

(2) 検査項目

- ・ 大腸菌 (*E.coli*)
- ・ 腸管出血性大腸菌 O157
- ・ サルモネラ属菌
- ・ 赤痢菌 (生食用かきのみ対象)

(3) 検体数

- ① 各自治体の検体数は、東京都は 420 検体、福岡県は 145 検体、岡山県は 140 検体、静岡県は 130 検体、その他の自治体にあつては 150 検体とする。食品別の検体数は、以下の 150 検体の例を参考とし、各自治体にて同様の割合で調整する。

野菜 (カット、漬け物用を含む。)	全品目で 65 検体
ミンチ肉	全品目で 25 検体
生食用牛レバー	10 検体
角切りステーキ肉等の牛肉	全品目で 20 検体
生食用食肉 (中心部まで十分加熱されない食肉類、ローストビーフを含む。)	全品目で 20 検体
生食用かき	10 検体
計	150 検体

(注) 野菜については各品目 5 検体以上を採取することとする。

5. 検体採取上の注意

いずれの食品も、複数の検体を採取する。

食品別の注意事項は以下のとおり。

(1) 野菜

中央卸売市場又は小売店において、生産者または生産地域が確認できるものを採取する。

(2) 食肉

ミンチ肉は食肉販売店より、生食用と称して販売されている牛レバーは食肉販売店又は飲食店より採取する。

(3) 生かき

中央卸売市場、小売店又は小分け包装を行う水産加工場において採取する。

6. 検査方法

別添 2 により実施する。

7. 検査結果報告

別添3の1～3の様式により平成18年2月末日までに食品安全部監視安全課まで報告する。別添3の2及び3については、それぞれ腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ属菌が検出された場合に使用する。

なお、「平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査の契約について」（平成17年6月29日付け食安発第0629002号）別紙「平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査予算執行要領」に示す事業実績報告書については、調査の終了の日から1か月を経過した日又は平成18年3月31日のいずれか早い日までに、支出負担行為担当官に提出し、その写し1部を食品安全部監視安全課あて別途送付する。

8. その他

(1) 検査結果に基づく指導等

検査の結果、食品衛生法に違反していることが判明した場合には、営業者に対し食品衛生法に基づく指導等を行うとともに、遡り調査を実施して汚染源を究明するなど必要な措置をとること。

(2) 菌検出の場合の報告について

腸管出血性大腸菌O157、サルモネラ属菌及び赤痢菌が検出された場合には、上記7. に拘わらず、速やかに食品安全部監視安全課食品安全係まで報告すること。

平成 17 年度食品の食中毒菌汚染実態調査における検査法

1. 大腸菌、腸管出血性大腸菌 O157、サルモネラ属菌

(1) 検体の調整方法

ハサミ、ピンセット等を用いて 25g 採取しストマッカー 400 用袋（ストマフィルター使用可）に採る。それに BPW（225ml：サルモネラ用）またはノボピオン加 mEC（225ml：大腸菌及び腸管出血性大腸菌 O157 用）を注ぎ入れ、15～30 秒間ストマッカー処理する（ストマッカー 400 あるいはマスティケーター等が準備できない施設は、揉み洗いを 20 回程度行う。なお、ホモジナイザー処理は不可。）。

なお、下記の食品を検査する場合には以下の点に留意する。

① キャベツ、ネギ、レタス、タマネギ等

可食部分の外側（外皮部分を含めて検査した場合は検査結果を区別する必要があることから、その旨記録すること。）をハサミ、ピンセット等を用いて採取する。

② ダイコン、ニンジン、キュウリ、トマト等

なるべく皮を含む外側表面（泥付きのダイコン、ニンジン等を検査した場合は、検査結果を区別する必要があることから、その旨記録する。）をハサミ、ピンセット等を用いて採取する。

(2) 検査方法

① 大腸菌 (*E.coli*)

以下の方法により、*E.coli* を同定する。

下記②の方法で増菌した培養液 1ml をダーラム管入り EC 培地 (10ml) に接種し、44.5℃・20～24 時間培養する。これ以降の操作は、「食品衛生検査指針微生物編」（社団法人日本食品衛生協会、2004）の第 2 章細菌の章 2 汚染指標菌 2. (3) ③ (138 頁) に従う。

なお、「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年 12 月 28 日付け厚生省告示第 370 号）において大腸菌に係る成分規格が設定されている食品については、当該規格に係る試験検査法を実施する。

② 腸管出血性大腸菌 O157

「腸管出血性大腸菌 O157 の検査法について」（平成 9 年 7 月 4 日付け衛食第 207 号・衛乳第 199 号）による試験法で実施する。ただし、別添 4 の参考法を併用する場合は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部（工藤由起子 主任研究官）に連絡し、増菌培地を入手する。

③ サルモネラ属菌（別添 5 参照）

ストマッカーあるいは揉み洗い処理した BPW (225ml) は、 $36 \pm 1^\circ\text{C} \cdot 20 \sim 24$ 時間、前増菌する。その培養液 0.5ml を Tetrathionate Broth (TT) 培地 (10ml)、培養液 0.1ml を RV 培地 (10ml) に接種し、 $42 \pm 0.5^\circ\text{C} \cdot 20 \sim 24$ 時間培養した培養液を試料とする。

