

をお願いします。次回は第 50 回です。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 50 回議事録概要

2014 年 10 月 27 日開催

60. 委員長より挨拶。
61. 配布資料と第 49 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 49 回議事録概要案の確認を行い、4 か所の修正がなされた。具体的な記述の部分が多いため、内容を簡潔にした議事概要案の修正版を作成し、事務局から全委員に送付し、再度確認をお願いすることにした。
62. 今後、議事抄録では「正式名称（略語）」、議事録概要では略語のみでの記載に統一することとし、該当部を修正した。

ウェルシュ菌試験法について (ST3)

63. 資料を用いて、伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法について説明があった。
64. 前回までの意見を参考に、変更を行った。
65. 培地を比較検証した結果、SC 寒天培地(U.S.FDA-BAM 及び USDA/FSIS MLG は TSC 寒天培地と表記) は特徴ある集落を形成し、他の細菌の発育を抑制することが確認できた。
66. ウェルシュ菌は通常芽胞での汚染が問題となり、定量法よりも定性法が必要であると考えられるため、新規試験法のプロトコールを ST1 として提案する。
67. 公定法では増菌培地が使われないため、新たに検討する定性法では、増菌培地の検討を行う必要がある。
68. 通常増菌培地として TGC 培地を使用するが、食品の微生物検査では使用されていない。
69. レサズリン含有 TGC 培地は、一般的に使用されている培地であるが、海外ではメチレンブルーを用いた培地などが主流である。
70. 増菌培養の温度と時間、グルコースを入れるか否か、pH などについて検討する。
71. 培地量は 225 ml とし、静置培養で行う。
72. 表 1(B)の確認培養の項目において、「TGC 培地で増菌した後、」を追記する。
73. 選択分離培地としては、SC 培地、CW 卵黄加寒天培地、KM 加 CW 卵黄加寒天培地、D-シクロセリンを添加した CW 卵黄加寒天培地が候補として挙げられる。
74. ISO 7937:2004 に記載されている SC という表現が正式ではあるが、通常 TSC 寒天培地と標記されているため、ISO に準じて「SC (TSC) 寒天培地」と標記する。
75. 選択分離培地は数多く記載されているが、いくつか絞ったほうが良い。
76. 対象となる検体について、自然界検体という表現は「環境・便検体」に変更する。
77. BAM 法では定量法での希釈水はペプトン水で、定性法ではチョップドレバーブイオンやクックドミート培地を使用するとの記載があるが詳細に記述されているわけではなく、希釈水の組成は統一されていない。
78. 定性法における増菌培地は TGC 培地で良いと思われるが、選択分離培地は定量法と揃えたほうが望ましい。
79. 定性法を新規試験法とするので、今回の比較表を ST1 資料とする。ここにある培地を

比較・検討する方向で進める。

集落計数法について

80. ファイルの中の資料 B「ISO 微生物試験法における菌数算定法の現状」(第 43 回配布資料)を資料とする。B は付帯文書であり、これらは統一されていない。
81. ISO でも集落計数法を統一する動きがあるため、検討委員会でも議論していきたいと考えている。
82. 伊豫田委員を中心に、衛生指標菌作業部会で進めていくこととなった。
83. 集落計数法は合意したものを使用することとなる。
84. ISO では試験所認定を受けているか否かで計数の方法が異なっている。
85. (一財)食品分析センター及び(一財)日本冷凍食品検査協会と協力して、ISO と公定法それぞれの集落計数法で算出した結果が蓄積されてきており、具体的な案を含めた今後の方向性を次回以降の委員会で提案することとした。

食品の微生物試験法に関する用語集について

86. 食品衛生検査指針の改定に伴い用語の議論が出ており、まだ統一しきれていないため、バリデーション作業部会で作成した用語集を基に、検討委員会で用語集を作成する。
87. 作業部会である程度まとめ、検討委員会に提出して、確認を行いたい。
88. 食品微生物学会の用語集は、細菌学会の用語辞典にできるだけ合わせるようにしているため、なるべくこの 2 冊に従うようにする。
89. 細菌学会の用語辞典については少し難点もあるため、全てをベースとするのではなく、試験法の利用という観点から議論を行い進める。
90. 食品と臨床では、表現等が変わってくるため、ひとまず表を作成し、それを基に議論を進め、用語集を作成していく。

