

どのような観点で検査法を決めるのか、本委員会での議論が重要である。

81. 畜水産食品を対象とした議論ではあるが、ブドウ球菌の性質から手の拭き取り検査や、おにぎりなどの日本食への対応などについては議論が必要ではないか。
82. 定型もしくは疑わしいコロニーをいくつ検討すべきかについては、複数個でいくつにするかは検討した後、数を決める。
83. ストマッキング処理の時間は、1分で今後も統一する。
84. 検査済みの菌株の取り扱いについては、保存の必要性等に関し今後決めてゆく。
85. 培養時間に関しては、一晚培養などの曖昧な表現はやめ、XX時間等、より具体的な表記にしてゆく。
86. フローチャートは確認されましたので、原案プロトコールのご提案を作業部会から行ってください。

#### サルモネラ作業部会より

87. 作業部会での検討により、検査するコロニー数は3コロニーとしたい。
88. セレナイトは有害金属であることから、従来法である EEM 増菌は廃棄が大変であり、BPW を用いる手法への移行が妥当である。
89. RV、TT の併用は負担が大きいが、検査精度を上げるためには併用が望ましい。
90. サルモネラ検査法は、作成方針のステージ1であるので、作業部会での検討結果を付けて、プロトコールを確定しまずステージ2としてから、コラボについて提案をする。
91. ステージ2とするためには、スパイクテストなどの具体的な実験データと文書化した修正プロトコールを示していただかないと検討は困難である。
92. 作業部会からは、PCR による検査法の検討が要望されたが、標準法の考え方から逸脱するので、標準法としては培養法に関するプロトコールとしてまとめていただきたい。
93. 検査法作成のステージの進め方に関して、Web 上に公開されている作成方針に従い、再度確認を行った。
94. サルモネラについては、次回ステージ2に進めるための資料とプロトコール案を提示し検討を行う。

#### コラボスタディの進め方について

95. コラボスタディの進め方はまだ方法論が定まっていないので、松岡先生を中心とした作業部会を作り、AOAC、ISO、IDF の協力を得て、方法論の提案をしてもらう。

#### その他

96. 時間超過のため、“毒素産生菌の検査”についての議論は次回以降に行う。
97. 次回は2月26日の開催を予定。今回と同様に、オブザーバーを若干名募集する予定。

以上

## “食品からの細菌検査標準法作成方針”

わが国における食品を対象とした細菌検査法は、食品の規格・基準の定められているものについては基本的に告示法で、またそれぞれ食品衛生上の問題が生じた事例に対応して、病原細菌と原因となりやすい食品の組み合わせによる個々の検査法が通知法により示されている。この告示および通知によって示された方法のみがわが国の公定法と理解されているが、これらは長期にわたり改正が行われていないものがあり、今後国際的に広く認められている検査法との整合性を考慮する必要がある。一方わが国では従来から厚生労働省監修の「食品衛生検査指針・微生物編」があり、ここに記載された方法が標準的なものとされて、広く利用されている現状がある。2004年改訂の「食品衛生検査指針・微生物編」には上記の告示および通知法とわが国で現在広く行われている標準的な細菌検査法が網羅的に収録されているが、個々の細菌については食品からの検出法という指針を示しているにすぎない。食品からの細菌検査は日常の食品の衛生検査と食中毒の原因究明などであるが、その目的によって検査法が異なっており当然である。しかしこれらの検査法は全ての検査法が微生物学的な本質を踏まえつつ科学的に検証できる評価を踏まえたもので構成されていなければならない。告示および通知法の見直しや食中毒菌検査の統一化も重要であるが、それを含めた食品にかかわる細菌の科学的根拠に基づきバリデイトされた標準的検査法を改めて策定することが急務である。

そこで、標準法検討委員会では、統一した方向性を持った“食品からの細菌検査標準法”を作成することの重要性を確認し、標準法を以下の4つの手順に従って作成することとした。この標準法は、培養法を有する微生物については、原則として培養法を基準として採用し、国際的に広く認められた検査法との互換性を考慮して作成する。プロトコールの作成に当たっては、公開により広く意見を求め、実行性のあるより妥当なプロトコール作りを行う。これらの基本方針が担保されるように、以下の4つのステージを満たし、作成したものを標準法として公開することにした。

原案（ステージ1）：標準法検討委員会（親委員会）は、作業部会を立ち上げる。作業部会は文献調査や情報収集により、関連する国際的な標準法の比較表を作成し、それを基に“原案のたたき台”を親委員会に提出する。親委員会では、このたたき台を議論し、当該検査法の方向性を確認した上で、“原案”としてまとめる。その作成方針を含めて、インターネット上に公開、期間を設定し意見を求める。ここで、文書にて第三者組織（日本食品微生物学会や、衛生微生物技術協議会等）の意見を求める

