

クターの血清型および PFGE 型の経日変化を表 7 に示す。同じ患者の糞便でも 5°C 保存により分離される菌の血清型 PFGE 型が変化し、菌の生存性は *C coli* よりも *C jejuni* の方が、また、同じ *C jejuni* でも血清型 F 群よりも D 群の方が高い傾向にあった。

図 1 に 5°C 保存における生理食塩液中の *C jejuni* の生存性について示す。菌株 No T1-2 のように血清型 F 群で他の菌株よりも早く死滅してしまったり、No T3-8 のように血清型 D 群で他の菌株よりも長く生存したのもみられたが、残りの菌株については生存性に差はみられなかった。

図 2 に 5°C 保存における生理食塩液中の *C coli* の生存性について示す。血清型はいずれも UT で PFGE 型は P2 型と P3 型の 2 種類の菌株を供試したが、生存性に差はみられなかった。

次に表 8 に食品中のカンピロバクターの汚染菌数と分離菌株の血清型、PFGE 型および薬剤感受性試験の結果を示す。食品中のカンピロバクターの汚染菌数は MPN(増菌)法でささみ 115 cfu/100g、心臓 2300 cfu/100g、ねぎま 215 cfu/100g、レバー 1200 cfu/100g、皮 20 cfu/100g であった。一方、直接平板塗抹法ではいずれも MPN 値よりも 1 オーダー以上高くささみ 40 cfu/g、心臓 500 cfu/g、ねぎま 50 cfu/g、レバー 595 cfu/g、皮 15 cfu/g であった。食品からは、それぞれ *C jejuni* と *C coli* の 2 種類の菌が分離されたが、直接平板塗抹法と MPN (増菌) 法の 2 法で分離された菌株の血清型 PFGE 型が異なる場合がみられた。2 種類の培養

法で分離平板上に発育した 3 コロニーについてそれぞれ型別を行ったが、ねぎまから分離された *C coli*(血清型別 UT、PFGE3 型、菌株 No 55-1~3)や皮から分離された *C jejuni*(血清型 F 群、PFGE1 型、菌株 No 57-1~2)や *C coli*(血清型別 UT、PFGE3 型、菌株 No 57-3)のように直接培養法でしか分離できないタイプもあった。また、薬剤感受性試験では *C jejuni* は供試した 6 薬剤すべてに感受性であったのに対し、*C coli* は NA, NFLX, OFLX, CPF4 剤に対して耐性を示した。なお、同時に検査したシャカパリサラタ、つくねについては両法ともカンピロバクター陰性であった。

図 3 に本事例の原因食品と推定された鶏肉(ささみ)のさかのぼり調査の結果を示す。認定小規模食鳥処理業者が 3 月 7 日午後に他県の食鳥処理場(外はき方式の処理場で 1 日の処理羽数は約 1 万羽)で処理された丸と体 220 羽を購入し、むね肉、もも肉、ささみ等の各パーツに分け冷蔵保存した。この際まな板・包丁等の区別はせず同じ場所ですべての解体工程を行った。翌 3 月 8 日の昼に焼き鳥屋がこの卸売業者からささみと鶏皮を購入し、21 時ころに「ささみ刺身」等を客に提供した。表 9 に原材料の仕入れ状況を、表 10 に料理の調理工程を示す。原材料は調理されるまで低温で保存され、また料理は調理後にすみやかに客に提供された。

#### D 考察

カンピロバクター食中毒においては同一事例の患者から複数回の血清型菌が分離

されたことか報告されているか、本事例においても当初の検査で患者4人からすべて異なる型（血清型・PFGE型）の菌が分離された。そこで5°C保存しておいた患者便について再度検査を行ったところ、3名中2名の便からは1回目と異なる型の菌が分離された。このうち1名（患者3）においては5°C保存24日後の便から3タイプの菌が分離され、最終的にこのグループの患者からは血清型D群（PFGE4型）とF群（PFGE1型）の2タイプの*C. jejuni* およびPFGE2型と3型の2タイプの*C. coli*、計4タイプの菌が分離された。今回5°C保存の糞便1gを滅菌生理食塩液で10倍段階希釈し、最も希釈段階の高い分離平板上に発育したコロニーを釣菌して型別を行ったが、糞便中に複数の型の菌が混在している場合には段階希釈を行わない限り、それぞれの菌を分離するのは非常に困難であった。患者から分離されたカンピロバクターの型（血清型・PFGE型）の保存日数による変化から、*C. coli*よりも*C. jejuni*の方が、同じ*C. jejuni*でも血清型F群よりもD群の方が低温での生存性が高いことが推測されたことから（表7）、5°Cでの生理食塩液中の菌の消長についての試験を行った。*C. jejuni*については菌株No T1-2のように血清型F群で他の菌株よりも早く死滅してしまったり、またNo T3-8のように血清型D群で他の菌株よりも長く生存したのもみられたが、全体的に血清型による差はみられなかった（図1）。一方、*C. coli*についても*C. jejuni*に比べ低温での生存性に差はみられなかった。これらのことから、5°C保存便か

ら分離した菌株のタイプが変化したのは単に温度（低温）による影響だけでなく、糞便中の他の菌との競合等、別の要因も考慮しなければならぬことが示唆された。

糞便中のカンピロバクターの菌数は5°C保存5日後で3名とも $10^7$ (cfu/g)台あり、1名の便においては保存24日後でも $10^2$ (cfu/g)台あったことから、特に微好気状態で保存しなくても糞便中では菌は長期間生存することが明らかとなった。

食品中のカンピロバクターの汚染菌数についてはMPN法で心臓とレバーが $10^3$ (cfu/100g)台、ささみとねぎまが $10^2$ (cfu/100g)台であり、鶏レバー心臓のカンピロバクターの汚染菌数は鶏肉よりも高かった。これは、平成13年度に本研究で行った市販鶏レバーの汚染実態調査と同様の結果であった。また、平成12年度に本研究で行った調査結果から、市販鶏肉の汚染菌数は76.6%（98/128検体）が $10^2$ (cfu/100g)台以下であり、本事例の原因食品と考えられたささみの汚染菌数は115cfu/100gと同レベルであった。本検体（ささみ）は実際に患者が食べた残り（残品）ではなく、保健所の調査が行われた事件発生5日後の時点で施設に残されていた食品（参考品）ではあるが、食鳥処理場-鶏肉卸売業者-焼鳥屋と同一ルートで同様に処理されて搬入されたものであるカンピロバクターの汚染菌数は、MPN値の95%信頼限界は25cfu/100g（下限）から470cfu/100g（上限）と幅があり、一方、直接平板塗抹法では40cfu/gであった。事件当日「ささみ刺身」は4人で1皿（約80g）を食へ

