

200401130A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

細菌性食中毒の予防に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高鳥 浩介

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成17(2005)年3月

細菌性食中毒の予防に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長）

研究要旨

細菌性食中毒の予防対策を検討するために、我が国において主要な食中毒の原因となっている病原細菌と食品について効果的な検査法の確立および汚染実態調査等を実施し、リスクアセスメントに必要な基礎データの収集を行った。研究対象とした病原細菌と食品の組み合わせは、（１）生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌およびサルモネラ、（２）生食用鮮魚介類におけるビブリオ、（３）鶏肉のカンピロバクター、（４）無調理摂取食品のリステリア、の４つとした。また、リスクアセスメントモデルの構築に不可欠な食中毒発症菌量に関する科学的データの収集を行った。

分担研究者

工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所

衛生微生物部 主任研究官

山本 茂貴

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部 部長

五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部 室長

が進みつつあり、日本の現状に即した知見が必要である。現在日本での主要な細菌性食中毒は腸炎ビブリオ、サルモネラ、腸管出血性大腸菌、カンピロバクターなどを原因菌としており、その原因食品として生食用食品が注目されている。腸炎ビブリオ食中毒は日本の特徴的な食中毒でありビブリオ・バルニフィカスは食品を介し重篤な症状を引き起こす。これらについて国内での汚染実態の研究が求められる。サルモネラ食中毒は家庭内の食中毒も多くサルモネラ制御についてさらに研究が求められている。近年世界的にも国内でも感染者の増えているカンピロバクターは鶏肉を原因としているが国内で

1. 研究目的

細菌性食中毒の予防対策には近年世界的に普及しているリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が求められている。日本においても取り組み

の調査がほとんど行われていない。腸管出血性大腸菌食中毒は持続的に発生しており重篤な症状にいたることから実態を把握する必要がある。特に血清型 0157 以外の血清型である 026 などによって患者が発生しているにもかかわらず原因食品はほとんどの事例で不明である。加えて、世界的に注目されている食中毒菌であるリステリアについては ready-to-eat と呼ばれている無調理摂取食品が主要な原因のひとつとして挙げられているが、国内においては日本独自の調理品も多いため調査データを収集する必要がある。日本で問題になっている主要な食中毒原因菌と食品について汚染実態を把握し、さらに実際の食中毒事例を調査し発症菌量を明確にする。これらの研究から得られた結果をもとに日本独自のリスクアセスメントを試みる。本研究によって、食品のリスクを明かにし、その制御方法に関する科学的根拠を提供し、食中毒の発生を未然に防止できることが期待される。以下は、本研究における 4 つの分担研究課題である。

(1) 生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

(2) 生食用鮮魚介類におけるピブリオ食中毒の予防に関する研究

(3) 鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

(4) 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

また、本研究では、日本で問題になっている主要な食中毒原因菌による実際の食中毒事例を調査し摂食状況や発症菌量を明確にすることを目的として継続的に各自治体の協力により事業を進めることとした。

B. 研究方法

(1) 生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

1. 0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

腸管出血性大腸菌の血清型 0157、026 および 0111 の各菌株を実験に供試した。選択増菌培養、免疫磁気ビーズ (IMS) 法、選択分離平板培地、遺伝子検出方法 (PCR 法および LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法) 等を用い、食品での添加回収実験および検出感度の検討を行った。

2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 0157 検査における LAMP 法の評価
LAMP 法に着目し牛生レバー、ゴボウのゴマ和えおよびブロッコリーの芽の食品検体での添加回収実験を行った。増菌培養後、LAMP 法および分離培養法によって検出を行った。また、と畜場でとさつ・解体された牛枝肉ふきとり 230 検体も供試した。

3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究

0169 については、選択分離培地上のコロニーをニトロセルロース膜に転写

し、抗0169免疫血清を利用した酵素抗体法を実施した。腸管出血性大腸菌については、ニトロセルロース膜上でコロニーを形成させ抗志賀毒素 (Stx) 抗体を用いたアビジン-ビオチン法により、吸着毒素を発色させた。

4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

国際的なサルモネラ汚染食品の把握を行うとともに、国内で販売されている計 271 件の香辛料を供試した。サンプルを 2 段階増菌培養後、免疫磁気分離法を組み合わせ濃縮し選択分離培地に塗抹し培養した。また、PCR 法によって増菌培養液か *invA* 遺伝子を検出した。この定性試験によって検出された検体については MPN 法によって定量試験を行った。

5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

食中毒患者や環境から分離した 430 菌株について、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成能のスクリーニングを行なった。形成能の比較的高い菌株と低い菌株を合計 22 株選択し、それら菌株についてサルモネラの生存性をさらに詳しく調べた。

6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

2004 年度の食中毒事例における原因食品中の食中毒菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼した。原因食品中の菌数、原因食品の推定摂取量、病因物質の推定摂取量、検査までの検体の保管状況、検査方法などにつ