腸管出血性大腸菌検査法について

91. 工藤委員より、腸管出血性大腸菌検査法について、報告があった。

事務連絡：各作業部会の進行状況

92. 特になし

事務連絡その他

93. 次回の検討委員会は、12月3日(水)に開催予定。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 51 回議事録概要

2014 年 12 月 3 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 50 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 50 回議事録概要案の確認を行った。訂正箇所はなく、細かな表現等を事務局により修正するという事で承認された。
3. 配布資料中の第 49 回議事録概要案の修正版について、ウェルシュ菌に関する記述が詳細であったため、大幅に簡略化し、後日各委員による確認を行うこととした。
4. 別添資料の「食品中のリステリア・モノサイトゲネスの検査について」は、文章の修正を加えたため、各委員による確認を行うこととした。

ウェルシュ菌試験法の集落計数法について (ST4)

5. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法の集落計数法 ST4 案について説明があった。
6. 定量法は ISO 7937 をそのまま起こして培地を検証する、ということで、今回の検討は ST4 である。
7. 文章中の TSC 培地を SC 培地に修正。文章中の一番はじめの SC 培地の記述のみ、「SC (TSC) 培地」とする。
8. 確認試験 A における培養条件を、嫌気培養ではなく好気培養に修正。これに伴い、他の該当箇所も同様に修正する。
9. LS 培地を用いる確認試験 A はガスの量で判定を行う。一方、確認試験 B では NM 培地・LG 培地の 2 つの培地を使用するが、これらの培地は国内ではほとんど使用されていない。現在、国内での培地の購入可否を確認しており、購入可能であれば、確認試験 B を用いることができる。
10. 実際に確認試験を行うとすると、確認試験 A の方が難しいと考えられるため、確認試験 B の方を推奨する。
11. ダーラム管及び中試験管のサイズについて、ISO 7937 に記載されていないため、今後、国内で使用されている様々なサイズのものを用いて検証を行い、サイズの範囲を決定する。
12. 使用器具に、ダーラム管を追記する。
13. 確認培地の LS 培地に関する文章中の「加温溶解後 8 mL ずつ中試験管に分注し、」について、他の培地では 10 mL になっている。これは ISO 7937 の記述通りであり、今後検証を行って、どのようにするかを判断する。
14. レシチナーゼ反応について、ISO 7937 では行われていないが、国内では一般的であり検査指針では従来の方法を示す。
15. ウェルシュ菌の定義は、嫌気性菌ではなく偏性嫌気性菌に修正する。
16. ISO 7937 では中試験管を使用しているが、日本では小試験管等で小規模に行っている。1 検体あたり 5 集落を用いて確認試験を行うことから、性状確認に小試験管を用いることの可否について作業部会で検証する。

17. ストマッカー時間が1分間と記述されているが、30秒～1分間に変更する。
18. 使用機器、器具において、「⑩滅菌シャーレ、フラスコ」の記述からフラスコを削除する。
19. ISO 7937の翻訳ではなく、ISOと整合性のあるバリデートされた試験法とする。それに伴い、「本試験はISO 7937:2004に従った…」を「本試験はISO 7937:2004に基づき検証された…」のような記述に変更する。
20. 「希釈試料 1 ml+TSC 寒天培地 10～15 ml (混釈)」に「(重層)」と追記する。
21. 以上を修正した後、作業部会に戻して検討する。その後、修正案を検討委員会にて再検討する。

腸炎ビブリオ試験法について (ST4)

