

総合研究(分担)報告書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

黒木 俊郎

平成 25～27 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

総合研究（分担）報告書

Campylobacter jejuni の遺伝子型別法の評価

研究分担者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究分担者 泉谷 秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 相川 勝弘（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

研究協力者 鈴木 美雪（神奈川県衛生研究所 微生物部）

Campylobacter jejuni による食中毒の発生時における原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析には、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）が広く普及しており、食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握等の疫学解析に用いられている。しかし、PFGE 法は操作が煩雑、結果を得るまでに 3～4 日を要する、複数の機関間での結果の比較が必ずしも容易ではないといった問題がある。そこで、PCR 法を用いた新たな型別法である comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) が海外で開発されたことから、この手法の導入を目指し、評価を行った。評価において、CGF40 のための multiplex PCR に用いる taq polymerase の選択に課題があることが明らかとなった。4 種の市販の taq polymerase のうちの 1 種によりもっともよい結果が得られたが、標準株を用いた検討において、本来検出されなければならない一部のバンドを得ることが出来なかった。鶏肉から分離した *Campylobacter jejuni* 及び *C. coli* を CGF40 及び PFGE により型別し、薬剤感受性及び鶏肉の産地のデータと合わせてクラスター解析したところ、CGF40 は PFGE と同等の識別能力を示し、特定の菌グループが薬剤耐性あるいは生産地域との関連性があることが示された。本研究により、CGF40 は PFGE と同等の識別能力を有し、疫学解析に有用な手法であることが示された。

A. 研究目的

Campylobacter jejuni は細菌性食中毒の主要な原因菌である。食中毒の発生時には原因物質の特定や感染経路の解明、食中毒の規模の把握のために、疫学解析としての分離菌株の型別は不可欠である。*Campylobacter* の型別法には、血清型別、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法などがある。このうち、識別能が高いことや操作が容易であること、解析機器が普及していることなどから PFGE 法が最も普及している。

PFGE 法には多くの利点があるが、その一方で、結果を得るまでに 3~4 日を要するため、迅速に結果を得ることができない、フラグメント解析法であるために複数の機関が実施した解析結果を比較することが必ずしも容易ではないといった課題がある。そのため、これらの課題を解決する解析法を導入し、疫学解析の場において複数の型別法の選択肢があることが望まれる。

C. jejuni の PCR を用いた型別法 comparative genomic fingerprinting 40 (CGF40) が 2012 年に Taboada らにより提案された (文献 1)。*C. jejuni* 株における保有頻度と「SNP がないこと」から

40 の ORF が選ばれた。CGF40 はこれらの 40 の ORF の有無により型別を行う。

CGF40 は対象にする 40 の ORF を 5 つごとに分け、8 組の multiplex PCR により ORF の有無を解析し、この結果により型別を行う。これまでの検討では multiplex PCR により本来検出されなければならないバンドが得られない事象がみられたため、複数の taq polymerase を用いて、適切に結果が得られるかを評価した。そこで本研究では、CGF40 の導入に向けて、CGF40 の評価を行った。さらに、鶏肉からの分離株を用いて、菌株の薬剤感受性と鶏肉の生産地域のデータと合わせて、CGF40 と PFGE によりクラスター解析を行った。

B. 研究方法

平成 25 年度では、神奈川県衛生研究所において鶏肉から分離した *C. jejuni* 保存株 13 株と *C. jejuni* ATCC33560 を CGF40 の評価に用いた。CGF40 の条件は、既報に従った。Taq polymerase は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) および KOD FX Neo (東洋紡) を用い、PCR 条件は 94°C、5 分の後に、94°C、30 秒 ; 55°C、30 秒 ; 72°C、30 秒を 1 サイク

ルとし、35 サイクルを実施し、その後 72°C で 5 分間加熱して完全に伸長させた。PCR 後に 2.0% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線下で観察した。

平成 26 年度および平成 27 年度の検討では、CGF40 の解析結果が既知の標準株 NCTC11168 (ATCC 700819) および RM 1221 (ATCC BAA-1062) を用いた。 *C. jejuni* および *C. coli* 分離株の CGF40 による解析には、平成 24 年度に「食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築」(主任研究者 小西良子) において、市販鶏肉からの分離した *C. jejuni* および *C. coli* を用いた。

CGF40 の条件は、既報を参照した。Taq polymerase は平成 26 年度は Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) および Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ) を用い、平成 27 年度は Emerald Amp PCR Master Mix (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ)、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 (タカラバイオ) および KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye (Kapa Biosystems) を用いた。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応後に

