

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮原 美知子

平成20（2008）年3月

目次

- 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
宮原美知子

- II. 分担研究報告
 1. サルモネラ試験法
田口 真澄、 宮原 美知子
表 1 - 5
資料 1 - 5
 2. 黄色ブドウ球菌試験法
河野 潤一、 五十君 静信
表 1 - 10
実験図
資料 1、 2
 3. 腸炎ビブリオ試験法
 - 1) 腸炎ビブリオ試験法
甲斐 明美、 荒川 英二
表 1
資料 1 - 4
 - 2) PCR での検討
荒川 英二、 宮原 美知子
資料 1
 4. 食品からの微生物検査標準法検討委員会
五十君 静信
食品からの微生物検査標準法検討委員会名簿
資料 1 - 4 (議事録概要)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表

I 総括研究報告書

主任研究者 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）

H19 年度 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、食品中これら微生物の試験法を検討してきた。科学的根拠のある、多くの方の賛同が得られる検査法を提案するために、食品からの微生物検査標準法検討委員会を立ち上げ、検査法の策定の仕方を検討するとともに、その過程の進行の仕方についても議論し、できる限りその方針に沿った検討の仕方を行ってきた。検討委員会も公開し、その決定事項についてもホームページ上に載せ、学会等でも公開を行ってきた。今年度は最終年度でもあり、最初の目標を達成するように努力を行った。サルモネラは6機関での一斉検査を行って、約3個少数菌サルモネラ接種でも検出できることを確認した。その結果を受けて、14機関での低菌数と高菌数の2段階の接種、硫化水素産生サルモネラと硫化水素非産生サルモネラを使用してのコラボ研究を行った。その結果、99.7%の接種状況との一致という良好な結果が得られた。国立衛研ホームページ上に検証したサルモネラ試験法を標準法として提案するところである。黄色ブドウ球菌については、現在の直接塗抹法の他に、増菌培養を伴う検出法を提案し、そのコラボ研究を行う段階にある。現在コラボに参加する人を募っているところである。腸炎ビブリオは標準試験法としての条件等の詳細検討を行った。分離検出培地での腸炎ビブリオ判定が酵素基質培地で可能かどうかを検討し、90%以上の確率で腸炎ビブリオを検出できるとの確認を行った。しかし、さらに迅速判定を行うためにはPCRでの判定が必要であること考え、腸炎ビブリオ特異的プライマーの検討を行った。遺伝子解析を行い、腸炎ビブリオに特異性の高いプライマーを設定し、各種ビブリオ株でのPCR検出の検討を行った。新しいプライマーは10の4乗個で検出が可能であり、現在までに検討したビブリオ1,018株中、腸炎ビブリオは99.8%、腸炎ビブリオ以外のビブリオを誤って検出した例は1.9%という結果が得られ、高い特異性が確認された。このことから、このプライマーを利用した迅速判定を現在検討中であり、培養時間等の短縮、腸炎ビブリオ確認の短縮化などが図られている。

分担研究者

サルモネラ検査法検討班

田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所細菌課
主任研究員

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

河野潤一 神戸大学農学部准教授

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
主任研究員

食品からの微生物検査標準法検討委員会

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

A. 研究目的

現在、国際的に認められている細菌検査の標準法は、そのプロトコー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、複数の検査室で実効性の評価を経た後、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、我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。一部の検査期間では、検査法の議生津工場のため、海外の債券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、具体的になっていない。

このような現状を打開するために、この研究班が作られたが、具体的な研究目的としてはサルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの食品からの検査法を現行の方法を変更し、科学的裏付けのある検査法で、作成過程から公開方式で行い、多くの人の意見を集約した検査法を作ることにある。サルモネラに関しては平成5年に通知された食肉製品に関するサルモネラの検出法を有害化学物質を含まない、廃棄の時に面倒な処理のいらぬ方法に換えること、また、損傷菌に対して検出感度の高い国際的にも認められる検査法に換えることが求められている。黄色ブドウ球菌検査法は、現行法は10倍乳剤を0.1ml, 2枚の卵黄加マンニット食塩培地に塗抹するという現行法があるが、諸外国では、その塗抹寒天培地に損傷菌にも対応できるBaird-Parker (BP) 寒天培地を用いることが多いことから、両培地での比較検討が求められた。また、2000年に起きた食中毒事件への反省から、標準検査法にエンテロトキシンを検出検査を組み込むべきでは等の意見がある。それらの

