

図1. プレエンリッチメント法を用いたdサルモネラの検出方法

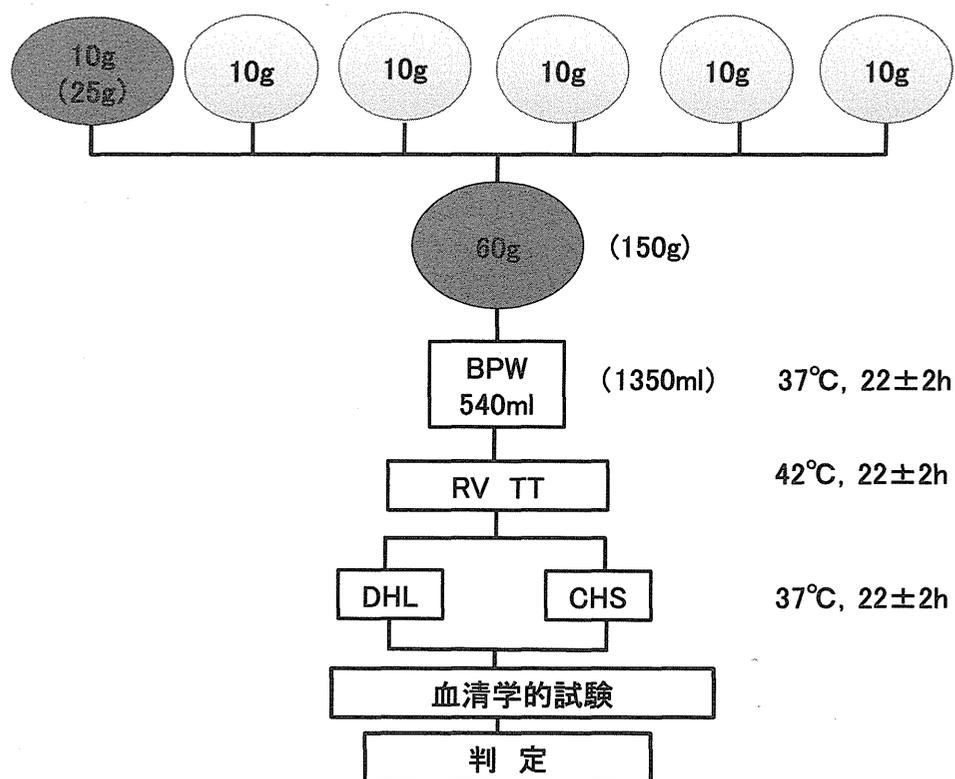
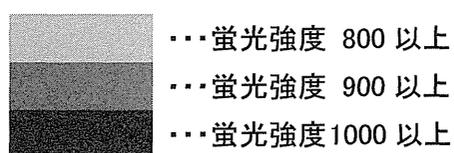


図2. プール法を用いたdサルモネラの検出方法

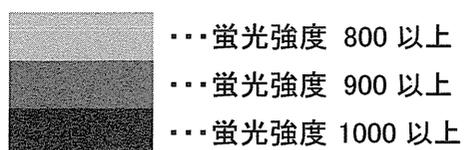
778.4	766.3	592.8	406.7	475.5	681
361.9	617.9	677.2	674.5	237.8	282.8
477.4	352.7	213.6	257.6	476.4	491.2
879.5	871.3	424.6	979.3	559.1	812.2
793.9	330.3	1112	721.7	309.2	413.2
250.8	723.5	483.3	624.3	468.2	1005

図3. 低汚染検体 (10 μ l, 1点汚染) の検体ごとの蛍光強度 (n=36)



588.7	584.8	924.5	502.5	564.9	558.2
707.1	709.7	1101	1147	492.9	480.5
756.1	752.9	861.9	1066	469.8	395.9
663.2	746.7	698.4	708.7	663.7	677.9
680.4	668.7	994.7	956.5	583.7	563.9
581	577.2				

図4. 中汚染検体 (10 μ l、2点汚染) の検体ごとの蛍光強度 (n=32)



