

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17年度～19年度 総合研究報告書

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、 塚本 定三

資料1-5

資料6 サルモネラ試験法 案

2. 黄色ブドウ球菌試験法

清水 晃、 河野 潤一、 五十君 静信

3. 腸炎ビブリオ試験法

甲斐 明美、 荒川 英二

表1-15

図1, 2

資料1-4

4. 食品からの微生物検査標準法検討委員会

高鳥 浩介、 五十君 静信

表1, 2

資料1

公開されている試験法中 5 試験法

黄色ブドウ球菌コラボスタディー実行案 (直接平板培養法)

黄色ブドウ球菌コラボスタディー実行案 (MPN法による菌数測定法)

腸炎ビブリオ試験法・定性法

腸炎ビブリオ試験法・定量法

カンピロバクター (ジェジュニ/コリ) の試験法

ホームページ上で載せるのが遅れているが、既に検討委員会承認済みの

サルモネラ試験法最終公開案 (コラボ終了)

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

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。国立医薬品食品衛生研究所のホームページは、食品の項目詳細はこちらをクリック、各部の食品関連情報項目から食品からの微生物検査標準法検討委員会をクリック、そこに委員会で検討してきた項目が表示される仕組みを作ってきた。当初18名の委員会メンバーであったが、現在では24名のメンバーによって討議がなされている。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。サルモネラは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。諸外国検査法とかけ離れていない、そして効率の良い検査法となったと確信している。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。予備実験や作業班での検討では、卵黄加マンニット食塩培地と卵黄加 Baird-Parker 培地の性能差は損傷菌接種では検出率に多少の差はあったが著しくはなく、同等に用いられるとの結果であったので、この両培地を用いてのコラボ実験となる予定である。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。定量法における乳剤にはじめからアルカリペプトン水を用いるようにすること、培養時間や培養温度について現行法で不便な部分について修正等を行った。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ての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。

平成 17-18 年度

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

平成 19 年度

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 主任研究官

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、検査法の議牛津工場のため、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、2,000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の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。また、委員会もオブザーバー参加を募集し、公開とした。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し、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。確認された検査法は標準法として提案される。

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、初年度は国内での検査法、諸外国の検査法を参考にして、日本で標準法として評価に耐える検査法案を作業部会として提案した。また、その検査法とした場合に問題となる点に関して、作業班で実験を行い、結果を検討した。次年度は、その検査法を使った汚染実態についての調査を行い、使い勝手等を検討した。また、補助データとして、前培養後のBPW培養液でPCRを行い、最終集落検出による未殺菌液卵であった。これらの実態調査は0.3 cfu/g以下のサルモネラでも検出できることが確認された。鶏挽肉では前培養でのPCR検出結果と集落確認にいたる培養法での結果との一致率は70%弱の一致率であったが、液卵検体では100%の一致率が得られ、前培養後のPCR検査は培養の最終結果を確実に予測できることが分かった。提案したサルモネラ検査法は、10年ほど前から、BPW前増菌にRVとTTの選択培養で2種類の分離寒天平板培地での分離検出とのサルモネラ検出法としては、すでに使われてきている検査法であることから、検出限界の検討、あるいは硫化水素産生菌接種と硫化水素非産生菌種での接種実験、対象食肉製品での接種実験等の基礎実験データは必要ないと当初考えていたが、基礎データを積み上げることにした。

10年来行われてきている食中毒菌汚染実態調査で用いている方法と類似の方法であるが、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られる。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、卵黄加マンニット食塩培地と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。1,092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約1%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ところまで進んでいる。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による菌数計算法をコラボとして行おうと提案しているところである。

腸炎ビブリオに関しては、現行の試験法を詳細に検討し直して、標準法として提出し直す段階にとどまっている。当初の目的である迅速判定への試みは腸炎ビブリオの特異性の高いプライマーを開発し、判定方法について検討を試みている段階であり、まだ、

