=原 著=

輸入食品の赤痢菌検査における試験品の 保管と検出感度の検討

川本千枝[†]・宮城和文・鈴木一郎・森 英人
橋本 智・江本雅三・内田幸憲

(神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター)

(受付 平成 16 年 6 月 17 日)

(受理 平成 16 年 8 月 30 日)

Investigation Concerning Storage of Imported Food Samples and Sensitivity of Detection for *Shigella sonnei*

Chie KAWAMOTO[†], Kazufumi MIYAGI, Ichiro SUZUKI, Hideto MORI,
Satoru HASHIMOTO, Masami EMOTO and Yukinori UCHIDA

(Center for Imported Foods and Infectious Diseases, Kobe Quarantine Station,
1-1 Toyahama-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0866; [†] Corresponding author)

To decide how to store food samples for a bacterial test of *Shigella sonnei*, its survival rate was assessed in saline and various foods such as canned young corn, raw oyster, raw ark shell, raw shrimp and raw cuttlefish at 4°C and -20°C for 13 days. The survival rate of *S. sonnei* in saline and in food uncontaminated with other bacteria at 4°C storage was better than that at -20°C. On the other hand, the survival of the organisms at -20°C storage was better than that at 4°C in the case of contaminated foods.

We investigated the influence on *S. sonnei* by *Escherichia coli* using two new methods for *S. sonnei*. Briefly, they are methods of direct anaerobic culture and of anaerobic culture after aerobic enrichment culture established by the Japanese Ministry of Health and Welfare in 2002. In addition, we performed recovery experiments for *S. sonnei* using various foods such as canned young corn, raw oyster, raw ark shell and raw shrimp. The sensitivity of both methods was influenced by *E. coli* and/or other bacteria. Furthermore, the PCR method showed better sensitivity than the traditional incubation method in both culture methods. Although we were able to detect *S. sonnei* up to $\leq 10^{-1}$ CFU/g in the cases of uncontaminated food, the sensitivity was changed by the kind of foods in the cases of contaminated foods using both methods. These results suggest that either of the two methods and two storage conditions could be chosen depending on the kind of foods.

Key words: *Shigella sonnei*, Storage of food sample, Survival rate, Sensitivity of detection

緒 言

赤痢は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で二類感染症として位置づけられており、2001～2002年の赤痢患者の推定感染地は国外が過半数を占め、インドやインドネシアなどのアジア地域か

らの旅行者による輸入件数が多い傾向にある。また、2001～2002年の血清群別の報告例は *S. sonnei* が最も多い⁷⁾。一方、食料品による食中毒事例も報告されており²⁾、近年は米国でのメキシコ産パセリ³⁾やノルウェーでのスペイン産レタス⁶⁾での輸入食品による食中毒事例も発生している。我が国でも、1999年には食品衛生法施行規則が一部改正され赤痢菌が食品衛生法に基づいても取扱われるようになった。2001年11月には西日本を中心として韓国産輸入カキによる *S. sonnei* の集団食中毒

[†] 連絡先

☎652-0866 神戸市兵庫区遠矢浜町 1-1

が多発し被害者は160名に及んだ^{7), 12)}。そのような状況の中で、2002年1月には厚生労働省より食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法が示され⁹⁾、検査を実施することとなった。検疫所においても輸入食品のモニタリング検査の一つとして *S. sonnei* の検査を実施することとなったが、提示された試験法においては試験品の搬送および保管について具体的な方法は示されておらず、また、試験品の種類により *S. sonnei* の検出感度に差が生じるかどうか不明にされている。

そこで、我々は輸入食品の *S. sonnei* の検査業務に役立てるため、試験品の冷蔵または冷凍保管での *S. sonnei* の生存性と試験品の種類による本法の検出感度について検討を行った。

材料および方法

1. 使用菌株

Shigella sonnei NIH 93930 と *Escherichia coli* ATCC 25922 を用いた。それぞれ使用する際に、トリプトソーヤブイヨン（日水製薬）にて一夜培養したものを適宜 0.1% ペプトン加生理食塩水で希釈した。

2. 各種の生理食塩水中における *S. sonnei* の生存性試験

生理食塩水、0.1% ペプトン加生理食塩水および 1% ペプトン加生理食塩水を滅菌した後、それぞれ $2.6 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^5$ CFU/ml の菌数となるように *S. sonnei* を添加し試料を調製した。それぞれについて、15 ml 容量のポリプロピレン製容器に 10 ml ずつ分注して密栓した後、冷凍 (-20°C) と冷蔵 (4°C) で保管して *S. sonnei* の菌数を経時的に 13 日間調べた。*S. sonnei* の菌数の測定は、0.1% ペプトン加生理食塩水で試験液を段階的に希釈した後、その 0.1 ml ずつを 2 枚または 5 枚の普通寒天培地 (Difco) 上に塗抹し、 37°C で 48 時間培養した後そのコロニー数を測定し、1 ml 中の *S. sonnei* の菌数を算出した。

