

内 閣 府 食 品 安 全 委 員 会

平成15年度食品安全確保総合調査

家畜等の食中毒細菌に関する汚染実態調査 報告書

平成16年3月

財団法人 日本食品分析センター

目次

第1部 採卵鶏の糞便及び鶏卵からの <i>Salmonella</i> の検出及び定量方法の開発・・・	1
Ⅰ 採卵鶏の糞便からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討・・・	2
1 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
1) 糞便・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
2) 菌株・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
2 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
1) 糞便からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性)、定量方法及び 検出感度の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
2) 輸送糞便中の <i>Salmonella</i> 減少率の検討・・・・・・・・	3
3 結果及び考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
1) 糞便からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討・・・・・・	3
2) 糞便からの <i>Salmonella</i> の定量方法の検討・・・・・・・・	6
3) 輸送糞便中の <i>Salmonella</i> 減少率の検討・・・・・・・・	7
4) 採卵鶏の糞便からの <i>Salmonella</i> 検出 (定性) 及び 定量法フローシート・・・・・・・・・・・・・・・・	8
Ⅱ 鶏卵からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討・・・・・・・・	1 1
1 材料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 1
1) 鶏卵・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 1
2) 菌株・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 1
2 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 1
1) 鶏卵からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討・・・・・・	1 1
2) 鶏卵からの <i>Salmonella</i> の定量方法の検討・・・・・・・・	1 2
3) 鶏卵中の <i>Salmonella</i> の安定性に関する検討・・・・・・・・	1 2
3 結果及び考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 3
1) 鶏卵からの <i>Salmonella</i> の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討・・・・・・	1 3
2) 鶏卵からの <i>Salmonella</i> の定量方法の検討・・・・・・・・	1 4
3) 鶏卵中の <i>Salmonella</i> の安定性に関する検討・・・・・・・・	1 4
4) 鶏卵からの <i>Salmonella</i> 検出 (定性) 及び定量法フローシート・・・・・・	1 5

第2部 家畜等(鶏及び牛)の糞便及び食肉からの <i>Campylobacter</i> の検出及び定量方法の開発	1 8
I 家畜等(鶏及び牛)の糞便及び食肉からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性)及び定量方法の検討	1 9
1 材料	1 9
1) 糞便	1 9
2) 菌株	1 9
2 方法	1 9
1) 糞便からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性), 定量方法及び検出感度の検討	2 0
2) 輸送糞便中の <i>Campylobacter</i> 減少率の検討	2 1
3 結果及び考察	2 1
1) 糞便からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性)及び検出感度の検討	2 1
2) 糞便からの <i>Campylobacter</i> の定量方法の検討	2 5
3) 輸送糞便中の <i>Campylobacter</i> 減少率の検討	2 6
4) 糞便からの <i>Campylobacter</i> 検出(定性)及び定量法フローシート	2 7
II 家畜等(鶏及び牛)の食肉からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性)及び検出感度の開発	3 0
1 材料	3 0
1) 食肉	3 0
2) 菌株	3 0
2 方法	3 0
1) 食肉からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性), 定量方法及び検出感度の検討	3 0
2) 増菌培地使用量の検討	3 0
3 結果及び考察	3 0
1) 食肉からの <i>Campylobacter</i> の検出方法(定性)及び検出感度の検討	3 0
2) 食肉からの <i>Campylobacter</i> の定量方法の検討	3 2
3) 増菌培地使用量の検討	3 4
4) 食肉からの <i>Campylobacter</i> 検出(定性)及び定量法フローシート	3 6

第3部 農場で飼養されている採卵鶏の <i>Salmonella</i> 及び <i>Campylobacter</i> の 汚染実態について……………	3 9
Ⅰ 農場で飼養されている採卵鶏の <i>Salmonella</i> 汚染実態について……………	4 0
1 対象地域と農場……………	4 0
2 材料……………	4 0
3 方法……………	4 0
1) 糞便について……………	4 0
2) 鶏卵について……………	4 2
3) 使用した機器・培地等について……………	4 4
4 結果及び考察……………	4 4
1) 糞便について……………	4 4
2) 鶏卵について……………	4 5
Ⅱ 農場で飼養されている採卵鶏の <i>Campylobacter</i> 汚染実態について……………	4 7
1 対象地域と農場……………	4 7
2 材料……………	4 7
3 方法……………	4 7
1) 糞便からの <i>Campylobacter</i> 検出法……………	4 7
2) 使用した機器・培地等について……………	4 9
4 結果及び考察……………	4 9
第4部 食中毒細菌の電子顕微鏡写真の撮影……………	5 2
1 使用菌株……………	5 3
2 撮影方法……………	5 3

第1部 採卵鶏の糞便及び鶏卵からの *Salmonella* の検出 及び定量方法の開発

第1部 採卵鶏の糞便及び鶏卵からの *Salmonella* の検出

及び定量方法の開発

採卵鶏の *Salmonella* による汚染の実態を把握するために、採卵鶏の糞便及び鶏卵から *Salmonella* を検出・定量する方法として、増菌培地や分離培地の組合せを替えて本菌の有効な検出方法 (定性) を検討すると共に、糞便サンプリング後の輸送条件を検討する。

I 採卵鶏の糞便からの *Salmonella* の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討

1 材料

1) 糞便

抗生物質等の薬剤を使用せずに飼養している採卵鶏から採取した。

2) 菌株

Salmonella Enteritidis IF0 3313 (試験菌A)

Salmonella Enteritidis [食品由来の野生株] (試験菌B)

なお、各種検討試験においては、普通寒天培地 (NA培地) に試験菌を接種し、35℃で24時間培養後の菌体を滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊させて用いた。また、接種菌量の測定においては、菌液をPBSで適宜10倍段階希釈後、各希釈液1mlずつを2枚の滅菌シャーレに分注し、NA培地を用いて混釈培養 (35℃, 24時間) した。培養後に出現集落数を計測し、接種菌液1mlあたりの生菌数を求めた。

2 方法

抗生物質無投与で合成抗菌剤無添加飼料を給餌されている健康な採卵鶏の糞便を用いて以下の検討試験を実施した。

なお、各検討試験に共通の測定手順を以下に示した。

糞便1 gに滅菌リン酸緩衝生理食塩水を9 ml加え、十分に攪拌して試料原液を調製した。常法に従って10倍段階希釈液を調製した。試料原液及び10倍段階希釈液1 mlずつを、増菌培地10 mlの入った中試験管 (18 mm×180 mm) 3本ずつにそれぞれ接種し、36℃, 好気条件で1日間培養した。培養液についてPCR反応による *Salmonella* のスクリーニングを実施した。PCR反応が陽性となった培養液を選択分離培地に画線分離し、36℃, 好気条件で1日間培養した。 *Salmonella* が疑われる集落について、生化学的試験及び血清学的試験を実施し、 *Salmonella* 及び *Salmonella* Enteritidis か否かを確認した。

なお、PCR反応によるスクリーニングは、 *Salmonella* 用検出試薬セット (QUALICON) を用いた自動PCR (QUALIBAX™細菌検出システム) により実施した。

1) 糞便からの *Salmonella* の検出方法 (定性), 定量方法及び検出感度の検討

糞便に *Salmonella* の菌株を接種し, 表 - 1 に示した5種類の培地 (増菌培地としてHT及びRV培地の2種類を, 選択分離培地としては硫化水素の産生により判定するXLD寒天培地及び硫化水素非産生性であっても *Salmonella* と判定できるBG寒天並びにCHROM寒天培地) の組み合わせにより接種菌の回収を試みた。

なお, 糞便1 g当たりの *Salmonella* 接種菌数を3濃度実施し, 検出方法 (定性), 定量方法及び検出感度の考察を同時に行える試験系とした。また, 定量方法はMPN算出法とした。

表 - 1 検討培地と培養条件

	検討培地	培養条件
増菌培地	Hajna Tetrathionate (HT) 培地	36℃, 24時間, 好気
	Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地	36℃, 24時間, 好気
選択分離培地	XLD寒天培地	36℃, 24時間, 好気
	Brilliant Green (BG) 寒天培地	36℃, 24時間, 好気
	BD CHROMagar <i>Salmonella</i> (CHROM) 寒天培地	36℃, 24時間, 好気

2) 輸送糞便中の *Salmonella* 減少率の検討

保管形態, 保管温度及び保管時間の3つのファクターについてそれぞれ2条件ずつ設定して接種した *Salmonella* の増減を調査した。

なお, 滅菌容器には糞便20 gを採取し, キャリーブレイア培地には 20 mlのキャリーブレイア培地に糞便20 gを量り込んで混ぜ合わせたものとする。

接種菌の増減調査には①で決定した検出方法を用いた。また, 減少率の検討のためのファクターとその条件を表 - 2に示した。

表 - 2 検討試験におけるファクターとその条件

検討	保管形態	保管温度	保管時間
①	滅菌容器内に直接保存	****	0時間
②	滅菌容器内に直接保存	冷蔵 (約2~10 ℃) *	24時間
③	滅菌容器内に直接保存	常温 (20 ℃)	24時間
④	キャリーブレイア培地	****	0時間
⑤	キャリーブレイア培地	冷蔵 (約2~10 ℃) *	24時間
⑥	キャリーブレイア培地	常温 (20 ℃)	24時間

* 発泡スチロールの箱に蓄冷剤を詰めて保管した。

3 結果及び考察

1) 糞便からの *Salmonella* の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討

結果を表 - 3に示した。

検出方法として, 2種類の増菌培地及び選択分離培地に顕著な差は認められなかったが, *Salmonella* Enteritidis A (試験菌A) の回収において, HT培地を使用した場合低濃度接種

区 (3/g) では、いずれの分離培地でも検出することができなかった。

また、検出感度についても、増菌培地にHT培地を使用した場合、*Salmonella* Enteritidis A (試験菌A) において、低濃度の接種菌数 (3/g) ではいずれの分離培地でも検出することができなかったが、RV培地を使用した場合には、BG及びCHROM寒天培地で糞便1 g当たり1桁の接種菌数でも検出することが可能であった。

なお、CHROM寒天培地の検出感度については、試料接種数3列のうち、検出することができたのは1列のみであったことから、唯一検出できなかったXLD寒天培地と顕著な差はないものと判断された。

以上の結果から、増菌培地としてRappaport-Vassiliadis培地を、選択分離培地として硫化水素の産生により判定する培地にXLD寒天培地を、並びに硫化水素非産生性であっても *Salmonella* と判定できる培地にBG寒天培地を使用することが採卵鶏の糞便からの *Salmonella* の検出 (定性) 試験に適していることが確認された。

表 - 3 各条件における *Salmonella* 検出結果 (定性及び感度)

増菌培地	選択 分離培地	<i>Salmonella</i> Enteritidis A		<i>Salmonella</i> Enteritidis B	
		理論接種菌数 (/g)	検出 (/g)	理論接種菌数 (/g)	検出 (/g)
HT培地	XLD寒天培地	0	－ [0/3] *	0	－ [0/3]
		3	－ [0/3]	3	＋ [1/3]
		10	＋ [2/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]
	BG寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		3	－ [0/3]	3	＋ [1/3]
		10	＋ [1/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]
	CHROM寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		3	－ [0/3]	3	＋ [1/3]
		10	＋ [2/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]
	XLD寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		3	－ [0/3]	3	＋ [1/3]
		10	－ [0/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]
RV培地	BG寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		3	＋ [1/3]	3	＋ [1/3]
		10	＋ [1/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]
	CHROM寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		3	＋ [1/3]	3	＋ [1/3]
		10	－ [0/3]	15	＋ [1/3]
		80	＋ [3/3]	104	＋ [3/3]

－：検出せず，＋：検出する（*Salmonella* が検出された試料接種列数が1以上を＋とした）

* [0/3]：[*Salmonella* が検出された試料接種列数/試料接種列数]

すなわち試行は3回

2) 糞便からの *Salmonella* の定量方法の検討

結果を表-4に示した。

定量方法としては、いずれの培地の組み合わせにおいても顕著な差は認められなかったが、試験菌 A についてはHT培地を増菌培地とした場合に定量性に劣ることが判明した。また、高濃度接種区 (80/g) では、いずれの分離培地でも実測値が接種菌数よりも1桁低かった。

したがって、定量試験においても増菌培地としてRV培地を、選択分離培地としてXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地を使用することが良いと判断された。

なお、糞便に接種した試験菌液の生菌数から換算して理論接種菌数とした。また、実測値はMPN算出法により得られた最確数を1 gあたりに換算して示した。

表 - 4 各条件における *Salmonella* 回収結果 (定量)

増菌培地	選択 分離培地	<i>Salmonella</i> Enteritidis A		<i>Salmonella</i> Enteritidis B	
		理論接種菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種菌数 (/g)	実測値 (/g)
HT培地	XLD寒天培地	0	<3	0	<3
		3	<3	3	7.3
		10	9.1	15	3.6
		80	23	104	150
	BG寒天培地	0	<3	0	<3
		3	<3	3	7.3
		10	3.6	15	3.6
		80	23	104	150
	CHROM寒天培地	0	<3	0	<3
		3	<3	3	7.3
		10	9.1	15	3.6
		80	23	104	150
	XLD寒天培地	0	<3	0	<3
		3	<3	3	3.6
		10	<3	15	3.6
		80	230	104	93
RV培地	BG寒天培地	0	<3	0	<3
		3	3.6	3	3.6
		10	3.6	15	3.6
		80	240	104	93
	CHROM寒天培地	0	<3	0	<3
		3	3.6	3	3.6
		10	<3	15	3.6
		80	240	104	93

試行は1回

3) 輸送糞便中の *Salmonella* 減少率の検討

結果を表 - 5 に示した。

常温保管の場合には、いずれの保管形態でも生菌数の増加が認められた。

一方、低温で保管した場合は、24時間後の生菌数に大きな差は認められなかった。

以上、保管形態を考慮しなくても低温で輸送する限り、糞便中の *Salmonella* 生菌数の大きな増減はないものと考えられた。

以上の結果から、糞便試料を滅菌採取容器内に直接サンプリングし、冷蔵保管 (発砲スチロール内に蓄冷剤を詰めて保存) による輸送が有効であると判断された。

なお、発砲スチロール内の温度変化の一例を図-1に示した。

表 - 5 各保管条件での *Salmonella* 生菌数の増減

保管形態	保管温度	保管時間	<i>Salmonella</i> 実測値 (/g)
滅菌容器に直接保存	****	0時間	2,400
滅菌容器に直接保存	冷蔵*	24時間	2,400
滅菌容器に直接保存	常温	24時間	24,000
キャリーブレイヤー培地	****	0時間	1,500
キャリーブレイヤー培地	冷蔵*	24時間	1,500
キャリーブレイヤー培地	常温	24時間	140,000

* 発砲スチロールの箱に蓄冷剤を詰めて保管した。

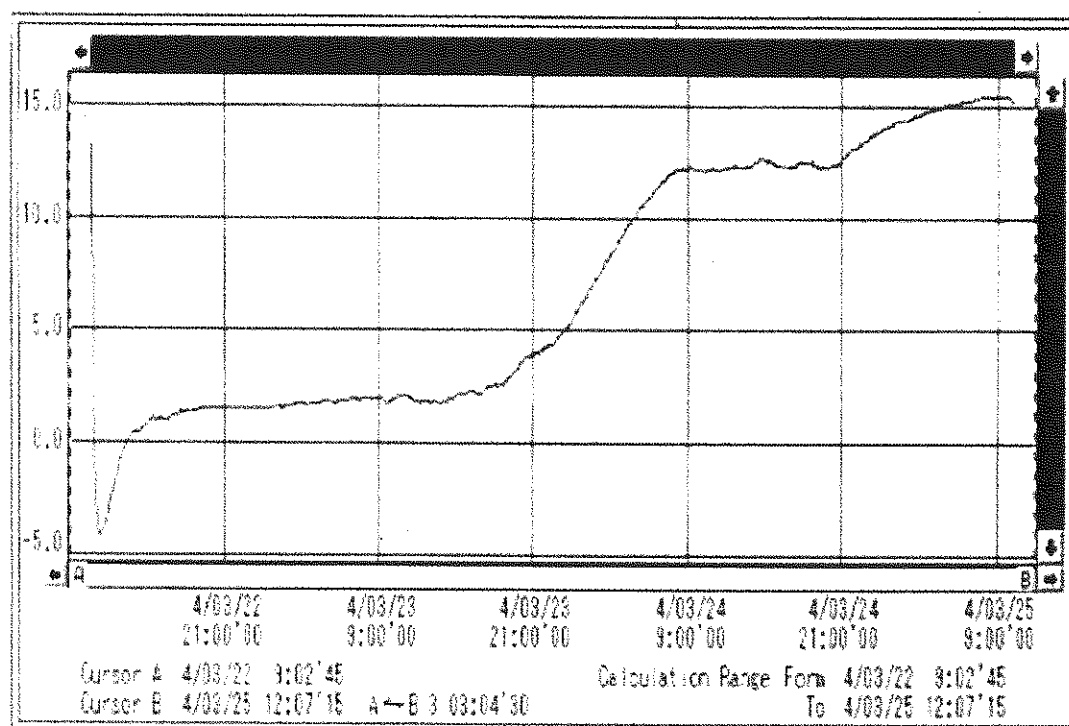


図-1 蓄冷剤を詰めた発砲スチロール内の温度変化の一例

4) 採卵鶏の糞便からの *Salmonella* 検出 (定性) 及び定量方法フローシート

以上の結果より、採卵鶏の糞便から *Salmonella* を検出 (定性) あるいは定量するに当たって推奨される方法が決定した。

定性試験においては、糞便1gをRappaport-Vassiliadis培地100mlに接種して36℃で24時間培養する。培養液についてPCR反応を行い、*Salmonella* のスクリーニングを実施する。PCRで陽性反応が認められた試験管の培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し、36℃で24時間培養する。培養後、*Salmonella* が疑われる集落について *Salmonella* Enteritidis か否かを生化学的性状試験及び血清学的試験により確認する。

また、定量試験においては、糞便1gにリン酸緩衝生理食塩水9mlを加えて良く混合した後、常法にしたがって10倍段階希釈液を調製して試料液とする。各試料液をRappaport-Vassiliadis培地10mlが入った試験管に接種して36℃で24時間培養する。培養液についてPCR反応を行い、*Salmonella* のスクリーニングを実施する。PCRで陽性反応が認められた試験管の培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し、36℃で24時間培養する。培養後、*Salmonella* が疑われる集落について *Salmonella* Enteritidis か否かを生化学的性状試験及び血清学的試験により確認する。

上記の試験法フローシートを図-2及び3に示した。

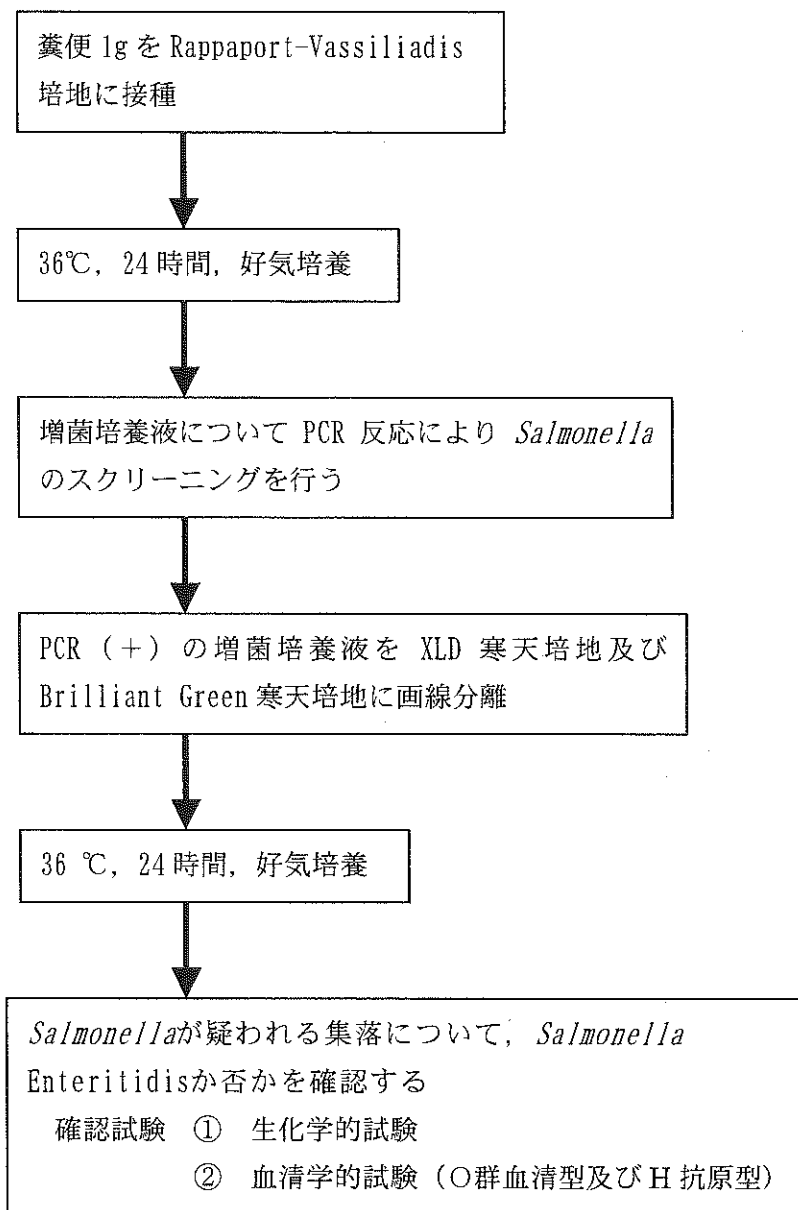


図-2 採卵鶏の糞便からの *Salmonella* 検出 (定性) 試験方法

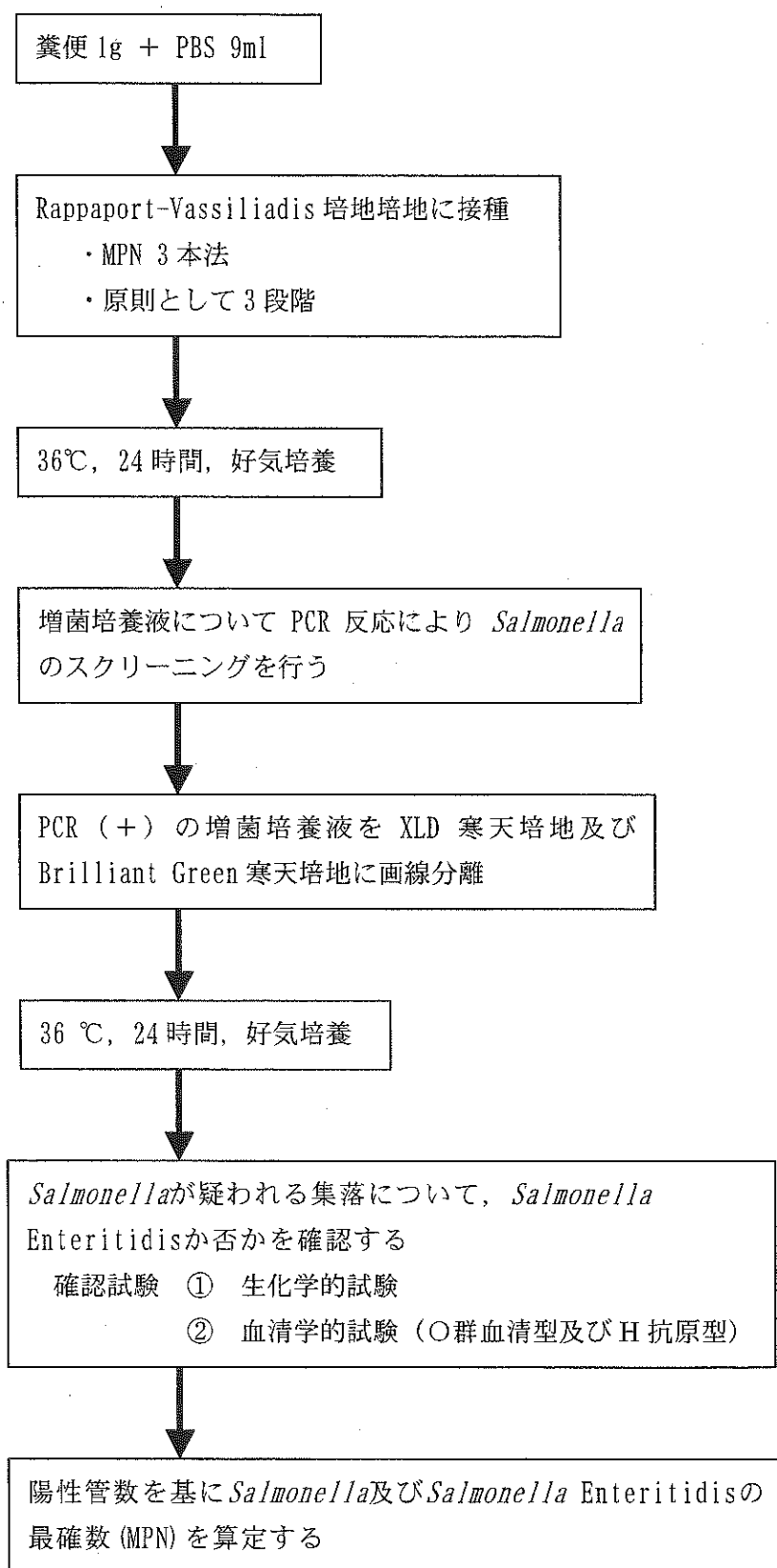


図-3 採卵鶏の糞便からの *Salmonella* 定量試験方法

II 鶏卵からの *Salmonella* の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討

鶏卵の *Salmonella* による汚染の実態を把握するために、市販の鶏卵から *Salmonella* を検出・定量する方法として、増菌培地や分離培地の組合せを替えて本菌の有効な検出方法を検討する。