〔 TT 培地の作製法は、TT 培地を加熱溶解後、 40°C 以下に冷却する。それにヨウ素液を培地 1 L あたり 20ml 加え、よく攪拌しながら試験管に分注する。〕

試料 (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及び硫化水素非産生性であってもサルモネラと判定できる培地) に画線塗沫し、 $36 \pm 1^\circ\text{C} \cdot 18 \sim 24$ 時間培養する。各分離平板培地に発育・増殖した典型的な、あるいは疑わしい集落^(注1)を 3 つ釣菌して、TSI 培地、LIM 培地あるいは LIA (リジン鉄寒天) 培地等に接種し、 $36 \pm 1^\circ\text{C} \cdot 18 \sim 24$ 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又は亀裂の発生) 及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 (まれに陰性あり) のものを、LIA 培地にあつては培地全体が紫変、高層部黒変のものを定型的なサルモネラと判定し、血清学的試験ならびに生化学的試験 (同定用キット使用も可) を行いサルモネラを同定する。また、定型的ではないが、サルモネラが疑われるものについても、血清学的試験ならびに生化学的試験を実施する。

○ 硫化水素の産生により判定する培地 :

MLCB、DHL、XLD、レインボー Salmonella (GSI クレオス)、ES サルモネラ培地

○ 硫化水素の非産生であってもサルモネラと判定できる培地 :

BGS (ブリリアントグリーン寒天培地にスルファピリジンを添加)^(注2)、BGM (改良ブリリアントグリーン寒天培地 (Oxoid, (関東化学販売)))^(注3)、ランバック培地 (メルク、CHROMagar 社 (関東化学販売))、クロモアガーサルモネラ (CHROMagar 社 (関東化学販売))、SMID (ビオメリュー)、ES サルモネラ II (栄研)

(注1) サルモネラ属菌が疑われる集落には、硫化水素を産生しないものを含む。

(注2) BGS 用スルファピリジンの添加方法

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。この溶液を 70°C 以上を保った BGS 培地 (1L) に添加し、混和する。この培地を 60°C 前後に冷却して平板を作製する。培地の温度が 60°C 以下

の時にスルファピリジン溶液を添加すると析出する場合があるので注意する。

(注3) BGM 培地用サプリメントの添加方法

アンプル1瓶に滅菌水5mlを加え、溶解した後、50℃前後に冷却した培地500mlに全量添加する。

2. 赤痢菌

「赤痢菌の試験法について」(平成14年1月9日付け監視安全課事務連絡)による試験法で実施する。

なお、当該事務連絡では2種類の試験法を示しているが、可能な限り、検出感度に優れる二番目の方法(「冷凍カキの *Shigella sonnei* 試験法(2)」)で実施する。

3. 注意事項

検査法等で不明な点の問い合わせ先

- ・ 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第二室 宮原美知子室長
TEL, FAX: 03-3700-9497
- ・ 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 工藤由起子主任研究官
TEL: 03-3700-1141(内線 533) FAX: 03-3700-9527

平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査結果報告書

(自治体名)

○ 腸管出血性大腸菌O157用

(検体名)

(検体採取日)

(検出菌名)

(検査方法 H9.7.4衛食207・衛乳199に基づくO157検査法

別添4の参考法)

注: 使用した検査方法を○で囲む。

使用培地等		使用の有無	結果	メーカー	備考
選択増菌培地	ノボビオシン加mEC培地				
	mEC基礎培地				
	その他の培地 ()				
免疫磁気ビーズ					
選択分離培地	CT-SMAC培地				
	BCMO157培地				
	クロモアガーO157培地				
	その他の培地 ()				
確認用培地	1%セロビオース 加LIG寒天培地				
	その他の培地 ()				

(注1) その他の培地を使用した場合には、()に培地名を記入する。

(注2) 使用の有無については、使用した培地に○を記入する。

(注3) 結果については、選択分離等が可能であった場合に○を記入し、塗抹した増菌培養の種類および直接法/ビーズ法の区別を備考に記入する。

平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査結果報告書

(自治体名)

○ サルモネラ属菌用

(検体名)
 (検体採取日)
 (検出菌名)

使用培地	使用の有無	結果	メーカー	備考
前増菌培地	BPW培地			
選択増菌培地	TT培地			
	RV培地			
選択分離培地 (硫化水素産生菌用培地)	MLCB培地			
	DHL培地			
	XLD培地			
	レインボーサルモネラ培地			
	ESサルモネラ培地			
	その他の培地 ()			
選択分離培地 (硫化水素非産生菌用培地)	BGS培地			
	BGM培地			
	ランバック培地			
	クロモアガーサルモネラ培地			
	SMID培地			
	ESサルモネラⅡ培地			
	その他の培地 ()			
鑑別培地	TSI培地			
	LIM培地			
	LIA培地			
	その他の培地 ()			

