

USDA 法（参考資料 5）に、カナダの検出法（参考資料 6）、ISO 法（参考資料 7）そして、参考文献として（FDA 法と ISO 法での比較検討実験報告）（参考資料 8）についてサルモネラ検出法を検討した。それらを比較表にまとめた。

（参考資料 9）

選択培地が 2 種類も必要であるか？また、分離寒天平板培地が 2 種類も必要かについて検討が行われた。

平成 16 年度食品における微生物汚染実態調査の結果を入手するとともに、さらに聴き取り調査および、分析を行い、次のような結果がまとめた。全国の 18 カ所の自治体で実施された中で、15 カ所の自治体がサルモネラを検出した。総検体数 2786 検体中 46 検体にサルモネラ検出があった。検出されたものは、みつばで 1 検体、レタスで 1 検体、ミンチ肉（牛）2 検体、ミンチ肉（豚）5 検体、ミンチ肉（牛豚混合）2 検体、ミンチ肉（鶏）26 検体、牛タタキ 1 検体、鶏タタキ 4 検体、カキ（生食用）2 検体、その他生食用食肉 1 検体、その他加工用食肉等 1 検体にサルモネラが検出された。特に 103 検体中 26 検体にサルモネラが検出された鶏肉はサ

ルモネラ汚染の代表品目であると考えられる。ただし、血清型まで、検討してくれた自治体の報告によれば、鶏から検出されるのは *Salmonella Infantis* あるいは *Salmonella Enteritidis* であり、*Infantis* の方が圧倒的に検出確率が高かった。この検出方法は BPW 前増菌後、RV と TT での選択培養後に、2 種類の分離用寒天平板培地にて検出する方法で行われているが、RV と TT のどちらの培地から、また、どの寒天平板から検出したかを聴き取りにより調査したところ、次のような結果が得られた（参考資料 10）。RV 選択培地のみ使用したとすると、サルモネラの捕捉率は 91% となり、TT 選択培地のみを使用したとすると捕捉率は 71% となった。RV のみ選択培養液では 9% のサルモネラを検出できないことになり、TT のみでは、29% のサルモネラが検出できなかつたことになる。また、分離用寒天平板培地としてはどちらかだけでは見落としがあり得ることになる。もっとも、検出されたサルモネラはすべて、硫化水素產生性サルモネラであった。

3. サルモネラ検査法原案を「食

品からの微生物検査標準法検討委員会」へ提出

1回目平成17年11月22日

- 4.. 「食品からの微生物検査標準法検討委員会」での検討項目の提示

主に、選択培地での培養温度とその使用機器での温度幅について

5. サルモネラ検査法原案を
「食品からの微生物検査標準法検討委員会」へ提出

2回目平成18年2月14日

培養温度と培養機器に関する実験では、次のような結果を得た。(結果表1)に示した。恒温槽中の培養では、41°Cでの培養が、もっとも黒色コロニーを多く出現させた。42と43°Cでの恒温槽培養では、黒色コロニーが少數検出された。インキュベーター中の実験では、42と41.5°Cの培養温度とも検出コロニー数は多く、良好な結果が得られた。

D. 考察

選択培養時の温度設定と使用機器においては、 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の温度幅でコントロールされているインキュベーターで、42あるいは41.5°Cの温度設定が良好な検出結果を示した。ただし、検出結果を黒色コロニーでの出現数に限定して計測したため、コロニーの出現数が多すぎる場合には、黒色コロニーにはならないと考えられる。その場合には見かけ上検出率は低くなっ

てしまつた可能性がある。選択培養液の原液をスパイラルプレーターで塗抹した場合にはどの条件においても黒色コロニーの出現は見られなかつた。実際の検査において、サルモネラの出現を検出する場合にはエーゼを用いたコロニーアイソレーション技術での塗抹をするのが一般的であるので、実際の検査では、もっと効率よくサルモネラの検出ができるものと思われる。しかし、 10^{-3} 希釈でのスパイラルプレーター塗抹での出現コロニー数はこのエーゼでの塗抹に相当する菌濃度と菌数が塗抹されると考えられる。これらのことから、選択培養液の温度コントロールは $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で管理のできる恒温水槽を使わなくとも、 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の管理できるインキュベーターで充分であり、41-42.5°Cの温度範囲でも充分であることから、従来の選択培養温度 $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で充分であると結論できる。

