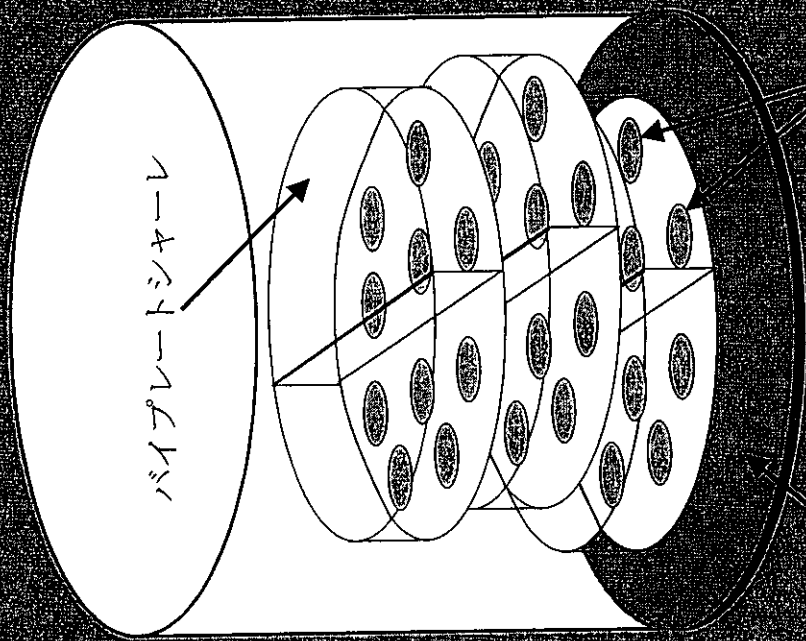


- 性に及ぼす相対湿度の影響、厚生労働科学研究生活安全総合研究事業、食品製造の高度衛生管理に関する研究、平成14年度分担研究報告書(2003)
- 15) MaDate J J and Hall L B
Survival of *Staphylococcus aureus* in the environment *Am J Hyg* 78, 330-337 (1963)
- 16) Rockland, L B , Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5 and 40°C *Anal Chem* 32, 1375-1376 (1960)
- 17) 浅野悠輔、石原良三編著 , 卵—その化学と加工技術—、p 71-77、光琳、東京 (1985)
- 18) Masschalck B et al , Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure *Appl Environ Microbiol* 67, 339-344 (2001)
- 19) Hughey V L and Johnson E A , Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease *Appl Environ Microbiol* 53, 2165-2170 (1987)

表 1 相对湿度調整用飽和塩溶液

飽和塩溶液	相对湿度
LiCl	12%
MgCl ₂	33%
Mg(NO ₃) ₂	52%
NaCl	76%



バイプレートシヤール

飽和塩溶液 20ml

ペーパースライス

図1 相対湿度調整容器を用いた生残性試験モラル

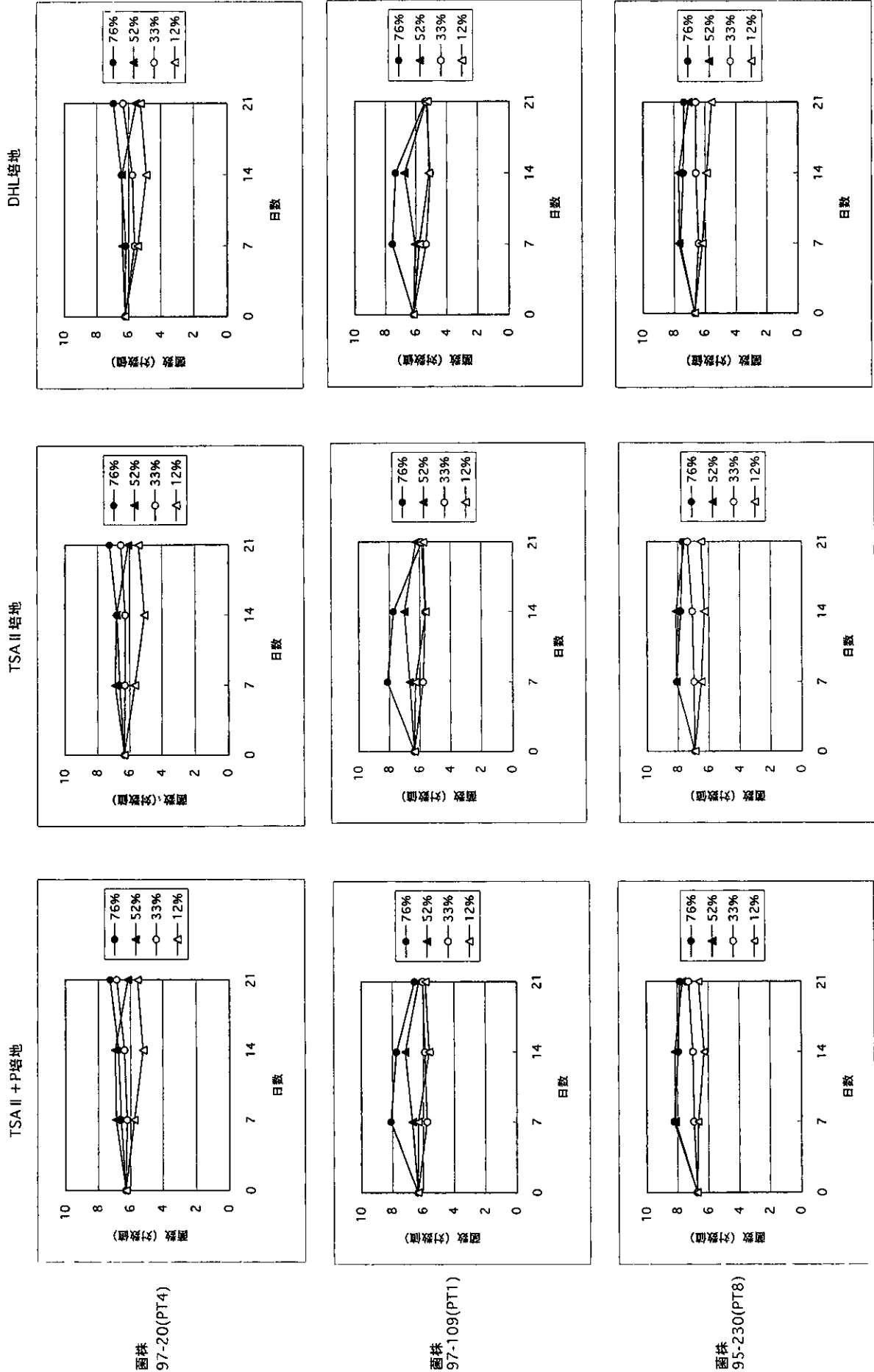
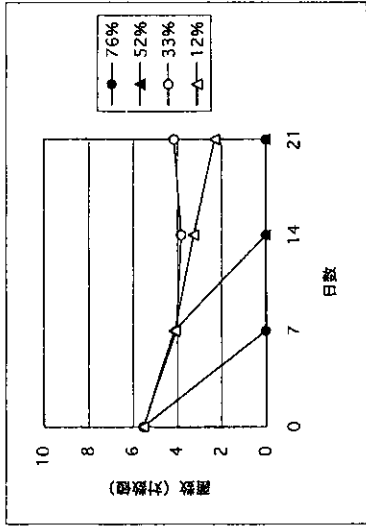
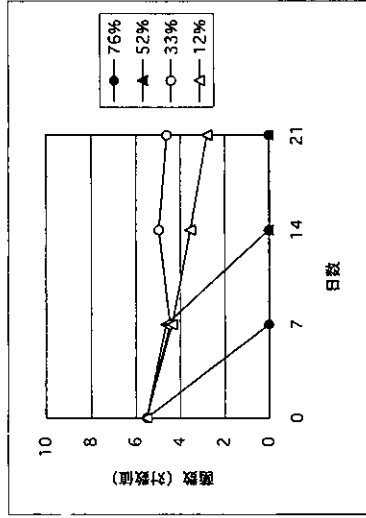