3.0% NuSieve™ 3:1 アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線下で観察した。

PFGE は既法 (文献 2) に従い、一部変更して実施した。各菌株の DNA は、40U の *Sma*I により 30°C で 5 時間作用させた。CHEF MAPPER (Bio-Rad) を用い、PFGE の条件はパルスタイムを 6.76~35.38 として 12°C、200V で 18 時間泳動とした。ゲルは 0.5 μg/ml のエチジウムブロマイドで染色し、UV 下で観察した。 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812 をコントロール株として用いた。

薬剤感受性測定は K-B 法により、アンピシリン (10 μg)、テトラサイクリン (30 μg)、ストレプトマイシン (10 μg)、クロラムフェニコール (30 μg)、エリスロマイシン (15 μg)、カナマイシン (30 μg)、ST 合剤 (23.75/1.25 μg)、ナリジクス酸 (30 μg) およびシプロフロキサシン (5 μg) (Becton Dickinson) を用いて測定した。

CGF40 のパターンと PFGE パターンは Bionumerics software version 6.6.3 (Applied Maths) を用いて、デンドログラムを作成した。

CGF40 と PFGE の識別能力を比較するために、Simpson の多様度指数 (Simpson' s

index) (文献 3) を算出した。

C. 研究結果

平成 25 年度の検討では、使用する taq polymerase は 3 種類としたが、それぞれの taq polymerase により PCR の結果が異なる対象遺伝子があった。12 株中、2 機関で結果が一致したのは 1 株であった。また、CGF40 の 40 のターゲット遺伝子のうち、19 で結果が異なっていた。

平成 26 年度の検討では、CGF40 の PCR 条件の設定の検討において、PCR 反応液として EmeraldAmp PCR Master Mix を用い、PCR 反応の温度および時間の設定を 94°C, 5 分 → (94°C, 30 秒 → 55°C, 60 秒 → 72°C, 60 秒) x35 サイクル → 72°C, 5 分に設定した場合に最も良い結果が得られた。

平成 27 年度の検討では、比較対象とした taq polymerase の中では Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 の使用が適していることが示された。

鶏肉から分離した *C. jejuni* 65 株および *C. coli* 9 株の合わせて 74 株は、PFGE により *C. jejuni* は 55 パターンおよび *C. coli* は 7 パターンに分けられ、*C. jejuni* の Simpson の多様度指数は 0.9947 であり、74 株は 6 クラスタに分けられた。*C. coli* が 1 つのクラスタを形成し、*C. jejuni* は 5 クラスタ (cluster P1~P5)

を形成した (図 5)。Cluster P4 はさらに 4 クラスタ (subcluster I~IV) に分けられた。

CGF40 では *C. jejuni* は 49 パターンおよび *C. coli* は 6 パターンに分けられ、*C. jejuni* の Simpson の多様度指数は 0.9889 であり、74 株は 7 クラスタに分けられた。*C. coli* が 1 つのクラスタを形成し、*C. jejuni* は 5 クラスタ (cluster C1~C6) を形成した。

Simpson の多様度指数を比較すると、PFGE が CGF40 よりもわずかに高かったが、ほぼ同じであった。クラスタ解析において、CGF40 のほうが PFGE よりも、菌株の地域的由来あるいは薬剤耐性といった特徴がクラスタとよく関連しているように見受けられた。

D. 考察

Campylobacter の型別法としては、血清型別 (Lior 法及び Penner 法) や薬剤耐性パターンによる型別 (antimicrobial resistotyping) があり、遺伝学的手法を用いた型別法として Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法、Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法、リボタイピング、Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法、

Multilocus sequence typing (MLST) 法、*fla* typing 法、Single Nucleotide Polymorphism (SNP : 一塩基多型) 解析法がある。*C. jejuni* による食中毒の疫学調査では、操作性や簡易性等の理由から PFGE 法が最も多用されている。PFGE 法は識別能が高いなどの利点があるが、結果を得るのに 3~4 日を要することや、フラグメント解析法であるために複数の機関での結果の比較に限界があるといった課題がある。そこで、短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法の導入が望まれる。

C. jejuni の遺伝子型別法として開発された CGF40 は、*C. jejuni* の染色体中の ORF の中から 40 の ORF を対象に、その保有の有無に基づいて型別を行う fingerprinting 法である。PCR 法による検出を用いるため、迅速に結果を得られるという利点がある。そこで、より短時間で結果が得られ、複数の機関間での結果の比較を容易に行うことが可能な解析法として、CGF40 の評価を行った。

