

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

## 細菌性食中毒の予防に関する研究

平成17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18（2006）年3月

## 目 次

### 総括研究報告書

細菌性食中毒の予防に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	1
高鳥 浩介	

### 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・・・・・・・・・・・・	21
高鳥浩介	

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・・・・・・・・	95
工藤由起子	

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・・・・・・・・	131
山本茂貴	

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・・・・・・・・	177
五十君静信	

# 総括研究報告書

## 細菌性食中毒の予防に関する研究

高鳥 浩介

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つであり今年度の研究要旨は以下の通りであった。

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成果を得た。サルモネラについては、輸入の香辛料や魚介類における汚染とその菌株の解析を行った。ビブリオ・バルニフィカスは、効果的な分離方法が必ずしも解決されておらず、さらに感染源や経路の解明を究明する必要があり検討を行った。鶏肉からのカンピロバクター分離法の標準化を検討し、微好気環境の簡易法としての気密袋について検討した。好気ストレスによってコッコイド化した本菌について、mRNA の発現を解析した。カンピロバクターは鶏が主な保菌動物であり、その調査を行った。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としてわが国独特の魚介類加工無調理摂取食品におけるリステリアの挙動を中心に、リステリアの危害分析に関する基礎的な知見をまとめた。

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

## A 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ビ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  
今年度の研究目的は以下の通りである。

腸管出血性大腸菌による食中毒は血清型 0157 によるものが多いが、日本では毎年血清型 026 及び 0111 による患者も多く、適切な方法を開発した。今年度は自然汚染検体で試験し、さらに応

用方法を加えることを検討する必要がある。

また、以前から野菜・香辛料や魚介類等についてサルモネラ等の食中毒菌の汚染等があることが報告されている。このため、昨年度に香辛料・ハーブ等についてサルモネラを対象として汚染状況を中心に調査し今年度は株の解析をし、さらに魚介類についても汚染調査を行い株の解析をする必要がある。

さらに、日本で問題になっている主要な食中毒原因菌による食中毒事例を調査し摂食状況や発症菌量を各自治体の協力により事業を進める。

ビブリオ・バルニフィカスはビブリオ属菌の中でも最も重症化し致死性が高い疾病を引き起こすが、原因食品や汚染源の解明のために海水や生物または食品等からの分離は、困難な場合が多い。このため、効果的な分離方法を確立し、感染源や経路の解明を確実に効率よく行う必要がある。また、腸炎ビブリオについても海水中の菌数を把握し、魚類における汚染部位をリアルタイム PCR を用いた定量法を検討する必要がある。

近年、細菌性食中毒の予防対策にはリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が世界的に求められている。そこで、我が国においても、主要な細菌性食中毒の原因菌および食品を対象に、その汚染頻度や高汚染食品を把握するとともに食中毒の発生菌量を調べ、

これらの結果をもとに我が国独自の微生物学的リスクアセスメントを試みる必要がある。

カンピロバクターの研究においては、分離培養法を確立し、市販鶏肉の汚染率及び菌数調査を行い、ブロイラー飼育農家での汚染率を調査する。コッコイド化した本菌の mRNA の発現について、本食中毒の主な原因菌種であるカンピロバクター・ジェジュニを用いて PCR 法で解析・検討することを目的とした。

我国における食品媒介感染症としてのリステリア症の発生状況を把握し、そのヒトへの危害について科学的に分析を行い、リスクマネジメントに必要な科学的根拠を提供する。危害の想定される特定の非加熱喫食食品については、リスクアセスメントを試み、具体的なリスクマネジメントの方法に関する情報を提供する。これにより、リステリアによるリスクが明らかとなり、食品を介したヒトのリステリア症の発生を未然に防止できることが期待される。今年度は、魚介類加工無調理摂取食品を主な対象として研究を進める。

