

* オートクレーブ 115°C, 15 分間, pH5.2±0.2

③ テトラチオネート液体培地 (Tetrathionate USA: TT)

組成：1,000 ml あたり

カゼインペプトン	2.5 g
肉ペプトン	2.5 g
胆汁酸塩	1.0 g
炭酸カルシウム	10.0 g
チオ硫酸ナトリウム	30.0 g
精製水	1,000 ml

* 煮沸するまで混和加熱する。この液体培地は 4°C で数週間保存可能である。この溶液を 45°C 以下に冷却後、1,000 ml に対して下記に示すヨウ素溶液 20ml を添加した後、混和する。よく混和しながら、10ml ずつ滅菌した試験管に分注する。ヨウ素溶液を添加した後は直ちに使用する。

ヨウ素溶液組成

ヨウ素	6.0 g
ヨウ化カリウム	5.0 g

精製水 20.0 ml

硫化水素産生により判定する分離寒天平板培地

④MLCB

組成：1,000 ml あたり

酵母エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
ハートエキス末	2.0 g
塩化ナトリウム	4.0 g
マンニット	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	4.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
クリスタルバイオレット	0.01 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH 6.8±

* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

④ DHL

組成：1,000 ml あたり

肉エキス	3.0 g
ペプトン	20.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	2.3 g
クエン酸ナトリウム	1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
中性紅	0.03 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH 7.4±

* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

③ XLD

組成：1,000 ml あたり

酵母エキス	3.0 g
L-リジン・HCl	5.0 g

キシロース	3.75 g
乳糖	7.5 g
白糖	7.5 g
デスオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.8 g
フェノールレッド	0.08 g
寒天	12.5 g
精製水	1,000 ml

pH 7.4 ±0.2

* 加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

硫化水素産生によらずサルモネラ判定する分離寒天平板培地

⑤ BGS

BGA (ブリリアントグリーン寒天培地)

組成：1,000 ml あたり

プロテオース	ペプトン	10.0 g
酵母エキス		3.0 g

乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
フェノールレッド	0.08 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 ml

pH 6.9 ±0.2

* 上記 BGA をオートクレーブ滅菌 121°C, 15 分間後、液温を約 70°C に下げ、その温度に保って、下記のスルファピリジン溶液を添加し、混和する。培地の温度が 60°C 以下の場合では、結晶が析出するので注意する。混和後、溶液温度を 60°C 前後に冷却し、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

スルファピリジン溶液の作製方法

ジメチルホルムアミド 2ml にスルファピリジン 1 g を加えて溶解する。

⑥CHS (クロモアガーサルモネラ)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
塩化ナトリウムおよび塩類	8.0 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

*加温溶解後、シャーレに約 20ml ずつ分注し平板とする。

⑦ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	1.5 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デスオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
マンニット	15.0 g
中性紅	0.03 g
合成酵素基質	0.45 g

ノボビオシン 0.02 g

寒天 15.0 g

pH 7.4±0.2

*オートクレーブ滅菌 121℃, 15 分間

⑧SM2 (chromID Salmonella Agar)

組成：1,000 ml あたり

ペプトン 6.25 g

トリス 0.16 g

乳糖 6.0 g

胆汁酸塩 1.5 g

発色基質混合物 0.03 g

塩化ナトリウム 5.0 g

選択剤混合物 0.03 g

寒天 14.0 g

精製水 1,000 ml

pH 7.3

* 組成は上記の通りですが、生培地以外では販売していない。

⑨TSI、LIM、インドール試薬や生化学的性状試験に使用する試

薬についてはサルモネラ確認にのみ用いるものではないので、製品

情報に従って作製し、用いること。

II-2 黄色ブドウ球菌試験法

清水 晃

五十君 静信

河野 潤一

厚生労働科学研究費補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）
平成 17～19 年度分担研究総合報告書

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
	河野 潤一	神戸大学農学部
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

今なお重要な食中毒細菌である黄色ブドウ球菌について、従来わが国各所で行われてきた方法論は区々であり、また問題点も指摘されてきた。さらに、食品流通経済のグローバル化にある現在では検査法においても国際的な互換性が求められている。そこで、本研究ではわが国と外国における検査法について各種の問題を比較検討し、標準となる検査法の原案を作成した。

