

## 参考資料 8

Detection of *Salmonella* in Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 *Salmonella* Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study

Philip T. Feldsine, Andrew H. Lienau, Stephanie C. Leung, and Linda A. Mui, Florence Humbert and Marylene Bohnnert

Kirsten Mooijaman and Saskia Schulten

Paulin't Veld

Patricia Rollier

Renata Leuschner and Katherine Capps.

*Journal of AOAC International*, 86, 2003, 275-295.

三種類の食品に対するサルモネラの AOAC の培養による検出法と ISO 6579:2002 の方法を比較検討した。合計 21 カ所の連邦政府機関、産業界が米国あるいはヨーロッパで参加した。自然汚染のサルモネラが入手できる時はそれを用い、不可能な時には、人工的にサルモネラと競合する微生物フローラを接種した。チーズと乾燥卵製品では、両検出法で結果に統計的有意差は見られなかった( $p < 0.05$ )。統計的有意差は照射滅菌後にサルモネラと競合微生物フローラを接種後に、凍結乾燥した鶏肉で観察された。もう一度統計で有意差が見られた場合は自然汚染の鶏挽肉を用いた場合であった。3回の内の1回だけ、両方法で統計的な有意差が観察された。これらの結果から、新鮮チーズ、新鮮チルド冷却と冷凍鶏肉、さらに乾燥卵製品に対してサルモネラの培養検出法として、ISO 6579:2002 の検出法を公式な第一方法として推薦する。

参考資料 9

サルモネラの検査法比較

適用国	日本	日本	日本	米国	米国	カナダ	ISO	
適用項目	非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱食肉製品(加熱殺菌後包装)平成5年3月1	液卵 平成11年11月1日より施行	食中毒汚染実態調査	BAM April 2003	USDA, 1998	MFO-21, 2002年7月1日	2002/7/15, ISO 6579	Journal of AOAC International, 86, 275-295, 2003
増菌培養方法 検査量	25g	25g	25g	25g	食品検体により、検体量が異なっている。25-325gまで、様々。	15x25=375、single 25g	25g	ISO 6579と the AOAC Official Methodによるサルモネラの検出比較 コラボ研究
増菌培養液	225mlのEEM	225mlのBPWにL-システイン(0.2g/L)あるいはFeSO4/7H2O(64mg/L)添加	225mlのBPW	23種食品によって増菌培地を選択する。Lactose broth, TSB with ferrous sulfate (35mg/1L TSB), TSB, 1% brilliant green dye solution, universal preenrichment broth, nutrient broth, TSB with K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (0.5%), tetrathionate broth with brilliant green dye solution, lactose broth, BPWなど。添加剤も各種あり。	検体量にあわせて、培養液量も様々。主に、BPWであるが、中には添加剤を使用するものあり。	Nutrient broth (NB) and BPW	BPW	Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 Salmonella Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study 結論: ISO6579:2002を表記の食物のサルモネラ検出法として推薦した。
温度(°C)	35.0±1.0	36±1	36±1	35	35±2	35	37±1	
培養時間(時)	18±2	22±2	20-24	24±2	20-24	18-24	18±2	
選択培養方法						前培養で +or-判断		
培養液	1mlをセレナイトブリン培地、セレナイトシスチン培地又はハーナ・テトラチオン酸塩培地15mlに加える。	0.5mlずつBPW培養液をRVとTTそれぞれ10mlに接種し培養。	BPW培養液を0.5mlを10mlTTに、0.1mlを10mlRV培地に接種。	Guar gum のみ 1ml lactose broth + 10ml SCbrothと 10mlTTへ、その他の食品はBPW培養液を0.1mlを10mlRV培地に、1mlを10mlTTに接種。	BPW培養液0.5±0.05mlを10mlTTへ、0.1±0.02mlを10mlRVへ接種	前培養液 1.0mlを9ml SCと tetrathionate brilliant green (TBG) broth で培養。	BPW培養液 0.1mlをRVS (Rappaport-Vassilliadis medium with soya) 10mlへ、1mlを MKTTn (Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth) 10mlで培養。	
温度(°C)	43.0±1.0もしくは35.0±1.0	42.0±0.5	42.0±0.5	微生物多い場合: RV 42±0.2, TT 43±0.2, 恒温水槽; 微生物が少ない場合: RV 42±0.2 (恒温水槽), TT 35±2.0; Guar gumの場合: SCとTT 35。	42.0±0.5	SC: 35, TBG: 42.5	RVS broth: 41.5±1, MKTTn broth: 37±1. 42.5°C以上にならないように注意。	
時間	20±2	22±2	20-24	24±2	22-24	24±2	24±3	

