

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18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19（2007）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・・・・・・・・	147
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・・・・・・・・	221
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）

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）

工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

山本 茂貴（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部）

五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部）

研究要旨

主要な食中毒菌に対する日本独自のリスクアセスメントモデルを策定してリスク管理措置を検討し、食中毒発生防止を測る必要がある。このため、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う。本研究では、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、ビブリオ、カンピロバクター、リステリアを対象に実施する。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。

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
  - 1) 自然汚染食肉検体での検出
  - 2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討
2. 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  
マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出
3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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

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。現在の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、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌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国内で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。加えて、国内でも重症例の発生が明らかになったリステリアについては、国内の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、リスクアセス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行い、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。

さらに、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。

## B. 研究方法

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

### 1) 自然汚染食肉検体での検出

#### (1) 供試検体

平成18年4月から平成18年12月に国内で入手した輸入牛肉 439 検体を供試した。原産国は7カ国であった。

#### (2) 増菌培養方法

増菌方法として、16年度に確立した血清型0157以外の血清型も含めた腸管出血性大腸菌を迅速に効率よく検出する方法で行った。

#### (3) 遺伝子検出方法

増菌培養液の VT スクリーニングを LAMP 法を用いて行った。

#### (4) 免疫磁気ビーズ (IMS) 法

増菌培養液 1 ml について血清型 0157、026 および 0111 の各々の免疫磁気ビーズ (デンカ生研) を用いて濃縮を行った。

#### (5) 分離培養法

分離平板培地は血清型 0157 用に BCM0157 培地、クロモアガー0157 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加ソルピトールマッコンキー培地 (CT-SMAC)、血清型 026 用に Vi RX 026 培地およびセフィキシム・亜テルル酸

加ラムノースマッコンキー培地 (CT-RMAC) を用いた。血清型 0111 用に Vi RX 026 培地および CT-SMAC を用いた。

(6) LAMP 法で陽性の検体における VT 陽性菌の検出方法

増菌培養液をリン酸生理食塩水にて  $10^{-6}$  まで 10 倍階段希釈した。この各希釈液 0.1ml を RX 026 寒天培地 (セフィキシムおよび亜テルル酸ナトリウム不添加) (栄研化学) 2 枚ずつに塗抹し 35°C にて 20 時間培養した。また、各 10 倍階段希釈液 50ml を Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット (栄研化学) を用いて VT 遺伝子の検出を行った。

2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

(1) 各種 DNA 抽出法の検討

各種 DNA 抽出方法の比較を行った。

(2) 血清型による増菌培養条件の比較

検体には牛挽肉、カイワレ大根およびアルファルファを使用した。

2. 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

マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出

1) 使用菌株

EPEC E2348/69 [*eae*]、EHEC 99-140-A [*stx1*, *eae*]、EHEC V-831 [*stx2*, *eae*]、STEC EC7225 [*stx1*]、STEC EC8212 [*stx2*]、ETEC 97-245-244 [*est* (STp)]、ETEC E7476 [*est*

(STh)]、ETEC E5798 [*elt*]、EAggEC E59152 [*aggR*]、EIEC E35990 [*virB*]、DAEC V-64 [*afaB*]、EAST1EC 96-127-23 [*astA*]

2) 培地

供試菌株の培養にはトリプトソーヤブイヨン (TSB; Oxiod, Hampshire, UK)、トリプトソーヤ寒天平板 (TSA; Oxiod) を使用した。

3) 通常の PCR 法

4 種の遺伝子 (*invE*・*stx*・*est*・*elt*) を同時検出するテトラプレックス PCR、2 種の遺伝子 (*afaC*・*astA*) あるいは (*eae*・*aggR*) を同時検出するデュプレックス PCR 法を実施した。

4) プライマーとプローブの設計

リアルタイム PCR に使用したプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 2.0 (ABI) を用いて、添付のガイドラインに従い設計した (表 3)。塩基配列は米国生物工学情報センター (NCBI; National Center for Biotechnology Information) の提供する GenBank から収集した。

