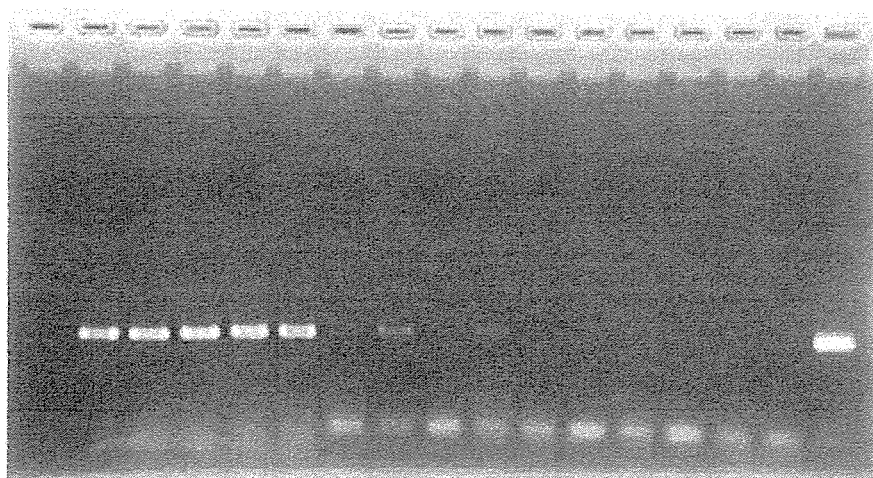


3. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験 -その1-

[検査材料]

1. ロース生ハム（非加熱）
2. ロースハム（加熱後包装）
3. ベーコン（加熱後包装）
11. 冷凍鶏肉ミンチ（サルモネラ陰性の検体）
12. 冷凍鶏肉ミンチ（サルモネラ陰性の検体）
13. 冷凍鶏肉ミンチ（サルモネラ陰性の検体）
17. 冷凍鶏肉ミンチ（サルモネラ陰性の検体）
20. 冷凍鶏肉ミンチ（サルモネラ陰性の検体）

[PCR 結果]



1 1 2 2 3 3 11 11 12 12 13 13 17 17 20 20 P
10⁰ 10¹ 10⁰ 10¹

検体	BPW PCR	RV のに ごり	RV → ク ロモアガ ー	RV → DHL	TT → ク ロモアガ ー	TT→DHL
1-10 ⁰	-	+	.*	-	-	-
1-10 ¹	++	++	3/3	3/3 白	1/3 **	1/3 白 **
2-10 ⁰	++	++	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
2-10 ¹	++	++	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
3-10 ⁰	++	+++	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
3-10 ¹	++	++	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
11-10 ⁰	+w	+	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
11-10 ¹	+	+	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
12-10 ⁰	+w	+	3/3	3/3 白	3/3	3/3 白
12-10 ¹	+	+	3/3	3/3 白	3/3	0/3 黒 3/3 白
13-10 ⁰	-	+	-	-	-	0/3 黒
13-10 ¹	-	+	1/1	0/3 黒	3/3	0/3 黒 0/3 白
17-10 ⁰	-	+	3/3	0/3 黒	3/3	0/3 黒 0/3 白
17-10 ¹	-	+	3/3	0/3 黒	3/3	0/3 黒
20-10 ⁰	-	+	-	-	3/3	0/3 黒
20-10 ¹	-	+	3/3	0/1 黒	3/3	0/3 黒

1) .*:釣菌するコロニーなし。

2) **:2/3 は R/YG,++, O 多価-

加熱死菌でも O 型別できず。H 型別では g,s,t で他の生化学性状も一致するため、添加した *S. Senftenberg* であると推察できる。なぜ、O 抗原が変化したかは不明。

3) MLCB はすべて小コロニーまたはコロニーなしのため釣菌せず。

4) DHL でサルモネラでなかった菌はすべて *Proteus sp.*であった。

5) サルモネラは TSI, LIM,血清で判定 (R/YG, ++, O1,3,19)

4. 硫化水素非産生サルモネラの添加回収実験-その2- スライスハムへの接種

No.	サルモネラ接種菌数	BPW-P CR	RV-MLCB	RV-CHRO Magar <i>Salmonella</i>	TT-MLC B	TT-CHROM agar <i>Salmonella</i>
1	7	+	—	+	—	+
2	7	+	—	+	—	+
3	7	+	—	+	—	+
4	7	+	—	+	—	+
5	7	+	—	+	—	+
6	36	+	—	+	—	+
7	36	+	—	+	—	+
8	36	+	—	+	—	+
9	36	+	—	+	—	+
10	36	+	—	+	—	+