寒天平板分離培地	DHL,MLCB等の分離培地に画線塗抹	硫化水素の産生により判定できる培地と硫化水素非産生でも判定できる培地の2枚	硫化水素の産生により判定できる培地と硫化水素非産生でも判定できる培地の2枚	Bismuth sulfite (BS) agar, xylose lysine desoxycholate (XLD) agarとhektoen enteric (HE) agar	BGS, DMLIA あるいはXLT4寒天培地	10 μ l, BS and brilliant green sulfa (BGS).	XLD	
同定方法	TSI, LIMなど	TSI, LIMあるいはLIA培地	TSI, LIM, 血清型別	TSI, LIA slant, urease test, serological polyvalent flagellar (H) test. Or Spicer-Edwards serological test, testing of urease-negative cultures, serological polyvalent somatic (O) tests for Salmonella and somatic (O) group tests.	TSI, LIA slant commercially available biochemical test kits. If the VITEK test kit is used, the cytochrome oxidase and gram stain are optional. AOAC Official Method 967.27 or "Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae" 4th Edition 参照	TSIとLIA. Polyvalent and/or single trouping somatic antisere are used to support the tentative identificaion of isolates as members of <i>Salmonella</i> spp.	TSI slant and stab the butt. Urea agar slant. LILysine decarboxylation on medium, β galactosidase detection, Voges-Proskauer (VP) reaction, indole reaction and serological confirmation and serotyping. (Salmonella reference centerへ)	

## 参考資料 10

厚生労働省平成16年度食品の食中毒菌汚染実態調査（集計結果）より

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

宮原美知子

2786 検体より、46 検体にサルモネラ検出。なお、同時に同検体で行ったと思われる O157 検査においては1 検体も検出されなかった。

18カ所検査を行い、15カ所サルモネラ陽性結果提出。

総検体数 (%)	RVとTT (%)	RVでのみ検出 (%)	RVのみ検査 (%)	RVで検出 (%)	TTでのみ検出 (%)	TTで検出 (%)
46 (100)	26 (57)	12 (26)	4	42 (91)	4 (8.6)	40 (65)
42 (100)	26 (61.9)	12 (28.6)		38 (90.5)	4 (9.5)	30 (71.4)