いて指定した報告方法に沿って詳細な情報を取りまとめた。

(2) 生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

1. ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

既知の方法を参考にし実検体において、培養法および PCR 法によって *V. vulnificus* 検出方法の検討を行った。国内の 6 地域の産地の明らかな鮮魚介類を対象とし、MPN 法 (3 本法) にて菌数を測定した。

2. 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量 PCR 法の応用

確立した *V. vulnificus* 定量 PCR 法 *V. vulnificus* 54 株について特異的な増幅を確認した。また、本定量 PCR 法による *V. vulnificus* 数の定量のために、菌株の培養液を希釈し本定量 PCR および培地での生菌数測定を行った。国内 6 ヶ所の実検体海水から DNA 抽出し TaqMan に使用した。さらに、海水中の *V. vulnificus* 数を MPN 法によって測定した。

3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ-水鳥糞便の検索-

熊本県の防波堤及び海岸線の岩礁や干潟に飛来した水鳥の新鮮糞便 367 検体を採取して検査材料とした。雑食性のウミネコ、セグロカモメ群及びユリカモメ群と、主に植物質が主食のヒドリガモ群、マガモ群及びコガモ群に分けた。また、周辺海水についても検出

した。

(3) 鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

1. リスクプロファイルの作成

リスクプロファイルの作成では、農場から消費に至る各段階での鶏のカンピロバクター保菌率及び菌数、鶏肉の汚染状況などの定量データについて、国内外の文献および衛生研究所及び食肉衛生検査所におけるデータを収集し、解析した。

2. 鶏肉からの検出法の検討

鶏肉からの *Campylobacter jejuni* の検出法を検討するため、増菌培地として Preston 培地と Bolton 培地を分離培地として CCDA 培地と Butzler 培地を比較した。

3. コッコイド化した菌の解析

コッコイド化した菌の解析では、供試菌株としてカンピロバクター・ジェジュニの患者由来株を用いた。コッコイド化した菌の調製は、これまでの我々の研究によって設定した培養法によって行った。菌体のコッコイド化はDAPI染色またはカルボールフクシン染色後、直接鏡検法により確認した。また、培養液から菌体を回収し、その構成成分であるゲノムDNA、リボソームRNAおよびタンパク質について解析した。DNAはアガロース電気泳動法にて、RNAは抽出・精製後、2100 Bioanalyzer (Agilent)にて解析した。タンパク質はSDS-PAGE後、銀染色した。一方、微好気培養した後好気ストレスを与えた菌（スト

レスによるコッコイド化は起こらない)についても、その菌体構成成分を上記と同様に解析した。

(4) 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

1. 食品を介したヒトのリステリア症の掌握

下痢症患者の原因菌分離時に、リステリア分離培地 PALCAM 寒天培地を加え、直接塗末により菌の分離を試み、リステリアが下痢症の原因となっているかを調べた。ヒト・リステリア症(髄膜炎患者)および食肉汚染分離株のゲノム構造の特性による分子疫学的解析から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を検討した。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

菌株の収集・保存を行った。これらの株を用いて、強毒株の指標となりうるマーカーの検索をPCR法及びSouthern Dot Hybridization法により行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。これらの株の病原性について培養細胞を用い、実際に低病原性群が存在しているかどうかを検証した。

3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化

疫学マーカーの検索を行った。

4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

スモークサーモンと辛子明太子およ

びたらこについて検討した。スモークサーモン製造施設を調査施設とし、原材料であるサケ、製造工程や製造環境におけるリステリアに対する危害分析を行った。また、辛子明太子およびたらこのリステリアの増殖について検討した。

(倫理面への配慮)

当研究においては、疫学情報を取り扱う可能性があるが、この場合は、“疫学研究に関する倫理指針”に従い実験内容や方法などについて国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会の審査を受け、個人情報の保護について最大限の倫理的な配慮を行い研究する。リステリア研究の患者情報の取り扱いに関しては、国立医薬品食品衛生研究所の医学研究倫理委員会の審査を既に受けており、医学研究倫理規定に基づき管理を行った。

C. 研究結果

1. 0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

供試した選択分離培地は、血清型 0157 および血清型 026 のそれぞれについて特異的に検出できた。しかし、血清型 0111 は特に優位な特徴によって区別されなかった。菌の牛ひき肉での添加回収実験において、IMS 法後の選択分離培養法でも高感度に検出できたが、LAMP 法は短時間で高感度に検出できることが認められた。

2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大

腸菌 0157 検査における LAMP 法の評価
供試した Stx 産生性の STEC 0157 株 53 株において、LAMP 法の特異性が示された。添加回収実験において、培養法で検出された検体はすべて LAMP 法で陽性反応を示した。牛枝肉ふきとり検体では培養法陰性で LAMP 法のみ陽性は 4 検体あった。