サルモネラの提案すべき検出法については、参考資料11に示した。

この示したサルモネラ検出法については、液卵のサルモネラ検出法あるいは「食品における微生物汚染実態調査」とおおむね一致した検査法であり、検査日数についても判定まで4日間を要する。このことが検査を充分数行うための妨げになっていることも考えられることから、今後さらにサルモネラの有無を早期に判定する検査を取り入れた検査法として提案していくたいと考えている。また、カナダにおいては、既にこの早期判定を取り入

れた検査法を実施していることから、日本でもこの方式を検査法に採り入れるのに問題は無いと思われる。

E. 結論

食品におけるサルモネラ検出法として、標準法を想定した検査法を提案する。国立医薬品食品衛生研究所のホームページに提案し、パブリックコメントを収集するとともに、学会等にも働きかけを行い公表し、多く同意の得られる検査法としていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michiko Miyahara: Simultaneous Enrichment Detection Method for Four Types of Pathogenic Bacteria in Food.

Biocontrol Science, 2005, 10, 91-96.

2. 学会発表

宮原美知子：市販鶏挽肉でのサルモネラとリステリアの検出検討

第 26 回日本食品微生物学会学術総会

平成 17 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

結果表1

接種菌数一希釈倍率		41°C water bath	42°C water bath	43°C water bath	42°C incubator	41.5°C incubator
4000-original conc.	0	0	0	0	0	0
4000-10 ⁻³	6*	0	0	0	30	7
4000-10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0
400-original	0	0	0	0	0	0
400-10 ⁻³	15	3	1	46	18	
400-10 ⁻⁵	1	0	0	0	0	1
40-original	0	0	0	0	0	0
40-10 ⁻³	5	1	5	10	34	
40-10 ⁻⁵	0	0	0	0	5	

スパイラルプレーター 37μl 塗抹／XLD プレート

*検出黒色コロニー数

参考資料 1

平成5年3月17日 衛乳第54号 各都道府県知事・各政令市市長・各特別区区長宛 厚生省生活衛生局長通知

試験法 別紙1

(3) サルモネラ属菌試験法

- ① 試料25gを無菌的に細切しEMブイヨン225mlに混和し、35.0°±1.0°の温度で18±2時間培養した後、培養液1mlをセレナイトブリリアントグリン培地、セレナイトシチン培地又はハーナのテトラチオニ酸塩培地15mlに接種して、43.0°±1.0°（若しくは35.0°±1.0°）の温度で20±2時間培養し、菌増殖を認めないものは、サルモネラ属菌陰性とする。
- ② 菌増殖を認めた場合は、直ちに1白金耳量をMLCB培地又はDHL培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。35.0°±1.0°で24±2時間培養後、MLCB培地又はDHL培地からサルモネラ属菌の定型的集落を釣ちょう菌して、TSI培地及びLIM培地に移植する。そのTSI培地及びLIM培地で当該集落を24±2時間培養し、ONPGディスクを用いて試験した結果、サルモネラ属菌の性状を示したものについてはサルモネラ属菌陽性とし、その他の場合はサルモネラ属菌陰性とする。

参考資料 2

平成10年11月25日 生衛発第1674号 各都道府県知事・各政令市市長・各特別区区長宛 厚生省生活衛生局長通知

別紙 サルモネラ属菌試験法

検体25gを無菌的に採取し、L-システィン(0.2g/リットル)又はFeSO₄·7H₂O(64ml/リットル)を添加したB PW225mlに混和し、36°±1°の温度で22±2時間培養した後、培養液をTT培地(10ml)、RV培地(10ml)にそれぞれ0.5mlずつ接種し、42°±0.5°の温度で22±2時間培養した培養液を試料とする。試料の1エーゼ量を2種類の分離平板培地(硫化水素の產生により判定する培地及び硫化水素非產生性であってもサルモネラと判定できる培地*)に画線塗抹し、36°±1°の温度で18~24時間培養する。

各分離平板培地に発育・増殖した定型的集落を釣菌して、TSI培地、LIM培地あるいはLIA培地等に接種し、36°±1°の温度で18~24時間培養する。培養後、TSI培地にあっては高層部黄変・黒変・ガス産生(高層部における気泡又は亀裂の発生)及び斜面部が赤変したものを、LIM培地にあっては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性(まれに陰性あり)のものを、LIA培地にあっては培地全体が紫変、高層部黒変のものをサルモネラと判定し、血清学的試験並びに生化学的試験(同定用キットの使用も可。)を行いサルモネラと同定する。