件も検討が望まれている。腸炎ビブリオは、生鮮魚介類等での腸炎ビブリオ検査が2,001年に決められているが、これらの食品はその検査が3-4日腸炎ビブリオ確定までにかかる検査法であるので、実際検査を行っても、結果の出る頃には、食品そのものは消費されて食品の安全性確保のための検査には役に立たない。何とか迅速判定の方策を検討してとの要望があった。この要望に応えるような研究をめざした。また、標準法として他の検査法とバランスのとれた検査法とするにはどのような条件等の検討が必要か考え、標準法としての検討も行う。

B. 研究方法

各作業部会が現行法、各国の状況等を検討し、日本にあった検査法の原案を提案する。その原案を検討委員会で詳細に検討し、その検討結果については、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ食品項目に載せていく。載せるだけではなく、意見も募集していく。各作業班では、提案した検査法を精査するための実験を行い、試験法としての問題点を検討し直す、あるいは実験を行って結果を検討する。このようにして試験法を作り上げ、小規模の検討実験を行って、想定した機能を持った検査法であるかどうかを検討し直し、最終的にはコラボ実験を行うことによって検査法の確認を行う。

C. 研究結果

この研究班の研究結果については、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ食品項目に掲載している。

サルモネラについては、コラボ研究を良好な結果で終了し、標準法としてホームページに掲げるところである。14機関でのコラボで99.7%の接種状況との一致率であった。接種菌数も1

資料25g中サルモネラ5個程度ときわめて少ない菌数とその10倍の菌数の2段階菌数があり、未接種の群もあり、硫化水素産生株あるいは硫化水素非産生株と2種類の菌株がありながら、ほとんど完璧にO抗原型までしっかりと検出された。また、このサルモネラの検査法は一斉検査で行ったハム等の食肉製品、コラボ研究で使用した生の食肉、さらに未殺菌液卵(全卵)や白身液も少数菌サルモネラを検出することができたことから、多く種類の食品のサルモネラ検査法として十分に適用可能であると考え。このサルモネラ試験法を食品のサルモネラ標準試験法として報告する。

黄色ブドウ球菌に関しては、卵黄加マンニト食塩培地とBPの比較検討においては、損傷菌である場合にはBPの検出力は優れていたが、一般的な食品においては、同等な検出力と判断された。それらのことより、両培地を比較するコラボ実験を検討することになった。現在、直接塗抹法とMPNでの増菌菌数測定法の検査法について両培地を使ったコラボ実験を計画している。コラボ参加をホームページ上で募っているところである。

腸炎ビブリオは酵素基質培地の腸炎ビブリオの検出力を検討し、酵素基質培地で選択した集落の90%以上は腸炎ビブリオであることが確認された。このことから、腸炎ビブリオ確認については約1日が検査日数の節約が可能であると考えられる。また、それ以上の腸炎ビブリオ判定の時間節約を考えると、培養後のPCR判定が妥当であると考えられた。そこで、腸炎ビブリオ特定のために考えられているPCRプライマーの中で、腸炎ビブリオ特異性を持ったプライマーを設定することを目標とした。腸炎ビブリオと同じ培地上に検出される可能性の高い*Vibrio alginolyticus*と明確に区別できるプラ

イマーを設定したいと考えた。*Vibrio* 属で多く解析されている *toxRS* 遺伝子での塩基配列が似ている *V. parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ) と *V. alginolyticus* を比較検討し、両配列がそれぞれ特異的である配列を特定し、腸炎ビブリオ特異的である配列部分内でプライマーを設定した。このプライマーを使ったPCRにより、腸炎ビブリオ特異的な検出反応が可能になった。1,018 株の *Vibrio* 株について検討を行ったが、腸炎ビブリオ判定の誤判定は 1%以下であった。このことから、この新プライマーによる PCR 判定により、今後適用の仕方を検討することによって、迅速判定が可能になると考えられる。腸炎ビブリオの標準法については、従来の方方法で変更の要望の多い部分についての詳細検討を行って、改変を行った。その検討については、結果をホームページ上にステージ2の作業部会案として提案している。(2008年2月)

