

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮原美知子

平成19年(2007年)3月

目次

I. 総括研究報告 1-5

主任研究者 宮原美知子

II. 分担研究報告

1. サルモネラ検査法 1-9

分担研究者 塚本定三、宮原美知子

結果 図及び表 1-15

サルモネラ検査法（ステージ2：作業部会案） 1-3

2. 黄色ブドウ球菌検査法 1-13

分担研究者 清水晃、五十君静信

表 1-16

黄色ブドウ球菌の検査法（ステージ1：原案） 1-8

3. 腸炎ビブリオ検査法 1-5

分担研究者 甲斐明美、荒川英二

表 1-3

図 1

4. 標準検査法検討委員会運営 1-20

分担研究者 高鳥浩介

食品からの細菌検査標準法作成方針 1-2

カンピロバクター・ジェジュニ/コリ検査法

（ステージ1：原案） 1-4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

I 総括研究報告

主任研究者 宮原美知子

厚生科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

H18年度 I. 総括研究報告書

畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究

主任研究者 宮原 美知子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第二室長

研究要旨 サルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオについて、標準検査法として示せる方法を検討してきた。その検討の成果を報告する。また、カンピロバクターについても原案の提案を行った。昨年度は食品からの微生物検査標準法検討委員会を立ち上げ、標準法に関する作成の基本方針を決定するとともに、作成の段階の基準も検討し、公開した。提案された検査法に対して、方針と見合ったものであるかどうかを検討してきた。それらの成果は国立衛研のホームページより、情報公開項目にて公開を行ってきた。サルモネラはステージ2、黄色ブドウ球菌はステージ1、カンピロバクターはステージ1として公開中である。また、会議の概要については、逐次公開してきた。

分担研究者

サルモネラ検査法検討班

塚本定三 大阪府立公衆衛生研究所細菌課長

宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長

黄色ブドウ球菌検査法検討班

清水晃 神戸大学農学部教授

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第一室長

腸炎ビブリオ検査法検討班

甲斐明美 東京都健康安全研究センター食品微生物研究科長

荒川英二 国立感染症研究所細菌第一部主任研究官

食品からの微生物検査標準法検討委員会

高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部部長

A. 研究目的

現在、国際的に広く認められている細菌検査の標準法は、そのプロトコル作りの段階から公開し、専門家や実際に検査を行う技術者の意見を広く求め、検査法案を策定した後、コラボスタディーにより、複数の検査室で実行性の評価を経たのち、最終案がまとめられる。標準法ができた後も、常に修正が必要かどうかの検討が加えられ必要とあれば速やかに修正が検討される。一方、わが国の細菌検査法は、起案の段階からこのような確固たる方向性を持って作られ、議論され評価を受け作成された検査法は皆無である。食品の細菌検査法を何とかしてほしいという要望は、細菌検査を行っている現場では以前から強く求められてきたが、食中毒起因細菌の検査法全体を見回して根本的な議論がされることはこれまで無かった。さらに輸入食品検査の正当

性や、今後必要となる検査法の精度管理を考えると、このような現状は一刻の猶予も許されない状況である。一部の検査機関では、検査法の技術向上のため、海外の細菌検査の評価プログラムに参加することがある。このような場合、用いた個々のプロトコールは参加した機関に一覧として示されるが、日本で標準的に用いている培地は、他の国では用いられていない特殊な培地として片隅に示されてしまうことがあり、一部の検査法は、国際的に広く用いられている方法とかけ離れており、諸外国との隔たりは著しい。国内の細菌検査法のこのような状況を改善しようという議論は、関連学会や研究会で始まっているが、まだこの研究班の目指す方針ほど網羅的、具体的に なっているものはないと思われる。

国外の広く認められている標準法では、既に本研究の目指す方針と同様な方法で検査法が作られており、国内においてもこのような議論を経た検査法が作られると、ようやく国際的にも認められる細菌検査の標準法を持つこととなる。研究班が目指すものは、現在並びに将来においても考え得る最上の手法を持って検査法を作成することである。