## 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

自然汚染食肉検体での検出： 国内で入手した輸入牛肉 324 検体を供試した。増菌培養液の VT スクリーニングに LAMP 法を用い、また、免疫磁気ビーズ（血清型 0157、026 及び 0111）を用いた分離培養を行った。さらに、LAMP 法で陽性の検体における VT 陽性菌の検出を行った。

低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討： 牛ひき肉に菌接種または非接種とし各血清型（0157、026 及び 0111）菌を、約 10—50 cfu を接種し LAMP 法及び分離培養に供した。また、食品増菌液に腸管出血性大腸菌の各種希釈菌液を接種し、培養法及び遺伝子検出法の各種遺伝子検出法の限界を比較検討した。遺伝子検出のための DNA 抽出法は熱抽出法及び PrepMan 抽出法を行った。

2) 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおける PCR 法の適用

EPEC、EPEC 及び EIEC 株を陽性対照として試験に供した。動物性食材 55 品、植物性食材 60 品を検体とし、増菌液についてマルチプレックス遺伝子増幅法（PCR）による下痢原性大腸菌病原遺伝子の検出を行い、PCR 法の検出感度試験や増菌培養液中の食品微生物による阻害を検討した。

3) 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

鶏肉及び香辛料から分離した *Senftenberg* 及び *Weltevreden* について、ヒト由来の同血清型株と PFGE 法（制限酵素：*Bln I*）による遺伝子解析による相同性を比較した。

4) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビ、イカ計 353 件（原産国：中国、インド、インドネシア、ベトナム、タイが 68.8%）について調査した。

5) 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

106 自治体から情報が得られた。依頼項目として、原因物質名、患者数（人）原因食品中の菌数、原因食品の推定摂食量、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

国内の 5 地域の産地の明らかな鮮魚介類を対象とし、増菌培養法を検討した。また、PCR 法にて *V. vulnificus* の遺伝子を検出し、ヘモリジン遺伝子および *toxR gene* の保有を確認した

2) 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長

2004 年 9 月から 2006 年 3 月に、有明海沿岸海水総計 133 検体が得られ

ブリオの消長を検討した

### 3) 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

東京湾において魚類（計 30 検体）を採取し、鰓、消化管（胃～肛門）について検索した。

## 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) 培養法の検討

鶏皮付モモ肉試料 25g を気密性袋に採取し、Preston 培地 100ml にて 5 倍希釈し、1) と同様に分注した試験管各 9 本を微好気および好気培養するとともに、シールした残液袋を好気大量培養後、分離培地として mCCDA および Butzler 培地を用いて MPN 定量値と定性結果を比較した。

### 2) コッコイド化した菌の mRNA の発現

コッコイド化した菌の解析には、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。すなわち、好気ストレス後、菌体を回収し全 RNA を抽出した。抽出した RNA から cDNA を調製し、これを鋳型として、DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrA*)、および酸化ストレス応答タンパク質 Rrc 遺伝子 (*rrc*) に対するプライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA の発現を解析した。一方、微好気培養

した後に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、同様に解析した。

### 3) ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

鹿児島県下のブロイラー飼育農場から食鳥処理場に搬入されたブロイラーの盲腸内容物をプレストンブロス、バツラー寒天培地で 4 2℃ 4 8 時間増菌選択培養し、菌株を収集した。2 週ごとに 2 農場 2 鶏群ずつ（1995 年度：1 鶏群 5 羽、2003 年度から 2005 年度：1 鶏群 16 羽）調査した。ナリジクス酸感受性はディスク法（30 μg）で調べた。

## 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) 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

原材料、製造工程、製造環境におけるリステリアの汚染状況を調査し、漬け込み工程については菌の接種試験を試み、リステリアの菌数の変動を明らかにした。

### 2) 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

調味液およびバラコ試料にリステリアを接種し、菌数の変動を検討した。製造工程における菌の消長を制御する因子を検討した。

### 3) 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動



魚卵加工品はリステリアの汚染率が比較的高いことが知られており、食品を摂取する時点での菌数を予測するため、たらこ明太子について本菌を接種し、温度管理の違いによる菌数の挙動を調べた。