D. 考察

研究最終年度で、サルモネラ標準検査法が提案までこぎ着けたことは良かったと考えている。黄色ブドウ球菌もコラボが始まるまで進んでいる。腸炎ビブリオは要望された事項のゴールまではたどり着いていないが、近くまで検討は進んだと考えている。新しい検査法の策定に道筋をつけることができたと考えている。要望のあった、3菌種に関して、上記のように研究が行われてきた。今後も、別の微生物に対しても必要があれば、すぐに同様の検討を行えるシステムが確立したと考える。

昨年度も考察に“食品からの微生物検査標準法検討委員会”での議論・承認を得ないと進まない方針のため、検討結果がスムーズにいきてこない。また、議論参加者がきちんと毎回参加される委員と参加できない方とがあるので、前

回あるいは以前に済んだ議論も、議事録認証の会議上であるいは進んだステージ段階の議論において蒸し返しになり、全体として議論が進まないことがよくあった。これらをうまく避けて議事を進める方策が最終年度の今年度も見いだすことができなかった。この研究課題は今年度で終了するが、食品からの微生物検査法作成方針やシステムは国立医薬品食品衛生研究所に残り、機能を果たし、円滑な議事進行が行われることを期待したい。

E. 結論

掲げた研究目的の中で、サルモネラの食品からの検査法は標準検査法として提案できた。

黄色ブドウ球菌は直接塗抹法とMPNによる菌数計算方をコラボを行おうとして提案しているところである。

腸炎ビブリオは現行の試験法の詳細検討を行って、標準法としての提案を行っている。また、当初の目的であった、判定の円滑化への検討としては、腸炎ビブリオに特異性の高いプライマーの創製、そのプライマーを使用してPCRを行い、各ビブリオその他への特異性の検証および、判定短縮化の試みを行っているが、判定法として提出するまでには至っていない。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、田口真澄、久米田裕子、神吉政史、郡司明彦、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重、木股裕子、塚本定三：食品からのサルモネラ新検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのサルモネラ検出。日本食品微生物学会誌投稿中

宮原美知子、荒川英二：食品からの腸炎ビブリオ迅速検出法の検討。防菌防黴誌投稿予定

宮原美知子、宮原誠・塩漬け野菜保存での腸管出血性大腸菌 O157 の生残性。防菌防黴誌第 3 5 巻, No.12, 779-783 (2007)

Masashi Kanki, Junko Sakata, Masumi Taguchi, Yuko Kumeda, Masanori Ishibashi, Takao Kawai, Kentaro Kawatsu, Wataru Yamasaki, Kiyoshi Inoue, and Michiko Miyahara · Performance of PCR-based detection of Salmonella enterica in poultry meat at the broth pre-enrichment step. J. Food Protect., 投稿中

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 サルモネラ。防菌防黴誌、35, No.8, 527-535, (2007)

宮原美知子：サルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの食品における標準検査法の検討。日食微誌、25, No. 1, (2008)

宮原美知子：看護・介護における衛生管理 — 高齢者施設の食中毒実態 —。防菌防黴誌、35, No.11, 755-760 (2007).

藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信：市販食肉、健康人、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性。日食微誌、24 (2)、100-106 (2007).

清水 晃、市場智子、河野潤一、五十君静信：調理済み食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態。食衛誌、48 (5)、J341-344 (2007).

2. 学会発表

宮原美知子、露木映理子、宮原誠：食品中サルモネラと腸炎ビブリオの検査法と殺菌方法の検討

日本防菌防黴学会第 34 回年次大会、2007 年、8 月

宮原美知子：サルモネラ、黄色ブドウ球菌と腸炎ビブリオの食品における標準検査法の検討

第 28 回日本食品微生物学会学術総会、シンポジウム 2007 年 9 月

田口真澄、神吉政史、甲斐明美、石原ともえ、木股裕子、郡司明博、塚本定三、宮原美知子：食品中のサルモネラ検査標準法策定に向けての検討

第 28 回日本食品微生物学会学術総会、2007 年 9 月

宮原美知子、荒川英二：腸炎ビブリオの食品からの迅速検出法の検討。

第 41 回腸炎ビブリオシンポジウム、2007 年 11 月

Michiko Miyahara, Makoto Miyahara, Eiji Arakawa : Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR in food and effect of electron-beam irradiation on the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio* 2007, 2007 年 11 月

宮原美知子、田口真澄、神吉政史、甲斐明美、石原ともえ、木股裕子、郡司明博、塚本定三：食品中サルモネラ標準検査法の検討
日本薬学会第 128 年会、2008 年、3 月

内井香里、河野潤一、清水 晃、齋藤悦子：LAMP 法による黄色ブドウ球菌毒素 TSST-1 およびエンテロトキシン (SEA、SEB) 遺伝子の検出。

第 144 回日本獣医学会学術集会講演要旨集、p.103 (2007).