5. BPW と EEM 増菌でのサルモネラ検出比較検討 -1-

冷凍鶏挽肉での BPW-RV, TT 検出系と EEM-SC 検出系のサルモネラ検出比較検討

サルモネラ検出率							最終サルモネラ検出率
			RV選択増菌		TT選択増菌		
	BPW-ダイヤサルム	BPW-PCR	MLCB	クロモアガーサルモネラ	MLCB	クロモアガーサルモネラ	
BPW増菌	1/10	8/10	8/10	10/10	4/10	8/10	10/10
EEM増菌	EEM-ダイヤサルム	EEM-PCR	SC選択増菌-MLCB				6/10
	1/10	4/10	6/10				

6. BPW と EEM それぞれのサルモネラ検出法比較

BPWとEEM増菌でのサルモネラ検出比較実験（まとめ）

	増菌培地	サルモネラ接種	接種後の冷凍処理	前増菌培養後のPCR検出	RV-MLCB	RV-CHS	TT-MLCB	TT-CHS	サルモネラの検出率
No. 1-5	BPW	無し	無し	0/5	4/5	3/5	2/5	2/5	4/5
No. 6-10	BPW	3cfu	無し	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
No. 11-15	BPW	3cfu	有り	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

		サルモネラ接種	接種後の冷凍処理	EEM-PCR	HTT-MLCB	HTT-CHS	サルモネラの検出率
No. 16-20	EEM	無し	無し	0/5	1/5	1/5	1/5
No. 21-25	EEM	3cfu	無し	5/5	5/5	5/5	5/5
No. 26-30	EEM	3cfu	有り	1/5	5/5	5/5	5/5

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

検体番号	SPC	培養判定でのサルモネラ検出	サルモネラ菌数 (MPN 値 /g)	BPW 培養液での判定 PCR	BPW 培養液での判定 LAMP	BPW 培養液での判定 LFS
1	1.7×10^7	—		—	—	—
2	4.8×10^6	+	1.40	— *	— *	— *
3	1.2×10^7	—		—	—	—
4	1.3×10^7	+	0.92	— *	+	— *
5	2.3×10^7	+	2.00	— *	— *	— *
6	8.1×10^6	—		—	—	—
7	6.1×10^6	+	<0.3	— *	+	— *
8	4.1×10^6	+	<0.3	— *	— *	— *
9	1.8×10^7	+	<0.3	— *	— *	— *
10	2.3×10^5	—		—	—	+w*
11	2.5×10^4	—		—	—	—
12	7.9×10^5	—		—	—	—
13	5.6×10^5	—		—	—	—
14	8.5×10^7	+	2.40	— *	+	— *
15	1.2×10^8	—		—	—	—
16	9.7×10^6	—		—	—	—
17	7.6×10^7	—		—	—	—

18	6.7×10^8	+	15.00	— *	+	+(—)
19	1.3×10^8	—		—	—	—
20	2.9×10^6	—		—	—	—
21	6.9×10^4	+	<0.3	+	+	+
22	1.3×10^6	+	0.36	— *	+	— *
23	6.9×10^5	+	<0.3	+	+	— *
24	2.2×10^7	+	<0.3	— *	— *	— *
25	1.1×10^6	+	<0.3	— *	— *	— *
26	N.T.	—	—	—	—	—
27	N.T.	+	0.92	+	+	— *
28	N.T.	+	<0.3	+	+	— *
29	N.T.	—	—	—	—	+ *
30	N.T.	—	—	—	—	—
31	N.T.	+	0.92	+	+	— *
32	N.T.	+	2.30	+	+	— *
33	N.T.	—	—	—	—	—
34	N.T.	—	—	—	—	—
35	N.T.	+	0.30	+	+	— *
36	N.T.	+	<0.3	— *	+	— *
37	N.T.	+	<0.3	— *	+	— *
38	N.T.	—	—	—	—	+ *
39	N.T.	+	<0.3	+	+	+
40	N.T.	+	<0.3	— *	+	— *
41	N.T.	+	1.50	— *	+	— *
42	N.T.	+	<0.3	+	+	— *