1 材料

1) 鶏卵

市販の鶏卵を用いた。

2) 菌株

Salmonella Enteritidis IF0 3313 (試験菌A)

Salmonella Enteritidis [食品由来の野生株] (試験菌B)

なお、各種検討試験においては、普通寒天培地 (NA培地) に試験菌を接種し、35℃で24時間培養後の菌体を滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊させて用いた。また、接種菌量の測定においては、菌液をPBSで適宜10倍段階希釈後、各希釈液1mlずつを2枚の滅菌シャーレに分注し、NA培地を用いて混釈培養 (35℃, 24時間) した。培養後に出現集落数を計測し、接種菌液1mlあたりの生菌数を求めた。

2 方法

市販の鶏卵に *Salmonella* の菌株を接種し、厚生労働省より公定法として通知されている「液卵からのサルモネラ属菌試験法」に準じ、表-6に示した5種類の培地の組み合わせにより、接種菌の回収を試みた。

表-6 *Salmonella* 検出のための使用培地と培養条件

培養区分	使用培地	培養条件
増菌培地 (一次)	L-システイン (0.2g/L) 添加BPW培地	36℃, 22時間, 好気
増菌培地 (二次)	Tetrathionate (TT) 培地	42℃, 22時間, 好気
	Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地	42℃, 22時間, 好気
選択分離培地	XLD寒天培地	36℃, 24時間, 好気
	Brilliant Green (BG) 寒天培地	36℃, 24時間, 好気

1) 鶏卵からの *Salmonella* の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討

鶏卵に *Salmonella* の菌株を接種し、表-6に示した培地を用いて接種菌の検出を試みた。

接種菌株は、*Salmonella* Enteritidisを用い、鶏卵25g当たりの *Salmonella* 接種菌数を 10^0 (試験菌Aは2cfu/25g, 試験菌Bは3cfu/25g), 10^1 (試験菌Aは17cfu/25g, 試験菌Bは37cfu/25g) 及び 10^2 (試験菌Aは128cfu/25g, 試験菌Bは256cfu/25g) の3濃度とした。

測定手順を以下に示した。

鶏卵25 gに *Salmonella* の菌株を接種し、一次増菌培地225 mlを加え、36℃, 好気条件

で1日間培養した。培養液についてPCR反応による*Salmonella*のスクリーニングを実施した。PCR反応が陽性となった培養液0.5mlを二次増菌培地に接種し、42℃、好気条件で1日間培養した。培養液について選択分離培地に画線分離し、36℃、好気条件で1日間培養した。*Salmonella*が疑われる集落について血清学的試験を実施し、*Salmonella*及び*Salmonella* Enteritidisか否かを確認した。

なお、PCR反応によるスクリーニングは、*Salmonella*用検出試薬セットを用いた自動PCR (QUALIBAX™細菌検出システム) により実施した。

2) 鶏卵からの*Salmonella*の定量方法の検討

鶏卵に*Salmonella* Enteritidisを接種し、表-6に示した培地を用いてMPN算出法により接種菌の回収を試みた。

なお、鶏卵1g当たりの*Salmonella*接種菌数を 10^0 (試験菌Aは1.5cfu/25g, 試験菌Bは3.5cfu/25g), 10^1 (試験菌Aは15cfu/25g, 試験菌Bは36cfu/25g) 及び 10^2 (試験菌Aは152cfu/25g, 試験菌Bは364cfu/25g) の3濃度とした。

測定手順を以下に示した。

鶏卵25gに*Salmonella*の菌株を接種し、一次増菌培地225 mlを加え、十分に攪拌して試料原液を調製した。常法にしたがって10倍段階希釈液を調製した。試料原液10mlずつを中試験管 (18mm×18mm) 3本に、10倍段階希釈液1mlずつを一次増菌培地10mlの入った中試験管 (18mm×18mm) 3本にそれぞれ接種し、36℃、好気条件で1日間培養した。培養液0.5mlを二次増菌培地に接種し、42℃、好気条件で1日間培養した。培養液について選択分離培地に画線分離し、36℃、好気条件で1日間培養した。*Salmonella*が疑われる集落について血清学的試験を実施し、*Salmonella*及び*Salmonella* Enteritidisか否かを確認した。

3) 鶏卵中の*Salmonella*の安定性に関する検討

鶏卵に*Salmonella* Enteritidisを接種し、表-7に示した条件で保存した。保存開始時、保存1日及び保存2日後に、表-1に示した培地を用いてMPN算出法により接種菌の菌数測定を実施した。

表 - 7 検討試験における保存条件

保存温度	保存日数
****	開始時
冷蔵 (約5℃)	1日間
	2日間
氷温 (約0℃)	1日間
	2日間
冷凍 (約-20℃)	1日間
	2日間

3 結果及び考察

1) 鶏卵からの *Salmonella* の検出方法 (定性) 及び検出感度の検討

結果を表 - 8 に示した。

表-6に示した *Salmonella* 検出のための条件において、接種菌数を 10^0 (試験菌Aは2cfu/25g, 試験菌Bは3cfu/25g), 10^1 (試験菌Aは17cfu/25g, 試験菌Bは37cfu/25g) 及び 10^2 (試験菌Aは128cfu/25g, 試験菌Bは256cfu/25g) の3濃度の全てから *Salmonella* を検出することができた。したがって、鶏卵25gあたりに1桁の接種菌数でも検出することが可能であることが確認された。

表 - 8 *Salmonella* の検出結果

増菌培地	PCR又は選択 分離培地	<i>Salmonella</i> Enteritidis A		<i>Salmonella</i> Enteritidis B	
		理論接種菌数 (/25g)	検出 (/25g)	理論接種菌数 (/25g)	検出 (/25g)
BPW	PCRによるスク リーニング	0	—	0	—
		2	+	3	+
		17	+	37	+
		128	+	256	+
TT培地	XLD寒天培地	0	—	0	—
		2	+	3	+
		17	+	37	+
		128	+	256	+
	BG寒天培地	0	—	0	—
		2	+	3	+
		17	+	37	+
		128	+	256	+
RV培地	XLD寒天培地	0	—	0	—
		2	+	3	+
		17	+	37	+
		128	+	256	+
	BG寒天培地	0	—	0	—
		2	+	3	+
		17	+	37	+
		128	+	256	+

— : 検出せず, + : 検出する

試行は1回

2) 鶏卵からの *Salmonella* の定量方法の検討

結果を表 - 9 に示した。

いずれの培地の組合せにおいても顕著な差は認められなかった。したがって、定量試験においても表-1に示した *Salmonella* 検出のための方法を使用することが有効であると判定された。

なお、鶏卵に接種した試験菌液の生菌数から換算して理論接種菌数とした。また、実測値はMPN算出法により得られた最確数を1 gあたりに換算して示した。

表 - 9 MPN算出法による *Salmonella* 回収結果

増菌培地	選択分離培地	<i>Salmonella</i> Enteritidis A		<i>Salmonella</i> Enteritidis B	
		理論接種菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種菌数 (/g)	実測値 (/g)
TT培地	XLD寒天培地	1.5	4.3	3.5	4.3
		15	23	36	21
		152	210	364	230
	BG寒天培地	1.5	4.3	3.5	4.3
		15	23	36	21
		152	210	364	230
RV培地	XLD寒天培地	1.5	4.3	3.5	4.3
		15	23	36	21
		152	210	364	230
	BG寒天培地	1.5	4.3	3.5	4.3
		15	23	36	21
		152	210	364	230

試行は1回

3) 鶏卵中の *Salmonella* の安定性に関する検討

結果を表 - 10 に示した。

氷温で保存した場合は、保存開始時から保存2日間後まで生菌数の増減は認められなかった。

一方、冷蔵で保管した場合は保存2日後に、冷凍で保管した場合は、保存1日間後で生菌数にわずかな減少傾向がみられたものの、保存2日間後までの生菌数に大きな差は認められなかった。

以上の結果から、サンプリングしてから輸送後の鶏卵試料の保存条件は、氷温で保存することが有効であると判断された。

表-10 各保存条件での *Salmonella* 生菌数の増減

保存温度	保存日数		<i>Salmonella</i> 実測値 (/g)	
			TT培地	RV培地
****	開始時	XLD寒天培地	430	430
		BG寒天培地	430	430
冷蔵	1日間	XLD寒天培地	430	430
		BG寒天培地	430	430
	2日間	XLD寒天培地	230	230
		BG寒天培地	230	230
氷温	1日間	XLD寒天培地	430	430
		BG寒天培地	430	430
	2日間	XLD寒天培地	430	430
		BG寒天培地	430	430
冷凍	1日間	XLD寒天培地	230	230
		BG寒天培地	230	230
	2日間	XLD寒天培地	230	230
		BG寒天培地	230	230

試行は1回

4) 鶏卵からの *Salmonella* 検出 (定性) 及び定量法フローシート

以上の結果より、採卵鶏の鶏卵から *Salmonella* を検出 (定性) あるいは定量するに当たって推奨される方法が決定した。

定性試験においては、鶏卵を割卵して全卵を混合した後、25 gを採取する。システイン加緩衝ペプトン水225 mlを加えて混合後、36℃、好気条件で24時間培養する。増菌培養液についてPCR反応により *Salmonella* のスクリーニングを行う。PCR陽性の増菌培養液0.5 mlをTT培地及びRV培地に接種し、42℃、好気条件で24時間培養する。増菌培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し、36℃、好気条件で24時間培養する。*Salmonella* が疑われる集落について、*Salmonella* Enteritidisか否かを確認する。

また、定量試験においては、鶏卵を割卵して全卵を混合した後、10 gを採取する。リン酸緩衝生理食塩水90mlを加えて良く混合した後、常法にしたがって10倍段階希釈液を調製して試料液とする。各試料液をシステイン加緩衝ペプトン水10mlが入った試験管に接種して36℃で24時間培養する。増菌培養液についてPCR反応を行い、*Salmonella* のスクリーニングを実施する。PCR陽性の増菌培養液0.5 mlをTT培地及びRV培地に接種し、42℃、好気条件で24時間培養する。増菌培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し、36℃、好気条件で24時間培養する。*Salmonella* が疑われる集落について、*Salmonella* Enteritidisか否かを確認する。

上記試験方法のフローシートを図-4及び5に示した。

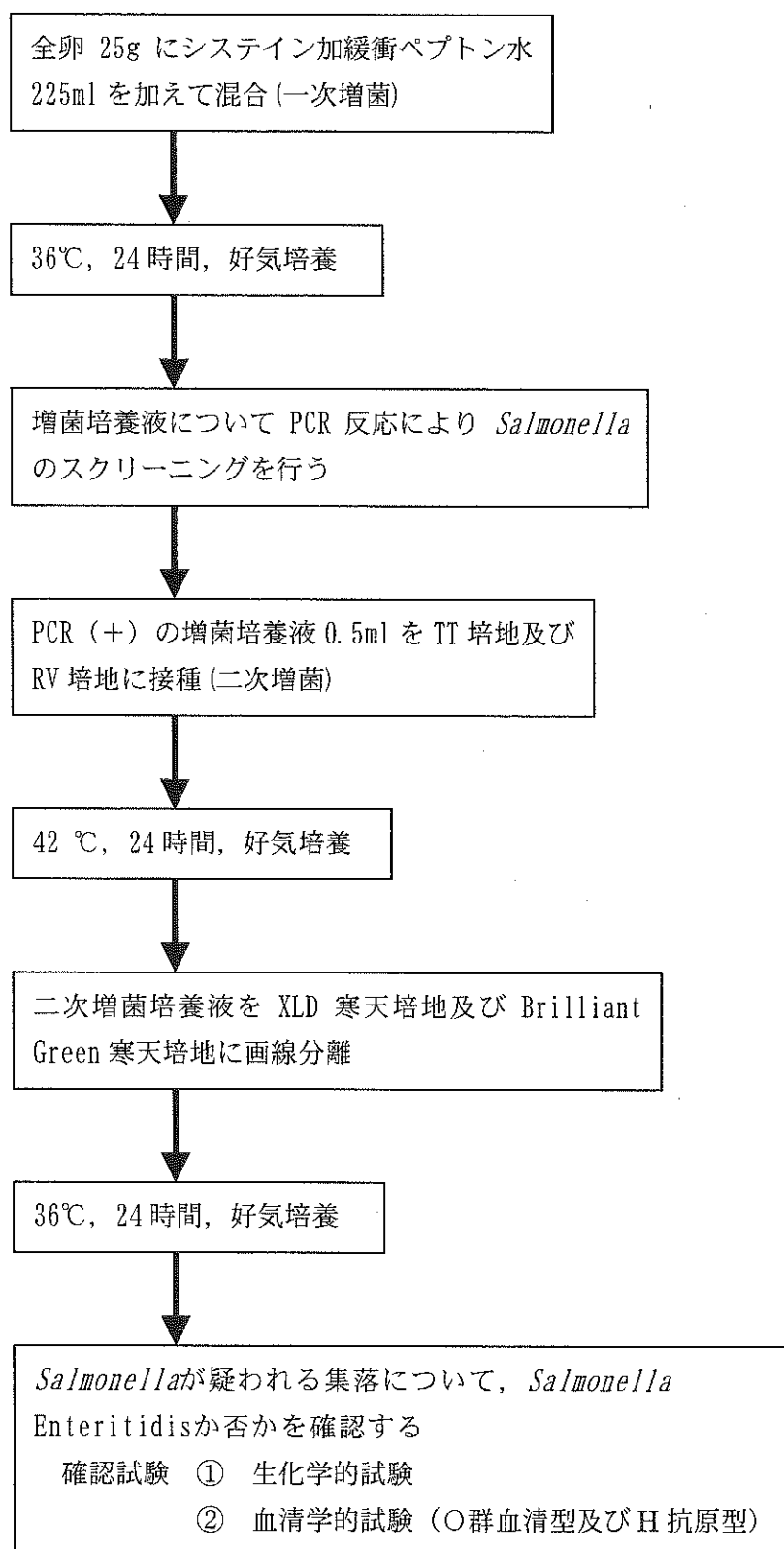


図-4 鶏卵からの *Salmonella* 検出 (定性) 試験方法

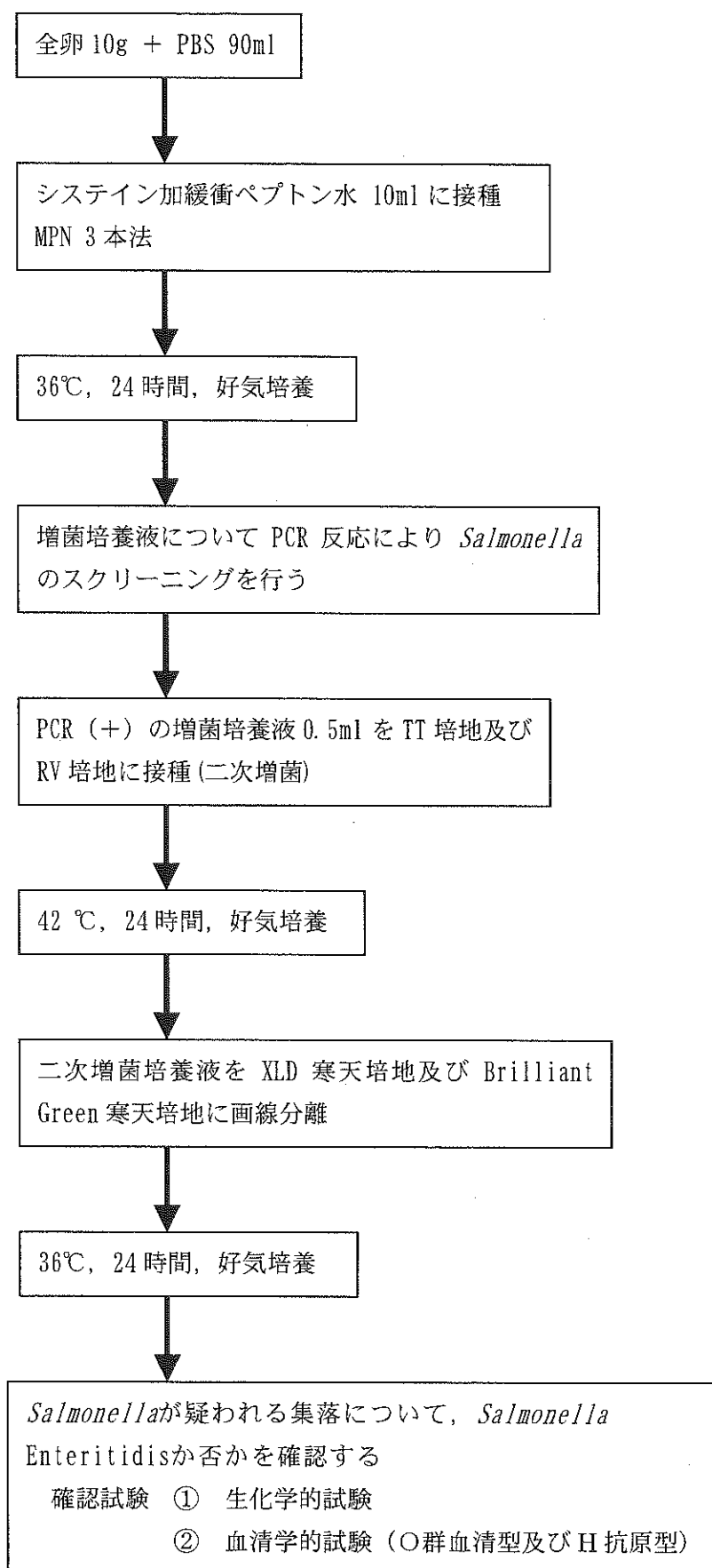


図 - 5 鶏卵からの *Salmonella* 定量試験方法

第2部 家畜等(鶏及び牛)の糞便及び食肉からの
*Campylobacter*の検出及び定量方法の開発

第2部 家畜等(鶏及び牛)の糞便及び食肉からの*Campylobacter*の検出 及び定量方法の開発

家畜(鶏及び牛)のカンピロバクターによる汚染の実態を把握するために、家畜(鶏及び牛)の糞便からカンピロバクターを検出・定量する方法として、増菌培地や分離培地の組合せを替えて本菌の有効な検出方法を検討すると共に、糞便サンプリング後の輸送条件を検討する。

I 家畜等(鶏及び牛)の糞便からの*Campylobacter*の検出方法及び検出感度の検討

1 材料

1) 糞便

抗生物質等の薬剤を使用せずに飼養している採卵鶏及び牛(乳牛)から採取した。

2) 菌株

Campylobacter jejuni DSM 4688

Campylobacter coli DSM 4689

2 方法

抗生物質無投与で合成抗菌剤無添加飼料を給餌されている健康な鶏及び牛の糞便を用いて以下の検討試験を実施した。

各検討試験に共通の測定手順を以下に示す。

糞便1 gに滅菌リン酸緩衝生理食塩水9 mlを加え、十分攪拌して試料原液とした。常法に従って10倍段階希釈液を調製した。試料原液及び各10倍段階希釈液を増菌培地10 mlの入った中試験管(18 mm×180 mm)3本ずつにそれぞれ接種し、各条件で培養した。培養後、培養液を選択分離培地に画線して培養した。選択分離培地に出現したカンピロバクターを疑える集落について、*Campylobacter* 共通プライマー(*C. jejuni* , *C. coli* 対象)と、*C. jejuni* 及び *C. coli* それぞれの特異的プライマーを用いたPCR法により確認試験を実施した。

なお、PCR反応における各種条件と使用したプライマーの配列を図-6に記載した。

A. PCR 反応液

Tris-HCl (pH8.3)	20 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP	200 μM
Primer forward	0.4 μM
Primer reverse	0.4 μM
Taq polymerase	0.025 U

B. PCR プライマー

1) *C. jejuni*, *C. coli* 共通

for. 5' -AATCTAATGGCTTAACCATTA-3'
rev. 5' -GTAAGTAGTTTAGTATTCCGG-3'

2) *C. jejuni* 特異

for. 5' -GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3'
rev. 5' -AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3'

3) *C. coli* 特異

for. 5' -GGTATGATTTCTACAAAGCGA-3'
rev. 5' -ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3'

C. PCR 反応

a) *C. jejuni*, *C. coli*

共通プライマー

94℃ 1分
58℃ 1分
72℃ 1分
上記 25 サイクル
72℃ 1分

b) *C. jejuni*

特異プライマー

94℃ 1分
66℃ 1分
72℃ 1分
上記 25 サイクル
72℃ 1分

c) *C. coli*

特異プライマー

94℃ 1分
60℃ 1分
72℃ 1分
上記 25 サイクル
72℃ 1分

図 - 6 PCR反応条件

1) 糞便からの *Campylobacter* の検出方法 (定性), 定量方法及び検出感度の検討

糞便にカンピロバクターの菌株を接種し、表 - 11 に示した 4 種類の検出方法で接種菌の回収を試みた。なお、糞便 1 g 当たりのカンピロバクター接種菌数を 1~3 桁の 3 濃度実施し、検出方法、定量方法及び検出感度の考察も同時に行える試験系とした。