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

II-1 サルモネラ試験法

分担研究者 田口真澄

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

サルモネラ試験法

分担研究者 田口真澄 大阪府公衆衛生研究所 細菌部 主任研究員

分担研究者 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 食品中サルモネラの検出法に関して研究を行った。昨年度検討した少数菌数を接種した実験での検出感度、選択分離寒天平板での性能の検証などを基に6カ所での一斉検査を行った。食品検体に各自で精度管理用に作られた Easy QA ball *Salmonella* Typhimurium と Easy QA ball 大腸菌群 (*Enterobacter aerogenes*) を使用して、各自接種を行い、提案しているサルモネラ試験法通りに検出試験を行った。上記の菌種をそれぞれ5試料ずつ接種し、検出を行った。接種検体はスライスハムを使用した。結果はサルモネラ接種されたかどうかの一致率は1機関10試料、6機関での集計で98%であり、正答率は高かった。接種菌数は上記の製品を使用したことから、約3 cfu であることが確かであるので、少数サルモネラもしっかり検出できることが分かった。この結果を元にサルモネラ試験法のコラボ検討を行うことになった。また、硫化水素非産生サルモネラも検出可能である試験法であることから、接種菌株は硫化水素産生株および硫化水素非産生株の2菌種を用い、接種菌数も2段階に設定した。1群は6試料とし、サルモネラ非接種の対照群も含めて、1機関30試料での検討となった。選択分離寒天平板2種類の決定のために、ミスラ法と接種実験による検出感度の検討を行った。その結果、硫化水素産生により判定する寒天培地には、MLCB, DHL, BS と XLD を検討した中では、同等であると判断された MLCB, DHL と XLD の中から、MLCB を選択した。硫化水素産生によらず判定する選択分離寒天平板には BGS, CHS, ESII と SM2 が検討されたが、どれも同等と判定された中で、BGS を選定してコラボ実験を行うことになった。サルモネラの試験は定性判断であることから、有効な10機関以上での検討が必要であるとの標準法検討委員会での結論を受けて、公募を行った。多くの申し込みをいただいたが、準備の都合等により、14機関でコラボ研究を行った。その結果419/420のサルモネラ接種、非接種とO抗原の特定での一致率が419/420の結果で試験法が少数菌でも硫化水素産生、非産生にかかわらず検出できる検査法であることが明らかになった。WEB上に標準法案として公開した。

協力研究者

塚本定三 東邦微生物病研究所
神吉政史 大阪府公衆衛生研究所
木股裕子 神戸市保健環境研究所
甲斐明美 東京都健康安全研究センター
石原ともえ 神奈川県衛生研究所
郡司明博、

(財) 日本食品分析センター大阪支所
仲西寿男

(財) 日本食品分析センター大阪支所

A. 研究目的

本研究では、食中毒起因細菌の試験法がどのようにあるべきかを示し、その方針に沿ってサルモネラ試験法を検討することを目的としている。

サルモネラ検査法は、平成5年食品衛生法の食品、添加物等の規格基準、食肉製品中の成分規格サルモネラの検査法はEEM培地前増菌から、セレンナイトシスチン、セレンナイトプリリアントグリニ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又あるいはDHL培地への塗抹などにより検出することになっている。EEM前増菌培地が国外的には使われなくなっていることがある。また、セレンおよびその関連化合物は化学物質管理促進法では毒性があるので管理すべきとして指定され、排出量の管理が必要となっている。そのため、世界的にみてもサルモネラの検査法から、セレン化合物は排除されるようになってきている。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、添加剤を加えたBPW培地の前増菌から、RVとTT培地での選択培養、そして2種類の選択分離培地への塗抹での検査を通知している。

国内外の状況では統一的な検査法は設定され

ていない現状であるが、日本で液卵と食中毒菌汚染実態調査で使われている方法とISOの方法を参考にすれば、BPWによる前増菌後のRVおよびTTでの選択増菌が妥当であると考えられた。そこで、サルモネラ試験法案を提案して、作業班での詳細検討を行い、小規模な一斉試験検討を行って、コラボ検討への条件設定を行って、コラボ研究を行った後に、試験法を最終案として提案することを目的とした。