#### 4) 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析

食品および環境から分離した 88 株のリステリア菌株につき、遺伝子レベルで検討を行った。

#### 5) リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

食品及び環境由来株、臨床由来株を各約 100 株を用いて、環境ストレス抵抗性について調査し、比較検討した。

(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。今年度は、菌株の性質の検討が中心で、疫学情報を扱う研究は無かった。

## C. 研究結果

### 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

自然汚染食肉検体での検出を行ったところ供試 324 検体中 5 検体の増菌培養液について LAMP 法 VT 遺伝子検出スクリーニングによって陽性反応が認められた。しかし、血清型 0157、026 及び 0111 を対象とした免疫磁気ビーズ法による検出では陰性であった。

### 2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

本研究で用いた増菌方法は 0157 の検出には優れていることが再確認された。また、0157、026 及び 0111 の検出に LAMP 法及び Real-time PCR 法が遺伝子検出法として使用可能であることが確認された。

### 3) 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおける PCR 法の適用

FDA 二段培養法が BPW-STG 法より高い大腸菌群検出率を示した。肉類は 80% 近い陽性率を示した。

### 4) 食品及び人由来 *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

食品及びヒト由来 SS 7 株と SW 8 株の PFGE パターンを比較し、相同性を検討したところ、食品由来の SS 2 株はヒト由来株と同一の PFGE パターンではなかつた。

った。

#### 5) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビ 212 検体のうちインドネシア産及びベトナム産のブラックタイガー各 1 検体計 2 検体から *S. Weltevreden* を分離した。

#### 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

106 の協力自治体から実際に測定結果の得られた事例は 5 件であった。内訳はサルモネラ 3 件、毒素原性大腸菌 1 件、カンピロバクター 1 件であった。病原物質の推定摂取量は、サルモネラ 288 MPN、400 MPN 及び  $10^{10}$  cfu、毒素原性大腸菌約 25 MPN、カンピロバクター 360 MPN が推定された。

### 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・バルニフィカスの検査法の検討と汚染実態

ビブリオ・バルニフィカスの海産物からの検出方法を温度や遺伝子検出を組み合わせ検討した。増菌については、これまでどおりに APW を使用し培養温度 35°C が妥当であった。また、分離培地には酵素基質培地の使用が必須であり、遺伝子検出法の併用によって感度を補える。国内 5 県の海域は検体の約半数以上から検出され、特に、九州地域では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2% も認められ環境に高菌数

で生息することが判明した。

#### 2) 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長

*V. vulnificus* は、133 検体中 48 検体から菌分離され、59 検体が PCR で検出された。*V. parahaemolyticus* は 92 検体から菌分離された。

沿岸 4 地点の海水では *V. vulnificus* と *V. parahaemolyticus* は水温とともに MPN 値が上昇していることが確認された。A、C、E の 3 地点は夏季に MPN 値の上昇が見られたが、F 地点は通年 MPN 値が低いが見出された。

#### 3) 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

全検体の体表において腸炎ビブリオは検出されなかった。検体のそれぞれの部位の腸炎ビブリオ検出率は鰓では 6/30 (25%)、消化管では 14/30 (47%) であった。

### 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) 培養法の検討

大量培養法： ×5 希釈試料による大量培養(好気培養法)では、mCCDA 培地で陽性率 50% (8/16)、Butzler 培地で 44% (7/16) を示した。

MPN 定量法： ×5 希釈試料による MPN 法(微好気培養法)では、mCCDA 培地、Butzler 培地とも陽性率 81% (13/16) を示し、MPN 値は <15~>5500 MPN/100g であった。

微好気および好気培養法の MPN 定量値の比較では、微好気培養法が高値あるいは同値を示すものが 81%(13/16)であった。一方、好気培養法は 50%(8/16)であり、微好気培養法の方が高値または同値であった。