また、定量方法は MPN 算出法とした。

表 - 11 検討培地と培養条件

検出 方法	増菌培養		分離培養	
	培地	培養条件	培地	培養条件
①	CEM 培地	42 ℃, 2 日間, 微好気	Skirrow 寒天培地	42 ℃, 3 日間, 微好気
②	CEM 培地	42 ℃, 2 日間, 微好気	Preston 寒天培地	42 ℃, 3 日間, 微好気
③	Preston 培地	42 ℃, 2 日間, 微好気	Skirrow 寒天培地	42 ℃, 3 日間, 微好気
④	Preston 培地	42 ℃, 2 日間, 微好気	Preston 寒天培地	42 ℃, 3 日間, 微好気

2) 輸送糞便中のカンピロバクターの減少率の検討

保管形態、保管温度及び保管時間の3つのファクターについてそれぞれ2条件ずつ設定して接種したカンピロバクターの増減を調査した。なお、嫌気ポーターには糞便1 g以上を採取し、Preston培地には糞便1 gを量り込むこととした。

接種菌の増減調査には①で決定した検出方法を用いた。また、減少率検討のためのファクターとその条件を表 - 12に示した。

表 - 12 検討試験におけるファクターとその条件

検討	保管形態	保管温度	保管時間
①	嫌気ポーター	****	0時間
②	嫌気ポーター	冷蔵(約2～10℃)*	24時間
③	嫌気ポーター	常温(20℃)	24時間
④	増菌培地	****	0時間
⑤	増菌培地	冷蔵(約2～10℃)*	24時間
⑥	増菌培地	常温(20℃)	24時間

* 発泡スチロールの箱に蓄冷剤を詰めて保管

3 結果及び考察

1) 糞便からの*Campylobacter*の検出方法(定性)及び検出感度の検討

結果を表 - 13及び14に示した。また、試験菌株のPCR反応後の電気泳動結果の一例を図 - 7に示した。

増菌培地としてPreston培地を使用した場合は、いずれの分離培地でも検出に差はなかったが、Preston寒天培養平板上にはカンピロバクター以外の集落も多数生育しており、他の細菌集落の出現がほとんど認められないSkirrow寒天培地のほうが選択性において優れていると判断された。

一方、CEM培地を使用した場合には、分離培養平板上に出現する集落数が少なく、*Campylobacter*に対しても若干選択性が働いていることが推測された。

また、感度については、鶏糞便の検出においてはいずれの条件でも差は認められなかったものの、牛糞便では増菌培地にPreston培地を使用した場合に陽性となった試料接種列数がわずかに多くなる傾向が認められ、Preston培地を用いた方がCEM培地より若干感度が良くなるものと考えられた。

これらの結果から、鶏及び牛のいずれの糞便においても、増菌培地としてPreston培地を、選択分離培地としてSkirrow寒天培地を使用することが有効であると判定された。

なお、カンピロバクターは酸素存在下では死滅速度が速いため、バクテリアチャンバーを用いた顕微鏡観察により計測した菌液の細胞数から換算して理論接種菌数とした。また、実測値はMPN算出法により得られた最確数を1 g当たりに換算して示した。

表 - 13 各条件におけるカンピロバクター検出試験結果 (鶏糞便の場合) [定性及び感度]

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (／g)	検出 (／g)	理論接種 菌数 (／g)	検出 (／g)
CEM培地	Skirrow 寒天培地	0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		8	＋ [3/3]	3	＋ [2/3]
		80	＋ [3/3]	26	＋ [3/3]
		800	＋ [3/3]	260	＋ [3/3]
		0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
Preston 培地	Preston 寒天培地	8	＋ [3/3]	3	＋ [2/3]
		80	＋ [3/3]	26	＋ [3/3]
		800	＋ [3/3]	260	＋ [3/3]
		0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		8	＋ [3/3]	3	＋ [2/3]
Preston 培地	Preston 寒天培地	80	＋ [3/3]	26	＋ [3/3]
		800	＋ [3/3]	260	＋ [3/3]
		0	－ [0/3]	0	－ [0/3]
		8	＋ [3/3]	3	＋ [2/3]
		80	＋ [3/3]	26	＋ [3/3]

－：検出せず，＋：検出する

(*Campylobacter*が検出された試料接種列数が1以上を＋とした)

* [0/3]： [*Campylobacter* が検出された試料接種列数/試料接種列数]

試行は3回

表 - 14 各条件におけるカンピロバクター検出試験結果 (牛糞便の場合) [定性及び感度]

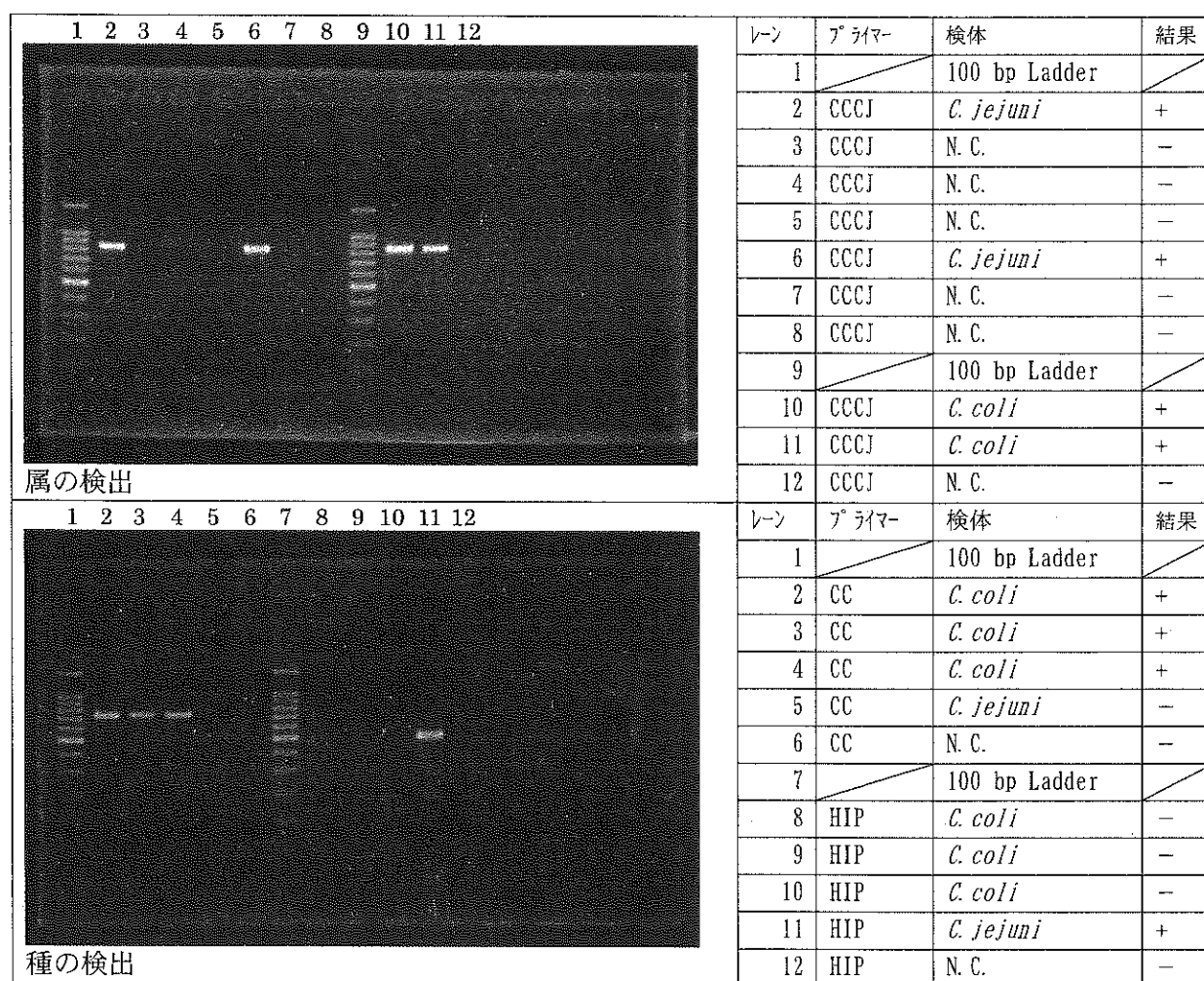
増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)
CEM 培地	Skirrow 寒天培地	0	— [0/3]	0	— [0/3]
		2	+ [1/3]	3	+ [1/3]
		24	+ [3/3]	25	+ [3/3]
		240	+ [3/3]	250	+ [3/3]
	Preston 寒天培地	0	— [0/3]	0	— [0/3]
		2	+ [1/3]	3	+ [1/3]
		24	+ [3/3]	25	+ [3/3]
		240	+ [3/3]	250	+ [3/3]
Preston 培地	Skirrow 寒天培地	0	— [0/3]	0	— [0/3]
		2	+ [1/3]	3	+ [2/3]
		24	+ [3/3]	25	+ [3/3]
		240	+ [3/3]	250	+ [3/3]
	Preston 寒天培地	0	— [0/3]	0	— [0/3]
		2	+ [1/3]	3	+ [2/3]
		24	+ [3/3]	25	+ [3/3]
		240	+ [3/3]	250	+ [3/3]

— : 検出せず, + : 検出する

(*Campylobacter*が検出された試料接種列数が1以上を+とした)

* [0/3] : [*Campylobacter* が検出された試料接種列数/試料接種列数]

試行は3回



+: 検知する, -: 検知せず, N. C. : 陰性対照, CCCJ : *Campylobacter* 属共通プライマー 850bp, CC : *C. coli* 特異プライマー 500bp, HIP : *C. jejuni* 特異プライマー 750bp

図-7 PCR泳動結果(プライマーの特異性の確認)

2) 糞便からの *Campylobacter* の定量方法の検討

結果を表-15及び16に示した。

C. jejuni についてはいずれの培地の組合せでも大きな差は認められなかったが、*C. coli* についてはCEM培地を増菌培地とした場合に定量性に劣ることが判明した。これは、鶏、牛いずれの場合にも認められたことからCEM培地の選択性が特に *C. coli* に対して強く作用し過ぎていることが示唆された。

したがって、定量試験においても増菌培地としてPreston培地を、選択分離培地としてSkirrow寒天培地を使用することが良いと判断された。

なお、カンピロバクターは酸素存在下では死滅速度が速いため、顕微鏡を用いて計測した菌液の細胞数から換算して理論接種菌数とした。また、実測値はMPN算出法により得られた最確数を1 gあたりに換算して示した。

定量方法については、増菌培養を必要とするためMPN算出法以外の手法が無く、本試験でもMPN算出法で実施することとした。

表 - 15 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (鶏糞便の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	<3	0	<3
		8	23	3	9.1
		80	460	26	23
		800	2,300	260	23
	Preston寒天培地	0	<3	0	<3
		8	23	3	9.1
		80	240	26	23
		800	2,300	260	23
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	<3	0	<3
		8	23	3	9.1
		80	460	26	43
		800	4,600	260	430
	Preston寒天培地	0	<3	0	<3
		8	23	3	9.1
		80	460	26	43
		800	4,600	260	430

試行は1回

表 - 16 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (牛糞便の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	<3	0	<3
		2	3.6	3	3.6
		24	120	25	43
		240	430	250	43
	Preston寒天培地	0	<3	0	<3
		2	3.6	3	3.6
		24	120	25	23
		240	430	250	43
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	<3	0	<3
		2	3.6	3	9.1
		24	39	25	23
		240	930	250	230
	Preston寒天培地	0	<3	0	<3
		2	3.6	3	9.1
		24	39	25	23
		240	930	250	230

試行は1回

3) 輸送糞便中のカンピロバクターの減少率の検討

結果を表 - 17及び18に示した。

常温保管の場合にはほとんどの場合に生菌数の減少が認められた。

一方、低温で保管した場合は24時間後の生菌数に大きな差は認められなかった。

以上、低温で輸送する限り糞便中のカンピロバクター生菌数の大きな増減はないものと考えられた。ただし、Preston培地での輸送を行う場合はサンプリングの現場で1gを正確に量り取る必要があることを考慮すると、嫌気ポーターに糞便を採取して輸送した方が合理的であると考えられた。

表 - 17 各保管条件でのカンピロバクター生菌数の増減 (牛糞便の場合)

保管形態	保管温度	保管時間	生菌数の増減	
			<i>C. jejuni</i> 実測値 (/g)	<i>C. coli</i> 実測値 (/g)
嫌気ポーター	****	0時間	4,300	2,300
	約2～10℃*	24時間	4,300	2,300
	常温 (20℃)	24時間	4,300	930
Preston培地	****	0時間	2,300	4,300
	約2～10℃*	24時間	4,300	4,300
	常温 (20℃)	24時間	2,300	930

* 発泡スチロールの箱に蓄冷剤を詰めて保管した。

試行は1回

表 - 18 各保管条件でのカンピロバクター生菌数の増減 (鶏糞便の場合)

保管形態	保管温度	保管時間	生菌数の増減	
			<i>C. jejuni</i> 実測値 (/g)	<i>C. coli</i> 実測値 (/g)
嫌気ポーター	****	0時間	2,300	4,300
	約2～10℃*	24時間	4,300	4,300
	常温 (20℃)	24時間	1,500	93
Preston培地	****	0時間	4,300	2,400
	約2～10℃*	24時間	4,300	2,300
	常温 (20℃)	24時間	2,300	2,300

* 発泡スチロールの箱に蓄冷剤を詰めて保管した。

試行は1回

4) 糞便からの *Campylobacter* 検出 (定性) 及び定量法フローシート

以上の結果より、家畜等 (鶏及び牛) の食肉から *Campylobacter* を検出 (定性) あるいは定量するに当たって推奨される方法が決定した。

定性試験においては、糞便1gをPreston培地100mlが入った試験管に接種して42℃で48時間微好気培養する。培養液をSkirrow寒天培地に画線分離し、42℃で48～72時間培養する。培養後、培養平板上に出現した *Campylobacter* を疑われる集落についてPCR反応により *Campylobacter* か否かの確認を行う。

定量試験においては、糞便1g (牛の場合は10g) にリン酸緩衝生理食塩水9ml (牛の場合は90ml) を加えて良く混合した後、常法にしたがって10倍段階希釈液を調製して試料液とする。各試料液をPreston培地10mlが入った試験管に接種して42℃で48時間微好気培養する。培養液をSkirrow寒天培地に画線分離し、42℃で48～72時間培養する。培養後、培養平板上に出現した *Campylobacter* を疑われる集落についてPCR反応により *Campylobacter* か否かの確認を行う。

上記の試験法フローシートを図 - 8及び9に示した。

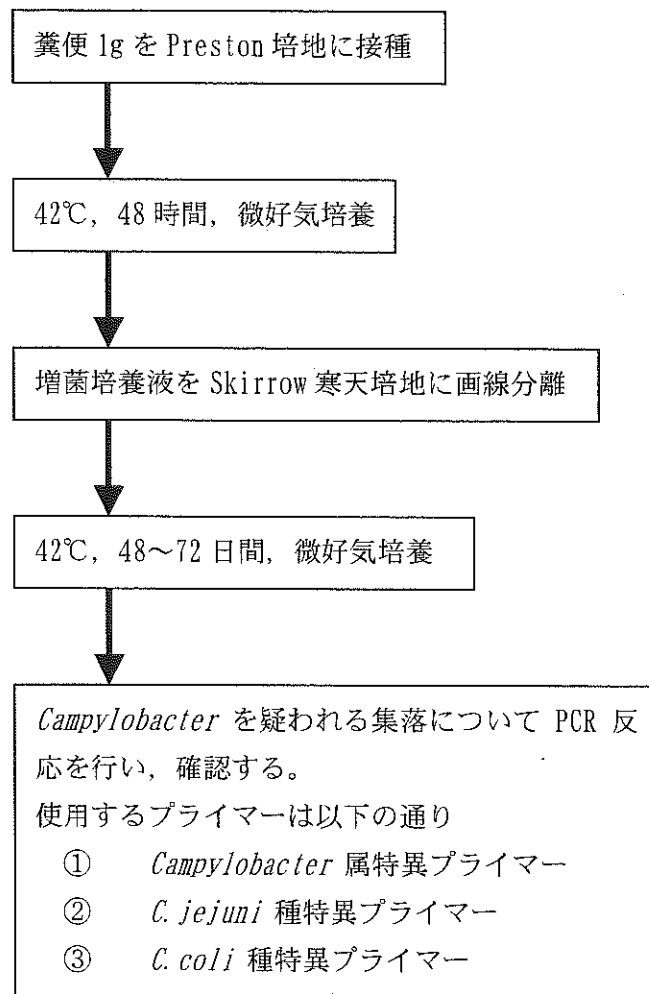


図 - 8 家畜等 (鶏及び牛) の糞便からの *Campylobacter* の定性試験方法

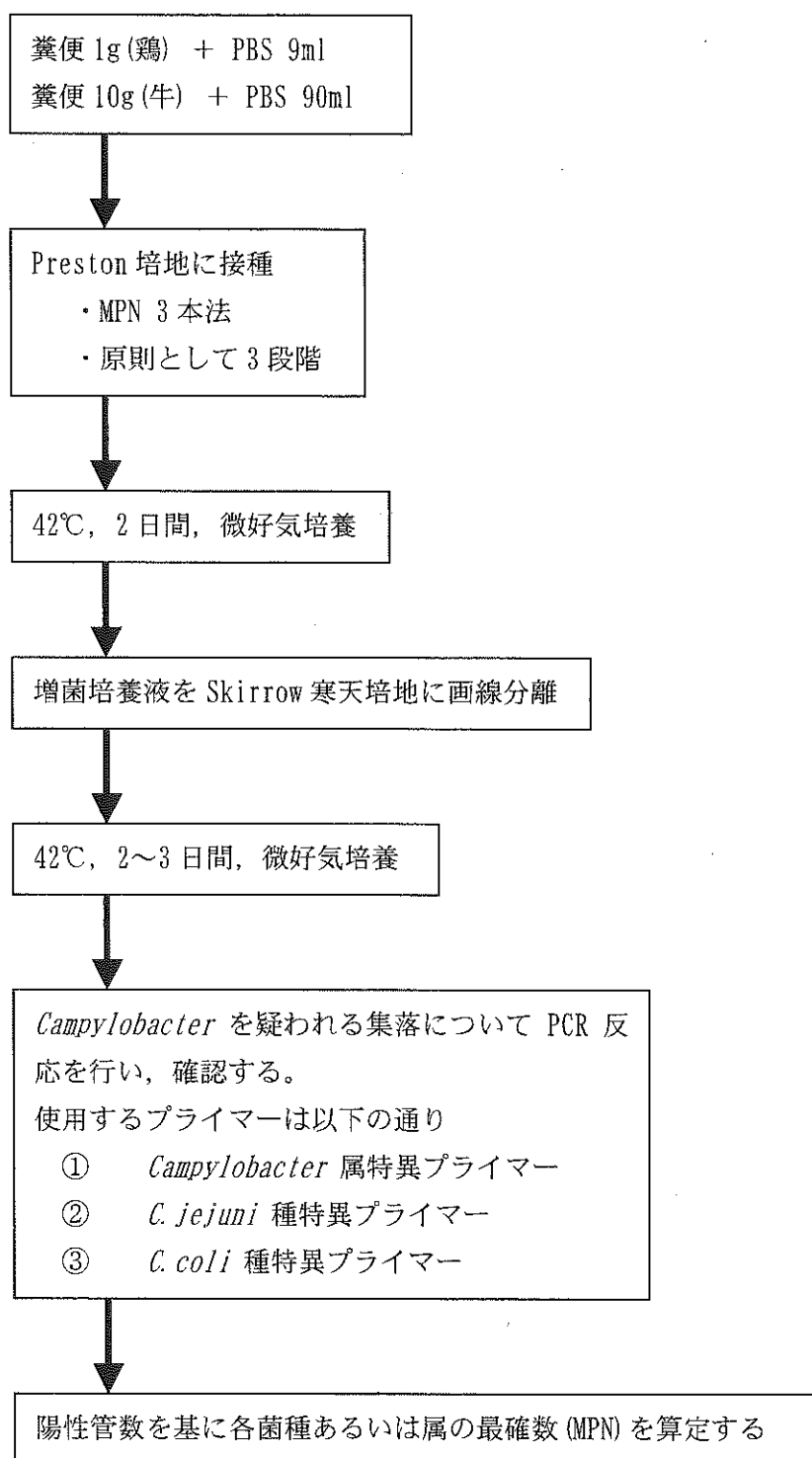


図 - 9 家畜等(鶏及び牛)の糞便からの *Campylobacter* の定量試験方法

Ⅱ 家畜等(鶏及び牛)の食肉からの*Campylobacter*の検出方法(定性)及び検出感度の検討

1 材料

1) 食肉

市販の鶏肉(ササミ)及び牛肉(モモ)を用いた。

2) 菌株

Campylobacter jejuni DSM 4688

Campylobacter coli DSM 4689

2 方法

1) 食肉からの*Campylobacter*の検出方法(定性)、定量方法及び検出感度の検討

市販の鶏肉及び牛肉に*Campylobacter*の菌株を接種し、第2部のⅠの1の2)と同様に表-11に示した4種類の検出方法で接種菌の回収を試みた。なお、肉1 g当たりの*Campylobacter*接種菌数を 10^0 、 10^1 及び 10^2 の3濃度実施し、検出方法、定量方法及び検出感度の考察を同時に行える試験系とした。なお、定量方法はMPN算出法とした。

2) 増菌培地使用量の検討

肉の定性試験において、肉25 gに対して増菌培地100 ml(サンプルに対して増菌培地4倍量)でも接種菌の回収が可能か否かについて試験した。

3 結果及び考察

1) 食肉からの*Campylobacter*の検出方法(定性)及び検出感度の検討

結果を表-19及び20に示した。

鶏肉においては、増菌培地としてCEM培地を使用した場合、*C. coli*が検出されなくなる場合が多く見られた。

また、増菌培地としてPreston培地を使用した場合は、いずれの分離培地でも検出に差は認められなかったが、鶏肉を検体とした場合のPreston寒天培養平板上には*Campylobacter*以外の集落も多数生育しており、菌の鑑別がしづらかった。一方、Skirrow寒天培地では、他の細菌集落の出現がほとんど認められず、接種した*Campylobacter*の集落も十分生育していたことから、Skirrow寒天培地のほうが選択性において優れていると判断された。

牛肉においては、増菌培地と分離培地の組合せのいずれにおいても検出に差は認められなかったが、増菌培地をPreston培地、分離培地をSkirrow寒天培地とした場合の方が典型集落の確認が容易であった。

また、感度については、いずれの条件でも大きな差はなく、食肉1 gあたりに1桁の接種菌数でも検出することが可能であった。

これらの結果から、増菌培地としてPreston培地を、選択分離培地としてSkirrow寒天培地を使用することが有効であると判断された。

なお、カンピロバクターは酸素存在下では死滅速度が速いため、バクテリアチャンバーを用いて顕微鏡により計測した菌液の細胞数から換算して理論接種菌数とした。

表 - 19 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (鶏肉の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
		8	+	6	—
		76	+	60	—
		760	+	600	—
Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
		8	+	6	—
		76	+	60	—
		760	+	600	+
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
		5	+	6	+
		52	+	59	+
		520	+	590	+
Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
		5	+	6	+
		52	+	59	+
		520	+	590	+