580.5	655.7	632.9	646	560.2	481.9
628.2	547.8	598.2	612.3	657.1	776.9
765.1	1047	936.2	582.2	1316	563.4
791.1	1055	1158	1181	721.8	1063
937.3	775.7	566.8	604.4	624.4	996.3
648.3	895.7	717.4	926.2	708.3	

図5. 高汚染検体 (10 μ l、5点汚染) の検体ごとの蛍光強度 (n=35)

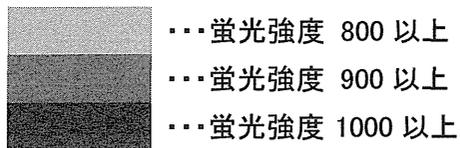


表1 ネギトロ10gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果(n=4)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 $9.6 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 $3.0 \times 10^2/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 $2.0 \times 10^2/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 $6.5 \times 10^2/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

表2 夾雑菌の各サンプル・プーリング法へ及ぼす影響(10g、n=1)

接種レベル CFU/g	夾雑菌 10 ³ CFU/g								ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-				
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-				

接種レベル CFU/g	夾雑菌 10 ⁴ CFU/g								ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-				
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-				

接種レベル CFU/g	夾雑菌 10 ⁵ CFU/g								ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+				
10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-				
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-				

表3 ネギト口25gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果(n=4)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 $7.5 \times 10^2/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 $6.7 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 $4.5 \times 10^2/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 $6.2 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				

表4 カット野菜10gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果(n=5)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 4.8×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 7.6×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 3.2×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 7.9×10^4 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

5

接種レベル CFU/g	細菌数 2.0×10^3 /g												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

表5 カット野菜25gを用いた各サンプル・プーリング法の検出結果(n=5)

1

接種レベル CFU/g	細菌数 $1.9 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

2

接種レベル CFU/g	細菌数 $7.1 \times 10^4/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

3

接種レベル CFU/g	細菌数 $5.8 \times 10^4/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

4

接種レベル CFU/g	細菌数 $4.8 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

5

接種レベル CFU/g	細菌数 $1.5 \times 10^3/g$												ネガコン			
	プレエンリッチメント				プール				ポジコン				RV		TT	
	RV		TT		RV		TT		RV		TT		DHL	CHS	DHL	CHS
サルモネラ	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	DHL	CHS	-	-	-	-
10^1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

総合研究(分担)報告書

I. 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
—欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法について情報収集—

II. エンテロトキシン産生性／非産生性ウェルシュ菌の
遺伝子検出法の開発と汚染実態調査

久米田 裕子

平成 25～27 年度 厚生労働科学研究費補助金（食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

I. 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
-欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての情報収集-

II. エンテロトキシン産生性／非産生性ウェルシュ菌の
遺伝子検出法の開発と汚染実態調査

研究分担者 久米田 裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

研究協力者 川津 健太郎（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

研究協力者 余野木 伸哉（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

検疫時の検査はわが国の食品衛生法の微生物規格基準に基づき実施されているが、今後、国際社会との協調・調和を進めるために、わが国の食品微生物規格のあり方を再検討することも必要である。平成 25 年度は食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集した。EU もアメリカも規格基準には二階級法のサンプリングプランと試験法が設定されており、さらに n 数が多い検査にはサンプル・プーリングの採用が検討されていた。平成 26 年度と 27 年度は、国内で発生した細菌性食中毒の原因究明に役立てるため、ウェルシュ菌に焦点を当て、日常の食中毒検査に使用できる病原因子の遺伝子検出法を構築した。本マルチプレックス PCR 法は、CPE (*C. perfringens* enterotoxin) 遺伝子に加え、BEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) a、BECb、そしてウェルシュ菌 α 毒素の PLC (phospholipase C) 遺伝子を同時に検出可能で、感度と特異性に優れていた。この方法等を使用し、食品やヒト糞便の汚染実態調査を実施した結果、乾しいたけでは 19.2% (5 検体/26 検体) からウェルシュ菌が分離され、そのうち 3.8% (1 検体) が CPE 産生菌であった。市販コショウでは 26.6% (4 検体/15 検体) からウェルシュ菌が分離されたが CPE 産生菌は分離されなかった。直接培養法でヒト糞便中のウェルシュ菌保菌率を調べた結果、29.5% (129 CPE/437 検体) がウェルシュ菌を保菌しており、その中で 2.2% (10 検体) のヒトが CPE 産生菌を、0.2% (1 検体) のヒトが BEC 産生菌を保菌していた。増菌培養法でウシ糞便中のウェルシュ菌保菌率を調べたところ、44.4% (40 検体/90 検体) が保菌していたが、CPE 産生菌も BEC 産生菌も分離できなかった。