* 硫化水素の產生により判定する培地: MLCB、DHL、XLIDほか

硫化水素非產生であってもサルモネラと判定できる培地: BGS(ブリリアントグリーン寒天培地にスルファピリジンを添加)、BGM(改良BGA)、ランバック培地、SMIDほか

平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査における検査法

1. 大腸菌、腸管出血性大腸菌 O157、サルモネラ属菌

(1) 検体の調整方法

ハサミ、ピンセット等を用いて 25g 採取リストマッカー 400 用袋（ストマフィルター使用可）に採る。それに BPW（225ml：サルモネラ用）またはノボビオシン加 mEC（225ml：大腸菌及び腸管出血性大腸菌 O157 用）を注ぎ入れ、15～30 秒間ストマッカー処理する（ストマッカー 400 あるいはマスティケーター等が準備できない施設は、揉み洗いを 20 回程度行う。なお、ホモジナイザー処理は不可。）。

なお、下記の食品を検査する場合には以下の点に留意する。

① キャベツ、ネギ、レタス、タマネギ等

可食部分の外側（外皮部分を含めて検査した場合は検査結果を区別する必要があることから、その旨記録すること。）をハサミ、ピンセット等を用いて採取する。

② ダイコン、ニンジン、キュウリ、トマト等

なるべく皮を含む外側表面（泥付きのダイコン、ニンジン等を検査した場合は、検査結果を区別する必要があることから、その旨記録する。）をハサミ、ピンセット等を用いて採取する。

(2) 検査方法

① 大腸菌 (*E.coli*)

以下の方法により、*E.coli* を同定する。

下記②の方法で増菌した培養液 1ml をダーラム管入り EC 培地（10ml）に接種し、44.5℃・20～24 時間培養する。これ以降の操作は、「食品衛生検査指針微生物編」（社団法人日本食品衛生協会、2004）の第 2 章細菌の章 2 汚染指標菌 2. (3) ③ (138 頁) に従う。

なお、「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年 12 月 28 日付け厚生省告示第 370 号）において大腸菌に係る成分規格が設定されている食品については、当該規格に係る試験検査法を実施する。

② 腸管出血性大腸菌 O157

「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」（平成 9 年 7 月 4 日付け衛食第 207 号・衛乳第 199 号）による試験法で実施する。ただし、別添 4 の参考法を併用する場合は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部（工藤由起子 主任研究官）に連絡し、増菌培地を入手する。

③ サルモネラ属菌（別添 5 参照）

ストマッカーあるいは揉み洗い処理した BPW (225ml) は、36 ± 1 °C・20 ~ 24 時間、前増菌する。その培養液 0.5ml を Tetrathionate Broth (TT) 培地 (10ml)、培養液 0.1ml を RV 培地 (10ml) に接種し、42 ± 0.5 °C・20 ~ 24 時間培養した培養液を試料とする。

〔 TT 培地の作製法は、TT 培地を加熱溶解後、40 °C以下に冷却する。それにヨウ素液を培地 1 L あたり 20ml 加え、よく攪拌しながら試験管に分注する。〕

試料（1白金耳量）を2種類の分離平板培地（硫化水素産生により判定する培地及び硫化水素非産生性であってもサルモネラと判定できる培地）に画線塗沫し、36 ± 1 °C・18 ~ 24 時間培養する。各分離平板培地に発育・増殖した典型的な、あるいは疑わしい集落^(注1)を3つ釣菌して、TSI 培地、LIM 培地あるいはLIA（リジン鉄寒天）培地等に接種し、36 ± 1 °C・18 ~ 24 時間培養する。

培養後、TSI 培地にあっては高層部黄変・黒変・ガス産生（高層部における気泡又は亀裂の発生）及び斜面部が赤変したものを、LIM 培地にあっては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性（まれに陰性あり）のものを、LIA 培地にあっては培地全体が紫変、高層部黒変のものを定型的なサルモネラと判定し、血清学的試験ならびに生化学的試験（同定用キット使用も可）を行いサルモネラを同定する。また、定型的ではないが、サルモネラが疑われるものについても、血清学的試験ならびに生化学的試験を実施する。