3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究

腸管毒素原性大腸菌 0169 については、酵素抗体法を実施することにより多数の集落中に混在する同菌を確実に識別釣菌できた。腸管出血性大腸菌については、抗 Stx 抗体を用いたアビジン-ビオチン法により、吸着毒素を発色させたところ、Stx 産生コロニーの呈色を確認できた。

4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

海外でも香辛料・ハーブ等のサルモネラ汚染に関する警告等があり、国内におけるブラックペッパー 1 件およびレッドペッパー類 1 件からサルモネラが検出された。その血清型はそれぞれ *S. Weltevreden* および *S. Senftenberg* であった。

5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

クリスタルバイオレット染色法によるスクリーニングにより、バイオフィルム形成能は菌株間で大きな差が認められた。これら株のうち、形成能の高い菌株と低い菌株を選びさらに検討した。その結果、クリスタルバイオレッ

トに対する染色性が比較的高い菌株は、Calcofluor による蛍光が強く、コロニーがrdar形態を示すことが認められた。

6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌の菌数測定を全国の地方自治体に依頼したところ 92 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果の得られた事例は 6 件 (腸管出血性大腸菌 2 件、サルモネラ 3 件、腸炎ビブリオ 1 件) あり、病原物質の推定摂取量が得られた。

(2) 生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

1. ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検査法の検討と汚染実態

35°Cでの増菌培養は 25°Cと同等もしくははより優れていた。また PCR 法は分離培養法と同等もしくははより優れていた。国内 6 地域で比較すると、東北では低かったが関東以南では検出限界以下であることは少なく多くの検体から検出された。

2. 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量 PCR 法の応用

本定量 PCR の特異性は供試した 54 株において確かめられた。本定量 PCR による検出限界の確定と定量のための検量線を作成した結果、生菌数で換算し検量線を得たところ、 $10^4 \sim 10^7$ cells/ml の生菌数において相関係数

$r^2=0.9912$ を示した。実検体での本定量 PCR と MPN 法による海水中の *V.*

vulnificus 数の定量的結果、両方法は比較的近い値を示した。

3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ—水鳥糞便の検索

雑食性水鳥 345 検体中 *V. vulnificus* が検出されたのは 84 検体、*V.*

parahaemolyticus は 240 検体であった。一方、植物質が主食の水鳥 22 検体では *V. vulnificus* 0 検体、*V.*

parahaemolyticus は 2 検体であった。

周辺海水では、*V. parahaemolyticus* は 1 月の一回を除いて調査した全ての月で陽性であった。また、両菌共に 9 ~ 10 月には高い MPN 値を示した。

(3) 鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

1. リスクプロファイル

農場段階から消費段階に至る鶏におけるカンピロバクター感染および鶏肉の汚染に関する定量データについてデータの収集を行った。

2. 鶏肉からの検出法の検討

Preston 培地と Bolton 培地ではほぼ同様の結果が得られた。分離培地は Butzler 培地が検出率が高かった。

3. コッコイド化した菌の解析

微好気培養または嫌気処理した後に好気ストレスを与えた結果、菌の CFU はともに検出限界以下にまで減少した。このとき、微好気培養後にストレスを与えた菌では、コッコイド化した菌体の増加は確認されなかった。一方、嫌

気処理後にストレスを与えた菌では、形状のコッコイド化の促進が認められた。このことから、培地上での増殖能を同様に失わせた状態で、らせん状の菌とコッコイド化した菌を比較することが可能であった。

微好気培養後にストレスを与えた場合、ゲノム DNA 量の著しい減少が確認された。一方、嫌気処理後にストレスを与えた場合ではそのような減少は認められなかった。微好気培養後にストレスを与えた菌体と比べて、嫌気処理後にストレスを与えコッコイド化させた菌体では蛍光強度は著しく低下しなかった。

次に、微好気培養した後にストレスを与えた場合、16S および 23S リボソーム RNA は検出限界以下であった。一方、嫌気処理後にストレスを与えてコッコイド化を促した菌では、両リボソーム RNA は検出された。

さらに、微好気培養した後にストレスを与えた菌では、多くのタンパク質の減少・消失が確認された。この減少・消失は菌の増殖能が急激に低下する時期とほぼ一致した。一方、嫌気処理した後にストレスを与えた菌では、最終的には増殖能は検出限界以下にまで低下したにもかかわらず、タンパク質のそのような著しい減少・消失は確認されなかった。

(4) 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

1. 食品を介したヒトのリステリア症

の掌握

下痢症患者のリステリア分離培地 PALCAM 寒天培地での直接塗抹法による分離の試みは、既に680検体を越えているが、まだ、菌の分離は出来ていない。疫学マーカーの同一性から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を明らかにした。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