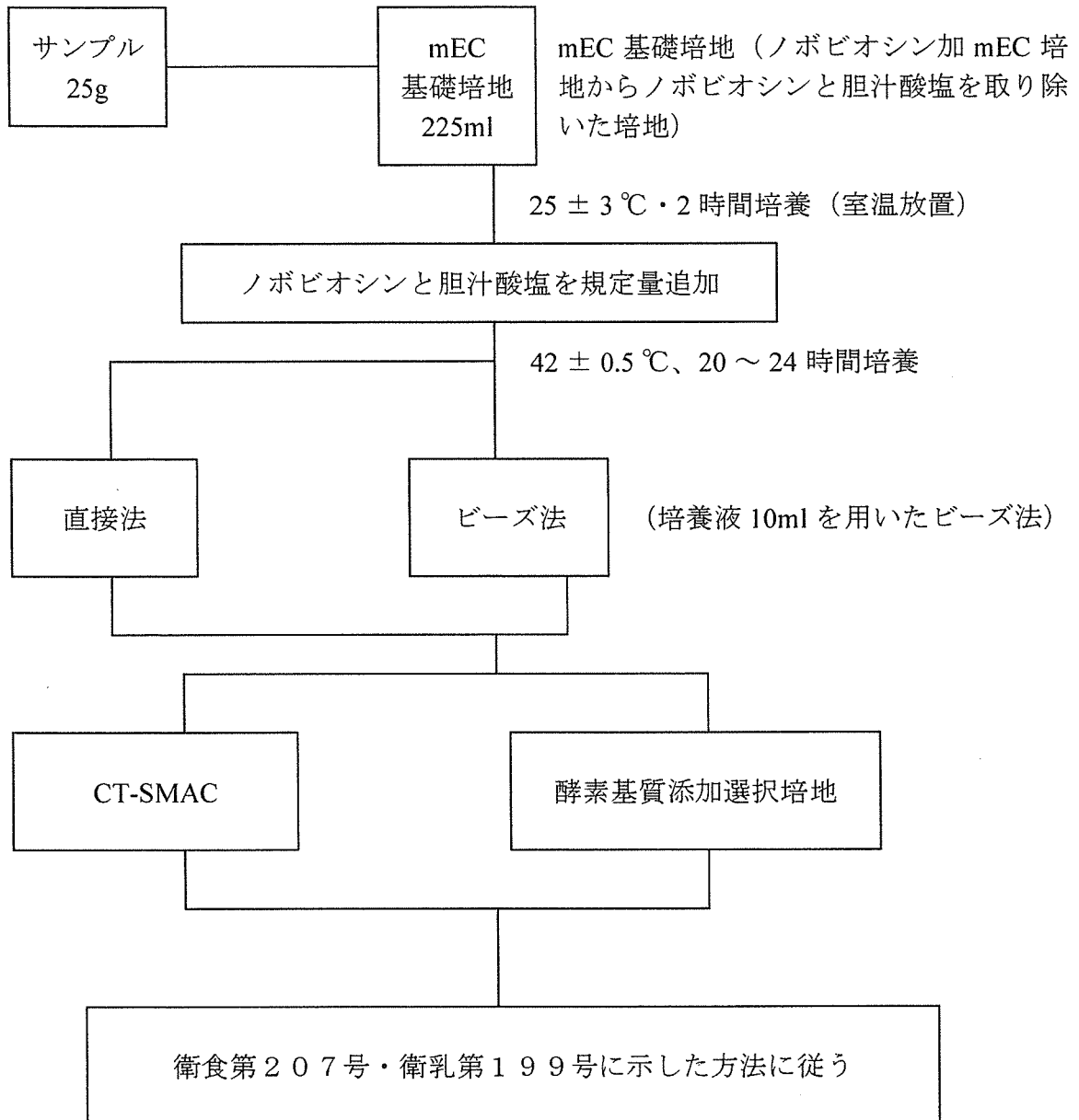
(注1) その他の培地を使用した場合には、()に培地名を記入する。

(注2) 使用の有無については、使用した培地に○を記入する。

(注3) 結果については、選択分離等が可能であった場合に○を記入し、塗抹した増菌培養の種類を備考に記入する。

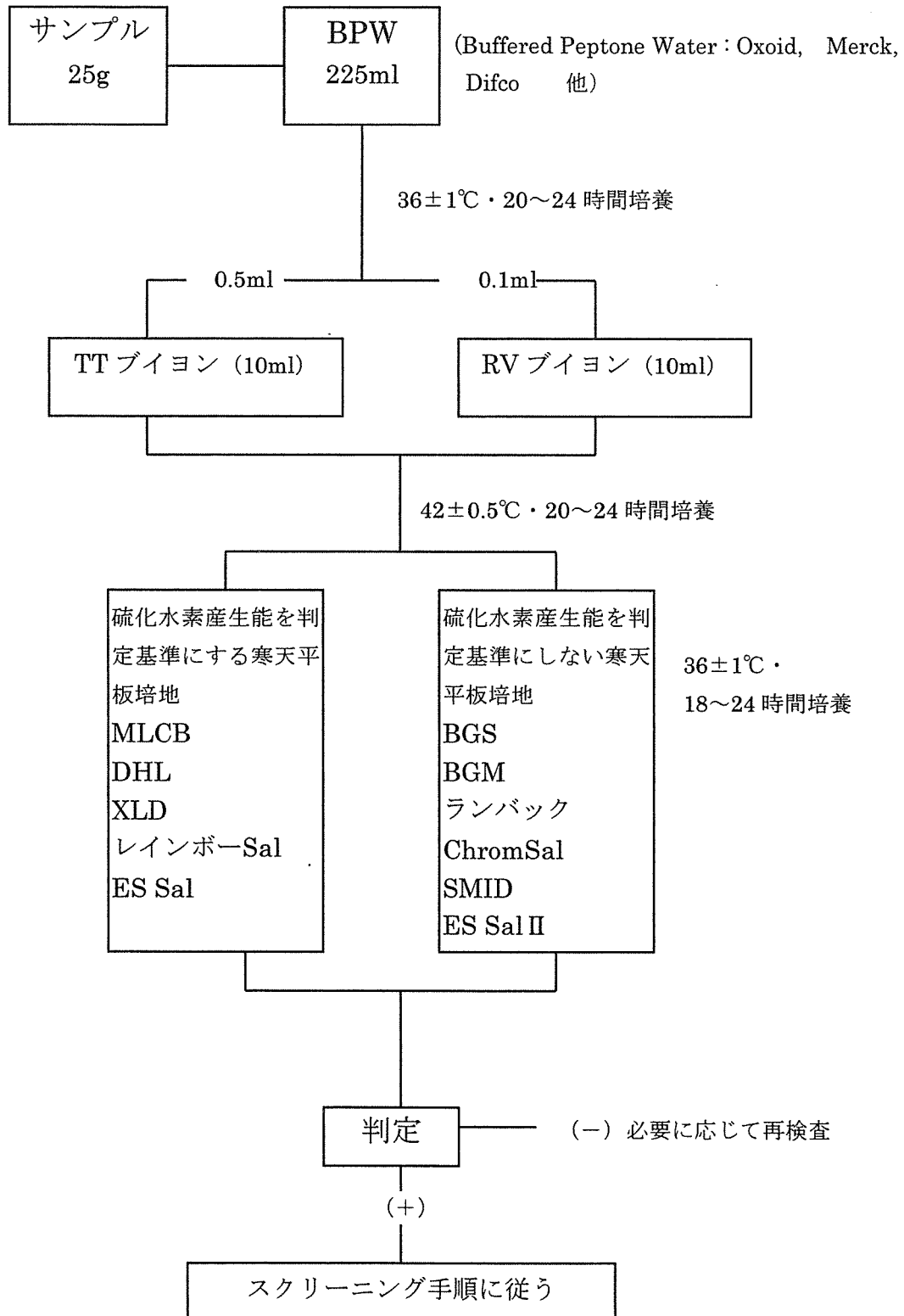
(別添4)

(参考法：腸管出血性大腸菌 O157 の検査法)