3. 食品中における *S. sonnei* の生存性試験

試験品としてヤングコーン水煮缶詰、生鮮魚介類（カキ、アカガイ、クルマエビ、イカ）を用いた。ヤングコーン水煮缶詰は煮汁ごとホモジネートし、その 25 g を試験品とした。生鮮魚介類は等量の滅菌生理食塩水を加えてホモジネートし、その 25 g を試験品とした。ホモジナイザーのカップ、フタ、カッターは滅菌したものを用いた。また、各試験品の一般生菌数は、0.1% ペプトン加生理食塩水で試験品を段階的に希釈した後、その 0.1 ml ずつを 2 枚または 5 枚の普通寒天培地（日水製薬）上に塗抹し、 37°C で 48 時間培養した後、そのコロニー数から算出した。本試験は、調製した各試験品 25 g に約 $1.3 \times 10^5 \sim 2.9 \times 10^5$ CFU/g の菌数になるよう *S. sonnei* を添加したものを、それぞれ冷凍 (-20°C) と冷蔵 (4°C) で

保管し *S. sonnei* の菌数を経時的に 13 日間調べた。*S. sonnei* の菌数の測定は、0.1% ペプトン加生理食塩水で試験品を段階的に希釈し、その 0.1 ml ずつを 2 枚または 5 枚のクロモアガー O157 TAM 寒天平板（以下、CRT 寒天平板：関東化学）上に塗抹して 37°C で 48 時間培養した後、定型のコロニーについて赤痢菌診断用 D 亜群血清（デンカ生研）を用い、*S. sonnei* であることを確認しながらコロニー数を測定し、菌数を算出した。

4. 食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法における *E. coli* を接種した食品での *S. sonnei* の発育試験

無菌であることを確認したヤングコーンに 3.4 CFU/g の *S. sonnei* を接種した後、一般生菌のモデルとして 1.2×10^5 , 1.2×10^3 , 1.2×10^1 , 1.2×10^{-1} CFU/g の菌数の *E. coli* をそれぞれ接種したものを試験品として検討を行った。厚生労働省が示した試験法を基に変法化した、①直接嫌気培養を行う方法と、②好気培養を行ってから嫌気培養を行う方法の、2 種類の *S. sonnei* 試験変法 (Fig. 1) を用いて、寒天平板培地を用いた培養法と PCR 法において *E. coli* が *S. sonnei* に及ぼす影響を調べた。方法①では 1 検体に対し $0.5 \mu\text{g/ml}$ ノボビオシン加シゲラブロス（ノボビオシン：関東化学、シゲラブロス：極東製薬）225 ml を注加し、 $42 \sim 44^\circ\text{C}$ で 20 ± 2 時間嫌気培養を行った。方法②では 1 検体に対し Buffered Peptone Water (OXOID) 225 ml を注加し、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ で 18 ± 2 時間好気培養を行った後、その 0.5 ml を $0.5 \mu\text{g/ml}$ ノボビオシン加シゲラブロス 10 ml に接種して $42 \sim 44^\circ\text{C}$ で 20 ± 2 時間嫌気培養を行った。嫌気環境はアネロパック（三菱ガス化学）で作った。寒天平板培地を用いた培養法は、CRT 寒天平板と SS 寒天平板（栄研）に嫌気培養した $0.5 \mu\text{g/ml}$ ノボビオシン加シゲラブロスを一白金耳塗抹し、 $35 \sim 37^\circ\text{C}$ で $18 \sim 24$ 時間培養した後、定型のコロニーを赤痢菌診断用 D 亜群血清で確認した。PCR 試験は、同培養液を用いて厚生労働省が示した試験法に従い、市販の *invE* 遺伝子検出用プライマーセット INV-1,2 と、*ipaH* 遺伝子検出用プライマーセット IPA-1,2（共に TaKaRa）を同時に用いる方法で行った。

5. 食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法における食品中の *S. sonnei* の検出感度試験

カキ、クルマエビ、アカガイおよびヤングコーンの食品試験品に $3.4 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^{-1}$ CFU/g の菌数の *S. sonnei* を接種し、前項 4 に準じて試験を行った。*S. sonnei* 接種前の各試験品の一般生菌数は、前項 3 に準じて算出した。

結 果

生理食塩水中における *S. sonnei* の生存性試験は、冷凍保管の場合、1 日経過後から急激な菌の減少を示し

Method 1

Method 2

Fig. 1 Procedures for detection of *S. sonnei*. *¹: Shigella broth (KYOKUTO SEIYAKU) with 0.5 µg/ml Novobiocin (KANTO CHEMICALS). *²: AnaeroPack (MITSUBISHI GAS CHEMICAL CO., INC.). *³: CHROMagarO157TAM (CHROMagar). *⁴: Salmonella Shigella Agar (NISSUI). *⁵: *S. sonnei* Polyvalent D (DENKA SEIKEN CO., LTD.). *⁶: Buffered Peptone Water (OXOID).