5) DNA 抽出

テンプレート DNA は安定的に抽出される必要がある。そこで PUREGENE Cell and Tissue DNA Isolation kit (Gentra Systems, Minnesota, USA) を用いて、添付のプロトコールを一部改変して以下の手順で行なった

6) リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は *stx* (*Stx1*・

Stx2)・*eae*トリプレックス、*stx1*・*stx2*デュプレックス、*est* (STp・STh)・*elt*トリプレックス、*est* (STp)・*est* (STh)デュプレックス、*aggR*・*astA*デュプレックス、*virB*・*afaB*デュプレックスの組み合わせで行なった。

7) プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

設計したプライマー・プローブ(表4・5)についてリアルタイムPCRにおける有効性を、 $T_m$ 値、増幅産物サイズ、 $C_t$ 値などから検討し、さらにマルチプレックス反応において各プライマーやプローブが相互に反応しないかを確認した。

8) リアルタイムPCRの感度

マルチプレックス・リアルタイムPCRの感度を検討した。

3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

1) 接種菌株

インドネシア産ブラックタイガーから分離された *Salmonella* Weltevreden(以下 SW と略す)および一昨年度の野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究においてタイ産チリペッパーから分離された *Salmonella* Senftenberg(以下 SS と略す)を使用した。

2) 接種検体

インドネシアで海水飼育された同一ロットのブラックタイガーについて、サルモネラの汚染の有無、一般生菌数

および大腸菌群数を以下の方法で測定した。

3) 菌液の作製

TBS で 24 時間培養した菌液を PBS で 100 倍希釈し、それを接種菌液とした。

4) 菌の接種方法

冷凍されたエビを 20℃の温浴中で短時間に解凍し、体表と体内の 2 通りの方法で接種した。体表：殻付きのエビ 1 匹をストマフィルターに入れ、体表全体に 50  $\mu$ l を接種し、冷凍保存した。体内：殻を除いてから注射器で腸管付近の 3 カ所に注射器を用いて計 50  $\mu$ l 接種し、ストマフィルターに入れ、冷凍保存した。

5) 冷凍保存温度および保存期間

保存温度は -10℃ から -30℃ の 3 温度、保存期間は 1、2、4、8、12 週間の 5 期間とした。

6) 菌数測定

1 検体は接種部位・保存温度・保存期間ごとに 3 匹を使用した

4. 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

ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と海水および魚介類からの検出  
熊本県及び静岡県にて海水を採水しビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの増菌培養における問題点を解明するために菌数の増加について培養法および real-time PCR 法で定量した。

5. 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) 定量的リスクアセスメント

カナダのリスクアセスメントモデルをレビューし、解析した。

日本のデータは発症菌量に関するデータが不足していることから、暴露リスクを中心にリスクアセスメントを行った。

### 2) 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増菌選択培養し、常法に従い同定を行い、菌株を収集した。

## 6. 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) シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

道東海域で漁獲された生鮮シロサケを用いた筋子製造における、原材料、製造工程、製造環境における汚染指標菌およびリステリアの汚染状況を明らかにし、リステリアの菌数の変動を検討した。

### 2) 味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

調味カズノコにおいて、輸入原材料から最終製品に至るすべての過程でリステリア菌に対する危害分析を行った。

### 3) ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

PCR法を用いてチーズから *L. monocytogenes* を迅速に検出する方法を検討した。チーズのEB増菌液および half fraser 増菌液に *L. monocytogenes* を接

種しDNAを抽出してPCR法を実施した。

### 4) 国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

全国の病院から送付された *Listeria monocytogenes* 臨床由来株33検体を使用した。血清型が同定されていない菌株はリステリア免疫診断用血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

### 5) 輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

11カ国(タイ、ブラジル、ニュージーランド、米国、アイルランド、カナダ、オーストラリア、中国、デンマーク、フランス、メキシコ)から輸入された生肉から分離した *L. monocytogenes* 菌株と国内分離菌株について、iap領域の塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

### 7. 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

平成18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。原因物質名、発生年月日、患者数(人)、摂食者数(人)、原因食品名、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を取りまとめた