I. 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 -欧米の微生物規格とサンプル・プーリング法についての 情報収集-

はじめに

平成 24 年度のカロリーベースにおける日本の食料自給率は 39%であり¹⁾、食料の多くを輸入食品に依存している状況にある。また、現在交渉中の TPP 経済連携協定が締結されれば、諸外国からの輸入食品がさらに増加すると予測される。食中毒を発生させない、すなわち微生物学的に安全でかつ高品質な食品を国民に提供するためには、輸入食品の検疫時に十分な衛生規制を実施する必要がある。現在、検疫時の検査はわが国の食品衛生法の微生物規格基準に基づき実施されているが、今後、国際社会との協調・調和を進めるためには、わが国の食品の微生物規格のあり方を再検討することも必要である²⁾。今年度は食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集したので報告する。また、EU において、n 数が多い検査にサンプル・プーリング法の採用を検討していたので、併せて報告する。

A. 微生物規格の国際動向

1996 年に採択された WTO（世界貿易機関）の衛生植物検疫措置の適用に関する

協定 (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary, 通称 SPS 協定) により、WTO 加盟国が、輸入食品に対し自国内での食品の安全のためにとる措置については、「科学的見地から行われたリスク評価の結果作られた国際規格」に基づいて行わなければならないとされている。この「科学的見地から行われたリスク評価の結果作られた国際規格」とは、すなわち「コーデックス規格」であり、従って、WTO 加盟国はコーデックス委員会が作成する微生物リスク評価のガイドラインに従ってリスク評価を行い、自国の微生物規格を策定しなければならないということになる^{3), 4)}。

しかし、わが国の食品衛生法では、食中毒起因微生物に関しては、規格基準のないものが多く、調理済み (ready-to-eat, RTE) 食品から検出された場合のみ、6 条違反で対応しているのが現状である。また、欧米ではロットあるいはバッチの検査を実施する際には、いわゆるサンプリングプランが取り入れられている。サンプリングプランは、International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) が提唱する考え方が基本になっており、HACCP や FSO (Food Safety Objective, 摂取時安全目標) などのリスク管理の手法を取り入れ、統計学的解析に基づいて設定されている^{5), 6)}。コー

デックス規格にも採用されているが、わが国では平成 24 年に作成された生食用食肉の規格基準で初めて採用されたばかりでまだまだ実績が浅い（表 1）。

そこで、諸外国の現状を把握するため、特に EU とアメリカを対象に、食中毒起因細菌の微生物規格について情報収集を行った。

B. EU とアメリカの微生物規格基準

食中毒起因細菌の代表として、サルモネラ、リステリア・モノサイトゲネス、腸管出血性大腸菌 (STEC) の EU とアメリカの規格基準を調査したので、一例を示す（表 2、表 3）。

EU は上述のコーデックス委員会が作成するガイドラインに従って科学的根拠に基づくリスク評価^{8), 9), 10)}を実施し、製品やロットの合否を判定されるものとして規格基準を作成している^{11), 12), 13)}。規格基準にはサンプリングプランと試験法が規定されている。食中毒起因細菌の場合のサンプリングプランは通常、二階級法 (two-class sampling plan) が採用され、n, c, m で規定されている。n は 1 ロットからランダムに採取される検体の数、c はロットを合格と判定するのに許容される不良検体の数 (n のうち、m を超えてもよい検体の数)、m は 1 検体に許容される微生物濃度 (基準値) を示す。数的指標に基づくリスク管理がベースと