CGF40 で用いる taq polymerase により PCR の結果が異なるという課題が明らかとなったことから、市販の taq polymerase の比較検討を行った。4 種の taq polymerase の中で、Multiplex PCR Assay

Kit Ver. 2 による PCR の結果がもっとも良好であった。しかし、Multiplex PCR Assay Kit Ver. 2 を用いても本来得られるべきバンドが得られないものもあり、今後さらに検討が必要である。

鶏肉からの分離株を CGF40 により解析したところ、従来から用いられている PFGE と同様に、CGF40 は菌株間の遺伝学的関連性を解析するための有効なツールであることが示された。

クラスター解析では、特定のクラスターでは遺伝子型と薬剤耐性や地理的分布との関連性が示された。この結果は、薬剤耐性が遺伝学的型別と関連しており、特定の地域に分布する特定の遺伝グループに薬剤耐性が広がっていることを示唆している。

E. 結論

C. jejuni の型別法として導入することを目的に、CGF40 の操作法の検討と評価を行った。CGF40 に用いる taq polymerase を適切に選択する必要があることが明らかとなった。CGF40 を用いたクラスター解析では、遺伝子型と薬剤耐性との間に関連性があり、また、特定のクラスターに属する菌グループが特定の地域に分布し、薬剤耐性を示すものもあることが示された。

F. 謝辞

研究班の調査において分離された菌株を解析に使用することをご了解いただきました麻布大学 小西良子先生並びに国立医薬品食品衛生研究所 大西貴弘先生、鶏肉からの *C. jejuni* 及び *C. coli* 分離株をご分与いただきました、秋田県健康環境センター 齊藤志保子先生、さいたま市健康科学研究センター 小林昭彦先生、滋賀県衛生科学センター 林賢一先生、福岡県保健環境研究所 堀川和美先生に深謝いたします。

G. 参考文献

1. Taboada, E.N., Ross, S.L., Mutschall, S.K., *et al.* (2012). Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 50, 788-797.
2. Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., *et al.* (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 3, 59-67.

3. Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 26, 2465-2466.

H. 研究発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

J. 健康危険情報

なし

総 合 研 究 (分 担) 報 告 書

食品の食中毒起因微生物検査に係る
サンプリングプランのモデリング

小西 良子

平成25～27年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

総合研究（分担）報告書

食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング

研究分担者 小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）

研究協力者 石崎 直人（麻布大学 生命・環境科学部）

本研究では、国際的なサンプリングプランとのハーモナイゼーションを図るため、日本のサンプリングプランのperformanceを検討するために代替病原微生物として蛍光ラテックスビーズ (F-LB) を用いた、非培養法による対象微生物の特異的迅速検出法を確立し、対象微生物の採取検体内分布を検討することとした。バッチ1kgから調製した測定用検体 (25g) 1 検体のサンプリングプランでは、汚染検出検体となる確率は低く、かつその確率は汚染量が少ないほど極めて少なくなることが示唆された。このことから、現在日本で主流となっているサンプリングプランは、実際の対象微生物の汚染分布推定結果から考察しても、母集団を代表する可能性は低いものと示唆された。

そこで、n数を増加した場合、それに対応出来るサンプル・プーリング法としてプレエンリッチメント法とプール法が報告されているが、その有効性をサルモネラをモデルにして、Ready-to-eat (RTE) 食品を対象に比較検討した。汚染サルモネラは熱処理した損傷サルモネラを用いた。

プレエンリッチメント法およびプール法の何れのサンプル・プーリング法を用いても、RTE食品であるネギトロとカット野菜では、サルモネラの汚染菌量が 10^{-1} CFU/g 以上であれば検出できることが確認された。この結果は今後のサンプリングプランの策定に資する。

A. 研究目的

食品の衛生管理を目的として行う微生物検査において、母集団の汚染を正しく反映するサンプリングプランが必要である。衛生管理における微生物のサンプリングプランでは、The International Commission on

Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) が提唱した2階級プランと3階級プランが一般的に使われている。2階級プランとは基準値によって、基準値以下は合格、基準値を超える場合は流通させないとする方法である。3階級プランとは、サン

プル単位内の微生物濃度に応じて、製品の品質が3つの階級に分類できる場合に考え出されたプランである。ICMSFの提案している微生物規格の基本的な特徴は、微生物の危害度および食品の取り扱い条件による危害度の両者を考慮した微生物の危害度分類を行い、それに対応したサンプリング法が設定されていることである¹⁾。

コーデックス規格、EU諸国におけるサンプリングプランは、原則ICMSFの考え方を基に作られており、種々の食品、又は食中毒起因微生物の違いによって、サンプリングプランが設定されている。