## 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

## 1) 自然汚染食肉検体での検出

供試した 439 検体中 9 検体（オーストラリアおよびアメリカ産）について LAMP 法 VT 遺伝子検出スクリーニングによって増菌培養液に陽性反応が認められた。しかし、血清型 0157、026 および 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り、それら以外の血清型の腸管出血性大腸菌が含まれることが明らかになった

## 2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

### (1) 各種 DNA 抽出法の検討

昨年度の結果から熱抽出法は優れないことが明らかになったため、アルカリ試薬およびキット等を用いた抽出方法を検討した。

### (2) 血清型による増菌培養条件の比較

血清型 0157 については、アルファルファにおいて 3 菌株とも mEC での 37 および 42℃ 培養、NmEC での 42℃ 培養の遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された。牛挽肉においては NmEC での 42℃ 培養の全試験方法で検出されたが、mEC での 37℃ 培養で検出されない塗抹方法があった。血清型 026 については、アルファルファおよび牛挽肉において供試した 4 株とも遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された。血清型 0111 については、牛挽肉において 1 菌株が mEC での 37℃ 培養での培養法では陰性の塗抹方法もあった。

## 2. 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

マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出

### 1) プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討

リアルタイム PCR を行い、通常の PCR の結果と比較した。 *stx1* 陽性 16 株 (*Shigella dysenteriae* 1 株を含む)、 *stx2* 陽性 20 株、 *eae* 陽性 35 株、 *est* (STp) 陽性 4 株、 *est* (STh) 陽性 6 株、 *elt* 陽性 5 株、 *aggR* 陽性 14 株、 *astA* 陽性 23 株、 *afaB* 陽性 6 株、 *virB* 陽性 2 株については PCR 結果と一致した。

### 2) リアルタイム PCR の感度

マルチプレックス・リアルタイム PCR の至適条件を検討し、確定した。

## 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

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、両者の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 パターンではなかった。しかしながら、鶏肉由来の SS 1 株のパターンはヒト由来の 2 株と近似し、香辛料の SW 1 株はヒト由来の 2 株と近似していた。

## 4. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

### 1) 接種検体の生菌数と大腸菌数

一般生菌数 (log CFU/g) は、殻付きのもの 5.77、殻を取ったもの 5.78、大腸菌群数は、殻付きのもの 2.40、殻を取

ったもの 2.30 であった。

## 2) 接種菌量

接種した 50 $\mu$ l の菌数 (log CFU/匹) は、SW が平均 5.43、SS が平均 5.49 であった。

## 3) サルモネラ菌数の変化

3 検体の平均値から得られた 1 匹あたりのサルモネラ菌数 (log CFU/匹) の変化は、SW・体表が 5.78、SW・体内が 6.17、SS・体表が 5.65、SS・体内 6.18 であった。

## 5. 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海水および魚介類からの検出

海水検体からのビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの検出ではビブリオ・バルニフィカスは、7月の検体では培養法で検出されたが、8月以降の検体ではリアルタイム PCR 法では検出されたにもかかわらず、培養法ではほとんど検出されなかった。このリアルタイム PCR 法で得られたビブリオ・バルニフィカスの菌数はビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ以外のその他の菌の菌数の約 1/100 であった。また、腸炎ビブリオは、ビブリオ・バルニフィカスとは異なり、いずれの検体も培養法で測定でき、多くの検体でリアルタイム PCR 法と近い定量値であった。

### 2) ビブリオ・バルニフィカス感染症

## 発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

感染症原因食材である塩分濃度 17% の「アナジャコ醤油漬け」から高い数値のビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオを検出した。しかし、分離したビブリオ・バルニフィカス株と臨床由来株との PFGE による解析では泳動パターンは一致しなかった。

### 3) 蓄養前後におけるアサリのビブリオ属細菌数の変化

検体採取日に試験を開始し TDH 遺伝子が検出された 2 検体は、ともに蓄養後 TDH 遺伝子が検出されなくなった。

## 6. 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) 定量的リスクアセスメント

カナダの定量的リスクアセスメントモデルに従い日本のデータを可能な限り適用して推計を行った。ベースラインデータとして、日本は冷却水に塩素を添加しているが、適正な濃度が保たれていないと仮定した。その結果、冷却水中でのカンピロバクターの菌数変化は、カナダのモデル同様に三角分布を適用し、Triang(-2.5, -1.28, -0.25) と推定された。