図2 相対湿度調整下における卵黄中のSalmonella Enteritidisの生残性

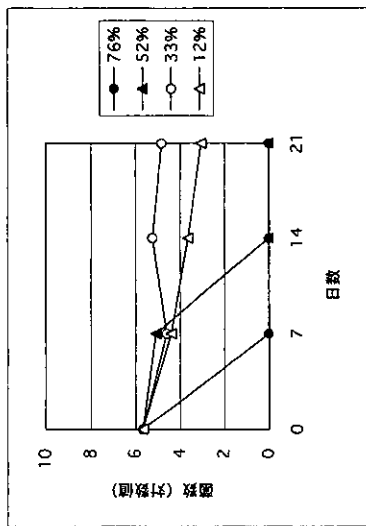
DHL培地



TSA II 培地



TSA II +P培地



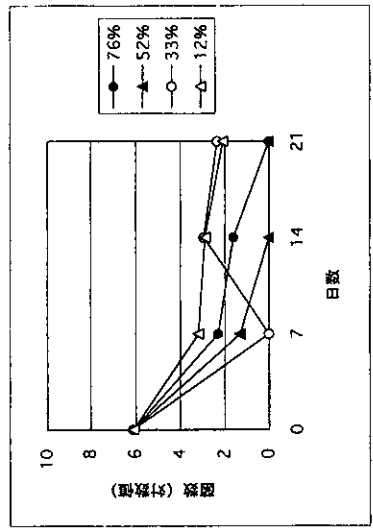
菌株
97-20(PT4)

菌株
97-109(PT1)

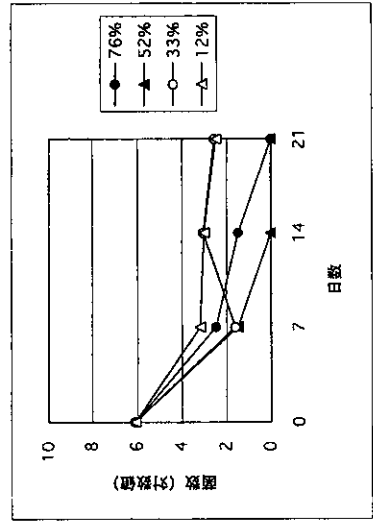
菌株
95-230(PT8)

図3 相対湿度調整下における卵白中のSalmonella Enteritidisの生残性

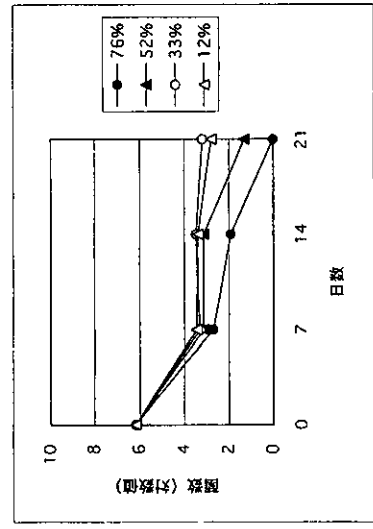
DHL培地



TSA II培地



TSA II + P培地



菌株
97-20(PT4)

菌株
97-109(PT1)

菌株
95-230(PT8)