EUにおけるサルモネラの規格基準は、乳製品やRTE食品では n=5であり、免疫力などの弱い乳幼児が食べる調製粉乳やベビーフードでは n=30となっておりISOに試験法が記載されている。*Listeria monocytogenes* については乳幼児および特別医療目的のRTE食品においては n=10が設定されている^{2, 3)}。

アメリカのFDA (Food and Drug Administration) とFSIS (Food Safety and Inspection Service) もEU同様、摂取する人のリスクと食品の種類によって、カテゴリを分けている。サルモネラのカテゴリⅠ (サンプリングと消費の間に殺菌工程がなく、乳幼児などリスクが高い対象食品) では n=60、カテゴリⅡ (サンプリングと

消費の間に殺菌工程がない食品) では n=30、カテゴリⅢ (サンプリングと消費の間に殺菌工程がある食品) では n=15が設定され、試験法は Bacteriological Analytical Manual (BAM) に掲載されている。*L. monocytogenes* については食品のpHやAwなどの特性や喫食者のリスクによって分類され、n=5~60であり、FSISのLaboratory Guidebookに試験法が掲載されている⁴⁻⁶⁾。

一方、日本の厚生労働省が行っている微生物のサンプリングプランは、1ロットからランダムにバッチ (1kg) を採取し、そこから25gをn=1で検査する方法が取られており、諸外国との整合性がとれていない。しかし、平成23年には生食用食肉を対象食品として腸内細菌科菌群が⁷⁾、平成26年には非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ (ソフト及びセミハードに限る。) を対象食品として *L. monocytogenes* の規格基準が策定された⁸⁾。それに伴い、サンプリング数も国際的基準にハーモナイズするように変更された。今後このような改正が続くと思われるが、n数が増えた場合には、従来のサンプリングプランと比較し、より多大な時間、費用および労力が課されることになる。そこで、簡易かつ検出感度の高いサンプリングプランが求められると考えられる。

本分担研究では、以下の3項目について実施した。

第一は日本のサンプリングプランの妥当性の有無を、代替病原微生物として蛍光ラテックスビーズ (F-LB) を用いて検討する。

第二はサンプル・プーリング法のプレエンリッチメント法とプール法を応用し、食中毒菌であるサルモネラを対象として、RTE食品であるネギトロから検出することが可能か検討する。

第三は対象食品をカット野菜に替え、サンプル・プーリング法が応用性を検討する。

B. 実験方法

1. 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) を用いた日本のサンプリングプランの妥当性評価

1.1 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) の検出限界の検討

Latex beads amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green (1.0 μ m ϕ , MKBK3507, 4.5 \times 10⁷/ml, SIGMA) を食中毒起因微生物として使用した。食品検体として、牛肉を用いた。最適な励起波長Exおよび蛍光波長Em) を決定し、10 μ l のF-LBを緩衝ペプトン水 (BPW)、肉エキス、Milli Qのそれぞれ4 mlを希釈液として4倍希釈し、最強強度の検出限界を求めた。

1.2 F-LBの検体への塗布量の検討

牛ミンチ肉25gに0、1、2、5、12.5 μ lを

塗布し、各々ストマッカー袋に入れ、1袋につきBPW225mlを入れ、ストマッキングし、4 $^{\circ}$ C、3,000rpmで遠心分離した。その中間層を、注射針を用いて採取し、蛍光強度を測定した。

1.3 F-LB分布の不均一性の検討

牛ブロック肉1kgを4ブロック用い、3ブロックにF-LBの塗布箇所数を変えて塗布した。1ブロック肉は対照とした。10 μ lを1箇所塗布したものを低汚染検体とした (4.5 \times 10⁵F-LB/kg)。10 μ lを2箇所塗布したものを中汚染検体とした (9.0 \times 10⁵F-LB/kg)。10 μ lを5箇所塗布したものを高汚染検体とした (2.0 \times 10⁶F-LB/kg)。それぞれをミンチ製造機でミンチ状にし、ストマッカー袋に25gずつ分注し、使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。25gにつきBPW225mlを入れ、ストマッキングした。4 $^{\circ}$ Cで3,000rpm 15分で遠心分離した後、その中間層 1mlをMilli Q4mlで希釈し、蛍光光度Ex 480nm, Em479nmで測定した。非汚染牛ブロック肉は対照とし、同様の作業を行った。