ており、仮に直接平板塗抹法から得られた数値が実際の値に近いと仮定すると、1人当たり 800 cfu/body で発症したことが推測された。この値は、過去に行われたミルクでの人体投与実験における発症値 500 cfu/body に近いことかわかった。

食品からの菌分離は直接平板塗抹法と MPN（増菌）法を併用して行ったが、両法で分離菌株の型（血清型・PFGE 型）に違いがみられた。各培養法につき分離平板から 3 コロニーずつを釣菌し型別を行ったが、両法いずれかてしか分離できなかった型の菌もあり、特に *C. coli* については直接平板塗抹法の方が分離率が高い傾向にあった。増菌培養により *C. jejuni* にマスクされてしまうことも推測されたことから 2 菌種の増菌培養液（Preston 培地）での増殖性について検討する必要があることが示唆された。以上のことから食品検体の場合には直接平板塗抹法と MPN（増菌）法の併用により汚染菌数の測定と菌分離を行うことが望ましいことか考えられた。

カンピロバクター腸炎は喫食してから発症するまでの潜伏時間が長く、調査開始時すでに食品が保存されていないために、原因を特定できない場合が多い。さらに、凍結保存による損傷菌の問題もあることから、食品からの菌分離法については今後詳細に検討する必要があることが考えられた。

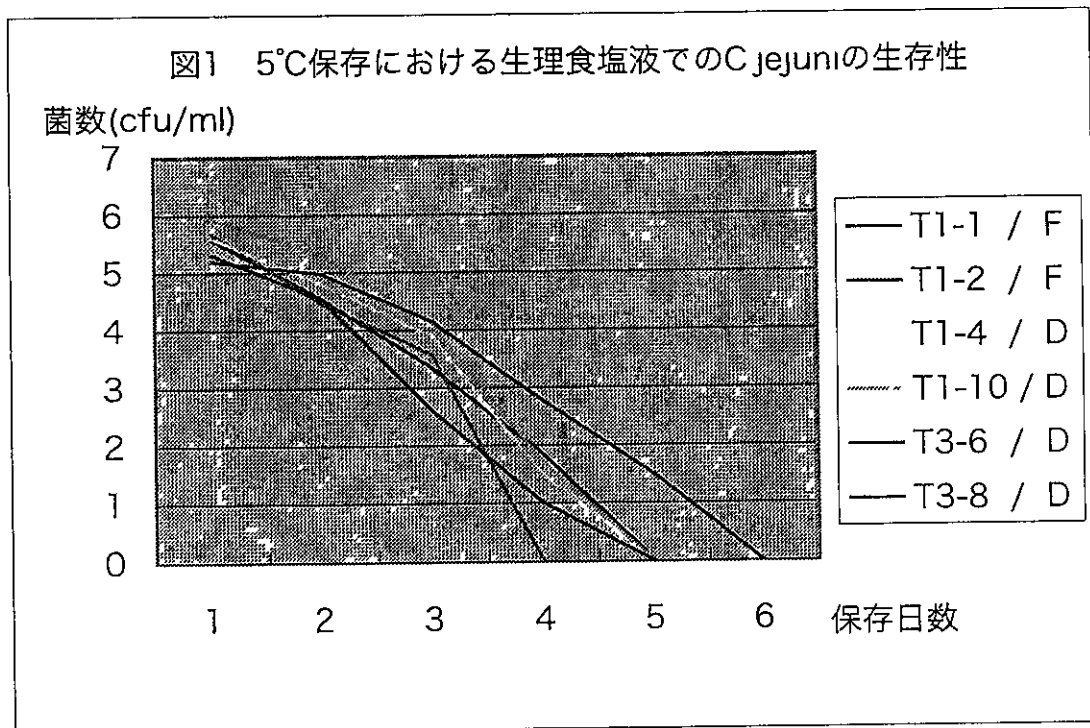
本事例では、認定小規模処理業者が購入した丸と体をむね肉 もも肉 ささみ等の各パーツに分けたが、この際まな板・包丁等の区別はせず、同じ場所ですべての解体行程を行っており、「ささ

み」が生て客に提供されるという認識はなかった。一方、焼鳥屋の店員は以前に食べた「ささみ刺身」がおいしかった事から、自分の店のメニューに加えてしまい、カンピロバクターに対する正しい知識を持ってはいなかった。

食中毒の発生要因の 1 つとして食品の取り扱い不備により食品中で菌が増殖することが挙げられ、この場合には特定のタイプの菌がメインとなるため患者と患者、あるいは患者と食品から分離される菌株のタイプが一致することか推測される。一方、カンピロバクターの特徴として、①30℃以上でないと発育できないことや、②発育には微好気状態が必要なこと、また、③乾燥条件にきわめて弱いことが挙げられ、通常の流通あるいは取り扱い時において食品中で菌が増殖することは難しいことから、食品に複数の菌が付着した場合にはいずれかのタイプがメインのポピュレーションとなるのではなく、汚染時の状態のまま消費者の手に渡ることか推測される。われわれが過去に行った調査では、市販鶏肉の約 4 割は同一検体から複数の血清型の菌が分離された。その一方で、カンピロバクターの場合には少量菌でも発症することか知られている。本事例のように原因食品が複数のタイプの菌に汚染されている場合にはそれを摂取したヒト（患者）の糞便からは同様に複数のタイプの菌が分離されることか推測されることから、事件究明のためには患者便についてはできるだけ多くの菌株を、場合によっては複数回分離 型別することか必要であることか考えられた。

血清型	0	7	14	21	28	35
T1-1 / F	390000	35000	2200	70	1	1
T1-2 / F	490000	29000	3700	1	1	1
T1-4 / D	410000	64000	7800	30	1	1
T1-10 / D	880000	210000	13000	50	1	1
T3-6 / D	210000	34000	400	10	1	1
T3-8 / D	160000	97000	14000	580	31	1

血清型	0日	7日	14日	21日	28日	35日
T1-1 / F	5 59106	4 54407	3 34242	1 8451	0	0
T1-2 / F	5 6902	4 4624	3 5682	0	0	0
T1-4 / D	5 61278	4 80618	3 89209	1 47712	0	0
T1-10 / D	5 94448	5 32222	4 11394	1 69897	0	0
T3-6 / D	5 32222	4 53148	2 60206	1	0	0
T3-8 / D	5 20412	4 98677	4 14613	2 76343	1 49136	0



厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

分担研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による Penner D 群及び O 群 *Campylobacter jejuni* の遺伝子型別に関する研究

ヒト、動物（鶏、牛）および環境（水）由来 *Campylobacter jejuni* をパルスフィールド・ゲル電気泳動法（*Sma*I 処理）で型別したところ、Penner D 群 61 株が 31 型に分けられ、一方、Penner O 群 52 株が 15 型に分けられた。

このうち Penner D 群の 3 つの型と O 群の 2 つの型についてはヒト由来株と鶏肉（レバー）由来株の遺伝子型が一致し、また、その他にもヒト-鶏肉間で DNA 切断パターンが類似した菌株がいくつかがみられたことから、カンピロバクター腸炎の原因食品として鶏肉（レバー）が重要であることが示唆された。

小野一晃	埼玉県衛生研究所
斎藤志保子	秋田県衛生科学研究所
川森文彦	静岡県環境衛生科学研究所
重茂克彦	岩手大学

## A 研究目的

平成 14 年度における本研究においてわが国において検出頻度の高い Penner B 群 *Campylobacter jejuni* についてパルスフィールド・ゲル電気泳動法により遺伝子型別を行ったところ、計 81 株が 55 型に分けられた。このうち 5 つの型についてはヒト由来株と鶏肉（レバー）由来株が同一の遺伝子型を示し、また、その他にもヒト-鶏肉間で DNA 切断パターンが類似した菌株がいくつみられたことから、カンピロバクター腸炎の原因食品として鶏肉（レバー）が重要であり、中でも Penner B 群の *Campylobacter jejuni* との関連が強いことが示唆された。そこで本研究では、Penner B 群に次いで検出頻度の高い Penner D 群とギランバレー症候群との関連が指摘されている Penner O 群の *Campylobacter jejuni* について同様にパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法により遺伝子型別を行い、さらに UPGMA(unweighted pair group method with averages)法により菌株間の相関関係を比較することによりヒト臨床由来株と動物由来株との関連性を調べた。

## B 検査方法

### 1) 供試菌株

秋田県衛生科学研究所、静岡県環境衛

生科学研究所、埼玉県衛生研究所の 3ヶ所て分離したヒト臨床（集団発生 2 事例由来 8 株、散発事例由来 21 株）由来 29 株、鶏（鶏肉）由来 28 株、牛（レバー由来 1 株、胆汁由来 3 株）由来 4 株、計 61 株の血清型 Penner D 群 *Campylobacter jejuni* およびヒト臨床（集団発生 4 事例由来 13 株、散発事例由来 26 株）由来 39 株、鶏（鶏肉由来 8 株、鶏レバー由来 4 株）由来 12 株、水由来 1 株、計 52 株の血清型 Penner O 群 *Campylobacter jejuni* を用いた。

### 2) パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法による *Campylobacter jejuni* の型別

*C. jejuni* 計 113 株について PFGE 法による DNA 切断パターンを基に遺伝子型別を行った。凍結状態 (-80℃) で保存してある *C. jejuni* をミュラーヒントン培地で微好気状態 (O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 85%) で培養後、菌体を滅菌蒸留水 200 μl に懸濁し、等量の 2% [W/V] 低融点アガロースと混ぜ、アガロースブロックを作成した。アガロースブロックはリソチーム溶液 (0.5M-EDTA [pH8.0], Lysozyme [1mg/ml]) に浮遊させ、37℃で 4 時間恒温水槽で静かに振盪した。その後アガロースブロックをプロテナーゼ K 溶液 (0.5mM-EDTA [pH8.0], Proteinase K [1mg/ml], 0.5% [W/V] N-lauroyl-sarcosine) に入れ、恒温水槽で 50℃に保温しながら一晩静かに振盪した。このアガロースブロックを洗浄液 (10mM Tris-HCl [pH7.2], 1mM-EDTA [pH8.0], 4mM Pefabloc SC) に入れ 50℃で 30 分恒温水槽で振盪

し (2 回繰り返す)、TE Buffer で洗浄後、制限酵素で一晩処理した。PFGE は CHEF-DR II (BIORAD) を用いて 1% [W/V] NA アガロースゲルにより、6V/cm パルスタイム 4 秒から 50 秒、14℃、22 時間の条件でおこなった。電気泳動後、Et-Br で染色し、紫外線照射下で写真撮影した。なお、制限酵素については Sma I を用いた。

### 3) 各菌株間における相関関係の比較

各菌株の PFGE 法により得られた DNA 切断パターン (Sma I 処理) をコンピュータで解析した後、UPGMA 法により樹形図を作成し、ヒト・動物・環境由来菌株間の相関関係を比較した。

## C 研究結果

### 1) Penner D 群 *Campylobacter jejuni* の型別結果

供試したヒト由来 *C. jejuni* 29 株の PFGE 型を表 1 に示す。集団発生例においては、集団例 (1) の 3 株は PD-19 型に、集団例 (2) の 5 株は PD-29 型に型別され、同一事例由来株はそれぞれ同じ遺伝子型を示した。一方、散发例ではほとんどの菌株が異なる遺伝子型に型別されたが、秋田県および静岡県において分離された PD31 型 (菌株 No AKD11、21、SHD23、25、26 の 5 株) や、静岡県において分離された PD-28 型 (菌株 No SHD24、27) の 2 株は分離された地域・時期が異なるにもかかわらず同一の遺伝子型を示した。

また、鶏肉および牛 (レバー、胆汁) 由来 32 株の PFGE 型を表 2 に示す。埼玉県において分離された PD-3 型、秋

田県において分離された PD-31 型、静岡県において分離された PD-25 型のように同一地域で分離年月日が比較的近い菌株どうしが同一の遺伝子型に型別されたものや、PD-16 型のように分離された地域・時期が異なるにもかかわらず同一の遺伝子型を示すものもみられた。

一方、ヒト由来株と鶏肉由来株で同一の遺伝子型を示したものもみられた。PD-7 型は静岡県において分離されたヒト由来 (菌株 No SHD7、8) と鶏肉由来株 (菌株 No SHD16、18)、PD-25 型は静岡県において分離されたヒト由来株 (菌株 No SHD9) と鶏肉由来株 (菌株 No SHD10、12、13、14、15、17)、PD-31 型は秋田県において分離されたヒト (菌株 No AKD11、21) および鶏肉由来株 (菌株 No AKD5、7、13、15、16) と静岡県において分離されたヒト由来株 (菌株 No SHD9、25、26) が同一の遺伝子型を示した。