図4 相対湿度調整下における対照ディスク中のSalmonella Enteritidisの生残性

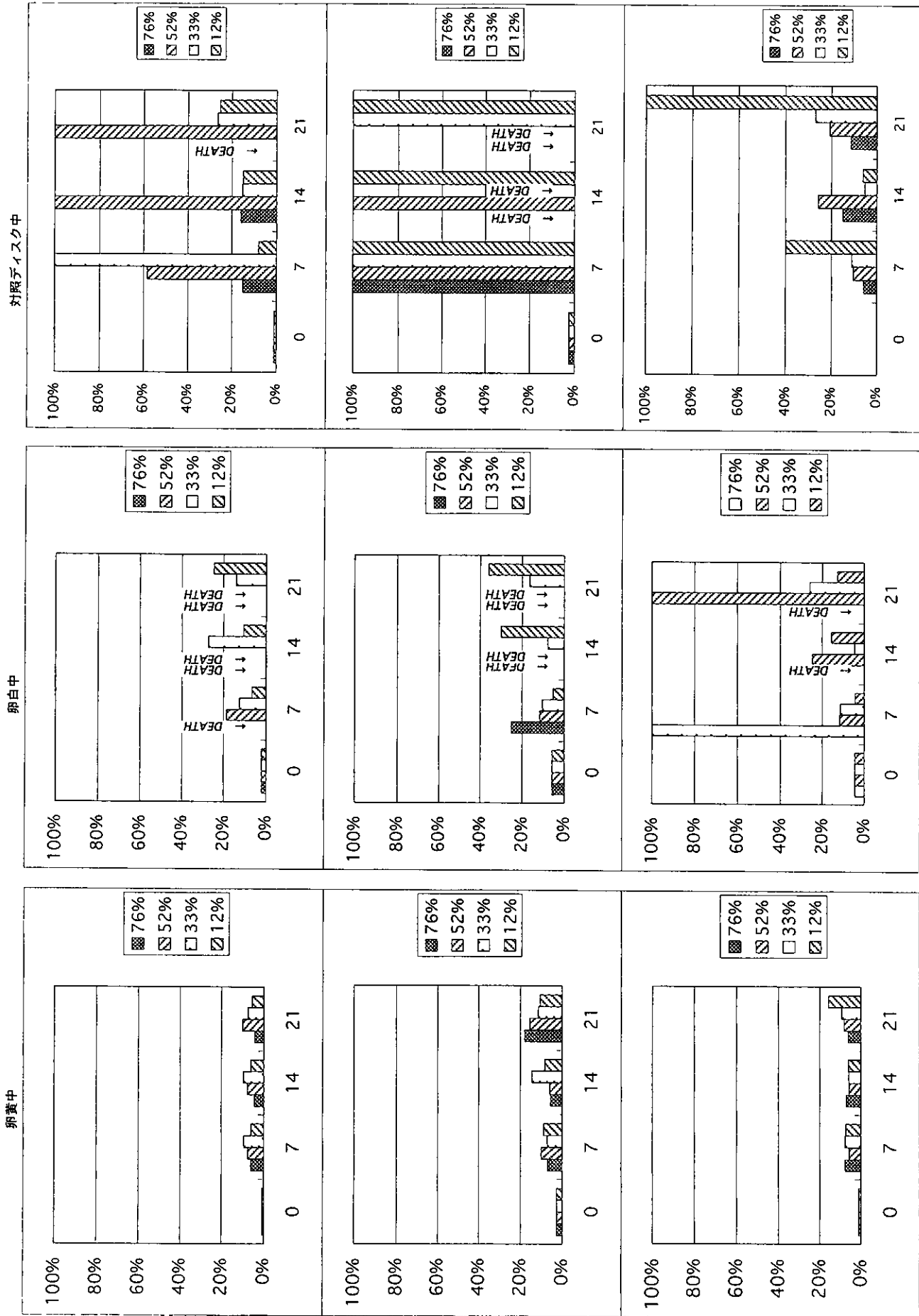


図5 相対湿度調整下における各菌液中のSalmonella Enteritidisの損傷菌率

菌株
97 20(PT4)

菌株
97 109(PT1)

菌株
95 230(PT8)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金
(食品安全確保研究事業)
分担研究報告書

3 液卵製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介 国立医薬品食品衛生研究所

3) サルモネラに関する研究

(2) Looped-mediated isothermal amplification 法を用いた液卵のサルモネラ検査法の検討および分離菌株の細菌学的解析

液卵製造施設のサルモネラ汚染を管理するにあたり、遺伝子学的手法を用いた LAMP 法が有効な検査方法であるかを公定法と比較検証した。LAMP 法は迅速性、確実性、簡便性に優れることが判明した。一方、公定法は LAMP 法よりも検査日数を要し迅速性に劣ったか、検出された菌について遺伝子学的解析を検討可能であり、液卵を汚染するサルモネラの細菌学的情報が得られた。

研究協力者

大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
柳川敬子	埼玉県衛生研究所

造業者、給食等調理業者であり、製造量の多い業者であることが判明した。液卵のサルモネラ汚染は、加熱工程のない製品や加熱不足の製品に持ち越され、また製造工程中の器具・機材および機械設備に広がり、食品をめぐる汚染循環が発生する。ひとたび汚染を受けた食品は、現在の広域流通システムを介して、広範囲

A 研究目的

平成14年度の本研究事業において、液卵のほとんどは未殺菌液卵として販売され、その販売先は製菓・製パン業者、加工卵業者、食肉製品・魚肉練り製品製

かつ、散在的あるいは集中的に多数の健康被害をもたらす可能性がある。

平成元年以降急増したサルモネラ食中毒の発生防止対策のため、厚生労働省は平成 10 年 11 月液卵の製造基準および成分規格並びに卵選別包装施設の衛生管理要領を食品衛生法に制定し、管理指導を強化した。

液卵は加工食品の原料用に購入されるため、製造当日あるいは製造翌日には出荷されることが多い。しかし、成分規格におけるサルモネラ検査法（以下公定法）は、結果判定までに 4 日間を要するため、流通前の液卵に検査結果をフィートバックすることはむずかしい。

そこで、遺伝子学的手法を用いた Looped-mediated isothermal amplification（以下 LAMP）法について、未殺菌液卵を検査対象に、サルモネラ検査法としての迅速性と検査精度を公定法と比較して評価した。また、検出されたサルモネラについては、今後液卵におけるサルモネラ対策を策定する基礎資料を得るため、血清型別や Pulsed-field gel electrophoresis

（以下 PFGE）法による細菌学的な解析を行った。

B 方法

平成 15 年 9 月 24 日から 10 月 9 日に、4 カ所（A、B、C、D 工場）の液卵製造施設で加工された未殺菌液卵 111 検体を対象に、一般生菌数およびサルモネラの検査を行った。

1 一般生菌数

常法に従い、液卵 25g に滅菌生理食塩水を加えて、10 倍段階希釈液を調製した。各段階希釈液 1ml に標準寒天培地（栄研化学）を混釈し、35℃、22 時間培養した後、発育した集落を測定した。

2 公定法によるサルモネラ検査

液卵 25g に L-システイン（0.2g/L）を添加した Buffered Pepton Water（以下 BPW、OXOID）225ml を加え、ストマソキックした後、36℃、20 時間培養した。この増菌培養液を 0.5ml ずつ Tetrathionate broth（以下 TT、OXOID）および Rappaport Vassiliadis Enrichment broth（以下 RV、OXOID）に接種し、 $42.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