2. dサルモネラ接種ネギトロを用いたプレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価

2.1 供試材料および供試菌株

供試材料：市販ネギトロ：神奈川県の小売店でH26年9月9日～12月7日に韓国、フィジー、台湾産ネギトロを購入した。何れの消費期限も2日間であった。

供試菌株：

- ・食中毒菌

Salmonella Infantis1383-1 (鶏肉由来)

- ・ネギトロ由来夾雑菌

Escherichia coli

Citrobacter braakii

2.2 サルモネラおよび夾雑損傷菌の作製方法 (損傷度)

食品中に存在する微生物は流通、保管等において何らかの損傷を受けているため、本実験で使用する接種菌については、損傷を与えたサルモネラおよび夾雑菌を用いた。*Salmonella* Infantis 1383-1 を Brain Heart Infusion (BHI) で35°C、24h培養後、ブロックヒーター (EYELA MG-2000) を用いて、スパイクプロトコール (annex D in draft ISO 16140-2) に基づいて50°C、15分加熱処理を行った⁹⁾。損傷菌の評価は加熱処理した増菌培養液をDHL選択培地とSPC非選択培地を使用して菌数を測定し、それらの相違が 0.5 log CFU以上であれば損傷菌と判定した。夾雑菌については2菌種を等

量混合した後に加熱処理を行い、サルモネラへの処理と同様に実施した。

2.3 夾雑菌の分離、同定方法

夾雑菌はネギトロ10gを用いたサンプリング法の検討時に、DHL培地とCHS培地上に高頻度に分離された集落について、アピ^o 20 (日本ビオメリュー) を用いて同定試験を行った後に、本実験に用いた。

2.4 ネギトロ10gを用いたプレエンリッチメント法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=4)

実験はdサルモネラ摂取量が 10^1 、 10^0 、 10^{-1} CFU/gとした3群でおこなった。それぞれの群でネギトロ10gを6検体採取し、それぞれストマッカー袋に入れた。6つのストマッカー袋のうち1つのストマッカー袋に、1g当たりdサルモネラの菌数をそれぞれ 10^1 ～ 10^{-1} CFUに調整し接種した後に、BPWを90mlずつ加えて、37°C、22±2時間培養した。培養後、各ストマッカー袋からBPW0.1mlを60mlのRV培地、1mlを60mlのTT培地に加えて42°C、22±2時間培養した。その後、各増菌培養液10μlをDHLとCHSに画線し37°C、22±2時間培養しコロニーの有無を確認し、サルモネラと疑われるコロニーについてはサルモネラ免疫血清を用いて血清学的試験を行った。ネギトロの細菌数は試料原液

を用いて標準寒天培地で37°C、48時間培養後、発育した集落数から算出した（図1）。

2.5 ネギトロ10gを用いたプール法によるdサルモネラの検出方法の検討（n=4）

プレエンリッチメント法と同様にサンプリングをした後に、1つのサンプルにdサルモネラを接種した後に、三角コルベンに60gを集めBPW540mlを加え、37°C、22±2時間培養した。以下、サルモネラの確認についてもプレエンリッチメント法と同様に行った（図2）。

2.6 夾雑菌のdサルモネラ検出率への影響についての検討（10g、n=1）

各サンプリング法と同様にネギトロを採取し、1つのストマッカー袋に、1g当たり dサルモネラの菌数をそれぞれ $10^0 \sim 10^{-3}$ CFUの4群に調整した後に、夾雑菌も合わせて $10^3 \sim 10^5$ CFUになるようにそれぞれ接種し、プレエンリッチメント法とプール法でdサルモネラの検出を行った。

2.7 ネギトロ25gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出方法の検討（n=4）

サンプリング量を25gとして10gの場合と同様にdサルモネラを接種し、各サンプル・プーリング法による検出方法の検討を行っ

た。

3. dサルモネラ接種カット野菜を用いたプレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価

H25年度にF-LBで得られたデータを基に、ネギトロではn=6で検討をしたが、国際的なサンプリングプランではn=5を採用している場合が多いため、RTE食品のカット野菜では、n=5の条件でプレエンリッチメント法とプール法の妥当性を評価した。

3.1 供試材料および供試菌株

市販カット野菜：平成27年10月10日～平成28年1月12日に小売店で茨城、北海道、愛知、秋田産カット野菜（キャベツ）を購入した。何れの消費期限も4日間であった。

供試菌株：

Salmonella Infantis1383-1（鶏肉由来）
損傷サルモネラの作製方法は、ネギトロで実施した方法と同様に行った。

3.2 カット野菜10gを用いたプレエンリッチメント法によるdサルモネラの検出方法の検討（n=5）

実験は dサルモネラ接種量が 10^1 、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} CFU/gとした4群で行った。それぞれの群でカット野菜10gを5検体採取し、ストマッカー袋に入れた。5つのストマッカー