○ 硫化水素の産生により判定する培地：

MLCB、DHL、XLD、レインボー Salmonella (GSI クレオス)、ES サルモネラ培地

○ 硫化水素の非産生であってもサルモネラと判定できる培地：

BGS（ブリリアントグリーン寒天培地にスルファピリジンを添加）^(注2)、BGM（改良ブリリアントグリーン寒天培地（Oxoid, (関東化学販売)））^(注3)、ランバック培地（メルク、CHROMagar 社（関東化学販売））、クロモアガーサルモネラ（CHROMagar 社（関東化学販売））、SMID（ビオメリュー）、ES サルモネラ II（栄研）

（注1）サルモネラ属菌が疑われる集落には、硫化水素を産生しないものもある。

（注2）BGS 用スルファピリジンの添加方法

ジメチルホルムアミド 2ml にスルファピリジン 1g を加えて溶解する。この溶液を 70 °C以上に保った BGS 培地 (1L) に添加し、混和する。この培地を 60 °C前後に冷却して平板を作製する。培地の温度が 60 °C以下

の時にスルファピリジン溶液を添加すると析出する場合があるので注意する。

(注3) BGM 培地用サプリメントの添加方法

アンプル1瓶に滅菌水5mlを加え、溶解した後、50℃前後に冷却した培地500mlに全量添加する。

2. 赤痢菌

「赤痢菌の試験法について」(平成14年1月9日付け監視安全課事務連絡)による試験法で実施する。

なお、当該事務連絡では2種類の試験法を示しているが、可能な限り、検出感度に優れる二番目の方法(「冷凍カキの *Shigella sonnei* 試験法(2)」)で実施する。