て20時間選択増菌培養した。各培養液20 μ lずつをXLD培地(OXOID)およびmodified Brilliant Green培地(以下BGM培地、OXOID)に塗抹し、36 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。平板培地上に発育した典型的集落をTSI寒天培地(栄研化学)およびLIM培地(栄研化学)に、XLD培地から2コロニー以内、BGM培地から3コロニー以内釣菌して、35 $^{\circ}$ Cで18時間培養した。サルモネラの同定は、TSI寒天培地等の生化学性状試験と免疫血清(テナカ生研)によるO血清型別およびH血清型別試験で行った。

3 LAMP法によるサルモネラ検査

1) LAMP法の検出感度

サルモネラ陰性の液卵をBPWで増菌培養した後、その培養液に食中毒の原因食品から分離した*Salmonella* Enteritidis S682を添加して、LAMP反応チューブ当たり $10^1\sim 10^3$ 個の3濃度、各3検体とした。この菌添加培養液50 μ lにLoopampサルモネラ検出試薬キット(栄研化学)に付属するExtraction Solution for Foods試薬を等量加え、95 $^{\circ}$ C、5分加熱した後、

その遠心分離上清5 μ lをLAMP鋳型とした。キット添付の説明書に従い、LAMP反応液を調製し、エチジウムブロマイド(最終濃度0.25 μ g/ml)と鋳型5 μ lを加えて、全量25 μ lとした。陽性対照には、キット添付のControl DNA Sal 5 μ l、陰性対照に滅菌蒸留水5 μ lをLAMP鋳型とした。

標的遺伝子領域の増幅反応は、ABI Prism 7700 (Applied Biosystems)を使用して、65 $^{\circ}$ Cの一定温度に、60分間保持して行った。サルモネラの判定は、反応液中に加えたエチジウムブロマイドによる蛍光強度の変化を経時的に測定して解析した。

2) 未殺菌液卵のサルモネラ検査

公定法によるサルモネラ検査に使用した液卵のBPW培養液50 μ lに、Extraction Solution for Foods 50 μ lを加え、加熱・遠心分離した後、上清5 μ lをLAMP鋳型とした。サルモネラの判定は前述の検出感度試験と同様に行った。

4 サルモネラの細菌学的解析

1) 薬剤感受性試験

検出したサルモネラのうち、*Salmonella* Enteritidis（以下 Enteritidis）および *Salmonella* Typhimurium（以下 Typhimurium）を対象に、薬剤感受性試験を行った。米国臨床検査標準委員会（NCCLS）の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク（BBL）を用い、アンピシリン（ABPC）、カナマイシン（KM）、ケンタマイシン（GM）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、シプロフロキサシン（CPFX）、フォスフォマイシン（FOM）、ノルフロキサシン（NFLX）、セフトキシム（CTX）、クロラムフェニコール（CP）、ナリシクス酸（NA）、ST合剤（SXT）の12薬剤について検査した。

2) PFGE 法による遺伝子解析

検出したサルモネラのうち、Enteritidis および Typhimurium を対象に、PFGE 法による遺伝子型別を行った。泉谷らの方法に準じて、DNA を抽出した後、プラクは *Xba* I（Roche）50U および *Bln* I（TAKARA）30U を含む制限酵素液で、37°C、16～18 時間消化した。電気泳動は

CHEF-DR II（Bio-Rad）を用いて、パルスタイム 5～50 秒、6V/cm、14°C の条件で 22 時間行った。泳動像の解析には遺伝子解析用ソフト Diversity Database を用いて、UPGMA（Unweighted, pair-group method using arithmetic averages）法によりテントログラムを作成し、各菌株の相同性を分析した。なお、類似度 85%以上を一つの型として分類した。

G 結果

実験的にサルモネラを添加した液卵培養液を用いて、LAMP 法の検出感度を検討した結果を Fig 1 に示す。LAMP 鋳型 5 μ l 当たり 175 個のサルモネラを添加した培養液は、蛍光強度の増大が確認され、サルモネラ陽性と判定できた。菌を添加しなかった陰性対照の培養液は蛍光強度に変化が見られず、サルモネラ陰性であった。

LAMP 法および公定法を用いて行った未殺菌液卵のサルモネラ検査結果を Table 1 に示す。サルモネラ陽性であった液卵は、LAMP 法で 111 検体中 101 検体、公

定法では 100 検体であった。公定法でサルモネラ陽性となった液卵 100 検体は LAMP 法でも陽性であり、またいずれの方法でも陰性であった液卵は 10 検体で、両法の一致率は 99.1%と高かった。

選択増菌培地別にサルモネラの検出状況を LAMP 法と比較した結果、TT 培地を用いた平板培養法と LAMP 法の両法がサルモネラ陽性であった液卵は 98 検体であった。RV 培地を用いた平板培養法は、89 検体が LAMP 法ともに陽性であった。

液卵の一般生菌数とサルモネラの検出状況を Table 2 に示す。液卵 111 検体の一般生菌数は、平均 $\text{Log } 4.38 \pm 0.62$ 個/g で、C 工場 (5.03 ± 0.59 個/g) > D 工場 (4.29 ± 0.52 個/g), A 工場 (4.20 ± 0.30 個/g) > B 工場 (3.92 ± 0.41 個/g) の順に菌数が多かった ($P < 0.05$)。サルモネラは未殺菌液卵の 90.1% から検出され、その検出と一般生菌数との間に相関は認められなかった。

サルモネラの血清型を Table 3 に示す。111 検体中 54 検体から *Enteritidis* が検出され、いずれの工場においても最も頻度の高い血清型であった。次いで、全工場

の液卵から *Salmonella* Cerro が 20 検体、*Salmonella* Infantis が 17 検体分離された。また、Typhimurium は 2 工場で製造された 7 検体から分離された。

薬剤感受性試験の成績を Table 4 示す。供試した *Enteritidis* 54 株中 17 株が SM 耐性、1 株が SM・TC の 2 剤耐性で、その他の株は 12 薬剤すべてに感受性であった。また、Typhimurium は 7 株すべて、いずれの薬剤にも感受性であった。

