

表1 市販鶏肉から分離されたサルモネラの血清型および分離菌株数
(2002年4月～2003年2月)

血清型	分離数(%)
Infantis	111 (64.2)
Harfa	11 (6.4)
Manhattan	7 (4.0)
Yovokome	4 (2.3)
Hadar	3 (1.7)
Typhimurium	2 (1.2)
Bredeney	1 (0.6)
Agona	1 (0.6)
OUT	33 (19.1)
計	173 (100)

市販鶏肉210検体中134検体(63.8%)から173菌株が分離された。
1検体から複数血清型が検出されたので、検体数とは一致しない。

表2 鶏肉由来 *S. Infantis* の
薬剤感受性試験成績

	菌株数(%)
供試菌	111
感受性	2 (1.8)
耐性	109 (98.2)
CP	0
TC	108 (97.3)
SM	103 (92.8)
KM	68 (61.3)
ABPC	1 (0.9)
ST	53 (47.7)
NA	11 (9.9)
FOM	0
NFLX	0

表3 鶏肉由来 S Infantis の薬剤耐性パターン

耐性パターン	分離菌株数(%)
供試菌株数	111 (100)
感受性	2 (1.8)
耐性	109 (98.2)
KM	1
TC	1
TC,SM	26 (23.4)
TC,KM	1 (1.1)
TC,SM,KM	22 (19.8)
TC,SM,ST	11 (9.9)
TC,SM,NA	1
TC,KM,ST	2 (1.8)
TC,KM,NA	1
TC,SM,KM,ST	33 (29.7)
TC,SM,KM,ABPC	1
TC,SM,KM,NA	2 (1.8)
TC,SM,ST,NA	2 (1.8)
TC,SM,KM,ST,NA	5 (4.5)

供試薬剤 CP, TC, SM, KM, APBC, ST, NA, FOM, NFLX

表4 鶏肉由来S Typhimurium 及びS Hadar の薬剤耐性パターン

血清型	耐性パターン	分離菌株数
S Typhimurium	CP,TC,SM,KM,ABPC	2
S Hadar	TC	1
	TC,SM	2

表5 輸入鶏肉のサルモネラ汚染調査成績(2003年11月～12月)

原産国	供試 検体数	陽性 数	血清型						
			Enteritidis	Virchow	Mbandaka	Braenderup	Hadar	Newport	
ブラジル	18	4	4						
タイ	13	4(2)*	1	1	1	1		1	1
中華人民共和国	12	3	3						
アメリカ	4	0							
計	47	11(2)	8	1	1	1	1	1	1

* 1検体から2種類の血清型菌を検出したものが、2検体あった。

表6 輸入鶏肉から分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン(2003年11月～12月)

薬剤耐性パターン	血清型						計(%)
	Enteritidis	Virchow	Mbandaka	Braenderup	Hadar	Newport	
供試菌株数	8	1	1	1	1	1	13
NA	4	1	1	1		1	8 (61.5)
NA SM	2						2 (15.4)
NA SM TC					1		1 (7.7)
NA SM TC ST ABPC	1						1 (7.7)
NA SM TC CP ABPC	1						1 (7.7)
計	8	1	1	1	1	1	13 (100)

供試薬剤 CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX

表7 散発および集団事例由来S Typhimuriumの薬剤感受性試験成績

供試薬剤	2000年	2001年	2002年	2003年	合計 (%)
供試菌株数	9	13	8	6	36 (100)
感受性	4	7	5	3	19 (52.8)
耐性 (%)	5 (55.6%)	6 (46.2%)	3 (37.5%)	3 (50.0%)	17 (47.2%)
CP	5	6	3	1	15 (41.7)
TC	5	6	3	4	17 (47.2)
SM	5	6	3	1	15 (41.7)
KM	0	1	1	0	2 (5.6)
ABPC	5	6	3	1	15 (41.7)
ST	0	0	1	2	3 (8.3)
NA	1	3	1	1	6 (16.7)
FOM	0	0	0	0	0
NFLX	0	3	0	0	3 (8.3)