22. 甲斐委員より、腸炎ビブリオ試験法(定性法)のST4案について、説明があった。
23. 培養時間の表記方法について、「○±○時間」ではなく「○～○時間」という記述で統一する。
24. 増菌培地についての変更はない。
25. 「(2) 選択分離培地」中に記述されているクロモアガービブリオ、X-VP 寒天培地、ES ビブリオ寒天培地の3培地を、新たに作成する「(3) 酵素基質培地」の項目に変更する。これに伴い、番号を付け直す。酵素基質培地、選択分離培地の箇所に、「以下の3つから1種類を選択する」の一文を追記する。
26. 確認培地以降の塩化ナトリウム濃度について、現場における使用を考慮して1～2%と記述している。なお、どちらの濃度でも腸炎ビブリオに大きな影響はない。この点について検討したところ、全てを2%と記述し、確認培地以降では「濃度を1%に下げることとも可能である」旨の注釈を記述することとした。
27. 言葉の使い方については、他の試験法を参考にして修正した。
28. 孵卵器のスペックは $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ と記述し、本文中では 37°C に統一する。
29. TSAT 寒天の濃度はISOに従って8.0～18.0 gとなっているが、TCBS 寒天の濃度に合わせて15.0 gに統一すべきかについては、リステリアのときと同様にISOにしたがい(8.0～18.0 g)を優先することとした。
30. 食塩、塩化ナトリウム及びNaClの記述を統一する。
31. ES ビブリオ寒天培地のpHについて、「 $8.8\pm *$ 」という記述になっているが、「本培地粉末95 gを精製水1,000 mlに加温溶解後、約 50°C に冷却し、0.5モル炭酸ナトリウム溶液を35 ml添加した後のpH」という記述を削除し、下記の調整方法の箇所で「0.5モル炭酸ナトリウム溶液を35 ml添加し(pHは約8.8となる)」とする。また、「(高圧高温滅菌はできない)」と追記する。
32. 以上を修正した後、各委員により確認を行う。

エルシニア・エンテロコリチカ試験法について (ST1)

33. 岡田委員より、エルシニア・エンテロコリチカ試験法のST1案について、説明があった。

34. BAM 法、USDA/FSIS 法、ISO 10273:2003、検査指針（2004 年版）の 4 方法と、それぞれに使用している培地組成を比較し、どの方法を基準とするか検討した。
35. 近年、ISO でもエルシニア試験法の検討が始まっており、変更される可能性があるが、それがいつ反映されるかわからないため、本検討委員会では現在公開されている ISO 10273 に従い検討を始める。
36. 検査指針の選択分離培養で使用されているエスクリン加 IN 寒天培地は、病原性のエルシニアを分離するために使用されている。
37. この試験法の方針として、病原性菌か、それとも全てのエルシニアか、どちらかに焦点を絞るべきであるかに関して、病原性エルシニアにターゲットを絞った方が良いとの意見が出た。
38. ISO 10273 では食品等、BAM 法・USDA/FSIS 法では食肉及び食鳥由来、検査指針では環境や糞便拭き取りを含めて検体としている。この中では、ISO が一番簡略であると共に、目的も合っている。しかし、本当にエルシニアが増えるか否か定かではないため、作業部会で ISO 10273 のプロトコルによる検討を行い、方向性を決めることとする。
39. エルシニアのニーズとして、肉の生食が問題となる。豚肉だと、エルシニアの検査が必要となる可能性が高い。
40. エルシニアは感染症法の対象病原体ではないため、感染研でもプロトコルはない。
41. 食中毒検査では PCR を使うが、標準試験法では PCR による試験は採用していない。それに伴い、エルシニアでも同様な対応とする。
42. ISO 10273 のプロトコル中の検体量「検体 X g+PSB プロス 9x ml」について、もし、ISO を基にした定性法を起こすのであれば、検体量を 25g に変更する。

セレウス菌セレウリド試験法について (ST3)

43. 鎌田委員より、セレウリド試験法の ST3 案について、説明があった。
44. これまで予備実験を行ったところ、細かい部分において調整が必要であることが分かった。
45. 岩手県保健環境研究センターにおいて、対象となる食品を一つに定めて LC-MS/MS をもちいた検証を行ったところ、検量線は 0.01~10 ng/ml の範囲で得られ、定量下限 0.01 ng/g であった。この回収率は、70~120%の間に入っていた。
46. 岩手県保健環境研究センター、(一財) 日本冷凍食品検査協会、及び (一財) 日本食品分析センターの 3 機関において、和光純薬工業製と林純薬工業製のセレウリドを用いて比較したところ、差が見られた。この原因として、純度の違いや劣化等が考えられたが、耐熱性の高さより、劣化による原因ではないとも考えられ、バイアルが有機溶媒を封入できるか否かという点に差があるのではないかと推測された。なお、市販品は製品により差が認められた。
47. 一カ所の添加回収試験では、回収率が 60%に到達しなかった。
48. ステージ 2 という記述をステージ 3 に変更した。
49. 静置としていた箇所を、遠心分離や振とうに変更した。