Typhimurium の *Xba* I および *Bln* I による PFGE パターンとテントログラムを Fig 2、Fig 3 に示す。2 工場、6 製造日に由来する 7 株は各酵素によって、1 亜型を含む 1 型 (A & A' および a & a') に型別された。

Enteritidis の制限酵素 *Xba* I および *Bln* I による切断パターンとテントログラムを Fig 4、Fig 5 に示す。4 工場、37 製造日に由来する 54 株は、*Xba* I によって 4 つの型に分類された。工場別では、A 工場の液卵に由来する 12 株が 3 型 (I、II、III)、B 工場由来の 8 株が 3 型 (I、II、IV)、C 工場由来の 18 株が 2 型 (I、

Ⅲ)、D工場由来の16株が3型(I、II、Ⅲ)に分類された。*Bln* Iによっては12の型に分類され、I型およびその亜型が35株と最も多かった。A工場由来株は5つの型(I、II、Ⅲ、V、IX)に、B工場由来株は1つの型(I)に、C工場由来株は7つの型(I、VI、VII、VIII、X、XI、XII)に、D工場由来株は2つの型(I、IV)に分類された。

D 考察

液卵のサルモネラ検査方法として、遺伝子学的手法を用いたLAMP法について、公定法と比較検討した。公定法ではサルモネラを検出できなかったか、LAMP法で陽性となった検体が1検体あった。当該検体は、市販のサルモネラ菌 *invA* 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1、2 (TaKaRa) を用いたPCR法によっても、標的遺伝子が確認された。また、LAMP法でサルモネラ陰性の検体は公定法でもすべて陰性で、本法は公定法と同等あるいはそれ以上の検出感度および精度を有していた。

今回検討したLAMP法は、液卵の一夜

培養液にアルカリ溶液を添加するだけで、煩雑な精製処理なくして、検査に供することかてきた。さらに、サルモネラの判定はLAMPチューブ内の増幅産物を取り出すことなく、蛍光強度の変化を経時的に分析することててきた。したかつて、短時間に液卵培養液中のサルモネラのスクリーニングが可能となることから、本法は日常の検査方法として有用な手法と考えられた。

一方、公定法の長所は菌が分離されるため、血清型別試験や遺伝子型別解析を行うことが可能となり、菌のもつ細菌学的な情報が得られる。今回検出されたサルモネラの血清型は、鶏肉をはじめ鶏糞や鶏の生活環境から分離されることの多い血清型である。これら菌かもたらした情報によって、農場におけるサルモネラ制御が液卵のサルモネラ対策に重要であることを示す資料が提供された。

液卵由来 Enteritidis の PFGE パターンは、多形性を示した。サルモネラのなかでも、Enteritidis は食中毒事例や散発下痢症の起因菌として検出されることか多

い。したがって、Enteritidis の PFGE 解析は、腸管出血性大腸菌 O157 同様、散発・集団食中毒事例発生時において汚染源の推察やその早期摘発に十分活用できるのではないかと期待される。

以上のことから、比較した 2 種類のサルモネラ検査法は、それぞれの長所・短所があり、検査を実施する施設（機関）や検査目的に応じて方法を選択し、または組み合わせることか最良と考える。