供試薬剤 CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX
 集団事例は1事例1株を供試

表8 散発および集団事例由来S Typhimurium の薬剤耐性パターン

耐性パターン	2000年	2001年	2002年	2003年	合計
TC				1	1
TC,ST,NA				1	1
CP,TC,SM,ABPC	4(2)*	2(2)	2(2)		8(6)
CP,TC,SM,KM,ABPC		1			1
CP,TC,SM,ABPC,ST				1	1
CP,TC,SM,ABPC,NA	1				1
CP,TC,SM,ABPC,NA,NFLX		3			3
CP,TC,SM,KM,ABPC,ST,NA			1		1
計	5(2)	6(2)	3(2)	3	17(6)

供試薬剤 CP, TC, SM, KM, APBC, ST, NA, FOM, NFLX

集団事例については、各1件として計上

*() DT104

表9 S Typhimurium フェージ型DT104による集団食中毒事例（東京都）

No	発生年月	発生場所	喫食者数	患者数	原因食品	薬剤耐性パターン
1	1997 10	保育園	21	11	保育園給食	CP, TC, SM, ABPC
2	1998 4	保育園		5	不明	CP, TC, SM, ABPC
3	1998 5	飲食店	7	6	牛レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC, ST, NA
4	1998 5	飲食店	不明	4	牛レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC, ST, NA
5	1999 5	不明	4	4	不明	CP, TC, SM, ABPC
6	1999 5	飲食店	6	4	不明	CP, TC, SM, ABPC, NA
7	2001 10	不明	2	2	牛レバ刺し	CP, TC, SM, ABPC
8	2001 12	飲食店?	44	3*	不明	CP, TC, SM, ABPC
9	2002 10	飲食店	28	9	仕出し弁当	CP, TC, SM, ABPC

* 喫食者44名中13名からカンピロバクター, 3名からサルモネラを検出

表10 散発事例由来 *S. Infantis* の薬剤感受性試験成績

供試薬剤	2000年	2001年	2002年	2003年	合計 (%)
供試菌株数	7	7	8	11	33 (100)
感受性	1	3	2	2	8 (24.2)
耐性	6 (85.7%)	4 (57.1%)	6 (75.0%)	9 (81.8%)	25 (75.8)
CP	0	0	0	0	0
TC	4	3	5	9	21 (63.6)
SM	4	2	5	9	20 (60.6)
KM	5	2	2	3	12 (36.4)
ABPC	1	0	0	0	1 (3.0)
ST	2	1	5	0	8 (24.2)
NA	0	0	3	0	3 (9.1)
FOM	0	0	0	0	0
NFLX	0	0	0	0	0

表11 散発事例由来 *S. Infantis* の薬剤耐性パターン

耐性パターン	2000年	2001年	2002年	2003年	計(%)
供試菌株数	7	7	8	11	33 (100)
感受性	1	3	8	2	8 (24.2)
耐性	6 (85.7%)	4 (57.1%)	6 (75.0%)	9 (81.8%)	25 (75.8)
TC		1			1 (3.3)
SM		1			1 (3.3)
KM	1				1 (3.3)
ABPC	1				1 (3.3)
ST			1		1 (3.3)
TC,SM			2	2	4 (12.1)
TC,SM,KM	2		1	2	5 (15.2)
TC,SM,ST			1	2	3 (9.1)
TC,SM,NA				2	2 (3.2)
TC,KM,ABPC		1			1 (3.3)
TC,SM,KM,ST	2	1		1	4 (12.1)
TC,SM,KM,NA			1		1 (3.3)

供試薬剤 CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX

表12 散発事例由来 C.jejuni のキノロン剤に対する耐性株出現状況(東京都)