B. 研究方法

各作業部会が検査法を最初に立ち上げる。標準法検討委員会はその基礎となる考え方などを中心に議論をし、国内外の現在の状況を勘案しながら、基本方針については結論を導いている。その結論については、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上に近く公開し、その結論に沿った検査法を作成できるように検査法を検討する。

一方、作業部会は、日本での現在の検査法、また、各国あるいは国際間の検査法のルールなどについて実態調査より検討を開始し、様々な方法の検査法より、日本の実情にも沿った検査法を提案する。その検査法案を検討委員会に提出し、検討を行っていただき、問題点については、各作業グループで実験での検討を行う。各作業グループはそれぞれの結果比較検討より、次の段階へと検査法を精査していくことになる。その段階についても検討委員会で議論の済んだ“食品からの細菌検査標準法作成方針”に従った段階を進行させる。

C. 研究結果

この研究班の研究成果は各作業班の分担研究者の報告に詳細に記載されている。また、目で見える成果は国立医薬品食品衛生研究所のホームページ上での検査法プロトコール公開が挙げられる。サルモネラはステージ2となり、今後コラボに向けた提案がされる予定である。黄色ブドウ球菌は原案の3案が提出された。直接平板培養法、選択増菌培養法、菌数測定法である。腸炎ビブリオは原案提出が遅れている。

腸炎ビブリオの分離培地として新しい酵素基質培地の有用性を検討した。食品（貝類）および海水 135 件をアルカリペプトン水で増菌後、クロモアガービブリオに塗抹分離、赤紫色集落が腸炎ビブリオであるかを生化学的性状試験および PCR 法で確認した。その結果、釣菌した 408 集落中 341 集落 (84%) が腸炎ビブリオであった。しかし、経験者が釣菌した場合は 98% が腸炎ビブリオであったが、未経験者では 58% であったことから、集落の色だけで判定す

るのは困難であることが確認された。

また、現在の告示法および通知法を基に改良し、培養法のスタンダードとなりうる方法を提案した。すなわち、増菌培地は1~2%食塩加アルカリペプトン水、培養温度および時間は $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、16~18時間、分離培地はTCBS寒天または酵素基質培地とすることとした。

D. 考察

“食品からの細菌検査標準法作成方針”については具体例に欠けるため、実際の適用にとまどいがあった。サルモネラの検査法においては、従来法と大差ない方法であることから、当初は接種実験のデータは示していなかったが、実際にステージ2の段階の提示においては接種実験のデータが求められたこと、従来行われた検査方法を変える場合には、その比較データが求められたこと、最小検出菌量のデータに関しても提示を求められたことなど、様々なデータが求められた。このような試みを通して、現在での標準検査法としての設定が行われることは意義深いものであると思われる。しかし、一方で会議の討論を経ない検査法は検査法として進んでいかなことから、検査法策定の進行速度が会議の進み方に大きく依存することになり、実験データよりも会議の進行に作成速度が依存することになってしまう現状がある。また、3菌種を同時に進行させているため、会議が3つのテーマで混み合うことにもなり、来年度は最終年度であるため、早急な時間の上での改善が望まれる。

新しい試みであるため、また、策定方針も4つのステージがあるため、1段階ずつ

丁寧に辿るには3年間は短すぎると考えている。

今後、段階認定の具体例を示すことにより、提出した検査法の状況によっては、初めから、ステージ2や3等の承認も行われるように検討すべきではないかと考えている。

E. 結論

十分な検討を行いながら、標準検査法としての設定を行っているため、多くの方の支持を得られる検査法として最終段階で提出できるものと想定している。実験・検査等を行い科学的裏付けも多く、公開しながら検討しているので、所期の目的を達成できるものと確信している。

F. 研究発表

1. 論文発表

○宮原美知子、小沼博隆：食品中赤痢菌の新検査法検出感度及び冷凍保存での生残性

防菌防黴誌、34, 263-266, 2006

中 峰松、清水 晃、河野潤一、五十君静信 (2006): 市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. 日食微誌、23(4), 217-222.