図 1 に Penner D 群 *Campylobacter jejuni* の UPGMA 法による樹形図を示す。供試した 61 株が 31 型に型別された。PD-3 型と PD-4 型、PD-16 型と PD-17 型、PD-28 型と PD-29 型、PD-30 型と PD-31 型のように、DNA 切断パターンが完全に一致しないまでも菌株間で高い相似性を示すもの (0.92) がみられた。

### 2) Penner O 群 *Campylobacter jejuni* の型別結果

供試したヒト由来 *C. jejuni* 39 株の PFGE 型を表 3 に示す。集団発生例においては、埼玉県の 3 事例は発生時期

が異なるにもかかわらず、すべて PO-2 型で一致した。散発例においても秋田県において分離された PO-14 型や PO15 型、静岡県において分離された PO-6 型や PO-8 型のように分離された時期が異なるにもかかわらず同一の遺伝子型に型別されたものもみられた。

また、鶏肉（レバー）および水由来 13 株の PFGE 型を表 4 に示す。秋田県において分離された水由来株（菌株 No AKO20）は集団例（4）（菌株 No AKO18、19）や散発例でヒトから分離された菌株（菌株 No AKO11、13、14）と同一の遺伝子型を示した。その他、PO-6 型では静岡県で分離されたヒト由来株（菌株 No SHO1、2、3、4、10、12、17、19、21）と鶏レバー由来株（菌株 No SHO14、16、18）、PO-10 型では秋田県で分離されたヒト由来株（菌株 No AKO10、12）と静岡県で分離された鶏レバー由来株（菌株 No SHO15）が同一の遺伝子型を示した。

図 2 に Penner O 群 *Campylobacter jejuni* の UPGMA 法による樹形図を示す。供試した 52 株が 15 タイプに型別された。

秋田県においてヒトから分離された PO-14 型と PO-15 型のように DNA 切断パターンが完全に一致しないまでも高い相似性（0.92）を示すものがみられた。

#### D 考察

ヒト由来株については、集団発生例では患者由来株がそれぞれ同一の型を示し

た。このうち Penner O 群については埼玉県内で発生した集団例（1）、（2）、

（3）は発生時期が異なるにもかかわらず同一遺伝子型を示した。また、散発例においても Penner D 群では 21 株が 15 タイプと供試した菌株の多くが異なる型に型別されたのに対し、Penner O 群では 26 株が 10 タイプと少なかった。

Penner O 群の菌株については、特にギランバレー症候群患者由来株では高いクローナリティーを示すことが報告されているが、本研究においても同様な傾向が示された。今後供試する菌株数をさらに増やし詳細に検討する必要があることが考えられる。なお、秋田県における集団例（4）では患者から分離された菌株と飲み水として使用した水から分離された菌株の DNA 切断パターンが一致し（PO-14 型）、原因が明らかとなった事例であった。

一方、Penner D 群の菌株については、株間で DNA 多型がみとめられ、われわれが平成 14 年度の本研究で行った Penner B 群の結果と同様であった。このように血清型により DNA の多型性に差がみられたことは興味深い。

カンピロバクター腸炎は潜伏時間が比較的長く、調査開始時すでに原因食品が保存されていないために、原因を特定できない場合が多い。今回 PFGE 法により PennerD 群および O 群の菌株について遺伝子型別を行いヒト-動物間の相関関係を比較したところ、ヒト-鶏肉間（PD-7 型、PD-25 型、PD-31 型）およびヒト-鶏レバー間（PO-6 型、PO-10 型）で同一の遺伝子型を示すものがあること



が判明し、カンピロバクター腸炎の原因食品として鶏肉（レバー）の関与が強く示唆された。これは平成 14 年度に行った Penner B 群の場合と同様の結果であった。

本調査においても、分離年月日・場所が異なっても同一の遺伝子型を示したものの (PD-31 型 PO-10 型) がみられた。PD-31 型については静岡県内での散発例（菌株 No. SH23、25、26）や秋田県内での散発例（菌株 No. AKD11、21）、鶏肉由来株（菌株 No. AKD5、7、13、15、16）といった複数事例のヒト由来株と鶏肉由来株の遺伝子型が一致したことが判明した。この型のように、ヒト腸炎との関連性の強いタイプを明らかにし、これらの菌による食品汚染を防ぐための対策を取ることが必要であると考えられる。

牛由来株についてはレバー由来株（菌株 No. SHD22）と胆汁由来株（菌株 No. SHD2）が同一の遺伝子型を示したか、供試した菌株数が 4 株と少なかったことから、今後菌株数を増やしヒト-牛間の相関についても鶏同様に調査する必要があることが考えられた。

今回、Penner D 群、O 群の菌株を対象として PFGE 法により遺伝子型別を行ったが、こちらの血清型においてもヒト-動物由来菌株間で共通の遺伝子型がみられたことから、他の血清群についても同様に調査することにより、カンピロバクター腸炎の原因（食品）由来を明らかにし、その制御方法について検討する必要があることが考えられる。

表2 鶏および牛由来Penner D群 *Campylobacter jejuni* のPFGE法による型別結果

菌株No	由来	分離年月日	分離場所	PFGE型
SAD2	鶏肉	1998 3 10	埼玉	PD-18
SAD16	"	1998 3 17	"	PD- 2
SAD72	"	1998 4 8	"	PD- 3
SAD73	"	1998 4 8	"	PD- 3
SAD82	"	1998 4 13	"	PD- 3
SAD83	"	1998 4 13	"	PD- 3
SAD84	"	1998 4 13	"	PD- 3
SAD116	"	2000 7 31	"	PD- 6
SAD119	"	2000 7 31	"	PD- 4
SAD121	"	2000 7 31	"	PD- 5
AKD4	鶏肉	2000 11 12	秋田	PD-13
AKD5	"	2000 11 12	"	PD-31
AKD7	"	2000 11 12	"	PD-31
AKD13	"	2001 12 17	"	PD-31
AKD15	"	2001 12 17	"	PD-31
AKD16	"	2001 12 17	"	PD-31
AKD17	"	2002 1 7	"	PD-27
AKD19	"	2002 11 19	"	PD-11
SHD10	鶏肉	2002 1 8	静岡	PD-25
SHD11	"	2002 1 8	"	PD-20
SHD12	"	2002 1 8	"	PD-25
SHD13	"	2002 1 8	"	PD-25
SHD14	"	2002 1 8	"	PD-25
SHD15	"	2002 1 8	"	PD-25
SHD16	"	2002 1 8	"	PD- 7
SHD17	"	2002 1 8	"	PD-25
SHD18	"	2002 1 8	"	PD- 7
SHD19	"	2002 1 8	"	PD- 9
SHD1	牛胆汁	2002 11 26	鳥取	PD-17
SHD2	"	2002 5 14	"	PD-16
SHD3	"	2002 8 6	"	PD-23
SHD22	牛レバー	2002 11 7	神奈川	PD-16

