

- 関するコロボレイティブ・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品培養液からの DNA 抽出法の検討. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.
- 日高あゆみ、渡部裕美、河村麻紀、高鳥浩介、西川 禎一. レタスの腸管出血性大腸菌 O157 汚染に対する各種殺菌料の効果と適用方法の検討. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 金子通治、浅井良夫、森田幸雄、大塚佳代子、金子誠二、古川一郎、野田裕之、工藤由起子、高鳥浩介. 輸入魚介類におけるサルモネラ汚染に関する研究. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.
- 右井淳子、近藤和雄、工藤由起子. 穀物加工品および原料におけるサルモネラおよび黄色ブドウ球菌のカテキンによる増殖および生残抑制効果. 第 92 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 18 年 10 月. 愛知.
- 山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信. 食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 第 20 回日本微生物生態学会総会. 2004 年 11 月 21-23 日. 仙台.
- 山崎学、長谷部保彦、北村和之、矢内原千鶴子、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* 検出用抗体: 31 kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討. 第 25 回日本食品微生物生態学会総会. 2004 年 9 月 28-29 日. 東京.
- 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の 27 kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 月 1-3 日. 大阪.
- 山崎学、山本茂貴、五十君静信. カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 2005 年 11 月 10-11 日. 金沢.
- Yamasaki, M., Amano, F., Kim, T.W., Yamamoto, S., and Igimi, S. Aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni* precultured under anaerobic condition. The 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (CHRO 2005). Gold Coast, Australia. September 2005.
- 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 第 78 回日本細菌学会総会. 2005 年 4 月 4-6 日. 東京.
- 奥谷晶子、五十君静信、山本茂貴. リステリア症診断のための ELISA 法の検討. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 月 1 日. 大

- 阪
- 岡田由美子、牧野壮一、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* の患者及び食品・環境由来株における病原因子関連遺伝子の保有状況. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 月 2 日. 大阪
- 五十君静信、奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴. わが国におけるリステリアの健康被害. 衛生微生物技術協議会第 25 回研究会. 2004 年 7 月 9 日. さいたま市
- 岡田由美子、牧野壮一、廣田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信. リステリアの病原性に関する検討. 衛生微生物技術協議会第 25 回研究会. 2004 年 7 月 9 日. さいたま市
- Kawamoto K, Makino S-I, Igimi S, and Takeshi K. The first food-borne outbreak associated with *Listeria monocytogenes* in Japan. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
- Igimi S, Okutani A, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Makino S, Maruyama T. Results of nationwide survey on listeriosis and the incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 12-15, 2004.
- Okada Y, Makino SI, Okada N, Yamamoto S, Igimi S. Role of *Listeria monocytogenes* sigma factors in survival of high osmotic conditions. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 12-15, 2004.
- 青山顕司、高橋千登勢、岡田由美子、五十君静信、山本茂貴、丸山務. 食品および臨床由来 *Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動解析 —第 2 報—. 第 25 回日本食品微生物学会. 2004. 9. 28. 東京
- 五十君静信. リステリアのリスクアセスメント. 第 53 回食と環境のセミナー. 2004. 10. 15 (東京)
- 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* の σ 因子の各種ストレス耐性における役割. 分子生物学会. 2004 年
- 五十君静信. 国内外における食中毒の動向とその制御. 微生物制御システム研究会公開講演会 “リステリア菌の汚染の動向と制御～欧米での最新情報から検査・制御まで～”. 日本防菌防黴学会. 2005. 1. 19
- 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. チルド食品研究会. 2005. 3. 1
- 仲真晶子. 食品媒介リステリア症. 日本防菌防黴学会第 32 回年次大会. 平成 17 年 5 月. 大阪.
- 馬場愛、樋脇弘、宮本敬久、瓜生佳世、江渕寿美、武田昭: 辛子明太子製造過程における *Listeria monocytogenes* の消長. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 2005 年 11 月. 金沢