本研究平成 17 年度ではわが国で一般的に用いられている検査法により市販食肉及び魚介類における黄色ブドウ球菌の汚染状況を把握するとともに検査法の問題点について検討した。平成 18 年度においては、選択分離培地、選択増菌培地、培養法および同定法に関する基礎的な研究を行い、黄色ブドウ球菌検査法の標準となる原案を作成した。平成 19 年度には、選択分離培地の性能比較を研究機関各所で行い結論を得た。さらに前年度の原案に基づく検査を実施検討しさらに問題点を精査し、改めて「黄色ブドウ球菌試験法」を策定することができた。

A. 研究目的

わが国では、黄色ブドウ球菌食中毒の発生件数は食品業界の衛生設備・製造方法の改善、衛生教育の向上などにより、また国・地方の食品衛生行政指導の努力により、年々減少の傾向を示しているが、未だ大規模な集団発生事例がしばしば報告されており、なお重要な食中毒として位置付けられている。従来は握り飯、寿司などの穀類及びその加工品が黄色ブドウ球菌食中毒の主流であった。近年では食習慣が欧米諸国型に近づきわが国でも食肉及びその加工品、乳製品、魚介類及びその加工品の消費量が年々増加しているが、これらの食品における黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の汚染実態調査は、十分に行われておらず、「畜水産食品における黄色ブドウ球菌のリスク評価」についても検討されていないのが現状である。

一方で、畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検査法についても、検体からのサンプリング法、選択分離培地や増菌培地の種類、

菌同定法など、研究機関や検査室によって様々であり、これらの要因が検出率に大きく影響しているものと考えられる。また、黄色ブドウ球菌食の検査において、わが国では増菌を行わず、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採用されている。分離選択培地には3%卵黄加マンニット食塩

(MSEY) 培地が汎用されている。一方、諸外国では、スイス International Organization for Standardization (ISO) のISO6888-1~3および米国食品医薬品局 (FDA)

Bacteriological Analytical Manual (BAM)が推奨する Baird-Parker (BP) 培地が一般に用いられており、増菌培養法も整備されている。食品流通経済のグローバル化にある現状を背景として、国際的に互換性のある試験を行うことは重要であり、このような観点から従来の試験法を見直し、早急に標準法を確立する必要がある。

そこで、本研究平成17年度ではわが国で一般的に用いられている検査法により市販食肉及び

魚介類における黄色ブドウ球菌の汚染状況を把握するとともに検査法の問題点について検討した。平成18年度においては、選択分離培地、選択増菌培地及び培養法、同定法に関する基礎的な研究を行い、黄色ブドウ球菌検査法の標準となる原案を作成した。平成19年度においては、選択分離培地の性能比較を研究機関各所で行い結論を得た。さらに前年度の原案に基づく検査を実施検討しさらに問題点を精査し改めて「黄色ブドウ球菌試験法」を策定することができた。

B. 研究方法

1. 国内従来法による食品汚染調査ならびに検査法についての考察
2. 国内および外国における黄色ブドウ球菌検査法の現状把握
3. 直接平板培養法における選択分離培地の検討
4. 選択増菌培養法における増菌培地と培養時間の検討
5. 黄色ブドウ球菌検査法の原案作成と提案

6. 黄色ブドウ球菌加熱損傷における各種培地の比較（コラボ研究）
7. 黄色ブドウ球菌検査法（ステージ1）による食品検査実地検討
8. 改訂提案「黄色ブドウ球菌検査法」とその実施検討

C. 研究結果

1. 国内従来法による食品汚染調査ならびに検査法についての考察

市販食肉について、食肉衛生検査指針（厚生労働省監修、2004年版）に従って汚染調査を行った。直接平板培養法と増菌培養法の検出率の比較では、選択増菌培養法で検出率が明らかに増加した。食肉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だけでは不十分で、選択増菌培養法が必要であった。

MPN法による食肉の汚染菌数は、大多数の検体が46/g以下であった。ふき取り法による食肉からの検出率は、増菌培養法で検出率が著しく増加した。

2. 国内および外国における黄色ブドウ球菌検査法の現状把握

直接平板培養法と選択増菌培養法について、ISO6888-1～3およびBAMの検査法を提示し、また市販されている主な選択分離培地、選択増菌培地を調べ、選択剤として、塩化ナトリウムを用いているものと、亜テルル酸カリウム、塩化リチウム、グリシンを用いているものに大別された。

3. 直接平板培養法における選択分離培地の検討

3菌株について、加熱損傷菌を作製して市販粉末培地であるMSEY培地とBP培地における発育菌数を比較検討した。対照としてTSAとBA培地を用いた。その結果、供試した菌株の種類や培地の製造元によって若干バラツキがみられたが、全体で見ると、発育菌数は供試した3株いずれも、BP培地がMSEY培地に比べて多かった。またMSEY培地と、本培地に1%ピルビン酸ナトリウムを添加した(MSEYP)培地を比較したところ、発育菌数は、3株中