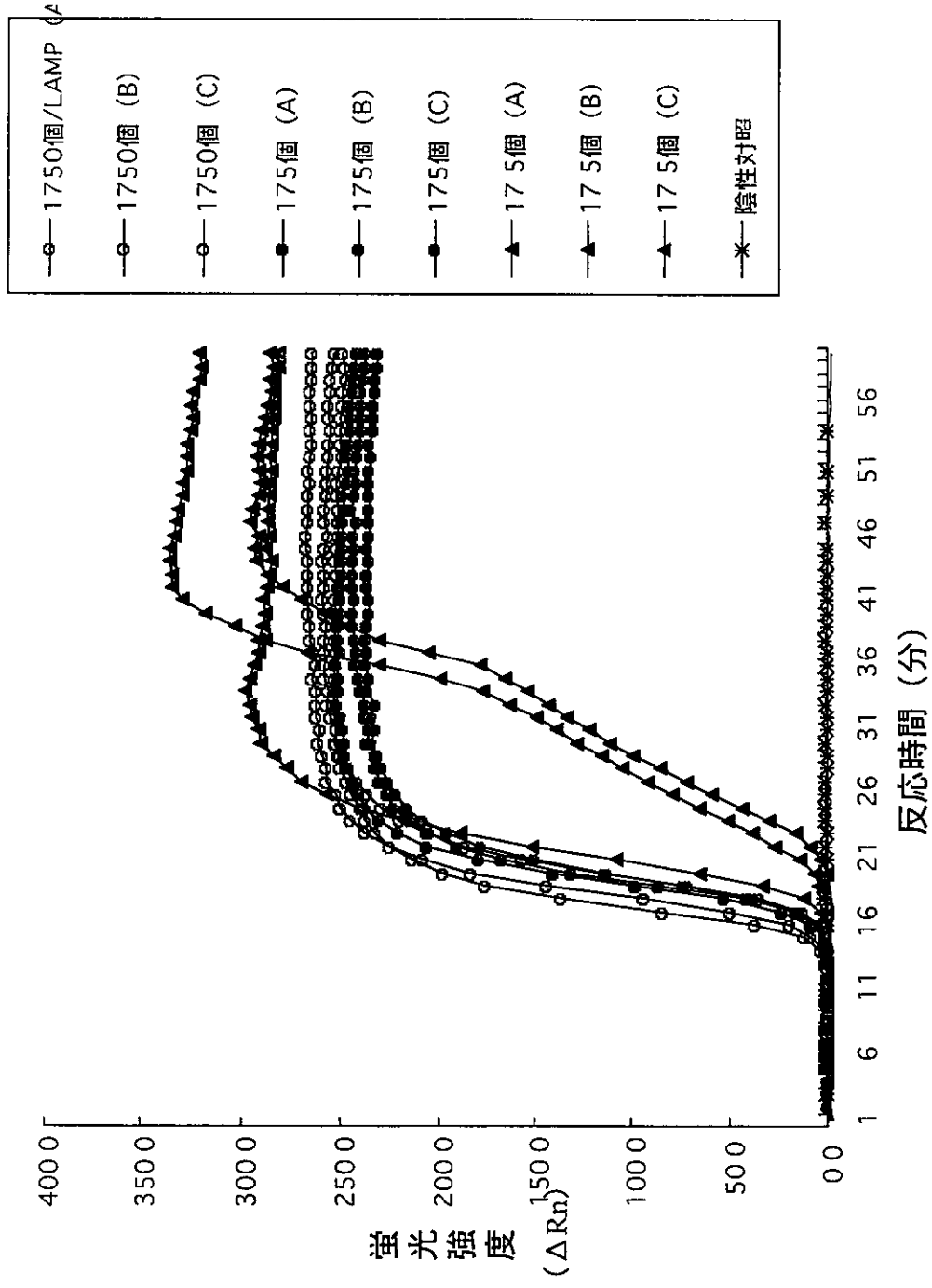


Fig 1 液卵のサルモネラ検査におけるLAMP産物（蛍光強度）の経時的変化

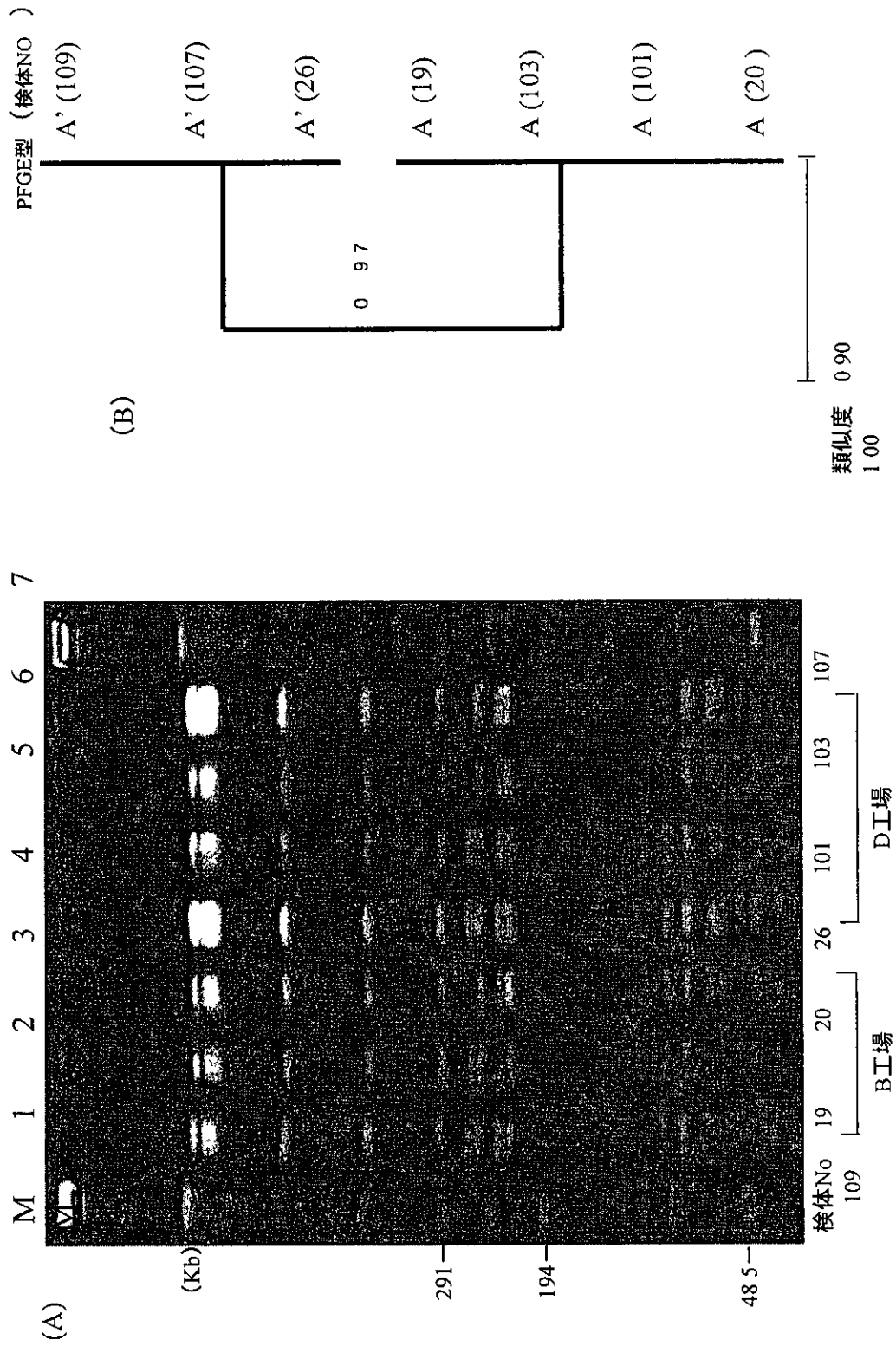


Fig 2 (A) 未殺菌夜卵から検出した *Salmonella Typhimurium* の *Xba*I による PFGE パターン
 レーン M, 1, 2, 3, B工場製造の夜卵 No 19, 20, 26, lanes 4-7, D工場製造の夜卵 No 101, 103, 107, 109
 (B) PFGE パターンのデントログラム