袋のうち1つのストマッカー袋に、1g当たりdサルモネラの菌数をそれぞれ $10^1 \sim 10^{-2}$ CFUに調整し接種した後に、BPWを90mlずつ加えて、37°C、22±2時間培養した。培養後、各ストマッカー袋からBPW0.1mlをRV選択増菌培地50ml、1mlをTT選択増菌培地50mlに加えて42°C、22±2時間培養した。その後、各増菌培養液10 μ lをDHLとCHSに画線し37°C、22±2時間培養しコロニーの有無を確認し、サルモネラと疑われるコロニーについてはサルモネラ免疫O血清を用いて血清学的試験を行った。カット野菜の細菌数は試料原液を用いて標準寒天培地で37°C、48±2時間培養後、発育した集落数から算出した。

3.3 カット野菜10gを用いたプール法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=5)

プレエンリッチメント法と同様にそれぞれのカット野菜から5検体ずつ採取し、その1つにdサルモネラを接種した後に、1つの三角コルベンに50g 全てを集約し、BPW450mlを加え37°C、22±2時間培養した。以下、サルモネラの確認についてもプレエンリッチメント法と同様に行った。

3.4 カット野菜25gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出方法の検討 (n=5)

サンプル量を25gとして10gの場合と同様

にdサルモネラを接種し、両方法の検出方法の検討を行った。

C. 結果と考察

1. 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) を用いた日本のサンプリングプランの妥当性評価

1.1 蛍光ラテックスビーズ (F-LB) の検出限界

本実験で用いたF-LBの最適蛍光波長はEx480nm、Em 479nmで、牛肉の自然蛍光と区別ができたことから、F-LB特異的蛍光強度を測れることが可能となった。この波長における蛍光強度の検出限界はBPWで希釈した場合は256倍、牛肉エキスで希釈した場合は64倍、MilliQでの検出限界は1,024倍であり、MilliQで希釈して測定する方法が最も感度高く測定出来ることが分かった。以後、蛍光強度の測定には、検体をストマッキングした液をMilliQで希釈することとした。

1.2 F-LBの検体への塗布量の決定

牛挽肉25gに、F-LBを種々の濃度で塗布した結果、1 μ lの濃度でも蛍光強度は検出出来ることが分かった。この結果からF-LBの個数が 4.5×10^5 になるように10 μ lを塗布する検体を低汚染検体、中汚染では2箇所

の汚染、高汚染では5箇所をモデルとした。

1.3 F-LB分布の不均一性

F-LBで1-5箇所点汚染させた牛ブロック肉をミンチ状にして、手ごねした後、25gずつ分配し、それぞれをストマッカー袋に入れた。対照検体では31検体、低汚染検体では36検体、中汚染検体では32検体、高汚染検体では35検体となった。対照検体の蛍光強度は最小値190、最大値750.8、平均値561.8であった。このことから、最大値以上の800からF-LB特異的蛍光強度と評価することにした。低汚染検体から得られた36検体の測定結果を図3に示した。蛍光強度1000以上は2検体、900以上1000未満は1検体、800以上900未満は3検体の、計6検体（16%）が陽性であった。中汚染検体から得られた32検体の測定結果を図4に示した。1000以上は3検体、900以上1000未満は3検体、800以上900未満は1検体の、計7検体（22%）が陽性であった。高汚染検体では、図5に示したように、1000以上は6検体、900以上1000未満は4検体、800以上900未満は1検体の、計12検体（31%）であった。

これらの結果から、バッチ1kgから調製した測定用検体（25g）1検体のサンプリングプランでは、検体から汚染菌を検出する確率は低く、その検出確率は汚染量が少ない

ほど減少することが明らかになった。このことは、現在日本で主流となっているサンプリングプランは、実際の対象微生物の汚染分布推定結果から考察しても、母集団を代表する可能性は低いものと示唆された。

2. dサルモネラ接種ネギトロを用いたプレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価

2-1 dサルモネラおよび夾雑菌の評価

ネギトロに接種するサルモネラ、夾雑菌の*E. coli* と *C. braakii* の培養液を加熱処理し、それぞれDHL選択培地とSPC非選択培地を用いて菌数の相違を算出し、サルモネラの損傷度は1.5 log CFU、夾雑菌では1.41 log CFUであった。