## II. 分担研究報告書

II-2

**脱脂粉乳製造における食中毒菌（黄色ブドウ球菌等）およびブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌嘔吐毒の危害評価とその製造管理法の確立**

II-2-1 脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

II-2-2 脱脂乳および濃縮脱脂乳中での黄色ブドウ球菌の増殖特性およびエンテロトキシン産生

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

平成 15 年度厚生科学研究費補助金 食品 化学物質安全総合研究事業  
食品製造の高度衛生管理に関する研究

脱脂粉乳製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 高谷 幸 社団法人日本乳業協会理事

未殺菌乳（生乳、脱脂乳）中で黄色ブドウ球菌と共存し、10～40℃で増殖してくる菌を確認したところ、グラム陰性桿菌が優勢であった。ただし 10℃で培養すると *Pseudomonas* 属菌か、40℃では大腸菌が優勢であり、その間の温度では *Pseudomonas* 属菌と腸内細菌科の菌が混在していた。

黄色ブドウ球菌とこれらグラム陰性菌を同時に牛乳に接種して培養したところ、20℃培養では黄色ブドウ球菌の増殖が著しく抑制された。一方 30℃培養では、大腸菌と培養した場合には 20℃と同様抑制されたが、*Pseudomonas* 属菌と培養した場合には抑制されなかった。

また未殺菌乳中のエンテロトキシン検査法として VIDAS SET2 の適応性について検討したか、既存のものと同様、エンテロトキシン陰性にもかかわらず陽性を示す場合があり、そのまま適用するのは困難であった。

協力研究者

辻本義憲 明治乳業株式会社  
上門英明 明治乳業株式会社  
森田秀樹 明治乳業株式会社  
馬場良雄 明治乳業株式会社

られた。これは未殺菌乳中では他の共存菌も同時に増殖するために、黄色ブドウ球菌の増殖が抑制されるためと推定された。

そこで今年度は、前年度の検討の際に分離しておいた共存菌がどのような菌であるかを確認し、黄色ブドウ球菌の増殖への影響を検証した。

また未殺菌乳については、厚生労働省通知の方法（食監発第 0214002 平成 14 年 2 月 14 日）ではエンテロトキシンの検査ができないことを報告したが（平成 12 年度報告書）、検査キットメーカーより既存品より感度が高いキットが発売されたので、簡単ではあるが生乳に対する評価を行ったので報告する。

A 研究目的

平成 12, 13 年度には、未殺菌乳（生乳、脱脂乳）中における黄色ブドウ球菌の増殖とエンテロトキシン産生性を検討してきた。その検討の中で、黄色ブドウ球菌の生育至適温度付近では大きな差は認められないものの、10～20℃付近の低温下では未殺菌乳中より 130℃、2 秒 UHT 殺菌牛乳中における黄色ブドウ球菌の増殖が良いことか認め

## B 研究方法

### 1 共存菌の同定試験

#### 1-1 試験平板

平成 14 年度に「未殺菌乳中における黄色フトウ球菌の増殖性」を検討した際に、生菌数を測定した標準寒天培地平板（冷蔵保存）を用いた。ただし同定試験には、10℃ 168 時間、20℃ 72 時間、30℃ 24 時間、40℃ 12（脱脂乳）または 18 時間（生乳）保存後に菌数計測した平板を供試した。なお 48℃ は黄色フトウ球菌が増菌しなかったのを除外した。

#### 1-2 菌の分離と性状試験

試験平板上のコロニーの形態観察後、任意の菌株を標準寒天培地（栄研）に分離した。分離した菌株を以下の性状試験で分類 同定した。

- ① グラム染色としてフェイハー G（日水製薬）を用い、そのプロトコールに従って染色を行い、顕微鏡観察した。
- ② オキシダーゼ試験として Bactident Oxidase（Merck）を用い、そのプロトコールに従って試験した。
- ③ 同定キットである API 20 E または API 20 NE（ヒオメリュー社）を用い、分離菌株を同定した。

### 2 共存菌存在下での黄色フトウ球菌の増殖性

1 で分離同定した菌株の中の代表株と、黄色フトウ球菌が共存する状態及び黄色フトウ球菌単独の状態における牛乳中での増殖性を確認した。

#### 2-1 試料

市販牛乳（130℃、2 秒殺菌）を用いた。

#### 2-2 供試菌株

黄色フトウ球菌は、生乳より分離した 1128-4 株（エンテロトキシン A 産生）を用いた。その他の菌株は、1 で生乳より分離し、*Pseudomonas fluorescens*（20-3 株）及び *Escherichia coli*（40-1 株）と同定された 2 株を用いた。

#### 2-3 消長試験方法

供試菌株を BHI ブイヨン（日水製薬）に 1 白金耳量接種し、30℃（*P fluorescens*）あるいは 35℃（その他）で一晩培養した。その後もう 1 回同様に培養して接種菌液とした。*P fluorescens* あるいは *E coli* の培養液を、菌数が  $10^3 \sim 10^4$  cfu/ml オーダーとなるよう牛乳に接種した（一連の実験で用いた生乳の生菌数に合わせた）。さらに黄色フトウ球菌を  $10^2$  cfu/ml オーダーとなるよう接種した。対照として牛乳に黄色フトウ球菌のみを  $10^2$  cfu/ml オーダーとなるよう接種した。これらを滅菌した坂口フラスコ（500ml）に 150ml ずつ分注し、20 及び 30℃ で振とう培養した（120 ストローク/分）。経時的に培養液を分取し、生菌数、黄色フトウ球菌数を測定した。生菌数は標準寒天培地を用い、スパイラルプレーティング法、30℃ 48 時間培養で計測した。黄色フトウ球菌数は卵黄加マンニト食塩培