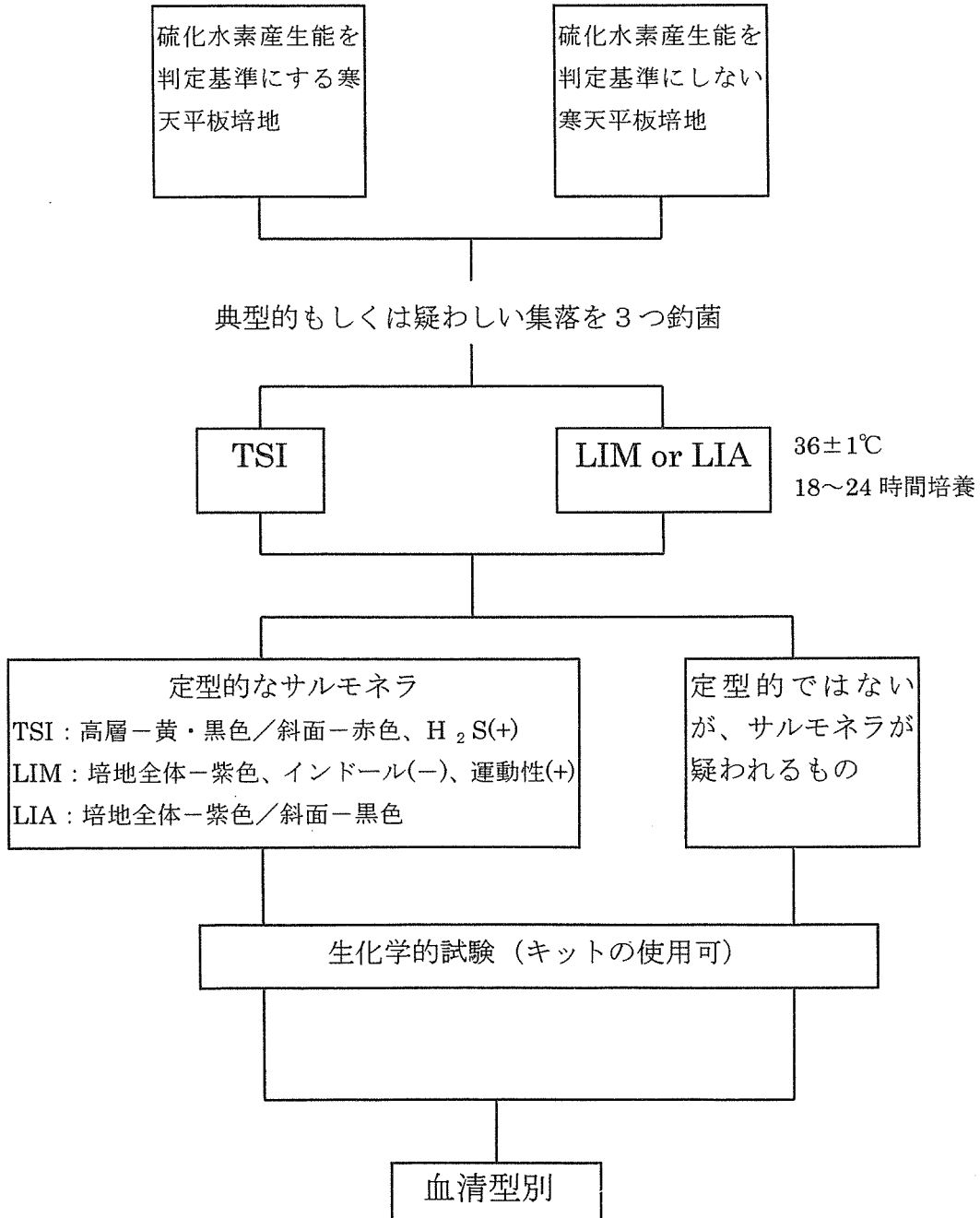


(別添5)

サルモネラの検査法



スクリーニング手順



資料 6

平成 17 年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果

平成17年度食品の食中毒菌汚染実態調査(集計結果)

(別添2)

		検体名	検体数	検査結果(陽性数)			
				E.coli	サルモネラ	O157	赤痢
厚生労働省 指定品目	野菜	アルファルファ	35	0	0	0	
		カイワレ	114	10	0	0	
		カット野菜	137	13	0	0	
		キュウリ	124	11	2	0	
		みつば	92	24	0	0	
		もやし	122	33	0	0	
		レタス	116	7	0	0	
		漬け物野菜	117	3	0	0	
	食肉	ミンチ肉(牛)	165	89	3	0	
		ミンチ肉(豚)	194	139	9	1	
		ミンチ肉(牛豚混合)	121	84	2	0	
		ミンチ肉(鶏)	110	88	37	0	
		牛レバー(生食用)	14	11	0	0	
		カットステーキ肉	173	111	0	0	
		牛結着肉	51	32	0	0	
		牛たたき	100	22	0	0	
		鶏たたき	52	34	5	0	
		馬刺	90	27	0	0	
	ローストビーフ	60	4	0	0		
	魚介	かき(生食用)	188	28	0	0	0
加工品	漬物	48	0	0	0		
	小計	2,223	770	58	1	0	
実施自治体 *1 選定品目	野菜	スプラウト	39	5	0	0	
		トマト	37	3	0	0	
		なす	31	1	0	0	
		ミニトマト	27	0	0	0	
		長ねぎ	24	8	0	0	
		大根	21	1	0	0	
		水菜	20	3	0	0	
		キャベツ	16	7	0	0	
		ピーマン	13	0	0	0	
		ニンジン	13	0	0	0	
		ハクサイ	12	1	0	0	
		サニーレタス	10	2	0	0	
		その他の野菜 *2	106	15	0	0	
	食肉	牛肉	68	19	0	0	
		豚肉	24	4	0	0	
		ハンバーグパテ	22	8	2	0	
		その他生食用食肉*3	71	22	0	0	
		その他加工用食肉等*4	35	10	0	0	
	小計	589	109	2	0	0	
合計			2,812	879	60	1	0

*1:実施自治体(17)

北海道、岩手県、千葉県、東京都、神奈川県、静岡県、岡山県、山口県、福岡県、宮崎県、沖縄県、千葉市、川崎市、横浜市、北九州市、福岡市及び宮崎市

*2:自治体選定品目のうち、総検体数が10に満たない野菜を「その他の野菜」とした。

*3:自治体選定品目のうち、総検体数が10に満たない生食用食肉を「その他生食用食肉」とした。

*4:自治体選定品目のうち、総検体数が10に満たない加工用食肉を「その他加工用食肉等」とした。

厚生労働省指定品目の調査結果の推移(平成15年～17年)