B. 実験方法

1. 分離寒天平板の選択

寒天培地の性能比較を行うために、次の2つの方法を用いた。ミスラ法（サルモネラの増殖が充分であるかどうかを検討する方法）と接種実験による検出感度比較の実験によって結果を評価した。サルモネラを硫化水素産生により判定する寒天培地として比較的日本で汎用されている培地として、MLCB, DHL, XLDとBismussulfite (BS)を選んだ。また、硫化水素産生によらずサルモネラを判定する寒天培地として、BGS (BGA+Sulfapyridine), CHS (CHROMagar Salmonella), ESII (ESサルモネラII)とSM2 (chromID Salmonella)を選択した。ミスラ法では、*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis* および硫化水素非産生の *S. Senftenberg* の4種類のサルモネラで増殖能力を検討した。保存株より、TSBに接種し、一晚培養を行った菌液を1シャーレを7分画して、10倍階段希釈を行って、各分画に50μlずつマイクロピペットで滴下して、培養を行った。接種実験の比較は、サルモネラが検出されなかった鶏挽肉に *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* および *S. Infantis* の3血清型を接種して検討した。提案した検査法を使って、各培地からサルモネラと疑われた集落を釣菌する

ことにより、サルモネラの判定を行い、サルモネラ検出率を算定した。また、サルモネラと疑われる見かけによる判断も行った。

サルモネラ試験法コロバ試験の予備実験として、6機関での各自接種によるサルモネラ試験法を検討した。食品検体に各自で精度管理用に作られた Easy QA ball *Salmonella* Typhimurium と Easy QA ball 大腸菌群 (*Enterobacter aerogenes*) を使用して、各自接種を行い、提案しているサルモネラ試験法通りに検出試験を行った。上記製品は、1バイアルあたり、30 cfu が入っている。滅菌水 1ml を加え混和後に、その 0.1 ml を 25g 細切スライスハム入りストマッカー一袋に接種を行った。接種菌数はほぼ 3cfu であった。各バイアルは 1 試料にのみ対応して接種を行ってもらった。試験者には接種したものがどちらの菌液であるか接種段階では不明であるように実験を行った。接種検体はスライスハムを使用した。分離寒天平板培地は硫化水素産生により判定する培地として、MLCB と XLD、硫化水素産生によらず判定する培地として、CHS と BGS を使用して評価した。上記菌株の 3 cfu をサルモネラ接種 5 試料と大腸菌群接種 5 試料によって、提案しているサルモネラ試験法によって、サルモネラ検出試験を行った。また、BPW 前増菌後には PCR での検討も行った。なお、この *S. Typhimurium* は硫化水素を産生する。(資料 1 一斉検査実験手順書を参照)

サルモネラコロバ実験を行った。コロバを行うと学会やホームページ上で公開したところ、応募者が集まり、すべての応募者に行ってもらえなかったが、14 機関でのコロバ研究を行った。食品検体はサルモネラ予備検査でサルモネラが検出されなかった豚挽肉を使用した。また、硫化水素非産生サルモネラも検出可能である試験

法であることから、接種菌株は硫化水素産生株 *S. Typhimurium* (O4) および硫化水素非産生株 *S. Senftenberg* (O1, 3, 19) の 2 菌種を用い、接種菌数も 2 段階に設定した。1-10 cfu とその 10 倍濃度を接種菌数とした。1 群は 6 試料とし、サルモネラ非接種の対照群も含めて、1 機関 30 試料での検討となった。分離寒天平板培地は硫化水素産生により判定する培地として MLCB、硫化水素産生によらず判定する培地として BGS を使用した。検体は温度ロガー付きでチルドで一斉に輸送した。ただし、2カ所については翌々日到着となったが、1 2カ所については翌日に検体が到着し、発送翌日に検査が開始された。到着が遅れた機関でも、到着後直ちに検査が開始された。温度ロガーは培養時にも検体と一緒に温度をモニターした。サルモネラの確認は TSI、LIM さらに LIM にインドール試薬を加え、その反応を確認するとともに、サルモネラと疑われた集落については TSI 斜面より集落を採取し、O 型血清の確認を行って、サルモネラの確認とした。検査終了後、検査結果を各試料毎、各培地毎にサルモネラの検出集落数 (例えば、3 個までサルモネラと疑われる集落があれば、サルモネラ O4 検出が 3 個であれば、3/3, O4) などの様に記載を行った。結果はメールで集計し、温度ロガーは郵送で返却をお願いした。温度ロガーの解析は、コロバ担当者が分析を行った。(資料 2 コロバ実験用実験手順書および資料 3 WEB 上に掲載されたコロバ実施案参照)