清水 晃、松村浩介、藤尾公輔、河野潤一、北井 智、五十君静信 (2006): 綿棒を用いた拭き取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. 日食微誌、23(4), 242-246.

藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野

潤一、北川 浩、五十君 静信
(2006): 市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性. 日食微誌、印刷中

Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F. 2006. An anti-Salmonella antibody prevents the Salmonella enterica serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella. *Bioscience & Microflora*. 25(3):117-119.

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.

Hiroshi Asakura, Akiko Ishiwa, Eiji Arakawa, Sou-ichi Makino, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto, and Shizunobu Igimi. Gene Expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*. in press

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、感染症学雑誌、2006, 80, 4, 383-390.

2. 総説・解説論文

宮原美知子：冷凍保存食品中の病原細菌の検出
防菌防黴誌、34, 569-575, 2006

塚本定三、宮原美知子：食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法
防菌防黴誌、35, 2007 掲載予定

3. 学会発表

宮原美知子：食品中サルモネラの検出方法再検討

第33回日本防菌防黴学会年次総会
平成18年5月

Michiko Miyahara, Kunihiro Shinagawa: Viabilities of pathogenic bacteria in frozen conditions

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress
平成18年6月

宮原美知子、塚本定三、田口真澄、久米田裕子、神吉政文、郡司明博、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重：食品中のサルモネラ検査法の標準化
第27回日本食品微生物学会学術総会 平成18年9月

宮原美知子：食塩濃度と腸管出血性大腸菌0157の生残性
第27回日本食品微生物学会学術総会 平成18年9月

松村浩介、清水 晃、藤尾公輔、河野潤一、五十君静信 (2006): 培養法及びPCR法による市販食肉中の黄色ブドウ球菌検出法の検討、第27回日本食品微生物学会学術集会講演要旨集、p.75.

藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一 (2006): 市販食肉から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性、第27回日本食品微生物学会学術集会講演要旨集、p.76.

齋藤悦子、上西 徹、河野潤一、吉田奈々
子、村橋玲那、清水 晃 (2006):市販魚介
類における黄色ブドウ球菌汚染と分離株の
各種性状、第 142 回日本獣医学会学術集会
講演要旨集、p.115.

II 分担研究報告

II-1 サルモネラ検査法

分担研究者 塚本定三

宮原美知子

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)

分担研究報告書

II-1 サルモネラ検出法検討班

分担研究者

塚本定三 大阪府立公衆衛生研究所細菌課長

宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室長

研究要旨 食品中サルモネラの検出法に関して検討を行った。昨年度行った国内外の比較検討をもとに妥当な検査法案を提案し、標準法検討委員会での討議を経て、国立衛研インターネット上でその方法を公開した。その案に従って、硫化水素産生株及び硫化水素非産生株サルモネラでの接種実験、従来使われていた方法との比較実験を行うとともに、鶏挽肉と未殺菌液卵での自然汚染サルモネラの実態調査を行うことにより、妥当な検出法であるかどうかの検討を行った。また、菌数推定のため、MPNでの検出を行った。実験の結果、提案しているサルモネラ検査法は硫化水素産生性サルモネラを1検体あたり3個以上で確実に検出し、非産生株では、7-10個で確実に検出することが分かった。接種実験上は上記以下の菌数接種は實際上困難であるため、おそらく、1検体25gあたり1個以上サルモネラがあれば検出できる方法であることが予想される。EEM増菌との比較実験においては、接種実験で差を見いだすことはできなかったが、自然汚染の鶏挽肉で検出率において、二度の実験において10/10と6/10、さらに4/5と1/5と差がみられ、BPW増菌系で検出率が高いことが判明した。鶏挽肉からのサルモネラ検査は東京と大阪の研究所で70検体を実施したが、平均で57%のサルモネラ検出率であった。MPNでは、 $<0.3\sim 15.0$ であったが、検出された検体中58%は $<0.3/g$ の少数菌汚染であった。未殺菌液卵においては20検体の検討を行ったが、40%の検出率であり、そのMPNは $<0.3\sim 750/g$ であり、鶏挽肉よりも汚染菌量の多いものが50%もあった。また、同時に前増菌におけるPCRによるサルモネラ検出も検討した。検体が、食肉製品においては、BPW培養液でのPCR判定は、培養結果と100%一致していた。また、未殺菌液卵での結果も100%であったが、鶏挽肉での検討ではその一致率は、69%であった。食肉におけるサルモネラの検査においてはBPWの前増菌でのPCRによる判定は培養による結果を十分に予測できないが、食肉製品や未殺菌液卵の検体では、培養での結果をBPW培養液のPCRでのサルモネラ判定の結果で予測可能であった。