なお、硫化水素産生性を検出の目安に使う培地でのみ検出されたサルモネラ6株でも、TSI等の同定検査により、すべて硫化水素産生性があることが判明した。

### 050808 まとめ 解析分

RV 使用 91%捕捉 RVのみ検出 29%

TT 使用 71%捕捉 TTのみ検出 10%

### 060310 まとめ

使用された分離寒天平板培地

H<sub>2</sub>S 産生を指標とする培地

XLT4, DHL, MLCB, XLD

H<sub>2</sub>S 非産生でも検出できる培地

CHROMagar *Salmonella*, BGS, ChromSal, ESII, SMID, ダイヤサルム、Ramback 寒天

検出に違いが見られた場合

MLCB -, BGS +

DHL -, CHROMagar *Salmonella* +

DHL -, ESII +

MLCB -, SMID +

DHL +, ESII -

DHL +, ESII -

DHL -, ESII +

DHL -, CHROMagar *Salmonella* +

DHL -, CHROMagar *Salmonella* +

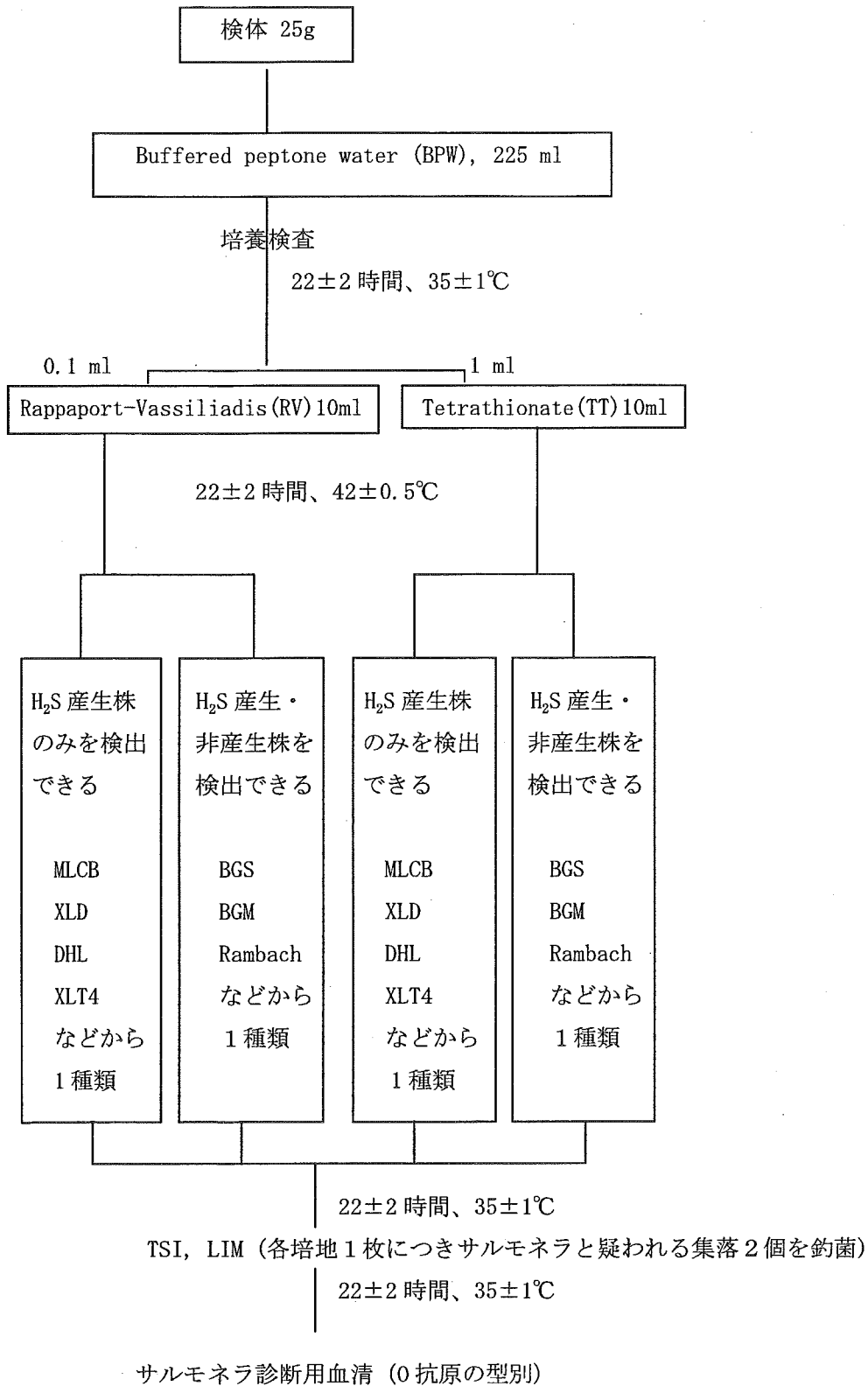
DHL +, CHROMagar *Salmonella* -

DHL +, SMID -

以上の結果より、H<sub>2</sub>S 産生を指標とする培地でのみ検出された場合が4件、H<sub>2</sub>S 非産生でも検出できる培地でのみ検出された場合が7件あり、どちらの場合もあり得る結果であった。H<sub>2</sub>S 産生を指標とする培地では、DHL が、H<sub>2</sub>S 非産生でも検出できる培地では、CHROMagar *Salmonella*、ESII、SMID と BGS が比較的有効に使われていた。

参考資料 11 サルモネラ検査法 (案)

(この検査法は *Salmonella Typhi* と *Salmonella Paratyphi* には適用不可である.)



## サルモネラ検査法

食品検体 25g を検査袋に入れて緩衝ペプトン水 (BPW) 225ml を加え、ストマッカーあるいは揉み洗い処理し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ・ $22\pm 2$  時間前増菌する。その培養液 0.1ml を Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 10ml に接種し、その培養液 1.0ml を Tetrathionate (TT) 培地 10ml に接種し、 $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・ $22\pm 2$  時間培養する。RV と TT 培養液は 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および硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地) に画線塗抹し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ・ $22\pm 2$  時間培養する。各分離平板培地に発育・増殖した定型的あるいは疑わしい集落を 2 個ずつ釣菌して、Triple Sugar Iron (TSI) 培地と Lysine Indole Motility (LIM) 培地等に接種し、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ・ $22\pm 2$  時間培養する。培養後、TSI 培地にあつては高層部黄変・黒変・ガス産生 (高層部における気泡または亀裂の発生) および斜面部が赤変したものを、LIM 培地にあつては培地全体が紫変、インドール陰性、運動性陽性のものをサルモネラと判定するが、非定型的な性状を示すサルモネラが疑われる場合はさらに詳しく生化学的性状を調べて同定する。血清学的試験 0 多価と 01 多価血清での凝集試験を行い、さらに 0 抗原血清型について決定する。