	1997年	1998年	1999年	2000年	2001年	2002年	計
供試菌株	103	132	129	178	170	204	916
感受性	68(66.0%)	91(68.9%)	64(49.6%)	82(46.1%)	62(36.5%)	104(51.0%)	471(51.4%)
耐性	35(34.0%)	41(31.1%)	65(50.4%)	96(53.9%)	108(63.5%)	100(49.0%)	445(48.6%)
TC			28	43	40	39	150
EM	3	3				2	8
EM TC			1	1	1		2
CPEX	1						1
NFLX NA	3	1					4
NFLX OFLX NA	2						2
NFLX OFLX CPEX NA	25	35	18	30	34	26	168(18.3%)
NFLX OFLX CPEX NA EM	1	2					3
NFLX OFLX CPEX NA TC			18	20	33(19.4%)	33(16.2%)	38
NFLX OFLX CPEX NA EM TC			1	2			3
キノロン剤に対する耐性率	32 (31.1%)	38 (28.8%)	37 (28.7%)	52 (29.2%)	34 (39.4%)	26 (28.9%)	51 (31.1%)

分担課題名 食品由来の食中毒菌による耐性獲得リスクマネージメント手法に関する研究

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長

協力研究者 山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所 部長

協力研究者 山崎 学 国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員

研究要旨

わか国において、カンピロバクターやサルモネラは、食中毒発生事例が多く、代表的な食中毒起因菌であるか、抗生物質耐性菌が増加傾向にあり、問題となっている。一方、スウェーデン王立研究所の研究により、鶏に用いられたアホパルンと、ハンコマイシン耐性腸球菌の出現に因果関係が示され、耐性菌の出現に食肉動物の飼料に用いられた抗生物質が関与していることが示唆されている。本分担研究では、食品分離株における耐性に関わる検討を行うと共に、研究班全体より得られた生産段階、食品、臨床といったそれぞれの分離株に関する耐性に関する情報を基に、耐性菌出現防止に関わるリスクマネージメント手法を検討する。本年は、食品からのカンピロバクター分離手法の研究班内での標準化を検討し、試案を作成した。食品由来株の耐性獲得の基礎データとしては、臨床分離、環境および食品分離のリストERIAに関して調査を行った。

A 研究目的

カンピロバクター等の食中毒菌の抗菌剤耐性に関するリスクアセスメントを行い、耐性菌出現防止に関わるリスクマネージメント手法を検討し、耐性菌の出現の防止に有効な対策に関する情報を提供する。

B 研究方法

食中毒菌の抗生物質耐性、食中毒発生状況、食品汚染状況をもとにリスクプロファイルを作成し、米国 FDA により行われたリスクアセスメントの情報を参考に、カンピロバクターを中心に日本国内における情報およびデータの収

集を行うとともに、耐性獲得リスクマネージメントに関する検討を開始する。本年は具体的にまず、食品からのカンピロバクター分離法の試案作成を試みた。食中毒菌に関する耐性株の基礎データは、リストERIAについて行った。

(1) 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化 海外の主要なプロトコールを、調べPHLS 法、FDA-CFSAN (BAM) 法、ISO 法を比較検討し、文献等の情報から、標準的なプロトコール原案を作成した。この案につき、日常的に検査を行っている衛生研究所に意見をもとめ、個々の問題点を明らかにすると共に、プロトコールを完成させる上で、実験によるデータの確

認か必要と思われる部分を議論し明らかにした。これらの重要な部分については、カンピロハクター分離に実績のある9の地方衛生研究所と共同で、手法の検討を開始した。

(2)食中毒菌の耐性獲得状況の基礎データとしては、本年はリステリアを対象とした。食品由来100株、臨床由来101株について、寒天平板希釈法によりMICを測定した。対象とした薬剤は、ABPC、CTF、DSM、GM、KM、EM、LCM、NHT、VCM、VGM、SNM、OTC、BC、CP、NA、ERFXの16剤である。

