20	7	1.5×10^3	<20
8	8.9×10^2	<20	8	1.0×10^3	<20
9	3.2×10^2	<20	9	1.3×10^3	<20
10	9.0×10^2	<20	10	7.2×10^2	<20
11	2.8×10^2	<20	11	7.4×10^2	<20
12	2.3×10^2	<20	12	9.0×10^2	<20
13	3.5×10^2	<20	13	7.0×10^2	<20
14	1.7×10^2	<20	14	1.0×10^3	<20
15	2.1×10^2	<20	15	9.5×10^2	<20

表2 ヤングコーンの細菌汚染状況

検体No.	輸入元	一般生菌数(g)	発育集落	(TSA確認集落数)*	<i>E.coli</i> MPN(100g)
1	萬国貿易㈱	<300	0/0	0	<20
2	"	<300	0/1	1	<20
3	"	<300	0/1	1	<20
4	"	<300	4/7	0/0	<20
5	"	<300	0/0	0	<20
6	京浜貿易㈱	<300	0/0	0	<20
7	"	<300	25/19	22/23,	<20
8	"	<300	6/3	4/6, 3/3	<20
9	"	3.8×10^2	41/35	25/25	<20
10	"	<300	3/6	2/5	<20
11	㈱ヤグチ	<300	1/0	1	<20
12	"	<300	0/0	0	<20
13	"	<300	5/1	3/0	<20
14	"	<300	9/7	5/5	<20
15	"	<300	1/6	0/4	<20