- 仲真晶子. 食品の *Listeria* 汚染実態. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 17 年 11 月. 金沢.
- 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月眞理子、本藤良. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎研究 5, *Listeria monocytogenes* 分離株の分子進化学的解析. 第 139 回日本獣医学会学術集会. 2005.
- 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤良. と場に搬入された牛におけるリステリア菌の保有状況と *L.m* 分離株のゲノム構造の特性. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 2005.
- 小笠原邦敏、植田富貴子、望月眞理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤良. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎研究 6, *Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化学的解析. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 2005.
- 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* の σ 因子の食塩耐性における役割. 日本細菌学会総会. 2005.
- 朝倉宏、川本恵子、度合雅久、五十君静信、塚本定三、山本茂貴、牧野壮一. モルヒネによる *Listeria monocytogenes* 及び *Brucella abortus* 感染に対する感受性変化についての検討. 日本細菌学会総会. 2005.
- 五十君静信. 食品媒介リステリア感染症の現状とその制御に向けて. 第 89 回日本食品衛生学会学術講演会. 2005.
- Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. SigmaL contributes the osmotolerance of *Listeria monocytogenes*. The XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 2005.
- 五十君静信. 国内のリステリア症の現状とその制御に向けて. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会. 2005.
- 五十君静信. 国内のリステリア症の現状とその制御の方向性. 食の安全を確保するための微生物検査協議会講演会. 2005.
- 清家一生、福田雅史、小笠原邦敏、本藤良、植田富貴子. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究. 7. *Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化学的解析 (2). 第 142 回日本獣医学会学術集会. 2006.
- 樋口 篤、仲真晶子、小西典子、下島優香子、尾畑浩魅、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、福山正文、山田澄夫. チーズからの *Listeria monocytogenes* 検出法の比較検討. 第 27 回食品微生物学会学術集会. 平成 18 年 9 月. 大阪.
- 仲真晶子、小西典子、下島優香子、石崎直人、尾畑浩魅、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、五十君静信、諸角 聖、山田澄夫. *Listeria* のヒト糞便からの検出状況. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 2006.
- 岡田由美子、朝倉宏、岡田信彦、牧野壮一、

山本茂貴，五十君静信．*Listeria monocytogenes rpoN* 欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析．第79回日本細菌学会総会．2006．

Okada Y, Makino S-I, Okada N, Asakura H, Yamamoto S and Igimi S. Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. 10th International Symposium on Toxic Microorganisms. Washington DC USA. November 8, 2006.

五十君静信．食品媒介感染症としてのリステリア症の現状．ILSI Japan 食品汚染微生物 シンポジウム．2006.12.7

五十君静信．国内のリステリア症の現状．リステリア菌髄膜炎の11ヶ月の乳児例に関する指定発言．第546回日本小児科学会東京都地方会談話会 2007.3.10．帝京大学．東京

岡田由美子、石和玲子、高谷幸、山本茂貴、五十君静信．未殺菌乳を原料とするチーズ製造工程における *Listeria monocytogenes* の消長．日本細菌学会 2007.3.26．大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)
特になし

総 合 研 究 (分 担) 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

高 鳥 浩 介

平成16～18年度 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

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）

総合研究（分担）報告書

生食用の食肉及び野菜・香辛料における腸管出血性大腸菌及び
サルモネラ食中毒の予防に関する研究

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）

研究協力者

工藤由起子、山路史子	国立医薬品食品衛生研究所
飯塚信二、新妻 淳、三浦彰子、加地祥文	横浜検疫所 輸入食品・検疫検査センター
鎌倉和政、後藤郁夫、鈴木荘介、池田 健	神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター
小西典子、矢野一好、金子誠二、甲斐明美	東京都健康安全研究センター
尾上洋一、古川一郎、浅井良夫	神奈川県衛生研究所
田中廣行、土屋 禎 日本食品分析センター	小澤一弘 中部衛生検査センター
金子通治、野田裕之 山梨県衛生公害研究所	平松礼司 愛知県衛生研究所
熊谷 進 東京大学大学院	仁科徳啓 東海大学短期大学部
大塚佳代子 埼玉県衛生研究所	小沼博隆 東海大学海洋学部
西川禎一 大阪市立大学	森田幸雄 群馬県衛生環境研究所
宮城県保健環境センター	奈良県福祉部健康安全局食品・生活安全課
江戸川区江戸川保健所	福山市保健所
千葉市保健福祉局健康部 環境保健研究所	福岡県保健環境研究所
横須賀市健康福祉部 健康安全科学センター	大分県衛生環境研究センター
静岡県健康福祉部 中部保健所	大分市保健所
静岡市衛生研究所	沖縄県福祉保健部薬務衛生課

研究要旨

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および細菌学的研究について、サルモネラについては野菜・香辛料、魚介類等での汚染および細菌学的研究について検討した。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。