菌株の収集は、臨床分離株、環境分離株、食品分離株とも順調に進んでいる。これらの株を用いて、強毒株の指標となりうるマーカーの検索を行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。また、培養細胞を用いた感染実験では、ウシ由来株で57%（危険率5%）、豚由来株で33%（危険率5%）に低病原性群が存在した。

3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化

疫学マーカーの検索については、*iap* 遺伝子の変異により疫学マーカーとして用いる方法について検討した。この遺伝子の配列の差は、株の同一性を調べるのに有効であることが示された。*plcA* 遺伝子と *hly* 遺伝子においては、その保有状況が病巣由来株とそれ以外の株間ではっきりとした有意差が示された。

4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

北海道内の2箇所のスモークサーモ

ン製造施設の調査結果は、スモークサーモン加工過程における汚染を確認するもので、リスク評価の基礎データが得られた。

D. 考察

(1) 生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

1. 0157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究

本研究での結果および既知の情報から、迅速で感度の高い腸管出血性大腸菌検査法を考察した。例として、冷凍食肉からの腸管出血性大腸菌 血清型 0157, 026, 0111 の検出法について遺伝子検出を取り入れて迅速で高感度な方法が提案できると考えた。

2. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 0157 検査における LAMP 法の評価

今回検討した LAMP 法は、培養法よりも検出率が高く、また検査日数の観点から見ても、培養法に要する日数が 4 日であるのに対し、LAMP 法は 2 日で判定することが可能であった。患者発生時には原因食品の特定（推定）に迅速性が求められ、さらに、日ごろからのリスクの高い食品を推定することが食中毒予防に有効である。

3. 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究

コロニープロット法は、これまで分離株の毒素産生性をチェックする手段として利用される傾向にあった

が、増菌後のスクリーニングで陽性を示した検体について本法を実施すれば、疫学調査や食中毒事例の調査時に原因菌の分離率が改善されるものと期待できる。

4. 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

国内の香辛料・ハーブ等からのサルモネラの検出割合は 0.7% (2/271) と低い結果であったが、汚染品が国内で販売されていることが判明した。このため、加熱不十分の調理法によって使用され、さらに調理過程から人が食するまでにサルモネラが増殖できる段階が含まれる場合、食中毒を発生させる可能性が考えられる。

5. 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

食中毒患者から分離された菌株が比較的高いバイオフィーム形成能を示す傾向が認められたことから、バイオフィーム形成能が病原性に関与している可能性が考えられる。今後、この方法で確認したバイオフィーム生成能の高い菌株と低い菌株を用いて、乾燥条件に対する耐性を比較検討する必要がある。

6. 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

本年度は 6 件の報告にすぎなかったが、食中毒発生予防のためには、病因物質の解析に限らず病因物質の推定摂取量の把握も重要な要因であり、さらに自治体の協力により本事業を推進していきたいと考えている。

(2) 生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

1. ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) の検査法の検討と汚染実態

V. vulnificus 検査法を培養法および PCR 法を用いて検討したところ、両者は同等か後者がやや優れた結果が得られた。しかし、より食中毒予防の観点から精度の高い技術を確立するために、今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考える。また、患者の発生率と魚介類の汚染率に関連があることが予想されたが、患者の発生が少ない地域においても汚染率が高かった。このため、患者の発生には食生活等の生活習慣など他の要因が影響していることが考えられた。

2. 海水からのビブリオ・バルニフィカス検出のための定量 PCR 法の応用

これまでの、定量方法に比べ迅速に結果の得られるリアルタイム PCR 法が *V. vulnificus* についても有用であることが示された。実検体海水においては、若干 MPN 法と異なる結果もあった。海水検体中の微細な浮遊物などに菌が付着し均一な検体で無かったことなどが原因と考えられる。さらに、正確な検出のためには検体の取り扱いや調整方法など工夫が必要である。今後、魚介類などについて検討が必要であると

考えられる。

3. 環境中のビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ—水鳥糞便の検索

調査期間中、周辺海水が定性試験で陰性であった場合も全て *V. parahaemolyticus* が水鳥糞便から検出されたのに比べ、*V. vulnificus* は 9～11 月に限られていたことから、*V. parahaemolyticus* に比べて水鳥の消化管を通過しにくい傾向が示唆された。

(3) 鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

1. リスクプロファイルを作製することにより、食鳥肉の加工段階での定量的データが不足していること、食中毒発生時の発症率及び摂食菌数のデータが不足していることが明かとなり、次年度以降、検討することになった。

2. 鶏肉からのカンピロバクター検出方法の検討では、Bolton 培地は増菌の能力が高いことがあるが、同時に雑菌を増菌する場合があった。CCDA 培地はコロニーの携帯になれる必要がある。