F. 研究発表

1. 論文発表

○ Michiko Miyahara: Simultaneous enrichment Detection Method for

- Four Types of Pathogenic Bacteria in Food. *Biocontrol Science*, (2005), 10, 91-96.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Uji, T. and Kitagawa, H. (2005): Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 67(1), 107-110.
- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. and Inamoto, T. (2005): Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 67(3), 269-274.
- Fukuda S, Tatsumi H, Igimi S, Yamamoto S. 2005. Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken meat samples. *Letters in Applied Microbiology*. 41:379-384.
- Terai S, Yamasaki M, Igimi S, Amano F. 2005. Expression of SEp22, a pathogenicity - related protein of *Salmonella* Dps, in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from the poultry farms in Japan. *Bioscience and Microflora*. 24:113-118.
- Asakura H, Igimi S, Kawamoto K, Yamamoto S, Makino S. 2005. Role of in vivo passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 253, 243-249.
- T. HASEGAWA, Y. YOSHIDA, J. KOSUGE, T. HAGA, Y. GOTO, T. SHINJO, K. UCHIDA, R. YAMAGUCHI, S. TAKEYAMA, O. K. TAKATORI: Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. *The Veterinary Record*, (2005), 156, 23-24.
- 小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖: 東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオ検出と分離菌株の諸性状, *日食微誌*, 22: 138-147, 2005.
- 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.
- 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.* 9, 869-879 (2007)

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.

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

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。防菌防黴誌投稿中

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 35 卷, 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 (2006): 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(2005): 市販鶏挽肉でのサルモネラとリステリアの検出検討

第 26 回日本食品微生物学会学術総会 平成 17 年 11 月

中野千紗、清水 晃、河野潤一、北川 浩、松村浩介、藤尾公輔、北井 智 (2005): 人・家畜・家禽の鼻腔におけるエンテロトキシン (SE) 産生黄色ブドウ球菌及び MRSA の保菌状況と分離株の性状解析、第 140 回日本獣医学会学術集会講演要旨集、p. 141

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 O157 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.

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

塚本 定三

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）

総合分担研究報告書

サルモネラ試験法

分担研究者（H19年度） 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

分担研究者（H17-18年度） 塚本定三 大阪府公衆衛生研究所 細菌部 細菌課長
現 東邦微生物病研究所

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。H17年度において国内の検査法、諸外国の検査法を検討し、その違いと特徴について検討を行った。H18年度においてはその中から、我が国で今後続けるべき検査法を作業班として検討し、新しい検査案を作成した。また、その検査法案による、汚染実態調査も行った。検査法案に沿って詳細条件について問題点を検討した。H18年度には少数菌数を接種した実験を行い、検出感度や、我が国の従来法との比較研究等を行った。H19年度には選択分離寒天平板での性能の検証を行い、新検査法でのハムを食品検体とした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。選択分離寒天平板2種類の比較検討のために、ミスラ法と接種実験による検出感度の検討を行った。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、検出時間の長い BS を除いて同等であると判断された。硫化水素産生によらず判定する寒天培地には BGS, CHS, ESII そして SM2 での比較検討を行った。どの寒天培地もサルモネラを良好に検出し、同等と検証された。検出感度の観点から、検出率は硫化水素産生によらず判定する寒天分離培地の方が検出率としては良好であった。これら2種類の寒天培地から、MLCB と BGS を選択してコラボ実験に使用することにした。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。接種菌数は1資料1-10個の低菌数接種群と10-100個の高菌数接種群とした。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。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する。

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

協力研究者

(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

塚本定三 東邦微生物病研究所

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、セテナイトシスチン、セテ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、セテナイト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. 国内外のサルモネラ検査法の比較検討

現在使われている国内の方法と国外の検査法について詳細に検討した。

2. 選択培養時の培養温度の検討

選択培養温度については培養温度と、使用する機器について検討を行った。培養温度は41.5-43℃で、使用機器については恒温水槽と恒温槽(気相)での検討を行った。分離寒天培地としてはXLDを使用した。また、前増菌後のPCRも行い、PCR検出についても検討を行った。

3. RVとTTの選択制については厚労省で10年来行ってきた、食品の食中毒菌汚染実態調査結果を解析することにした。

4. 1-3の検討結果妥当と思われるサルモネラ検査法を提案した。以下の検討はその新検査法により比較実験等を行った。

1) Easy QA ボール(硫化水素産生サルモネラ)使用による接種実験

検体食品はスライスハムを使用した。菌数を

かえて、検出感度を検討した。

2) Easy QA ボールによる食肉製品への接種検討。

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）であるポークウィンナーやベーコンについて接種実験を行った。