### 2) ブロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

盲腸内容物からのカンピロバクター分離頻度を表 1 に示した。2003 年度から 2006 年度の調査の合計で 184 農場中 84 農場 (45.7%) が

カンピロバクター陽性であった。2006年度のみでは陽性率70%と高率であった。個体ごとでは2003から2006年度の合計で2943羽中386羽(13.1%)が陽性であった。

#### 7. 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) シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

シロサケスジコ製造において、原材料から最終製品に至る全ての過程でリステリアは、検出されなかった。肉片や粘液などの汚れを溜めやすく、容易に排除しにくい箇所、微生物増殖の温床となりやすい。これらの箇所が、リステリアに置いても重要な管理ポイントとなる。

##### 2) 味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

味付けカズノコ製造において、原材料から最終製品に至る全ての過程でリステリアは、検出されなかった。原卵は、カナダ産の輸入パール缶を使用しており、飽和塩水漬けされており水分活性は非常に低かった。

##### 3) ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

チーズのEB増菌液及びhalf fraser増菌液に*L. monocytogenes*を接種しDNAを抽出してPCR法を行ったところ、アルカリ熱抽出のみでは106個/mlで検出されない場合があった。市販のキットを用いたが、検出感度は105個/mlまでであった。

#### 4) 国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

リボタイピングの結果から、今回調査した臨床由来リステリア菌株の30株が既存のDupont ID Number (DUP) 15種類に分類された。既存のDUPに分類されないもの(none)は3株見られ、そのうち2株は同一のリボパターン(none1)を示した。また、33株中7株(21.2%)がDUP1038に分類され、それらは全て血清型4bであった。

#### 5) 輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

輸入株30株は輸入国と血清型に対応してEGD株とは異なる10型に分類された。

#### 8. 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

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまでEnteritidisやTyphimuriumについては比較的知見が多く昨年までも結果が得られているが、今年度は異なる血清型による3事例の事例が報告された。少数の感染菌数であることが報告された。

#### D. 考察

##### 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

###### 1) 自然汚染食肉検体での検出

分離株については、9検体中2検体(22.2%)がVT1産生、6検体(66.7%)

が VT2 産生、1 検体 (11.1%) が VT1&2 産生で、9 検体中 7 検体 (77.8%) が血清型 OUT であり、その他 08:H19 および 0128 がそれぞれ 1 検体 (11.1%) ずつ分離された。

日本での流通牛肉全体の汚染率や菌株の解析等の汚染調査が必要である。牛肉を汚染している OUT が感染を引き起こしている可能性が考えられる。これまで血清型 0157 については食品からの検出方法が確立され行われているが、026、0111 も含め他血清型については効果的な方法が確立されていない。本研究で用いたような方法によって、確実に検出できれば汚染率や主要な血清型など汚染実態が把握でき衛生管理の必要な対象を効果的に明らかにできるものと思われる。

## 2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

昨年度の結果から熱抽出法は優れないことが明らかになったため、アルカリ試薬およびキット等を用いた抽出方法を検討した。どの食品でも今回実施した VT 遺伝子検出法のいずれも  $10^3$  cfu/ml 以上の腸管出血性大腸菌を含む食品培養液から確実に検出できることが明らかになった。しかし、チーズでは再現性が優れない場合があり、種類によって異なる可能性もあることからさらに検討が必要と考えられた。

血清型 0157 については、アルファルファ、牛挽肉で検出されたが、mEC での

37℃培養で検出されない塗抹方法があった。血清型 026 は、アルファルファおよび牛挽肉において供試した 4 株とも遺伝子検出法および培養法のいずれでも検出された。血清型 0111 は、牛挽肉において 1 菌株が mEC での 37℃培養での培養法では陰性の塗抹方法もあった。

これらの 3 血清型を網羅する増菌培養法として、mEC での 42℃培養が優れていたが、検体数や菌株数をさらに増やして検討する必要がある。また、いずれの条件を採用するのが最善か対象食品や対象血清型など目的を踏まえ選択することも有用と考えられる。