検体名	検体数			検査結果(陽性数)												
				E.coli			サルモネラ属菌			腸管出血性大腸菌O157			赤痢			
	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	
野菜	カイワレ	135	121	114	10	9	10	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	アルファルファ	22	20	35	1	1	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	レタス	139	123	116	8	6	7	-	1	-	-	-	-	/	/	/
	みつば	102	95	92	28	25	24	-	1	-	-	-	-	/	/	/
	もやし	135	147	122	28	41	33	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	キュウリ	130	125	124	9	4	11	-	-	2	-	-	-	/	/	/
	カット野菜	107	177	137	8	8	13	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	漬け物野菜	86	101	117	7	5	3	1	-	-	-	-	-	/	/	/
食肉	ミンチ肉(牛)	172	188	165	97	110	89	-	2	3	-	-	-	/	/	/
	ミンチ肉(豚)	170	148	194	113	114	139	1	5	9	-	-	1	/	/	/
	ミンチ肉(牛豚混合)	124	134	121	72	73	84	4	2	2	-	-	-	/	/	/
	ミンチ肉(鶏)	78	103	110	69	92	88	22	26	37	-	-	-	/	/	/
	牛レバー(生食用)	11	22	14	9	15	11	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	カットステーキ肉	161	200	173	81	113	111	2	-	-	-	-	-	/	/	/
	牛結着肉	65	53	51	46	34	32	-	-	-	1	-	-	/	/	/
	牛たたき	72	88	100	9	21	22	-	1	-	-	-	-	/	/	/
	鶏たたき	10	47	52	8	27	34	1	4	5	-	-	-	/	/	/
	馬刺	60	81	90	10	15	27	1	-	-	-	-	-	/	/	/
	ローストビーフ	33	72	60	2	10	4	-	-	-	-	-	-	/	/	/
魚介	かき(生食用)	197	204	188	14	35	28	-	2	-	-	-	-	-	-	-
加工品	漬物	/	/	48	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/
	小計	2,009	2,128	2,223	629	758	770	32	44	58	1	0	1	0	0	0