2株ではMSEYP培地で多かった。

市販の食肉類およびその加工品、魚介類について両培地の検出率を比較したところ検出率は、培地間の差はみられなかった。また、両培地で黄色ブドウ球菌陽性となった検体の発育菌数についても、大きな差はみられなかったが、BP培地では検体中の菌数が少ない場合には検出できる可能性があると思われる。

4. 選択増菌培養法における増菌培地と培養時間の検討

選択増菌培地の種類と食塩濃度による検出率の比較検討を行った。HIBおよびTSB培地に、食塩を5%、7.5%、10%およびピルビン酸ナトリウムを1%の割合で添加した選択増菌培地を作製し、また選択剤として亜テルル酸カリウムが添加されたGCB培地も使用した。次に、実地に食肉各種検体の乳剤を作製し、選択増菌培地に添加して培養後、その培養菌液をMSEY培地に塗抹培養後、判定を行った。黄色ブドウ球菌検出率は、HIBとTSB培地に添加する食塩濃度間、両培地間で大きな差はみら

れなかった。これらに比べ GCB 培地では若干低率であった。また、選択増菌培地からの黄色ブドウ球菌の検出率は、MSEY 培地と BP 培地とで差がみられなかった。

5. 黄色ブドウ球菌検査法の原案作成と提案

これまでの成績を基に黄色ブドウ球菌検査法について、直接平板培養法、選択増菌培養法、および菌数測定法のそれぞれについてプロトコールを作成し、ステージ1として公開提案した。

6. 黄色ブドウ球菌加熱損傷における各種培地の比較（コラボ研究）

分離選択培地の検討を確実なものとするため国内4ヶ所の研究機関において、黄色ブドウ球菌3株について加熱による菌回収をBP培地およびMSEY培地を用いて比較検討した。研究機関による偏差はあるもののいずれにおいても加熱損傷菌に対してBP培地は優れた発育能を有することが確認された。MSEY培地にピルビン酸ナトリウムを添

加したMSEYP培地ではMSEY培地単独より回収率の増加傾向が認められた。

7. 黄色ブドウ球菌検査法（ステージ1）による食品検査実地検討

提案された黄色ブドウ球菌検査法（項目5）に従って畜水産食品検査を実施した。市販食肉および各種魚介類を用いた。直接平板培養法では、肉類、魚介類ともに分離率はきわめて低くまた陽性検体であっても培養平板上の集落数は1～数個程度であり、菌数測定は不能であった。一方、直接平板培養法と同一の検体について選択増菌培養法による検出を試みたところ、肉類の鶏肉においては黄色ブドウ球菌の検出率は著しく増加した。豚肉、牛肉では少数ながら増加した。魚介類では直接平板培養法と変わりなく低率であった。検体試料をさらにMPN法（3本法）を用いて選択増菌培養を行い、黄色ブドウ球菌の検出ならびに菌数測定を行った。検出率は肉類の鶏肉、豚肉、魚介類ともに検出率は増加した。牛肉で

は選択増菌培養法と変わらず低率であった。これらは黄色ブドウ球菌の汚染実態を表現しているものと考えられる。

8. 改訂提案「黄色ブドウ球菌検査法」とその実施検討

これまでの研究成果に加え第13回「食品からの微生物検査標準法検討委員会」における検討から「黄色ブドウ球菌検査法」を改訂して提案した。その内容は、黄色ブドウ球菌菌数測定法としての直接平板培養法とMPN法に特化したものであり、選択増菌培養法はMPN法に含まれるとして削除することとなった。直接平板培養法とMPN法についてのプロトコールはステージ3としてそれぞれ公開した。

本法に基づくコラボ研究に先立ち一部実施試験を行った。本試験の結果、直接平板培養法およびMPN法ともにBP培地、MSEY培地とも接種菌量と大きく異なることなく回収された。測定はすべて良好な結果を得、以上の成績から実行案要

領のとおりコラボ試験は実施に堪えることを検証できた。

D. 考察

わが国では、食肉及び魚介類を含む各種食品の黄色ブドウ球菌を検査する方法は、食品衛生検査指針に従って、無作為に検体の一部を数箇所切り取り、10倍乳剤または10倍段階希釈を調製して、これをブドウ球菌選択分離培地に塗抹する定量法が提唱されている。この方法は検体中の菌数を測定し、定量的に評価する方法であるが、検体全体を検査するわけではないため、検体の採取の仕方、あるいは菌量が少ない場合は陰性と判定される場合が考えられる。今回の調査で、食肉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だけでは不十分で、増菌培養法が必要であること示している。