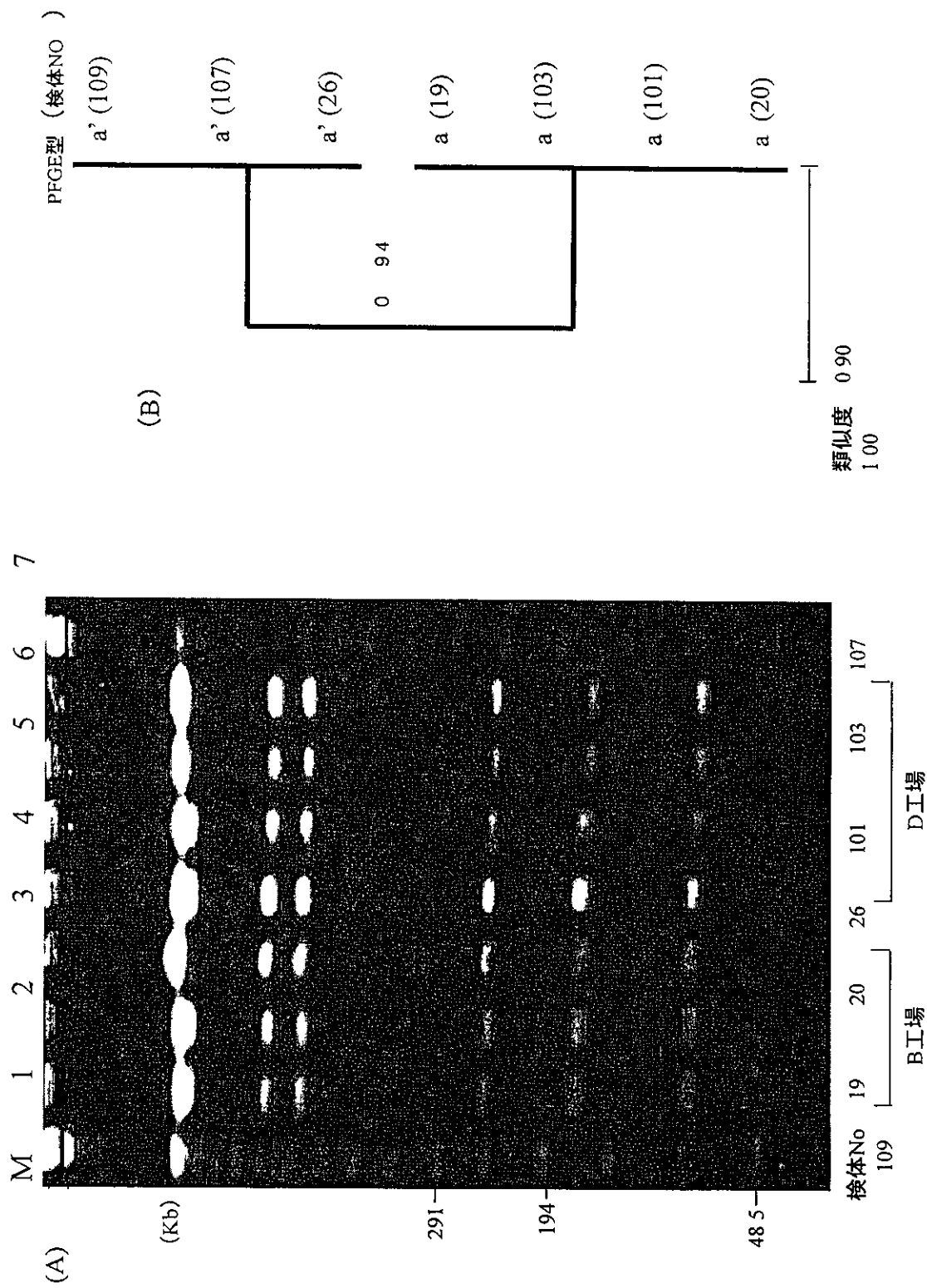


Fig 3 (A) 未殺菌夜卵から検出した *Salmonella Typhimurium* の Bln I による PFGE パターン
 レーン M, λ ラダー, lanes 1-3, B工場製造の夜卵 No 19, 20, 26, lanes 4-7, D工場製造の夜卵 No 101, 103, 107, 109
 (B) PFGE パターンのデントログラム