50. 回収率が 70%に満たないことから、細かい部分での調整が必要であるとされる。カラムにサンプルをロードするときのメタノール含有率が関与していると考えられる。
51. 1カ所、80%以上の回収率となった。抽出効率は問題ないが、そこからの吸着（添加回収のやり方）がうまくいっていないのでは、と考えられた。
52. 抽出する際の溶媒を変えてみてはどうか、との指摘があった。
53. 次回の検討では、添加した後の静置時間の違いにより、回収率を比較してみる（0分又は60分静置）。
54. 固相カラムの目詰まりが起こったことから、これが回収率に影響している可能性も考えられるため、この原因についての検討も行うべきであるとされた。
55. 次回の検討委員会では、方向性を定めた後、ST3案として検討を行う。

リステリア・モノサイトゲネス試験法通知について

56. リステリア試験法が、11月28日付で検疫所向けに通知された（地方自治体も含む）。
57. BPWの組成は、既にカゼインペプトンに変更済みである。
58. リステリアの規格基準も、まもなく公表される予定である。いくつかの問題点を修正した後、各委員による確認を行う。

事務連絡その他

59. 次回の検討委員会は、1～2月に開催予定です。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 52 回議事録概要案

2015 年 2 月 18 日開催

1. 委員長より挨拶。
2. 配布資料と第 51 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 51 回議事録概要案の確認を行った。2箇所の修正を行った。さらに2箇所については具体的な社名等を削除し、公開しても差し支えない表現に修正するという事で承認された。

エルシニア・エンテロコリチカ試験法 (NIHSJ-27-ST1)

3. 岡田委員より、エルシニア・エンテロコリチカ試験法 ST1 案について説明があった。
4. BAM、USDA/FSIS、ISO 10273:2003、検査指針 (2004 年版) の 4 方法において使用される各培地を手配しているが、国外産の培地が含まれており、入手出来ない培地がある。
5. ISO 法を ST1 原案として採択し公開し、ST2 として添加回収試験の実施・評価を行いたいとの意見が述べられ、承認された。
6. 次回からは ST2 として検討を進めるが、作業部会で得られた結果が悪ければ、ST1 に戻し、ISO 以外の方法を再度検討する方針とした。
7. ISO 法では検査に必要な期間が 1 週間と、他の 3 方法に比べると短い。

セレウス菌試験法 (NIHSJ-28-ST1)

8. 萩原委員より、セレウス菌試験法 ST1 案について説明があった。
9. 第 48 回検討委員会で、平板法を定量法のプロトコールとして進めることとなっており、ISO7932:2004 を基に、フローチャートを作成した。
10. 確認試験として、溶血性試験の必要性について議論し、ISO 法では溶血性試験が行われているが、食品検体を対象とする場合、溶血性試験は必要ないとされた。
11. バチルス・チューリングゲンシス (クリスタルトキシン産生菌) における典型集落の判定は、クリスタルトキシンの観察による判定であり、確認試験にクリスタル染色を入れるべきとの意見が出た。
12. 有益微生物と有害微生物の区別が必要であるなど、試験の目的によりクリスタルトキシン染色の実施の有無は判断されるべきである。
13. グラム染色のみで芽胞が確認されるのではという意見が出たが、実施する者の熟練度によるため、芽胞染色を行えば確実である。
14. 選択分離・典型コロニーの確認方法について、作業部会で ST2 として検討を行う。
15. 黄色ブドウ球菌試験法の時と同様に、検出限界又は基準値を決定すべきであるとの意見が出た。
16. 試料の調整におけるストマッカー処理に関して、「1~2 分間攪拌混合」を「30 秒~1 分間攪拌混合」に訂正する。
17. フローチャート中の「1ml+滅菌希釈水 9ml」および「10 倍段階希釈試料水」の記述を