作業部会案（ステージ2）：各作業部会は、国立研究機関、大学、地方衛生研究所、食肉検査所、登録検査機関、検疫所等の協力を受けながら原案の検討箇所を設定し、実験データから細かいプロトコールの検討を行い、重要な指摘がある場合はそれを考慮した“作業部

会案”を作成する。作業部会案は、親委員会に提出するとともに、一定期間インターネット上で公開し広く意見を求める。さらに、文書にて第三者組織の意見を求める。

コラボ実施案 (ステージ3)：インターネットや第三者組織の意見などを参考とし、親委員会は作業部会案について議論し、“コラボ実施案”とする。コラボスタディーの規模や協力施設の数等を示し、インターネット上で公開し、意見を求める。コラボスタディー参加者を募る。

標準法 (最終ステージ)：作業部会は、複数の検査機関でコラボスタディーによりその実行性を評価する。親委員会は、コラボスタディーの結果を受け、作業の進行が方針に従って行われているかの確認を行った後、“標準法”として公開する。

尚、親委員会は、方針通りに作業部会が機能し、標準法作成が順調に行われたかを確認し、不備な点があれば、“食品からの細菌検査標準法作成方針”の見直しを行う。

	食品からのカンピロバクター(ジェジュニ/コリ)の検査法原案	コメントおよび懸案事項
<p>サンプルの調製</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。</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、<u>0.5 ml の洗い出し液を 10 ml の増菌培地に接種し、</u> 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>

	検査法原案(つづき)	コメント
増菌培養	<p>(Preston 培地)            微好気条件にて 42°C で 24 - 48 時間培養する。</p> <p>(Bolton 培地)            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>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%、チツ素 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>(注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>(注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>

	検査法原案(つづき)	コメント
分離培養	<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 Butzler培地、Skirrow 培地、Preston 寒天培地</p>	
コロニーの同定	<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 コンビ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>	

	検査法原案(つづき)	コメント
コロニー の同定 (つづき)	<p>(3)鑑別同定</p> <p>①グラム染色:ラゼン状(球状[コッコイド]の場合もある)のグラム陰性            かん菌</p> <p>②カタラーゼ陰性</p> <p>③オキシダーゼ陽性</p> <p>④ラテックス凝集テスト(DrySpotTestなど)で陽性</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>⑤馬尿酸塩加水分解試験(<i>C.jejuni</i> [＋]、<i>C.coli</i> [－])</p> <p>⑥インドキシル酢酸塩加水分解陽性(<i>C.jejuni</i> [＋]、<i>C.coli</i> [＋])</p> <p>⑦必要に応じて TSI 培地などで生化学試験</p> </div>	<p>(注5)<i>jejuni/coli</i> 以外はほとんど出ない実態があるので⑤-⑦が必要かどうか検討</p>

厚生労働科学研究費“細菌性食中毒の予防に関する研究”カンピロバクター研究班起案

平成18年5月23日 第5回検討委員会確認

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

#### 論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宮原美知子、小沼博隆	食品中赤痢菌の新検査法検出感度及び冷凍保存での生残性	防菌防黴誌	34	263-266	2006
宮原美知子	冷凍保存食品中の病原細菌の検出	防菌防黴誌	34	569-575	2006
塚本定三、宮原美知子	食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法	防菌防黴誌	35	印刷中	2007
中 峰松、清水 晃、河野潤一、五十君静信	市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状	日食微誌	23	217-222	2006
藤尾公輔、清水 晃、松村浩介、河野潤一、北川 浩、五十君静信	市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性	日食微誌	24	印刷中	2007
Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F.	An anti-Salmonella antibody prevents the Salmonella enterica serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella	Bioscience & Microflora	25	117-119	2006
Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S.	The sigma factor, RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in <i>Listeria monocytogenes</i>	FEMS Microbiol Lett	263	54-60	2006
Hiroshi Asakura, Akiko Ishiwa, Eiji Arakawa, Sou-ichi Makino, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto, and Shizunobu Igimi	Gene Expression profile of <i>Vibrio cholerae</i> in the cold stress-induced viable but non-culturable state	Environmental Microbiology		in press	
尾畑浩魅、下島優香子、小西典子、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、諸角聖、福山正文	腸炎ビブリオ食中毒事例におけるPCR法を用いた食品からの耐熱性溶血毒(TDH)産生菌の分離	感染症学雑誌	80	383-390	2006