試行は1回

表 - 20 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (牛肉の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
		7	+	7	+
		22	+	66	+
		220	+	660	+
Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
		7	+	7	+
		22	+	66	+
		220	+	660	+
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
		7	+	6	+
		68	+	60	+
		710	+	260	+
Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
		7	+	6	+
		68	+	60	+
		710	+	260	+

試行は1回

2) 食肉からの *Campylobacter* の定量方法の検討

結果を表-21及び22に示した。

増菌培地としてCEM培地を使用した場合、*C. coli* の実測値はPreston培地で増菌した場合に比較して低くなる傾向が認められた。これは、鶏、牛いずれの場合にも認められたことから、糞便の場合と同様にCEM培地の選択性が特に*C. coli* に対して強く作用していることが示唆された。

一方、増菌培地としてPreston培地を使用した場合は、いずれの分離培地でも実測値に差はなかったが、鶏肉ではPreston寒天培養平板上には*Campylobacter*以外の集落も多数生育しており、他の細菌集落の出現がほとんど認められないSkirrow寒天培地のほうが選択性において優れていると判断された。

これらの結果から、増菌培地としてPreston培地を、選択分離培地としてSkirrow寒天培地を使用することが有効であると判断された。

菌種別にみると、*C. jejuni*についてはいずれの培地の組合せでも大きな差は認められなかったが、*C. coli*についてはCEM培地を増菌培地とした場合に定量性が劣ることが判明した。

したがって、定量試験においても増菌培地としてPreston培地を、選択分離培地として

Skirrow寒天培地を使用することが良いと判断された。

なお、カンピロバクターは酸素存在下では死滅速度が速いため、顕微鏡を用いて計測した菌液の細胞数から換算して理論接種菌数とした。また、実測値はMPN算出法により得られた最確数を1 g当りに換算して示した。

定量方法については、増菌培養を必要とするためMPN算出法以外の手法が無く、本試験でもMPN算出法で実施することとした。

表 - 21 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (鶏肉の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		8	0.72	6	<0.3
		76	1.6	60	<0.3
		760	290	600	<0.3
	Preston寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		8	0.72	6	<0.3
		76	16	60	<0.3
		760	290	600	0.91
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		5	4.3	6	4.3
		52	240	59	93
		520	1100	590	430
	Preston寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		5	9.3	6	24
		52	240	59	93
		520	1100	590	430

試行は1回

表 - 22 各条件におけるカンピロバクター回収結果 (牛肉の場合)

増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
		理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	実測値 (/g)
CEM培地	Skirrow寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		7	9.3	7	0.91
		22	43	66	2.3
		220	460	660	2.3
Preston培地	Preston寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		7	9.3	7	2.3
		22	43	66	2.3
		220	460	660	2.3
Preston培地	Skirrow寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		7	46	6	24
		68	93	60	110
		710	930	260	230
Preston培地	Preston寒天培地	0	<0.3	0	<0.3
		7	9.3	6	24
		68	93	60	110
		710	2400	260	230

試行は1回

3) 増菌培地使用量の検討

肉25 gに対して増菌培地量100 mlにした場合の接種菌の回収試験結果を表-23に示した。

増菌培地としてCEM培地を使用し、鶏肉1 g当たり1桁の菌接種の場合に検出されない場合が認められたものの、増菌培地としてPreston培地を使用した場合には低濃度の菌接種でも検出が可能であった。

以上の結果から、増菌培地にPreston培地を使用すれば、25 gの肉に対して100 mlの増菌培地での検出に問題が無いことが判明した。

表 - 23 肉25 gに対して増菌培地を100 ml使用した場合

対象	増菌培地	選択 分離培地	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	
			理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)	理論接種 菌数 (/g)	検出 (/g)
鶏肉	CEM培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
			6	—	6	—
			55	+	60	+
			550	+	660	+
	Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
			6	+	6	—
			55	+	60	+
			550	+	660	+
	Preston培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
			9	+	6	+
			86	+	57	+
			860	+	570	+
牛肉	CEM培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
			9	+	6	+
			86	+	57	+
			860	+	570	+
	Skirrow寒天培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
			7	+	7	+
			66	+	66	+
			660	+	660	+
	Preston培地	Skirrow寒天培地	0	—	0	—
			5	+	6	+
			51	+	64	+
			510	+	640	+
牛肉	Preston培地	Preston寒天培地	0	—	0	—
			5	+	6	+
			51	+	64	+
			510	+	640	+

4) 家畜等(鶏及び牛)の食肉からの*Campylobacter*検出(定性)及び定量法フローシート

以上の結果より、家畜等(鶏及び牛)の食肉からの*Campylobacter*を定性あるいは定量するに当たって推奨される方法が決定した。

定性試験においては、食肉25gをPreston培地100mlに直接接種して42℃で48時間培養する。培養液をSkirrow寒天培地に画線分離し、42℃で48～72時間培養する。培養後、培養平板上に出現した*Campylobacter*を疑われる集落についてPCR反応により*Campylobacter*か否かの確認を行う。

定量試験においては、食肉1gにリン酸緩衝生理食塩水9mlを加えて良く混合した後、常法にしたがって10倍段階希釈液を調製して試料液とする。各試料液をPreston培地10mlが入った試験管に接種して42℃で48時間微好気培養する。培養液をSkirrow寒天培地に画線分離し、42℃で48～72時間培養する。培養後、培養平板上に出現した*Campylobacter*を疑われる集落についてPCR反応により*Campylobacter*か否かの確認を行う。

上記の試験法フローシートを図-10及び11に示した。

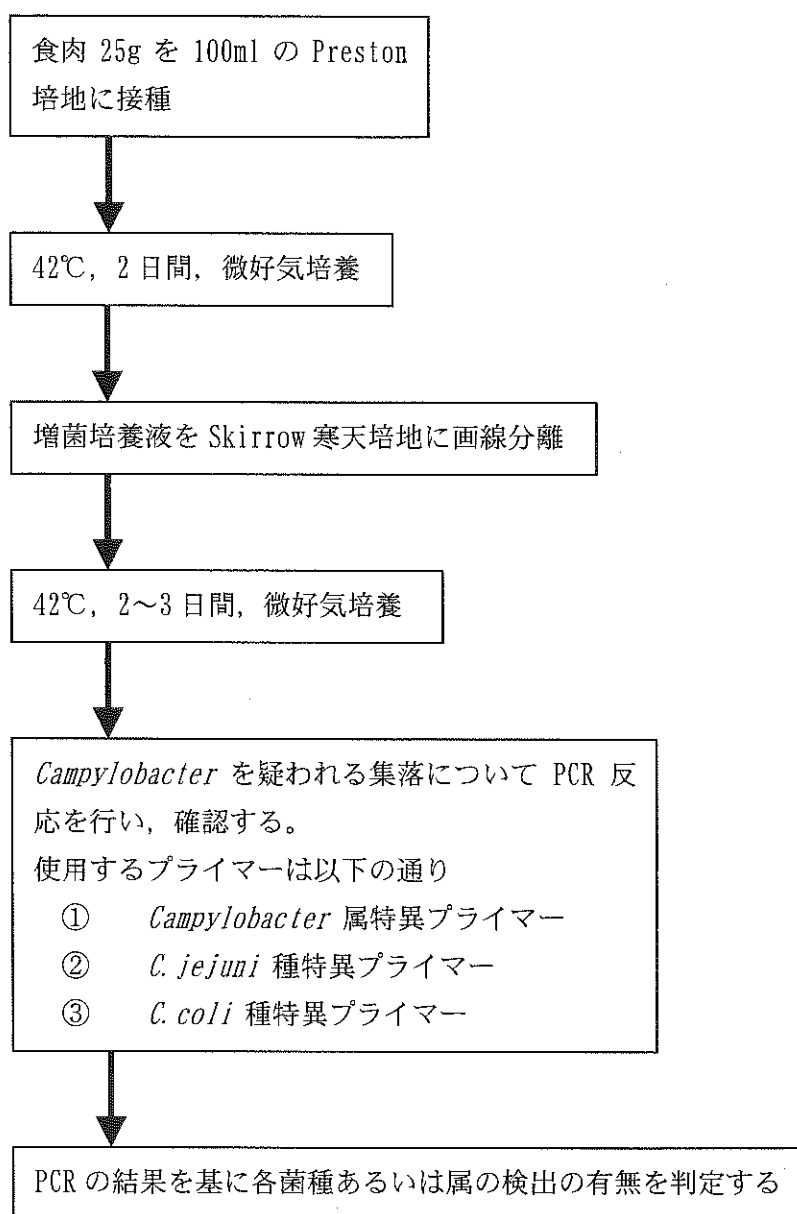


図 - 10 食肉からの *Campylobacter* 定性試験方法

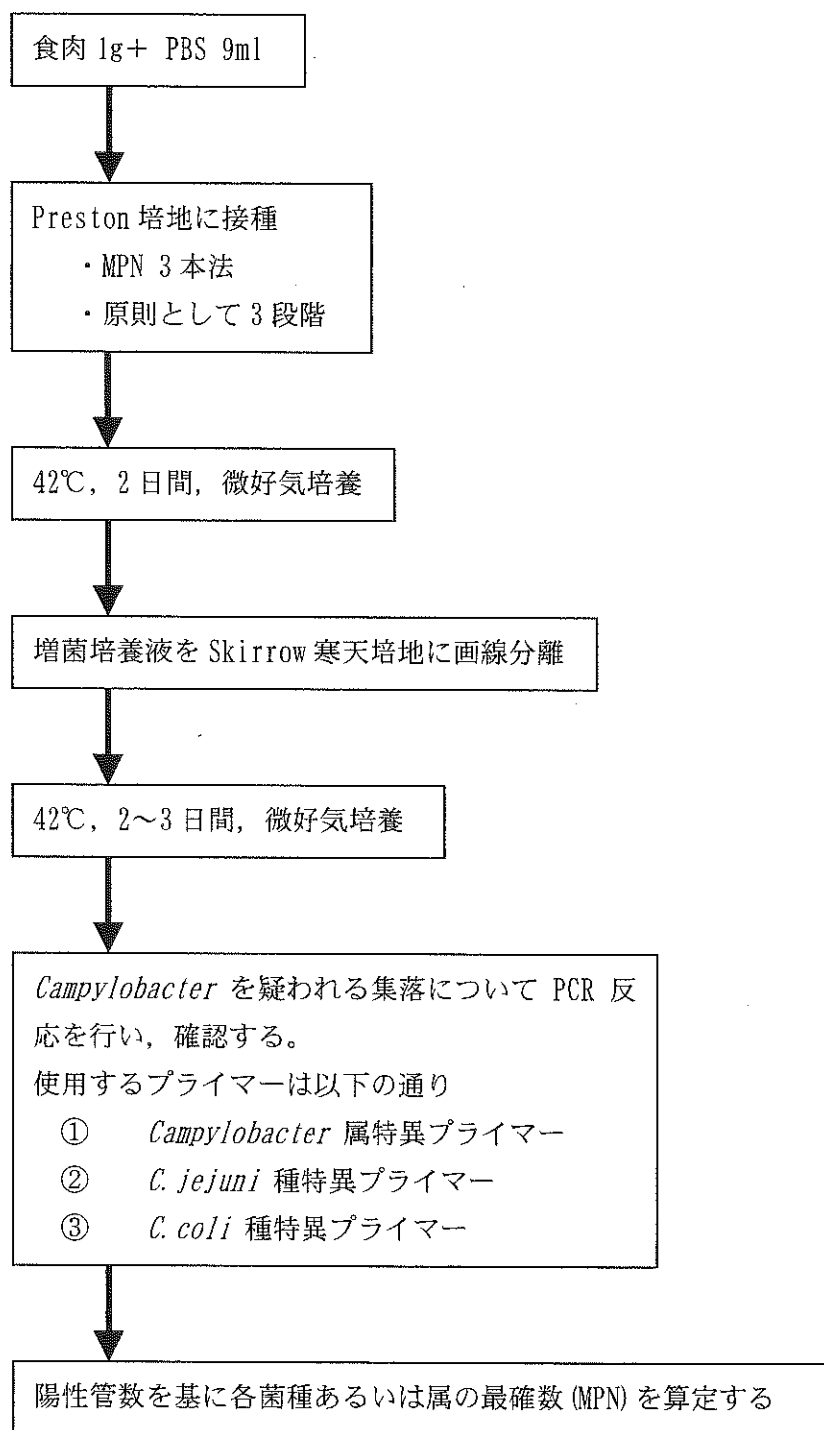


図 - 11 食肉からの *Campylobacter* 定量試験方法

第3部 農場で飼養されている採卵鶏の
*Salmonella*及び*Campylobacter*の汚染実態について

第3部 農場で飼養されている採卵鶏の

*Salmonella*及び*Campylobacter*の汚染実態について

I 農場で飼養されている採卵鶏の*Salmonella*汚染実態について

農場で飼養されている採卵鶏の*Salmonella* 汚染実態を調査することにより，食中毒発生の汚染経路解明のための基礎的データを収集することを目的とした。

1 対象地域と農場

全国を5地域に区分し，各地域から2農場ずつを選定した。

なお，選定した農場とその所在地域の一覧を表-24に示した。

表-24 糞便及び鶏卵採取農場の一覧

地域ブロック	農場略号
北海道／東北	A
	B
関東／甲信越	C
	D
東海／北陸	E
	F
中国／四国	G
	H
九州／沖縄	I
	J

2 材料

1農場につき10箇所から糞便を約50gずつ滅菌臨床コップに採取した。採取する糞便は乾燥が進んでいない新鮮なものとした。採取した糞便は直ちに蓄冷剤を入れた発泡スチロールボックスに保管し，試験室へ搬送した。また，1農場につき鶏卵300個（鶏舎あるいはラインごとに10箇所から30個ずつ）を採取し，クール便にて試験室へ搬送した。

3 方法

1) 糞便について

良く混合した糞便1gをRappaport-Vassiliadis培地10mlが入った試験管に接種して36℃で24時間培養した。培養液についてPCR反応を行い，*Salmonella*のスクリーニングを実施した。PCRで陽性反応が認められた試験管の培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し，36℃で24時間培養した。培養後，*Salmonella*が疑われる集落について

て *Salmonella* Enteritidis か否かを生化学的性状試験及び血清学的試験により確認した。
上記の試験法フローシートを図 - 12 に示した。

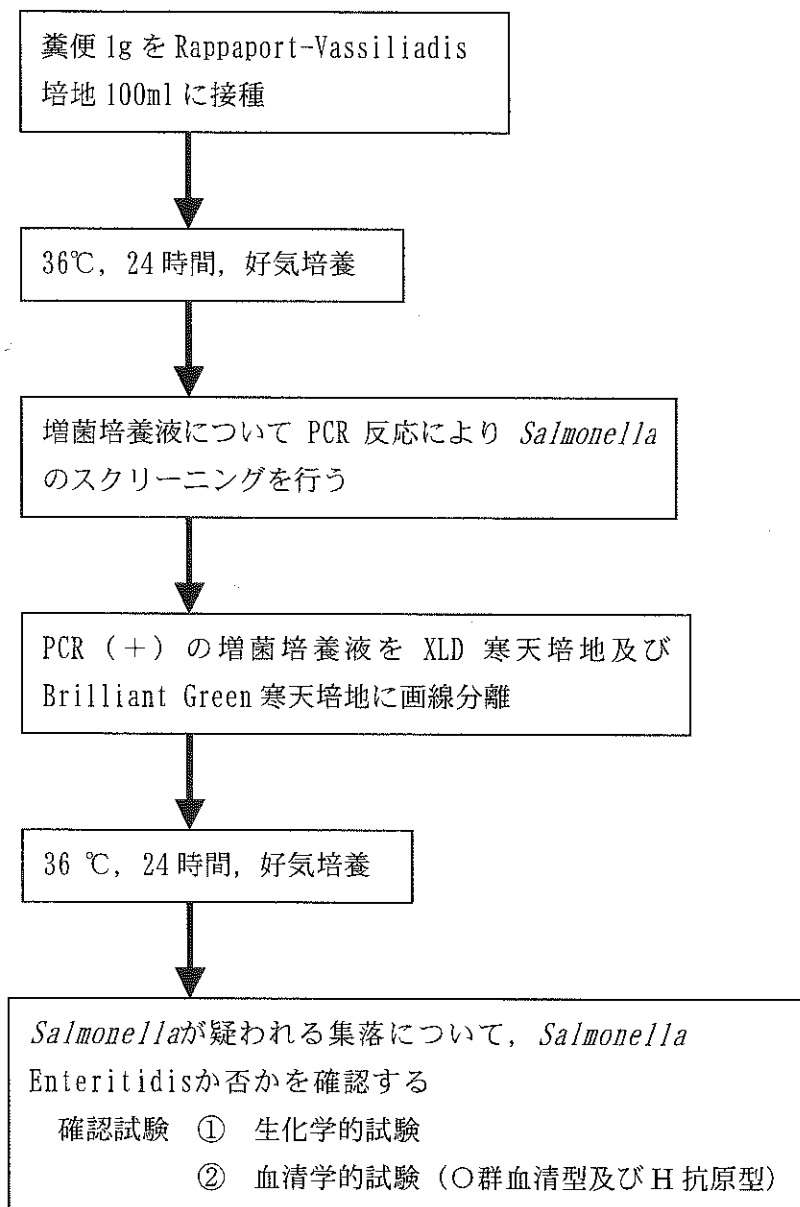


図 - 12 採卵鶏の糞便からの *Salmonella* 定量試験方法

2) 鶏卵について

卵殻を酒精綿で殺菌後に割卵し、全卵を混合した後、25 gを採取した。システイン加緩衝ペプトン水225 mlを加えて混合後、36 ℃、好気条件で24時間培養した。増菌培養液についてPCR反応により *Salmonella* のスクリーニングを行った。PCR陽性の増菌培養液0.5 mlをTT培地及びRV培地に接種し、42 ℃、好気条件で24時間培養した。増菌培養液をXLD寒天培地及びBrilliant Green寒天培地に画線分離し、36 ℃、好気条件で24時間培養した。

Salmonella が疑われる集落について、*Salmonella* Enteritidisか否かを確認した。

Salmonella が検出された場合は、同じ試験をMPN算出法で実施することにより *Salmonella* の定量試験を実施した。

なお、PCR反応によるスクリーニングは、*Salmonella* 用検出試薬セットを用いた 自動PCR (BAX™システム) により実施した。

上記試験方法のフローシートを図-13に示した。

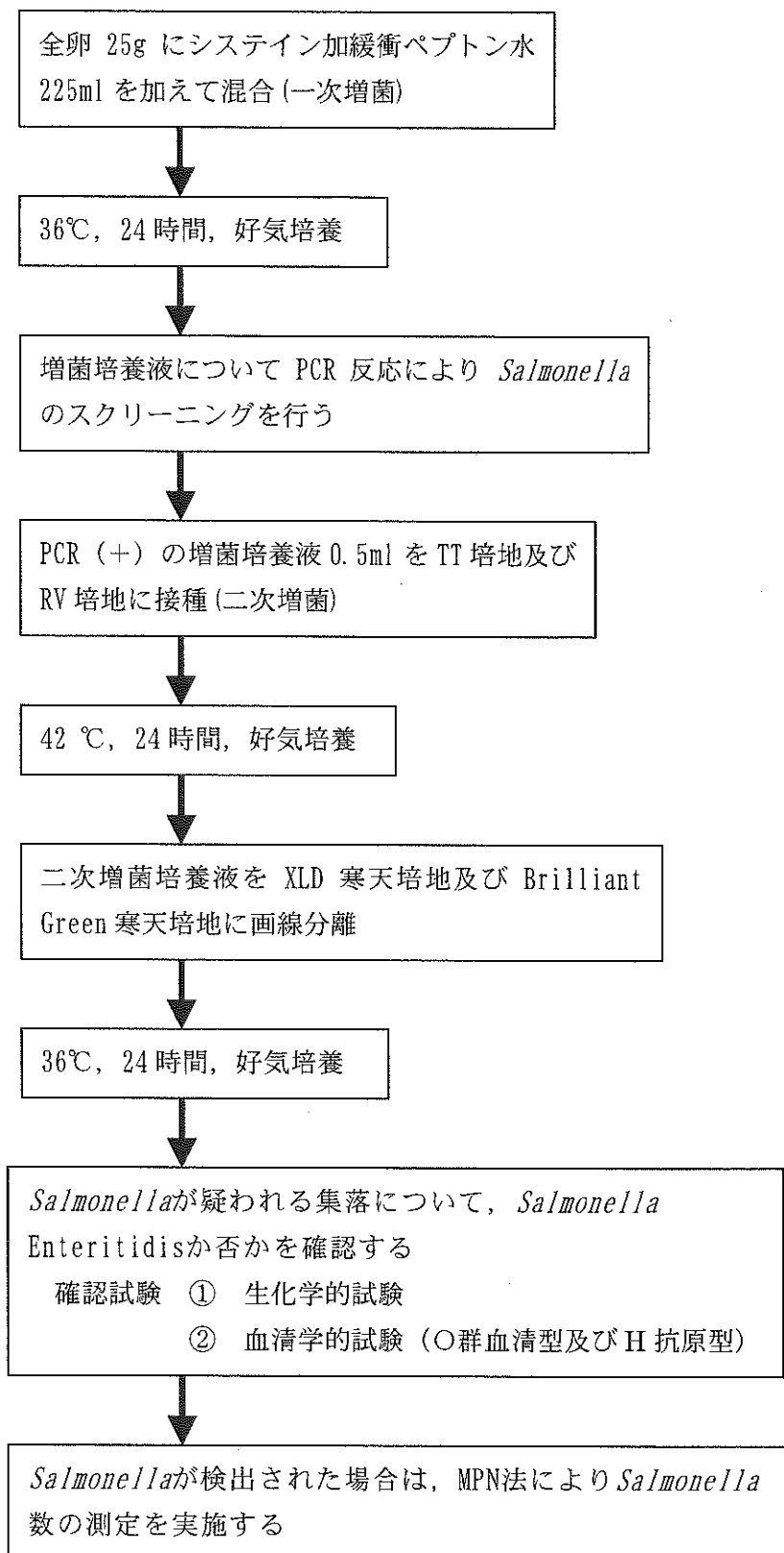


図 - 13 鶏卵からの *Salmonella* 検出試験方法

3) 使用した機器・培地等について

本試験で使用した主要な機器と培地等の一覧を表-25に示した。

表-25 使用機器及び培地一覧 (*Salmonella*)

対象	名 称	メーカー名	機種番号
機器	BAXシステム	QUALICON	20-DP-0100
試薬	<i>Salmonella</i> 用検出試薬セット	QUALICON	****
培地	Rappaport-Vassiliadis培地	Merck	****
	XLD寒天培地	Oxoid	****
	Brilliant Green寒天培地	(Difco)	****
	○群抗血清	デンカ生研	****
	システイン加緩衝ペプトン水	栄研器材	****
	TT培地	Oxoid	****

()内はブランド名

4 結果及び考察

1) 糞便について

検出試験結果を表-26に示した。また、鶏群内汚染率、地域内汚染率及び鶏群汚染率を表-27に示した。

農場Eの*Salmonella*汚染率は40%と高かったが、その他の9農場からは*Salmonella*はまったく検出されなかった。

また、糞便4検体から*Salmonella*が検出された農場Eにおいても、その血清型はいずれもO7であったことからO9の血清型を示す*Salmonella* Enteritidis ではないことが確認された。