3. 注意事項

検査法等で不明な点の問い合わせ先

・国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室 宮原美知子室長

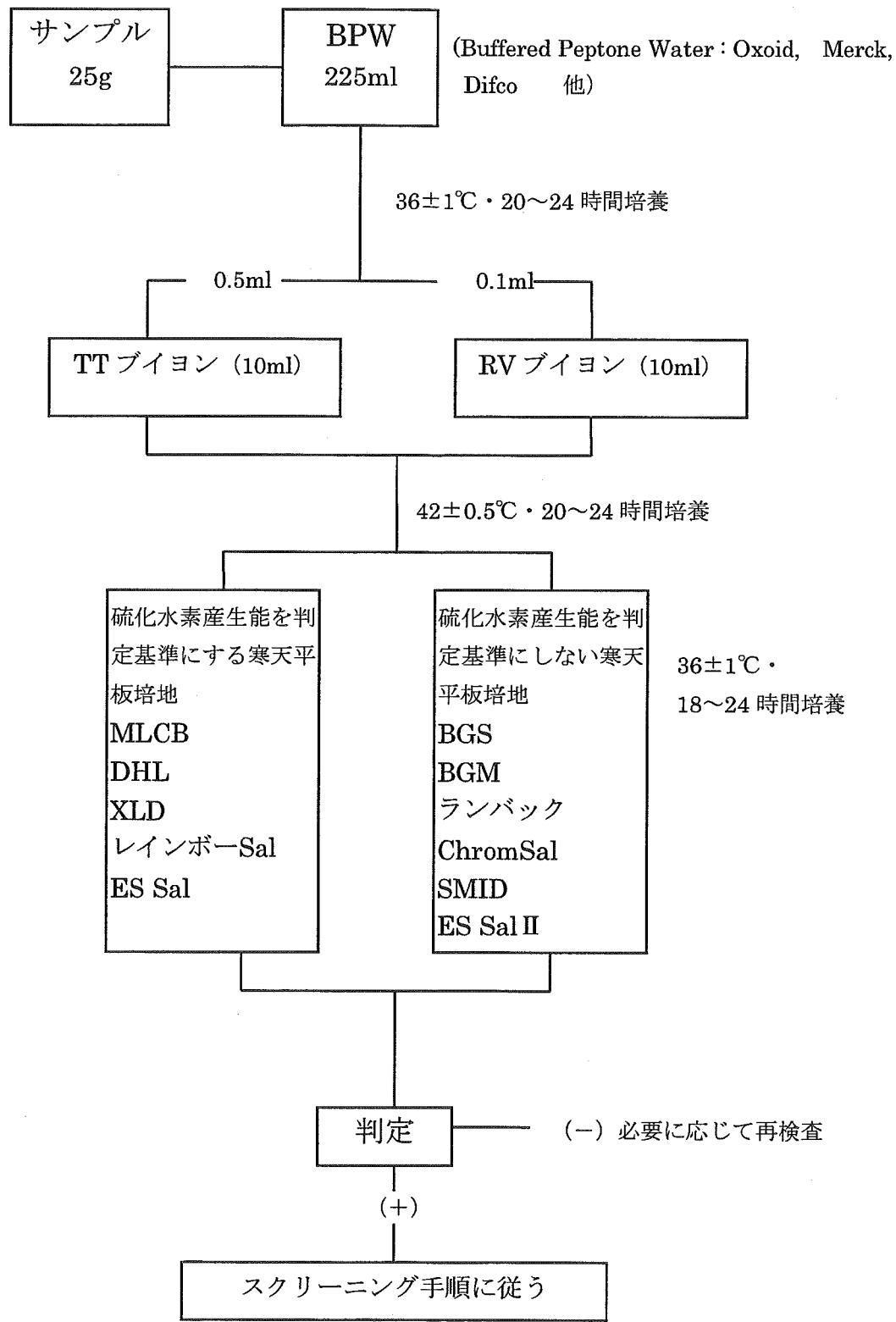
TEL, FAX: 03-3700-9497

・国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 工藤由起子主任研究官

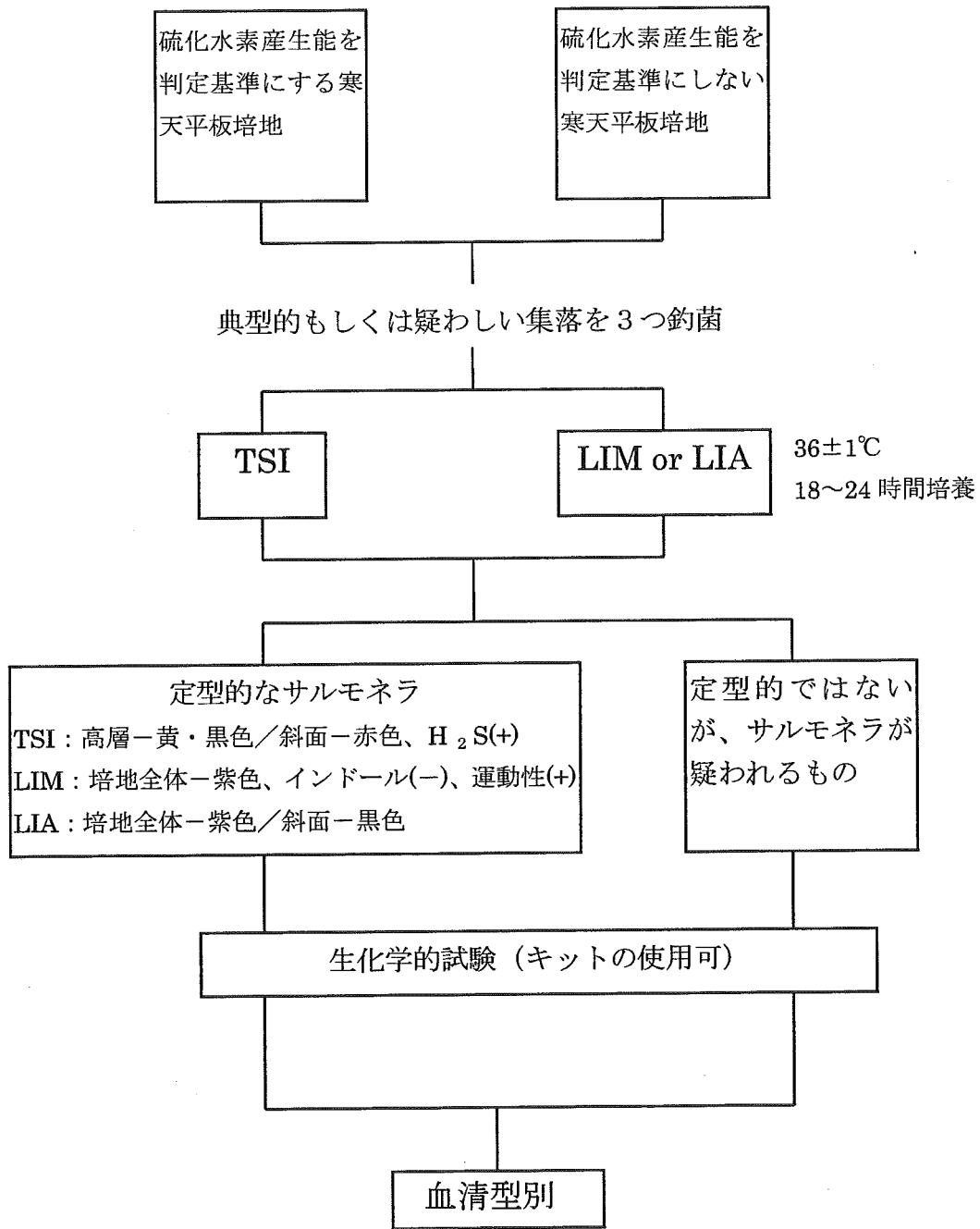
TEL: 03-3700-1141(内線533) FAX: 03-3700-9527