## 2. 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

### マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出

マルチプレックス PCR では鋳型量やプライマー量、またはプライマーのプライミング性能に偏りが生じると、一方の遺伝子の PCR 反応に酵素反応が集中し、単一の遺伝子の増幅時に比べ DNA 増幅量が低下する場合がある。これまでのところ、細菌のマルチプレックス・リアルタイム PCR による定量検出では、競合条件下での検出には注意が払われていない。しかしながら、食品や糞便を検体とするとき、複数の標的となる菌がそれぞれ異なる数存在している可能性は十分に考えられ、それらとともに検出できる方法が重要であると考えられる。その意味からも、今回

開発したリアルタイム PCR 条件は、実用性の高いものと期待できる。

下痢原性大腸菌を同時に網羅的に検出するリアルタイム PCR 法を確立した。今後は、本法を用いて食品や家畜あるいは環境の汚染実態調査を行い、その汚染源を探る予定である。

### 3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

接種したサルモネラの血清型として、SW と SS を使用したが、これは米国において輸入魚介類（主に東南アジア）から高率に分離されるサルモネラの血清型は、1 位が SW、2 位が SS であったことによった。とくに、SW はベトナムにおいてエビ、さらにウシ、ブタからも高率に分離されると報告されている。今回の実験では SW より SS の方が冷凍後の残存菌数が多い傾向がみられたが、血清型本来の冷凍保存に対する抵抗性の違いか、今後さらに例数を増やしての検討が必要である。

### 4. 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

ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討と海水および魚介類からの検出

APW にて 35℃ で増菌し分離する方法は、腸炎ビブリオには適しているが、ビブリオ・バルニフィカスには不十分であると思われた。また、ビブリオ・バルニフィカスが培養法で検出されなかったのは、腸炎ビブリオやその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中

での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、ビブリオ・バルニフィカスの効果的な選択増菌法及び選択分離培地の検討が必要と思われる。

### 5. 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) 定量的リスクアセスメント

ベースケースにおける各暴露経路での暴露リスクを比較すると生食と交差汚染は不十分な加熱調理に比べて圧倒的に大きい。

冷却段階での塩素濃度管理は、すべての暴露経路に対して暴露リスクをベースケースの約 36% に低減させるので、最も有効な食中毒対策であると考えられる。

消費者教育のうち生食の抑制は食文化の関係から効果が期待しにくい。加熱調理の徹底は時間がかかるが教育方法を検討し、中長期にわたり、継続的に実施する必要がある。

#### 2) プロイラー農場でのカンピロバクター汚染実態

本調査では無作為に農場を選び材料の収集を実施しているが、疫学的解析にはさらに多数のサンプル確保が必要かもしれない。2006 年度までの 4 年間では約半数の農場由来の盲腸内容からカンピロバクターが分離され、個体別では約 13% の分離率であった。一方、農場に赴き総排泄腔スワブを採取し培養すると 19 農場中 17 農場が

カンピロバクター陽性という結果になり、個体別でも77%と高率になった。このことから、調査材料の収集方法によっても菌の分離率が大きく影響されるものと考えられる。

## 6. 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) シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

シロサケ筋子の製造工程、原材料、中間製品、最終製品のいずれからもリステリアは検出されなかったが、断頭機の魚体運搬ベルト、原魚裁割工程における機器類等、ローラーコンベアの軸受け部で、一般生菌数が顕著に高いことから、これらの箇所での微生物制御を重点的に行う必要がある。

### 2) 味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

調味カズノコの製造工程、原材料、中間製品、最終製品の一般衛生管理事項の再点検と、製造環境の徹底した洗浄・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。

### 3) ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

PCR法を用いた増菌培養液からの *L. monocytogenes* 簡易迅速な検出方法を検討した。

チーズ 25g 当たり 10cfu のレベルで菌を接種して EB 培地あるいは half Fraser 培地で 24 時間培養後の培養液中の *L. monocytogenes* の菌数を測定したところ

102~106 cfu/ml であったため、増菌後の菌数が低い場合に上記の方法では検出ができないと考えられた。チーズはタンパク質、脂肪など PCR 反応を阻害する物質が多いため一次増菌液から簡易に DNA サンプルを作製することは容易ではなく、今後の検討が必要である。