気密性袋を用いた好気培養による大量培養法および MPN 法でも、高率にカンピロバクターが検出されたことから、本袋を使用すれば、必ずしも微好気培養を行わなくとも Preston 培地中でのカンピロバクターの増殖が可能なことが認められた。

## 2) コッコイド化した菌の mRNA の発現

前年度までの研究結果同様、嫌気処理後にストレスを与えた菌では、ストレス 24 時間後では、培養液中の菌の約 40%の菌体が、ストレス 48 時間後では、約 90%の菌体がコッコイド化し、菌体構成成分の障害・変性が最小限に抑えられていることを確認した。一方、微好気処理した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認められなかった。ストレス 24 時間後の菌体の mRNA について解析した結果、微好気培養後にストレスを与えた場合、標的とした遺伝子 *gyrA* および *rrc* の mRNA の発現は検出限界以下であり、認められなかった。一方、嫌気処理後にストレスを与えた場合では、発現量の減少は認められたものの、これらの mRNA が検出され、菌体内で両遺伝子

の発現がまだ行われていることが確認された。さらに、ストレス 48 時間後の菌体の mRNA についても解析した結果、嫌気処理した後にストレスを与えた菌体では *rrc* の mRNA の発現が認められた。

## 3) ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

農場における汚染実態、ブロイラー個体における菌汚染実態から、2003 年度では 45 鶏群中 26 鶏群がカンピロバクター陽性を示したが 2005 年度では 44 鶏群中 9 鶏群と減少傾向が認められた。2003 年度は 81 株中 33 株が耐性を示し、2004 年度もほぼ同様な値を示したが、2005 年度は 36 株中耐性が 6 株と減少を示した。2005 年度では耐性株はすべてカンピロバクター・ジェジュニであり、カンピロバクター・コリはすべて感受性であった。

## 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) 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

塩たらこ製造において、原材料から最終製品に至るすべての過程におけるリステリアの危害分析を行った。漬け込み工程で使用される運搬用パレットと樽移動用コンベアーから菌が検出され、これら使用器具・機材からの交叉汚染が製品への汚染に重要であることが示された。

2) 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

辛子明太子の製造過程における本菌の消長の検討から、pH5.9かつAw0.95以下の調味液を使用して6℃の温度で辛子明太子を製造すれば、リステリアの生菌数は減少して行くことが示された。

3) 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動

今回の検討で辛子明太子では、4℃、10℃共に菌数の減少が、たらこでは、4℃において菌数の減少が観察された。

4) 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析

わが国におけるリステリア分離株が3つの分子進化学的系統からなることが明かとなり、輸入食品を通じわが国に輸入された輸入株のあることがわかった。

5) リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

高食塩濃度耐性能に関しては、食品・環境由来株と臨床由来株の間に差は見られなかったが、低温増殖能に関しては食品・環境由来株が抵抗性を示した。ヒト腸管上皮細胞由来の Caco-2 細胞内での増殖性の強い株（強毒株）は細胞内増殖性の弱い株と比較して、食塩抵抗性が強い株の割合が高い傾向が認められた。

## 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) 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

低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討では、腸管出血性大腸菌の検出法として迅速で高感度な方法の開発が示されたが、増菌培養は、血清型によって適切な方法が異なることが考えられ、さらに検討することが望まれた。

2) 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおけるPCR法の適用

菌を分離できていないことや、PCRの陽性判定を増幅されたDNA産物のサイズのみによって判定しているため、偽陽性の可能性を否定できないが、PCRを用いたスクリーニングによって、市販食材が種々の下痢原性大腸菌によって汚染されている可能性が示唆された。

3) 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析

タイや沖縄県で SW を起因菌とする事例が少なくないため今後検討する必要がある。

4) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

サルモネラはエビからのみ検出され H<sub>2</sub>S 産生性の違いや異なる PFGE パターンを示したことから、潜在的な病原菌が混在してエビを汚染している可能性が疑われた。