Fig. 2. Survival of *S. sonnei* in saline. Symbols: ○, saline stored at 4°C; △, saline with 0.1% peptone stored at 4°C; □, saline with 1% peptone stored at 4°C; ●, saline stored at -20°C; ▲, saline with 0.1% peptone stored at -20°C; ■, saline with 1% peptone stored at -20°C.

た。しかし、冷蔵保管の場合では少なくとも11日間はわずかな減少にとどまり、*S. sonnei*の生存性が明らかに良かった (Fig. 2)。この結果より、生理食塩水中での*S. sonnei*の保存は、冷蔵保管が適していることがわかった。

食品中における*S. sonnei*の生存性試験は、ヤング

コーンとカキの場合、冷蔵保管の方が生存性が良かった。しかし、アカガイ、クルマエビ、イカでは、数日間は冷凍、冷蔵保管とも同程度の減少であったが、3～7日間を超えると冷凍保管の方が*S. sonnei*の生存性が良かった (Fig. 3)。

食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法における *S. sonnei* の発育に対する一般生菌の影響を調べるために、一般生菌のモデルとして *E. coli* を用いた実験を行った。試験品は無菌であることを確認したヤングコーンを用いた。*S. sonnei* の発育に対する *E. coli* が及ぼす影響を調べた結果、*S. sonnei* の検出感度は、①直接嫌気培養を行う方法と、②好気培養を行ってから嫌気培養を行う方法ではほぼ同様の結果を示した。すなわち方法①と方法②の両方法において、3.4 CFU/g の *S. sonnei*, 1.2×10^5 , 1.2×10^3 , 1.2×10^1 , 1.2×10^{-1} CFU/g の *E. coli* をヤングコーンに接種して検討を行った結果、PCR 法では *E. coli* $10^5 \sim 10^{-1}$ CFU/g のすべての菌数レベルで *S. sonnei* の検出が認められ (Fig. 4)、培養法では SS 寒天平板上において *E. coli* 10^5 CFU/g の菌数レベルで *S. sonnei* の検出ができなかったものの、 10^3 , 10^1 , 10^{-1} CFU/g の菌数レベルで *S. sonnei* のコロニーを確認することができ、CRT 寒天平板上においては実験を行っ

Fig. 3. Survival of *S. sonnei* in food samples. The test was performed in triplicate. Symbols: ○, stored at 4°C; ●, stored at -20°C.

Fig. 4. Electrophoretograph of PCR products of *S. sonnei* influenced by *E. coli*. Each sample in lanes 1 to 4 is young corn containing 3.4 CFU/g of *S. sonnei*, and *E. coli* in the following numbers: lane 1, 1.2×10^5 CFU/g; lane 2, 1.2×10^3 CFU/g; lane 3, 1.2×10^1 CFU/g; lane 4, 1.2×10^{-1} CFU/g. Lane 5 is the negative control. Lane 6 is the positive control. Lane M is the 100 bp ladder marker. Method 1 is direct anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 μ g/ml Novobiocin. Method 2 is anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 μ g/ml Novobiocin after aerobic enrichment culture with Buffered Peptone Water.

たすべての *E. coli* の菌数レベルで *S. sonnei* を検出することはできなかった。 *E. coli* が *S. sonnei* の発育に及ぼす影響は大きく、PCR 法および培養法ともに *E. coli* の菌数が多いほど、*S. sonnei* の検出感度は低くなった (Table 1)。

食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法において、実際の食品試験品としてヤングコーン、カキ、アカガイ、クルマエビを用い $3.4 \times 10^3 \sim 3.4 \times 10^{-1}$ CFU/g の *S.*

sonnei を接種して求めた検出感度試験では、PCR 法の方が培養法よりも検出感度が高かった。一般生菌が存在しないヤングコーンでは、方法①、②ともに $\leq 10^{-1}$ CFU/g という高い検出感度を示したが、方法①ではカキが、方法②ではクルマエビが、培養法、PCR 法ともに 10^2 CFU/g と低かった (Table 2)。