### 4) 国内で分離されたりステリア臨床株の分子疫学的研究

今回の研究により、以前行った 10 種の病原因子の保有状況では型別できなかった患者由来株の分子疫学的型別が、リボタイピングの手法を用いることにより可能となることが示された。

全国各地で分離された患者由来株の 2 割以上が DUP1038 に型別される血清型 4b の菌株であった。今後国内産食品や輸入食品等から分離された本菌のリボタイピングによる型別を行うことで、同じ遺伝子型別に分類される菌株がどのような食品に多く含まれているかを明らかにすることが可能となり、食品媒介リステリア症の原因食品を迅速に同定するための有用な情報となりうると思われた。

### 5) 輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

輸入株 30 株は輸入国と血清型に対応して、EGD 株とは異なる 10 型に分類された。この 10 型中の 3 型は、本邦株で作成した系統樹中で新しい枝を形成していたが、本邦株のみで作成した系統樹を大きく変化させることはなかった。従って、輸入株も本邦株と同様に分子進化学的に

A、B、C 群の 3 系統に大別可能な系統樹上に分類し得ることを明らかにした。また、この 3 系統に含まれる分離株の血清型の分布との関連を解析することにより、系統と血清型との強い関連性を明らかにした。

#### 7. 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

発症菌数を把握することを目的に調査を行っているが、サルモネラにおいてはこれまで Enteritidis や Typhimurium については比較的知見が多く昨年までも結果が得られ、事例が報告された。少数の感染菌数であることが報告された。

事例 1 (血清型 Montevideo) 事例 2 (血清型 Enteritidis) 事例 3 (血清型 Enteritidis) 事例 4 (血清型 04:H:eh, NT) 事例 5 (血清型 Agona) 腸管出血性大腸菌の事例 (事例 6) を紹介した。

本事業は、食中毒発生現場に最も近い地方自治体の協力のもとで実施してきたが、各自治体の積極的な参加ではあったが、実際細菌性食中毒事例として調査できたのは 3 年目である今年度も例年とほぼ同様に 6 件にすぎなかった。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、さらに継続的な事業による重要性の広い理解とデータの蓄積が必要ではないか考える。

#### E. 結論

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

##### 1) 自然汚染食肉検体での検出

迅速で検出感度の高い検査方法が多くの試験で求められているが、腸管出血性大腸菌の検出法については、血清型に関わらず病原因子であるペロ毒素を検出することによる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る。

##### 2) 低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討

腸管出血性大腸菌の検出法について、血清型 0157 だけではなく 0157 に次ぎ日本での主要な血清型である 026 及び 0111 を対象に含め検討した。以上の結果をもとに、腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の検出法として迅速で高感度な方法が示された。

#### 2. 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

##### マルチプレックス定量 PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検出

志賀毒素産生性大腸菌・腸管毒素原性大腸菌・腸管病原性大腸菌・腸管侵入性大腸菌・腸管凝集接着性大腸菌・分散接着性大腸菌・EAST1 遺伝子保有大腸菌の 8 種類の病原遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *est* (STp)、*est* (STh)、*elt*, *aggR*, *astA*,

*virB*, *afaB*) を標的として、リアルタイム・マルチプレックス PCR 法の応用を試み、本手法は DEC の網羅的スクリーニングに極めて有効な手段になると期待される。

### 3. 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

エビでのサルモネラ接種冷凍保存実験の結果、サルモネラはエビで冷凍保存された場合、とくに $-30^{\circ}\text{C}$ では菌数が長期間維持されることが確認できた。エビを解凍する時にはサルモネラ汚染を広げないように、解凍したエビや解凍水からの二次汚染の防止、手洗いの励行、調理器具の洗浄消毒等衛生管理を行うことが必要である。

### 4. 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

ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討では、APW での  $35^{\circ}\text{C}$  増菌の場合、分離法は腸炎ビブリオには適しているが、ビブリオ・バルニフィカスには不十分であると思われた。また、ビブリオ・バルニフィカスが培養法で検出されなかったのは、腸炎ビブリオやその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。今後、ビブリオ・バルニフィカスの効果的な選択増菌方法及び選択分離培地の検討が必要であると思われる。