削除し、「希釈する場合は、10倍階段希釈する」旨を追記する。

18. フローチャート中の「試料液 1ml+MYP 寒天培地 (3枚×2) 塗抹」を「試料液 1ml を MYP 寒天培地 (3枚) に塗抹を 2セット」と訂正する。
19. この記述と「試料希釈水 0.1mL 及び階段希釈水を MYP 寒天培地 (2枚) に塗抹」を並列にして記述する。
20. ISO の原文では 140mm シャーレと大きいサイズを用いているが、日本では一般的に 90mm シャーレを用いているため、試料液 1ml を 3枚の寒天培地に塗抹する際に、乾かす時間が必要である。
21. 確認試験における分離培養は非選択培地で行うべきであるという意見がでた。
22. 「…他の日本での入手可能な選択培地の有効性評価を行った。」を、「…他の日本での入手可能な選択培地の有効性評価を行う予定である。」に訂正する。
23. 記述された TSA、MYP、PEMBA、NGKG、X-BC、及び CBC 培地は、国内で入手可能であるので、作業部会では、これらの培地を用いて検証を行う。
24. 夾雑菌の抑制剤として、MYP ではポリミキシン B とマンニット、PEMBA ではポリミキシン B とピルビン酸、NGKG ではポリミキシン B とフェノールレッドであるが、酵素基質培地である X-BC および CBC に含有される抑制剤は不明である。
25. フローチャートを修正したものを ST1 の原案として採択し、次回以降は ST2 の検討を行う。
26. ST2 では、マンニット分解性、卵黄反応、レシチナーゼ反応性、溶血性等に関して検討する。

ウェルシュ菌試験法：定性法 (NIHSJ-29-ST1)

27. 伊藤委員より、ウェルシュ菌試験法の定性法 ST1 案について説明があった。
28. 前回の検討委員会では ISO 7937 から定量法を起こしたため、ISO で使用している確認培地 (LS、LG、及び NM 培地) の検証を行った。
29. 定性法は新たに作成することとなったため、ウェルシュ菌の確認培地の検討を行った後、プロトコルを起こして定性法の ST1 原案とする。
30. 定量試験は混釈法であるが、定性試験では増菌培養後に表面塗抹法を用い検証を行った。
31. ISO 7937 で使用している確認培地での性状を確認したところ、LS 培地において、ガス産生は確認されたが、黒変色は認められなかった。
32. ガス産生量によっては、細いサイズのダーラム管を用いる必要があると推測された。
33. 定性試験における分離用培地の検討では、TSC 寒天培地において、卵黄の添加有無により、判定の易しさが大きく異なった。
34. 国内ではウェルシュ菌以外の夾雑菌を抑制するカナマイシン (KM) を加えるのが一般的であるが、KM 添加は避けたほうが良いと考えられ、KM 主体の確認培地を見直す必要がある。
35. カンピロバクター試験法の検討結果から、増菌培養と分離培養の抗生物質は異なるものを使用した方が良いと思われる。

36. CW 培地では、夾雑菌の抑制が弱いため、欧米ではシクロセリンが使用されている。
37. 検証を実施したが、集落が小さく判定および釣菌が困難であったことから、添加量等も含め、さらなる検討が必要である。
38. 作業部会で引き続き検討を行い、次回の検討委員会で ST1 原案の提案と検討を行う。

セレウス菌セレウリド試験法 (NIHSJ-26-ST3)

39. セレウス菌セレウリド試験法の ST3 案については、次回以降に検討する。

食品からの微生物標準試験法作成方針の見直しについて

40. 食品からの微生物標準試験法の試験法検討案作成方針について、一度確認を行う必要がある。
41. 各ステージで、「文書にて第三者組織の意見を求める。」旨の記述があるが、web で公開しており、文書である必要性はなくなっている。
42. 現場の実用性を加味するために、何らかの記述をした方がよいとの意見が出た。
43. 試験法の検討結果をパブリケーションしたデータもしくは共同研究したデータも公開するべきと意見も出た。
44. 今後、作成方針の内容や公開方法などについて作業部会で議論を行い提案する。
45. 次回以降の検討委員会で、再度議論を行うこととした。

リステリア・モノサイトゲネス試験法通知 12 月 24 日付

46. NIHSJ 法が、11 月 28 日付で検疫所向けに通知され、12 月 24 日付で一般向けに通知された。
47. 定性法の一部をスクリーニング法として、頭書きで追記された。

各作業部会の進行状況

48. バリデーション作業部会担当として松岡委員より、微生物試験法のバリデーションガイドラインの原案が提出された。
49. 衛生指標菌に関する検討は、次回以降に行う予定である。