C. 研究結果

ミスラ法での増殖能力の検討を検討した結果、表 1 に示した結果を得た。どの検出分離寒天平板においても 10^6 あるいは 10^7 希釈において集落の形成が認められた。ただし、1 つだけ例外

の培地があった。BS 培地であるが、24 時間培養においては集落がほとんど見られず、24 時間培養での増殖は他の培地と比較して不良であった。*S. Typhimurium* 滴下の場合のみ、他の培地と同様に 10^6 あるいは 10^7 希釈において集落が形成されて、同様の増殖力を示した。

接種実験における検出力についての実験では、表 2 に示すような結果が得られた。接種菌株はすべて硫化水素産生菌株を使用して比較したところ、硫化水素産生による検出培地では、両選択培地から 50% 以上の検出率で集落を検出できた培地は MLCB のみであった。両選択培地からの検出バランスは他の 3 種の寒天培地ではうまくとれていないことが分かった。また、菌種によって RV または TT から塗抹検出が可能であるときと不可能であるときもあることも分かった。たった 3 菌種でもこのような違いが見られ、たくさん検出できたように思われる肉眼的判断でも、サルモネラでなかったと判明した培地ではサルモネラ検出効率は良くないと考えられる。硫化水素の産生によらず検出する培地では、硫化水素産生による培地よりも一般的には検出率が上がった。また、どちらの選択培地からの塗抹でもサルモネラを検出できなかった例はこの実験例では皆無であった。提案した試験法のように、2 種類の選択培地 RV と TT から 2 種類の分寒天平板培地に塗抹し、各シャーレに 3 個集落を採取することにより、全体での検出ミスは避けられると考えている。また、2 種類の分離平板検出培地を使用することによって、硫化水素産生については最初から判定しやすいと思われる。

一斉検査について、表 3 の結果が得られた。1 機関 10 試料での各自接種の実験によって、98% の一致した結果を得た。なお、サルモネラ接種された 30 試料中 1 試料のみサルモネラが

検出されなかった結果が得られた。大腸菌群接種 30 試料においてはすべてサルモネラ陰性と判定された。BPW 培養後の PCR での結果は塗抹・培養後に得られたサルモネラ検出結果と同じであった。この一致率は 100% であった。

この一斉検査の結果を受け、コラボ実験が計画された。食品検体としては、サルモネラ以外の雑菌があるものが検討され、接種サルモネラとしては硫化水素産生性と非産生性の 2 種類を選定し、2 段階の接種菌量と非接種群の対照群の計 5 群、1 群 6 試料で評価することが決まった。硫化水素産生により判定する分離寒天平板培地として、MLCB を、硫化水素産生によらずサルモネラと判定する分離寒天平板培地に BGS が選定された。

参加機関 14 機関は表 4 に示した。この結果については表 5 に結果のまとめを示した。420 試料を 1 機関に 30 試料ずつ配布し、試験した結果、419/420 試料について、接種通りの検出結果を回収した。結果の接種と一致しなかった 1 試料については硫化水素産生性 *S.*

Typhimurium の少数菌接種群の 1 試料であった。資料 4 に実験条件の詳細を示した。あらかじめサルモネラ試験法を何度も行い、サルモネラの検出されない豚挽肉を確認して、コラボ実験の食品検体としたが、ランダムに選んだ 6 試料での平均生菌数は 5.4×10^5 cfu/g であった。また、硫化水素産生菌株 *S. Typhimurium* (O4) 接種低菌数は 4.9 cfu で、高菌数は 36.6 cfu であった。硫化水素非産生 *S. Senftenberg* (O1, 3, 19) 接種低菌数は 5.6 cfu で、高菌数は 55.7 cfu であった。血清型についても検出結果を提出していただき、接種菌通りの血清型が報告された。