なお、BPW 培養後に遺伝学的、あるいは簡易キットを使つてのサルモネラ有無の可能性についても判定できるかどうかを検討予定である。

### 培地作成上の注意点について

BPW については、使用時に  $35^{\circ}\text{C}$  付近の温度に温めておくこと。

BPW 培養液の TT 培地への接種量は国際的な整合性をとるため、従来使われていた 0.5ml から 1.0ml へと変更を行った。

RV と TT 培地は接種当日に作製し、接種時に  $42^{\circ}\text{C}$  付近の液温となるように準備すること。

TT 培地の作成法：TT 培地を加熱溶解後、 $40^{\circ}\text{C}$  以下に冷却する。ヨウ素溶液 20ml を TT 培地 1 L に加え、良く攪拌する。さらにかきまぜながら、10ml ずつ滅菌試験管に分注する。

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB, ES サルモネラ、DHL, XLD, Bismuth sulfite agar、XLT4 など

硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地：ES サルモネラ II, BGS(ブリリアントグリーン+スルファピリジン)、BGM (改良 BGA) , ダイアサルム、ランバック寒天培地、クロモアガーサルモネラ、SMIDII など

BGS 寒天培地の作成方法：ジメチルホルムアミド 2 ml にスルファピリジン 1g を加えて溶解する。70℃以上に保った高圧蒸気滅菌した BGA (1L) 培地にこの溶液を添加し、混和する。培地の温度が 60℃以下の時にスルファピリジン溶液を添加すると結晶析出する場合がありますので注意する。スルファピリジン添加培地を 60℃前後に冷却して平板を作製する。

BGM 寒天培地の作成方法：BGM 培地添加用アンプル 1 瓶に滅菌水 5ml を加え溶解する。BGM 培地を 500ml に加熱溶解後、50℃に冷却し、添加溶液を全量加えて、良く混和後、シャーレに分注する。



## II. 分担研究報告

### 3. 腸炎ビブリオ検査法

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）  
畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究  
平成17年度 分担研究報告書

食品を対象とした腸炎ビブリオの試験方法に関する研究

分担研究者	甲斐明美 荒川英二	東京都健康安全研究センター 国立感染症研究所
研究協力者	八柳 潤 金子誠二 杉山寛治 磯部順子 緒方喜久代 尾畑浩魅	秋田県衛生科学研究所 東京都健康安全研究センター 静岡県環境衛生科学研究所 富山県衛生研究所 大分県衛生環境研究センター 東京都健康安全研究センター

研究要旨：食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法作成にあたっての基本方針について検討した。本研究班で検討するのは、「食品衛生の確保を目的とした検査法」であり、①標準法（すべての検査法の基礎となる培養法）と②迅速診断法（標準法に比べて、時間的に短縮でき、標準法と同等、あるいはそれ以上の精度の確保が必要）を作成する。また、基本指針として、①食中毒検査ほどの感度は必要なし②実行性があること③経費④標準的な検査室で検査可能であること等について合意に達した。

次に、現行法の中で、検査対象菌、検査に要する日数、増菌培養法等の14項目についての問題点を整理した。さらに、日本の「食品衛生検査指針」、米国FDAの「Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004)」、スイスの International Organization for Standardization が提供している「International Standard (ISO) 8914, 1990」を、比較検討すべき世界的な方法と考え、具体的な検査法の比較検討を行った。

次年度からは、今年度整理した問題点等に関する実験を行い、比較検討することにより、望ましい検査法の作成を図る。

#### A. 研究目的

現在、国内における食中毒起因菌の検査法は、厚労省等からの通知法や「食品衛生検査指針」等を参考に実施されているが、国外の標準法のような規格化され

たプロトコールに従った検査は行われていない。また、国際的にも認められるような検査法も確立されてはいないのが実情である。そこで、食品衛生を十分に確保することができ、且つ海外との互換性

にも十分考慮した検査法の導入が必要である。本研究では、食中毒起因菌のうち腸炎ビブリオを対象とした検査法について検討し、検査法の確立を目指す。今年度は現在行われている腸炎ビブリオ検査法の現状と海外で行われている方法について様々な情報を集め、問題点を把握すると共に、新たに確立する検査法の基本的な方向性を見いだすことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 基本方針の策定

食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法の作成にあたり、現在わが国で使われている方法を基本に、分担研究者および研究協力者で問題点等を明らかにし整理すると共に、標準法検討委員会（親委員会）の意見を求め、基本方針を明確にする。

### 2. 国内・国外の腸炎ビブリオ検査法の比較検討

国内・国外の腸炎ビブリオ検査法について情報収集を行い、比較検討し、相違点を整理する。

## C. 研究結果

### 1. 基本方針の策定

#### 1) 目的とする検査法

食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法は、(1) 食品衛生の確保を目的とした検査法と (2) 食中毒の検査法の2つに大別されるが、本研究班（作業部会）で検討するのは、前者の「食品衛生の確保を目的とした検査法」（以下、一般検査と略す）とする。