C 研究結果

食品からのカンピロハクター分離の標準法を3種（PHLS法、BAM法、ISO法）の特徴とそれを基に検討したプロトコル原案の概略をまとめたものを別表1に示した。これをたたき台として、食品や臨床材料からのカンピロハクター分離実績のある衛生研究所の研究者の意見を合わせ、検査法の問題点及び検討が必要な重要項目を整理したのか、別表2である。別表2の重要項目を、国立医薬品食品衛生研究所、東京都健康安全研究センター、埼玉県衛生研究所、秋田県衛生科学研究所、群馬県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島市衛生研究所、山口県環境保健研究センター、熊本県保健環境科学研究所の10衛生研究所のネットワークを作り、分担して検討することにした。

食中毒菌の耐性獲得状況の基礎データとしては、リステリアの環境および食品分離株100株、臨床分離株101株の16薬剤に対するMIC測定値を、別表3に示した。

D 考察

国内における食品からのカンピロハクター検査法はこれまでなかった。一方、実際の食品特に食中毒で問題となる鶏肉について、市販食品から分離を試みるとその手法により分離状況は全く異なることが知られている。そのため、食品におけるカンピロハクターの状況を調へるには、食品からの分離方法を標準化することは、必須である。そこで、標準的な食品からの分離方法を検討し、その方法を用いて食品からのカンピロハクター分離を行い、その分離株の耐性状況を明らかにすることにした。これを機に研究班に限らず、広く用いることの可能な食品からの標準法を作成することを目標とした。そこで、海外で標準法として用いられている英国のPHLS法、米国FDAのBAM法、そしてISO法について詳しく検討を行い、標準法原案を作成した。このプロトコルにつき、臨床や食品からのカンピロハクター分離の実績のある衛生研究所に意見を求め、実施にあたって特に重要となる点、実験的にデータを出して検討が必要と思われる点を明らかにした。この検討を要する重要ないくつかのポイントについては、国立医薬品食品衛生研究所に加え、9の衛生研究所のネットワークを作り、検討を開始した。

リスクアセスメントに必要な基礎データについては、リステリアの臨床分離株と食品および環境分離株につき、16薬剤を対象にMICの測定を行った。リステリアは、腸球菌やカンピロハクターのような生産動物への抗菌剤の使用かその耐性獲得に直接影響を受けると考えられている細菌と異なり、自然界に広く分布し、このような選択圧を受けにくいと思われる。す

なわち、リステリアの耐性獲得は、腸球菌やカンピロバクターと異なり、主に医療現場での耐性獲得が主であると考えられる。リステリアは、グラム陽性菌であることから、同じグラム陽性菌である腸球菌で耐性獲得を検討する抗生物質を中心に 16 剤を選び耐性状況を明らかにした。調査した 16 薬剤において、OTC で、臨床由来株の一部の耐性獲得が見られた以外は、耐性獲得と思われる株はほとんど無く、臨床由来株、環境および食品由来株を比較してもあまり大きな耐性獲得の違いは認められなかった。

E 結論

食品からのカンピロバクター分離の標準法の原案を作成し、その妥当性を検討するネットワークをつくり、検討を開始した。臨床、環境および食品分離のリステリアについて、16 薬剤につきその耐性状況を明らかにした。

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

(英文発表)

Fukuyasu T, Igimi S, Uchida K, Eguchi M, Endo T, Ooshima K, Kuwano A, Sawada T and Tamura Y Standards of the in vitro mutation frequency study and the antimicrobial activity study in gut The Journal of Antibiotics 56 191-196, 2003

Matuoka H, Oishi K, Watanabe M, Kozono I, Saito M and Igimi S Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine Bioscience,

Biotechnology, and Biochemistry 67 2459-2462, 2003

Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S Nationwide survey of *Listeria monocytogenes* infection in Japan Epidemiology and Infection in press 2004

Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan International Journal of Food Microbiology in press 2004

Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S, Amano F Identification and Characterization of an Oxidative Stress-Responsive Protein from *Campylobacter jejuni*, Homologous to Rubredoxin Oxidoreductase/Rubrerhythrin FEMS Microbiology Letters in press 2004

(和文発表)