地（栄研）を用い、塗抹法で 35°C48 時間培養後、卵黄反応を示した定型コロニーを黄色ブドウ球菌コロニーとして計測した。

### 3 生乳を用いたエンテロトキシン検査キットの評価

従来、エンテロトキシン検査には、ヒオメリュー社の mini VIDAS 及び VIDAS Staph Enterotoxin (SET) を用いてきた。2003 年よりヒオメリュー社は VIDAS Staph Enterotoxin を改良した VIDAS Staph Enterotoxin2 (SET2) を販売開始した。新しいキットは従来のものより高感度であり、生乳中のエンテロトキシンを直接測定可能であるとの情報があったので、生乳を用いて簡単な評価を行った。

#### 3-1 生乳

当社工場で受乳した生乳 3 ロットを用いた。近隣工場からは受乳時にローリーよりサンプリングし、当日あるいは冷蔵保存して 2 日以内に実験に供した。遠方の工場からは冷蔵の宅配便で取り寄せ、到着当日に実験に供した。

#### 3-2 エンテロトキシン標準品

Toxin Technology 社の Staphylococcal enterotoxin A (SEA) を用いた。

#### 3-3 方法

SEA 標準品を生乳に添加し、SEA 濃度が 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.4 ng/ml の生乳を調製した。これらを試料とし、以下 VIDAS SET2 のプロトコールに従い mini VIDAS を用いて測定した。なお陰性対照として SEA 無添加の生乳を同時に測定した。

## C 研究結果

### 1 共存菌の同定試験

実験温度毎の生菌数測定平板より、3~4 菌株を分離し、合計 29 菌株を同定した。分離されたのは全てグラム陰性桿菌であったが、10°C 実験区では分離株全てが *Pseudomonas* 属と同定され、実験温度が上昇するに従い腸内細菌科の菌の割合が増加し、40°C 実験区では分離した菌株全てが *Escherichia coli* であった（表-1）。

### 2 共存菌存在下での黄色ブドウ球菌の増殖性

牛乳に黄色ブドウ球菌を単独で接種すると (10<sup>2</sup>cfu/ml)、20°C 培養では 24 時間後には 10<sup>3</sup>cfu/ml、48 時間後には 10<sup>5</sup>cfu/ml まで増殖した。一方 *P. fluorescens* や *E. coli* と共存させた場合は、24 時間後の黄色ブドウ球菌数は単独の場合とほぼ同等の 10<sup>3</sup>cfu/ml であったが、48 時間後でも 10<sup>3</sup>cfu/ml でありほとんど増殖しなかった（図-1）。その時の生菌数は 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>cfu/ml に達していた（図-2）。

同様の実験を 30°C で行くと、8 時間培養の時点では黄色ブドウ球菌の単独接種及び共存菌が存在しても、黄色ブドウ球菌数は 10<sup>4</sup>cfu/ml に達したか、単独接種の場合はその後 18 時間目には 10<sup>7</sup>cfu/ml に達した。一方共存菌存在下では、接種菌の違いで黄色ブドウ球菌数に差が認められ、*P. fluorescens* が共存した場合、黄色ブドウ球菌数は単独の場合と同様 18 時間目には 10<sup>7</sup>cfu/ml に達したか、*E. coli* が共存し

た場合、 $10^4$ cfu/ml のまま菌数が維持された (図-3)。その時の生菌数は  $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml に達しており、*P. fluorescens* の到達菌数が低いわけではなかった (図-4)。

### 3 生乳を用いたエンテロトキシン検査キットの評価

今回用いた SET2 においても、従来用いていた SET と同様 TVI 6 以上が陽性と判定される。今回の検討では 3 検体の生乳を用いたが、そのうち 2 検体では SEA を添加していないにもかかわらず、陽性と判定された (表-2)。また同じ濃度に SEA を添加しているにもかかわらず、生乳の検体毎に測定値が若干変動すること、さらには SEA が 0~0.2ng/ml の範囲では良好な直線関係が認められたが (図-6)、0.4ng/ml の測定結果を含めてグラフを作成すると、相関係数が低下した (図-5)。

## D 考察及び結論

### 1 共存菌の同定試験

10℃実験区で優勢となったのは *Pseudomonas* 属菌であり、20、30℃と実験温度か上がるに従い大腸菌を中心とした腸内細菌科の比率が上がり、特に 40℃実験区では大腸菌のみ分離された。この理由は、低温細菌として知られている *Pseudomonas* 属の低温下での増殖速度が他の菌の増殖速度よりも速いため低温下では優勢となるものの、温度が上昇するに従い他菌種との差が見られなくなるため他の菌も分離されるようになったと考えられた<sup>1)</sup>。さらに環境由来の *Pseudomonas* 属の生育上限温度は 35℃付近であるため、40℃では全く検出さ

れず、40℃で増殖可能な大腸菌が優勢となったと考えられた。

### 2 共存菌存在下での黄色フトウ球菌の増殖性

牛乳に黄色フトウ球菌を接種して 20 及び 30℃で培養すると、比較的速やかに増殖した。一方黄色フトウ球菌と *P. fluorescens* や *E. coli* を共存させて 20℃培養すると、黄色フトウ球菌の増殖が著しく抑制された。これは 20℃における黄色フトウ球菌の増殖速度と比較し、共存しているグラム陰性桿菌の増殖速度が速いため速やかに増殖し、黄色フトウ球菌の増殖を抑制すると考えられた。同様の実験を 30℃で行うと、*E. coli* を共存させた場合には同様の傾向が認められたか、黄色フトウ球菌数の到達菌数は 20℃の時 ( $10^3$ cfu/ml) より 1桁高かった。しかし *P. fluorescens* を共存させると、黄色フトウ球菌の挙動は、単独接種の場合と同様であった。この時の生菌数の最終到達菌数は *E. coli* 接種区と同様 ( $10^9$ cfu/ml) であったか、その立ち上がりか遅かった。そのため黄色フトウ球菌の増殖が抑制されなかったものと推定された。

また今回の実験ではエンテロトキシンの産生については確認していないが、以前の検討から  $10^6$ cfu/ml 程度まで増殖した場合に産生されると推定される。このことから未殺菌乳の場合、20℃以下の低温で保持すれば、グラム陰性菌等が優先的に増殖する事はあるものの、黄色フトウ球菌数は容易には  $10^6$ cfu/ml には達せず、フトウ球菌エンテロトキシンによるリスクは極めて小さ