43	N.T.	+	0.36	—*	—*	—*
44	N.T.	+	0.92	+	+	—*
45	N.T.	+	<0.3	+	—*	—*
46	9.4×10^6	+	0.92	+	N.T.	+
47	9.4×10^6	+	<0.3	+	N.T.	+
48	6.7×10^5	+	<0.3	+	N.T.	+
49	6.6×10^5	+	<0.3	+	N.T.	+
50	5.9×10^5	—		—	N.T.	+*
51	3.9×10^5	—		—	N.T.	+*
52	6.2×10^5	+	0.36	—*	N.T.	+
53	2.6×10^5	—		—	N.T.	+*
54	1.4×10^6	+	<0.3	—*	N.T.	+
55	2.4×10^5	+	0.36	+	N.T.	+
56	3.8×10^5	—		—	N.T.	+*
57	3.8×10^5	—		—	N.T.	+*
58	3.1×10^5	—		—	N.T.	+*
59	3.2×10^5	—		—	N.T.	—
60	3.2×10^5	—		—	N.T.	—
61	3.2×10^5	—		+*	N.T.	—
62	2.8×10^5	—		+*	N.T.	—
63	6.7×10^6	+	<0.3	+	N.T.	+
64	8.6×10^6	+	<0.3	+	N.T.	+
65	9.9×10^6	+	<0.3	+	N.T.	+
66	8.8×10^6	+	0.36	+	N.T.	+
67	9.4×10^6	+	<0.3	+	N.T.	—*
68	7.3×10^6	—		+*	N.T.	+*

69	9.6x10 ⁶	+	<0.3	+	N.T.	+
70	7.4x10 ⁶	—		+ *	N.T.	+ *
	集計	40/70				

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

検体 番号	SPC	デソ	培養での サルモネ ラ検出	サルモネラ菌 数(MPN 値/ g)	BPW 培 養液での 判定 PCR	BPW 培養液 での判定 LAMP	BPW 培養 液で の判 定 LFS
①	1.7x10 ⁴	3.5x10 ³	—		—	N.T.	+*
②	1.7x10 ⁴	4.3x10 ³	—		—	N.T.	—
③	3.2x10 ⁴	2.0x10 ³	—		—	N.T.	—
④	4.8x10 ³	N.T.	—		—	—	—
⑤	9.0x10 ³	N.T.	—		—	—	+*
⑥	N.T.	N.T.	—		—	—	+*
⑦	N.T.	N.T.	+	<0.3	+	+	+
⑧	3.2x10 ⁴	6.0x10 ²	—		—	N.T.	—
⑨	1.1x10 ⁵	5.1x10 ⁴	—		—	N.T.	—
⑩	1.3x10 ⁴	2.3x10 ³	—		—	N.T.	—
⑪	2.1x10 ⁴	2.8x10 ³	—		—	N.T.	+*
⑫	2.3x10 ⁴	1.1x10 ⁴	+	>110, 7.5x10 ²	+	N.T.	+
⑬	7.5x10 ⁴	1.6x10 ⁴	+	0.92	+	N.T.	+
⑭	3.0x10 ⁴	N.T.	+	0.36	+	+	—*
⑮	2.5x10 ⁴	N.T.	—		—	—	—
⑯	6.1x10 ⁴	N.T.	—		—	—	+*
⑰	N.T.	N.T.	+	>110	+	+	—*
⑱	N.T.	N.T.	+	46	+	+	—*
⑲	N.T.	N.T.	+	46	+	+	—*
⑳	1.9x10 ⁵	2.3x10 ⁴	+	7.5	+	N.T.	+
			8/20		8/20	5/10	

+* or -* 誤判断結果

or —*

N.T.

未検査

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
袋 (25g 検体) と MPN3 本法での検討

提案新方法

従来方法

袋 MPN

袋 MPN

検体No. (3) 新方法 (+ 0.82)	袋	1*	2*	3*	検体No. (3) 従来法	袋	1*	2*	3*
BPW培養液での判定	+				BPW培養液での判定	+			
PCR	+				PCR	+			
LAMP	+				LAMP	+			
LFS-サルモネラ	+				LFS-サルモネラ	+			
RV-寒天培地での判定	SP +				RV-寒天培地での判定	SP +			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	+			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
TT-寒天培地での判定	LFS —				TT-寒天培地での判定	LFS +			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
大阪 (4) 新方法 (+ 0.39)					大阪 (4) 従来法 (—)				
BPW培養液での判定	+				BPW培養液での判定	+			
PCR	+				PCR	+			
LAMP	+				LAMP	+			
LFS-サルモネラ	—				LFS-サルモネラ	—			
RV-寒天培地での判定	+				RV-寒天培地での判定	+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
TT-寒天培地での判定	—				TT-寒天培地での判定	—			
硫化水素での判定培地	—				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
検体No. (2) 新方法					検体No. (2) 従来法				
BPW培養液での判定	+				BPW培養液での判定	+			
PCR	+				PCR	+			
LAMP	+				LAMP	+			
LFS-サルモネラ	+				LFS-サルモネラ	+			
RV-寒天培地での判定	+				RV-寒天培地での判定	+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
TT-寒天培地での判定	—				TT-寒天培地での判定	—			
硫化水素での判定培地	—				硫化水素での判定培地	—			1
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			1
検体No. (3) 新方法					検体No. (3) 従来法				
BPW培養液での判定	+				BPW培養液での判定	+			
PCR	+				PCR	+			
LAMP	+				LAMP	+			
LFS-サルモネラ	+				LFS-サルモネラ	+			
RV-寒天培地での判定	+				RV-寒天培地での判定	+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
TT-寒天培地での判定	LFS+				TT-寒天培地での判定	LFS+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
検体No. (2) 新方法					検体No. (2) 従来法				
BPW培養液での判定	+				BPW培養液での判定	+			
PCR	+				PCR	+			
LAMP	+				LAMP	+			
LFS-サルモネラ	+				LFS-サルモネラ	+			
RV-寒天培地での判定	+				RV-寒天培地での判定	+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	—			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	—			
TT-寒天培地での判定	LFS+				TT-寒天培地での判定	LFS+			
硫化水素での判定培地	+				硫化水素での判定培地	+			
非硫化水素での判定培地	—				非硫化水素での判定培地	+			