五十君静信 食品由来のリステリア菌による健康被害 食品衛生研究 53 No 4 19-23, 2003

五十君静信 リステリアー注目されるようになった食品媒介感染症菌— 食品衛生研究 53 No 9 11-16 2003。

(学会発表)

奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君静信。日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブサーベイランス。第76回日本細菌学会総会。2003年4月2日。

山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信。*Campylobacter jejuni* の酸化ストレス応答タンパク質の同定。第76回日本細菌学会総会。2003年4月2日。

岡田由美子、牧野壮一、五十君静信、山本茂貴。高食塩濃度下における *Listeria* の遺伝子発現

について。ワークノブ遺伝子の構造と発現。第 76 回日本細菌学会総会。2003 年 4 月 2 日。

村上裕之、藤田康弘、五十君静信、丸山務、園部廣美。*Listeria monocytogenes* の LAMP 法による検出法の検討。第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 23 日。

酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山務、五十君静信、柳平修一。各種ナチュラルチーズからのリステリア菌検出方法の検討。第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 2 日。

青山顕司、高橋千登勢、奥谷晶子、丸山 務、山本茂貴、五十君静信。食品および臨床由来 *Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動解析第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 2-3 日。

奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君静信。国内における食品等のリステリア汚染状況の報告。第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 2 日。

山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信。好気ストレスによって coccoid 化した *Campylobacter jejuni* に関する研究。第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 23 日。

岡田由美子、廣田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。環境及び臨床由来リステリア菌株における病原因子関連遺伝子の保有状況について。第 24 回日本食品衛生微生物学会総会。2003 年 10 月 2 日。

Amano F, Karahashi H, Terai S, Okamoto A, Ishii Y, Igimi S, Okutani A, Yamasaki M, and Nakamura A Pathogenicity of Sep22, identical to *Salmonella* Dps, in BALB/c mice,

and its relation to H₂O₂ resistance 日本生化学会。2003 年 10 月 16 日。

山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信。*Campylobacter jejuni* の 27kDa タンパク質の酸化ストレスに対する応答性及びその機能解析。第 86 回細菌学会関東支部会。2003 年 10 月 30 日。

酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山務、五十君静信、柳平修一。自動免疫蛍光測定装置を用いたリステリア菌検査法の評価。日本食品衛生学会第 86 回学術講演会。2003 年 10 月 30-31 日。