なっているので、摂取するヒトの年齢等により病原菌に対するリスクが異なる事実が反映され、同じサルモネラやリステリア・モノサイトゲネスであっても、乳幼児用食品は規格基準が厳しく設定されている。また、その食品中で菌が増殖するのかもしれないのかにより食品が分類され、さらに、その規格基準をフードチェーンのどこに設定するかも (製造者の管理から離れる時点か、店頭販売時なのかなど) 規定されている。

アメリカの FDA と FSIS (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science) も EU と同様に規格基準あるいはガイドラインにはサンプリングプランと試験法が規定されている^{14), 15), 16), 17), 18), 19), 20), 21)}。EU 同様、摂取するヒトのリスクと食品の種類 (消費までの間に殺菌工程があるか否か、菌が増殖する食品であるか否かなど) によって、カテゴリーが分けられ、規格基準が設定されている。食中毒起因細菌の場合のサンプリングプランは二階級法が採用され、EU と異なり、リステリアであっても検査単位で「陰性」、つまりゼロトレランス (zero tolerance) 方式が採用されている。

FDA の場合、実際の検査においては、 $25\text{g} \times 15 = 375\text{g}$ 、 375g を 1 サブサンプルとする方法で実施している。すなわち、

サルモネラを例にとると、カテゴリーIの $n=60$ の場合、15 サンプルを混合し、375g にする (1 サブサンプル)。それに前増菌培養液を9倍量加えて培養して検査する。それを4サブサンプル実施することで、 $n=60$ としている。

C. サンプルングプランにおいてサンプル数 n の意味すること²²⁾

通常、前増菌培養を取り入れた試験法では、サンプル中に1個の菌が存在すれば (発育阻害物質の影響や損傷菌・競合菌の影響を考慮に入れない場合)、理論的には検出可能である。その結果、低い汚染レベルにおいては、検出確率は、試験するサンプル単位 (例えば、25 g) の数に依存する。図1は、サンプル数が $n=5$, $n=25$, $n=80$ の時の菌の病原菌汚染レベル (25g 中の汚染率で表示) と欠陥 (陽性) ロットの見逃し確率の関係を示したものである (ICMSF のサンプルングプラン二階級法に基づく)。この関係は、25 g あるいは 50 g のサンプルが、十分に混合されたロットから採取されたものでロットを代表するものという前提にたつ。過去に発生した発芽野菜が原因のサルモネラ・ハバナの集団食中毒では最大でも種子 1 kg 中 4 cfu の汚染濃度 (0.1 個/25 g) であった。図1の青線 ($n=5$, 25 g) と赤線 ($n=25$, 25 g) に示したように、 $n=5$ と $n=25$ のサンプルングプラン

(それぞれ 125 g と 625 g) に基づくと、「サルモネラ陽性である」種子のロットの合格率 (サルモネラ陰性となる) はそれぞれ理論上、約 60% と約 7% となる。 n 数が多いほど、検査結果の信頼度が高くなるため、わが国の $n=1$, $c=0$, $m=0/25$ g ではロットの合否判定として信頼度が低いということになる。

D. サンプルングプランにおけるサンプル・プーリング法の実用性

1 ロットあるいは1バッチの食品中に存在する病原微生物は、かなり低い濃度で、かつ不均一に分布しているものと考えられる。そのため、食品中から病原菌を検出するためには、一般的に多くのサンプルを試験する必要がある。しかし、リスク評価に基づくサンプルングプランで理論的に $n=60$ が必要とされても、実際の検査を実施するには多大な費用と労力が課されることになる。そこで、サンプル・プーリングという方法が検討されているので紹介する。

サンプル・プーリング法にはドライ・プーリング (dry pooling) とウェット・プーリング (wet pooling) という2種類の方法がある²²⁾。ドライ・プーリングとは、試験前にサンプル単位を混合する方法である。例えば、25 g ずつ 10 サンプルの試験を行うところを、サンプルを混合し、250 g を 1 サンプルとして試験