3. コッコイド化した菌の解析では、微好気条件下にて増殖するカンピロバクターはらせん状桿菌であるが、生育に不利な環境になることでコッコイド化した菌体が現れる。コッコイド化した菌の中でも、比較的インタクトな DNA を保持しリボソーム RNA をもつ菌体は、条件が整うことで、再びらせん状に戻り増殖能を回復する高い可能性を持つように思われる。

今回用いたコッコイド化した菌の調

製法は、カンピロバクターの生活環を反映していると考えられる。従って、実際の環境中においても、菌体構成成分を保持したままコッコイド化した菌が生存し、汚染拡大につながる水平伝播や感染に関与しているものと思われる。

本年度の研究によって、カンピロバクター食中毒の制御において、コッコイド化した菌の重要な位置づけがますます高まった。今後、この問題を明らかにする必要がある、コッコイド化した菌が生きているか否か、本菌にとって形態変化は何を意味するか、などついてその生理状態をさらに詳細に解析する必要がある。これによって、本食中毒の制御・予防対策への応用が可能になることが期待される。

(4) 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

1. 食品を介したヒトのリステリア症の掌握

下痢症患者からのリステリア分離の試みは、既に 680 検体を越えているが、ダイレクト法による分離であるため、低い菌数は検出されないためと考えられる。臨床的にかかわっている場合は高い菌数であることが予想されるため、リステリアによる下痢症患者は極端に少ないものと思われる。また、特定の地域における長期に渡る常在汚染と汚染食肉の関与を検討し、疫学マーカーの同一性から、その地域のリステリア症患者との関与が強く示唆された。

2. 臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析

収臨床分離株とその他の分離株には、特定の病原因子遺伝子の保有状態で明らかかな有意さを認めた。これはリステリアの菌株間で、病原性に差があることを示唆している。病原性の差を比較的簡単な系で評価できれば、環境や食品中にどの程度危険な強毒株が分布しているかを予想できる。培養細胞を用いた感染実験を行うことで評価した結果は、遺伝子レベルでの病原性の推定を支持するものであるといえる。

3. リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化

以前より *iap* 遺伝子の変異により疫学マーカーとして用いる方法について、今年度はこの遺伝子を疫学マーカーとして用い、食品とリステリア症患者を結びつける結果が出た。この結果は、ある地域に長期に渡り汚染食肉が流通し、その地域からリステリア症が発生し、患者分離株と食品汚染株の疫学マーカーが一致したことは、大変重要な知見である。*plcA* 遺伝子と *hly* 遺伝子においては、その保有状況が病巣由来株とそれ以外の株間ではっきりとした有意差が示されており、これらの遺伝子産物は強毒株のマーカーとして有力な候補と思われる。

4. 非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメント

北海道内の 2 箇所のスモークサーモン製造施設の調査結果は、スモークサ

一モン加工過程における汚染を確認するもので、リスク評価の基礎データとなる。辛子明太子およびたらこでは、温度の違いによりリステリアの増減は変化し、菌数を増やさないためには、温度管理と賞味期限が重要と思われる。

E. 結論

(1) 生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

主要な原因物質である腸管出血性大腸菌について食品からの効果的な検出方法の検討を行い、血清型に関わらず病原因子であるペロ毒素を検出する方法を検討した。これにより適切な検出ができると考えられ、腸管出血性大腸菌食中毒防止の推進に役立つものと思われた。サルモネラについては香辛料・ハーブ等からサルモネラが低頻度・低汚染菌数であったが分離された。また、細菌数や芽胞数が高いものも多くみられた。このため香辛料・ハーブ等を使用した食品の調理方法、調理後の保存に注意が必要である。また、食中毒細菌の感染菌量の把握を目的に全国の地方自治体に食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌数測定について調査依頼を行った。6事例での報告があったが、次年度も継続して調査を行い、データを蓄積する必要がある。

(2) 生食用鮮魚介類におけるビブリオ食中毒の予防に関する研究

効果的な分離方法を確立するために、既存方法の中から優れていると思われる方法を基礎とし、温度や遺伝子検出を組み合わせて検討した。APW を使用し 35℃増菌が妥当であった。また、分離培地としては酵素基質培地の使用が優れていたが、遺伝子検出法の方が分離培養法よりも検出率が高かった。今後さらに、定量 PCR 法の精度および応用、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定などについての検討が必要である。国内 6 県の海域についての検体を供試したが、東北では検出率が低く、関東以南では検出率が高かった。また、環境での汚染実態として水鳥に着目して調査した結果、冬季でも水鳥が保有していることが明らかになり、今後の継続調査が望まれた。

(3) 鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

1. リスクプロファイルを作成したが、食鳥肉加工段階、消費段階での菌数及び菌の増減に関する定量データが不足しており、継続して収集することになった。
2. 増菌培地は Preston 培地と Bolton 培地が同等の成績であり、検出培地として Butzler 培地が良好な成績が得られた。
3. 好気ストレス下でコッコイド化した菌体を調製し、その構成成分を解析した結果、コッコイド化した菌ではストレスによる菌体構成成分の著しい減少・崩壊は認められなかった。