表-26 糞便における *Salmonella* 検出試験結果

農場名 略号	判定対象	検体番号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
E	<i>Salmonella</i>	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—
	<i>S. Enteritidis</i>	NT	NT	(O7)	(O7)	(O7)	NT	(O7)	NT	NT	NT
F	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
I	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
J	<i>Salmonella</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—：陰性/1g

＋：陽性/1g, ()内はO群血清型を示す

NT：試験実施せず

表-27 鶏群汚染率及び鶏群内汚染率(%) [糞便]

汚染率	農場略号									
	北海道/東北		関東/甲信越		東海/北陸		中国/四国		九州/沖縄	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
鶏群内汚染率	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
地域内汚染率	0		0		20		0		0	
鶏群汚染率	10									

鶏群内汚染率(%) = 1農場当たりの *Salmonella* が検出された検体数 ÷ 1農場当たりの検体数 × 100

地域内汚染率(%) = 1地域当たりの *Salmonella* が検出された検体数 ÷ 1地域あたりの検体数 × 100

鶏群汚染率(%) = *Salmonella* が検出された農場数 ÷ 調査対象農場数 × 100

2) 鶏卵について

試験結果を表-28に示した。また、鶏群内汚染率、地域内汚染率及び鶏群汚染率を表-29に示した。

糞便からの *Salmonella* 検出率が40%の農場Eを含めて、いずれの農場の鶏卵からも *Salmonella* は検出されなかった。

表-28 鶏卵における *Salmonella* 検出試験結果

農場名 略号	採取箇所									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
B	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
C	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
D	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
E	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
F	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
G	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
H	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
I	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
J	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30

0/30 : *Salmonella*陽性数/検体数

表-29 鶏群汚染率及び鶏群内汚染率 (%) [鶏卵]

汚染率	農場略号									
	北海道/東北		関東/甲信越		東海/北陸		中国/四国		九州/沖縄	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
鶏群内汚染率	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
地域内汚染率	0		0		0		0		0	
鶏群汚染率	0									

鶏群内汚染率 (%) = 1農場当たりの *Salmonella* が検出された検体数 ÷ 1農場当たりの検体数 × 100

地域内汚染率 (%) = 1地域当たりの *Salmonella* が検出された検体数 ÷ 1地域あたりの検体数 × 100

鶏群汚染率 (%) = *Salmonella* が検出された農場数 ÷ 調査対象農場数 × 100

II 農場で飼養されている採卵鶏の*Campylobacter*汚染実態について

農場で飼養されている採卵鶏の*Campylobacter* 汚染実態を調査することにより，食中毒発生の汚染経路解明のための基礎的データを収集することを目的とした。

1 対象地域と農場

全国を5地域に区分し，各地域から2農場ずつを選定した。

なお，選定した農場とその所在地域の一覧を表-30に示した。

表-30 糞便及び鶏卵採取農場の一覧

地域ブロック	農場略号
北海道／東北	A
	B
関東／甲信越	C
	D
東海／北陸	E
	F
中国／四国	G
	H
九州／沖縄	I
	J

2 材料

1農場につき10箇所から糞便を約2gずつ嫌気ポーターに採取した。採取する糞便は乾燥が進んでいない新鮮なものとした。糞便を入れた嫌気ポーターを直ちに蓄冷剤を入れた発泡スチロールボックスに保管し，試験室へ搬送した。

3 方法

1) 糞便からの*Campylobacter*検出方法 (定性)

良く混合した糞便1gをPreston培地10mlが入った試験管に接種して42℃で48時間微好気培養した。培養液をSkirrow寒天培地に画線分離し，42℃で48～72時間培養した。培養後，培養平板上に出現した*Campylobacter*を疑われる集落についてPCR反応により*Campylobacter*か否かの確認を行った。さらに，*Campylobacter*が陽性となった集落については，*C. jejuni* あるいは*C. coli* のいずれであるかを，それぞれの菌種の特異的プライマーを用いて確認した。上記の試験法フローシートを図-14に示した。

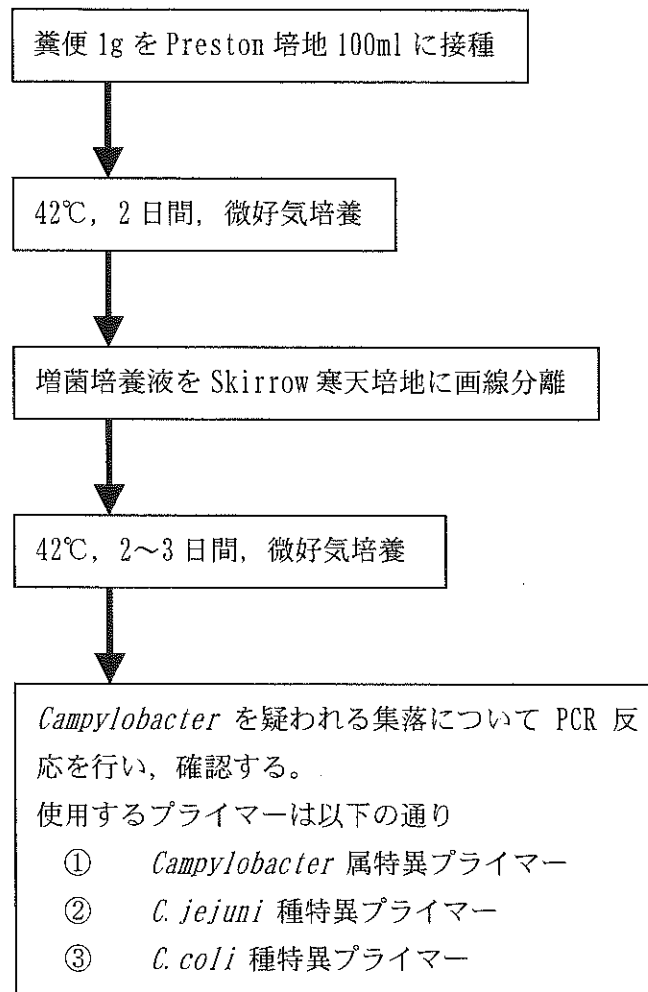


図 - 14 採卵鶏の糞便からの *Campylobacter* 定性試験方法

2) 使用した機器・培地等について

本試験で使用した主要な機器と培地等の一覧を表-31に示した。

表-31 使用機器及び培地一覧 (*Campylobacter*)

対象	名 称	メーカー名	機種番号
機器	遺伝子増幅装置 (PCR)	Perkin-Elmer	Gene Amp PCR System 9600
	電気泳動装置	Advance	Mupid II
	トランスイルミネーション	フナコシ	FTI-20M
培地 及び 試薬等	Preston培地	Oxoid	****
	Preston培地用Selective Supplement	Oxoid	****
	Preston培地用Growth Supplement	Oxoid	****
	Skirrow寒天培地	Oxoid	****
	Skirrow寒天培地用抗生物質	Oxoid	****
	PCR用 <i>Taq</i> ポリメラーゼ	タカラバイオ	****
	Agarose	Sigma	****
	100bp DNA Ladder (マーカー)	タカラバイオ	****

4 結果及び考察

試験結果を表-32に示した。また、鶏群内汚染率、地域内汚染率及び鶏群汚染率を表-33に示した。

Campylobacter 属検出率は、農場間では0～50%の幅が認められた。*Campylobacter* 属が検出された農場からは必ず *C. jejuni* が検出され、*C. coli* のみが検出された農場は無かった。

また、鶏群汚染率としては、*C. jejuni* で80%、*C. coli* で30%であった。

これらの結果から、採卵鶏の糞便からの汚染としては主に *C. jejuni* に注目する必要があるものと思われた。

表-32 採卵鶏の糞便における *Campylobacter* 検出試験結果

[illegible]

表-33 鶏群汚染率及び鶏群内汚染率 (%)

汚 染 率	試 験 対 象	農 場 略 号									
		北海道/東北		関 東 / 甲 信 越		東 海 / 北 陸		中 国 / 四 国		九 州 / 沖 縄	
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
鶏 群 内 汚 染 率	<i>Campylobacter</i> 属	20	30	10	0	0	10	50	50	30	20
	<i>C. jejuni</i>	20	30	10	0	0	10	40	40	30	20
	<i>C. coli</i>	0	10	0	0	0	0	10	30	0	0
地 域 内 汚 染 率	<i>Campylobacter</i> 属	25		5		5		50		25	
	<i>C. jejuni</i>	25		5		5		40		25	
	<i>C. coli</i>	5		0		0		20		0	
鶏 群 汚 染 率	<i>Campylobacter</i> 属	80									
	<i>C. jejuni</i>	80									
	<i>C. coli</i>	30									

鶏群内汚染率 (%) = 1農場当たりの *Campylobacter* が検出された検体数 ÷ 1農場当たりの検体数 × 100

地域内汚染率 (%) = 1地域当たりの *Campylobacter* が検出された検体数 ÷ 1地域あたりの検体数 × 100

鶏群汚染率 (%) = *Campylobacter* が検出された農場数 ÷ 調査対象農場数 × 100

第4部 食中毒細菌の電子顕微鏡写真の撮影

第4部 食中毒細菌の電子顕微鏡写真の撮影

代表的な食中毒原因細菌の形態を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、写真撮影した。

1 使用菌株

以下に示した食中毒細菌について走査電子顕微鏡写真を撮影した。

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni* DSM 4688

Salmonella Enteritidis NBRC 3313

Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210100

Staphylococcus aureus NBRC 13276

Escherichia coli O112 IID 954

Clostridium perfringens JCM 1290

Escherichia coli O157 ATCC 43895

Bacillus cereus JCM 2152

Vibrio cholerae RIMD 2214034

Shigella sonnei IID 969

Clostridium botulinum typeA 62 (A型ボツリヌス菌, 大阪府立大学分与株)

Yersinia enterocolitica IID 981

2 撮影方法

使用菌株を液体培地で培養した後、2 %グルタルアルデヒド溶液及び1 %オスミウム酸溶液で固定した。これらに臨界点乾燥処理を行い、以下に示した撮影条件で各菌株の走査電子顕微鏡写真を撮影し、写真-1~36に示した。

なお、写真の下方にある各数字・記号は左から順に加速電圧、倍率及びスケールを示す。

<撮影条件>

試験装置：低真空機能付走査電子顕微鏡 JSM-5610LV [日本電子株式会社]