検体名	検体数			検査結果(陽性率(%))												
				E.coli			サルモネラ属菌			腸管出血性大腸菌O157			赤痢			
	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	H15	H16	H17	
野菜	カイワレ	135	121	114	7.4%	7.4%	8.8%	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	アルファルファ	22	20	35	4.5%	5.0%	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	レタス	139	123	116	5.8%	4.9%	6.0%	-	0.8%	-	-	-	-	/	/	/
	みつば	102	95	92	27.5%	26.3%	26.1%	-	1.1%	-	-	-	-	/	/	/
	もやし	135	147	122	20.7%	27.9%	27.0%	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	キュウリ	130	125	124	6.9%	3.2%	8.9%	-	-	1.6%	-	-	-	/	/	/
	カット野菜	107	177	137	7.5%	4.5%	9.5%	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	漬け物野菜	86	101	117	8.1%	5.0%	2.6%	1.2%	-	-	-	-	-	/	/	/
食肉	ミンチ肉(牛)	172	188	165	56.4%	58.5%	53.9%	-	1.1%	1.8%	-	-	-	/	/	/
	ミンチ肉(豚)	170	148	194	66.5%	77.0%	71.6%	0.6%	3.4%	4.6%	-	-	0.5%	/	/	/
	ミンチ肉(牛豚混合)	124	134	121	58.1%	54.5%	69.4%	3.2%	1.5%	1.7%	-	-	-	/	/	/
	ミンチ肉(鶏)	78	103	110	88.5%	89.3%	80.0%	28.2%	25.2%	33.6%	-	-	-	/	/	/
	牛レバー(生食用)	11	22	14	81.8%	68.2%	78.6%	-	-	-	-	-	-	/	/	/
	カットステーキ肉	161	200	173	50.3%	56.5%	64.2%	1.2%	-	-	-	-	-	/	/	/
	牛結着肉	65	53	51	70.8%	64.2%	62.7%	-	-	-	1.5%	-	-	/	/	/
	牛たたき	72	88	100	12.5%	23.9%	22.0%	-	1.1%	-	-	-	-	/	/	/
	鶏たたき	10	47	52	80.0%	57.4%	65.4%	10.0%	8.5%	9.6%	-	-	-	/	/	/
	馬刺	60	81	90	16.7%	18.5%	30.0%	1.7%	-	-	-	-	-	/	/	/
	ローストビーフ	33	72	60	6.1%	13.9%	6.7%	-	-	-	-	-	-	/	/	/
魚介	かき(生食用)	197	204	188	7.1%	17.2%	14.9%	-	1.0%	-	-	-	-	-	-	-
加工品	漬物	/	/	48	/	/	-	/	/	-	/	/	-	/	/	/

平成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

分担研究報告書

5. 輸入食品における *Listeria monocytogenes* 及び
Yersinia enterocolitica の保有状況

分担研究者 岡田由美子

輸入食品における *Listeria monocytogenes* 及び *Yersinia enterocolitica* の保有状況

分担研究者 岡田由美子

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部主任研究官

研究要旨

Listeria monocytogenes（以下リステリア）はヒト及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こすリステリア症の原因菌であり、土壌、河川水や様々な動物の腸管内から分離されることが知られており、人への感染源としてはナチュラルチーズ、食肉製品等の非加熱喫食食品を中心とする汚染食品の摂取が主となっている。本菌は食塩耐性、低温増殖能などの高度な環境抵抗性を持つため、食品やその原料への1次汚染や食品製造工程での2次汚染、保存過程での増殖の抑制は困難である。欧米では過去数十年に亘ってナチュラルチーズや食肉製品を原因食品とするヒトのリステリア症の集団事例が報告されている。わが国でも年間80例ほどの散発例の発生が推測されているが、髄膜炎等の重篤なリステリア症では潜伏期間が約1ヶ月と長期にわたるため、その原因食品が特定されないことが多い。本研究では、現在国内で行われている輸入食品の微生物モニタリングシステムの検証の一助とする目的で、一般に流通している輸入食品であり家庭での保存期間が比較的長いと思われるチーズ、サラミソーセージにおけるリステリアの保菌状況について調査を行った。また、リステリアと同様の低温増殖性を持つ食中毒細菌であるエルシニアについてもその保有状況を調査した。その結果、市販サラミソーセージの33.3%（12検体中4検体）から *Listeria* 属菌が、16.7%（12検体中2検体）から *L. monocytogenes* が分離され、市販ナチュラルチーズの2.9%（70検体中2検体）から *Yersinia enterocolitica* が分離された。

A. 研究目的

リステリア症の原因菌 *L. monocytogenes* は人へは主に汚染食品の摂取を通じて感染する。一方本菌は動物の腸管内や河川水等自然界に幅広く分布しており、また、4℃以下でも増殖可能な低温増殖能や20%もの高食塩濃度下でも生残できる高塩濃度耐性能を持つことから食品原料の一次汚染のみならず製造工程及び保存期間での二次汚染・食品内増殖を防ぐことも困難となっている。本研究では、輸入食品におけるよりよい微生物モニタリング構築のた