2-2 ネギトロ10gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出（n=4）

10gを採取した場合のプレエンリッチメント法ではネギトロ中のdサルモネラ接種菌量が $10^1 \sim 10^{-1}$ CFU/g 何れの濃度においても検出することが可能であった。プール法では1回のみTT選択増菌培地を用いた場合、 10^0 と 10^{-1} CFU/gでdサルモネラを検出することが出来なかった。この検体の細菌数は 9.6×10^3 CFU/g と、他の3回行った検体と比較し約25倍高かったため、ネギトロ中の夾雑菌の汚染量がdサルモネラの検出

率に影響を及ぼしている可能性が考えられた（表1）。

2.3 夾雑菌のdサルモネラ検出率への影響 (n=1)

dサルモネラ低濃度汚染ネグトロに夾雑菌を種々の濃度接種し、各サンプル・プーリング法でdサルモネラの検出率を比較したところ、夾雑菌を 10^3 と 10^5 CFU/g 接種した検体では何れのdサルモネラ接種濃度においても検出をすることが出来たが、 10^4 CFU/g においては、RV選択増菌培地を用いたプレエンリッチメント法でのみ検出することが出来ない接種濃度が確認された（表2）。プレエンリッチメント法での不検出が夾雑菌濃度に比例していなかったこと、一度だけの実験であることから、再実験は必要であるが、TT選択増菌培地では、高濃度の夾雑菌においてもdサルモネラの検出に影響がなかったことから、ネグトロに含まれる夾雑菌は、dサルモネラの検出に重大な支障を与えないことが明らかになった。

2.4 ネグトロ25gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出 (n=4)

ネグトロにおいては夾雑菌の影響がほとんど無いことが明らかになったことから、サンプリング量を25gに増やし、4回実験を実施した。各回においてdサルモネラ汚染菌

量が 10^{-1} CFU/gであれば両サンプル・プーリング法において検出できることが確認できた。このことから、ネグトロを食品対象とする場合には、両サンプル・プーリング法には差が無いことが明らかになった（表3）。

我が国において生食用食肉、非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る。）の規格規準が策定され、それに伴い、サンプリング数も国際的規準にハーモナイズするように変更された。今後、食品の食中毒菌の衛生検査においては、複数の検体を採取することがより多く採用されることが考えられる。

そこで本研究において、より効率的で有効的な検査手法として報告されているサンプル・プーリング法の有用性を検証した。

いままでの報告によると、サンプル・プーリング法のうち、プール法は対象検体に含まれている夾雑菌の菌叢や菌量に影響を受けることが示唆されている¹⁰⁾。対象食品は、それぞれの国により独自のものがあるため、本法を他の食品に適用する際には、各食材において、夾雑菌の菌叢や菌量などを科学的に把握する必要がある。

本研究においては我が国で直接喫食する食材であり、食中毒菌の汚染や食中毒事例のあるネグトロとカット野菜を対象食品として、その有効性および実用性について、

比較検討を行った。

3. dサルモネラ接種カット野菜を用いたプレエンリッチメント法とプール法の妥当性の評価

RTE食品であるカット野菜の消費量は年々増加の一途をたどっているが、RTE食品を原因食品とする食中毒事件が海外では発生している^{11, 12)}。厚生労働省が実施している食品の食中毒菌汚染実態調査では、平成24年度にカット野菜から大腸菌が7.5%、カイワレヤやみつばからはサルモネラが検出されているため¹³⁾、日本のサンプリングプランが食に起因する健康被害を減少させるために、国際社会と調和を計るには、科学的根拠に基づきサンプリングプランのn数を設定しなければならない。

カット野菜においては、n=5の条件でプレエンリッチメント法とプール法の妥当性を評価した。

3.1 カット野菜10gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出 (n=5)

10gを採取した場合、各サンプリング法において5回中4回は、カット野菜中のdサルモネラ接種菌量が $10^1 \sim 10^{-1}$ CFU/g、何れの濃度においても検出することが可能であった。1回のみプール法ではRV選択増菌培地

を用いた場合の検出感度が 10^1 CFU/gであったが、TT選択増菌培地では 10^{-1} CFU/gまでdサルモネラを検出することが出来た(表4)。

3.2 カット野菜25gを用いた各サンプル・プーリング法によるdサルモネラの検出 (n=5)

サンプル量が10gにおいては、一部の濃度ではdサルモネラが検出されない場合も認められたため、我が国を初め世界各国で採用されているサンプル量を25gにして、5回実験を実施した。その結果、5回全てにおいてdサルモネラ汚染菌量が 10^{-1} CFU/g以上であれば、両方法において同等の検出感度であることが確認できた。このことから、カット野菜を対象食品とする場合では、両方法に差が無いことが明らかになった(表5)。