## 5) 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

サルモネラ 3 件、病原性大腸菌（毒素原性大腸菌）1 件、カンピロバクター 1 件の解析であったが、さらに情報の蓄積を行いたい。

## 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

昨年に得られた結果をもとにビブリオ・バルニフィカスの定量検査方法について増菌・分離培養および遺伝子検出方法を検討したところ分離培養法より PCR 法の方が検出率が高かった。このことから、PCR 法を用いた方が正確に測定が行われることが考えられる。ビブリオ・バルニフィカス生息環境の地域的な特徴があり、これは患者の発生率と魚介類の汚染率に関連があることを示している。また一方で、患者の発生が少ない地域においても汚染率は認められるため、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) 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長

*V. vulnificus* 感染症による患者の発生は有明海沿岸の 4 県に集中している。本調査の結果、沿岸 7 地点の海水では 7 月～10 月に *V. vulnificus* が分離された。海水温と *V. vulnificus* の関係は、菌分離

で 15.5℃を下限とし、PCR で 14℃を下限とし、検出されなく、塩分と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 28‰を上限とし、PCR で 32‰を上限とし、検出されなかった。海水温、塩分と本菌の関係は、海水温で正の相関、塩分で負の相関が推察された。

### 3) 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量

魚類における部位別の腸炎ビブリオの定量実験を行った結果、腸炎ビブリオの検出率においては、鰓よりも消化管が高い検出率を示した。腸炎ビブリオ数に関しては、消化管において多く定量でき、消化管よりは少ないが鰓からも定量された。この要因の一つとして、供試した魚の食性が原因だと考えられる。

## 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) 培養法の検討

大量培養法：培地希釈率に関しては、×5 希釈を用いた気密性袋による大量培養法は×10 希釈と同等以上の陽性率を示し、×5 希釈を用いた MPN 法は、微好気および好気培養とも×10 希釈と同等の陽性率および MPN 値を示した。このことから、操作量は増えるものの、定量値が得られるとともに、必要培地量が大幅に削減できるメリットもあることから、定性法としても有用性が示された。

MPN 定量法：MPN 法による定量値の比較では、×5 希釈での微好気培養による MPN 法は、好気培養法による MPN 法より高 MPN 値を示す割合が高く、×10 希釈の MPN 法では逆の傾向がみられたことから、希釈倍率と微好気および好気培養間での MPN 値に関する差異傾向についてはさらに検討が必要と考えられるが、その MPN 値は 95% 信頼限界の下限および上限域に互いにオーバーラップするものも多かったことから、気密性袋を用いた MPN 定量検査法の有用性が示唆された。

## 2) コッコイド化した菌の mRNA の発現

コッコイド化したカンピロバクターの特性に関する科学的な知見は極めて少なく、この問題の解決には到底至っていない。前年度の研究から、コッコイド化した菌では、好気ストレスによる菌体構成成分の障害・変性は最小限に抑えられていることが示唆された。そこで、今年度は、この状態の菌が生きているか否か、mRNA の発現を解析することで検討した。その結果、コッコイド化した菌を 90%の含む培養液中の菌体から mRNA の発現が確認された。この結果は、コッコイド化した菌の中にはまだ生きている菌体が存在することを示唆する。このようなコッコイド化した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と考えられる。従って、遺

伝子の発現を確認したことによって明らかとなったまだ生きているコッコイド化したカンピロバクターについて、実際の環境中において、これが汚染拡大につながる水平伝播や感染に関与しているか否か、明らかにする必要性が強く指摘される。

## 3) ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

本調査では個々の農場の衛生管理状態に関する情報まで把握できておらず、菌分離頻度の減少傾向に関わる特定の要因は明確ではない。しかしながら、カンピロバクター陽性鶏群の減少は、ブロイラー飼育農家に対する衛生指導の効果を表しているのかもしれない。一方、1990年代から増加してきたキノロン系抗菌剤耐性菌は2004年までは減少しておらず、2005年度のみ低い値を示した。無薬飼育の普及等による衛生管理意識の増大によるものかもしれないが今後の耐性率の変動を続けてモニターし解析していく必要がある。