2) 食品衛生の確保を目的とした検査法（一般検査）の基本方針

以下の点を基本方針とした。

(1) 食中毒の検査ほどの感度は必要ない。

(2) 実行性のある検査法であること。

(3) 検査に要する経費も考慮に入れ、高価になりすぎないこと。

(4) 標準的な細菌検査室で検査可能なこと。すなわち、食品の腸炎ビブリオ検査は、衛生研究所、保健所、民間の登録衛生検査所、企業の細菌検査室等で実施されることを考慮し、特殊な検査法ではなく、一般的な検査法とする。

(5) 作成した方法で、行政処分が可能となるような検査法をめざす。

(6) 現在使われている方法との関連性について、ダブルスタンダードとはしない方向性を考える。厚生労働省は、告示法として出すことも念頭に入れている。

### 3) 対象とする検査方法

具体的な検査法は、以下の2つに大別される。

(1) 標準法：培養法が基本であり、すべての検査法の基礎となる。すなわち、迅速診断法等を検討する場合の比較対照となる。

(2) 迅速診断法：標準法に比べて、時間的に短縮できる方法の全てである。標準法と同等、あるいはそれ以上の精度の確保が望ましい。

本研究班では、(1) 標準法の作成 (2) 迅速診断法のプロトコールの作成を行う。迅速診断法と標準法の比較は、別途検討する。

### 4) 検査法作成のための具体的な基礎方針

食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法を作成するための基本方針を以下の通り

とした(表1)。

#### (1) 対象菌(菌種)

検査対象とする菌種について、腸炎ビブリオのみとするか、コレラ菌およびその類縁菌も含める、あるいは、それぞれを別項目として検査法を作成するかについて、標準法検討委員会(親委員会)に意見を求めた。その結果、基本的には腸炎ビブリオのみである。特に、定量検査(MPN法)は、腸炎ビブリオのみである。但し、輸入食品では、コレラ、エロモナス等の検査も含まれるので考慮する必要がある。

#### (2) 対象菌(病原性の有無)

検査対象とする菌は、腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)か、ヒトへの病原性と密接に関係する溶血毒(TDH, TRH)産生菌のみとするか、標準法検討委員会(親委員会)に意見を求め、さらに本研究班でも検討した結果、食品衛生を確保するための検査であるので、腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)とするという結論に達した。

#### (3) 定性法・定量法

腸炎ビブリオの検査法には、定性法と定量法があるが、その両方法を併記する。

#### (4) 検査日数

現行法では、3日~5日であるが、標準法としての培養法と、迅速法の両方法について検討する。検査に当たっては迅速性が重要である。病原性株(溶血毒原産生株)の検出には、2次、3次増菌培養をした方が良いとの報告もある。しかし、食品衛生の確保を目的とした検査法では、腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)を対象とした検査のため、必要以上に日数を要する検査法は採用しない。

#### (5) 供試検体量

供試検体量としては、25gが現在の日本の成分規格検査法やISOで採用されている。食中毒検査では10g法、FDAでは50g法もある。サルモネラ部会や黄色ブドウ球菌作業部会の方向性を確認して決定する。

また、検査の最初に調製する乳剤の濃度について、現行の10倍乳剤が良いのか、もう少し濃厚液(例3倍乳剤)の方が良いのではないかという意見があり、今後検討する事とした。

#### (6) 遺伝子検査法のスクリーニング検査法への導入

現在実用化されている主な遺伝子検査法としては、

##### ① PCR法

② Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP法)

③ Transcription-Reverse Transcription Concerted Method (TRC法)

##### ④ Realtime-PCR法

等があるが、普及している方法はPCR法である。

増菌培養液を対象としたPCR法の導入について、今後検討する必要がある。具体的には、MPNの試験管からPCR法と分離法を行い比較検討する。また、既に報告されている論文等も参考に検討する。

#### (7) 増菌培地

腸炎ビブリオの増菌培地として通常使用されている培地は、アルカリペプトン水と食塩ポリミキシンブイオンである。輸入食品では、コレラ菌やエロモナス等の検査も含まれるので、実用性から考えて、アルカリペプトン水が適当である。

#### (8) 増菌培養法

病原性株（溶血毒原産生株）の検出には、2次、3次増菌培養をした方が良いとの報告もある。しかし、一般検査法では、腸炎ビブリオ全体（指標菌的考え方）を対象とするため、必要以上に日数を要する検査法は採用しない。迅速性に主眼を置き、1次増菌培養のみとする。

#### (9) 分離培地

分離培地として、TCBS寒天が主に使われている。しかし、腸管出血性大腸菌等の検査において、酵素基質培地は非常に有効であることが知られている。現在、ビブリオ検査用酵素基質培地の市販品はクロモアガーのみであるが、今後の検討に加える。