研究協力者

大阪府立公衆衛生研究所細菌課
田口真澄、久米田裕子、神吉政史
(財)日本食品分析センター大阪支所
高須一重、郡司明博、森田友美、太
田順司、高山正彦、仲西寿男

A. 研究目的

本研究では、食中毒起因細菌の標準となる検査法がどの様にあるべきかを示し、その方針に沿ってサルモネラについての検査法の検討を行うことを目的としている。

サルモネラ検査法は、食品衛生法の食品、添加物等の規格基準の食肉製品中の食肉製品の成分規格、平成5年11月29日の通知の別紙1においてEEM培地での前増菌からセレナイトシスチン、セレナイトブリリアントグリーンあるいはハーナのテトラチオン酸塩培地での選択培養そしてMLCBまたはDHL培地への塗抹などにより検出することになっている。しかし、セレナイトは化学物質管理促進法で毒性があることより、管理すべき物質として指定され、排出量の管理が必要とされている。そのため、世界的に見てもサルモネラの検査法から、セレナイト化合物は排除されるようになってきている。また、EEMでの前増菌がサルモネラの検査法の前増菌として採用されない状況もある。わが国においても、1998年11月25日に通知

された液卵のサルモネラ属菌試験法については、BPW培地の前増菌から、RVとTT培地での選択培養、そして2種類の選択分離寒天平板への塗抹での検査を通知している。同じサルモネラの検査法でありながら、食品によって、極端な検査法の違いを是正し、かつ、理論的な裏付けもある、実際に検査を行う人たちにも同意の得られるそして、世界の現状から見ても技術革新の方向に沿った検査法を構築することを目的としている。

B. 実験方法

図に示したサルモネラ検査法に従って実験を行った。

1. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その1-

Easy QA Ball *Salmonella*

Typhimurium NCTC12023/ATCC14028 日水56112 精度管理用菌株を使用し、接種実験を行った。検体は食肉製品のスライスハムを使用した。1ボール当たり30cfuのサルモネラが含まれている。1ボールの入っている小瓶に1mlの滅菌水を加えて、溶解させる。均一にして、その0.1mlを検体25g入りストマフィルター袋に加えて接種した。10倍段階希釈を滅菌水にて行い、その1/10と1/100の菌量を接種した。なお、Control群として、Easy QA Ball (大腸菌群) 0.3cfu/0.1mlを接種した。

2種類の選択分離寒天平板として、硫化水素産生性によりサルモネラを

検出する寒天培地として MLCB を、硫化水素非産生サルモネラでも検出できる寒天 CHROMagar *Salmonella* (CHS と以下略)培地として、また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

2. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その2-

Easy QA Ball *Salmonella* を使用し、食肉製品への接種を行った。非加熱食肉製品である生ハム、特定加熱食肉製品であるローストビーフ、加熱食肉製品（加熱後包装）であるポークウィナーやベーコンについて接種実験を行った。なお、Control 群として、非接種検体をそれぞれの食品について 1 検体検出実験を追加した。接種菌数は 1 検体につき、3cfu とした。

また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

3. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験 -その1-

2006 年 6 月、大阪公衛研で分離された *Salmonella* Senftenberg (O1, 3, 19 : g, s, t:-)での接種実験を行った。使用した食品検体は非加熱食肉製品ロース生ハム、加熱後包装食肉製品のロースハム、加熱後包装食肉製品のベーコン、サルモネラ陰性の冷凍鶏肉ミンチ 5 検体について接種実験を行った。接種菌数を約 10 個と 1 個の 2 段階とした。硫化水素産生性によりサ