### 5. 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) 食鳥処理プロセスにおける冷却水の塩素濃度管理、農場における感染予防対策、消費者教育による鶏肉の生食抑制および加熱調理の徹底の4つの食中毒対策シナリオのなかで、塩素濃度管理が最も効果があった。

2) 定量的リスクアセスメントはこうじるべきリスク管理措置を把握する上で非常に有効であることが確認された。

3) ブロイラー農場におけるカンピロバクターの流行要因には不明な点が多く、解析には適切な方法と十分なサンプル数が必要であろう。本調査ではカンピロバクター分離率、ナリジクス酸に対する耐性率の両者ともに高い値を維持しており、今後もモニターを続け、菌の流行や耐性獲得に関わる因子を解析していく必要がある。

### 6. 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) シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

断頭機の魚体運搬ベルト、原魚裁割工程における機器類等、ローラーコンベアの軸受け部で、一般生菌数が顕著に高いことから、これらの箇所での微生物制御を重点的に行う必要がある。

2) 味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

調味カズノコの製造工程、原材料、中間製品、最終製品の一般衛生管理事項の再点検と、製造環境の徹底した洗浄・殺菌を行い、衛生状態を確認する。

### 3) ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

チーズはタンパク質、脂肪など PCR 反応を阻害する物質が多いため一次増菌液から簡易に DNA サンプルを作製することは容易ではなく、今後の検討が必要である。

### 4) 国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

今回の研究により、以前行った 10 種の病原因子の保有状況では型別できなかった患者由来株の分子疫学的型別が、リボタイピングの手法を用いることにより可能となることが示された。

### 5) 輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

輸入株 30 株は輸入国と血清型に対応して、EGD 株とは異なる 10 型に分類された。

### 7. 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数の測定を全国の地方自治体に依頼したところ 101 自治体から承諾を得たが、実際に測定結果を得られた事例はサルモネラ 5 件、腸管出血性大腸菌 1 件の計 6 件であった。

病原物質の推定摂取量は、腸管出血性大腸菌においては 9 cfu 以下、サル

モネラ(血清型 Montevideo、Agona、Enteritidis、04:H:eh,NT)においては患者一人当たりについて 330 MPN-360,000,000 cfu であった。この結果から、非常に少ない摂取量でも感染が成立することが前年度に引き続き示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hara-Kudo, Y., Niizuma, J., Goto, I., Iizuka, S., Kamakura, K., Kaji, Y., Suzuki, S. and Takatori, K. Procedures for isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, which is independent of serotype, from beef naturally contaminated with the pathogen. 投稿中.

Hara-Kudo, Y., Konishi, N. Otsuka, K., Hiramatsu, R. Tanaka, H., Tsuchiya, T., Konuma, H. and Takatori, K. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by means of immunomagnetic separation methods in combination with a molecular method: a collaborative study. Int. J. Food Microbiol. 投稿中.

Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K. Kojima T., Ikedo, M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing

- Escherichia coli* using Loop-mediated isothermal amplification. J. Med. Microbiol. 56: 398-406, 2007.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. J. Food Prot. 70: 90-96, 2007.
- Goto, M., Hayashidani, H., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harboring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. Lett. Appl. Microbiol. In press.
- 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。日本食品衛生学会誌。47, 119-126, 2006.
- Hara-Kudo, Y., Ohtsuka, K., Onoue, Y., Otomo, Y., Furukawa, I., Yamaji, A., Segawa, Y. and Takatori, K. *Salmonella* prevalence, total microbial and spore populations in imported spices to Japan. J. Food Prot. 69:2519-2523, 2006.
- Otomo, Y., Abe, K., Odagiri, K., Shiroto, A., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Detection of *Salmonella* in spent hens and eggs associated with food-borne infections. Avian Diseases. In press.
- 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. Epidemiol. Infect. 134: 780-785, 2006.
- Yoneyama, N., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Effects of heat-degraded sugars on survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus* and other bacteria. J. Food Prot. 70: 373-377, 2007.
- Kamio, A., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Yahiro, T. and Konuma, H. Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in seawater. 投稿中.
- Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, Sata T, Ogasawara K, Fujima A and Hondo R. (2006) Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. J. Microbiol.