コーティング：Auコーティング；10 mA, 4 min

加速電圧：15 kV

試料傾斜：0°

作動距離：13 mm

倍 率：7,500及び10,000倍、ただし、カンピロバクターは10,000及び15,000倍で撮影した。

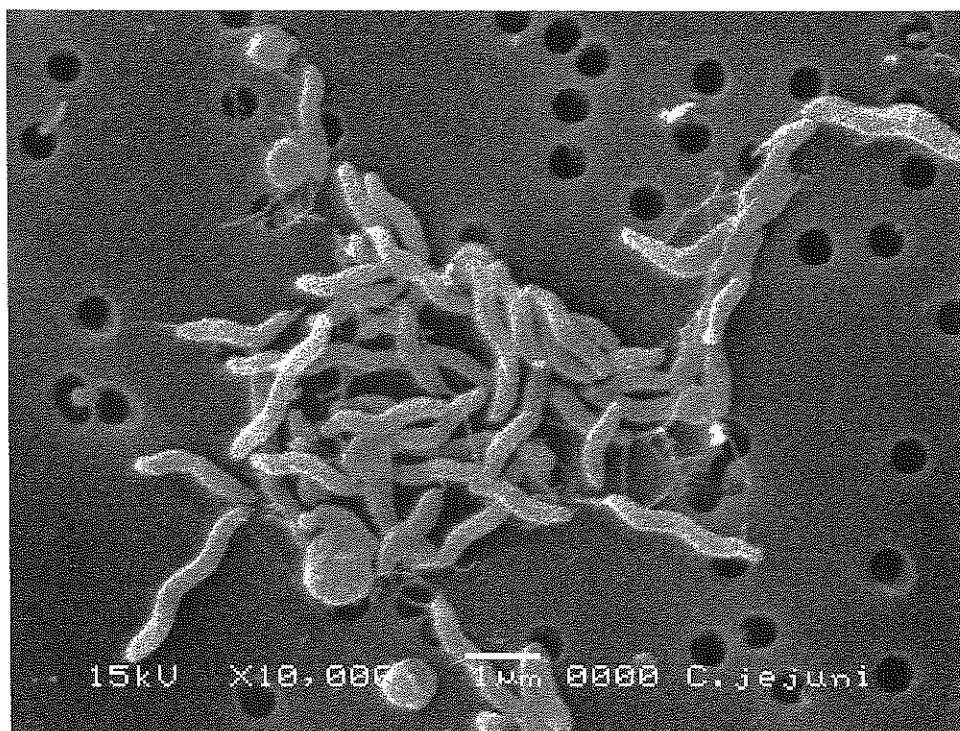


写真-1 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*の形態の一例

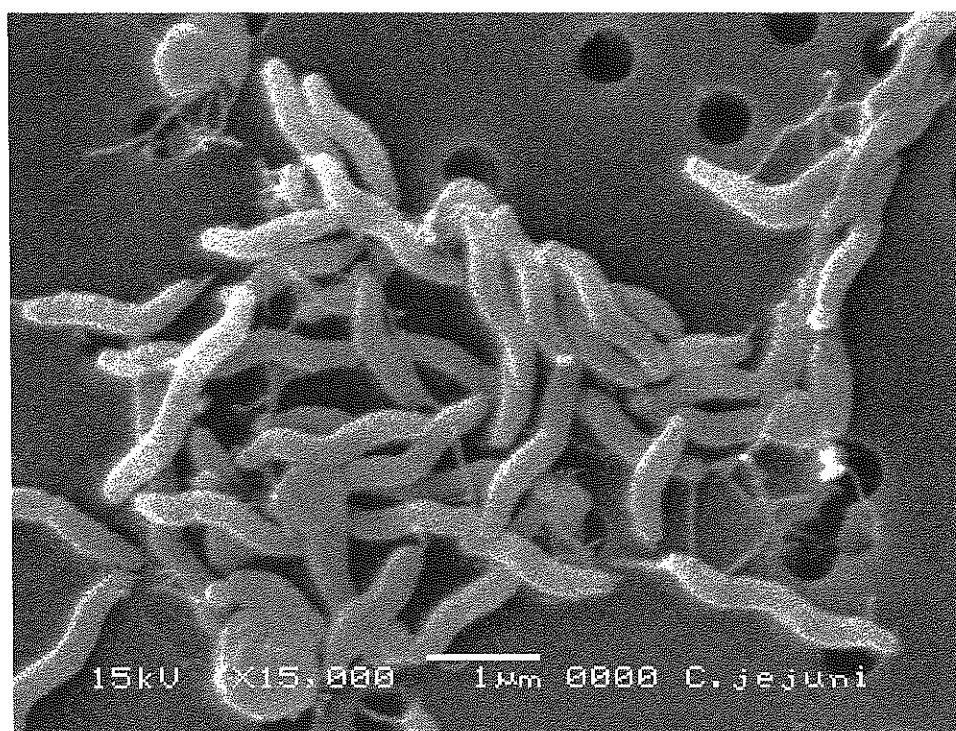


写真-2 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*の形態の一例

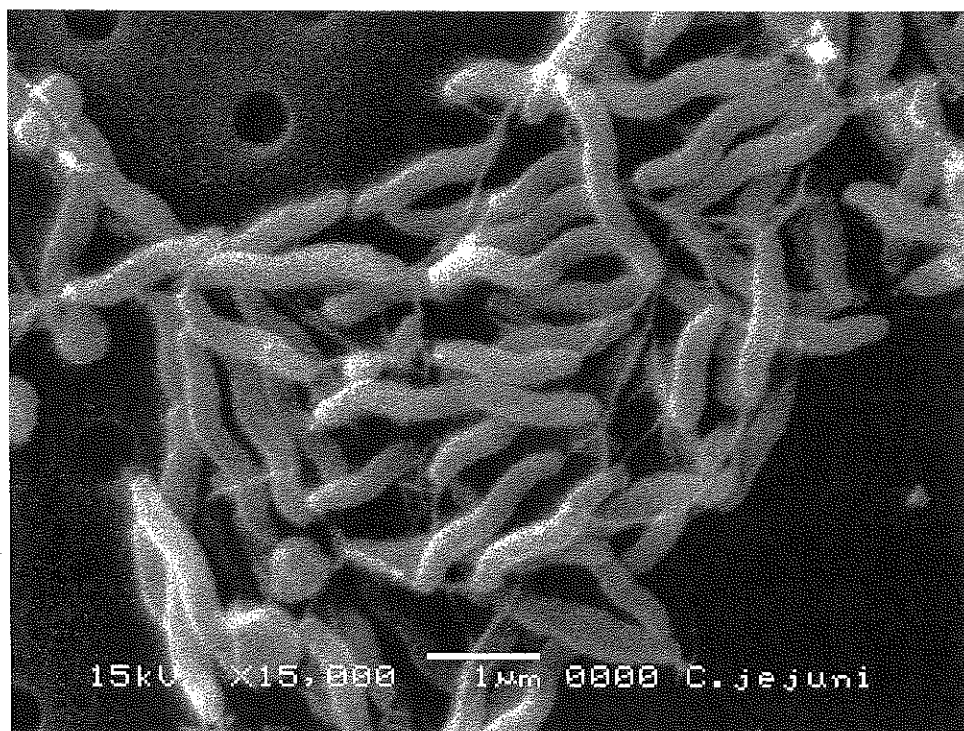


写真-3 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*の形態の一例

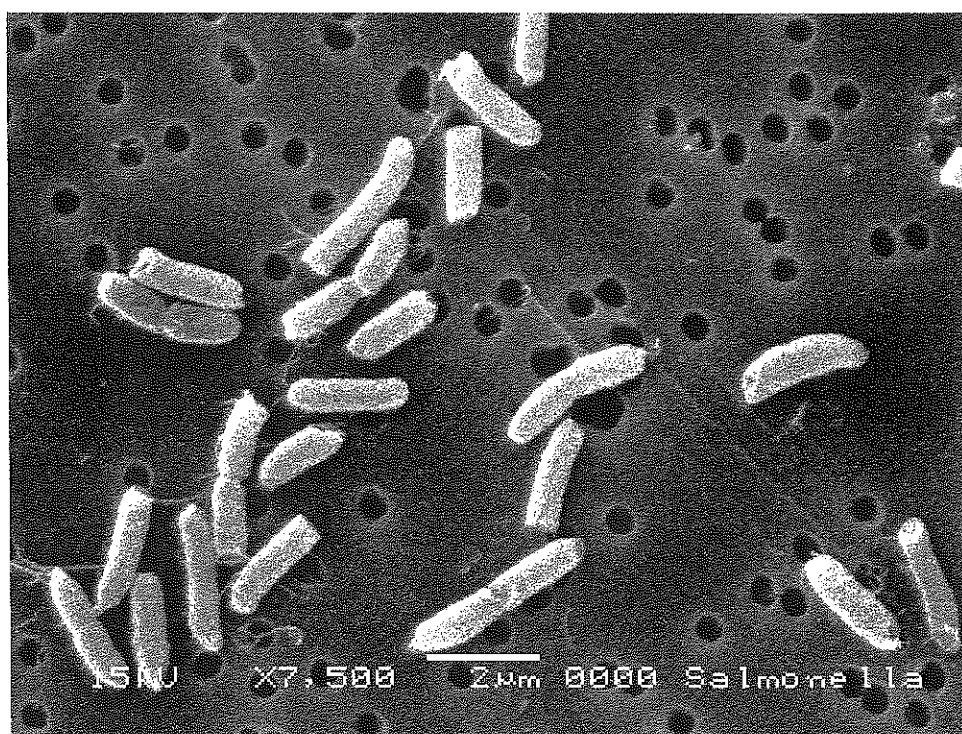


写真-4 *Salmonella Enteritidis*の形態の一例

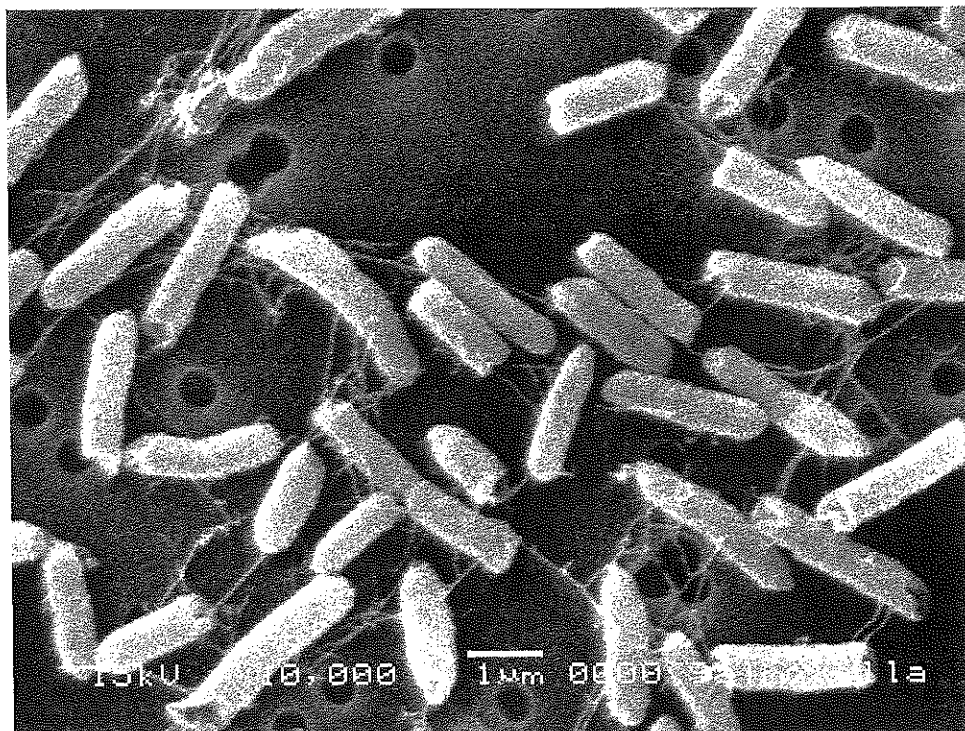


写真-5 *Salmonella* Enteritidisの形態の一例

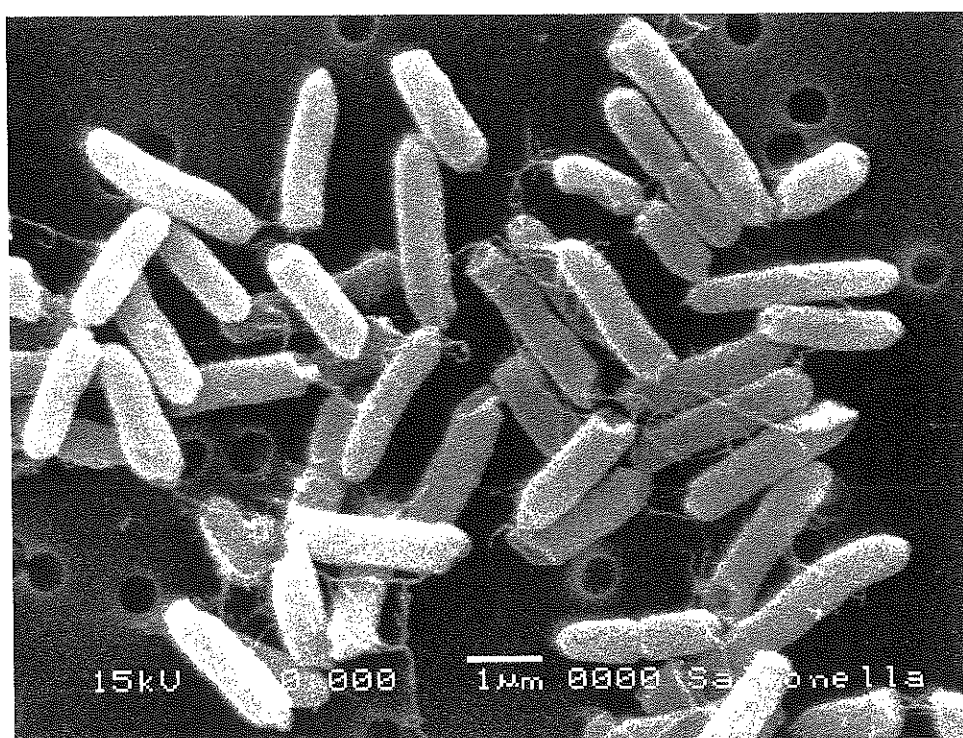


写真-6 *Salmonella* Enteritidisの形態の一例

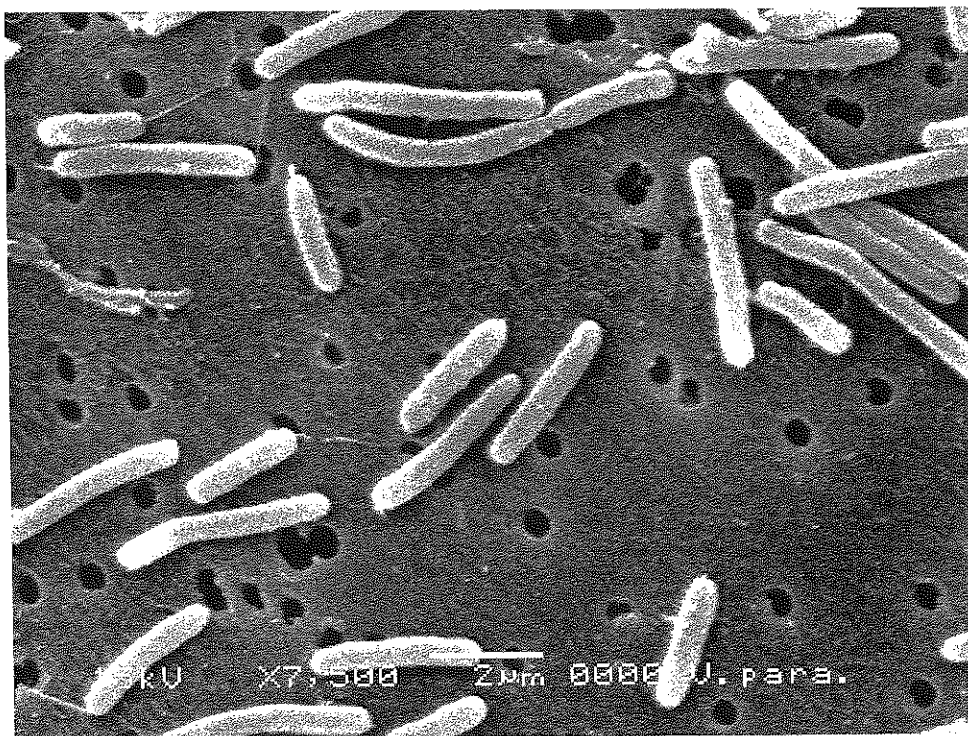


写真-7 *Vibrio parahaemolyticus*の形態の一例

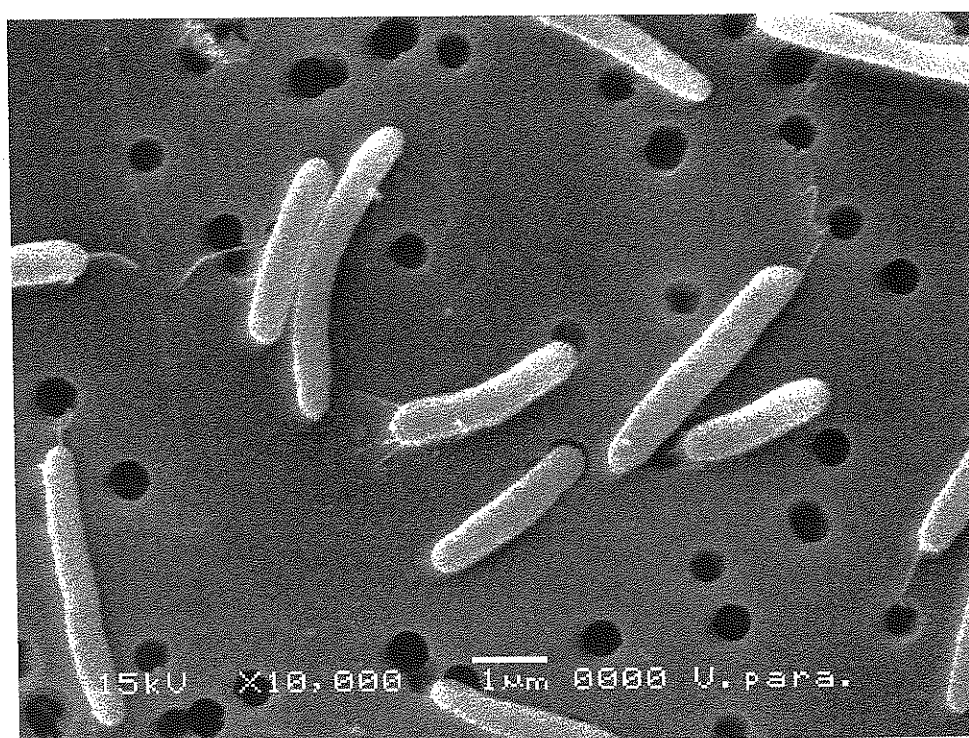


写真-8 *Vibrio parahaemolyticus*の形態の一例

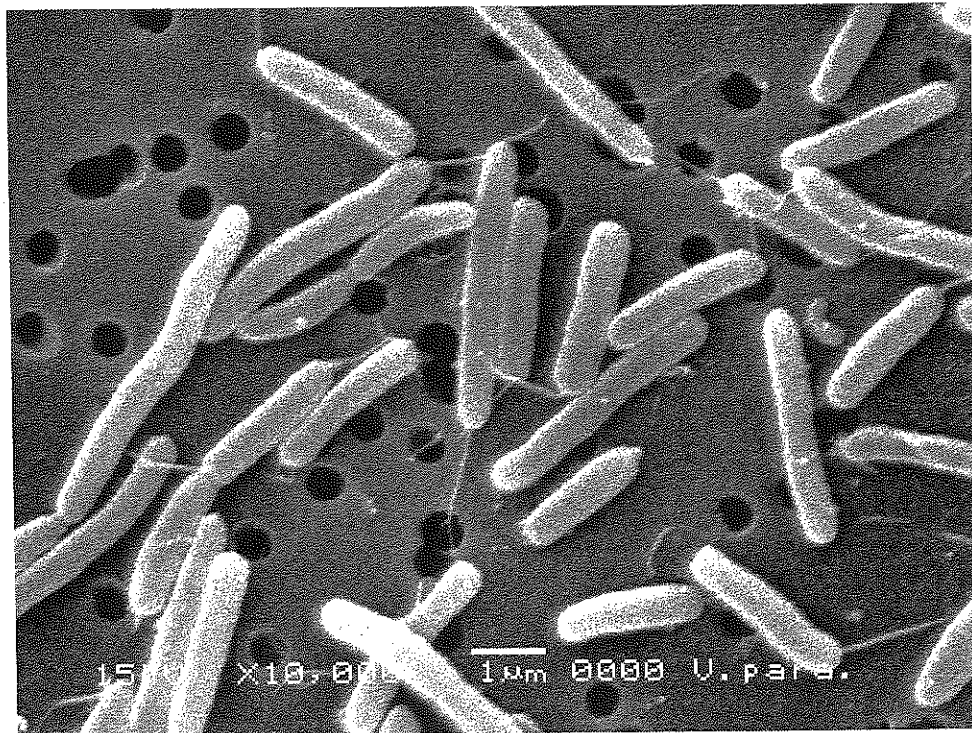


写真-9 *Vibrio parahaemolyticus*の形態の一例

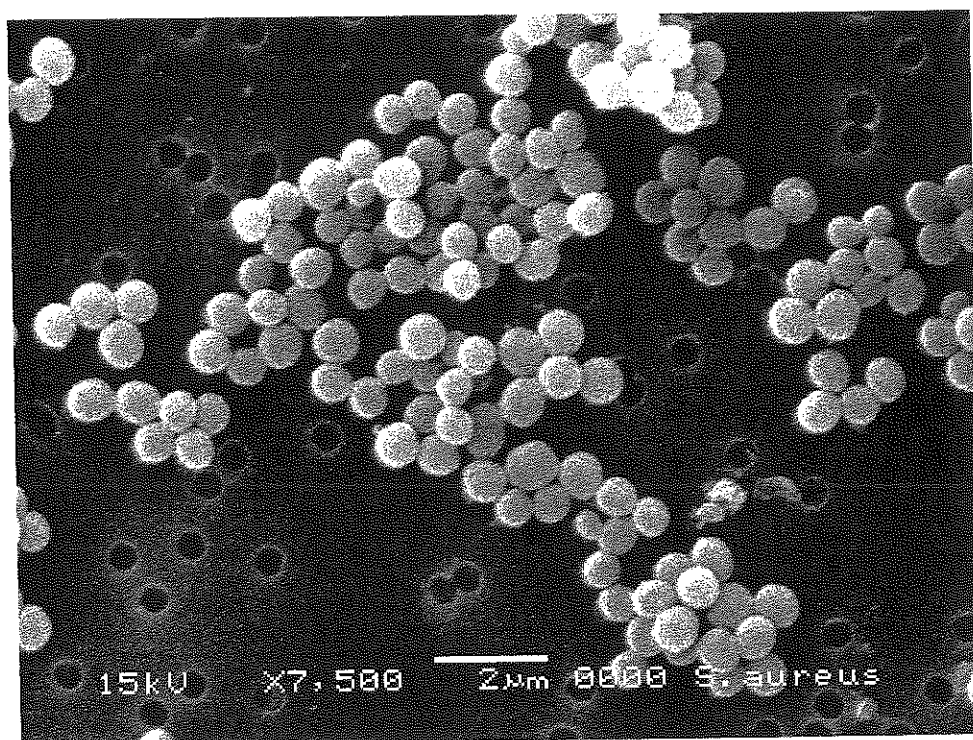


写真-10 *Staphylococcus aureus*の形態の一例