を行う方法を指す。ウェット・プーリングとは、例えば、25 g の個々のサンプルに 225 ml の前増菌培地（サルモネラであれば buffered pepton water, BPW）を加えて一晚培養し、その後、それぞれのサンプルから少量（5 ml）の増菌液を採取して混合し、その後は 1 サンプルとして以降の試験を行う方法である。

アメリカで採用している 25 g×15=375 g をサブサンプルとして検査する方法は、このドライ・プーリングに当たる。さらに、FSIS の “Beef Trimmings for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC)” のガイドラインでは、ウェット・プーリングについても次のとおりに言及されている。「検査費用を節約するため、多検体を増菌培養後、‘プール’してもよい。しかし、その場合は、陽性検体の増菌培養液が陰性検体の増菌培養液で希釈されるため、ウェット・プーリング法を実施しても STEC の検出感度を低下させないということを保証する必要がある。」

EU でも最近、以下のとおり、サンプル・プーリング法が注目されている。EU Regulation No 2073/2005 では、鶏肉中のサルモネラは陰性と規定された。新しい規格基準によると、25 g の鶏肉を 5 検体検査し、サルモネラ・ティフィムリウム（一相 monophasic 含む）とサルモネラ・エンテリティディスが陰性でなくてはな

らないとされた。その規格が設定された後、複数の EU の食品検査機関から、5 検体のサンプルをひとつずつ検査するのではなく、ひとつにまとめて検査できないかという問い合わせが EU Member States (DG-Sanco) にあった²³⁾。残念ながら、鶏肉をプーリングした場合のサルモネラの検出感度を調べた報告はなかったため、EURL for Salmonella の研究室でこの実験に取りかかることとなった。この実験は統計に関する ISO ワーキンググループが作成したサンプル・プーリングのドラフトプロトコール (ISO/TC34/SC9 WG2 (Statistics)) に基づいて実施された。実験の詳細²²⁾は参考資料として平成 25 年度報告書に示した。

Price ら (1972 年)²⁵⁾ は粉ミルク、卵白、ココア、小麦を用いたサルモネラ試験においては、ウェット・プーリングの方がドライ・プーリングより検出率が高かったと報告している。ドライ・プーリングとウェット・プーリングの検出率の相違は、標的病原菌の汚染レベルが低く、バックグラウンド菌叢の汚染レベルが高い場合に大きくなることが予想される。一般的に病原菌の汚染は均一ではなく、25g 中に 1 個しか病原菌が存在しない可能性もある。もし、このサンプルと病原菌がない残りの 9 サンプルを混合した場合、病原菌は「10 倍希釈」されるだけでなく、バックグラウンド菌叢が「10

倍増加」する。両方の影響により、特に損傷している病原菌の場合は発育が難しくなり、蘇生に長時間かかる。つまり、これが、多量のサンプルから汚染レベルが低い病原菌を検出するのが困難となる理由である。以上を考えると、ウェット・プーリングの方が代替法として適していると推察される。この方法の場合は、サンプル量は少ないままであるので、病原菌は前増菌培地の中で検出可能なレベルまで発育することができる。その前増菌培養した培地をプールした場合、病原菌はすでに十分発育しているので混合しても検出しやすい。さらに、ウェット・プーリングでは前増菌培養した個々のサンプルを冷蔵庫に保存できるので、プールした増菌培地から病原菌を検出した場合、必要があれば前の段階にもどって再試験することもできる。

プーリング法は以上のように試験法の検出感度に影響を与えるため、プールするサンプル数がどこまで可能か等を検討し、必ずそのプロトコルの妥当性を評価する必要がある。しかし、サンプルをプールし、サンプルを扱いやすい数に減らすことは、労力的にも経済的にも合理的である。ドライ・プーリングとウェット・プーリングは妥当性評価を試みるだけの価値が十分存在すると考えられた。