めの研究の一端として、現在国内で一般に流通している輸入チーズおよびサラミソーセージにおける *L. monocytogenes* の保菌状況について調査を行った。また、同じく低温増殖性を持つ食中毒細菌である *Y. enterocolitica* についても調査した。

B. 研究方法

1. 検体

都内スーパーマーケット及び専門店で購入したナチュラルチーズ70検体及びサラミソー

ページ12検体について調査を行った(表1)。

2. *L. monocytogenes* の分離・同定及び型別
各検体を25gに無菌的に切断してリステリア選択培地(UVM II培地)(オキシド)225mlとともにストマッカー袋に入れ、ストマッカー(GSIクレオス製、マスティケーター)にかけ(チーズは毎秒5-8ストロークで30-150秒、サラミソーセージは毎秒8ストロークで150秒)、懸濁液を作成した。その1mlをPALCAMリステリア選択寒天培地(oxoid)3枚に塗布し30℃一夜以上培養した。疑わしいコロニーを全数釣菌し、確認試験を行った(直接培養)。残った懸濁液を30℃で一夜培養してその0.2mlを1枚のPALCAM寒天平板に塗布し、30℃一夜以上培養した。疑わしいコロニー5個を釣菌し、確認試験を行った(増菌培養)。確認試験のため、得られたリステリア様コロニーをCHROM agar Listeria(関東科学)に画線培養し、ハローを周囲に持つ青色コロニーの形成を確認した。PALCAM寒天平板上で単一コロニーを形成するように培養し、得られたコロニーからポアメディア羊血液寒天(栄研)を用いたCAMP testおよびAPI Listeria(日本ビオメリユー)を用いて性状を検査した。さらに、単一コロニーをバッファー(Tris(pH8.0)10mM, EDTA(pH8.0)1mM)50 μ lに懸濁し、100℃10分間加熱処理したものを高速遠心機で15000rpm10分処理した上清を用いてPCRを行った。PCRには*L. monocytogenes*の病原因子、*hly*および*iap*内からそれぞれ一組のプライマー(*hly*はCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAとATTACGGCTTTGAAGGAAGAA、*iap*はCAAAGGTGGATCCAAAGTAAGTGTとTGGAGCTTCCGAATTCACCTTCTG)を用いた。

L. monocytogenes と同定された株について、

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。また、リボプリンターシステム(タカラバイオ)を用いてリボタイピングを行った。

3. エルシニアの分離・同定及び型別

各検体を10gに無菌的に切断しストマッカー袋に入れてPBS90mlを加え、*L. monocytogenes*の分離時と同様にストマッカーで懸濁したのちに4℃にて3週間低温増菌培養を行った。3000 μ lを同量の0.75%水酸化カリウム加0.5%塩化ナトリウム水溶液でアルカリ処理し、菌液一白金耳をYersinia selective agar base(関東化学)にイルガサン(和光純薬)とノボビオシン(和光純薬)を添加したIN培地に塗布した。28℃で48時間以上培養し、エルシニア様コロニーについて同定試験を行った。純培養したコロニーをTSI及びLIM培地(日水製薬)で試験し、エルシニア様の性状を示したものについてAPI Rapid20E(日本ビオメリユー)を用いてさらに生化学性状を調べた。その結果エルシニアとされた株について37℃及び25℃における自己凝集性とプラスミドの有無を調べることで病原性を評価した。更に*Y. enterocolitica*と同定された株について、エルシニア・エンテロコリチカO群型別血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。また、乳製品からのエルシニアの分離報告及び乳製品を原因とするエルシニア症の報告例についてPubMedを用いて文献検索を行った。

4. 生化学性状の評価

各検体のpHをラコムテスターpH計(アズワン)を用いて、Aw値は水分活性計(GSIクレオス)を用いて測定した。また、各検体の抗リステリア活性を調べるためにPBSに最終濃度10%となるように検体を懸濁し、

穴径0.22 μm のポアフィルターで濾過した液を作成した。その20 μl を10⁴ CFU/ml の *L. monocytogenes* EGD 株を混釈した BHI 寒天培地に接種した。コントロールには代表的バクテリオシンである Nisin (Sigma) を用いた。

C. 研究結果

今回調査した市販輸入サラミソーセージの33.3% (12検体中4検体) から *Listeria* 属菌が、16.7% (12検体中2検体) から *L. monocytogenes* が分離され、市販輸入ナチュラルチーズの2.9% (70検体中2検体) から *Yersinia enterocolitica* が分離された (表2)。また、*L. monocytogenes* が分離された2種のサラミソーセージ検体の pH (検体1が5.67、検体2が5.44) はラベルの表記 (検体1, 2共に5.3未満) より高い数値を示しており、検体1の Aw 値 (0.884) もラベルに表記された水分活性 (0.87未満) より高かった。両者ともに一夜増菌培養した懸濁液から *L. monocytogenes* が検出されたが直接培養法からは検出されなかったため、汚染菌数は100/g 未満であった。2検体はスペインの同一メーカーの製品であったが、分離株の血清型は1検体が1/2c であり、他方が1/2a であった (表3)。リボタイピングの結果から前者は DUP19165 株、後者は DUP1045 株と高い相同性を示し、両者とも Lineage は II に分類された。また、1/2a 株が分離された検体2からは *L. innocua* も分離された。また、他のスペイン産サラミソーセージ2検体から *L. innocua* が分離されたため、今回調査したスペイン産サラミソーセージ7検体中4検体 (57.1%) から *Listeria* 属菌が、7検体