ルモネラを検出する寒天培地として DHL と硫化水素非産生サルモネラでも検出できる寒天培地 CHS の 2 種類の培地を用いた。

また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

4. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験 -その2-

3. で使用した硫化水素非産生サルモネラによって加熱後包装食肉製品のロースライスハムを食品検体として添加回収実験を行った。MLCB と CHS の 2 種類の寒天培地を使用した。

また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

5. BPW と EEM 増菌でのサルモネラ検出比較検討 -1-

EEM 増菌から SC 選択培養での検出実験も行った。冷凍保存鶏挽肉の自然汚染サルモネラの検出により、BPW と EEM 増菌検出の比較を行った。寒天培地として、MLCB, CHS, X-Sal (nissui) を使用した。

また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

さらに、BPW 培養と EEM 培養後にサルモネラの迅速判定の検討のため、ダイヤサルムによる判定を検討した。ダイヤサルム寒天培地中央に 0.05ml の培養液を滴下して、35±1℃、22±2 時間の培養を行い、2cm 以上の増殖拡

大がみられたものをサルモネラと判定した。その増殖円の少し外側から寒天培地を掻き取り、選択分離寒天平板に塗抹した。

6. BPW と EEM 増菌でのサルモネラ検出比較検討 -2-

表に示した BPW あるいは EEM 増菌でのサルモネラ検出率の比較検討を行った。非接種群、接種群さらに接種後 -20℃、4 日間冷凍保存検体での検出率比較を行った。EEM 増菌後にハーナのテトラチオン酸塩での選択培養を行い、寒天培地での検出は MLCB を使用したが、参考のために CHS も使用した。

また、サルモネラ迅速判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

7. 鶏挽肉における提案サルモネラ検出方法での検出実験

大阪公衛研、国立衛研と食品分析センター大阪支所の 3 研での検出実験を行った。検体は市販の鶏挽肉を購入し、試薬や培地は同じものを使って 70 検体について検出を行った。分離検出されたサルモネラについては、O 抗原と H 抗原を決定して、血清型を決定した。汚染菌量についても検討するために MPN での BPW 増菌を行った。すなわち、3 段階 3 本法によって、MPN による菌量測定を行った。25g 入り袋検体についても、そのまま増菌し、選択培養後、塗抹培養して同様に分離培養を行った。

また、サルモネラ判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

8. 未殺菌液卵における提案サルモネラ検出法での自然汚染サルモネラの検出

大阪公衛研、国立衛研と食品分析センター大阪支所の 3 研での検出実験を行った。20 検体の未殺菌液卵は提供いただいたものを使用した。

分離検出されたサルモネラについては、O 抗原と H 抗原を決定して、血清型を決定した。汚染菌量についても検討するために MPN での BPW 増菌を行った。すなわち、3 段階 3 本法によって、MPN による菌量測定を行った。25g 入り袋検体についても、そのまま増菌し、選択培養後、塗抹培養して同様に分離培養を行った。

また、サルモネラ判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

9. 液卵での通知された検出法と今回提案した方法の検出比較

液卵に使うように指示された方法は BPW に添加剤を加えること、そして、RV と TT への BPW 培養液の接種量がどちらも 0.5ml であることが今回提案した方法と違っているだけである。BPW には添加剤無しで、そして、RV と TT への BPW 接種量を 0.1ml と 1.0ml としたところが主な変更点である。

未殺菌液卵によって、2 方法を詳細に検討した。

10. 白身卵液での接種菌の検出実験

サルモネラの増殖には鉄分とシステインが必要ということから、従来の液卵サルモネラ検出法では $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ あるいは L-システインの BPW への添加が必要とされていた。白身卵液では、黄身成分と比較して鉄分とシステインの不足が考えられることから、添加無しの系を使ってサルモネラの添加回収実験を行って、新方法が白身卵液にも適用できるかどうか検証した。

QA Ball *Salmonella* での 3cfu 接種を無菌的に分離した白身卵液 25g 入り 5 検体のストマフィルターへ接種した。

1 検体は非接種検体とした。

また、サルモネラ判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

11. 鶏、豚、牛挽肉でのサルモネラ検出実験

市販挽肉(鶏、豚、牛)でのサルモネラ検出実験を行った。それぞれ同じ店の挽肉 5 検体ずつサルモネラの検出を検討した。

また、サルモネラ判定のため、BPW 増菌後に PCR を行い、サルモネラの有無を検討した。

C. 研究結果

1. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その1-

大腸菌群接種ではサルモネラは検出されず、サルモネラ 0.03cfu でも検

出されず、0.3cfu で 1/5 検出され、3cfu 接種では 10/10 全検体からサルモネラが検出された。確率に従ったサルモネラの検出が見られた。25g 検体中 3cfu 前後のサルモネラで確実に検出できることがわかった。接種菌であることは O 血清抗体凝集により確認した。また、BPW 培養液での PCR サルモネラ判定は培養結果と一致した結果を示した。結果表参照

2. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その2-

表に示したように 4 種類の食肉製品について QA ボールでの 3cfu 摂取によって、この検出法ですべて検出が可能であった。非接種検体からサルモネラの検出はなかった。

BPW 培養液での PCR サルモネラ判定は培養結果との一致が見られた。

3. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験 -その1-

10 個硫化水素非産生サルモネラ接種においては、ロース生ハム、ロースハム、ベーコン、冷凍鶏肉ミンチすべての食品検体で、サルモネラを検出することができた。

4. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験 -その2-

硫化水素非産生サルモネラでは、DHL, MLCB そして XLD 等の培地においては、黒色集落が出現しないので、目視による判断としては、出現集落をサルモネラとは判定できなかった。しかし、塗抹に使用した MLCB 寒天培地上

に均一な集落がみられ、黒色ではないのでサルモネラ陰性と判定したが、その集落を同定検査した結果、接種したサルモネラであることが判明した。一方、CHROMagar *Salmonella* ではサルモネラと判定できる紫色の集落が出現し容易に分離も可能であった。2種類の分離寒天平板培地の使用により、硫化水素非産生サルモネラも検出が可能であった。

5. BPW と EEM 増菌でのサルモネラ検出比較検討 -1-

冷凍鶏挽肉の自然汚染サルモネラでの検出比較の結果は表に示したように、BPW 系で 10/10 であり、EEM-SC 系で 6/10 の検出率であった。この実験では BPW 増菌の検出力が優れていた。

RV 選択増菌による CHS 寒天培地でのサルモネラ検出力が優れていた。

ダイヤサルムによるサルモネラ判定は、手技になれていないためかうまくいかなかった。どちらの検出法によっても 1/10 のサルモネラしか検出できなかった。

また、PCR による判定は、BPW で 8/10、EEM で 4/10 の検出率であり、培養法での実際の検出率より低かった。

6. BPW と EEM 増菌でのサルモネラ検出比較検討 -2-

同一市販店で購入した鶏挽肉を長期に冷凍保存した。その鶏挽肉を使用して、BPW と EEM 増菌培養系でのサルモネラ検出比較を行った。結果は表に示した。接種しない群、QA Ball

Salmonella による 3cfu 接種群と同様に接種後に 4 日間冷凍保存後に検出を行った 3 条件で比較を行った結果、表に示したように、接種実験ではそのまま検出しても、冷凍保存後に検出しても違いが見られなかったが、自然汚染の系で比較すると、BPW 増菌法で 4/5 の検出で、EEM 増菌法で 1/5 の検出率であった。BPW 増菌法の検出率が高かった。

なお、BPW 培養液や EEM 培養液での PCR サルモネラ判定ではどちらの培養液においても培養による最終判定の結果を正しく予想することはできなかった。しかし、BPW 系で 8/15、EEM 系では 10/15 で PCR サルモネラ判定が培養の結果と一致していた。