(別添 5)

サルモネラの検査法



スクリーニング手順



食品の種類	1. 乾燥卵卵黄、乾燥卵白、乾燥全卵、液体のミルク(スムキムミルク、2%の太ったミルク、全体およびバターミルク)、また粉末だつたミック(ケーキ、クッキー、ドーナツ)、ビスケットおよびパン)、乳児用調合乳および卵を含んだいる経口あるいは経管栄養法。	2a, b. 卵 翅付き卵、液体の全卵 (均質化された)	2c. 卵 固ゆで卵(鶏、あひるお よび他のもの)	3. 脂肪を含まない 粉乳(インスタン ント、インスタン トではない) 4. 乾燥した全乳	5a. カゼイン(乳のカゼ イン) 5b, 5c. カゼイント・ カゼイン、カゼ イント・カゼ イン)	6. 大豆粉
検査量	25g	←	←	←	←	←
前培養地	ラクトース・ブイヨン	トリプチケースソイブ イヨン(1000mlのTSBに 35mgの硫酸第1鉄を加え る)	トリプチケースソイブ イヨン	ブリリアントグ リーン水(1000mlの 滅菌蒸留水に2mlの 1%のブリリアント グリーン染色液を 加える)	ユニバーサル前培養ブ イヨン	ユニアーチュラル前培 養ブイヨン・ブ イヨン
前培養の量	225ml	←	←	←	←	←
前培養の温度、時間	35C、24±2h	←	←	←	←	←
増菌培地	Rappaport Vassiliadis(RV) ブイヨン Tetrathionate(TT)ブイヨン	← ←	← ←	← ←	← ←	← ←
前培養から増菌培養	前培養液0.1mlをRVブイヨン 前培養液1mlをTTブイヨン	← ←	← ←	← ←	← ←	← ←
増菌培養の温度、時間	高汚染食品はRVブイヨン42± 0.2°C(水槽) 24±2h、TT ブイヨン43±0.2°C(水槽) 24±2hで培養 低汚染食品はRVブイヨン42± 0.2°C(水槽) 24±2h、TT ブイヨン35±2°C 24±2hで 培養	← ←	← ←	← ←	← ←	← ←
分離培地	BS寒天、XLD寒天、HE寒天	←	←	←	←	←
分離培養の温度、時	35C、24±2h	←	←	←	←	←