E. 結論

食中毒起因微生物を中心に、欧米の微生物規格とサンプリングプランについて情報収集した。EU もアメリカも規格基準には二階級法のサンプリングプランと試験法が設定されていた。また、n 数が多い検査にサンプル・プーリングの採用が検討されていた。サンプル・プーリング法にはドライ・プーリング(dry pooling)とウェット・プーリング(wet pooling)という2種類の方法があった。どちらの方法であってもプーリング法は試験法の検出感度に影響を与えるため、プールするサンプル数がどこまで可能か検討するなど、必ずそのプロトコルの妥当性を評価する必要がある。サンプルをプールし、サンプルを扱いやすい数に減らすことは、労力的にも経済的にも合理的である。ドライ・プーリングとウェット・プーリングは妥当性評価を試みるだけの価値が十分存在すると考えられた。

II. エンテロトキシン産生性／非産生性ウェルシュ菌の遺伝子検出法の開発と汚染実態調査

A. 研究目的

ウェルシュ菌は食中毒の原因菌の一つであり、ヒトや動物の腸管内に常在し、食肉や魚介類、野菜などの多くの食品を汚染する。これまでウェルシュ菌食中毒の発生に、病原因子としてCPE

(*Clostridium perfringens*

Enterotoxin)が不可欠とされていた。ところが、平成22年に大阪市のホテル、23年に栃木県のホテルで発生した事例で、CPEを産生しないウェルシュ菌による集団食中毒事例が発生し、病原因子として新型エンテロトキシンBEC (Binary Enterotoxin of *Clostridium perfringens*) が同定された²⁷⁾。

そこで平成 26 年度は、日常の食中毒検査に使用するため、従来の病原因子である CPE (*C. perfringens* enterotoxin) 遺伝子に加え、BECa、BECb、そしてウェルシュ菌 α 毒素の PLC (phospholipase C) 遺伝子を検出する PCR 法を構築した。さらに平成 27 年度はそれらを同時に検出できるマルチプレックス PCR 法を開発した。

また、構築した PCR 法を使用し、乾しいたけなどの乾燥食品の汚染実態調査、ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌 (エンテロトキシン産生性および非産生性) の保菌調査を実施したのであわせて報告する。

B. 研究方法

1. マルチプレックス PCR によるウェルシュ菌エンテロトキシン CPE 遺伝子と新規エンテロトキシン BECa および BECb 遺伝子の同時検出法の開発

1-1. 使用菌株

- ウェルシュ菌：CPE 遺伝子陽性株 10 株 (NCTC8239, NCTC8798, 食中毒患者便分離株 8 株)、BECa および BECb 遺伝子陽性株 3 株 (OS1, TS1, ヒト糞便分離株 1 株)、エンテロトキシン陰性株 33 株 (JCM1290, JCM3816, JCM3816, JCM3817, JCM3818, JCM3819, GTC15081, ヒト糞便分離株 27 株) を使用した。
- ウェルシュ菌以外のクロストリジウム属菌：*C. aceticum*, *C. difficile*, *C. sporogenes* などレファレンス株 15 菌種 21 株を使用した (詳細示さず)。
- クロストリジウム属以外の菌種：80 菌種 145 株を使用した (詳細示さず)。

1-2. DNA 抽出法

Yamazaki らの方法により、アルカリ熱抽出法を使用した²⁸⁾。すなわち、1 μl ループの菌体を 50 μl の 25 mM NaOH に懸濁し、95°C 5 分間加熱後、4 μl の 1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で中和した。そして、15,000 rpm で 5 分間遠心後、その上清を PCR のテンプレートとした。

1-3. シングル PCR 法

PCR：PCR 反応液は、Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) と各 0.8 μM のプライマー (表 4) を用いて、24 μl 容量で調整し、DNA 抽出液を 1 μl 加え、最終容量を 25 μl とした。反応条件は、94°C, 1 分 → (98°C, 10 秒 → 55°C, 30 秒 → 72°C, 1