寒天培地上の集落で形態・色がサルモネラと判定されたものを+と表記した。確認の結果サルモネラであると確定したものをピンク枠で記載した。なお、MPN3 本法での確認の場合3検体中いくつかの検体で確認されたのかを数字で示した。

*MPN 1, 2, 3 については希釈倍数が10の0乗、1乗、2乗を示した。つまり、袋と同じ濃度、10倍希釈、100倍希釈での検出数が示されている。

10. 白身卵液での接種菌の検出実験

白身液卵への QA ボールによる接種実験（新検出法 BPW 添加剤無しでの検出）

	接種 (<i>Salmonella</i>)	PCR	RV-MLCB	RV-CHROMagar <i>Salmonella</i>	TT-MLCB	TT-CHROMagar <i>Salmonella</i>
1	3cfu	+	+	+	+	+
2	3cfu	+	+	+	+	+
3	3cfu	+	+	+	+	+
4	3cfu	+	+	+	+	+
5	3cfu	+	+	+	+	+
6	非接種	-	-	-	-	-

11. 鶏、豚、牛挽肉でのサルモネラ検出実験

3 種挽肉においての SPC とサルモネラの検出

	SPC(cfu/g)	BPW-PCR	RV-X-Sal	RV-クロモア ガーサルモネ ラ	TT-X-Sal	TT-クロモアガ ーサルモネラ
鶏挽肉	7.2×10^6	4/5	1/5	4/5	0/5	1/5
豚挽肉	3.4×10^5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
牛挽肉	2.8×10^6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