## 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) 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

塩たらこ製造工程における交叉汚染は、使用器具・器材を介して中間製品あるいは最終製品が汚染を受ける可能性があるため、一般的衛生管理事項の

再点検と、器具・器材の徹底した洗浄・殺菌を行い、定期的な細菌検査によって常に衛生状態を確認する必要がある。

2) 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

調味液の組成と温度管理により本菌の生菌数の減少が起こったのは、温度、pH、Aw あるいは浸透圧などの複数の要因によって菌の増殖が抑制され、一部は分裂能が消失したためと思われる。

3) 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動

辛子明太子、たらこ共に厳密な温度コントロールは重要である。

4) 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析

最近、輸入食品を介して、新たなるリステリアの菌群が入りつつあり、本菌の疫学に重要な影響を与えうる。

5) リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

食品分離株の中には、病原性と環境抵抗性が強く、ヒトへの感染リスクが高いと思われる菌株が存在していることが示されたため、今後その割合や特徴に関する知見を収集刷る必要がある。

## 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

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法に関して、

自然汚染食肉検体での検出を昨年度に確立した方法を応用し国内の輸入牛肉を対象に検出を試み、国内でも患者が報告されている血清型 OUT 株を分離した。

2) 腸管出血性大腸菌低菌数接種食品について、血清型 0157、026 及び 0111 で検討し、迅速で高感度な方法の開発が示された。

3) 志賀毒素産生性大腸菌及び腸管毒素原性大腸菌による食材汚染のスクリーニングにおける PCR 法の適用では、市販食材が種々の下痢原性大腸菌によって汚染されている可能性が示唆された。

4) 食品及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析では、両血清型株について食品及びヒト由来株の一部は遺伝学的に近似した。

5) 魚介類のサルモネラ汚染ではサルモネラの輸入魚介類のエビから多く検出した。菌株の血清型はいずれも *Weltevreden* であった。

6) 食中毒事例の原因食品中の菌数について、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

1) ビブリオ・バルニフィカスの海産物からの検出方法を温度や遺伝子検出を組み合わせで検討した。増菌については、これまでどおりに APW を使用し培養温度 35°C が妥当であった。

2) 国内 5 県の海域は検体の約半数以

上から検出され、特に、九州地域では環境に高菌数で生息することが判明した。

3) 海水中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の季節消長では、海水温と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 15.5℃を下限とし、PCR で 14℃を下限とし、検出されなかった。塩分と *V. vulnificus* の関係は、菌分離で 28‰を上限とし、PCR で 32‰を上限とし、検出されなかった。

4) 腸炎ビブリオの魚類における部位別定量については、鰓及び消化管では、腸炎ビブリオが高頻度かつ高菌数で検出された。

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) 気密性袋を用いた×5希釈試料による大量培養法は、カンピロバクター定性検査に使用可能と考えられた。

2) 気密性袋を用いた×5希釈試料による MPN 定量法は、大量培養法と比較して同等あるいはそれ以上の検出感度を示し、定性検査としても有用と考えられた。

3) 気密性袋を用いた×5希釈による MPN 定量法では、微好気培養法に比較して、陽性率および定量値が低くなる傾向がみられたことから、さらに検討が必要と考えられた。

4) コッコイド化した菌体の中には、mRNA を発現し、まだ生きている菌が存在していることが示された。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が示唆された。

5) 農場（鶏群）およびブロイラー（個体）における菌汚染実態を調査した結果、カンピロバクター陽性鶏群、個体ともに減少傾向が認められた。分離された菌のナリジクス酸耐性は 2005 年度に減少傾向を示した。

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) 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析から漬け込み工程で使われる運搬用パレットと樽移動用コンベアーから菌が検出され、これら使用器具・機材からの交叉汚染が製品への汚染に重要であることが示された。

2) 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長をみたところ、pH5.9 かつ Aw0.95 以下の調味液を使用し、6℃の温度で辛子明太子を製造し、リステリアの生菌数は減少する。