Table 1. Influence of number of *E. coli* on detection of *S. sonnei* in young corn using method 1*¹ and method 2*²

Number of <i>E. coli</i> (CFU/g)	Number of <i>S. sonnei</i> (CFU/g)	Growth on plates* ³			
		Method 1		Method 2	
		CRT agar	SS agar	CRT agar	SS agar
1.2×10 ⁵	3.4	—	—	—	—
1.2×10 ³	3.4	—	+	—	+
1.2×10 ¹	3.4	—	++	—	++
1.2×10 ⁻¹	3.4	—	+++	—	+++

*¹ Direct anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 µg/ml Novobiocin.

*² Anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 µg/ml Novobiocin after aerobic enrichment culture with Buffered Peptone Water.

*³ The effect shows colonies of *S. sonnei* on CRT and SS agar plates as follows: 1-30, +; 31-300, ++; ≥301, +++.

Table 2. Sensitivity of *S. sonnei* using food samples

Sample	Standard plate count (CFU/g)	Sensitivity* ¹ (CFU/g)			
		Method 1* ²		Method 2* ³	
		PCR	Plates	PCR	Plates
Shrimp	1,100	≤10 ⁻¹	10 ¹	10 ²	10 ²
Ark shell	360	≤10 ⁻¹	10 ⁰	≤10 ⁻¹	≤10 ⁻¹
Oyster	180	10 ²	10 ²	≤10 ⁻¹	10 ⁰
Young corn	0	≤10 ⁻¹	≤10 ⁻¹	≤10 ⁻¹	≤10 ⁻¹

*¹ These sensitivities were decided by inoculating *S. sonnei* onto various foods. The test was performed in triplicate. Numeral shows results of 3/3 positivity.

*² Direct anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 µg/ml Novobiocin.

*³ Anaerobic culture with Shigella broth with 0.5 µg/ml Novobiocin after aerobic enrichment culture with Buffered Peptone Water.

考 察

生理食塩水中での *S. sonnei* の生存性は、冷凍保管よりも冷蔵保管の方が優れていた。これは、一般に食品汚染菌は冷凍による損傷を受けるという報告があり⁵⁾、*S. sonnei* そのものの生存性は冷凍よりも冷蔵状態の方が高いのかもしれない。実際に、*S. flexneri* において、冷凍により細菌細胞が損傷を受けるという報告もある¹³⁾。また、食品試験品のヤングコーン、カキ、アカガイ、クルマエビ、イカを用いた生存性試験では、ヤングコーンとカキについては冷凍より冷蔵保管の方が *S. sonnei* の生存性は良かった。一方、アカガイ、クルマエビ、イカにおいては、冷凍保管の方が冷蔵保管より良好な生存性を示した。これらの試験品においては冷蔵下では *S. sonnei* 以外の菌の発育が観察され、これらの菌の発育に抑制され *S. sonnei* の菌数維持が困難になったと思われる。実際に、マウスの生体内実験により *S. sonnei* は *E. coli* など腸内細菌の存在下で発育が抑えられており一般に増殖力が弱いとされている⁴⁾。冷凍下では、仮にその他の細菌が混在していても双方とも休眠状態のため菌数の変化が少ないのではないだろうか。また、食品検体中にはエビのキチン質が低温下でコレラ菌を保護するように¹⁾、*S. sonnei* の生存を助ける物質があるのかもしれない。

食品からの赤痢菌 (*S. sonnei*) の検査法において、一般

生菌のモデルとして *E. coli* を接種した食品での *S. sonnei* の発育試験では、PCR 法で実験を行ったすべての *E. coli* 接種条件で *S. sonnei* を検出することが可能であったが、*E. coli* の接種量が増加するほど DNA バンドが弱くなって *S. sonnei* の検出が難しくなった。本結果により、*S. sonnei* の検出感度はその他の菌の発育の影響によるものが大きいのと思われるため、実際に数種類の食品検体を用いて *S. sonnei* の検出感度を調べた。その結果、食品検体における検出感度は、一般生菌を含まないヤングコーンでは①直接嫌気培養を行う方法と、②好気培養を行ってから嫌気培養を行う方法の両方で検出感度が良く、≤10⁻¹ CFU/g まで *S. sonnei* を検出できた。また、方法①ではカキからの *S. sonnei* の検出感度が低く、このことは小沼らの研究⁸⁾の結果と一致したが、方法②では一般生菌数の多いクルマエビにおける感度が低かった。カキの消化管の細菌叢は外部環境よりも嫌気性菌や芽胞の割合が多いという報告があり¹⁰⁾、またクルマエビはビブリオ属などの好気性菌が多いと考えられ¹¹⁾、それらの細菌叢の違いが増菌方法の違いによる検出感度の差に影響している可能性がある。