いと考えられた。

### 3 生乳を用いたエンテロトキシン検査キットの評価

改良された VIDAS SET2 を用いて生乳中の SEA 検出を試みたが、SEA 無添加の生乳でも陽性を示す場合があることが確認された。これは従来用いていた SET と同様、生乳中のアルカリフォスファターゼによるものと推定されるが、個々の生乳によってその活性が異なっているため、陽性的場合と陰性的場合が認められたと考えられる。よって生乳を SET2 で直接測定する場合は、従来品と同様加熱処理等でアルカリフォスファターゼを不活化させる必要がある。また供試した生乳の検体数が少ないため、さらにデータを蓄積する必要はあるが、同一濃度試料で測定値の変動が認められた。よって検量線を作成して定量するには、変動の原因（バックグラウンドの影響？）を取り除き、安定した結果が得られるよう、前処理法等の検討が必要と考えられた。また本法は免疫測定法であるため、一定の抗体量に結合する毒素量には限界がある。そのため高濃度の試料を測定する場合は、0.2ng/ml 程度まで希釈する必要があった。

### 4 結論

未殺菌乳中における黄色ブドウ球菌の増殖性を検討した際に、同時に増殖してくる菌はグラム陰性菌が優勢であった。特に培養温度が 20℃以下の場合には、*Pseudomonas* 属か、40℃では大腸菌が優勢で、その間の温度帯では *Pseudomonas* 属と腸内細菌科の菌が混在していた。

これらグラム陰性菌を黄色ブドウ球菌と

共に牛乳に接種 培養すると、20℃培養ではグラム陰性菌の増殖かはやく、黄色ブドウ球菌の増殖が著しく抑制された。一方 30℃培養では、*E. coli* と共存した場合は 20℃培養と同様、黄色ブドウ球菌の増殖は抑制されたが、*Pseudomonas* 属の菌株と共存した場合は抑制されなかった。この原因は、各供試菌株の各温度における増殖速度の差によるものと推定された。

以上より、脱脂粉乳製造工程において、ブドウ球菌エンテロトキシンによる危害を防止するには、未殺菌乳の温度管理が最も重要であり、少なくとも 20℃以下に保持することか重要である。通常乳処理工場て生乳を貯乳する場合、サイロタンクの温度は 10℃以下に管理されており、黄色ブドウ球菌の増殖によるリスクは極めて小さいと言える。

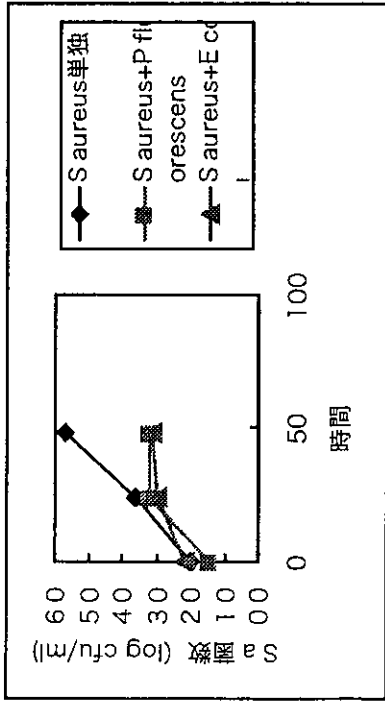
また脱脂粉乳製造中に何らかの異常が発生し、未殺菌乳を回収する場合でも、速やかに 20℃以下に冷却すれば、少なくとも黄色ブドウ球菌によるエンテロトキシン産生は防止できると考えられた。

以上

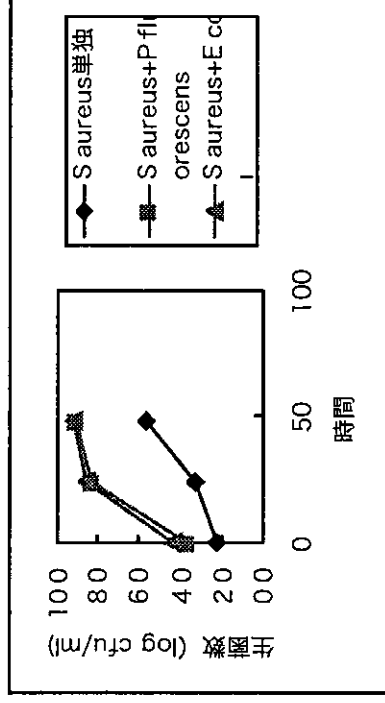
### 文献

- 1) 小川益男 食品への予備微生物学への適用, 矢野信礼他編, p 141, サイエンスフォーラム(1997)

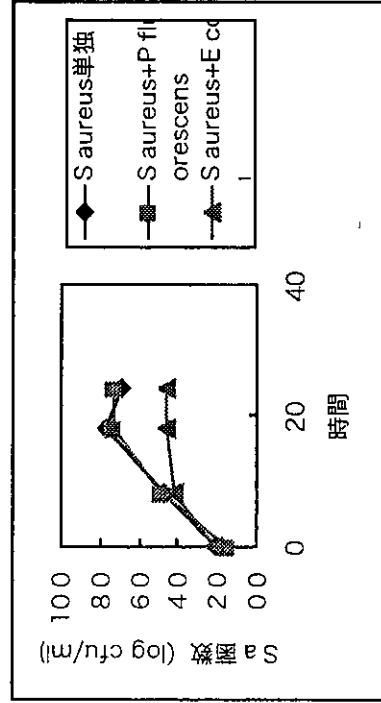




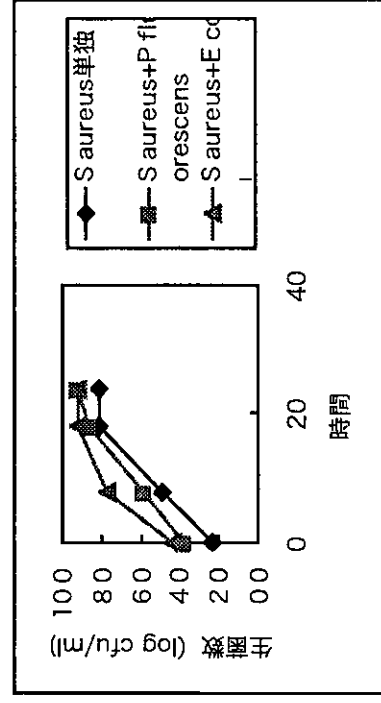
図一 黄色ブドウ球菌の増殖と共存菌との関係 (20°C培養, 黄色ブドウ球菌数)  
S a , S aureus



図一2 黄色ブドウ球菌の増殖と共存菌との関係 (20°C培養, 生菌数)



図一3 黄色ブドウ球菌の増殖と共存菌との関係 (30°C培養, 黄色ブドウ球菌数)  
S a , S aureus



図一4 黄色ブドウ球菌の増殖と共存菌との関係 (30°C培養, 生菌数)