7. 鶏挽肉における提案サルモネラ検出方法での検出実験

3 機関で検討を行った 70 検体中 40 検体からサルモネラが検出された。鶏挽肉から検出されたサルモネラは *S. Infantis* が主であったが、その他、*S. Hardar*, *S. Agona*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* などが検出された。2 種類の血清型サルモネラで汚染された鶏挽肉もあった。検出された 40 検体中、サルモネラの汚染菌数は MPN <0.3~15.0/g であったが、23 検体は <0.3/g であった。34 検体は <1/g であったことから、汚染菌量は多くないと考えられる。

PCR での判定は培養結果との一致率が 69%であった。

8. 未殺菌液卵における提案サルモネラ検出法での自然汚染サルモネラの検出

3 機関で 20 未殺菌液卵のサルモネラ検出を行った。8 検体より、サルモネラを検出した。これらの未殺菌液卵より検出されたサルモネラの血清型は *S. Enteritidis* が主であった。しかし、その他、*S. Corvallis*, *S. Infantis*, *S. Thompson*, *S. Cerro*, *S. Montevideo* も検出され、血清型不明の 013: y: ーも分離された。*S. Enteritidis* と他の血清型が混合で 4 検体で検出された。そのうちの 2 検体は 3 血清型サルモネラが混合汚染していた。また、汚染菌量は MPN <0.3, 0.36, 0.92, 7.5, 46, 46, >110, 750/g であったが、鶏挽肉と異なり、>110 のひどい汚染状態の液卵が 2 検体も検出された。汚染状態がひどかった 2 検体では、*S. Enteritidis* が単独の血清型で検出された。

BPW 培養液での PCR あるいは LAMP 法でのサルモネラ判定では、培養での結果と 100%一致がみられた。

9. 液卵での通知された検出法と今回提案した方法の検出比較

通知された方法は袋での検討法であるので、そのやり方で比較し、さらに、MPN 法での詳細検討を併用した。検討した液卵の 7 検体のうち、RV 培養液より従来法で検出されなかった 3 検体に比較して、提案新方法では RV 培養液からサルモネラを検出すること

ができた。ただし、MPN 法で詳細検討を行ったが、変わりのない結果しか得られなかった。

10. 白身卵液での接種菌の検出実験

提案新方法で Easy QA Ball 3cfu 接種ですべての検体からサルモネラを検出することができた。

11. 鶏、豚、牛挽肉でのサルモネラ検出実験

これらの挽肉からサルモネラの検出を検討したが、鶏挽肉以外から自然汚染サルモネラを検出することはできなかった。鶏挽肉から 4/5 の検出率で、豚と牛の挽肉ではどちらの検体も 0/5 の検出率であった。

PCR での検討では、どの挽肉においても培養の結果と一致した結果を示した。

D. まとめおよび考察

提案したサルモネラの新検出法は硫化水素産生性あるいは硫化水素非産生性サルモネラ接種実験において少なくとも 3cfu 以上の少量菌を 25g 食品検体に接種で検出することが可能であった。現在の方法が EEM からの増菌である食肉製品に対して行って、検出することができた。現在の方法を今回提案の BPW 増菌ーRV と TT への選択培養法に帰ることによって、今回の実験で検証したように自然汚染鶏挽肉におけるサルモネラを有効に検出することができ、EEM 増菌の場合よりも検出率が高かった。また、現在液卵のサルモネラ検出に使われている BPW

からの増菌法と今回の提案した検出法はだいたい同じ方法であるが、添加物や、選択培養時のBPW接種培養液量の違いなどを含めて検討しても、些細な提案法の検出率の優位のみ結果として得られた。少なくとも同等以上の検出力が検証された。

また、自然汚染された市販鶏挽肉や未殺菌液卵の実験より、サルモネラの少数菌が検出され、これらのサルモネラ検出方法としても有用であることがわかった。殺菌液卵に検証方法として決められている方法は添加物を加えなくても、(特にFe分が少ないとの報告のある白身液卵を使って検証しても)3cfuのサルモネラを検出することができた。