検査所では食品監視担当課において試験品の採取が行われ、検査担当課へ輸送を行い試験品の検査を実施している。試験品の輸送手段として手渡しの場合と宅配便を利用する場合があることを考慮すると、倉庫やコンテナヤードでの検体採取から検査着手までの期間は1日か

ら最長で7日程度になる。本検討結果より、ヤングコーンやカキの保管については冷蔵保管が望ましいが、アカガイ、クルマエビ、イカのような生食用鮮魚介類の場合、搬送、保管には冷凍環境が望ましいのではないかと思われる。また、食品の種類により検出感度が異なることが明らかとなり、食品に含まれる生菌数および細菌叢を考慮して、2つの検査法を選択する必要性が示唆された。今後は食品の種類と例数を追加して検討を行い、各食品に適した保管条件と検査法を選定することが望まれた。

要 約

S. sonnei の検査を実施する食品検体の搬送および保管について、冷蔵または冷凍いずれの保管条件が適切か検討した。試験品として生理食塩水および食品（カキ、アカガイ、クルマエビ、イカ、ヤングコーン）を用いた。その結果、*S. sonnei* の生存性は本菌単独の環境において冷蔵保管時に良く、一般生菌が混在する食品中では冷凍保管時に良い傾向が見られた。また、2002年に厚生労働省により示された2つの赤痢菌検査法（試料の増菌方法として、①直接嫌気培養を行う方法、②あらかじめ好気培養を行ってから嫌気培養を行う方法）について、*E. coli* 存在下での *S. sonnei* の検出感度を調べ、さらに実際の食品中（カキ、クルマエビ、アカガイ、ヤングコーン）に *S. sonnei* を添加してその検出感度を調べた。その結果、両検査法の検出感度は *E. coli* もしくは一般生菌数の影響を受けたが、両方法ともPCR法の方が培養法よりも高感度であった。一般生菌の生存しない食品検体では $\leq 10^{-1}$ CFU/g レベルまで *S. sonnei* を検出できたが、一般生菌の存在する生鮮食品においては食品の種類によって上記2つの検査法の検出感度が異なった。これらの結果から、検査実施の際は試験品の種類によって保管条件と検査法を選択する必要があると思われる。

文 献

- 1) Amako, K., Shimadori, S., Imoto, T., Miake, S. and Umeda, A.: Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 603-605 (1987).
- 2) Centers for disease control and prevention: Public health dispatch: Outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating a nationally distributed dip—California, Oregon, and Washington, January 2000. Morbid. Mortal. Weekly Rep., **49**, 60-61 (2000).
- 3) Centers for disease control and prevention: Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley—United States and Canada, July-August 1998. Morbid. Mortal. Weekly Rep., **48**, 285-289 (1999).
- 4) Hentges, J. D. and Freter, R.: *In vivo* and *in vitro* antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. Bacterial Antagonisms, 30-37 (1961).
- 5) Hurst, A., Hendry, G. S., Hughes, A. and Paley, B.: Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods. Can. J. Microbiol., **22**, 677-683 (1976).
- 6) Kapperud, G., Rorvik, M. L., Hasseltvedt, V., Hoiby, A. E., Iversen, G. B., Staveland, K., Johnsen, G., Leitao, J., Herikstad, H., Andersson, Y., Langeland G., Gondrosen, B. and Lassen, J.: Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. J. Clin. Microbiol., **33**, 609-614 (1995).
- 7) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局: <特集>細菌性赤痢 2001~2002. 病原微生物検出情報, **24**, 1-2 (2003).
- 8) 小沼博隆: 韓国産カキによる細菌性食中毒. モダンメディア, **49**, 61-76 (2003).
- 9) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課: 赤痢菌の試験法について. 平成14年1月9日, 事務連絡 (2002).
- 10) Kueh, C. S. and Chan, K. Y.: Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. J. Appl. Bacteriol., **59**, 41-47 (1985).
- 11) Oxley, A. P., Shipton, W., Owens, L. and McKay, D.: Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. J. Appl. Microbiol., **93**, 214-223 (2002).
- 12) 佐野喜彦: *Shigella sonnei* を原因とする韓国産かきによる食中毒について. 食品衛生研究, **52**, 35-41 (2002).
- 13) 霜鳥翔一, 小島夫美子, 東島弘明, 天児和暢: 海産生鮮魚介類を対象とした赤痢菌検査法の検討. 感染症誌, **64**, 1337-1344 (1990).