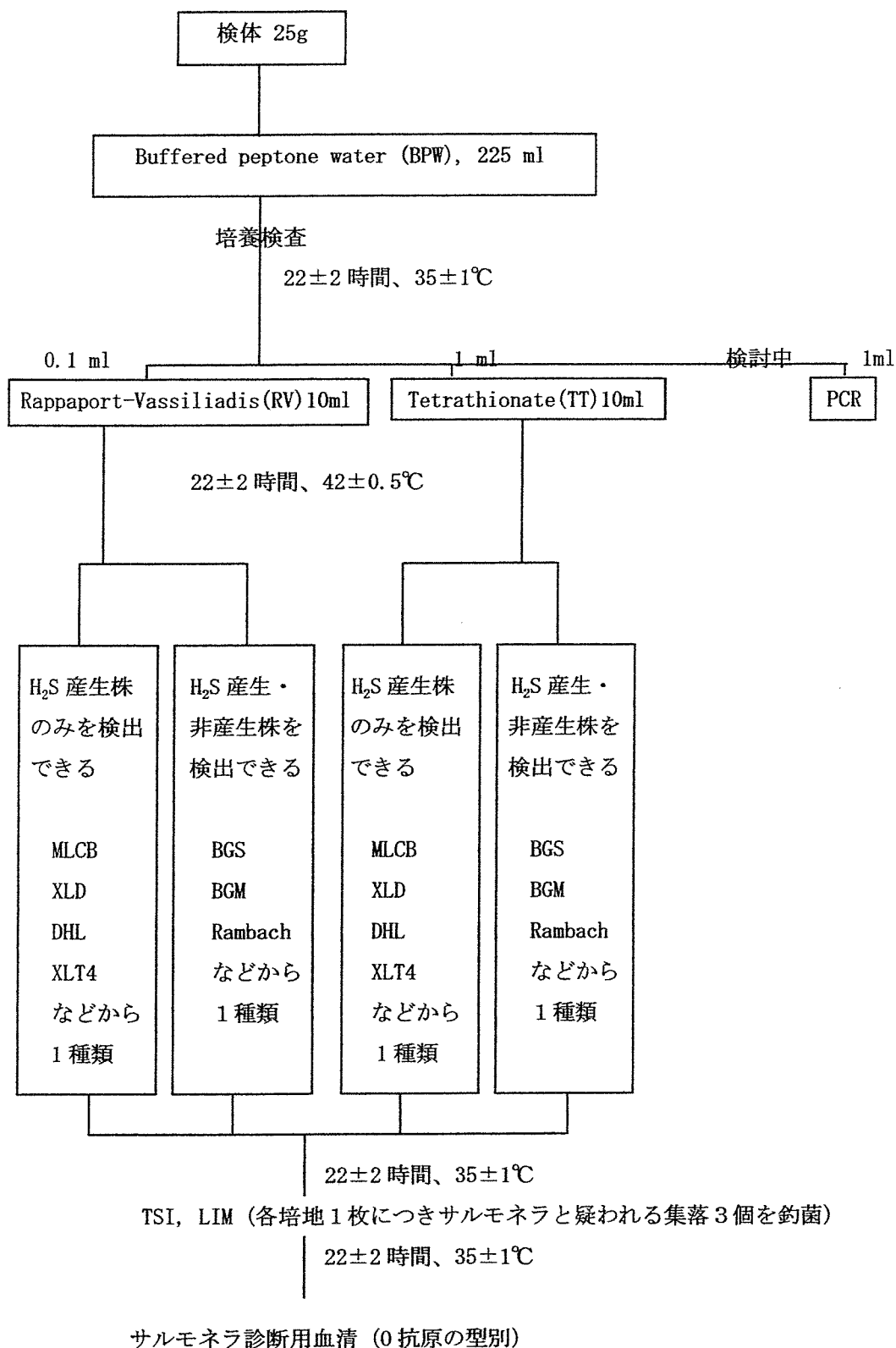
サルモネラの検査法作業部会のまとめ

平成 19 年 2 月

サルモネラ検査法検討作業部会

サルモネラ検査法

(この検査法は *Salmonella* Typhi と *Salmonella* Paratyphi A 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、 $35\pm 1^{\circ}\text{C} \cdot 22\pm 2$ 時間前増菌する。その培養液 0.1ml を Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 10ml に、また、1.0ml を Tetrathionate (TT) 培地 10ml に接種し、 $42\pm 0.5^{\circ}\text{C} \cdot 22\pm 2$ 時間両培地で培養する。RV と TT 培養液はよく混和後に 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、 $35\pm 1^{\circ}\text{C} \cdot 22\pm 2$ 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、 $35\pm 1^{\circ}\text{C} \cdot 22\pm 2$ 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。

培地作成上の注意点について

BPW については、使用時に 35°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。

BPW 培養液の RV 培地への接種量は 0.1ml とした。(選択性を確保するため。)

RV と TT は以下のように作成し、使用する段階では液温が室温以上であること。

RV 培地の作成保存方法：RV は加温溶解後に 10ml ずつ分注し、 115°C 、15 分間高压滅菌する。作成後冷蔵庫で 7 ヶ月保存可能

TT 培地の作成方法：TT 基礎培地(BAM 準抛培地を使用)は作成後 1 週間冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作成当日に使用のこと。

TT 基礎培地を加熱溶解後、 40°C 以下に冷却する。ヨウ素溶液 20ml を TT 培地 1L 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。

ヨウ素溶液の作成法

ヨウ化カリウム 5g

ヨウ素 6g

精製水 20ml

① 5g のヨウ化カリウムを 20ml の蒸留水に乳鉢等でつぶしながら溶かす。

② 6g のヨウ素をつぶしながら溶かす。

③ 褐色のガラス瓶に保存。

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)、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 2ml 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るので注意する。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。

*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判定できるかどうかを検討した。鶏挽肉では、BPW 培養後の遺伝学的判定は培養のみでの判定と一致率は 70%弱、未殺菌液卵や食肉製品等では 100%の一致率であった。サルモネラ検査において少なくとも液卵および食肉製品については、BPW 培養液を用いての遺伝学的な検査方法を採用入れることにより迅速検査は可能であった。今後、標準検査法に遺伝学的検出法を組み入れることを検討したいと考える。簡易キットについては、現段階では適応可能なものが無かった。