以下の3研究課題について3年間にわたり実施した。

1. 腸管出血性大腸菌による食中毒予防に関する研究

- 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
- 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
2. サルモネラ食中毒の予防に関する研究
 - 1) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究
 - 2) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究
 - 3) 及び人における *S. Senftenberg* と *S. Weltevreden* の分布と細菌学的解析
 - 4) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究
3. 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16年度から平成18年度にわたる調査研究)

A. 研究目的

日本で発症の多い細菌性食中毒の予防を目的として、主要な原因物質である腸管出血性大腸菌およびサルモネラについて以下の研究を行った。

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 による患者も多く報告されている。血清型 0157 については検査法の開発が進んでいるが、一方、血清型 026 及び 0111 については適切な方法が開発されておらず、食品検査、食中毒調査などにおいて適切な行政措置をとることが難しい。このため、食品検査や食中毒調査において迅速かつ感度と特異性に優れた検査方法を示す必要があり、本研究において検討した。

また、以前から野菜・香辛料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、本研究では香辛料・ハーブ等について国内で販売されている香辛料・ハーブ、魚介類等についてサルモネラを対象として汚染状況を中心に検討した。

さらに、近年世界的に普及しているリスク

アセスメントにおいて日本で発症している細菌性食中毒の原因物質に関する定量的なリスク評価が求められる。そこで、本研究では、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明確にすることを目的として各自治体の協力により事業を進めた。

B. 研究方法

1. 腸管出血性大腸菌による食中毒予防に関する研究

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

腸管出血性大腸菌の血清型 0157, 026, 0111 の各菌株を実験に供し、食品からの検出方法を研究した。すなわち、検出には自然汚染食肉および低菌数接種食品、増菌培養法、遺伝子検出法分離方法について研究を行った。

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

大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌 0169 を適確に釣菌する手法の検討として、

下痢原性大腸菌を食品から適確に検出・釣菌する方法を確立する目的で、コロニーブロット法の応用を試みた。

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 法の適用として ETEC、EPEC 及び EIEC を陽性対照として試験に供して検討した。

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について、菌株、培地、通常の PCR 法、DNA 抽出、リアルタイム PCR 法、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 の感度を検討した。

2. サルモネラ食中毒の予防に関する研究

1) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

国際的なサルモネラ汚染食品の把握を行うとともに、国内のブラックペッパー類、レッドペッパー類、クミン、カレーパウダー等の計 271 件の香辛料について、サルモネラ汚染状況を調べた。

2) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

食中毒患者や環境から分離した 430 菌株について、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成能のスクリーニングを行った。

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

市販の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 212 件、イカ 63 件等計 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%）について調査を行い、細菌学的検討を行った。

3. 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

調査研究した 3 年間で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、約 100 自治体から承諾を得た。依頼項目として、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に沿って詳細な情報を取りまとめた。

C. 研究結果

1. 腸管出血性大腸菌による食中毒予防に関する研究

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

供試した選択分離培地は、血清型 0157 および血清型 026 用のそれぞれについて特異的に検出できた。しかし、0111 についてはいずれの培地においても一般の大腸菌と同様の形態を示し、特に優位な特徴によって区別されることはなかった。

自然汚染食肉検体からの検出では 3 年間で供試した 720 検体中 11 検体の増菌培養液

に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。

低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討では、各種DNA抽出法の検討を行ったところ、多くの食品で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検出できた。チーズでは再現性は困難であり、検討が必要であった。

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、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。

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

大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌0169を適確に釣菌する手法の検討を行ったところ、0169は、選択分離培地上のコロニーをニトロセルロース膜に転写し、抗0169免疫血清を利用した酵素抗体法を実施することで、確実に識別釣菌できた。

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、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。

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では、プライマーおよびプローブの有用性と特異性の検討において、リアルタイムPCRを行い、通常のPCRと比較したところほぼ一致した。

2. サルモネラ食中毒の予防に関する研究

1) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

野菜・香辛料から、国内における香辛料・ハーブ等でサルモネラはブラックペッパーおよびレッドペッパー類から検出され、その血清型はそれぞれ*S. Weltevreden*および*S. Senftenberg*であった。

2) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

サルモネラの生存に関する研究でクリスタルバイオレット染色法によるスクリーニングにより、バイオフィーム形成能は菌株間で大きな差が認められた。

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

食品及びヒト由来SS株とSW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SS株はヒト由来株と同一のPFGEパターンではなかった。