別表 1 Detection of *Campylobacter* Species from Food Products

Sample preparation	PHLS method	FDA-CFSAN (BAM) method	ISO method (1 st ed)	検討したプロトコル原案
<p>Weigh 25 g sample into a stomacher bag</p> <p>↓</p> <p>Add 9 × weight (or volume) of <i>Campylobacter</i> enrichment broth</p> <p>↓</p> <p>Homogenize by using a stomacher</p> <p>↓</p> <p>Transfer the suspension into a screw capped container (nominal volume 250 mL) leaving very little headspace</p>	<p>Weigh 25 g most samples (50 g fruit or vegetables) into a filter bag</p> <p>↓</p> <p>Add 100 ml of <i>Campylobacter</i> enrichment broth</p> <p>↓</p> <p>Rinse gently by shaking for 5 min or using a table-topshaker set at 25 rpm</p> <p>↓</p> <p>Hold 5 min</p> <p>↓</p> <p>Transfer the suspension into the incubation bag or flask</p> <p> </p> <p>* The sample types listed below are prepared by different procedure</p> <p>(1) Lobster tail or crab claws</p> <p>(2) Whole meat carcass or sample that cannot be easily reduced to 25 g (e.g. whole rabbit lobster or large piece of game meat)</p> <p>(3) Liquid egg yolk or whole egg mixture</p> <p>(4) Shellfish shucked</p> <p>(5) Water</p> <p>(6) Swabs</p> <p>(7) Milk frozen daily products</p>	<p>Pre-enrichment</p> <p>Sample within 10 days of production or time of contamination</p> <p>A daily product</p> <p> </p> <p>Incubate at 37°C for 22 ± 2 h</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 41 5°C for 22 ± 2 h</p>	<p>A quantity x (g or ml) of sample</p> <p>↓</p> <p>Add a 9x volume of <i>Campylobacter</i> enrichment broth</p> <p>(Preston broth or Park and Sanders)</p> <p> </p> <p>* Park and Sanders broth For some physical treatment (e.g. freezing) received-sample or product</p>	<p>検討したプロトコル原案</p> <p>(1) サンプルの採取 25 g (25 mL) のサンプルを採取し、ストマックハノグに入れる。</p> <p>(2) サンプルの調製 増菌培地 225 mL を入れてホモシネートする。</p> <p>増菌培養は通常の場合、Preston 増菌培地を利用する。</p> <p>また、菌損傷の可能性の高い場合は Bolton 培地を使用する。</p>
<p>Selective enrichment</p>	<p>Direct plating out</p> <p> </p> <p>* For those products suspected of containing a large quantity of thermotolerant <i>Campylobacter</i></p> <p> </p> <p>Plate the non-incubated suspension onto Karmali agar and second selective isolation medium**</p>	<p>Direct plating out</p> <p> </p> <p>* For those products suspected of containing a large quantity of thermotolerant <i>Campylobacter</i></p> <p> </p> <p>Plate the non-incubated suspension onto Karmali agar and second selective isolation medium**</p>	<p>(Preston 培地)</p> <p>微好気条件にて 42°C で 24 - 48 時間培養する。</p> <p> </p> <p>(Bolton 培地)</p> <p>微好気条件下にて 37°C で 4 時間培養の後に、42°C で 24 - 44 時間培養する。</p>	<p>(Preston 培地)</p> <p>微好気条件にて 42°C で 24 - 48 時間培養する。</p> <p> </p> <p>(Bolton 培地)</p> <p>微好気条件下にて 37°C で 4 時間培養の後に、42°C で 24 - 44 時間培養する。</p>

<p>〔 Sample for ≥ 10 days of refrigeration All water samples All shellfish samples</p> <p>Incubate at 30°C for 3 h, then at 37°C for 2 h under microaerobic conditions</p> <p>↓</p> <p>Enrichment</p> <p><u>With shaking</u></p> <p>Incubate at 42°C for 23-24 h under microaerobic conditions</p> <p>* For shellfish, incubate for an extra 4 h * For dairy samples incubate for 48 h total * For <i>C. fetus</i> keep the temperature at 37°C and incubate for a further 48 h</p> <p><u>With non-shaking</u></p> <p>Incubate at 42°C for 28-29 h under microaerobic conditions</p> <p>* For shellfish, incubate for 48 h * For <i>C. fetus</i>, incubate for 52 h</p>	<p>** Modified Butzler agar, Skirrow agar, Charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) or Preston agar</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 42°C for 48 h, 72 h and, if necessary, 5 days under microaerobic conditions</p> <p>Enrichment</p> <p><u>Preston broth</u></p> <p>Incubate at 42°C for 18 h under microaerobic conditions</p> <p><u>Park and Sanders broth</u></p> <p>Incubate at 32°C for 18 h under microaerobic conditions</p> <p>↓</p> <p>Add the antibiotic solution B at a concentration of 5% (V/V)</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 37°C for 2 h under microaerobic conditions</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 42°C for 40-42 h under microaerobic conditions</p>	<p>微好気条件については以下の方法が推奨されており 微好気条件が保持される事を市販の指示薬などで確認して利用すること。</p> <p>微好気条件とは酸素 5%, 二酸化炭素カス 10%, チノ素 85%を基本とする。</p> <p>①培養室内を微好気条件に自動制御できるイノキニューヘータ</p> <p>②市販の微好気ノヤーノシステム (カスキノトシステムなど) を利用する方法。</p> <p>③微好気ガスで容器の気相を置換し、カスを透過しない容器で密封する。</p> <p>④300 mL 容の通気性のない材質の容器 (ないし袋) に空隙部分を少なくして増菌培養液を直接入れる。</p>	<p>分離培地に増菌培養した液を画線塗抹して 42°C で 24・48 時間培養する。</p> <p>分離培地は mCCDA 培地を用いる。また、必要に応じて、下記の二次培地を追加する。</p> <p>Karmali 寒天培地、Modified</p>
<p>Plate onto <i>Campylobacter</i> selective agar (modified CCDA)</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 37°C for 48 ± 2 h under microaerobic conditions</p>	<p>Plate onto <i>Campylobacter</i> selective agar (modified CCDA)</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 37°C for 48 ± 2 h under microaerobic conditions</p>	<p>Make a 1 100 dilution in 0.1 % peptone water of the enrichments</p> <p>↓</p> <p>Plate two loopfuls of undiluted and diluted portions onto either Abeyta-Hunt-Bark agar or modified CCDA agar</p>	<p>Plate a loop of the enrichments onto Karmali agar and second selective isolation medium**</p> <p>** Modified Butzler agar, Skirrow agar, Charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) or Preston agar</p>

