

平成28年度・衛生研究所研究費事業報告

病原エルシニア検出法の検討および市販豚肉の汚染実態調査

(計画年度：平成28年度)

研究代表者

食品微生物担当

榊田希

共同研究者

食品微生物担当

大阪美紗 星野梢\* 門脇奈津子 大塚佳代子

副所長兼食品微生物検査室長

只木晋一

目的

日本のエルシニア食中毒の発生件数は非常に少なく、そのほとんどが病原性の低い *Yersinia enterocolitica* (以下 *Y. enterocolitica*) 血清群03によるものだったが、近年病原性の高い血清群08による集団感染事例が発生している。

食中毒発生時には、原因食品を迅速かつ確実に特定することが重要であるが、食品からのエルシニア検出法は増菌培養に長時間を要し、同定まで約1か月かかる。そこで既報の増菌培地および分離培地を比較し、最適な菌検出法を検討した。また、リアルタイムPCR (以下rtPCR) を用いたスクリーニング法についても検討した。

さらに、主要な汚染経路とされる豚肉の汚染実態を把握するため、市販豚肉の汚染実態調査を実施した。

成果概要

1 検出法の検討

(1) 増菌培地および分離培地の比較

*Y. enterocolitica* 3 菌株を、菌量が  $10^0$  cfu/g から  $10^6$ cfu/g となるようにサラダおよび挽肉に添加し、3種類の増菌培地 PBS, PMP, PSBB で増菌培養後、4種類の分離培地 CIN, mCIN, mVYE, CHROMagar *Y. enterocolitica*(以下CYE)に画線塗抹し、検出を比較した。

PBS と PMP では、培養前に陰性だった検体が培養1週間後に陽性となったが、さらに培養期間を延長しても陽性検体数は増えなかった。PSBBは菌株によって検出にばらつきがあった。検出率の高かった分離培地は、サラダでは CIN, 挽肉では CYE だった。

(2) スクリーニング法の検討

(1) の増菌培養後の培養液をアルカリ熱抽出し、*ystA* 遺伝子を標的とした rtPCR に供した。また、(1)で調製した検体を増菌培養前に分取して 30℃で48時間培養し、アルカリ熱抽出後、同様に rtPCR に供した。Auto 設定で Ct 値が得られたものを陽性とした。

rtPCR 法では、培養法で検出できなかった初期菌量の少ない検体が陽性だった。陽性検体数が多かったのは、サラ

ダでは PMP の1週間後、挽肉では PMP の48時間後だった。

以上の結果から、効率的な検出法として次の方法が考えられる。PMP を用い、30℃および4℃で培養を行う。30℃培養は48時間後にスクリーニング検査し、病原遺伝子陽性の検体については培養液をアルカリ処理後、CIN および CYE で検出を試みる。4℃培養は1週間後にスクリーニング検査し、CIN および CYE で検出を行う。いずれかのスクリーニング検査で陽性となった検体は、免疫磁気ビーズ法を追加して集中的に検査を行うことで効果的な検査が期待される。

2 市販豚肉の汚染実態調査

1の検討により最適であると判断した検出法を用いて、国産豚肉123検体および輸入豚肉100検体の汚染実態調査を実施した。

国産豚肉は123検体中65検体がスクリーニング陽性で、10検体から32株の *Y. enterocolitica*血清群03が検出された。日本での集団感染事例の大部分を占める血清群03の汚染経路として、豚肉が重要であることを確認できた。

輸入豚肉は100検体中14検体がスクリーニング陽性だったが、菌検出はされなかった。検出感度の高いrtPCR法では陽性だったが、培養法の検出限界より汚染菌量が少ないために検出されなかった可能性、および菌が死滅していた可能性が考えられる。

自己評価

培養法とスクリーニング法を組み合わせた一定の検出法が確立できた。期間および地域が限定的ではあるが、市販豚肉の汚染状況を知ることができた。

展望

健康被害防止のためには、豚肉だけでなく食品および環境中の病原エルシニアについて調査することが重要であると考えられる。

公表等

第113回日本食品衛生学会学術講演会 (2017年)

\*現 朝霞保健所