3) 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動をみたところ辛子明太子では、4℃、10℃共に菌数の減少、たらこでは、4℃において菌数の減少を認めた。

4) 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析から、わが国におけるリステリア分離株が3つの分子進化学的系統からなることが明かとなり、輸入食品を通じわが国に輸入された輸入株のあることがわかった。



5) リステリアの食品内での生残性・増殖性とヒトへの感染リスクでは、高食塩濃度耐性能に関して、食品・環境由来株と臨床由来株の間に差はみられなかったが、低温増殖能に関しては食品・環境由来株が抵抗性を示した。ヒト腸管上皮細胞由来の Caco-2 細胞内での増殖性の強い株（強毒株）は細胞内増殖性の弱い株と比較して、食塩抵抗性が強い株の割合が高い傾向が認められた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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*. 13:1043-8, 2005.

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.

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.

Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y.,

Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 195-199, 2006.

Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins. *Proceedings, The 8th International Symposium on Green Tea*, 41-52, 2005.

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.* 85:2354-2361, 2005.

Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M. Loop-Mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*. 253:155-161, 2005.

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. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6730-6735, 2005.

工藤由起子、尾上洋一、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. 印刷中.
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., and Takatori, K. Incidence of *Salmonella* in imported spices in Japan. *J. Food Prot.* In press.
- Daisuke Nakajima, Ruri Ishii, shiho Kageyama, Yoshiki Onji, Shigeru Mineki, Nobuhisa Morooka, Kosuke Takatori and Sumio Goto : Genotoxicity of microbial volatile organic compounds. *Journal of Health Science*, 52(2), 148-153
- 高橋浩介 : 細菌毒, 真菌毒, 自然毒. *臨床と微生物* 33(3), 269-274 (2006).
- 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  $\beta$ -Glucan Associated with BMP-7 on MC3T3-E1 Proliferation and Osteogenic Differentiation. *Key Engineering Materials Vols.*, 228-289, 241-244 (2005)
- B. J. Park, S. C. Kim, D. H. Lee, H. J. Son, K. C. Nam, K. Takatori, M. Aihara and J.-C. Park : Computer-Assisted Image Processing Techniques for Quantitative Analysis of Cell Migrations on Collagen-Coated Glass. *Key Engineering Materials Vols.*, 288-289, 503-506 (2005).
- T. HASEGAWA, Y. YOSHIDA, J. KOSUGE, T. HAGA, Y. GOTO, T. SHINJO, K. UCHIDA, R. YAMAGUCHI, S. TAKEYAMA, K. TAKATORI: Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. *The Veterinary Record*, 156, 23-24
- 工藤由起子、三輪憲永、山崎省吾、八柳潤、岩出義人、高橋肇、宮坂次郎. 魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. *感染症学会誌*. 79: 931-936, 2005.
- Takahashi, H., Hara-Kudo, H., Miyasaka, J., Kumagai, S. and Konuma, H. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificu*. *J. Microbiolog. Method*, 61: 77-85, 2005.
- Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO<sub>2</sub> oxidation. *Chemosphere*. 62: 149-154, 2006.
- Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic bird in Japan. *Epidemiology and Infection*. In press
- Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 195-199,