従って、これらコッコイド化した菌では、ストレスによる障害・変性は最小限にとどまっていると考えられた。このことはこの形態の菌体が再び増殖能を回復する可能性を持つことを示唆した。

(4) 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究を行った。食品を介したヒトのリステリア症の掌握では、疫学マーカーの同一性から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与を明らかにした。臨床由来および食品由来リステリア菌株の収集と疫学的、細菌学的な解析を進展させ強毒株の指標となりうるマーカーの検索を行ったうえ、そのカテゴリー分けを行った。リステリアの疫学マーカーの検索とその標準化を試み、特に *iap* 遺伝子の変異により疫学マーカーとして用いる方法について検討した。遺伝子の配列の差は、株の同一性を調べるのに有効であること、および *plcA* 遺伝子と *hly* 遺伝子においては、その保有状況が病巣由来株とそれ以外の株間ではっきりとした有意差が示された。非加熱喫食食品中のリステリアのリスクアセスメントを実施するにあたり、北海道内の2箇所のスモークサーモン製造施設を設定した。スモークサーモン加工過程における汚染を確認するもので、リスク評価の基礎データが得られ

た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hara-Kudo, Y., Watanabe, H. and Konuma, H. Differences in Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Various Conditions that Reenacts the Cooking of Lunches Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Diarrhea. *Epidemiology and Infection* (in press) .
2. 田中啓子、本井博文、工藤由起子. 麺および野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 損傷菌の検出に関する検討. *日本食品衛生学会誌*. 45: 113-119, 2004.
3. Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J., Agri. Food Chem.* 52:5740-5746, 2004.
4. Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Salmonella* in unpasteurized liquid egg and typing of the isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press)
5. 楠博文、笹井和美、馬場栄一郎、深田恒夫、高鳥浩介、植村興. 腸

- 管出血性大腸菌 0157 : H7 犬腸管内における挙動. 日本獣医師会雑誌 57(5):326-329 (2004)
6. Hara-Kudo, Y., Yamasaki, A., Sasaki, M., Okubo, T., Minai, Y., Haga, M., Kondo, K., and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial activity of green tea catechin for bacterial spore. J. Sci. Food Agri. (in press)
 7. 田中啓子、本井博文、工藤由起子. 惣菜中のセレウス芽胞制御における加熱処理の効果. 食品衛生学雑誌. 46: 1-7, 2005.
 8. Hayashidani, H., Hara-Kudo, Y., Kinoshita, S., Saeki, K., Okatani, A. T., Nomura, Y. and Kumagai, S. Differences in heat resistance among pathogenic *Yersinia enterocolitica* depended on growth temperature and serotype. J. Food Prot. 68: 1081-1082, 2005.
 9. D. H. Lee, D.-W. Han, B. J. Park, H. S. Baek, K. Takatori, M. Aihara, K. Tsubaki and J.-C. Park : The Influences of β -Glucan Associated with BMP-7 on MC3T3-E1 Proliferation and Osteogenic Differentiation., Key Engineering Materials Vols., 228-289 : pp. 241-244 (2005)
 10. 高鳥浩介、相原真紀、村松芳多子. 微生物汚染についての考え方. IBEC 24 : 5-9 (2004)
 11. 高鳥浩介、相原真紀. 細菌・真菌の計測と安全性評価—計測の必要性と安全性の理解のために—BE 建築設備 55(2) : 34-40 (2004)
 12. 高鳥浩介. 食品工場の空調と微生物. 食品工場長 日本食糧新聞社 92 : 12-13 (2004)
 13. Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A., Sugita-Konishi, Y., Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cocking for aroma and taste. J. Food Protection. 67: 2820-2824, 2004.
 14. In-Seop Lee, Masakazu Uzawa, Maki Aihara and Kosuke Takatori. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in effluent seawater by alternating current treatment. Appl. Environment. Microbiol. 70(3): 1833-1835 (2004)
 15. Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H., and Hara-Kudo, Y. Development of a Quantitative Real-Time PCR Method for Estimation of the Total Number of *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Foods. J. Food Prot. 68: 1083-1088, 2005.
 16. Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO_2 oxidation. Chemosphere. In press.
 17. Takahashi, H., Hara-Kudo, H., Miyasaka, J., Kumagai, S. and