中2検体 (28.6%) から *L. monocytogenes* が分離されていた。今回分離された2株のエルシニアは両者とも37℃における自己凝集性を示さず、病原性プラスミドを保持していなかったことから、非病原株であることが確認された (表4)。エルシニアが分離されたナチュラルチーズは2種類ともフランスから輸入された未殺菌乳を原料とする白かびタイプのチーズであった。選択培地上で形成されたエルシニア様コロニーで、API Rapid20E を用いた同定試験の結果他種と同定された菌は表5に示すとおりであった。また、乳製品を原因とするエルシニアの分離例及びエルシニア症の報告例について文献調査を行ったところ、表6の結果が示された。今回調査した検体に抗リステリア活性を示したものはみられなかった。

D. 考察

1. 今回の調査により、一般に流通している輸入サラミソーセージ12検体中2検体から *L. monocytogenes* が検出された。*L. monocytogenes* の汚染菌量は100 CFU/g 未満であり、輸出国側の基準となる EU の *L. monocytogenes* 汚染基準には違反していなかった。しかしながら日本では本菌の衛生基準は定性的なものであり、食品衛生法違反として商品の回収が行われた。また、本研究による検査時は当該検体の製造から間もない時期であったが、本菌は低温増殖菌でありこれらの検体の賞味期限が8-10ヶ月と長期であったため、店舗及び家庭での保存期間中に菌が更に増殖する可能性が高いと思われた。また、今回試験した中でスペイン産のサラミソーセージの半数近くから *Listeria* 属菌が分離されており、1検体からは *L. monocytogenes* と *L. innocua* の両

方が分離された。また、*L. monocytogenes* が分離された2つの検体は同一メーカーの製品であるが血清型、リボタイプ共に異なる株が分離されており、スペイン産の食肉製品が高度に本菌に汚染されている可能性が示唆された。一方ナチュラルチーズに関しては今回の調査では *L. monocytogenes* は分離されなかった。

2. 今回の調査により、一般に流通している輸入ナチュラルチーズ 70 検体中 2 検体からエルシニアが検出された。2 検体共にフランス原産の未殺菌製白カビチーズであった。現在行われているエルシニア試験法は低温増菌法であり、定性的な解析であるため汚染菌量は不明であった。また、両検体共に試験日から賞味期限が 2 週間以内であり、3 週間の増菌培養及びその後の同定試験の間に流通が終了していると思われた。更に今回の分離菌は非病原株であることが確認されたため、当該商品の回収等は不要とした。一方で、文献調査の結果から多くの国で生乳や乳製品からエルシニアが分離されており、汚染乳製品を原因とする集団感染も報告されていることから、国内でも輸入乳製品を通じたエルシニア症の感染に注意する必要があると思われた。輸入ナチュラルチーズには現在国内での生産が認められていない未殺菌乳を原料としたものがしばしばみられるが、今回の調査結果からも病原菌を保有しているリスクが殺菌乳を原料とするものよりも高いと思われるため、原産国のラベルにも必ずしも表記されていない原料の殺菌の有無について明確に表記したほうがよいのではないかと思われた。また、現在行われているエルシニアの検査法は同定までに大変長期間を要し、選択培地についても表5に示したように多くの類似コロニーが形成されることから、迅速でより選択性の強く定量的な分離法の確立が望ましいと思われる。

3. ナチュラルチーズには乳酸菌由来の抗リステリア活性を持つバクテリオシンが含まれていることがあり、また、国内では現時点では認められていないが EU では食品添加物としてバクテリオシンが添加されることがある。また、ゴータチーズ等の表面を覆うワックスへのナタマイシン添加も EU では認められているため、今回調査した検体について抗リステリア活性の有無を調べたが、全検体でコントロールとして用いたナイシンと比較して全く活性は見られなかった。

E. 結論

今回の調査の結果、国内で一般に流通している輸入サラミソーセージの 33.3% から *Listeria* 属菌が、16.7% から *L. monocytogenes* が分離されたことから、現在行われている微生物モニタリングでは必ずしも効率的に有害微生物に汚染された輸入食品の排除ができていないことが示された。特にスペイン原産の食肉製品については更に詳細なモニタリングを実施するべきであると思われた。また、現在ほとんど注目されていない輸入乳製品のエルシニア汚染についても注意が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

L. monocytogenes が検出されたサラミソーセージに関し厚生労働省を通じて輸入代理店に連絡し、当該商品の回収が行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada Y, Okada N, Makino S, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. 2006. The sigma factor RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in

Listeria monocytogenes. FEMS Microbiol Lett.
vol. 263 p54-60.

2. 学会発表

Y. OKADA, S. MAKINO, N. OKADA, H.
ASAKURA, S. YAMAMOTO, S. IGIMI
Identification and analysis of the osmotolerance
associated genes in *Listeria monocytogenes*. 天然資
源の開発利用に関する日米会議主催の第10
回食品媒介微生物学・細菌毒素解析に関する国
際シンポジウム 2006年11月ワシントンDC

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし