

含まれるアミノ酸の種類と機能

名称	区分 (*1)	機能
分岐鎖アミノ酸(BCAA) (イソロイシン、ロイシン、バリン)	○	・筋タンパク分解抑制 ・肝保護 ・インスリン分泌促進 ・糖尿病改善
スレオニン	○	・胃炎改善 ・筋緊張亢進の抑制
メチオニン	○	・肝保護 ・成長ホルモン分泌促進 ・腎炎改善 ・動脈硬化抑制
フェニルアラニン	○	・抗うつ作用 ・発がん抑制
トリプトファン	○	・催眠導入効果 ・鎮痛作用 ・抗うつ作用
リジン	○	・糖尿病性白内障予防 ・骨粗しょう症予防
ヒスチジン	○	・亜鉛不足による記憶障害の改善 ・抗うつ作用
アルギニン	◎	・筋肉増強作用 ・成長ホルモン分泌促進 ・動脈硬化予防 ・高血圧抑制 ・インスリン分泌抑制 ・肝保護 ・糖尿病での脂質過酸化抑制 ・腸管保護 ・免疫増強 ・心機能改善 ・血管拡張 ・高脂血症患者の血流改善
グリシン	△	・アルコール性肝障害抑制 ・抗潰瘍作用
アラニン	△	・肝保護 ・下痢時の症状緩和
セリン	△	・胃酸分泌抑制 ・胃粘膜保護
アスパラギン	△	・運動持久力向上 ・インスリン分泌促進 ・運動機能向上 ・脳のグルタミン増加作用 ・成長ホルモン分泌促進
グルタミン	△	・腸管保護 ・免疫増強 ・抗うつ作用 ・筋タンパク分解抑制 ・胃粘膜保護 ・成長ホルモン分泌抑制 ・記憶障害改善
システイン	△	・胃粘膜保護 ・皮膚保護 ・美白作用

アミノ酸		全卵(100g)	卵黄(100g)	卵白(100g)
イソロイシン	Ile	340	330	350
ロイシン	Leu	550	540	560
リジン	Lys	450	470	430
メチオニン	Met	210	160	250
シスチン	Cys	160	130	200
フェニルアラニン	Phe	320	260	380
チロシン	Tyr	260	260	250
スレオニン	Thr	290	300	280
トリプトファン	Trp	94	90	98
バリン	Val	420	380	460
ヒスチジン	His	160	160	160
アルギニン	Arg	400	440	370
アラニン	Ala	360	320	390
アスパラギン酸	Asp	640	590	670
グルタミン酸	Glu	800	730	850
グリシン	Gly	210	190	230
プロリン	Pro	240	250	230
セリン	Ser	430	450	410

	・糖尿病改善
プロリン	△ ・肝細胞増殖因子 ・皮膚の天然保湿因子
チロシン	△ ・交感神経の活性化 ・ストレスの軽減
アスパラギン酸	△ ・肝保護 ・エネルギー源
	・腸管保護 ・免疫増強 ・抗うつ作用
グルタミン酸	△ ・筋タンパク分解抑制 ・胃粘膜保護
	・成長ホルモン分泌抑制 ・記憶障害改善

資料2 サルモネラの検査法比較

適用国	日本	日本	日本	米国	米国	カナダ	ISO	
適用項目	非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱食肉製品(加熱殺菌後包装)平成5年3月17	液卵 平成11年11月1日より施行	食中毒汚染実態調査	BAM April 2003	USDA, 1998	MFO-21, 2002年7月1日	2002/7/15, ISO 6579	Journal of AOAC International, 86, 275-295, 2003
増菌培養方法 検査量	25g	25g	25g	25g	食品検体により、検体量が異なっている。25-325gまで、様々。	15x25=375, single 25g	25g	ISO 6579と the AOAC Official Methodによるサルモネラの検出比較 コラボ研究
増菌培養液	225mlのEEM	225mlのBPWにL-システイン(0.2g/L)あるいはFeSO ₄ /7H ₂ O(64mg/L)添加	225mlのBPW	23種食品によって増菌培地を選択する。Lactose broth, TSB with ferrous sulfate (35mg/1L TSB), TSB, 1% brilliant green dye solution, universal preenrichment broth, nutrient broth, TSB with K ₂ SO ₃ (0.5%), tetrathionate broth with brilliant green dye solution, lactose broth, BPWなど。添加剤も各種あり。	検体量にあわせて、培養液量も様々。主に、BPWであるが、中には添加剤を使用するものあり。	Nutrient broth (NB) and BPW	BPW	Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 Salmonella Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study 結論: ISO6579:2002を表記の食物のサルモネラ検出法として推薦した。
温度(°C)	35.0±1.0	36±1	36±1	35	35±2	35	37±1	
培養時間(時)	18±2	22±2	20-24	24±2	20-24	18-24	18±2	
選択培養方法						前培養で+		
培養液	1mlをセテナイトブリリアントグリーン培地、セテナイトシステチン培地又はハーナ・テトラチオン酸塩培地15mlに加える。	0.5mlずつBPW培養液をRVとTTそれぞれ10mlに接種し培養。	BPW培養液を0.5mlを10mlTTに、0.1mlを10mlRV培地に接種。	Guar gumのみ 1ml lactose broth + 10ml SCbroth + 10mlTTへ、その他の食品はBPW培養液を0.1mlを10mlRV培地に、1mlを10mlTTに接種。	BPW培養液0.5±0.05mlを10mlTTへ、0.1±0.02mlを10mlRVへ接種	前培養液 1.0mlを9ml SCと tetrathionate brilliant green (TBG) broth で培養。	BPW培養液 0.1mlをRVS (Rappaport-Vassiliadis medium with soya) 10mlへ、1mlを MKTTn (Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth) 10mlで培養。	
温度(°C)	43.0±1.0もしくは35.0±1.0	42.0±0.5	42.0±0.5	微生物多い場合: RV 42±0.2, TT 43±0.2. 恒温水槽: 微生物が少ない場合: RV 42±0.2 (恒温水槽), TT 35±2.0; Guar gumの場合: SCとTT 35。	42.0±0.5	SC: 35, TBG: 42.5	RVS broth: 41.5±1, MKTTn broth: 37±1, 42.5°C以上にならないように注意。	
時間	20±2	22±2	20-24	24±2	22-24	24±2	24±3	

寒天平板分離培地	DHL,MLCB等の分離培地に画線塗抹	硫化水素の産生により判定できる培地と硫化水素非産生でも判定できる培地の2枚	硫化水素の産生により判定できる培地と硫化水素非産生でも判定できる培地の2枚	Bismuth sulfite (BS) agar, xylose lysine desoxycholate (XLD) agarと hektoen enteric (HE) agar	BGS, DMLIA あるいはXLT4寒天培地	10 μ l, BS and brilliant green sulfa (BGS).	XLD	
同定方法	TSI, LIMなど	TSI, LIMあるいはLIA培地	TSI, LIM, 血清型別	TSI, LIA slant, urease test, serological polyvalent flagellar (H) test. Or Spicer-Edwards serological test, testing of urease-negative cultures, serological polyvalent somatic (O) tests for Salmonella and somatic (O) group tests.	TSI, LIA slant commercially available biochemical test kits. If the VITEK test kit is used, the cytochrome oxidase and gram stain are optional. AOAC Official Method 967.27 or "Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae" 4th Edition 参照	TSIとLIA. Polyvalent and/or single grouping somatic antisera are used to support the tentative identification of isolates as members of <i>Salmonella</i> spp.	TSI slant and stab the butt. Urea agar slant. L-Lysine decarboxylation medium, β galactosidase detection, Voges-Proskauer (VP) reaction, indole reaction and serological confirmation and serotyping. (Salmonella reference centerへ)	

資料3

接種菌数—希釈倍率	41°C water bath	42°C water bath	43°C water bath	42°C incubator	41.5°C incubator
4000-original conc.	0	0	0	0	0
4000-10 ⁻³	6*	0	0	30	7
4000-10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
400-original	0	0	0	0	0
400-10 ⁻³	15	3	1	46	18
400-10 ⁻⁵	1	0	0	0	1
40-original	0	0	0	0	0
40-10 ⁻³	5	1	5	10	34
40-10 ⁻⁵	0	0	0	0	5

スパイラルプレート— 37μl 塗抹/XLDプレート

*検出黒色コロニー数

資料 4

平成 17 年度食品の食中毒菌汚染実態調査結果の解析

サルモネラに関して

RV と TT 培地での比較

実態調査報告書を元に、以下の解析を行った。

2223 検体中 サルモネラ陽性検体 58 検体 (いただいた報告書では、54 検体)

RV のみの選択増菌 6 検体

サルモネラ陽性全検体 (54 検体) から RV のみの選択増菌分を除いて解析を行った。 $54 - 6 = 48$

48 検体分(RV と TT の両方で、選択増菌が行われた検体分)

H17 年度

全検体(48 検体)	RV と TT で検出	RV で検出	RV のみ検出	TT で検出	TT のみ検出
陽性検出数	32	42	10	38	6
陽性検出%	66.7%	87.5%	20.8%	79.5%	12.5%

なお、参考まで、H16 年度分の同調査の解析結果を示した。

H16 年度

全検体(42 検体)	RV と TT で検出	RV で検出	RV のみ検出	TT で検出	TT のみ検出
陽性検出数	26	38	12	30	4
陽性検出%	61.9%	90.5%	28.6%	71.4%	9.5%

以上の結果から、食品中サルモネラの検出において、選択増菌培地に RV 培地のみを使用すると両選択培地を使用した場合と比較して 90%位は検出可能であるが、10%程度の検出漏れがでてくると考えられる。

そのことを考えると BPW 増菌後には、RV と TT の両選択培地を使用して検査することが必要であると結論づけられる。

調査を行ってくださった皆様の詳しい結果報告により、これらの解析を行うことが出来ました。調査を行ってくださった皆様に感謝いたします。

平成 18 年 4 月 21 日

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
宮原美知子

資料5 サルモネラコロボ結果集計

	サルモネラ 判定	一致率	
非接種群	陰性	84/84	
硫化水素産生株 低菌数	O4	83/84	1/84非接種群に 判定
硫化水素産生株 高菌数	O4	84/84	
硫化水素非産生株 低菌数	O1,3,19	84/84	
硫化水素非産生株 高菌数	O1,3,19	84/84	

資料 6

サルモネラ試験法 案

Proposal of the Standard Method for Isolation of *Salmonella* in Foods

サルモネラ属菌標準試験法

1. 試験試料 25 g をストマッキング袋等に無菌的にとりわけ、BPW 225 ml を加え、ストマッカーなどで均質化し、培養する。その培養液の一部を RV 培地と TT 培地で選択増菌培養後、2 種類の分離寒天培地（硫化水素産生性で検出する培地と硫化水素産生性に関係なくサルモネラを検出する培地、それぞれ 1 種類）に塗抹培養し、集落の産生を検討する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI 寒天培地および LIM 培地に接種し、生化学的性状の確認を行う。さらに、抗 O 血清による凝集反応により O 抗原の血清型別を実施してサルモネラ属菌と確定する。
2. 使用器具、装置
 - ① 滅菌ハサミ
 - ② 滅菌ピンセット
 - ③ 滅菌装置
 - ④ ストマッカー
 - ⑤ ストマッキング袋
 - ⑥ 三角フラスコ
 - ⑦ 自動秤量分注装置または秤量器

- ⑧ pH 計
- ⑨ 滅菌ピペットまたはマイクロピペットと滅菌チップ
- ⑩ メスシリンダー
- ⑪ 小試験管
- ⑫ 中試験管
- ⑬ 試験管立て
- ⑭ 白金耳
- ⑮ 高圧蒸気滅菌器 (滅菌のインジケーター必要)
- ⑯ 乾熱滅菌器 (滅菌のインジケーター)
- ⑰ 恒温槽または恒温水槽 ($35\pm 1^{\circ}\text{C}$ と $42.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の制御)
- ⑱ 滅菌シャーレ

3. 培地、試薬および抗血清

- ① 前増菌用培地緩衝ペプトン水 (BPW) : 加温溶解後、 121°C で
15 分間滅菌する。

- ② 選択増菌用培地

Rappaport-Vassiliadis (RV)培地 : 加温溶解後、10ml. ずつ中
試験管に分注し、 115°C 、15分間滅菌する。作製後は冷蔵庫で数
週間保存可能。

Tetrathionate (TT) 培地：沸騰まで加温混和後、40℃以下に冷却する。ヨウ素溶液20mlを培地1Lに加え、よく攪拌する。さらに攪拌しながら、10 ml ずつ滅菌中試験管に分注する。TT基礎培地は作製後冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日に使用のこと。

③ 分離寒天培地

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB、DHLと XLDから1種類。使用説明書に従って作製。

硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地：

BGS(ブリリアントグリーン+スルファピリジン)、CHS(クロモアガーサルモネラ)、ES II (ESサルモネラ寒天培地II), SMIDIIから1種類。使用説明書に従って作製。

④ 確認用培地

TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層斜面とする。

LIM (Lysine Indole Motility) 培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

⑤ O血清型確認血清

サルモネラ免疫血清0多価、01多価および0群血清

⑥ 生化学的性状確認培地と試薬等

シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、斜面とする。

VP半流動培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で15分間滅菌し、高層に固める。

インドール試薬

VP用試薬

チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙

4. 試験手順

1) 前培養増菌

① BPW を約 35℃となるよう温めておく。

② 試料 25g に BPW 225ml を加え、1 分間ストマッカー処理する。

③ 35±1℃、22±2 時間前増菌培養する。

2) 選択増菌培養

① RV 培地および TT 培地を約 42℃となるように温めておく。

② BPW で前培養した培養液 0.1 ml を RV 培地 10 ml に接種

する。

③ BPW で前培養した培養液 1 ml を TT 培地 10 ml に接種する。

④ 接種した RV および TT 培地を $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。

3) 分離用寒天培地

① 培養後の RV および TT 培地をよく攪拌する。

② 1 白金耳量を、以下の (ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地および (イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹する。

(ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

- ① MLCB
- ② DHL
- ③ XLD

(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

- ① BGS (ブリリアントグリーン+スルファピリジン)
- ② CHS (クロモアガーサルモネラ)
- ③ ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)

④ SM2 (chromID Salmonella Agar)

③接種した培地を $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。

注意：サルモネラを釣菌する際、集落の色については、硫化水素により判定する培地では黒色集落をサルモネラと推定し、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地の BGS では無色透明で培地色が赤色になったもの、CHS では藤色、ESII ではピンクそして SM2 ではピンクをサルモネラと推定する。分離用寒天培地上でのサルモネラ集落の色についてはあらかじめ検証後に検査に使用すること。

4) 確認培養

- ① 各分離寒天培地に形成された定型的集落（各培地の上記注意を参照）を 3 個ずつ釣菌して、TSI 寒天培地と LIM 培地に接種する。
- ② TSI 寒天培地には白金線で高層に穿刺し、斜面に塗抹する。
- ③ LIM 培地は高層に穿刺する。
- ④ 接種した培地は $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。
- ⑤ 培養後、以下の結果が得られたものは定型的サルモネラである。
 - (ア) TSI 寒天培地：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) および斜面部が鮮やかに赤変したもの。

(イ) LIM 培地：培地全体が紫変（リジン陽性）、運動性陽性、上記性状確認後にインドール反応を検討する。

サルモネラはインドール反応陰性（色の変化無し）。

⑥ 定型的なサルモネラと確認された菌株は、5) に示す O 抗原の血清学的試験を行い、サルモネラであることの確定および O 抗原血清型について決定する。

⑦ サルモネラには、硫化水素非産生性、運動性の弱いもの、リジン陰性といった非定型的性状を示すものがあり、また、市販の O 血清に凝集の弱い O 群型別不能のサルモネラも知られている。①-⑥により、サルモネラの確認は可能であると考えるが、定型的性状を示さない場合は 6) に示す生化学的性状試験も検討し、サルモネラの確認をすることが望ましい。

5) 血清型別

サルモネラと疑われ釣菌された菌株についてサルモネラ免疫血清を用いたスライド凝集法による O 血清型別試験を TSI 寒天培地斜面上から菌を採取して実施する。

(ア) O 多価血清および O1 多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が見られた O 群血清を用いて当該菌の O 群を決定する。

(イ) サルモネラの定型的な生化学的性状を示したにもかかわらず、いずれの血清にも凝集が認められないときは O 群型別不能とする。

6) 生化学的性状

① 非定型的サルモネラが疑われるときは (ア) ~ (ウ) に示した生化学的性状を実施する。同定キットの使用も可。

(ア) オキシダーゼ試験：チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙に菌を塗布して1分間以内に深青色になれば陽性とする。

(イ) クエン酸：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。

(ウ) VP:VP 半流動培地に菌を穿刺し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養後、VP 用試薬 A, B を滴下する。陽性の時は数分後に試薬が赤色となる。1 時間後も赤色となら