分) ×30 cycle →72°C, 10分とした。

1-4. マルチプレックス PCR 法

PCR反応液は、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit(QIAGEN)に、表4のと通りのプライマーを加えて、24 µl容量で調整し、DNA抽出液を1 µl加えて最終容量を25 µlとした。プライマーの濃度は、*becA*と*becB*は0.2 µM、*pIc*と*cpe*は0.4 µMとした。反応条件は、95°C, 5分→(95°C, 30秒→60°C, 90秒→72°C, 30秒) ×30サイクル→68°C, 10分とした。PCR産物は2.5~3.0%のアガロースゲル電気泳動でそれぞれの大きさを確認した(表4, 図2)。

1-5. マルチプレックス PCR 法の感度

CPE 遺伝子陽性株として *C. perfringens* NCTC8239、BECaおよびBECb 遺伝子陽性株として *C. perfringens* OS1 を使用し、本PCR法の感度を測定した。すなわち、両菌をチオグリコレート(TGC)培地(ニッサイ)を用いて、37°Cで一夜、嫌気培養し、その菌液を TGY (3% Trypticase soy, 2% D-glucose, 1% yeast extract (BD), 0.1% L-cystein) 培地に接種した。37°Cで一夜、嫌気培養後、培養液をTGY培地で10倍段階希釈し、それぞれの希釈段階で菌数を測定した。また、PCRのテンプレートとしては、各10倍段階希釈液1 mlを遠心後集菌し、1-2の方法に従いDNAを抽出し、本PCR法を実施した。

1-6. マルチプレックスPCR法の特異性

1-1に記載した合計102菌種187株を使用し、本PCR法を実施し、特異性を確認した。

2. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染実態調査

2-1. 材料

平成25年12月から平成26年8月にかけて、大阪府内7ヶ所の量販店で乾しいたけ26検体(原木栽培22検体、菌床栽培4検体)、輸入コシヨウ15検体(白コシヨウ4検体、黒コシヨウ9検体、白黒混合コシヨウ2検体)を購入し、供試材料とした。

また、平成25年6月に大阪府内のと畜場において、解体後の牛直腸40検体から、スワブを無菌的に採取し、供試材料とした。牛直腸スワブは5都道府県、9農家で飼育された牛から採取した。

2-2. 方法

1) 食品からのウェルシュ菌分離法

乾しいたけ等の食品については、食品10gをストマッカー袋に無菌的に採取し、液体チオグリコレート培地(栄研)90mlを加え、80°C、10分加熱処理後、42°Cで18±2時間、嫌気培養した。培養後、その増菌液一白金耳をカナマイシン不含卵黄加CW寒天培地(栄研)に塗抹し、42°Cで18±2時間、嫌気培養した。判定は、CW寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーが検

出された検体を推定ウェルシュ菌陽性とした。推定ウェルシュ菌は、3) の記載どおり、 α 毒素遺伝子 (*plc*) をターゲットとしたPCRでウェルシュ菌であることを確認した。PCRで*cpe*遺伝子と*becA*および*becB*遺伝子の保有を確認し、*cpe*遺伝子陽性の株についてCPE産生性をPET-RPLA(デンカ)を用いて確認した。

さらに、増菌培養液から直接、*plc*、*cpe*、または*becAB*遺伝子の検出を試みるため、増菌培養液1 mlを1.5 ml遠心チューブに移し、15,000 rpm、5分間遠心し、上清を除去した。次に、前述のアルカリ熱抽出法で芽胞あるいは栄養体のDNA抽出を行った²⁸⁾。

3. ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌保菌調査

3-1. 材料

3-1-1. ヒト糞便

平成26年から27年にかけて、当所に搬入されたヒト糞便437検体(健康人とウェルシュ菌食中毒以外の有症苦情ヒト糞便)を使用した。

3-1-2. ウシ糞便

平成26年に大阪府内の食肉処理施設に生体で搬入された肉用牛の直腸スワブ90検体を使用した。

3-2. ウェルシュ菌の分離方法

3-2-1. ヒト糞便

カナマイシン添加卵黄加CW寒天培地

(CW寒天培地, ニッスイ) に糞便を直接塗抹し、42°Cで一晩嫌気培養した。培養後、CW寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、マルチプレックスPCRを実施した。CPE遺伝子を検出した菌株についてはPET-RPLA(デンカ生研)を用いてCPE毒素の産生を確認した。