<p>Identify <i>Campylobacter</i> colony</p>	<p><u>Oxidase test</u> Oxidase negative colonies do not require further confirmatory test</p> <p>↓</p> <p><u>Microaerobic growth</u> Incubate one plate microaerobically and the other plate aerobically at 37 C ± 1 C for 22 ± 2 h</p> <p>↓</p> <p><u>Cell morphology and motility</u> If cell morphology is in doubt then perform a Gram staining</p>	<p>Incubate at 42°C for 24-48 h under microaerobic conditions</p> <p>* For <i>C. fetus</i>, incubate at 37 C for 48-72 h</p> <p><u>Cell morphology and motility</u> One typical colony/plate</p> <p>↓</p> <p>Restreak typical organisms onto Abeyta-Hunt Bark agar without antibiotics (two colonies/sub) and incubate at 42°C for 24-48 h under microaerobic conditions For <i>C. fetus</i>, incubate at 37 C</p> <p>↓</p> <p>Confirmatory test Confirm only one plate/sub</p> <p><u>Catalase test</u> <u>Oxidase test</u></p> <p>↓</p> <p>Biochemical tests <u>Gram staining</u> <u>Hippurate hydrolysis</u> <u>TSI reaction</u> <u>Glucose utilization test</u> “Dryspot Campy test” or “Alter for <i>Campylobacter</i>” <u>Antibiotic inhibition</u> <u>Growth temperature tolerance</u> <u>Growth on MacConkey agar</u> <u>Growth in modified semisolid media</u> (added biochemicals described below) 1) with 1% glycine 2) with 3.5% NaCl 3) with H₂S from cysteine 4) with Nitrate reduction</p>	<p>Incubate at 42°C for 24-72 h (more generally, 48 h) and, if necessary, 5 days under microaerobic conditions</p> <p>↓</p> <p>5 typical and/or suspect colonies</p> <p>↓</p> <p>1) Inoculate into 1 ml of <i>Brucella</i> broth 2) Examination described below (using the selected colonies on plates)</p> <p><u>Cell morphology and motility</u> <u>Gram staining</u></p> <p>↓</p> <p>Inoculate with a loop of each selected colony suspensions (in <i>Brucella</i> broth) indicating typical cell morphology and motility onto a Columbia blood agar plate</p> <p>↓</p> <p>Incubate at 42 C for 24 h under microaerobic conditions</p> <p>↓</p> <p><u>Growth at 25°C</u> Incubate at 25°C for 2-5 days under microaerobic conditions</p> <p>Biochemical tests <u>Oxidase test</u> <u>TSI agar</u> <u>Catalase test</u> <u>Nalidixic acid and cephalothin sensitivity</u> <u>Hippurate hydrolysis</u></p>	<p>Butzler 培地、Skirrow 培地、Preston 寒天培地</p> <p>(1) コロニーの観察 疑わしい形状のコロニーを5コロニー程度採取。 直径1-2 mm程度の正円形でやや隆起したコロニー（時に扁平する）を対象とする。</p> <p>(2) コロニーの同定準備 コロヒア血液寒天培地およびこれと同等の糖の含有が少ない非選択培地に塗抹して42°Cで24-48時間培養。</p> <p>(3) 鑑別同定 ① クラム染色 ラゼノ状（球状 [コロコロ] の場合もある）のクラム陰性かん菌 ② カタラーゼ陰性 ③ オキナーゼ陽性 ④ ラゼノクス凝集テスト (DrySpotTest など) で陽性 ⑤ 馬尿酸塩加水分解試験 (<i>C. jejuni</i> [+], <i>C. coli</i> [-]) ⑥ イントキソリン酢酸塩加水分解陽性 (<i>C. jejuni</i> [+], <i>C. coli</i> [+]) ⑦ 必要に応じて TSI 培地などで生化学試験</p>
--	---	--	--	--