なければ陰性とする。

注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性である。

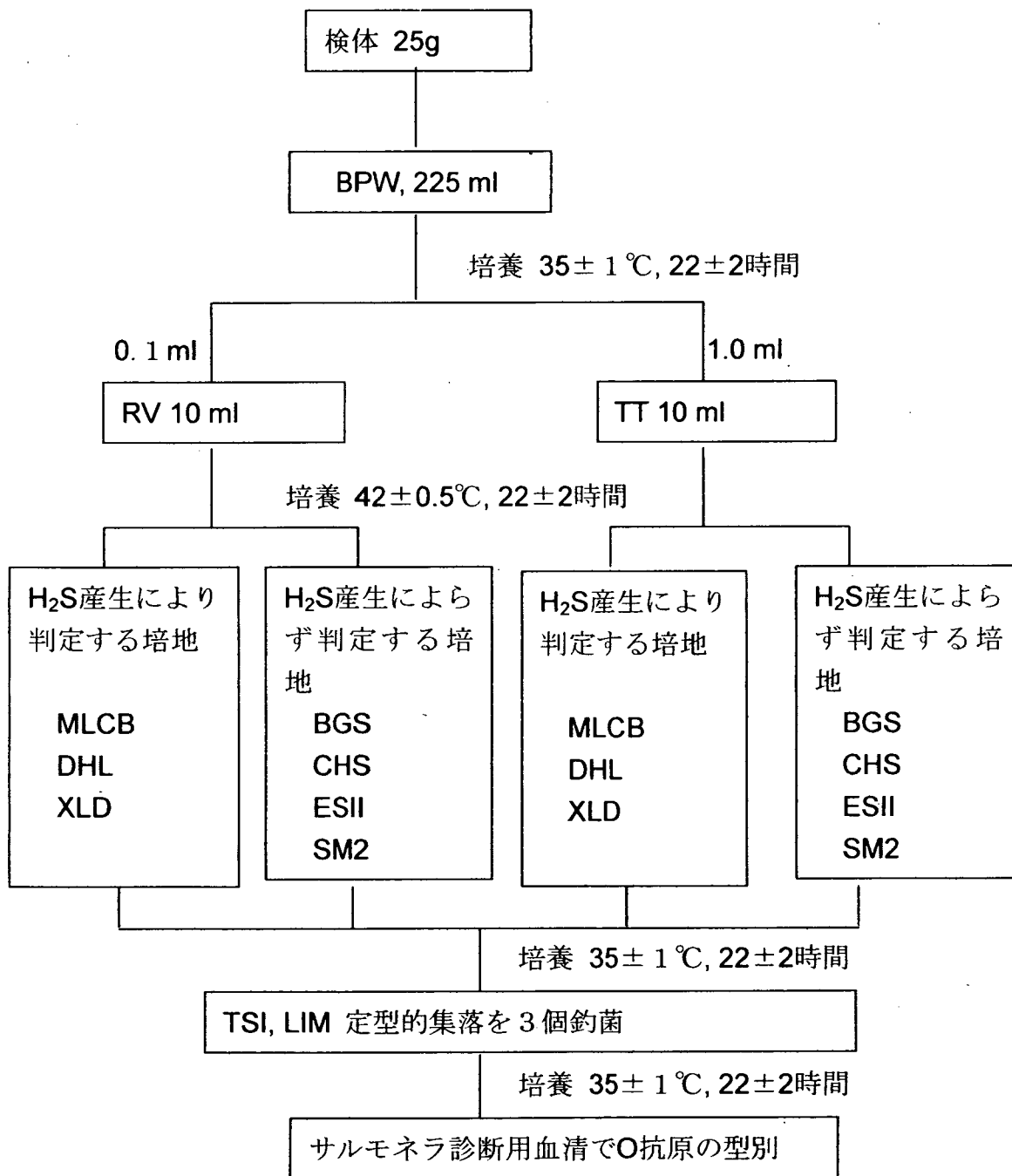
7) 記載

- ① サルモネラ陽性の時はO群またはO群型別不能まで記載する。
- ② 非定型的サルモネラの時も同様にO群まで記載するとともに、どの性状が異なっていたかも記入する。

5. フローチャート

サルモネラ試験法

(この試験法は*Salmonella* Typhiと*Salmonella* Paratyphi A には適用不可である。)



6. 培地組成 (参考例) および作製方法

④ 緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water: BPW)

組成 : 1,000 ml あたり

ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
リン酸水素二ナトリウム (12水和物)	9.0 g
精製水	1,000 ml

*オートクレーブ滅菌 121°C, 15 分間, pH 7.2±0.2

⑤ ラパポートーバシリアデイス液体培地 (Rappaport-Vassiliadis: RV)

組成 : 1,000 ml あたり

ソイペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸二水素カリウム (KH ₂ PO ₄)	1.6 g
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 ml