- Methods 66(1), 96-103.
- Asakura H, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, Makino SI. (2006) Enhancement of mice susceptibility to infection with *Listeria monocytogenes* by the treatment of morphine. Microbiol. Immunol. 50(7): 543-547.
- Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. (2006) The sigma factor, RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett. 263(1):54-60.
- Takeshi K, Kitagawa M, Kadohira M, Maruyama T, Igimi S, Kawamoto K, Makino S-I. (2007) Hazard Analysis of *Listeria monocytogenes* Contaminations in Processing of Salted Roe from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. J. Food Protect., in press.
- 仲真晶子. (2006) 食品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態. 日本食品微生物学会雑誌, 23(4):183-189.
- 五十君静信. (2006) 国内のリステリア症の現状とその制御に向けて. 日本食品微生物学会雑誌, 23(4):190-193
- 丸山務、五十君静信. (2006) シンポジウム *Listeria monocytogenes* の研究動向 司会の言葉. 日本食品微生物学会雑誌 23(4):182
- 仲真晶子. (2006) 食品媒介リステリア症. 臨床栄養, 108(5):512.
2. 学会発表
- 工藤由起子. 食品における腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の検査法に関する通知法への取り組みについて. 第27回日本食品微生物学会. 平成18年9月、大阪.
- 工藤由起子、瀬川優子、大塚佳代子、小西典子、平松礼司、田中廣行、小沼博隆、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌検出のための各種ベロ毒素遺伝子検出方法の比較. 第27回日本食品微生物学会. 平成18年9月、大阪.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌食中毒における畜産食品の重要性と食品の新しい公定検査法の策定. 平成18年度農林水産省家畜衛生研修会. 平成18年10月、つくば.
- 工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌の検出法について最近の話題. 第4回食の安全を確保するための微生物検査協議会. 平成18年12月、東京.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌の最近の傾向と新しい検査法について. 平成18年度厚生労働省食肉衛生技術研修会. 平成19年1月、東京.
- 工藤由起子. 「食品からの腸管出血性

大腸菌 0157 及び 026 の検査法」の背景について. 平成 18 年度食品衛生登録検査協会微生物研修会. 平成 19 年 1 月、東京.

工藤由起子. 食品からの腸管出血性大腸菌検出のための新しい公定法. 平成 18 年度地域保健総合推進事業地方衛生研究所と東海北陸ブロック微生物部門研修会、平成 19 年 1 月、愛知.

平松礼司、土屋 禎、小西典子、大塚佳代子、田中廣行、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌 0157 及び 026 の検査法の策定におけるコラボレイティブ・スタディによる評価. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、土屋 禎、田中廣行、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌検出に係わるベロ毒素遺伝子検出法の検討. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

小西典子、下島優香子、尾畑浩魅、門間千枝、仲真晶子、工藤由起子、甲斐明美、山田澄夫. 食品を対象とした腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の増菌培養法の比較検討. 第 10 回 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム. 平成 18 年 9 月. 東京.

土屋 禎、小西典子、森本 洋、畠山敬、磯部順子、横山栄二、浅井良夫、川森文彦、塚本定三、田中 忍、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの実施概要について. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

平松礼司、大塚佳代子、竹田義弘、田中真弓、濱崎光宏、山崎省吾、八尋俊輔、新妻 淳、鎌倉和政、有馬和英、小澤一弘、工藤由起子、高鳥浩介. 食品からの腸管出血性大腸菌血清型 0157 及び 026 の検出法に関するコラボレイティブ・スタディの結果について. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

小西典子、大塚佳代子、田中廣行、平松礼司、矢野一好、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 血清型および対象食品の違いによる腸管出血性大腸菌の検出方法に関する検討. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

大塚佳代子、小西典子、平松礼司、田中廣行、土屋 禎、小沼博隆、工藤由起子、高鳥浩介. 腸管出血性大腸菌の遺伝子検査法における検出感度の確保を目的とした食