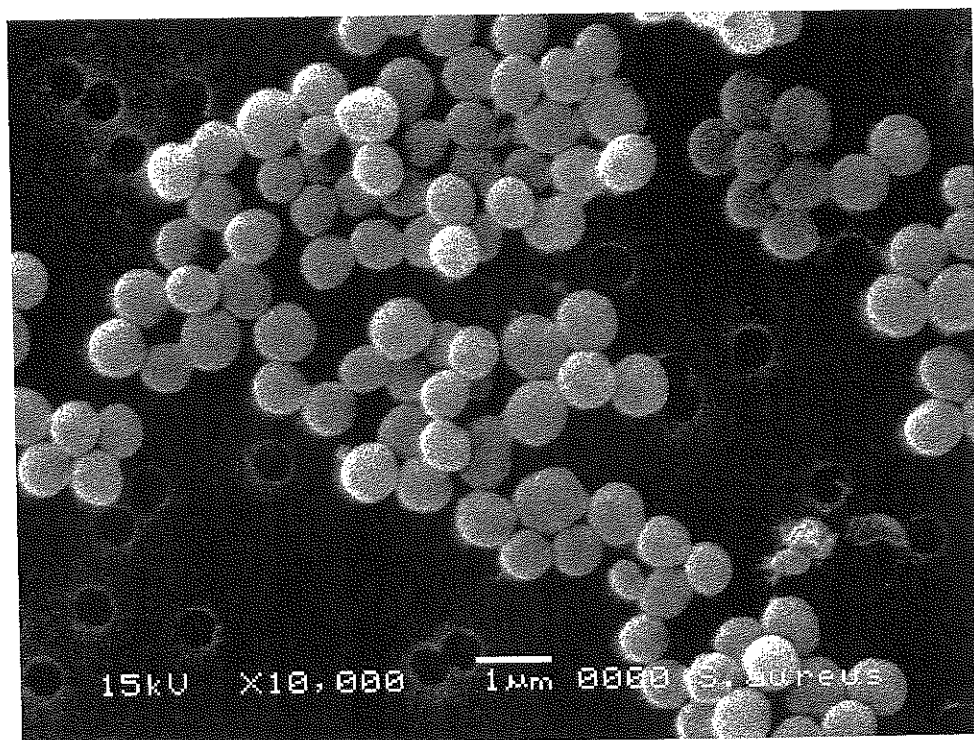


写真-11 *Staphylococcus aureus*の形態の一例

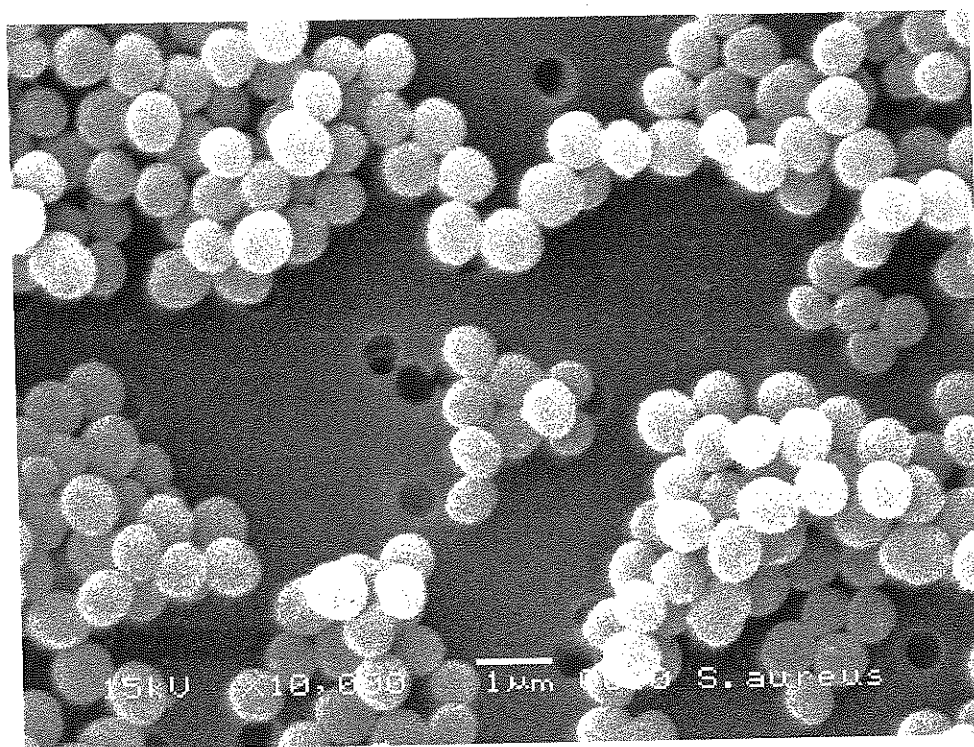


写真-12 *Staphylococcus aureus*の形態の一例

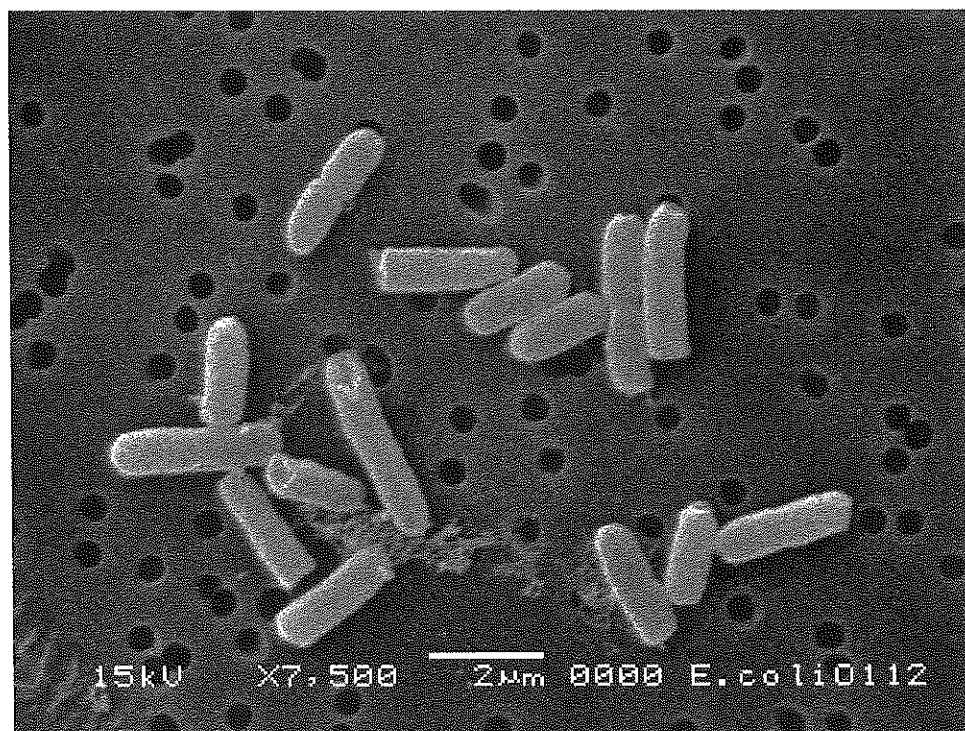


写真-13 *Escherichia coli* O112の形態の一例

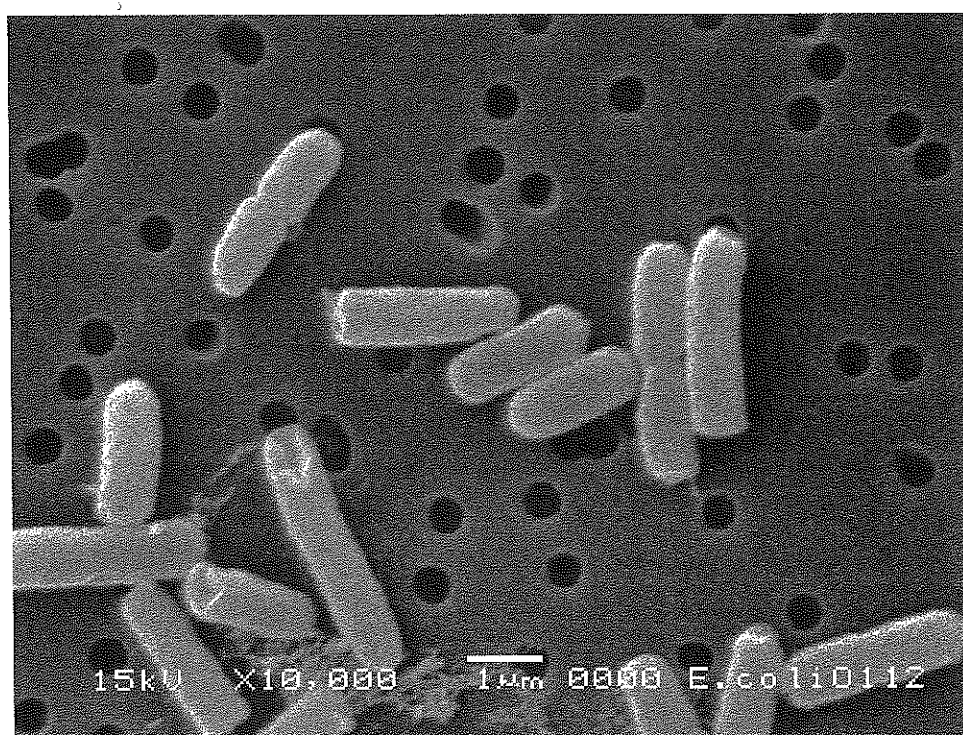


写真-14 *Escherichia coli* O112の形態の一例

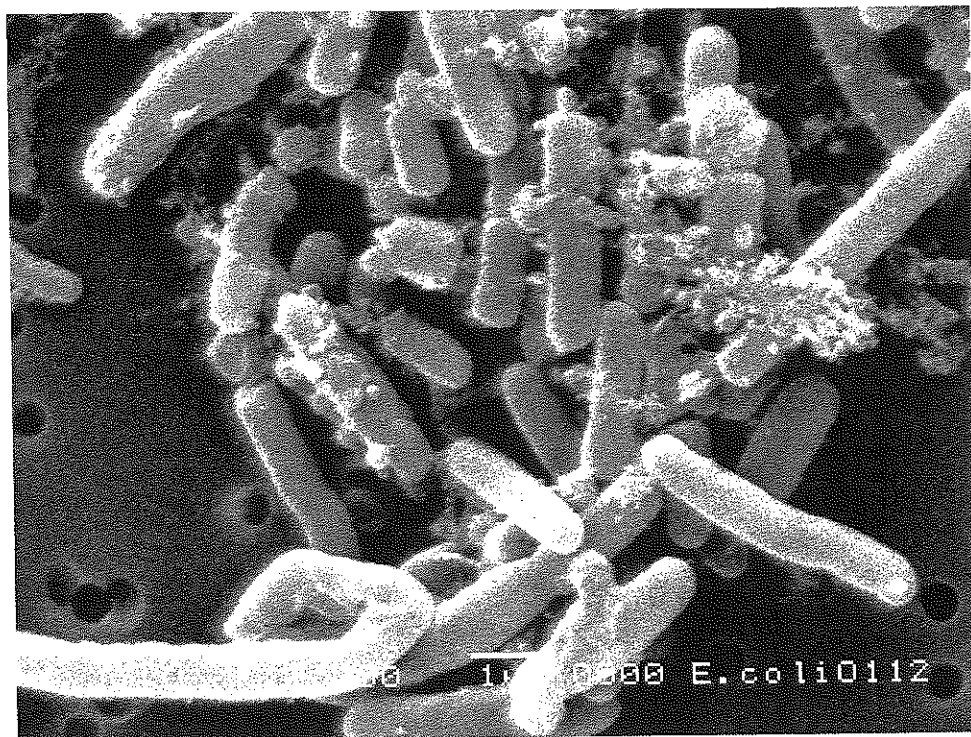


写真-15 *Escherichia coli* O112の形態の一例

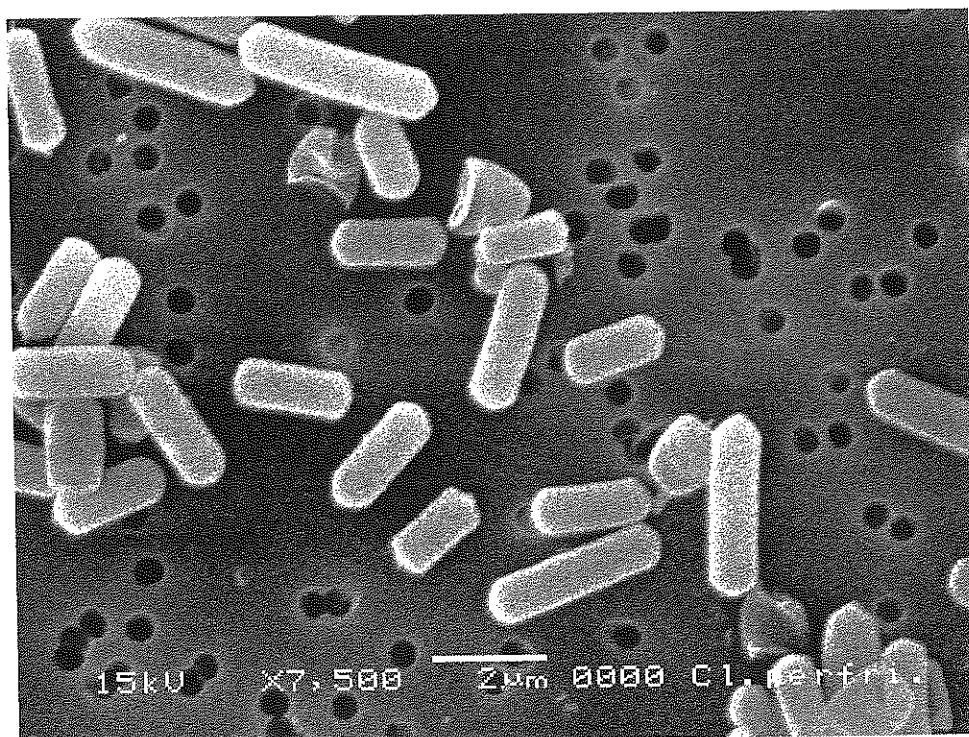


写真-16 *Clostridium perfringens*の形態の一例

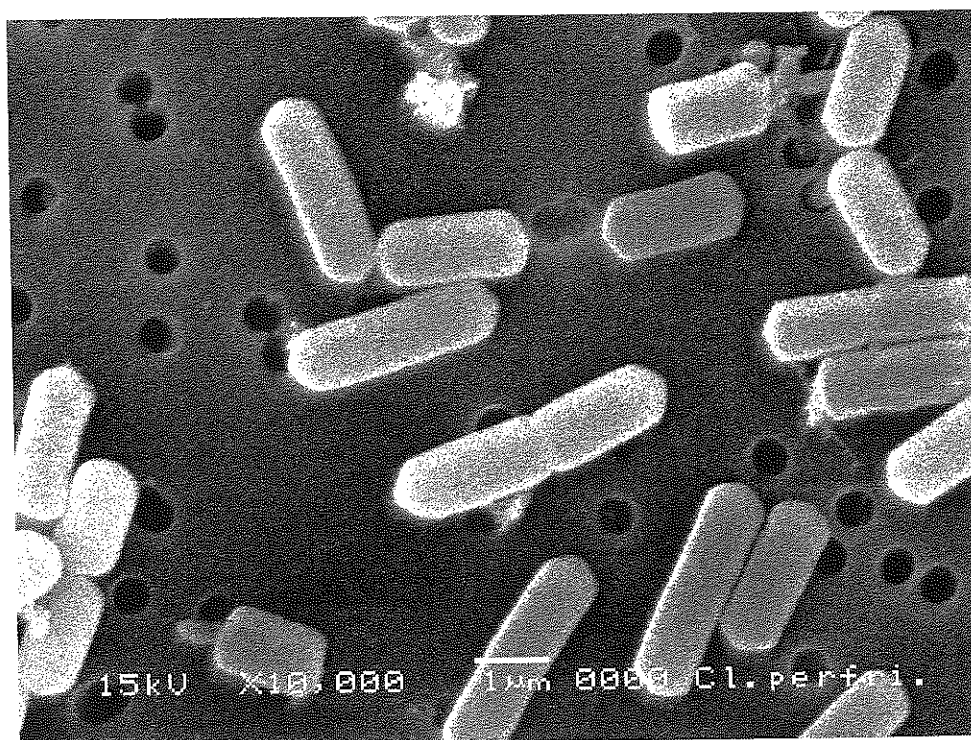


写真-17 *Clostridium perfringens*の形態の一例

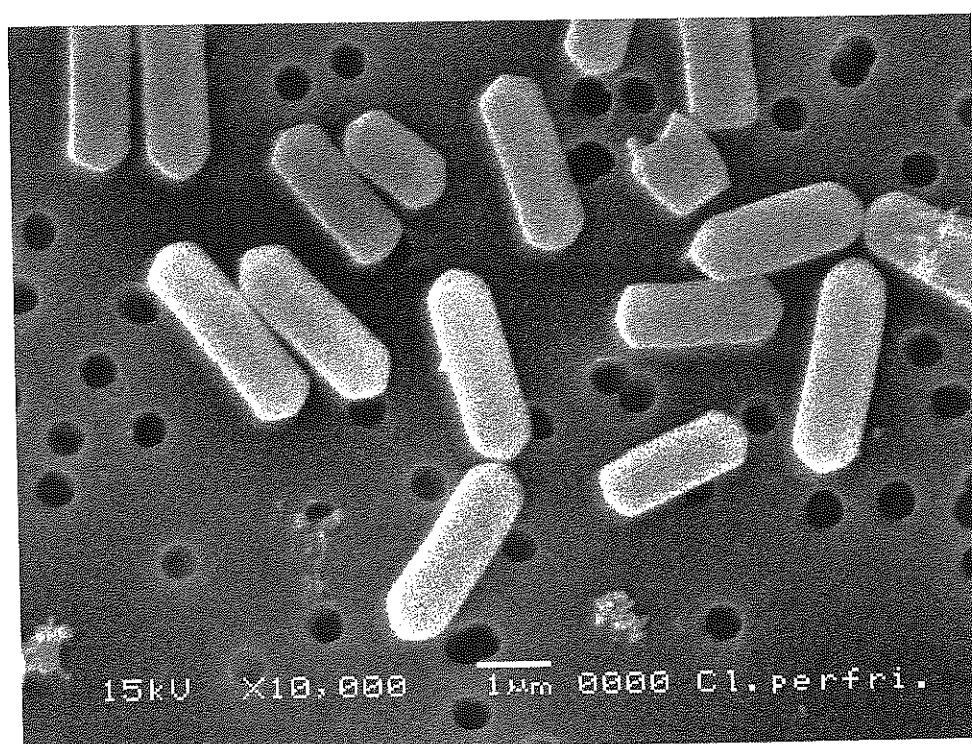


写真-18 *Clostridium perfringens*の形態の一例

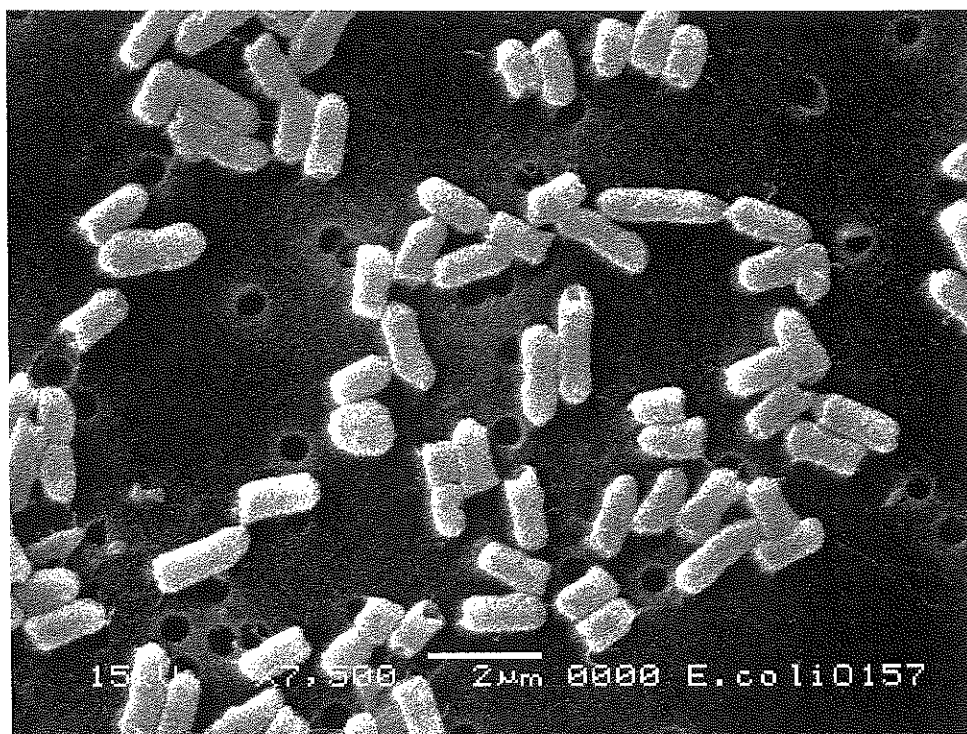


写真-19 *Escherichia coli* O157の形態の一例

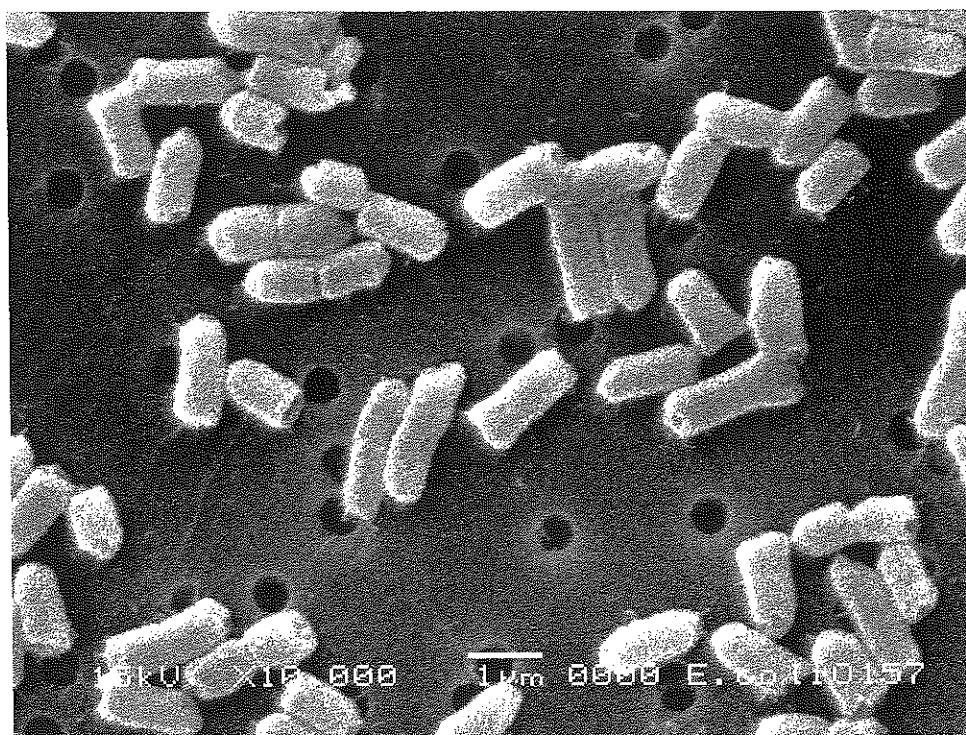


写真-20 *Escherichia coli* O157の形態の一例

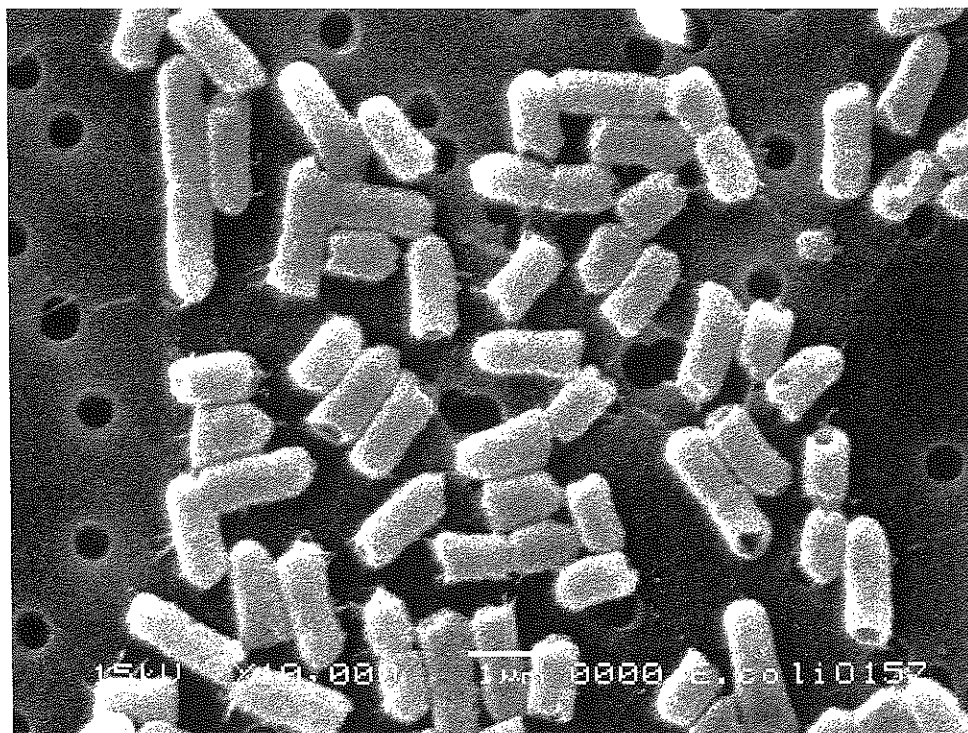


写真-21 *Escherichia coli* O157の形態の一例

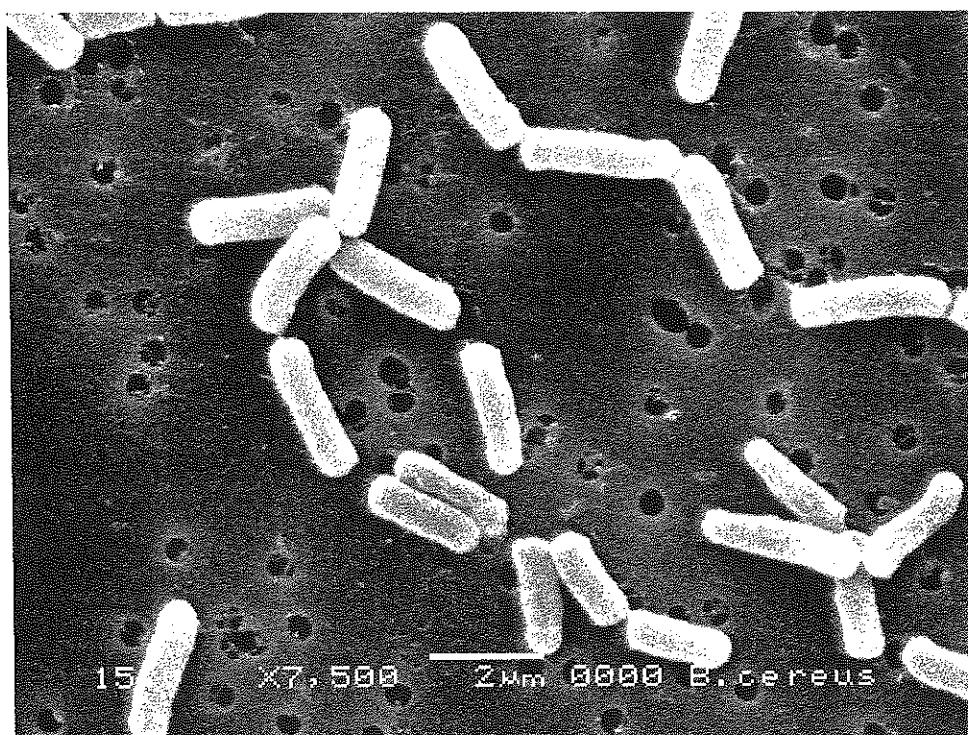


写真-22 *Bacillus cereus*の形態の一例

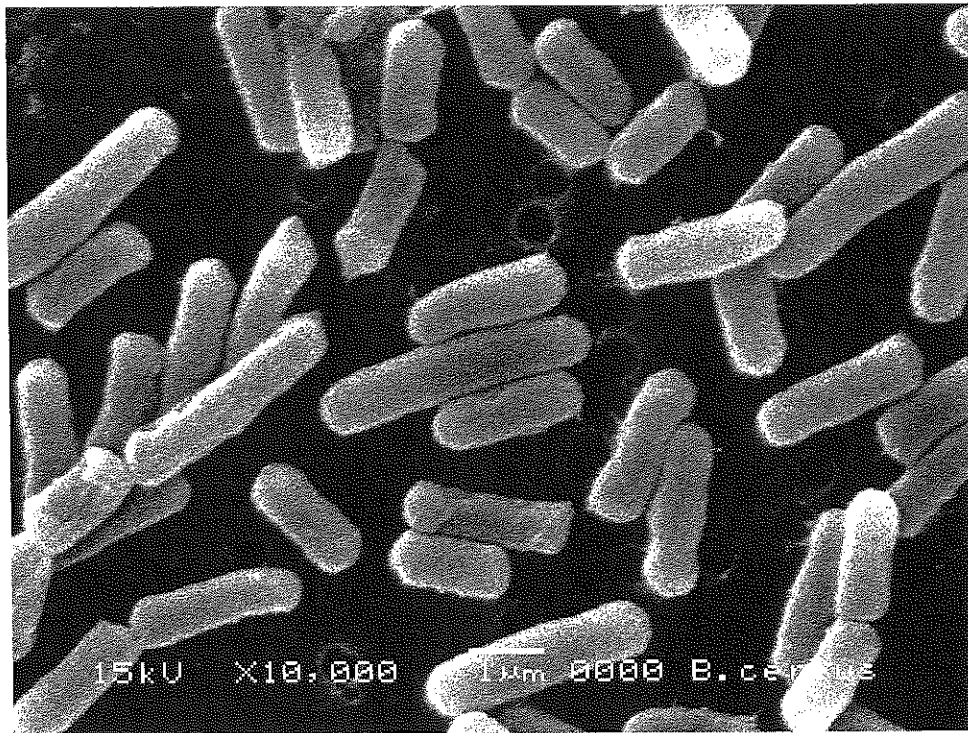