4) 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から*S. Weltevreden*を分離した。

3. 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

全国の自治体から実際に調査結果の得られた事例は3年間で17件であった。内訳はサルモネラ、腸管出血性大腸菌性、カンピロバクター、腸炎ビブリオなどであった。100以下の菌数の摂取によっても食中毒の発生が認められた。

D. 考察

1. 腸管出血性大腸菌による食中毒予防に関する研究

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

本研究での結果および既知の情報から、迅速で感度の高い腸管出血性大腸菌検査法を考察した。例として、冷凍食肉からの腸管出血性大腸菌 血清型 0157, 026, 0111 の検出法について遺伝子検出を取り入れて迅速で高感度な方法が提案できた。

自然汚染食肉検体での検出では輸入牛肉から少数例ではあるが腸管出血性大腸菌が検出された。さらに今後のデータの蓄積が必要と思われる。

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。また、各種 DNA 抽出法の検討から、VT 遺伝子検出法で 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が、さらに検討を必要とする。

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

大腸菌群に汚染された食材から志賀毒素産生性大腸菌および腸管毒素原性大腸菌 0169 を適確に釣菌する手法の検討から、志賀毒素 (Stx) 産生菌、特に Stx2 産生菌の反応は明瞭であったが、Stx2 型バリエーションに対する抗体の併用が検討されねばならない。

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、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 産物のサイズのみで判定しているため、偽陽性の可能性を否定できないと思われた。

2. サルモネラ食中毒の予防に関する研究

1) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

海外でも、香辛料・ハーブ等でのサルモネラ汚染の警告・通知があり、日本においてもサルモネラの検出割合は低いとはいえ、汚染品が国内で販売されていることが判明した。このため、加熱不十分の調理法によって使用され、さらに調理過程から人が食するまでにサルモネラが増殖できる段階が含まれる場合、食中毒を発生させる可能性が考えられる。さらに、他の腸内細菌系の食中毒細菌が分離されても矛盾しないと考えるため、今後の検討が必要である。

2) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

サルモネラは、バイオフィルムによって塩素に対する耐性が増加すること、酸耐性には影響しないことが報告されている。今後、この方法で確認したバイオフィルム生成能の高い菌株と低い菌株を用いて、乾燥条件に対する耐性を比較検討する必要がある。

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

香辛料由来株に近似するサルモネラが分離されたが、タイや沖縄県で SW を起原因菌とする事例少くないため今後関連性を検討する必要があると考えられる。

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 H₂S 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。食中毒患者から分離した *S. Weltevreden* の PFGE パターンと比較することにより汚染源の特定の可能性が示唆された。

3. 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

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3年間で17件であった。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. 腸管出血性大腸菌による食中毒予防に関する研究

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

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の検討から、血清型に関わらず病原因子であるベロ毒素を検出する方法を考察した。

自然汚染食肉検体での検出では、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、血清型 O157 株を分離した。迅速で検出感度の高い検査方法が多く試験で求めら、腸管出血性大腸菌検出法は、血清型に関わらず病原因子であるベロ毒素検出法がで

き、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。

低菌数の腸管出血性大腸菌接種食品における検討により血清型 0157 以外に日本での主要な血清型である 026 及び 0111 についても、迅速で高感度な方法の開発が示された。

迅速で検出感度の高い検査方法として、腸管出血性大腸菌検出法が確立され、血清型に関わらず病原因子であるベロ毒素を検出する適切な検出ができた。

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

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。

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では、志賀毒素産生性大腸菌・腸管毒素原性大腸菌・腸管病原性大腸菌などの8種病原遺伝子を標的として、リアルタイム・マルチプレックス PCR 法の応用を試み、DEC スクリーニングに有効な手段になることが期待される。

2. サルモネラ食中毒の予防に関する研究

1) 野菜・香辛料におけるサルモネラ汚染に関する研究

サルモネラについては国内販売の香辛料・ハーブ等からサルモネラが低頻度・低汚染菌数であったが分離された。

2) 乾燥条件下におけるサルモネラの生存に関する研究

中毒患者から分離された菌株が比較的高

いバイオフィルム形成能を示す傾向が認められた。

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

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。

4) 魚介類のサルモネラ汚染に関する研究

サルモネラの輸入魚介類において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。エビでのサルモネラ接種冷凍保存により、とくに -30°C では菌数が長期間維持されることが確認できた。

3. 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い 17 件の事例報告があった。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、今回少数の菌数でも発症することが確かめられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi, K., Hattori M., Hara-Kudo, Y., Okubo, T., Yamamoto, S., Sugita-Konishi, Y. Glycopeptide derived from hen egg ovomucin has the ability to bind enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J., Agri. Food Chem. 52:5740-5746, 2004.