3-2-2. ウシ糞便

直腸スワブを液体チオグリコレート培地(栄研化学) 10 mlに接種し、80°C、10分間加熱処理後、42°Cで一晩嫌気培養した。次に、液体チオグリコレート培地の増菌液を一白金耳、卵黄加CW寒天培地に塗抹し、42°Cで一晩嫌気培養した。培養後、CW寒天培地で卵黄反応陽性のコロニーを釣菌し、マルチプレックスPCRを実施した。CPE遺伝子を検出した菌株についてはPET-RPLA(デンカ生研)を用いてCPE毒素の産生を確認した。

C. 研究結果

1. マルチプレックスPCRによるウェルシュ菌エンテロトキシンCPE遺伝子と新規エンテロトキシンBECaおよびBECb遺伝子の同時検出法の開発

1-1. マルチプレックスPCR法の特異性と感度

標準菌株を使用してシングルPCRを行った結果、*becA*が499 bp、*becB*が416 bp、*plc*が324 bp、*cpe*が233 bpのPCR産物が確認できた(図2)。

特異性を調べるために使用したウェルシュ菌以外のクロストリジウム属菌21株およびクロストリジウム属以外の80菌種145株について、マルチプレックスPCR法を実施したところ、増幅産物は全く確認できなかった。使用したウェルシュ菌46株はすべて*plc*の増幅産物が確認できた。CPE産生ウェルシュ菌10株とBEC産生ウェルシュ菌3株は、*plc*に加え、それぞれ*cpe*と*becAB*の増幅産物が確認できた(図4)。

CPE遺伝子陽性株として*C. perfringens* NCTC8239、BECaおよびBECb遺伝子陽性株として*C. perfringens* OS1を使用し、本マルチプレックスPCR法の感度を測定した結果、CPE遺伝子陽性株で 10^4 cfu/ml、BECaおよびBECb遺伝子陽性株で 10^3 cfu/mlであり、分離菌のエンテロトキシン遺伝子検出法としては十分な感度を有していることがわかった(図3のAとB)。

2. 乾燥食品のウェルシュ菌汚染結果

汚染調査の結果を表5に示した。乾しいたけ26検体を調べたところ、5検体(19.2%)からウェルシュ菌が検出され、そのうち、1検体(3.8%)からCPE産生菌が検出された。増菌液1mlから直接DNAを抽出し、PCRを実施した結果も、26検体中5検体が*plc*遺伝子陽性、1検体が*cpe*遺伝子陽性で、分離培養の結果

と一致した。*becAB*遺伝子は増菌液のPCR、分離培養とも、すべて検出されなかった。市販コショウ15検体については、4検体(26.6%)からウェルシュ菌が検出されたが、CPE産生菌は検出されなかった。増菌液からPCRを実施した結果、4検体(26.6%)が*plc*遺伝子陽性で、1検体(6.7%)が*cpe*遺伝子陽性であった。*cpe*遺伝子陽性であった検体について、CW寒天培地から100コロニーを釣菌したが、CPE産生菌を分離することはできなかった。また、*becAB*遺伝子は増菌液のPCR、分離菌とも、すべて陰性であった。

3. ヒトとウシの糞便中のウェルシュ菌保菌調査

3-1. ヒト糞便

ヒトの糞便中の保菌状況を調べたところ、437検体中129検体からウェルシュ菌が分離された(表6)。その中で、分離菌株129株のうちCPE遺伝子を保有している菌株は10株であった。BECaおよびBECb遺伝子を保有している菌株は1株であった。

3-2. ウシ糞便

ウシの糞便中の保菌状況を調べたところ、直腸スワブ90検体中40検体からウェルシュ菌40株が分離された(表6)。その中で、CPE遺伝子とBECaおよびBECb遺伝子を保有している菌株はなかった(表6)。また、直腸スワブ50検体については、液