- quantitative real-time
polymerase chain reaction
targeted to the *toxR* for detection
of *Vibrio vulnificus*. J.
Microbiol. Method, 61: 77-85,
2005.
18. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y,
Yamamoto S and Amano F. 2004.
Identification and Characterization of
an Oxidative Stress-Responsive
Protein from *Campylobacter jejuni*,
Homologous to Rubredoxin
Oxidoreductase/Rubredoxin. FEMS
Microbiol. Letters. 235(1):57-63.
19. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and
Igimi S. 2004. Nationwide survey of
Listeria monocytogenes infection in
Japan. Epidemiol Infect. 132: 769-772.
20. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S,
Igimi S. 2004. Overview of
Listeria monocytogenes
contamination in Japan. Int J Food
Microbiol. 93:131-140.
21. Tanaka Y, Takizawa M, Igimi S,
Amano F. 2004. Enhanced Release of
Prostaglandin D2 during Re-
incubation of RAW 264.7
Macrophage-Like Cells after
Treatment of Both
Lipopolysaccharide and Non-
steroidal Anti-inflammatory.
Drugs Biol Pharm Bull. 27: 985-
991.
22. Asakura H, Panutdaporn N,
Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S,
and Makino S-I. 2004. Isolation of
mini-Tn5Km2 Insertion mutants of
Salmonella enterica serovar
Oranienburg sensitive to NaCl-
induced osmotic stress. Microbiol.
Immunol. 48:981-984.
23. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K,
Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S
and Igimi S. An outbreak of
food-borne listeriosis due to
cheese in Japan, during 2001. Int
J Food Microbiol. in press.
24. 五十君静信、山本茂貴、春日文子。
2004。腸管出血性大腸菌の食品汚
染と対策。化学療法の領域。20巻
No. 9:1350-1354.
25. 五十君静信。2004。海外における
食品を介したリステリア症集団事
例紹介。「食品衛生研究」9月号
54:No. 9:7-14.
26. 五十君静信。2004。どう防ぐ？食
品を介したリステリア感染。食の
科学。10月号No. 320 : 44-51。
27. 五十君静信、岡田由美子。2005。
食品を介したリステリア症。化学
療法の領域。21巻No. 4 : 475-481.
2. 学会発表
1. 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157
の発芽野菜における研究。第 25 回
日本食品微生物学会。平成 16 年 9
月、東京。
2. 大塚佳代子、柳川敬子、高鳥浩介、
工藤由起子。LAMP 法による液卵か
らのサルモネラ検出および分離菌

- 株の細菌学的解析. 第24回日本食品微生物学会. 平成16年9月、東京.
3. 尾上洋一、工藤由起子、中川 弘、高橋淳子、高鳥浩介. 小規模液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点とその改善について. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 4. 古川一郎、尾上洋一、工藤由起子、高鳥浩介. 液卵による製造および加工施設内汚染を想定した *Salmonella* Enteritidis の生残性. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 5. 杉山明、矢野拓弥、中野陽子、赤地重宏、岩出義人、山内昭則、巽俊彰、伊藤英雄、工藤由起子、高鳥浩介. 養鶏場、食鳥処理場の施設及び鶏、卵等の *Salmonella* sp. 汚染状況. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 6. 大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 0157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 7. 工藤由起子、高鳥浩介. 流通液卵の細菌学的解析と液卵に関連するサルモネラ食中毒について. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 8. 工藤由起子. 卵および液卵のサルモネラ汚染について. 広島食品微生物研究会第5回衛生管理技術情報研修会. 平成17年3月. 広島.
 9. Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins The 8th International Symposium on Green Tea. May 2005, Soul.
 10. 工藤由起子、山田加奈子、松寄洋輔、吉川邦衛、林谷秀樹、熊谷進. 腸炎ビブリオの挙動解析に有用な指標菌の検索. 日本食品衛生学会第87回学術講演会. 平成16年5月、東京.
 11. 高橋肇、岩出義人、小沼博隆、工藤由起子. Real-Time PCR 法を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の定量法の確立. 第24回日本食品微生物学会. 平成16年9月、東京.
 12. 瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫. 光触媒を用いたノリ加工廃水の浄化・再生に関する研究. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 13. 高橋肇、宮坂次郎、工藤由起子、熊谷進、小沼博隆. ToxR 遺伝子を標的とした Real-Time PCR 法による *Vibrio vulnificus* の定量法. 日本食品衛生学会第88回学術講演会. 平成16年11月、広島.
 14. 工藤由起子. 海産物における腸炎ビブリオ汚染と制御. 日本食品微生物学会学術セミナー. 平成16年11月. 静岡.