*参考まで

BPW 培養段階でサルモネラ有無判定に利用可の遺伝学的判定方法の操作方法

1.5ml マイクロチューブに BPW 培養液を 1ml 採取し、5,000rpm、2 分間遠心し、上清の培養液を除去する。(デカンテーションでよいが、なるべく培養液をしっかりと除去すること)

100 μ l の滅菌水を加え、ボルテックスにて攪拌後に 96℃、5 分間加熱後に、11,000 rpm、10 分間遠心により、上清を新しいチューブに分離する。この液を DNA 抽出液とする。(保存は 4℃で長期間保存可能)

試薬 19 μ l に検体(DNA 抽出液)1 μ l を添加して PCR を行う。なお、PCR 試薬液の中

に Positive Control DNA SN (TaKaRa, S040, 増幅産物 689bp)を添加し、PCR が各 DNA 抽出液で正常に反応しているかどうかを検討するとともに、negative control と positive control は必ず使用して、試薬全体で PCR が正常に反応したかどうかを判定すること。PCR は 94℃でのホットスタートにより、行うこと。(PCR のサイクルと試薬調整は以下の通り。)

PCR サイクル

94℃, 30s

55℃, 30s

72℃, 30s 以上を 35 サイクル、

さらに 72℃, 7min で終了し、4℃で反応液を保存。

PCR (Polymerase Chain Reaction) 試薬の調整

PCR 試薬作成 (1 検体に対して 19 $\mu\ell$)

X10 Ex Taq buffer 2 $\mu\ell$

dNTP 2 $\mu\ell$

primer 1* 0.1 $\mu\ell$

primer 2* 0.1 $\mu\ell$

Positive Control Template (1pg/ $\mu\ell$)

0.1 $\mu\ell$

Ex Taq 0.1 $\mu\ell$

滅菌蒸留水 14.6 $\mu\ell$

*primer 1 と primer 2 は TaKaRa SIN-1/2 (*invA* 遺伝子検出用)

PCR 反応後、アガロース電気泳動とエチディウム・ブロマイド染色により UV 照射下で検体での結果の判定を行う。サルモネラの *invA* 遺伝子が存在すれば、増幅産物は 378bp のバンドが出現する。Positive Control Template (689bp)のバンドのみ見られた場合は、PCR 反応は進行したがサルモネラは検出されなかった結果となる。Negative control 検体では 689bp のバンドのみが出現し、Positive control 検体では、689bp のバンド (出現しないこともある) とともに 378bp のバンドが出現する。(サルモネラの含まれている検体は 378bp バンドが判定の決め手であるが、DNA の濃度により 689bp のバンドも出てくる可能性もある)。

平成19年2月より 公開中

プロトコール案 ステージ2 サルモネラ検査法

サルモネラ検査法 (ステージ2：作業部会案) NIHSJ-01-ST2

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 ± 2 時間前増菌する。その培養液 0.1ml を Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 10ml に、また、1.0ml を Tetrathionate (TT) 培地 10ml に接種し、 $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・ 22 ± 2 時間両培地で培養する。RV と TT 培養液はよく混和後に 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 ± 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 ± 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。

培地作成上の注意点について

BPW については、使用時に 35°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。

BPW 培養液の RV 培地への接種量は 0.1ml とした。(選択性を確保するため。)

RV と TT は以下のように作成し、使用する段階では液温が室温以上であること。

RV 培地の作成保存方法：RV は加温溶解後に 10ml ずつ分注し、 115°C 、15 分間高压滅菌する。作成後冷蔵庫で 7 ヶ月保存可能

TT 培地の作成方法：TT 基礎培地(BAM 準拠培地を使用)は作成後 1 週間冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作成当日に使用のこと。

TT 基礎培地を加熱溶解後、 40°C 以下に冷却する。ヨウ素溶液 20ml を TT 培地 1L 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。