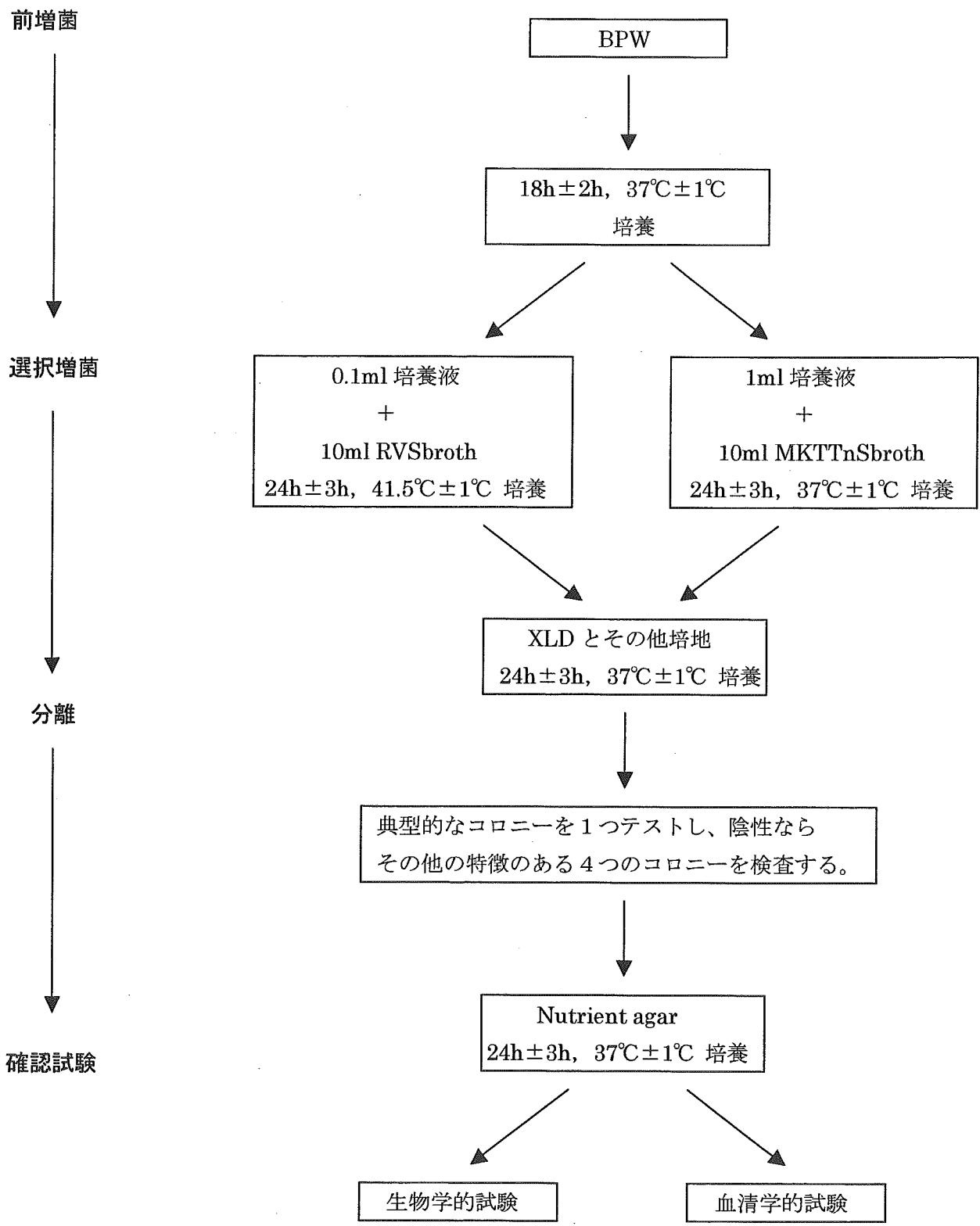
18. グーガム	19. オレンジジュース(低温殺菌)、アツチュー(低温未殺菌)、アルサイダー(低温殺菌)、アルサル(低温未殺菌)およびリソゴジュー(低温殺菌)	20. 犬の噛む部分である膝の耳その他の温殺菌、低温未殺菌)、アツチュー(低温殺菌)およびリソゴジュー(低温殺菌)	21. カンタローブ	22. マンゴー	23. トマト
25g	←	1個 (小さな場合2-3個)	25g (1個のままでもよい) ←	←	←
ラクトース・ブイヨン(1%セントラーレ溶液2.25mlを加える)	ユニバーサル前培養ブイヨン	ラクトース・ブイヨン (2.25mlのTergitol陰イオン7あるいはトリトンX-100を加える)	ユニバーサル前培養ブイヨン	バッハードペプトンウォーター	←
225ml	←	サンプル(g/ml)とブイヨンとの比率は1:9	225ml (1個のときは検査量の1.5倍) ←	←	←
Selenite cystine (SC) ブイヨン	←	Rappaport Vassiliadis (RV) ブイヨン	←	←	←
Tetrathionate (TT) ブイヨン	←	Tetrathionate (TT) ブイヨン ←	←	←	←
10ml 前培養液1mlをTTブイヨン	前培養液0.1mlをRVブイヨン ←	前培養液1mlをTTブイヨン ←	←	←	←
SCブイヨンおよびTTブイヨンとともに35°C、24±2h	高汚染食品はRVブイヨン42±0.2°C (水槽) TTブイヨン43±0.2°C (水槽) 24±2hで培養	←	←	←	←
	低汚染食品はRVブイヨン42±0.2°C (水槽) 24±2h、TTブイヨン35±2°C 24±2hで培養	←	←	←	←
←	←	←	←	←	←
←	←	←	←	←	←