写真-23 *Bacillus cereus*の形態の一例

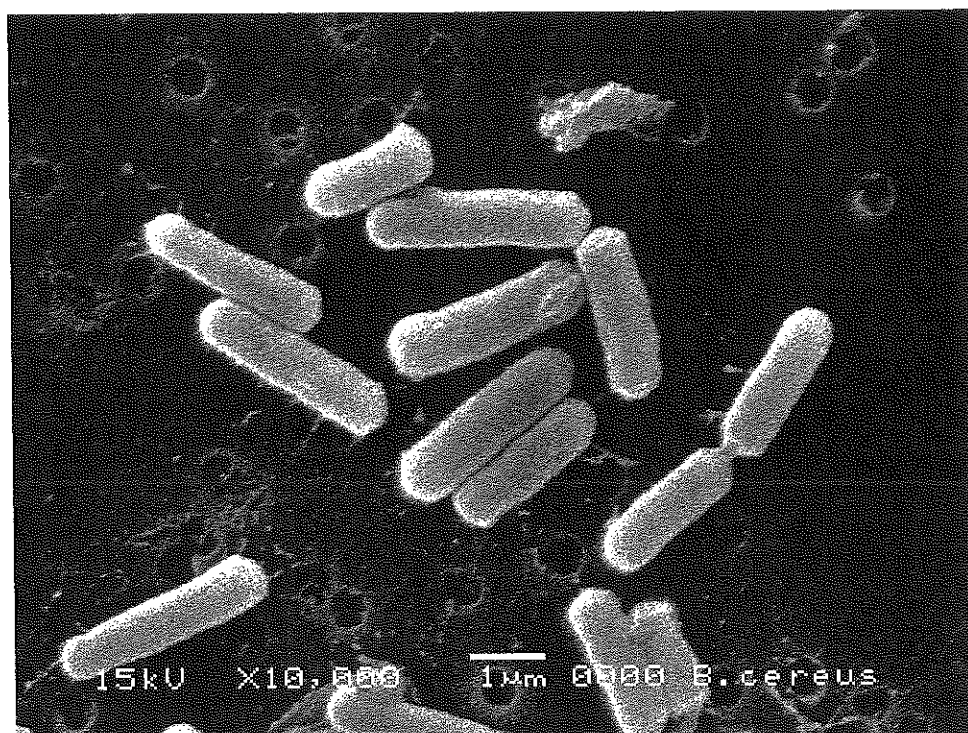


写真-24 *Bacillus cereus*の形態の一例

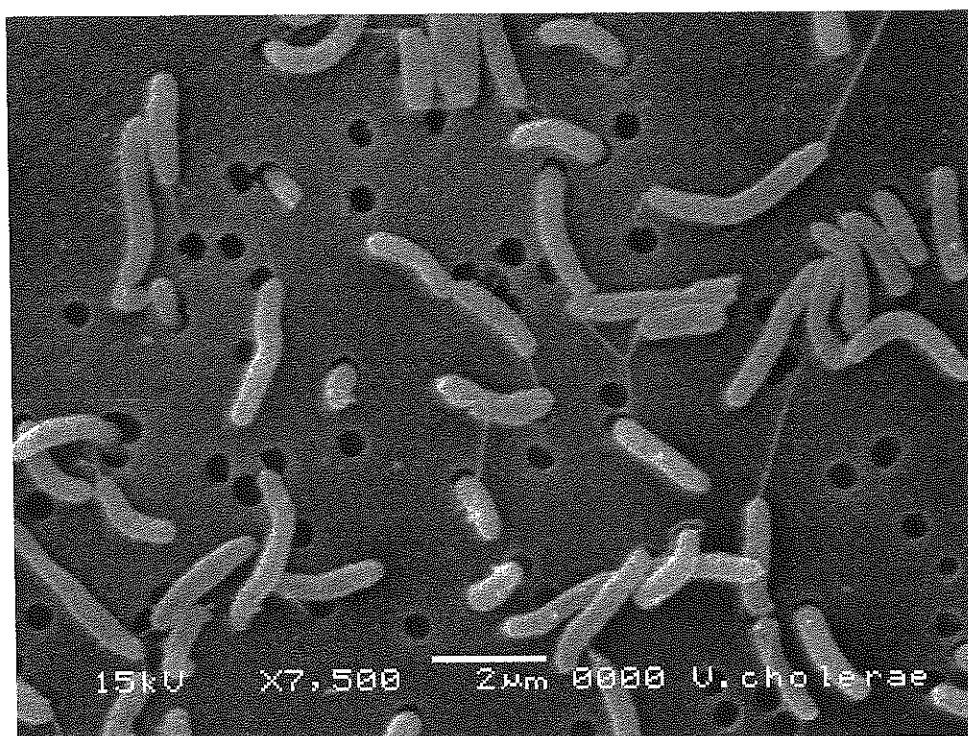


写真-25 *Vibrio cholerae*の形態の一例



写真-26 *Vibrio cholerae*の形態の一例

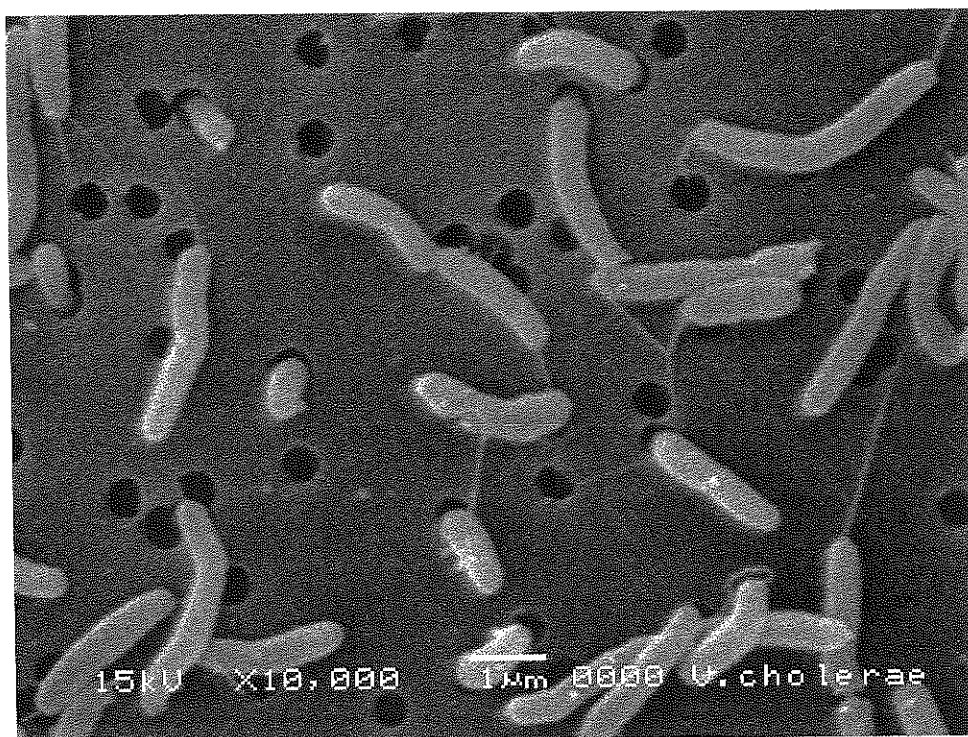


写真-27 *Vibrio cholerae*の形態の一例

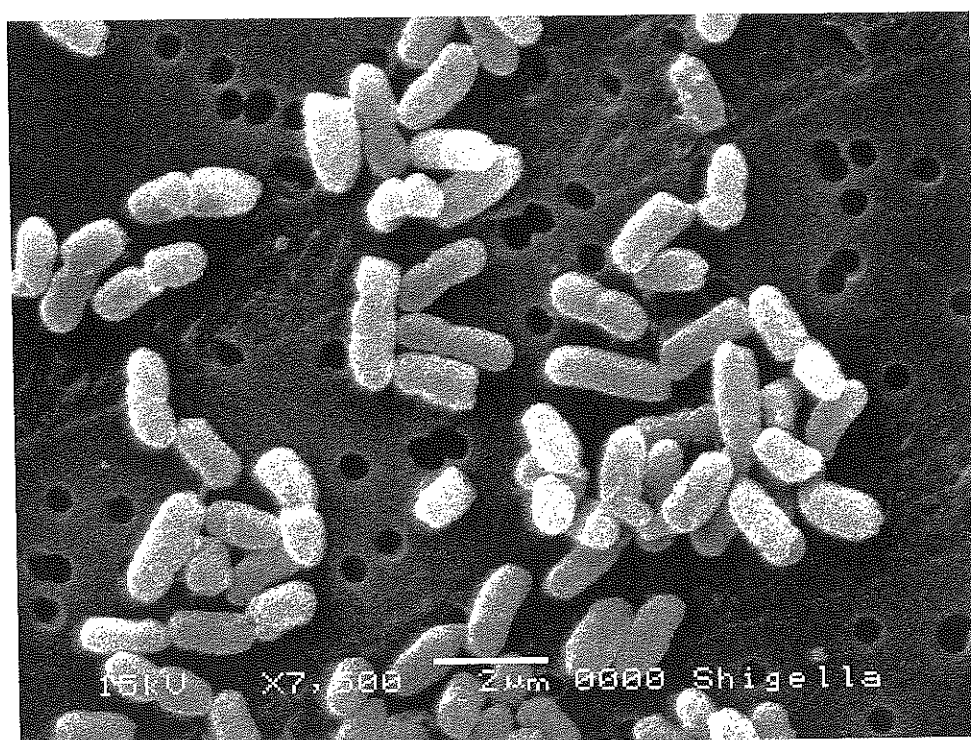


写真-28 *Shigella sonnei*の形態の一例

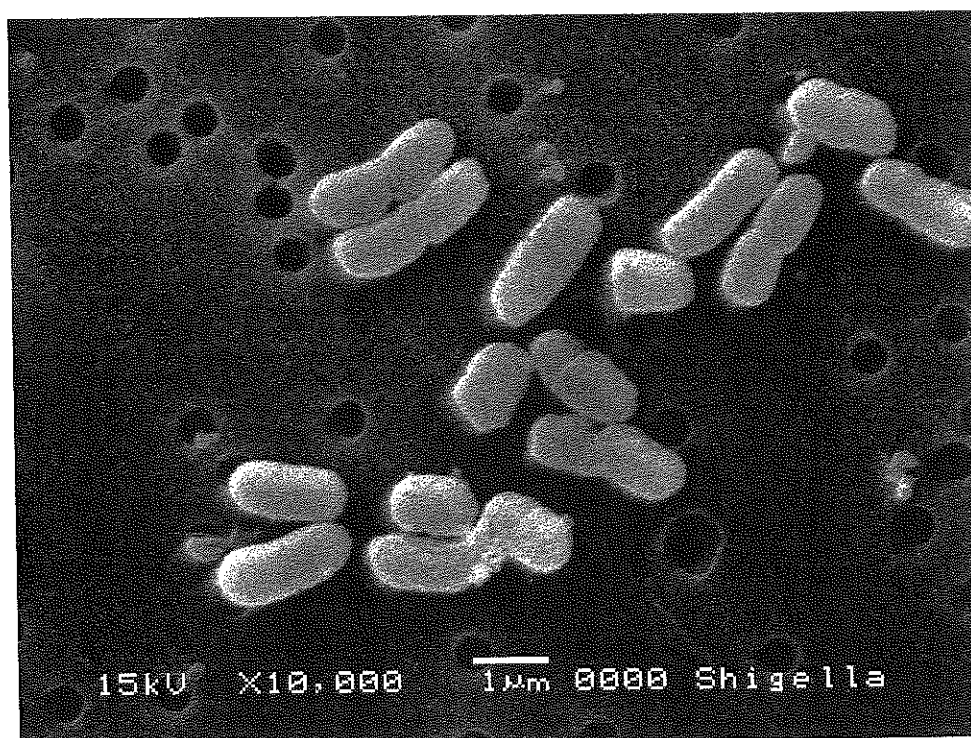


写真-29 *Shigella sonnei*の形態の一例

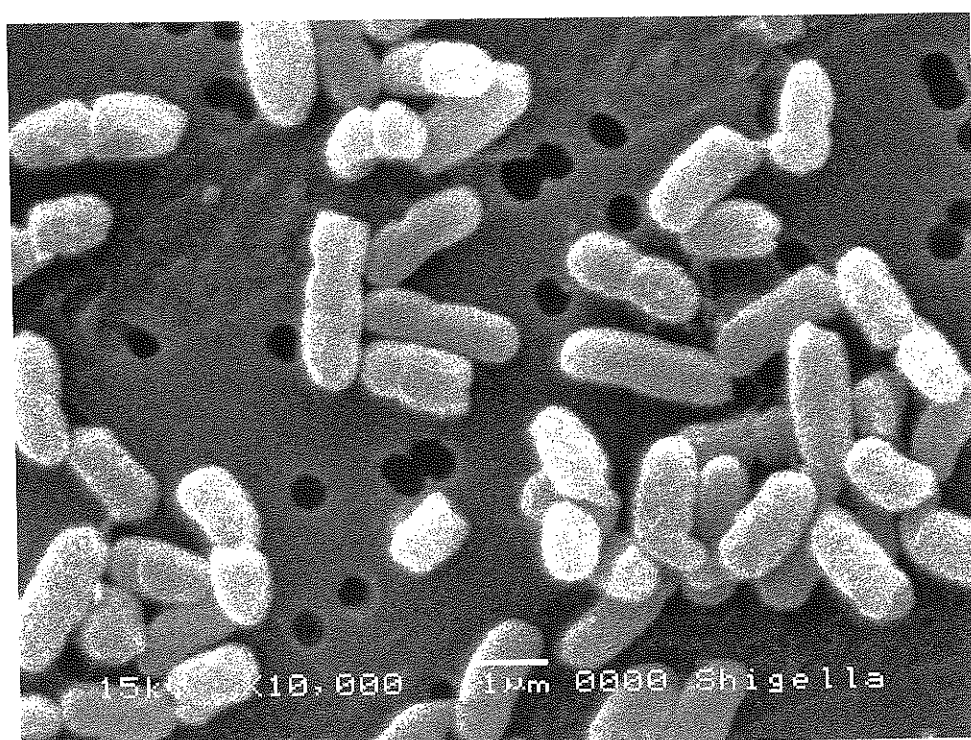


写真-30 *Shigella sonnei*の形態の一例

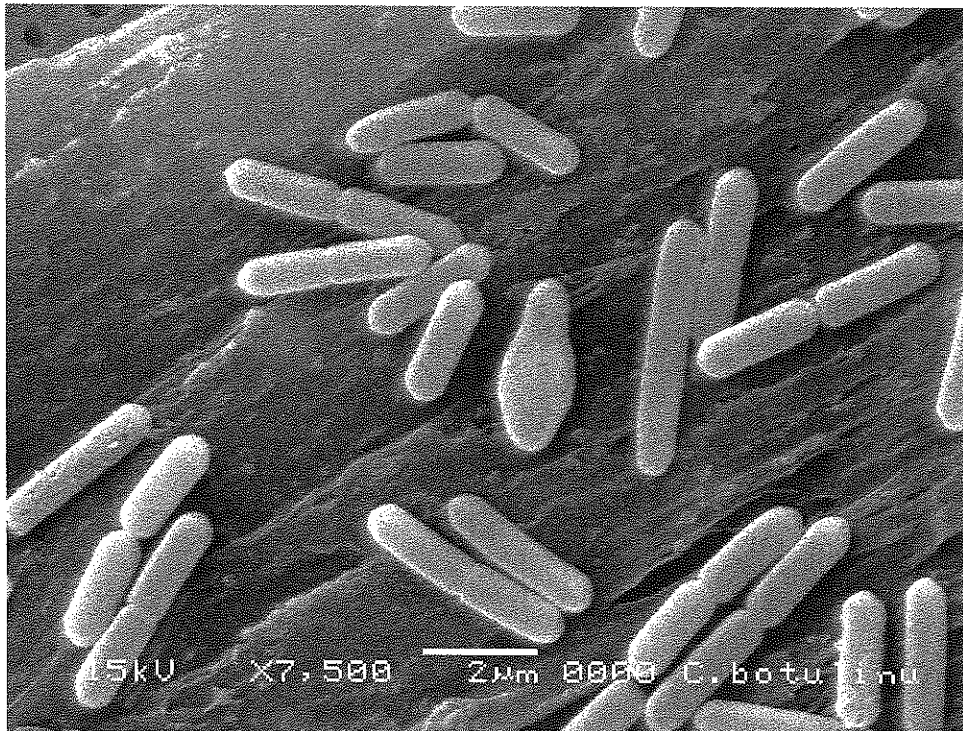


写真-31 *Clostridium botulinum* typeAの形態の一例

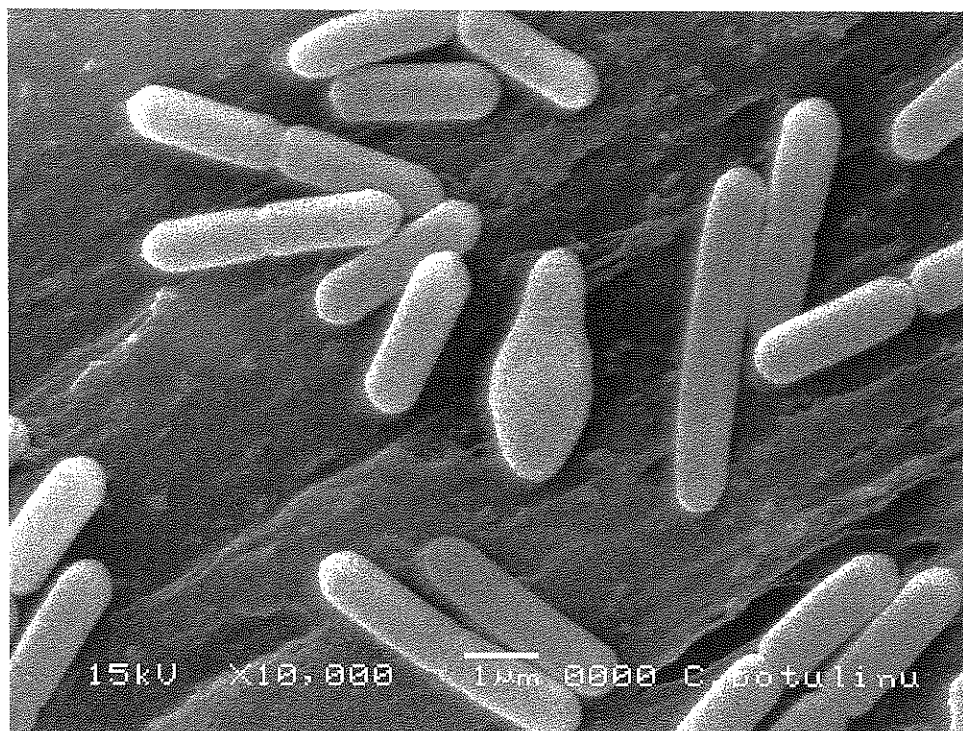


写真-32 *Clostridium botulinum* typeAの形態の一例

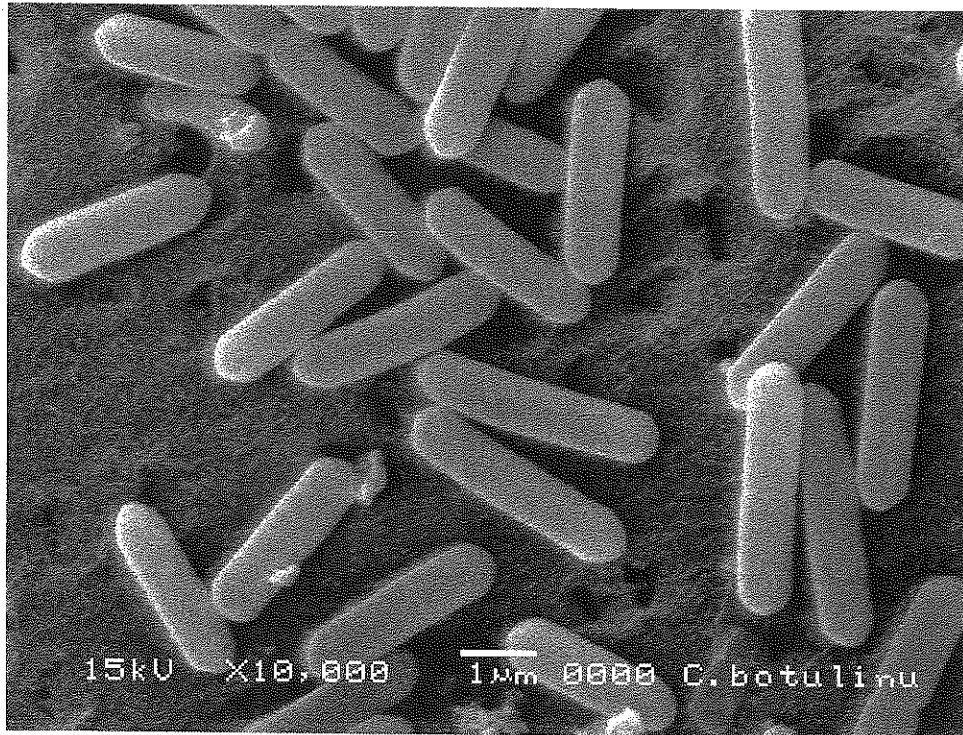


写真-33 *Clostridium botulinum* typeAの形態の一例

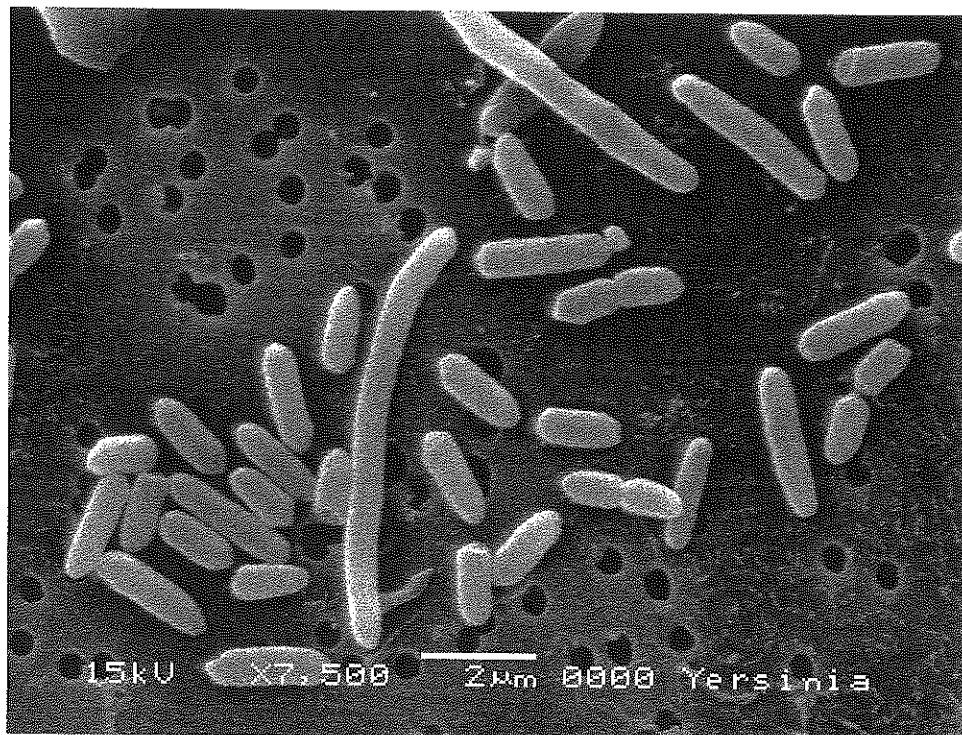


写真-34 *Yersinia enterocolitica*の形態の一例

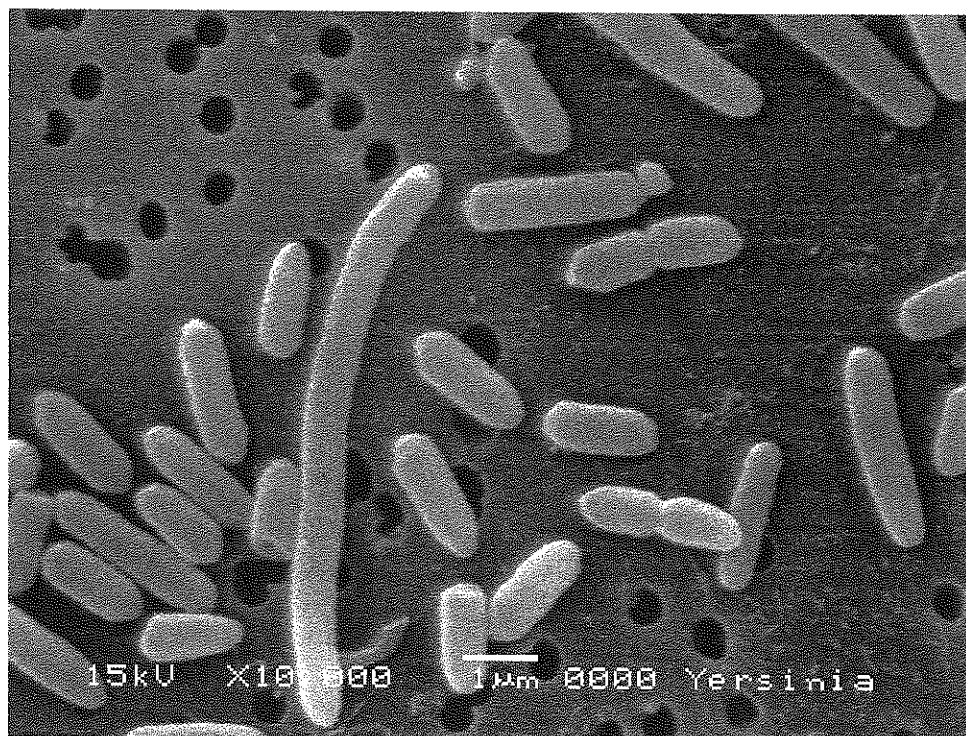


写真-35 *Yersinia enterocolitica*の形態の一例

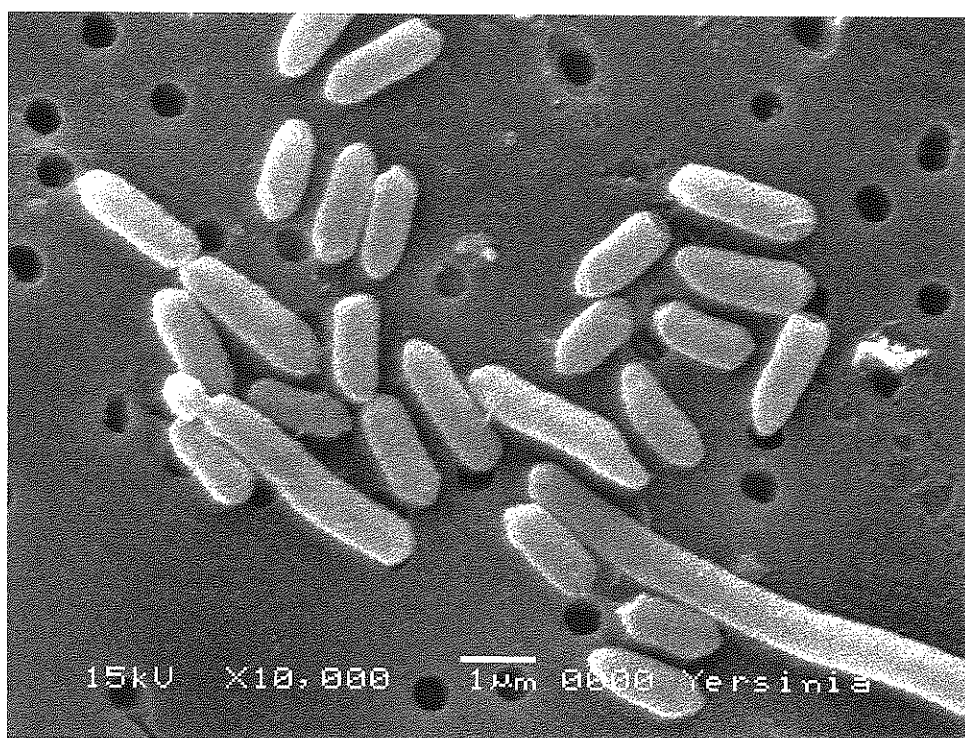


写真-36 *Yersinia enterocolitica*の形態の一例

以 上