3) 硫化水素非産生サルモネラの接種実験

大阪で分離された硫化水素非産生のサルモネラを使って、食肉製品と冷凍鶏肉ミンチへの接種実験を行った。また、前増菌後のPCR検出についても検討を行った。寒天培地としては、DHLあるいはMLCBとCHS（クロモアガールサルモネラ）を使用した。

4) 前増菌培地BPWとEEMによる増菌の比較検討

EEM増菌、SC選択培養、MLCB分離検出寒天培地の系とBPW増菌、RVとTT選択増菌にMLCB、CHSとX-Sal（硫化水素産生あるいは非産生株でも、どちらであるかを判定でき、サルモネラとして検出できる培地）を使って検討を行った。食品検体としては、冷凍自然サルモネラ汚染鶏挽肉と接種検体も冷凍鶏挽肉を使用した。前増菌後のPCR検出も検討した。

5) 各地鶏挽肉でのサルモネラ検出実験

東京1機関と大阪2機関により、市販鶏挽肉を購入して、サルモネラの検出実験を行った。70検体の検討を行った。MPN法を併用して、検出サルモネラの菌数を検討した。前増菌後のPCR検出についても検討を行った。

6) 冷凍未殺菌液卵（各地）でのサルモネラ検出実験

20カ所で採取された未殺菌液卵を使って、3機関でのサルモネラの検出実験を行った。20の未殺菌液卵で検討を行った。MPN法を併用し

て、検出サルモネラの菌数を検討した。前増菌後のPCR検出についても検討を行った。

7) 白身卵液での接種菌の検出実験

現在の未殺菌液卵に対する検査法では、 $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ あるいはシステインのBPWへの添加が必要とされている。この必要性の再点検のために、鉄分が少ないとされ、システインに関してはやや多めではあるが、卵黄や全卵と比べて多すぎない含量であるとされる白身液を使って、サルモネラの接種・検出実験を行った（資料1参照）。新方法では、システインも鉄分もBPW増菌液に添加しないまま使用して、検出を検討した。接種菌数は25g白身液あたり、3個と設定した。（Easy QA ボール使用）前増菌後のPCR検出についても検討を行った。

8) 鶏、豚と牛挽肉でのサルモネラ検出実験

鶏、豚と牛挽肉から自然汚染サルモネラの検出実験を行った。前増菌後のPCR検出についても検討を行った。

9) 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Bismusulfite (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。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。

9) コラボ試験の予備実験

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。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。食品検体として、スライスハムを用いた。

4. サルモネラコラボ実験

コラボ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機関でのコラボ研究を行った。食品検体はサルモネラ以外の雑菌があるものが検討され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、12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、コラボ担当者が分析を行った。

3. サルモネラ試験法の提出

コラボの結果により判断し、サルモネラ試験法としての判断を行い、ホームページへの掲載を行う。

C. 研究結果

サルモネラ試験法についての比較検討した結果については資料2に示した。

培養温度に関しては検討結果を資料3に示し

た。大きな違いは見られなかったが、この検討の結果では、42℃での incubator (恒温槽、気相) での培養で充分であることが分かった。恒温水槽の場合が必ずしも良い結果とはならなかった。

H17年度の食品の食中毒菌汚染実態調査結果結果について 2223 検体中、サルモネラの検出された 58 検体に関して解析を行っている。RV と TT の選択培養に関して、資料 4 に示したように、サルモネラを検出した液体培地としては、H17年度データの解析では RV と TT の両培地から検出されたものが 66.7%であり、RV で検出したのが 87.5%で、TT のみで検出したのが 12.5%であった。

QA ボールを使用した接種実験から 3 個でほとんど確実に検出できることが分かった。結論的には、1 個でもサルモネラが試料中に含まれば、検出可能であることが分かった。食品検体の種類を選ばず、生挽肉、冷凍挽肉、食肉製品各種、白身液卵のすべてにおいて検出可能であった。(詳しいデータについては、H18 と H19 年度報告書のサルモネラのデータを参照のこと。) また、自然汚染の鶏挽肉においては、EEM より BPW 前増菌を用いた系で検出すると検出率が BPW 増菌で高かった。白身液卵でも BPW に添加物を加えない状態での培養にて、少数サルモネラを検出することができた。また、汚染実態調査によれば、鶏挽肉では、40/70 の 57%でサルモネラが検出された。未殺菌液卵では、8/20 の 40%の検出率であった。MPN 法による鶏挽肉で MPN 0.3>/g が 21/40 で主であり、検出された血清型は主に *S. Infantis* であった。未殺菌液卵における検出菌数は最高に多いもので MPN 750/g であり、MPN 菌数が鶏挽肉に比べて高い菌数が検出された。検出された血清型は *S. Enteritidis* が主