参考資料 5

USDA 食品の種類	すくべられる食物 発酵した食品	鮮肉	屠体スパンジ・サ ンプル	鶏全体すぎ	液体、冷凍、料 理されたあるいは乾燥の卵 Breadingミック ス、乾燥ソース	衛生シリーズ食物ホ モジエネット
検査量	325g	25±0.5 g	(60ml用バッゲ)	30mlのすぎ	100g	250gの食物ホモジエ ネット
前培養地	バッファードペントン(BPW)	←	←	←	←	←
前培養の量	2925ml	225ml	50ml	30mlの2X BPW	900ml	25mlの10x BPW
前培養の温度、時間	35±2C、20-24h	←	←	←	←	←
増菌培地	TTブイヨン(Hajna) Modified Rappaport Vassiliadis(mRV)	←	←	←	←	←
前培養から増菌培 養	BPW 0.5±0.05mlをTTブイヨ ン10ml BPW 0.1±0.02 mlをmRVブイ ヨン10ml	← ←	← ←	← ←	← ←	←
増菌培養の温度、 時間	42±0.5C、22-24h	← 42±0.5C、18-24h (恒温水槽)	← ←	← ←	← ←	←
分離培地	BGS寒天培地 DMIAあるいはXLT4寒天培地	←	←	←	←	←
分離培養の温度、 時間	35±2C、18-24h	←	←	←	←	←

参考資料 7

Salmonella 検査法 (ISO6579)



Salmonella 検査法 (ISO)B.3 Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTn) 作成方法

B.3.1 基礎培地

B.3.1.1 構成

・ 肉エキス	4.3g
・ カゼイン消化酵素	8.6g
・ 塩化ナトリウム (NaCl)	2.6g
・ 炭酸カルシウム (CaCO ₃)	38.7g
・ チオ硫酸ナトリウムペンタ水和物 (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	47.8g
・ 胆汁液	4.78g
・ ブリリアントグリーン	9.6mg
・ 水	1000ml

B.3.1.2 調製

乾燥した基礎的な組成物質、もしくはそれらがすでに含まれている培地を水に入れ、5分間煮沸し、溶解させる。pHは25°Cで8.2±0.2で調整し、完全に混ぜる。

この基礎培地は3°C±2°Cで4週間保存可能。

B.3.2 ヨウ素ヨウ化物溶液

B.3.2.1 構成

・ ヨウ素	20.0g
・ ヨウ化カリウム (KI)	25.0g
・ 水	100ml

B.3.2.1 調製

完全に10mlの水でヨウ化カリウムを溶解し、それからヨウ素を加え、100mlの滅菌水で希釈する。暖めず。

小さいコンテナの中で適当な温度の暗所で保存可能です。

B.3.3 ノボビオシン溶液

B.3.3.1 構成

・ ノボビオシンナトリウム塩	0.04g
・ 水	5ml

B.3.3.2 調製

濾過した滅菌水でノボビオシンナトリウム塩を溶解する。

これは3°C±2°Cで4週間保存可能。

B.3.4 最終調製培地

B.3.4.1 構成

- | | |
|--------------------|--------|
| ・ 基礎培地 (B.3.1) | 1000ml |
| ・ ヨウ素ヨウ化溶液 (B.3.2) | 20ml |
| ・ ノボビオシン溶液 (B.3.3) | 5ml |

B.3.4.2 調製

無菌的にノボビオシン溶液 (B.3.3) 5ml を基礎培地 (B.3.3) 1000ml に加える。よく混ぜ、ヨウ素ヨウ化溶液 (B.3.2) 20ml を加える。良く混ぜる。

テストに必要な量を滅菌したフラスコに無菌的に分配する。

この培地は当日調製し使用する。

参考まで

* RSVについて

Merck の 2002 年度版カタログにラバポート・バシリアディス サルモネラ増菌ブイヨン(RSV ブイヨン)と OXOID The Manual に記載され、製品として販売されています。両カタログは多少の違いが見られますが、ISO の方法に準拠しているようです。

RV または RVS は *S. Typhi* の検出には適さないと記載がある。