腸炎ビブリオ、サルモネラなどの食中毒細菌の検出法には選択増菌培養法が実施されているが、黄色ブドウ球菌では直接分離培養である直接平板培養法のみが採用されている。本研究以

前にも黄色ブドウ球菌の検出法に増菌培養法を取り入れることによって、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ている。したがって標準検査法には増菌培養を示すことが結論された。

黄色ブドウ球菌の検査法について国際的な協調の観点からは諸外国で汎用されているBP培地が推奨される場所であるが、わが国で従来から使用されているMSEY培地との性能比較は標準法を策定するにあたって必須の検討事項である。そこで、国内研究機関4ヶ所において市販のBP培地およびMSEY培地各種の性能比較を行ったところ、加熱損傷菌に対してBP培地が優れた発育能を有することが確認された。その他の試験では両培地間に特に発育能に差を認めていない。したがって、加熱製品など損傷菌の存在が予想される場合にはBP培地の使用が強く推奨される。

最近わが国では食塩やピルビン酸ナトリウムなどを添加した培地による選択増菌培養が各所で行われ、黄色ブドウ球菌検出

率の著しい増加が報告されている。本研究では選択増菌培地を比較検討し特定した。この培地は十分な性能が検証でき、国内での統一規格基準として十分と期待される。

以上の研究成果の基に「黄色ブドウ球菌検査法」を策定することができた。

なお、黄色ブドウ球菌の検査法においては菌数計測よりもエンテロトキシン産生性のものを確実に検出することが食品衛生上本来の目的である。今回の事業では到達しなかった目標であるが、検査法の検討はその継続性が重要であり、近い将来にエンテロトキシン産生黄色ブドウ球菌の検査法が検討されなくてはならないものと考えられる。

E. 結論

黄色ブドウ球菌検査の標準法の試案を作成するにあたって考慮すべき点を、分離培地（選択分離培地、増菌培地）、検査法などについて、実地試験を基に詳細に比較検討し問題点を整理した。

選択分離培地については

BP 培地が加熱損傷菌の発育培地として優れていることを認めた。それ以外ではBP 培地と MSEY 培地では同等と結論した。選択増菌培養法が本菌検出には優れていると結論され、またこれに用いる培地も特定できた。

これまでの研究成果に基づき、改めて最終案に係る「黄色ブドウ球菌検査法」を策定できた。

F. 研究発表

1) 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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、217-222.

(4) 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、242-246.

(5) 藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信(2007): 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.

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

J341-J344.

2) 学会発表

(1) 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.

(2) 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.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 内井香里、河野潤一、清水晃、齋藤悦子 (2007): 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、第144回日本獣医学会学術集会講演要旨集、p.103.

H. 知的所有権の修得状況

なし

II-3 腸炎ビブリオ試験法

甲斐 明美

荒川 英二

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17～19年度分担研究報告書

「食品を対象とした腸炎ビブリオ試験方法に関する研究」

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	荒川 英二	国立感染症研究所
協力研究者	八柳 潤	秋田県衛生科学研究所
	杉山 寛治	静岡県環境衛生科学研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	金子 誠二	東京都健康安全研究センター
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	下島優香子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：食品を対象とした腸炎ビブリオ試験法を検討するにあたり、最初に、現行法の問題点を整理して、腸炎ビブリオ検査の基本方針を明確にした。そして、この方針に従って培養法を検討し、実験によって検証して、新たな腸炎ビブリオ試験方法として、作業部会案を提案した。

更に、検査時間を短縮するために、腸炎ビブリオの迅速同定にPCR法を応用することを検討した。PCR法の感度には問題ないが、特異性についてはもう少し検討が必要であるが、採用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、国内における食中毒起因菌の検査法は、厚生労働省から出された告示法、通知法や「食品衛生検査指針」等を参考に実施されている。しかし、これらの検査法は十分に議論されずに作成されたものが多いため、必ずしも現在の現場に即しているとは限らず、問題点も多い。また、食品検査は、国外の標準法のような規格化された

プロトコールには従っておらず、国際的に認められた検査法も確立されていないのが現状である。

本研究では、最初に現行法の問題点を整理し、日本の「食品衛生検査指針」および、比較検討すべき世界的な方法と比較検討を行う事とした。

次に、これらの検討結果に基づき、培養法の検討と、腸炎ビブリオ同定のための迅速法としてPCR法を検討して、