#### (10) 濃縮法

濃縮法として、免疫ビーズ法がある。腸炎ビブリオ検査には、腸管出血性大腸菌等と異なり、有効な増菌培地や分離培地がある。さらに、目的とするのは一般検査法であるので、免疫ビーズ法を用いた濃縮法は必要としない。

#### (11) 定量法

MPN法による定量試験において、菌の分離が必要か、遺伝子の検出のみで定量値として良いか討論した結果、菌の分離が基本であり、不可欠であるという結論に至った。しかし、MPNの試験管から、PCR法を行い、100/g以下と判定する方法については、迅速法として検討する必要がある。

#### (12) PCR法

PCR法の導入としては、増菌培地からのスクリーニング、菌の同定への応用が考えられる。検査に必要なプライマーは、腸炎ビブリオに特異的な物とし、今

後検討する。

#### (13) 検査対象食品

検査対象となる食品は、主に、①そのまま食べる食品 ②加工して食べる食品 当面の対象は、規格・基準のある食品、すなわち ①生食用魚介類 ②ゆでだこ、煮がに ③冷凍食品 である。

#### (14) 迅速検査法について

迅速診断法の位置づけ、行政処分の証拠となるか等については、今後の検討が必要である。

## 2. 国内・国外の腸炎ビブリオ検査法の比較検討

国内・国外の腸炎ビブリオ検査法として、

① 食品衛生検査指針：日本

② Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004)：FDA, USA

③ International Standard (ISO 8914, 1990)：International Organization for Standardization, Switzerland

の3種を中心に比較検討することとした。この他、EU、英国、カナダ、オーストラリア、米国農務省等の物があり、概観した結果、上記3種にほぼ一致するものであった。

#### 1) 分離培養法

分離培養にとって重要な事項、すなわち、検体の採取と試料の調製、希釈法、増菌培養法、濃縮法（免疫ビーズ法）、分離培地と培養法について、食品衛生検査指針、BAM、ISOに記載されている方法をまとめ、表2に示した。

#### 2) 同定法

腸炎ビブリオの同定法として重要な事

項、すなわち、糖分解、耐塩性、VP反応、アミノ酸試験等の生化学的性状試験法について、食品衛生検査指針、BAM、ISOに記載されている方法をまとめ、表3に示した。

#### D. 考察

今年度は、食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法の基本方針の策定を行った。また、検査法を作成するにあたり、検討すべき事項について整理した。さらに国内・国外の腸炎ビブリオ検査法に関する情報収集を行い、比較検討した。これらの結果、作成する検査法の方向性が明らかになった。検査法は、実行性のあるもの、そして国際的にも認められる、諸外国の方法とのハーモニゼーションを考慮した方法論の確立が重要であるとの結論に達した。

#### E. 結論

食品を対象とした腸炎ビブリオの検査法の基本方針の策定を行った。また、検査法を作成するにあたり、検討すべき事項について整理した。さらに国内・国外の腸炎ビブリオ検査法に関する情報収集を行い、比較検討した。検査法は、実行性のあるもの、そして国際的にも認められる、諸外国の方法とのハーモニゼーションを考慮した方法論の確立が重要である。次年度以降、これらの方針に基づいて(1)標準法の作成と(2)迅速診断法のプロトコール作成を行う。

#### F. 健康危機情報

平成16年に全国で発生した細菌性食中毒事件のうち、腸炎ビブリオによる事件数(患者2名以上)は132件でカンピロバクター(136件)に次いで第2位、患者数は2,773人で、サルモネラ(3,788人)に次いでやはり第2位であった。本菌による食中毒予防は、重要な課題である。

#### G. 研究発表

〈発表論文〉

小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木 浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖: 東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオ検出と分離菌株の諸性状, 日食微誌, 22:138-147, 2005.

尾畑浩魅, 下島優香子, 小西典子, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖, 福山正文: 腸炎ビブリオ食中毒事例におけるPCR法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離, 日本感染症学雑誌, 投稿中, 2005.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 食品を対象とした腸炎ビブリオ検査法の作成基本方針