本研究においてサンプリング数が増加した場合でも、ネギトロとカット野菜においてはプレエンリッチメント法とプール法の適用が可能であることが確認された。本法を他の食品に適用する際には、夾雑菌の菌叢や菌量などを科学的に把握し、使用する選択増菌培地、選択分離培地を数種類用いることにより、効率的かつ簡易に検査が可能になると考えられた。

D. 結論

食中毒起因微生物の検体中に存在する特定汚染菌の分布を簡便に測定できる手法を、食中毒起因微生物の代替に蛍光ラテックスビーズ (F-LB) を使うことによって構築した。この手法により少量かつ局在汚染した微生物が、検体処理で混合した後、どの程度汚染に不均一性があるか、それが陽性検出率にどのように反映するかを推定することが可能となった。本研究では牛肉ブロックを用いたモデルに応用し、少なくとも 4.5×10^5 個/kgの汚染があった場合では、検体数として複数検体数の必要性が示唆された。

次に複数検体が衛生管理検査に必要となった場合、効率的にその検査を遂行することが求められる。サンプル・プーリング法は、多検体を一つにまとめる工程を検査手順の中にいれ、作業の効率化を目指す手法である。方法としては、前増菌培養は個々に行いそれぞれの培地から一部をとり、本培養で一本化するプレエンリッチメント法と、多検体を前増菌培養から一本化するプール法がいままで報告されている。しかし、プール法は、プレエンリッチ法よりも簡便ではあるが、食材中の夾雑菌の影響を受けやすいとの報告があるため日本で食中毒事例のあるRTE食品のネギトロとカット野菜を用いて、食中毒菌であるサルモネラ

を検出することが可能か検討をした。その結果、プレエンリッチメント法とプール法、何れのサンプル・プーリング法を用いても、ネギトロでは汚染菌量が 10^{-1} CFU/g 以上であれば検出できることが確認された。

カット野菜においてもネギトロと同様に、汚染菌量が 10^{-1} CFU/g であれば両サンプリング法において同等の結果が得られた。

今後、それぞれの食材により夾雑菌の影響がことなることから、サンプル・プーリング法を用いる場合には、検証することが必要であることが示唆された。

E. 文献

- 1) 食品安全管理における微生物学的検査基準と設定の考え方 ICMSF/編 春日文子/監訳 小久保彌太郎/監訳 島原義臣/監訳 中央法規出版
- 2) Corrigendum to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of November 2005 on microbiological criteria for foodstuff.
- 3) COMMISSION REGULATION (EU) No 209/2013 of 11 March 2013. Amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat. Official Journal of the

- European Union. 12. 3. 2013.
- 4) BAM:Food Sampling/preparation of Sample Homogenate. April 2003.
- 5) September 2012. FSIS *Salmonella* Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products.
- 6) FSIS: Compliance Guidelines: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. January 2014.
- 7) 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について、食安発 0912 第 7 号平成 23 年 9 月 12 日
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：リステリア・モノサイトゲネスの検査について、平成 26 年 11 月 28 日、食安発 1128 第 3 号
- 9) Kirsten Mooijman、ISO and CEN activities for *Salmonella*, Technical issues workshop 2011 110519
- 10) W. R. PRICE, R. A. OLSEN, and J. E. HUNTER APPLIED MICROBIOLOGY, Apr. 1972, p. 679-682 Vol. 23, No. 4 *Salmonella* Testing of pre-enrichment Broth Cultures for Screening Multiple Food Samples.
- 11) Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A., Mitchell, R.T. J Food Prot. 2003 Mar;66(3):403-9. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis.
- 12) Vestrheim, D.F., Lange, H., Nygård, K., Borgen, K., Wester, A.L., Kvarme, M.L., Vold, L.. Epidemiol Infect. 2015 Nov 20 : 1-5. Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of *Salmonella* Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013.
- 13) 平成 26 年度食品の食中毒菌汚染実態調査の結果について、食安監発 0327 第 13 号、平成 27 年 3 月 27 日
- F. 健康危害情報
なし
- G. 研究発表
学会発表
- 1) 石崎直人、小西良子、食品の食中毒起因微生物検査に係るサンプリングプランのモデリング、日本防菌防黴学会第 41 回年次大会、2014 年 9 月 14 日、東京。

- 2) 石崎直人、小西良子、食品の食中毒起因微生物に係わるサンプリングプランのモデリング、第36回日本食品微生物学会学術総会、2015年11月12日、東京。

H. 知的所有権の取得条件

なし