であった。

寒天平板に関してミスラ法での増殖能力の検討を検討した結果、硫化水素産生で判定する培地で、BS 培地は 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。このことから、あとの検討した MLCB, DHL と XLD に関しては、サルモネラの検出増殖力に関して同等と判定し、検出に使用することとした。硫化水素産生で判定しない培地に関して、検討した BGS, CHS, ESII と SM2 に関しては、検出増殖力ともに同等であると判定した。この 4 種類の培地に関してどれを選んででも使用可能であると判断した。(詳しいデータに関しては、H19 年度のサルモネラの報告書を参照のこと)

6 機関による一斉検出検討実験も良好に終了し、コラボ実験が計画された。

コラボ実験も 14 機関の参加で、30 資料ずつ、計 420 資料もの判定結果で、419/420 において接種したものと一致した検出結果が報告された(資料 5 参照)。99.7%で一致率であった。この一致は O 型抗原まで一致した検出であり、ほとんど完璧な検出結果が得られた。

前増菌後の PCR でのサルモネラ検出に関しては鶏挽肉実態調査にて培養結果との一致率が 48/70 (69%) であった。未殺菌液卵での結果は 20/20 (100%)であり、その他の食肉製品への接種や、接種実験では PCR での結果は最終培養での判定と 100%一致していた。これらのことから、生肉関連では、BPW 前増菌後の PCR 判定は必ずしも正しい判定となつてはいなかったが、その他の食肉製品等においては正しいサルモネラの検出結果を示すことができた。今後、どのような食品検体で BPW での前増菌後の PCR 判定が正しい培養結果を示す可能性が高いのかをさらに検討することによって、PCR で

の判定を有効に活用できると考えている。更なる検討が必要であると考え。

D. 考察

以上の結果より、提案した試験法はサルモネラの食品からの、食品の種類をあまり選ばずに検出できる試験法として提案できると考えている。少数菌サルモネラも検出でき、生肉（鶏、豚、牛）、これらの冷凍肉でも良好に検出可能であり、未殺菌液卵、白身液、食肉製品にも良好な検査結果を得ることができる試験法である。液卵に対してのサルモネラ試験法も、今回の試験法に換えることが検査の効率化にもつながると考えている。以上のことより、食品からのサルモネラの標準試験法として研究報告する。ホームページ上には早期に最終段階として掲載する予定である。提案試験法は資料6に示した。

E. 結論

食品からのサルモネラの標準試験法を研究報告として公表できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michiko Miyahara: Simultaneous Enrichment Detection Method for Four Types of Pathogenic Bacteria in Food.

Biocontrol Science, 2005, 10, 91-96.

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

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：市販鶏挽肉でのサルモネラとリステリアの検出検討

第26回日本食品微生物学会学術総会 平成17年11月

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 O157 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

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

資料 1

たまご博物館 栄養学コーナー たまごの栄養価

<http://homepage3.nifty.com/takakis2/eivou.htm> より

主な成分	単位	全卵(100g)	卵黄(100g)	卵白(100g)
エネルギー	kcal	162	363	48
水分	%	74.7	—	—
たんぱく質	g	12.3	15.3	10.4
脂質	g	11.2	31.2	—
糖質	g	0.9	0.8	0.9
炭水化物	g	0.9	1.7	0.7
カルシウム	mg	55	140	9
リン	mg	200	520	11
鉄分	mg	1.8	4.6	0.1
ナトリウム	mg	130	40	180
カリウム	mg	120	95	140
マグネシウム	mg	10	10	10
亜鉛	mg	1.4	3.9	0.02
ビタミンA効力	IU	640	1800	0
ビタミンB1	mg	0.08	0.23	0.01
ビタミンB2	mg	0.48	0.47	0.48
ビタミンD	IU	10	30	0
ビタミンE	mg	1.1	3.2	0
ビタミンK	μg	12.0	32.0	1.0
ナイアシン	mg	0.1	—	0.1