ヨウ素溶液の作成法

ヨウ化カリウム 5g
ヨウ素 6g
精製水 20ml

- ① 5g のヨウ化カリウムを 20ml の蒸留水に乳鉢等でつぶしながら溶かす。
- ② 6g のヨウ素をつぶしながら溶かす。
- ③ 褐色のガラス瓶に保存。

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

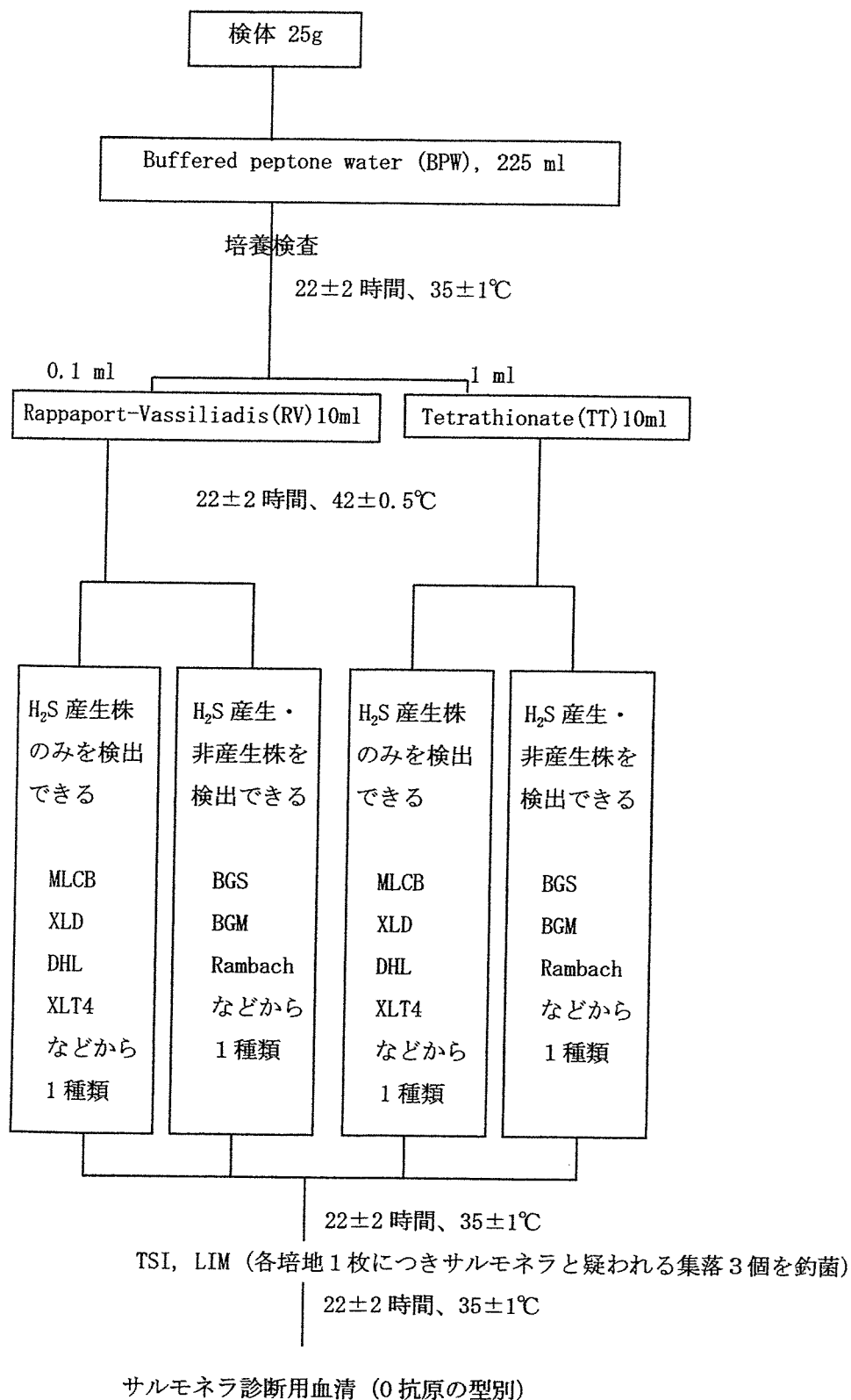
硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地：ES サルモネラ II, BGS(ブリリアントグリーン＋スルファピリジン)、BGM (改良 BGA)、ランバック寒天培地、クロモアガーサルモネラ、SMIDII など

BGS 寒天培地の作成方法：ジメチルホルムアミド 2ml 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るので注意する。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 を加えて溶解する。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。

サルモネラ検査法

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



II 分担研究報告

II-2 黄色ブドウ球菌検査法

分担研究者 清水晃

五十君静信

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）

平成18年度分担研究報告書

II-2 畜水産食品等の黄色ブドウ球菌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

研究協力者 尾上 洋一 神奈川県衛生研究所
金子 誠二 東京都健康安全研究センター
小野 一晃 埼玉県衛生研究所

研究要旨

前年度に引き続いて、黄色ブドウ球菌の標準となる検査法原案を作成するに当たって、外国の検査法との整合性を取るために、スイスのInternational Organization for Standardization (ISO)のISO 6888-1～3および米国の食品医薬品局(FDA)のBacteriological Analytical Manualの検査法を調べ、また現在、わが国で用いられている検査法と比較検討し、問題点を整理した。