表-1 生乳及び脱脂乳における黄色ブドウ球菌の増殖性を検討した際に分離した菌株の性状試験結果

実験温度	品種	培養時間 (h)	グラム染色及び形態	オキシダーゼ	同定試験結果 (API20Eまたは2ONE)
10℃	生乳	168	-S/R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	脱脂乳	168	-R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-S/R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-S/R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
20℃	生乳	72	-R	-	<i>Escherichia coli</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			-S/R	-	同定不能
	脱脂乳	72	-S/R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
			-S/R	+	<i>Pseudomonas putida</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas</i> sp
	30℃	生乳	24	-S/R	-
-R				+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-S/R				+	同定不能
-R				-	<i>Escherichia coli</i>
脱脂乳		24	-S/R	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			-R	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
			-S/R	-	<i>Escherichia coli</i>
40℃	生乳	18	-S/R	-	<i>Escherichia coli</i>
			-R	-	<i>Escherichia coli</i>
	脱脂乳	12	-S/R	-	<i>Escherichia coli</i>
			-R	-	<i>Escherichia coli</i>
			-S/R	-	<i>Escherichia coli</i>
			-S/R	-	<i>Escherichia coli</i>

-S/R, クラム陰性球桿菌、-R, クラム陰性桿菌  
オキシダーゼ試験, + 陽性、- 陰性

表-2 SET2によるSEA添加生乳測定結果

SEA濃度 (ng/ml)	K Z 生乳		K T 生乳		K ナ 生乳	
	RFV	TV	RFV	TV	RFV	TV
0	485	0.11	716	0.17	784	0.18
0	518	0.12			873	0.20
0.025	1290	0.31	1178	0.28	1459	0.35
0.025	1239	0.29			1316	0.31
0.05	1844	0.44	1563	0.37	1772	0.42
0.05	1770	0.42			1698	0.40
0.1	2816	0.67	2511	0.60	2856	0.68
0.1	2746	0.65			2518	0.60
0.2	4799	1.15	3899	0.93	4305	1.03
0.2	4649	1.11			4427	1.06
0.4	7102	1.70	6138	1.47	6492	1.55
0.4	7058	1.69			6377	1.53

記号は生乳を取り寄せた工場記号

K Tは1回測定て実施

斜字はVIDASで陽性と判定されたもの

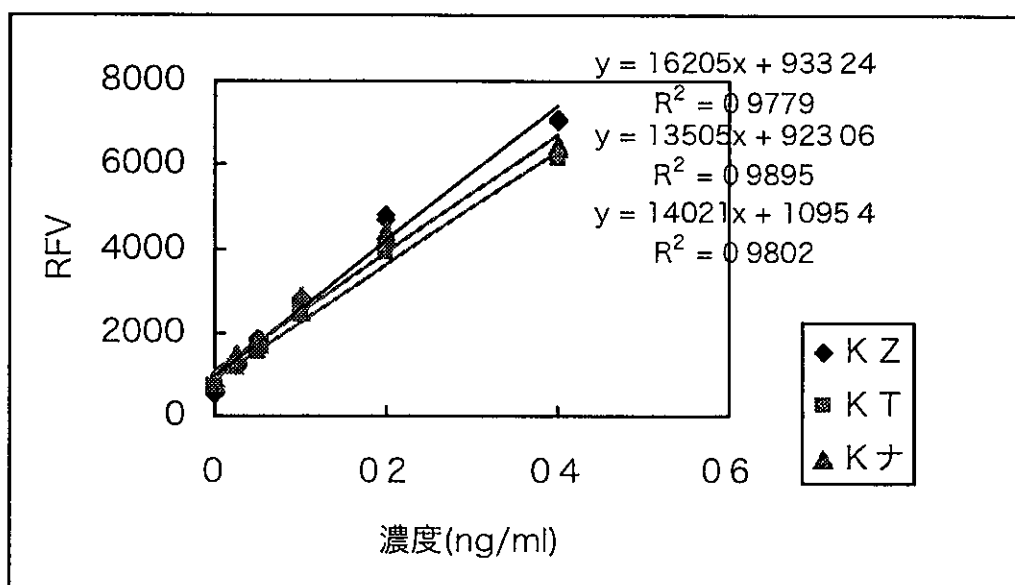


図-5 SEA添加濃度とRFV値の相関直線 (0.4ng/mlまでデータを採用)

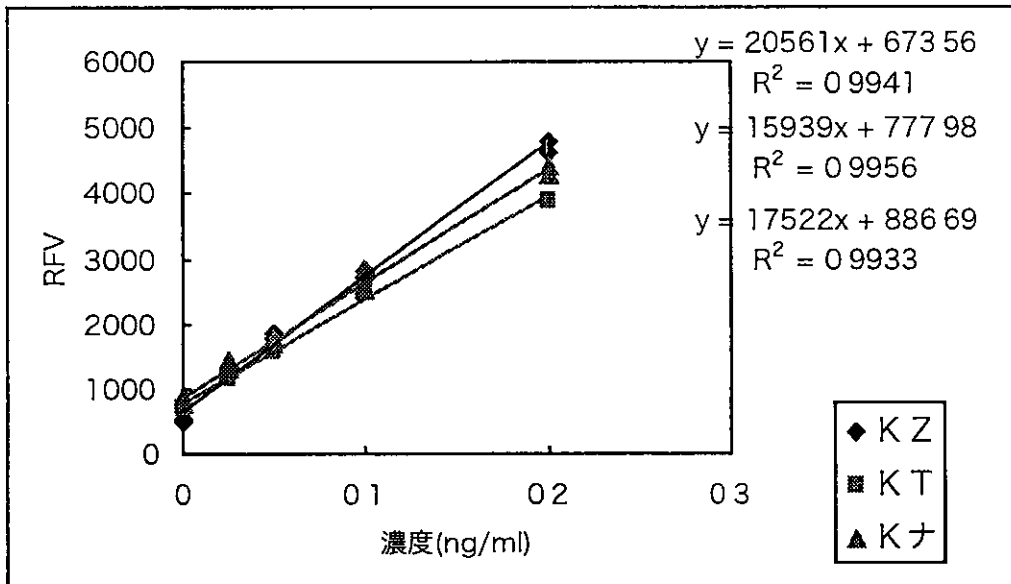


図-6 SEA添加濃度とRFV値の相関直線 (0.2ng/mlまでデータを採用)