D. 考察

サルモネラの検出分離寒天培地に関しては、

試験者の使用経験等による熟練度にも影響されることでもあるが、ミスラ法および接種実験による検出感度の比較を検討した。その結果、硫化水素産生により判定する寒天培地では4種類について検討し、24時間培養では判定が難しいBSを除けば、MLCB, DHLとXLDは判定に使えると結論を出した。また、硫化水素によらずサルモネラと判定する培地としては、BGS, VHS, ESIIとSM2が検討されたが、硫化水素産生によらず検出する培地では、硫化水素産生により判定する培地に比して検出率が高く、サルモネラ判定は容易であることが窺えた。また、検討したどの場培地もほぼ同等の検出力を有していた。しかし、現実的には定型的なサルモネラとしては硫化水素産生が98-99%であり、今までは硫化水素産生により判定する検出分離寒天培地中心で、判定に対しても多くの試験者の熟練度は高い。上記2種類の分離検出寒天培地による最終的なサルモネラ検出が行われることで高いサルモネラ検出感度が保証できると考える。

6機関で行った一斉検査においても3個のサルモネラが98%検出率で検出された。同時に検討したBPW培養後のPCRの結果より、寒天平板からのサルモネラ検出の最終結果はBPW培養後のPCRでのサルモネラ検出結果と同じで一致していた。1資料、サルモネラ3個接種し、検出されるはずのものが、検出されなかったが、BPW前増菌後のPCR検査でサルモネラが検出されていないことから、サルモネラの接種ミスが考えやすい。このことはさらに、サルモネラ試験の迅速判定を考える上では、BPW増菌後のPCRでの判定を行うことにより、迅速判定が可能であると推測できる。

14機関で行われたコラボ研究において、雑菌の多い豚挽肉を食品検体にして行われたが、

419/420の一致率で、サルモネラの接種、非接種、接種されたO抗原型までの結果が一致していた。このサルモネラ試験法は一斉検査での生菌数の少ない食肉製品ばかりでなく、生菌数の多い生の食肉の試験法としても有効であることが確認された。サルモネラの接種されたはずの1資料が非接種と判定されたが、試験ミスあるいは接種菌数は低菌数で平均4.9個/1資料であるので接種ミスとも考えられる。このサルモネラ試験法としては、99.8%の検出精度が得られたと認識している。

このサルモネラ試験法は前年度までの検討により、液卵（全液卵、白身液）の検査にも、食肉製品各種にも検討を行い、良好な結果を得ていることから、今回の生の食肉でも良好であるので、多くの食品に適用できるサルモネラの試験法として提案できると考えている。

E. 結論

食品からのサルモネラ試験法を資料5として示したように提案する。なお、この試験法は1998年11月に通知された液卵の試験法もこのサルモネラ試験法に置き換えることを提案したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

宮原美知子、田口真澄、久米田裕子、神吉政史、郡司明彦、森田友美、太田順司、高山正彦、高須一重、木股裕子、塚本定三：食品からのサルモネラ新検出法の検討と鶏挽肉および未殺菌液卵でのサルモネラ検出。日本食品微生物学会誌投稿中

Masashi Kanki, Junko Sakata, Masumi Taguchi, Yuko Kumeda, Masanori Ishibashi, Takao Kawai, Kentaro Kawatsu, Wataru

Yamasaki, Kiyoshi Inoue, and Michiko Miyahara · Performance of PCR-based detection of Salmonella enterica in poultry meat at the broth preenrichment step. J. Food Protect., 投稿中

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 サルモネラ：防菌防黴誌、**35**, No.8, 527-535, (2007)

