

研究目的

わが国では、ブドウ球菌食中毒の発生件数は食品業界の衛生設備・製造方法の改善、衛生教育の向上などにより、また国・県などの食品衛生行政指導の努力により、年々減少の傾向を示しているが、まだ大規模な集団発生事例がしばしば報告されており、なお重要な食中毒として位置付けられている。本食中毒の原因食品としては、わが国[1,2]では握り飯、寿司などの穀類及びその加工品が最も多く、次いで仕出し弁当、複合惣菜などの複合調理食品、菓子類となっている。一方、欧米諸国[3,4]では肉類及びその加工品、乳製品によるものが多く、本食中毒の主要原因食品が国の食習慣と密接に関連していることが知られている。

近年、わが国でも食肉及びその加工品、魚介類及びその加工品の消費量が年々増加しているが、これらの食品における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の汚染実態調査は、十分に行われておらず、「畜水産食品における黄色ブド

ウ球菌のリスク評価」についても検討されていないのが現状である。

一方で、畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検査法についても、検体からのサンプリング法、選択分離培地や増菌培地の種類、菌同定法など、検査室によって様々であり、これらの要因が検出率に大きく影響しているものと考えられる。また海外で行われている黄色ブドウ球菌検査法との整合性も考慮に入れた標準法の確立が早急に望まれている。

そこで本研究では、市販食肉及び魚介類について、黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査し、またこれらの食品からの黄色ブドウ球菌検査標準法を作成するための基礎的資料を得る目的で、わが国で日常よく使われている検査法について検討した。

研究方法

1. 検査材料

1) 食肉試料10g法による実験
2005年5月～8月にかけて、兵庫県のスーパーマーケット15店舗で市販されていたトレイパック詰め牛肉（スライス肉）、

豚肉（スライス肉）及び鶏肉（もも、むね肉）をそれぞれ15パック（1店舗につき1トレイパック）購入し、1トレイパックを1検体として、計45検体を供試した。また、ミンチ肉は2005年4月～10月にかけて、兵庫県及び大阪府のスーパーマーケット40店舗で市販されていたトレイパック詰め、牛ミンチ、豚ミンチ及び鶏ミンチをそれぞれ40パック購入し、計120検体を実験に供した。

2) 食肉試料25g法による実験

2005年10月～11月にかけて、兵庫県のスーパーマーケット20店舗で市販されていたトレイパック詰め、牛肉、豚肉及び鶏肉をそれぞれ20パック購入し、計60検体を実験に供した。

3) ふき取り法による実験

牛肉及び豚肉は2002年5月～2004年9月にかけて、兵庫県及び大阪府のスーパーマーケット80店舗で市販されていたトレイパック詰め、牛肉、豚肉をそれぞれ80パック購入し、計160検体を供試した。また鶏肉は2002

年5月～2003年8月にかけて、全国47都道府県のスーパーマーケット145店舗で市販されていた165検体（もも114、むね51）を用いた。

魚介類は2005年7月～8月にかけて、兵庫県のスーパーマーケット40店舗で市販されていたトレイパック詰め、208検体を供試した。その内訳はエビ51、イカ40、アジ30、サンマ28、イワシ24、サバ19、ブリ6、サワラ2、タイ4、マグロ1、サケ1、スズキ1、シマアジ1検体であった。

2. 検査試料の調整法と黄色ブドウ球菌の分離法

1) 食肉試料10g及び25g法による実験

食品衛生検査指針（厚生労働省監修、2004年版）[5]に従って、食肉試料は各検体を無菌的に10g及び25gを秤量し、滅菌生理食塩水90ml及び225mlでホモジナイズし、10%乳剤を作製した。本乳剤0.1mlを3%卵黄加マンニット食塩培地（ニッサイ）2枚に塗抹後、37℃、48時間培養を行った（直接平板培養法）。

食肉中の黄色ブドウ球菌の菌数は最確数(Most Probable Number: MPN) (3管法) 法により測定した。すなわち、上記の10%乳剤を、10ml、1ml及び0.1mlを、それぞれ選択増菌培地[7.5%NaCl加ハートインフュージョン(HI) ブイヨン(ニッスイ) 或いは7.5%NaCl加HI ブイヨンにピルビン酸ナトリウムを1%、リン酸ニカリウムを0.5%の割合で添加]10 ml入りの試験管3本ずつに接種し、37℃、24時間培養した。各試験管の培養液1白金耳(1 μ l)を3%卵黄加マンニット食塩培地に塗抹し、37℃、48時間培養し、本菌の有無を確認した。なお、試料10ml用の増菌培養には倍濃度の増菌培地を用いた(増菌培養法)。