15. 山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信。食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響。第 20 回日本微生物生態学会総会。2004 年 11 月 21-23 日。仙台。
16. 山崎学、長谷部保彦、北村和之、矢内原千鶴子、山本茂貴、五十君静信。 *Campylobacter jejuni* 検出用抗体：31 kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討。第 25 回日本食品微生物生態学会総会。2004 年 9 月 28-29 日。東京。
17. 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信。 *Campylobacter jejuni* の 27 kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性。第 77 回日本細菌学会総会。2004 年 4 月 1-3 日。大阪。
18. 奥谷晶子、五十君静信、山本茂貴。リステリア症診断のための ELISA 法の検討。第 77 回日本細菌学会総会。2004 年 4 月 1 日。大阪
19. 岡田由美子、牧野壮一、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。 *Listeria monocytogenes* の患者及び食品・環境由来株における病原因子関連遺伝子の保有状況。第 77 回日本細菌学会総会。2004 年 4 月 2 日。大阪
20. 五十君静信、奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴。わが国におけるリステリアの健康被害。衛生微生物技術協議会第 25 回研究会。2004 年 7 月 9 日。さいたま市
21. 岡田由美子、牧野壮一、廣田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。リステリアの病原性に関する検討。衛生微生物技術協議会第 25 回研究会。2004 年 7 月 9 日。さいたま市
22. Kajikawa A, Asai M, Satoh E, Okutani A, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY RECOMBINANT *LACTOBACILLUS CASEI* EXPRESSING *LISTERIOLYSIN O*. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
23. Kawamoto K, Makino S-I, Igimi S, and Takeshi K. THE FIRST FOOD-BORNE OUTBREAK ASSOCIATED WITH *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN JAPAN. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
24. Igimi S, Kajikawa A, Kim TW, Okutani A, Satoh E and Makino S-I. DEVELOPMENT OF *LISTERIA* VACCINE USING RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIA. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
25. Igimi S, Okutani A, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Makino S, Maruyama T. RESULTS OF NATIONWIDE SURVEY ON *LISTERIOSIS* AND THE INCIDENCE OF *LISTERIA* SPECIES IN RETAIL FOODS IN JAPAN. XV

- International Symposium on
Problems of Listeriosis Uppsala,
Sweden, September 12-15, 2004.
26. Okada Y, Makino SI, Okada N,
Yamamoto S, Igimi S. Role of
Listeria monocytogenes sigma
factors in survival of high
osmotic conditions. XV
International Symposium on
Problems of Listeriosis Uppsala,
Sweden, September 12-15, 2004.
27. 青山顕司、高橋千登勢、岡田由美
子、五十君静信、山本茂貴、丸山
務。食品および臨床由来*Listeria*
monocytogenes のパルスフィール
ド電気泳動解析 ー第2報ー。第25
回日本食品微生物学会。2004. 9. 28.
東京
28. 五十君静信。リステリアのリスク
アセスメント。第53回食と環境
のセミナー。2004. 10. 15 (東京)
29. Igimi S, Takeshi K, Kawamoto K,
Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S,
and Makino S-I. The first case of
food-borne listeriosis due to
natural cheese in Japan. UJNR
meeting. 2004. 11. 9. Atlanta.
30. 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、
朝倉宏、山本茂貴、五十君静信。
Listeria monocytogenes の σ 因子
の各種ストレス耐性における役割。
分子生物学会。2004年
31. 五十君静信。国内外における食中
毒の動向とその制御。微生物制御
システム研究部会公開講演会 “リ
ステリア菌の汚染の動向と制御～
欧米での最新情報から検査・制御
まで～。日本防菌防霉学会。
2005. 1. 19
32. 五十君静信。国内外のリステリア
による食中毒の現状とその対策。
チルド食品研究会。2005. 3. 1
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定
を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分 担 研 究 報 告 書

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌

およびサルモネラ食中毒の予防に関する研究

高 鳥 浩 介

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

細菌性食中毒の予防に関する研究

主任研究者 高鳥浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

生食用の食肉および野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌および
サルモネラ食中毒の予防に関する研究

分担研究者 高鳥 浩介（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究要旨

日本の細菌性食中毒の予防のために、主要な原因物質である腸管出血性大腸菌については食品からの効果的な検出方法について、サルモネラについては野菜・香辛料等の特に乾燥食品での汚染について検討した。また、食中毒細菌の感染菌量の把握を目的に全国の地方自治体に食中毒事例における原因食品中の食中毒細菌数測定について調査依頼を行った。これらについて以下の6つの研究課題を実施した。

- (1) O157 以外の血清型を含む腸管出血性大腸菌の食品からの検出方法に関する研究
- (2) 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価
- (3) 腸管出血性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌に関する研究 —大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌O169を適確に釣菌する手法の検討—
- (4) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究
- (5) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究
- (6) 食中毒事例における原因食品中の汚染菌数に関する研究

研究協力者

工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
加地 祥文	横浜検疫所	尾上 洋一	神奈川県衛生研究所
飯塚 信二	横浜検疫所	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
鈴木 荘介	神戸検疫所	山路 史子	国立医薬品食品衛生研究所
鎌倉 和政	神戸検疫所	西川 禎一	大阪市立大学
熊谷 進	東京大学大学院	大友 良光	弘前大学医学部
江戸川区江戸川保健所		福山市保健所	
大分市保健所		沖縄県福祉保健部薬務衛生課	
奈良県福祉部健康安全局食品・生活安全課			