これらの検証実験から考えて、今回提案しているサルモネラ検出法は、食肉、食肉製品、液卵等のサルモネラ検出に少量のサルモネラも検出できる方法として、充分であることがわかった。この方法を統一した食品のサルモネラ検出法として提案したいと考えている。また、PCRによる食品中へのサルモネラ検出での遺伝子の判断は、食肉を除いては有効であることがわかった。ただし、食肉では、69%程度の判定率であり、食肉のサルモネラ判定にBPW培養段階でのPCRの判定で決定するのは困難であった。検討した食肉製品や未殺菌液卵の実験結果では、BPW培養段階でのPCR判定において、そのPCRでの結果は培養での結果を

100%反映していた。

しかし、今回のPCRでの検討結果がどの点で問題であるのかを今後さらに検討をしていくつもりである。

E. 結論

提案したサルモネラ検査法で多くの食品からのサルモネラ検出に適用可能であると考えられる。25gの1検体中に3cfu以上のサルモネラがあれば検出可能であると検証された。液卵からのサルモネラ検出法にもこの提案検査法は従来法と比較しても同等以上であると検証された。この方法についてはサルモネラ検査法検討班報告書の最後にステージ2に載せるための原案を示した。実際の公開検査法のステージ2については、平成19年2月より、国立衛研ホームページ～情報公開～食品からの微生物検査標準法検討委員会～プロトコル案公開中のサルモネラにおいて公開を行っている。この検査法についても報告書の最後に示した。

このステージ2の検査法を多くの検査機関で検証するべく、コラボによる検討を予定している。また、研究班ではPCRでの判定役割が可能かどうかをさらに検討し、標準法を使いやすい検査法として用いるための方策についても検討したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、小沼博隆：食品中赤痢菌の新検査法検出感度及び冷凍保存での生残性
防菌防黴誌、34, 263-266, 2006

会 平成18年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

2. 総説・解説論文

宮原美知子：冷凍保存食品中の病原細菌の検出

防菌防黴誌、34, 569-575, 2006

塚本定三、宮原美知子：食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法

防菌防黴誌、35, 2007 掲載予定

3. 学会発表

宮原美知子：食品中サルモネラの検出方法再検討

第33回日本防菌防黴学会年次総会
平成18年5月

Michiko Miyahara, Kunihiro
Shinagawa: Viabilities of
pathogenic bacteria in frozen
conditions

20th IUBMB International Congress
of Biochemistry and Molecular
Biology and 11th FAOBMB Congress
平成18年6月

宮原美知子、塚本定三、田口真澄、久
米田裕子、神吉政文、郡司明博、森田
友美、太田順司、高山正彦、高須一重：

食品中のサルモネラ検査法の標準化

第27回日本食品微生物学会学術総
会 平成18年9月

宮原美知子：食塩濃度と腸管出血性大
腸菌 0157 の生残性

第27回日本食品微生物学会学術総

サルモネラ結果

1. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その1-

サルモネラの検出 (QA ボールによるハムへの接種実験)

接種菌株	BPW 培養液 PCR-サルモネラ	RV-MLCB	RV-CHROMagar Salmonella	TT-MLCB	TT-CHROMagar Salmonella
QA ボール(大腸菌群)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(大腸菌群)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(大腸菌群)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(大腸菌群)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(大腸菌群)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.03cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.03cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.03cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)0.3cfu/検体	—	—	—	—	—
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+
QA ボール(サルモネラ)3cfu/検体	+	+	+	+	+

2. 硫化水素産生サルモネラの接種実験 -その2-

食肉製品へのサルモネラ接種実験 (QA ボールでの接種)

	接種	BPW— PCR	RV—MLCB	RV—CHROMagar Salmonella	TT—MLCB	TT—CHROMagar Salmonella
生ハム 非加熱食肉製品	3cfu/25g	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	非接種	—	—	—	—	—
ローストビーフ 特定加熱食肉製品	3cfu/25g	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	非接種	—	—	—	—	—
ポークウィンナー 加熱食肉製品 (加熱後包装)	3cfu/25g	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	非接種	—	—	—	—	—
ベーコン 加熱食肉製品 (加熱後包装)	3cfu/25g	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+
	非接種	—	—	—	—	—