	食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の検査法試案	コメントおよび懸案事項
<p>サンプルの調製の調製</p>	<p>(1) サンプルの採取 25 g (25 mL) のサンプルを採取し、ストマックバッグに入れる。 検討手法 サンプルを等量の増菌培地または緩衝液等で、洗浄しその洗い液を増菌および直接選択培地に接種する。</p> <p>(2) サンプルの調製 増菌培地 225 mL に入れてホモジネートする。 増菌培養は通常の場合、Preston 増菌培地を利用する。 また、菌損傷の可能性の高い場合は Bolton 培地を使用する。</p>	<p>(注1) 増菌培地使用量の削減のために以下の方法の採用について Sample 25 g を等量の buffer(生理食塩水 or PBS) または増菌培地(抗生物質なし)にて洗浄した後、0.5 ml の洗い出し液を 10 ml の増菌培地に接種し、微好気条件下にて増菌培養。 欧米の主な公定法(PHLS, FDA ISO)ではこのような方法は設定されていない。従って、これらの方法と実験的に比較したデータから有効性が確認されれば、この方法も採用する。 [期待される効果] 菌の濃縮になる。また、使用する培地、supplements 及び添加する血液量の削減。</p> <p>(注2) 使用する増菌培地について 現在、日本では増菌培地として Preston 培地が広く用いられている。一方、近年の欧米の公定法では、<i>Campylobacter</i> が環境中では損傷を受けやすいことから、損傷菌を含めた増菌のために Bolton 培地の導入が認められる。我が国において設定する公定法についても、欧米の主な公定法と釣り合いをとる必要があり、従って、Preston 培地と Bolton 培地を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p>

表 2 ページ目 / 全 4 ページ

	検査法試案(つづき)	コメント
増菌培養	<p>(Preston 培地) 微好気条件にて 42℃ で 24 - 48 時間培養する。</p> <p>(Bolton 培地) 微好気条件下にて 37℃ で 4 時間培養の後に、42℃ で 24 - 44 時間培養する。</p> <p>微好気条件については以下の方法が推奨されており、微好気条件が保持される事を市販の指示薬などで確認して利用すること。 微好気条件とは酸素 5% 二酸化炭素ガス 10% チン素 85% を基本とする。</p> <p>①培養室内を微好気条件に自動制御できるインキュベータ ②市販の微好気ジャーシステム(ガスキットシステムなど)を利用する方法。 ③微好気ガスで容器の気相を置換し、ガスを透過しない容器で密閉する。 ④300 mL 容の通気性のない材質の容器(ないし袋)に空隙部分を少なくして増菌培養液を直接入れる。</p>	<p>(主3) Bolton 培地を用いた場合の培養温度のシフトアップについて培養温度のシフトアップは操作が大変になると考えられる。一方、欧米の公定法ではシフトアップが設定されている。従って、培養温度をシフトアップする方法としない方法を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p> <p>(主4) 微好気条件の設定方法について記載した各々の設定方法を実験的に比較したデータが必要と考えられる。</p>