直接平板培養法と選択増菌培養法で問題となっている選択分離培地、選択増菌培地、培養時間などについての実験を行い、基礎的資料を得た。また、「食品からの微生物検査標準法検討委員会」の議論をふまえて、黄色ブドウ球菌の標準となる検査法の原案を作成し、提案した。次年度はこの提案した検査法について、黄色ブドウ球菌作業部会を中心にコラボ研究を実施し、その妥当性を検討する予定である。また、食品の製造・調理環境（ヒト、器具、器材など）の衛生検査として拭き取り法による黄色ブドウ球菌の検査が一般的に行われていることから、拭き取り検査にも対応できる検査法、さらに、黄色ブドウ球菌検査ではエンテロトキシンの検出が重要な検査項目であることから、この検査法についても検討する予定である。

A. 研究目的

わが国で、腸炎ビブリオ、サルモネラ、カンピロバクターなどの食中毒細菌の検査には増菌培養法が用いられているが、黄色ブドウ球菌の検査では増菌を行わず、食品の10倍乳剤を選択分離培地に塗抹する、直接平板培養法が一般的に採用されている。この直接平板培養法で用いられている選択分離培地として、長年に亘って、食塩(5~10%)を選択剤とした、また黄色ブドウ球菌の指標である卵黄反応(リパーゼ反応)を確認するために卵黄液を添加した3%卵黄加マンニット食塩(MSEY)培地が多くの検査室、研究機関で広く用いられている。

一方、スイスのInternational Organization for Standardization (ISO)のISO 6888-1~3【1-3】および米国の食品医薬品局(FDA)のBacteriological Analytical Manual (BAM)【4】では、選択分離培地として、亜テルル酸カリウム、グリシン、リチウムなどを選択剤としたBaird-Parker(BP)培地が推奨されている。また、このBP培地に

は加熱や凍結などによる、いわゆる損傷菌に対する修復力を有するピルビン酸ナトリウムが、また鑑別剤として卵黄液が添加されており、食品材料から黄色ブドウ球菌を効果的に検出できるとして、諸外国ではこのBP培地が一般的に広く用いられている。

直接平板培養法は、食品検体中に黄色ブドウ球菌が少数の場合(100 cfu/g以下)には検出できないことがあり、黄色ブドウ球菌検査にも選択増菌培養法を導入すべきであるという意見がある。これに関連して、わが国の食品衛生検査指針【5】、ISO 6888-3【3】およびBAM【4】では黄色ブドウ球菌の汚染菌数が少数と推定される食品、競合菌が多数含まれていると推定される食品、菌が加熱や凍結などによって損傷を受けていると想定される食品の検査には、最確数(Most Probable Number;MPN)法による選択増菌培養法を推奨している。

最近になって、わが国でも市販の食肉および食肉加工製品、生食用魚介類、各種食品からの

黄色ブドウ球菌の検出率を高めるために、5%食塩＋1%ピルビン酸ナトリウム加ブイヨン培地【6-8】、7.5%食塩加トリプトンソーヤブイヨン(TSB)培地【9】、7.5%食塩加ハートインフュージョンブイヨン(HI)培地【10-13】、5%食塩および1%マンニット加ブレインハートインフュージョンブイヨン(0.2%フェノールレッド溶液を1.2%の割合に添加)(BHI)培地【14,15】による選択増菌培養が試みられ、本菌の検出率が直接平板培養法に比べて、著しく増加することが報告された。これらの報告は、各種の食品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のみでは不十分で、選択増菌培養法の併用が必要であることを示している。しかし現在、選択増菌培養法に用いられている、選択増菌培地の種類や増菌の培養時間などが検査室や研究機関によって様々であり、統一されていないのが現状である。

また、黄色ブドウ球菌検査の場合には、食品取り扱い施設等における衛生管理という観点か

ら、「製造・加工・調理施設内の器械・器具の拭き取り検査」や「人の手の拭き取り検査」が一般的に行われており、このような「拭き取り検査」にも対応できる検査法が要望されている。

さらに、黄色ブドウ球菌検査では、食品中のエンテロトキシンあるいは分離株のエンテロトキシン産生性を確認することが食品の安全性評価に最も重要であることから、エンテロトキシン産生性やエンテロトキシン遺伝子の検出を検査法の中に組み入れる必要がある。

本研究では、前年度に引き続いて、畜水産食品等からの黄色ブドウ球菌検査法の原案を作成するに当たって、特に問題点となっている、① 直接平板培養法に用いる選択分離培地、② 選択増菌培養法に用いる選択増菌培地、増菌の培養時間などに関する基礎的な実験を行うと共に、標準法検討委員会および作業部会で議論された点をふまえて、今後のわが国における黄色ブドウ球菌検査法の標準となる原案を作成したので、提案する。