No.	検討項目	検討内容	検討結果
1	対象菌(菌種)	1. 腸炎ビブリオのみ 2. コレラ菌, およびその類縁菌も含める 3. コレラ菌, およびその類縁菌は, 別項目とする	・定量検査(MPN法)は, 腸炎ビブリオのみ ・輸入食品では, コレラ, エロモナス等の検査も含まれるので考慮する。
2	対象菌(病原性の有無)	1. 腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方) 2. 溶血毒(TDH, TRH)産生菌のみ	汚染状況を調べるので, 1. 腸炎ビブリオ全体(指標菌的考え方)
3	定性法 & 定量法	1. 両方法を併記 2. 個別に記載	1. 両方法を併記
4	検査日数	1. 現行:3日~5日 2. 迅速法を考える	1. 標準法としての培養法, 2. 迅速法の両方を作成する。
5	検体採取量	1. 25g (日本の成分規格検査, ISO) 2. 10g 3. 50g (FDA)	1. 25g (日本の成分規格検査, ISO) を採用?, サルモネラ部会, 黄色ブドウ球菌部会の方向性と確認する。 ・最初の乳剤作成時に現行の10倍乳剤が良いのか, もう少し濃厚液(例:3倍乳剤)の方が良いのではないか? → 検討事項
6	スクリーニング法に遺伝子検査法を導入するか否か	1. PCR法 2. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP法) 3. Transcription-Reverse Transcription Concerted Method (TRC法) 4. Realtime-PCR法 5. 他	1. PCR法 が一般的 ・増菌培養液を対象としたPCR法の導入について(MPNの試験管から, PCR法と分離法を行い比較する)→検討事項
7	増菌培地	・アルカリペプトン水 ・食塩ポリミキシンブイヨン	・アルカリペプトン水 が適当(輸入食品では, コレラ, エロモナス等の検査も含まれる)
8	増菌培養法	1. 1次増菌 2. 2次増菌 3. 3次増菌	迅速性から 1. 1次増菌 のみで良い

No.	検討項目	検討内容	検討結果
9	分離培地	・TCBS寒天 ・酵素基質培地	・TCBS寒天 ・酵素基質培地：現在のところ、市販品はクロモアガーのみ、 クロモアガーは非常に有効
10	濃縮法の導入	免疫磁気ビーズ法	必要なし
11	定量法	1. 菌の分離が必要 2. 遺伝子の検出のみ	1. 菌の分離が必要 ・MPNの試験管から、PCR法を行い、100/g以下と判定する方法について、迅速法として検討する→検討事項
12	PCR法の導入	1. 菌の同定 2. 増菌培地	1. 菌の同定 にPCRを導入可能？ →プライマー（腸炎び菌に特異的なもの）→検討事項
13	検査対象食品	1. そのまま食べる食品 2. 加工して食べる食品	規格・基準のある食品 1. 生食用魚介類 2. ゆでだこ、煮がに 3. 冷凍食品
14	迅速診断法	位置づけ 行政処分の証拠となるか？	



表2. 腸炎ビブリオの検査法：分離培養法の比較

材料	食品衛生検査指針				BAM(FDA)				ISO8914
	生食用魚介類	ゆでだこ	海水や食品	魚介類	貝類	調理済食品	HGMF法		食品
検体の採取と試料の調製	MPN算出 検体 25g, PBS (3% NaCl) 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	菌検出 検体 25g, APW 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	TDH陽性菌検出 海水 1000mlをろ過し たフィルタ一 または検体 25g, APW 225ml, ストマッキング処理 30秒～1分	MPN算出 検体 50g, ストマッ キング処理90秒, PBS 450ml, ストマッキング処理 1分	MPN算出 ストマッキング処理 90秒, PBS 等容 量, 20gにPBS 80ml	MPN算出 検体 50g, ストマッキング処理 90秒, PBS 450ml, ストマッキング処理 1分	MPN算出 PTSで検体の10% 乳剤, ストマッキン グ処理1分, 1mlを HGMFでろ過		菌検出 ストマッキング処理済 み検体 25g, SPBと APWまたはGST 225ml
希釈	- 乳剤 1ml + APW 10ml, 乳剤 1ml + PBS 9ml→1ml または0.1ml + APW 10ml (*)	-	-	10% 乳剤をAPWで 10, 100, 1000倍	10% 乳剤をAPWで 10, 100, 1000倍	10% 乳剤を 2x APWで2倍, APWで10, 100, 1000倍	-	-	-
増菌	37°C, 一夜	37°C, 一夜	37°C, 18時間	35±2°C, 一夜	35±2°C, 一夜	35±2°C, 一夜	TSAMS, 35±2°C, 4時間		35または37°C, 7～8時間
二次増菌	-	-	PCR(rdh)+の時, 上 層 1ml + SPB 10ml, 37°C, 18時間	-	-	-	-		-
三次増菌	-	-	上層 0.5ml + SPB 10ml, 37°C, 6時間	-	-	-	-		-
免疫磁気ビーズ	-	-	+	-	-	-	-		-
分離培地と培養法	1白金耳, TCBS, 37°C (**), 一夜	1白金耳, TCBS (**), 37°C (**), 一夜	1白金耳, TCBS, 37°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	3mm白金耳, TCBS, 35±2°C, 一夜	VPSA, 42°C, 18～20時間		1白金耳, TCBS, 18時 間, TSAT, 20～24時間, 35または37°C