Hara-Kudo, Y., Kobayashi, A.,

Sugita-Konishi, Y., Kondo, K. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. J. Food Protection. 67: 2820-2824, 2004.

田中啓子、本井博文、工藤由起子. 麺および野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 損傷菌の検出に関する検討. 日本食品衛生学会誌. 45: 113-119, 2004.

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. 133, 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* 0:8 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、小西典子、高鳥浩介. 液卵製造工程のモニタリングによる微生物学的問題点の調査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., and Takatori, K. Incidence of *Salmonella* in imported spices in Japan. J. Food Prot., 69, 2519-2523, 2006.
- Nakajima, D., Ishii, R., Kageyama, S., Onji, Y., Mineki, S., Morooka, N., Takatori, K. and Goto, S. Genotoxicity of microbial volatile organic compounds. Journal of Health Science, 52(2), 148-153, 2006.
- 高鳥浩介. 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 β -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 grass. 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, 2005.
- 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. J. Med. Microbiol. 56: 398-406, 2007.
- 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.
2. 学会発表
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 O157 の発芽野菜における研究. 第 25 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.
- 大塚佳代子、田中成幸、柳川敬子、工藤由起子、高鳥浩介. 食品および牛枝肉の腸管出血性大腸菌 O157 検査における LAMP 法の評価. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.
- 工藤由起子. 液卵等によるサルモネラ食中毒について. 平成 16 年度食品安全行政講習会、平成 16 年 6 月、東京.
- 工藤由起子、高鳥浩介. 流通液卵の細菌学的解析と液卵に関連するサルモネラ食中毒について. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.
- 工藤由起子. 卵および液卵のサルモネラ汚染について. 広島食品微生物研究会第 5 回衛生管理技術情報研修会. 平成 17 年 3 月. 広島.
- 大塚佳代子、柳川敬子、高鳥浩介、工藤由

- 起子. LAMP 法による液卵からのサルモネラ検出および分離菌株の細菌学的解析. 第 24 回日本食品微生物学会. 平成 16 年 9 月、東京.
- 尾上洋一、工藤由起子、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. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.
- 古川一郎、尾上洋一、工藤由起子、高鳥浩介. 液卵による製造および加工施設内汚染を想定した *Salmonella* Enteritidis の生残性. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島.
- 杉山明、矢野拓弥、中野陽子、赤地重宏、岩出義人、山内昭則、巽俊彰、伊藤英雄、工藤由起子、高鳥浩介. 養鶏場、食鳥処理場の施設及び鶏、卵等の *Salmonella* sp. 汚染状況. 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会. 平成 16 年 11 月、広島
- Hara-Kudo, Y. and Sugita-Konishi, Y. Antibacterial action on pathogenic bacteria by green tea catechins The 8th International Symposium on Green Tea. May 2005, Soul.
- 工藤由起子. 腸管出血性大腸菌 0157 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ル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。
- 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品培養液からの DNA 抽出法の検討. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

日高あゆみ、渡部裕美、河村麻紀、高鳥浩介、西川禎一. レタスの腸管出血性大腸菌 0157 汚染に対する各種殺菌料の効果

と適用方法の検討 第 26 回日本食品微生物学会学術総会 平成 17 年 11 月 金沢

金子通治、浅井良夫、森田幸雄、大塚佳代子、金子誠二、古川一郎、野田裕之、工藤由起子、高鳥浩介. 輸入魚介類におけるサルモネラ汚染に関する研究. 第 27 回日本食品微生物学会学術総会. 平成 18 年 9 月. 大阪.