2) ふき取り法による実験

肉及び魚表面全体を滅菌綿棒で強くこすり、3%卵黄加マンニット食塩培地に直接塗抹し、37℃、48時間培養した(直接平板培養法)。また、上記の綿棒を7.5%NaCl加HIブイヨン5 mlに入れ、37℃、24時間増菌培養し、その培養液1白金耳(1 μ l)を3

%卵黄加マンニット食塩培地に接種後、コンラージ棒で全面にひろげ、37℃、48時間培養した(増菌培養法)。

3. 黄色ブドウ球菌の同定方法

卵黄反応陽性及びマンニット分解を示したコロニーについて、Devriese & Hájek [6]の記載に従い、カタラーゼ陽性、ブドウ房状のグラム陽性球菌、コアグララーゼ産生及びアセトイン産生したものを黄色ブドウ球菌と同定した。

研究結果

1. 食肉試料10g法による実験(表1)

牛肉、豚肉、鶏肉からの検出率は、直接平板培養法で牛肉6.7%、豚肉6.7%、鶏肉33.3%であったが、増菌培養法では牛肉40.0%、豚肉33.3%、鶏肉73.3%であった。また、ミンチ肉の検出率は、直接平板培養法で牛ミンチ12.5%、豚ミンチ10.0%、鶏ミンチ22.5%であったが、増菌培養法で牛ミンチ65.0%、豚ミンチ75.0%、鶏ミンチ80.0%であった。

2. 食肉試料25g法による実験 (表2)

直接平板培養法では牛肉10.0%、豚肉0%、鶏肉10.0%であったが、増菌培養法では牛肉40.0%、豚肉5.0%、鶏肉60.0%であった。

3. MPN法による汚染菌数 (表3)

食肉試料10g法：牛肉0.92～9.3MPN/g、豚肉0.36～24/g、鶏肉1.5～>110/g、牛ミンチ0.3～>110/g、豚ミンチ0.3～>110/g、鶏ミンチ0.3～>110/gであった。全体で110検体中95検体(86.4%)が46/g以下で、15検体(13.6%)が110/g以上であった。肉種別にみると、牛ミンチの11.5%、豚ミンチの10.0%、鶏ミンチの9.4%、鶏肉の54.5%が110/g以上を示した。

食肉試料25g法：牛肉0.3～9.3MPN/g、豚肉2.3/g、鶏肉0.36～>110/gであった。全体で21検体中20検体(95.2%)が46/g以下で、鶏肉の1検体(4.8%)のみが110/g以上であった

4. ふき取り法による食肉から

の検出率(表4)

直接平板培養法では牛肉7.5%、豚肉6.3%、鶏肉40.0%であったが、増菌培養法では牛肉30.0%、豚肉38.8%、鶏肉69.1%であった。特に鶏肉は調査した全国47都道府県のすべてから、また145店舗中131店舗(90.3%)の検体から黄色ブドウ球菌が検出され、全国レベルでの汚染が確認された。

5. ふき取り法による魚介類からの検出率(表5)

増菌培養法のみを使用した。全体で208検体中41検体(19.7%)から黄色ブドウ球菌が検出された。特にエビ(39.2%)、サバ(31.6%)、サンマ(25.0%)の検出率が注目された。

考察

わが国の市販食肉類からの黄色ブドウ球菌の検出状況については、調査された地域または検査法が若干異なっているが、1973年～1990年の調査成績をまとめると、牛肉27.9～40%[7,8,9]、豚肉4～76.3%[7,8,9,10]、鶏肉10～

95%[7,8,9,10,11,12,13]の範囲で検出されている。また最近における市販食肉の黄色ブドウ球菌汚染調査によると、清水と堀江[14]が1998年に兵庫県で調査した結果では、豚肉36.3%、鶏肉70.0%が本菌に汚染されていたと報告している。蔣ら[15]が1995年～1998年に中国の市販食肉における黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査し、検出率は豚肉29.5%、牛肉25.0%、鶏肉73.6%であったと報告している。今回の2002年～2005年の調査結果でも、豚肉、牛肉、鶏肉の汚染率は過去の調査とほぼ同様の結果が得られており、汚染率は過去からあまり変動していないことがわかった。また食肉の中でも、鶏肉が牛肉、豚肉に比べて高率に汚染されていることも過去の報告と同様であった。ミンチ肉では牛65.0%、豚75.0%、鶏80.0%で、種類別に関係なく、高率に汚染されていたのが注目された。

MPN法による食肉の汚染菌数は、鶏肉及びミンチ類で110/g以上のものが見られたが、大多数のものが46/g以下の汚染菌数

であった。

各種の市販魚介類からの黄色ブドウ球菌の検出率については、これまであまり報告[9,15,16,17]されておらず、検査法が若干異なっているが、5.8～61.7%であった。今回のふき取り法による汚染調査では13品目中8品目から分離され、全体で19.7%であった。