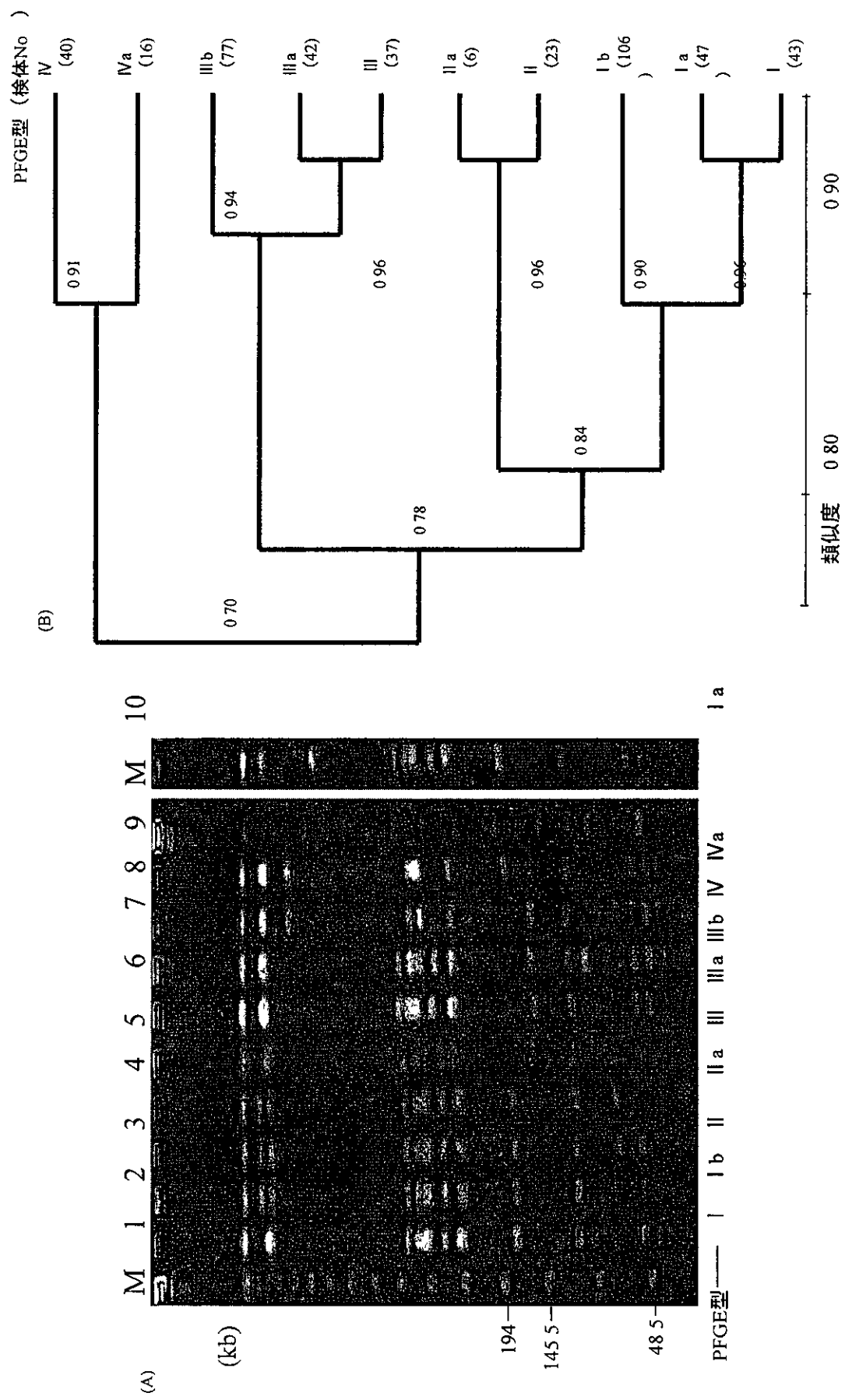


Fig 4 (A) 未殺菌液卵から検出した*Salmonella Enteritidis*の*Xba* I によるPFGEパターン
 レーン M, λ ラダー, lane1, 液卵No 43, lane2, No 106, lane3, No 23, lane 4, No 6, lane5, No 37, lane6, No 42, lane7,
 No 77, lane8, No 40, lane 9, No 16, lane10, No 47
 (B) PFGEパターンのデントログラム

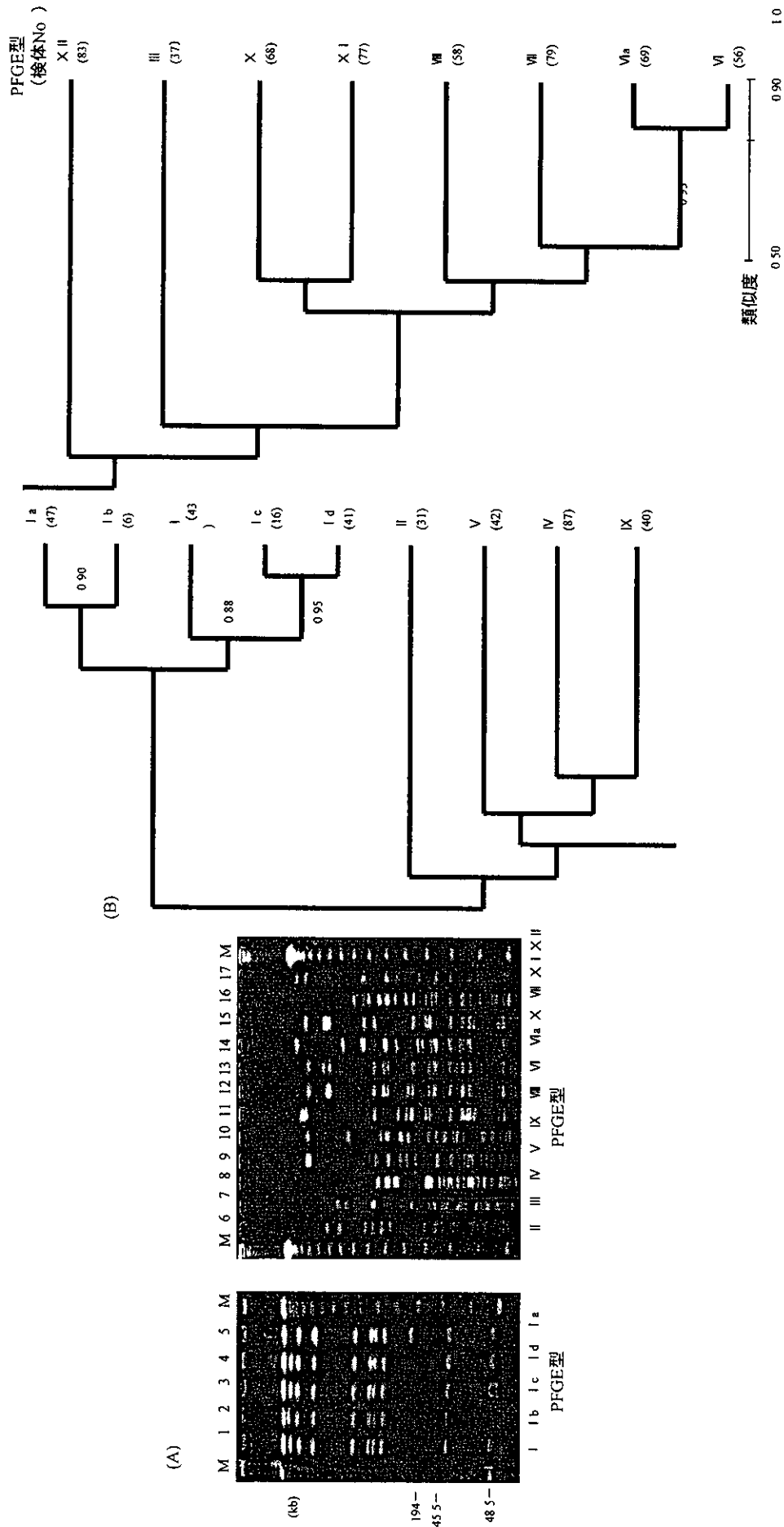


Fig 5 (A) 未殺菌夜卵から検出した*Salmonella enteritidis*のBln I によるPFGEパターン
 レーン M, λ ラダー, lane1, 夜卵No 43, lane2, No 6, lane3, No 16, lane4, No 41, lane 5, No 47, lane6, No 31, lane7,
 No 37, lane8, No 87, lane9, No 42, lane10, No 40, lane11, No 58, lane12, No 56, lane13, No 69, lane14, No 68, lane 15, No
 79, lane, 16, No 77, lane 17, No 83
 (B) PFGEパターンのデンドログラム

Table 1 検査方法別の未殺菌液卵からのサルモネラ検出状況

	公定法		TT培地-平板培養		RV培地-平板培養	
	+	-	+	-	+	-
L	+	1	98	3	89	12
A						
M						
P	-	10	0	10	0	10
法						