2. 学会発表

宮原美知子、露木映理子、宮原誠：食品中サルモネラと腸炎ビブリオの検査法と殺菌方法の検討

日本防菌防黴学会第34回年次大会、2007年、8月

田口真澄、神吉政史、甲斐明美、石原ともえ、木股裕子、郡司明博、塚本定三、宮原美知子：食品中のサルモネラ検査標準法策定に向けての検討

第28回日本食品微生物学会学術総会、2007年9月

宮原美知子、田口真澄、神吉政史、甲斐明美、石原ともえ、木股裕子、郡司明博、塚本定三：食品中サルモネラ標準検査法の検討

日本薬学会第128年会、2008年、3月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
特になし

表1 ミスラ法での平板培地の増殖力比較

NC:集落無し

		DHL	MLCB	XLD	BS	CHS	ES II	BGS	SM2
S. Typhimurium									
希	10 ⁻¹	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
釈	10 ⁻²	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻³	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁴	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁵	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁶	87	72	69	47	25	71	67	52
	10 ⁻⁷	26	26	16	1	5	8	3	11
S. Enteritidis									
希	10 ⁻¹	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
釈	10 ⁻²	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻³	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁴	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁵	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁶	83	71	38	NC	51	62	77	61
	10 ⁻⁷	9	11	10	NC	6	9	8	4
S. Infantis									
希	10 ⁻¹	多数	多数	多数	3	多数	多数	多数	多数
釈	10 ⁻²	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻³	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁴	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁵	64	多数	多数	NC	96	多数	多数	多数
	10 ⁻⁶	4	64	24	NC	18	57	55	68
	10 ⁻⁷	NC	6	3	NC	7	19	8	23
S. Senftenberg (H₂S非産生性)									
希	10 ⁻¹	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数	多数
釈	10 ⁻²	多数	多数	多数	9	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻³	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁴	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁵	多数	多数	多数	NC	多数	多数	多数	多数
	10 ⁻⁶	83	85	80	NC	63	86	75	84
	10 ⁻⁷	11	11	18	NC	6	7	9	4

表2 接種実験による培地の検出感度比較

H₂S産生株検出培地

		1	2	3
DHL	RV	67	17	0
	TT	0	0	0
MLCB	RV	50	83	100
	TT	50	83	83
XLD	RV	83	83	0
	TT	0	67	33
BS	RV	67	83	83
	TT	17	0	67

H₂S産生・H₂S非産生株検出培地

		1	2	3
CHS	RV	67	100	100
	TT	50	100	83
ES II	RV	100	83	100
	TT	100	100	67
BGS	RV	33	100	83
	TT	50	33	83
SM2	RV	17	83	83
	TT	67	83	83

肉眼的判断

—
+
++
+++

数字は検出率(%)

- 1 : 接種菌 (S. Typhimurium) 接種菌数 3 cfu
- 2 : 接種菌 (S. Enteritidis) 接種菌数 1.6 cfu
- 3 : 接種菌 (S. Infantis) 接種菌数 140 cfu

表3 サルモネラ検討成績

2007. 7. 27

検体番号	PCR	RV-H2S検出		RV-nonH2S		TT-H2S検出		TT-nonH2S		サルモネラ添加
1	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
2	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
3	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
4	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	2/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
5	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	2/3	BGS	3/3	
6	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
7	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
8	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
9	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
10	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
11	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
12	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
13	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
14	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
15	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
16	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
17	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
18	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
19	-	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
20	-	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
21	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
22	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
23	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
24	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
25	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
26	+	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	2/2	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
27	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
28	-	MLCB	—	CHS	—	MLCB	—	CHS	—	-
		XLD	—	BGS	—	XLD	—	BGS	—	
29	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
30	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	-
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	

検体番号	PCR	RV-H2S検出		RV-nonH2S		TT-H2S検出		TT-nonH2S		サルモネラ添加
31	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
32	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
33	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
34	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
35	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
36	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
37	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
38	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
39	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
40	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
41	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
42	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
43	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
44	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
45	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
46	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
47	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
48	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
49	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
50	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
51	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
52	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
53	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
54	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
55	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
56	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
57	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	
58	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
59	-	MLCB	-	CHS	-	MLCB	-	CHS	-	-
		XLD	-	BGS	-	XLD	-	BGS	-	
60	+	MLCB	3/3	CHS	3/3	MLCB	3/3	CHS	3/3	
		XLD	3/3	BGS	3/3	XLD	3/3	BGS	3/3	

- : 対象集落なし

表 4. コラボ試験協力機関

1	(財)日本食品分析センター大阪支所
2	神戸市環境保健研究所
3	神奈川県衛生研究所
4	東京都健康安全研究センター
5	北海道衛生研究所
6	札幌市衛生研究所
7	ニッポンハム 中央研究所
8	キリンホールディングス(株) 技術戦略部 フロンティア技術研究所 食品安全科学センター
9	兵庫県立健康環境科学研究所
10	(財)東京顕微鏡院
11	財団法人 食品分析開発センター-SUNATEC
12	財団法人 広島県環境保健協会 環境生活センター 微生物課
13	社団法人 日本海事検定協会 食品衛生分析センター 食品衛生チーム
14	財団法人 日本冷凍食品検査協会 関西事業所試験センター