わが国では、食肉及び魚介類を含む各種食品の黄色ブドウ球菌を検査する方法は、食品衛生検査指針に従って、無作為に検体の一部を数箇所切り取り、10倍乳剤または10倍段階希釈を調製して、これをブドウ球菌選択分離培地に塗抹する、定量法が提唱されている。この方法は検体中の菌数を測定し、定量的に評価する方法であるが、検体全体を検査するわけではないため、検体の採取の仕方、あるいは菌量が少ない場合は、陰性と判定される場合が考えられる。

今回の調査で、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。これらの結果から、また前述したように食肉中の汚染菌数が少ないことを考えると、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。

腸炎ビブリオ、サルモネラなどの食中毒細菌の検出法には選択増菌培養法が実施されているが、黄色ブドウ球菌では直接分離培養である直接平板培養法のみが採用されている。潮田[18]、野村ら[17]及び楠ら[16]は黄色ブドウ球菌の検出法に増菌培養法を取り入れることによって、本菌の検出率が直接平板培養法に比べて、著しく増加したことを報告している。

ふき取り法は、一般に食品の製造・調理環境、器具、器材などの検査に用いられているが、本研究でこの方法を食肉及び魚介類に応用してみた。食肉からの検出率は直接平板培養法で 6.3~40.0%、増菌培養法で 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。また、検出率も 10g 及び 25g 法とあまり差が見られなかったことから、今後リンス法を含めてふき取り法も検討する価値があるかも知れない。

結論

わが国の市販食肉及び魚介類における黄色ブドウ球菌の汚染状況を調査すると共に、これらの食品からの黄色ブドウ球菌検査標準法を作成するための基礎的資料を得る目的で、わが国で日常よく使われている検査法について検討した。

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、選択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、選択増菌培養法が必要であること示している。

2. MPN法による食肉の汚染菌

数は、大多数の検体が46/g以下であった。

3. ふき取り法による食肉からの検出率は、直接平板培養法で6.3~40.0%、増菌培養法で30.0~69.1%であり、増菌培養法で検出率が著しく増加した。

参考文献

- 1) 小田隆弘 (1998):食衛誌、39, J179-J185.
- 2) 五十嵐英夫 (1997):防菌防黴、25, 549-557.
- 3) Genigeorgis, C.A. (1989):*Int. J. Food Microbiol.*, 9, 327-360.
- 4) Wieneke, A.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J. (1993):*Epidemiol. Infect.*, 110, 519-531.
- 5) 品川邦汎 (2004):食品衛生検査指針、微生物編(厚生労働省監修)、pp.236-248, 社団法人日本食品衛生協会、東京.
- 6) Devriese, L.A. and Hajek, V. (1980):*J. Appl. Bacteriol.*, 49, 1-11.
- 7) 小沼博隆、品川邦汎(1985):肉の科学、26, 103-114.
- 8) 梅木富士郎、小久保弥太郎、春田三佐夫、四宮栄 (1973):日獣会誌、26, 20-23.
- 9) 清水晃、尾崎潤一郎、河野潤一、木村重(1991):食品と微生物、8, 135-141.
- 10) 山崎亨毅(1988):昭和62年度日本獣医公衆衛生学年次総会講演要旨集、pp.286-287.
- 11) 徳丸雅一(1988):食品と微生物、5, 59-65.
- 12) 岩上泰雄、山田米重、星川博文、石田謙子、吉野正克、大中隆史、山野井茂樹(1990):食品衛生研究、40, 101-108.
- 13) 板屋民子、徳丸雅一、砂川誠、正木宏幸、青木敦子、岩崎久夫(1987):日獣会誌、40, 191-196.
- 14) 清水晃、堀江理香(1999):日食微誌、16, 257-261.
- 15) 蔣長苗、劉佩紅、丁健平、劉旭光、胡東良、品川邦汎(2001):日食微誌、18, 43-47.
- 16) 楠くみ子、潮田弘、神真知子

、新井輝美、岩谷美枝、石上武、山田澄夫(1998): 日食微生物誌、15, 161-165.

17) 野村秀一、原賀壯勇、花木秀明、永山在明(2002): 日食微生物誌、19, 17-20.

18) 潮田弘(2000): 食衛誌、41, J335.

研究発表

1) 論文発表

(1) Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T. and Kitagawa, H. (2005): Characterization of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus isolated from retail raw chicken meat in Japan. J. Vet. Med. Sci., 67(1), 107-110.

(2) Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. and Inamoto, T. (2005): Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in

retail raw chicken meat throughout Japan. J. Vet. Med. Sci., 67(3), 269-274.