右井淳子、近藤和雄、工藤由起子. 穀物加工品および原料におけるサルモネラおよび黄色ブドウ球菌のカテキンによる増殖および生残抑制効果. 第 92 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 18 年 10 月. 愛知.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

特になし

総 合 研 究（分 担）報 告 書

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

工藤由起子

平成 16～18 年度 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

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）

総合研究（分担）報告書

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

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）

研究協力者

宮坂 次郎	熊本県保健環境科学研究所	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
中島 龍一	熊本県保健環境科学研究所	荒平 雄二	熊本県保健環境科学研究所
甲木 和子	熊本県保健環境科学研究所	徳永 晴樹	熊本県保健環境科学研究所
三輪 憲永	静岡県環境衛生科学研究所	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
岩出 義人	三重県科学技術振興センター	八柳 潤	秋田県衛生科学研究所
山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所	右田 雄二	長崎県衛生公害研究所
小沼 博隆	東海大学海洋学部	中村まき子	長崎県衛生公害研究所
神尾 暁	東海大学海洋学部	田久保好慶	東海大学海洋学部
高橋 肇	国立医薬品食品衛生研究所・東海大学海洋学部		
瀬川 優子	国立医薬品食品衛生研究所		

研究要旨

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) 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ことが知られており、日本では毎年感染者が報告されている。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求められている。また、魚介類や海水中の汚染について把握する必要がある。さらに、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) についても海水中の汚染菌数の把握を行うと共に魚類での汚染制御の方法を検証する必要がある。そこで、本研究では以下の4つの課題について検討を行った。

(1) ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討、(2) 海水、魚介類、水鳥などにおけるビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオの汚染、(3) 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、(4) 腸炎ビブリオについては魚類での汚染制御の方法

A. 研究目的

ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*) 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。日本では毎年感染者が報告されており、1998年から2003年の5年

間には患者数 94 人、このうち死者 68 人が報告されている。感染の原因は汚染海水や生物に接触することや汚染食品の摂取によるものといわれている。しかし、患者検体からは既存の検出方法によって十分に分離がおこなわれているが、海水や生物または食品等からの分離については競合するほかの海洋細菌によって困難な場合が多い。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。増菌及び分離方法を含む培養方法および定量 PCR 法等の遺伝子検出方法について検討を行った。さらに環境中のビブリオの汚染について、有明海を中心とする九州、近畿、関東東海地域など日本の各地の海水、魚介類、水鳥などについて季節を追ったビブリオ・バルニフィカスおよび腸炎ビブリオの菌数を調査した。さらに、魚類における汚染部位をリアルタイム PCR を用いた定量法によって解明した。ビブリオ・バルニフィカス感染症発生のともなう原因食材について細菌学的検討を行い、加えてアサリの畜養による浄化効果についても検討した。感染の防御に必要な汚染実態の把握を海水環境を中心に行い、特に患者の多い九州地方については細かく調査を行った。また、汚染水産食品の浄化と衛生的な調理についても検討した。

B. 研究方法

(1) ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討

2004～2006 年に、熊本県、長崎県、三重県、静岡県、千葉県、東京都、秋田県等の国内の海水および魚介類を採

取しビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの検出を行った。培養方法は Alkaline Peptone Water (APW) で 35℃にて増菌培養し、クロモアガービブリオ培地に塗抹培養し菌を分離した。定量方法には MPN 法（分離平板または PCR 法で検出）または腸炎ビブリオ定量 PCR 法 (Takahashi ら. J. Food Prot. 68: 1083-1088, 2005) および ビブリオ・バルニフィカス定量 PCR 法（本研究で開発: Takahashi ら. J. Microbiol. Method, 61: 77-85, 2005) を用いた。また、増菌培養中、経時的にビブリオ・バルニフィカス、腸炎ビブリオおよびその他の菌に分けそれぞれの菌数を計測した。

(2) 海水、魚介類、水鳥などにおけるビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオの汚染調査

2002～2006 年に季節を追って、長崎県、熊本県、静岡県を中心に海水、魚介類、水鳥糞便を採取して検査材料とした。海水および魚介類は、アルカリ性ペプトン水での MPN 法 (3 本法) にて定量した。分離培養にはクロモアガー・ビブリオ寒天培地を用いた。また、MPN 培養液について、PCR 法にてビブリオ・バルニフィカスの *toxR* 遺伝子を検出した。水鳥糞便については約 0.5g を採取現場で直接アルカリ性ペプトン水 10ml に接種して持ち帰り培養後、クロモアガー・ビブリオ寒天培地に塗抹し分離した。

(3) ビブリオ・バルニフィカス感染症発生のともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

当感染症発生の家庭で冷蔵保存されていた「アナジャコ醤油漬け