- 2006.
- 国井悦子他：鶏肉のカンピロバクター培養検査法の検討-鶏肉の検査方法別検出感度および検出率の比較，広島市衛生研究所年報，24,49-54(2005)
- Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. Int J Food Microbiol. 105:455-462. (2005)
- Ueda F, Yugami K, Mochizuki M, Yamada F, Ogasawara K, Fujima A, Shoji H, Hondo R. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. Jpn J Infect Dis. 58:289-293. (2005)
- Ueda F, Ogasawara K, Hondo R. Analysis of the molecular evolution of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese meats and environment. Jpn J Infect Dis. 58:320-322. (2005)
- Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, Sata T, Ogasawara K, Fujima A, Hondo R. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. J Microbiol Methods. 66:96-103. (2006)
- Ueda F, Ogasawara K, Hondo R. Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from imported meat in Japan. Jpn J Infect Dis. 59:54-56. (2006)
- Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int J Food Microbiol. 104:189-196. (2005)
- 牧野壯一，武士甲一，2005. 危機管理：バイオテロリズムへの対応，細菌毒素. 臨床と微生物，32 :621-627.
- 牧野壯一，武士甲一，2005. 食品微生物検査の簡易・迅速・自動化に関する最近の動向，資源環境対策，41(12):74-79.
- 仲真晶子 食品媒介リステリア症. 防菌防黴 34 : 149-154 (2006)
- 五十君静信、岡田由美子. 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. (2005)
- 酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山 務、五十君静信、柳平修一. ナチュラルチーズからの *Listeria monocytogenes* 検出における自動免疫蛍光測定装置の利用. 日本食品微生物学会誌 22 : 17-23. (2005)
- 五十君静信. リステリア症の概況と対策. 月刊フードケミカル 21(5):32-37. (2005)
- 五十君静信. リステリア菌の汚染実態と制御. 食品工業. 48(12):29-35. (2005)
- 五十君静信. リステリアの食品汚染とリスク管理. 食品衛生学雑誌. 46:J237-239. (2005)
- 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. チルド研究

会情報. No. 54:23-27. (2005)

( 書籍等 )

五十君静信. 食品媒介リステリア症の原因と発症の特徴. 食中毒検査・診療のコツと落とし穴. 中山書店. P. 28-29. (2006)

五十君静信. リステリア症の診断法. 食中毒検査・診療のコツと落とし穴. 中山書店. P. 112. (2006)

五十君静信. ヒトのリステリア症. 獣医感染症カラーアトラス 第2版. 見上彪監修. 文永堂出版株式会社. P201-203. (2006)

## 2. 学会発表

工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について. 平成17年度食品衛生監視員等研修会. 平成17年6月28日. さいたま市.

小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子. 香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について. 日本食品衛生学会第89回学術講演会. 平成17年5月. 東京.

佐々木美穂、近藤和雄、大久保勉、小西良子、工藤由起子. 緑茶カテキンの芽胞形成菌に対する抗菌活性. 日本防菌防黴学会. 平成17年5月. 大阪.

後藤元樹、高橋肇、Jagannath、林谷秀樹、高鳥浩介、工藤由起子. 黄色ブドウ球菌の定量 PCR. 第25回日本食品微生物学会. 平成17年11月. 金沢.

谷口裕之、工藤由起子、熊谷進. 絶飲絶食ストレス下のウズラにおけるサルモネラ経口感染. 日本防菌防黴学会. 平成17年5月. 大阪.

飯渕り子、工藤由起子、熊谷進. 乾燥環境におけるサルモネラの生存. 日本防菌防黴学会. 平成17年5月. 大阪.

飯渕り子、工藤由起子、熊谷進. サルモネラのバイオフィーム形成性と乾燥環境下における生残. 第140回日本獣医学会学術集会. 平成17年9月. 鹿児島.

山路史子、大塚佳代子、古川一郎、尾上洋一、大友良光、工藤由起子. 香辛料、ハーブ等におけるサルモネラ汚染. 日本食品衛生学会第91回学術講演会. 平成17年10月. 埼玉.

右井淳子、近藤和雄、澤田拓士、工藤由起子. シリアル、ドライフルーツ及びシード類におけるサルモネラ及び黄色ブドウ球菌の生残に関する研究. 日本食品衛生学会第91回学術講演会. 平成17年10月. 埼玉.

大塚佳代子、倉園貴之、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品及び人における *Salmonella* Senftenberg と *Weltevreden* の分布と細菌学的解析. 第25回日本食品微生物学会. 平成17年11月. 金沢.

工藤由起子. 卵でのサルモネラ汚染とその食中毒について. 静岡県平成17年度食中毒処理研修会. 平成17年11月16日. 静岡市.