\*: 乳剤 10ml + APW 90ml→10ml, 1ml + APW 10ml, 0.1ml + APW 10ml \*\*; 35°C以上37°C未満 \*\*\*: CHROMagar Vibrio  
 PBS: phosphate-buffered saline APW: Alkaline saline peptone water TCBS: Thiosulfate citrate bile sucrose agar  
 PTS: Peptone tween-salt diluent HGMF: Hydrophobic grid membrane filtration TSAMS: Tryptic soy agar magnesium sulfate  
 VPSA: V. parahaemolyticus sucrose agar SPB: Salt polymyxin B broth GST: Saline glucose culture medium with SDS  
 TSAT: Triphenyltetrazolium chloride soya tryptone agar

表3. 腸炎ビブリオの検査法：同定試験法の比較

	食品衛生検査指針	BAM(FDA)	ISO8914
コロニー分離			
糖分解試験	TSI, 35~37°C, 18~24時間		Nutrient agar, 35または37°C, 18~24時間 TSI, 35または37°C, 24時間
耐塩性試験	Nutrient BrothまたはLab-Lemco Broth (*) +NaCl 0, 3, 8, 10%, 35~37°C, 18時間	T1N0とT1N3, 35±2°C, 18~24時間	
VP試験	VP半流動培地, 35~37°C, 18~24時間		
リシン脱炭酸試験	メラーまたはLIM, 35~37°C, 1~4日間		Saline medium, 35または37°C, 24時間
アルギニン加水分解試験		AGS, 35±2°C, 18~24時間	
グラム染色と顕微鏡観察		TSBまたはTSA斜面, 35±2°C, 一夜	3%食塩水懸濁液
運動性試験		運動性試験培地, 35±2°C, 一夜	APW, 35または37°C, 1~6時間
同定キット		API20E	
オキシダーゼ試験			オキシダーゼ濾紙
好気、嫌氣的発育試験			Saline meat-yeast agar, 35または37°C, 24時間
インドール試験			Tryptone/tryptophane medium, 35または37°C, 24時間
βガラクトシダーゼ試験			Saline 0.25ml + toluene 1drop, 37°C, 2,3分

\*: ペプトン水またはトリプトン水(1%濃度)

T1N0, T1N3: 1% tryptone, 1% or 3% NaCl, AGS: arginine glucose slunt

## II. 分担研究報告

### 4. 黄色ブドウ球菌検査法

厚生労働科学研究費補助金研究報告書  
畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究  
分担研究者 清水 晃 神戸大学農学部  
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

## 研究要旨

黄色ブドウ球菌の作業部会では、黄色ブドウ球菌検査の標準法の試案を作成するに当たって考慮すべき点を、検体のサンプリング法、分離培地（選択分離培地、増菌培地など）、培養温度と培養時間、黄色ブドウ球菌同定法、遺伝子検査法などについて、これまで日本及び外国で報告されている論文等を検索して現状を把握し、問題点を整理している。また、黄色ブドウ球菌検査法の標準化に向けての基礎資料を得るために、実験を行っており、以下のことを明らかにしている。

1. 直接平板培養法と増菌培養法の検出率の比較では、食肉試料 10g 法では前者で 6.7～33.3%、後者で 33.3～80.0% であり、また食肉試料 25g 法では前者で 0～10.0%、後者で 5.0～60.0% であり、増菌培養法で検出率が明らかに増加した。食肉検体から黄色ブドウ球菌を確実に検出するには直接平板培養法だけでは不十分で、増菌培養法が必要であること示している。

2. 最確数(MPN)法による食肉の汚染菌数は、試料 10g 法では全体で 110 検体中 95 検体 (86.4%) が 46MPN/g 以下で、15 検体 (13.6%) が 110/g 以上であった。試料 25g 法では全体で 21 検体中 20 検体 (95.2%) が 46/g 以下で、1 検体 (4.8%) のみが 110/g 以上であった。

3. 多数の検体を短時間で処理するための方法として、ふき取り法を検討した。肉表面全体を滅菌綿棒でこすり、3%卵黄加マンニット食塩培地に直接塗抹する培養法と、同綿棒を選択増菌培地で培養する増菌培養法を比較すると、前者で 6.3～40.0%、後者で 30.0～69.1% であり、増菌培養することで検出率が著しく増加した。

4. 今回の調査では選択分離培地として、わが国でよく使用されている 3%卵黄加マンニット食塩培地を用いたが、今後、外国でよく用いられている Baird-Parker 培地との比較を行うと共に、検体のサンプリング法及び希釈液の組成、増菌用培地の組成、遺伝子検査法などについて検討して行く予定である。