2) 学会発表

中野千紗、清水 晃、河野潤一、北川 浩、松村浩介、藤尾公輔、北井 智 (2005): 人・家畜・家禽の鼻腔におけるエンテロトキシゲン (SE) 産生黄色ブドウ球菌及びMRSAの保菌状況と分離株の性状解析、第140回日本獣医学会学術集会講演要旨集、p.141

知的所有権の修得状況
なし

表1 試料 10g 法による市販食肉からの黄色ブドウ球菌の検出状況

検体	検体数	陽性検体数	
		直接平板培養法	増菌培養法***
牛肉*	15	1 (6.7%)	6 (40.0%)
豚肉*	15	1 (6.7%)	5 (33.3%)
鶏肉**	15	5 (33.3%)	11 (73.3%)
牛肉ミンチ	40	5 (12.5%)	26 (65.0%)
豚肉ミンチ	40	4 (10.0%)	30 (75.0%)
鶏肉ミンチ	40	9 (22.5%)	32 (80.0%)

*スライス肉 ** もも肉、むね肉

*** スライス肉は 7.5%NaCl 加 HI ブイヨン+ピルビン酸ナトリウム+リン酸ニカリウム、ミンチ肉は 7.5%NaCl 加 HI ブイヨン

表2 試料 25g 法による市販食肉からの黄色ブドウ球菌の検出状況

検体	検体数	陽性検体数	
		直接平板培養法	増菌培養法***
牛肉*	20	2 (10.0%)	8 (40.0%)
豚肉*	20	0	1 (5.0%)
鶏肉**	20	2 (10.0%)	12 (60.0%)

*スライス肉 **もも肉、むね肉 ***7.5%NaCl 加HI ブイヨン+ピルビン酸ナトリウム+リン酸ニカリウム

表3 市販食肉の黄色ブドウ球菌陽性検体における汚染菌数 (MPN 法)

		MPN/g						
検体	検体数	0.3~0.92	1.1~9.5	15	24	46	110	>110
試料 10 g 法	牛肉*	6	1	5				
	豚肉*	5	3	1		1		
	鶏肉**	11		3		1	1	3
	牛ミンチ	26	8	13	1		1	2
	豚ミンチ	30	13	12	1	1		1
	鶏ミンチ	32	10	11	2	2	4	
試料 25 g 法	牛肉*	8	6	2				
	豚肉*	1		1				
	鶏肉**	12	3	4	2	1	1	1

* スライス肉 ** もも肉、むね肉

表4 ふき取り法による市販食肉からの黄色ブドウ球菌の検出状況

検体	検体数	陽性検体数	
		直接平板培養法	増菌培養法 ***
牛肉*	80	6 (7.5%)	24 (30.0%)
豚肉*	80	5 (6.3%)	31 (38.8%)
鶏肉**	165	66 (40.0%)	114 (69.1%)

*スライス肉 ** もも肉、むね肉 ***7.5%NaCl 加HI プイヨン

表5 ふき取り法による市販魚介類からの黄色ブドウ球菌の検出状況

検体	検体数	陽性検体数 (増菌培養法 *)
エビ	51	20 (39.2%)
イカ	40	1 (2.5%)
アジ	30	0
サンマ	28	7 (25.0%)
イワシ	24	2 (8.3%)
サバ	19	6 (31.6%)
ブリ	6	2 (33.3%)
サワラ	2	2 (100%)
タイ	4	0
マグロ	1	1 (100%)
サケ	1	0
スズキ	1	0
シマアジ	1	0
計	208	41 (19.7%)

* 7.5%NaCl 加 HI ブイヨン+ピルビン酸ナトリウム+リン酸二カリウム

III.

研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
------	---------	----------	-----	------	-----	-----	-----

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Michiko Miyahara	Simultaneous enrichment Detection Method for Four Types of Pathogenic Bacteria in Food	Biocontrol Science	10	91-96	2005
Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T. and Kitagawa, H.	Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from retail raw chicken meat in Japan	J. Vet. Med. Sci.	67	107-110	2005
Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. and Inamoto, T.	Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus in retail raw chicken meat throughout Japan	J. Vet. Med. Sci.	67	269-274	2005
Fukuda S, Tatsumi H, Igimi S, Yamamoto S.	Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken meat samples	Letters in Applied Microbiology	41	379-384	2005
Terai S, Yamasaki M, Igimi S, Amano F.	Expression of SEp22, a pathogenicity - related protein of Salmonella Dps, in Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated from the poultry farms in Japan	Bioscience and Microflora	24	113-118	2005
Asakura H, Igimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S.	Role of in vivo passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7: Cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses	FEMS Microbiology Letters	253	243-249	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	2005

小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 島山 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		