事務連絡その他

50. 次回の検討委員会は、まだ確定していませんが 5 月か 6 月以降を予定しています。

以上

食品中の微生物試験及びその妥当性評価に関する研究

分担研究報告書

セレウス菌標準試験法に関する研究

分担研究者	荻原 博和	日本大学生物資源科学部
研究協力者	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：セレウス菌 (*Bacillus cereus*) はグラム陽性の芽胞を形成する細菌で、土壌や河川水などの自然環境に広く分布している。環境に分布する本菌は、農作物や食材等にも広く汚染が認められており、食品への汚染の機会も多いことが知られている。衛生的な取り扱いがなされなかった際には、食品を腐敗・変敗させ、最悪の場合には食中毒を引き起こす可能性もある。原因食品としては、米飯食品のチャーハン、ピラフ、焼き飯等が主要であることが報告されている。現在、わが国ではセレウス菌の試験法については複数の試験法が存在しているが、これらの試験法では国際的に調和がはかられていない現状がある。これらの現状を改善するために「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、日本で使用される試験法が国際的に科学的な根拠や信頼性がある標準試験法の策定を進めている。

本研究では、その一環として国際的に用いられているセレウス菌の試験法を比較検討し、国内での標準的試験法を制定するにあたって必要となる事項について検討した。本年度はセレウス菌の標準試験法として ISO (International Organization for Standardization) が定める国際規格の方法を中心に検討し、その過程において問題点と進行の進め方について明らかにした。

A. 研究目的

国際的な方法として ISO が定める国際規格の方法が代表的なものであり、他に米国 FDA の公定法 (Bacteriological Analytical Manual; BAM 法) 等がある。わが国では厚生労働省監修の食品衛生検査指針が利用されている。

現在、国内ではセレウス菌の標準的な試験法は制定されておらず、本研究班において国

際的な試験法と互換性のある標準的な試験法として ISO 7932:2004 INTERNATIONAL STANDARDS を中心に他の試験法も参考に検討を行うこととした。

本年度は各試験法の比較を行うために、各方法の比較表の作成を行い、問題点や評価点を探究し、最も適切な試験法の検討を行うこととした。最終的には ISO を基準に適応する

際の問題点や方法のフローチャートを作成し、検討を行った。

B. 研究方法

(1) 各種試験法の比較検討

INTERNATIONAL STANDARD

① ISO 7932 : 2004, 「Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30 °C」

② ISO 21871 : 2006, 「Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* – Most probable number technique and detection method」

③ Food and Drug Administration (FDA) の BAM 法 : *Bacillus cereus*, 2001; updated 2012, 「Bacteriological Analytical Manual Chapter 14 *Bacillus cereus*」

国際的な3方法と国内で利用されている厚生労働省監修の食品衛生検査指針・微生物編「10 セレウス菌」について検討し、各それぞれの概略を記載した比較表を作成し、比較検討した。

(2) セレウス菌試験法プロトコールの作成

食品からの微生物標準試験法検討委員会、第48回検討委員会に提出した比較表を審議された報告を受け、ISO 7932 : 2004 の試験法を検討していくこととなった。そのため ISO 7932 : 2004 のセレウス菌試験法のプロトコールを作成した。

第51回検討委員会の試験法委員会においてセレウス菌試験法のプロトコールの提案を行った。

(3) 検討培地の入手と収集

セレウス菌試験法の検出の際に最も重要な検出培地について文献等より情報を検討し、

今後の検討のために日本において入手できる *B.cereus* 選択培地の収集を行った。

C. 結果及び考察

(1) ISO 7932 : 2004, ISO 21871 : 2006 , FDA の BAM 2012 法の比較検討

ISO 7932 : 2004, ISO 21871 : 2006 , FDA の BAM 2012 法と食品衛生検査指針について検討し、各試験法の概略表を作成した。(Table 1, 2)。

Table 1 はセレウス菌試験法の平板試験法の概略を記載したものである。

ここでは ISO 7932 : 2004 法、FDA の BAM 2012 法、食品衛生検査指針(2014)法を記載した。相違点を各項目別にみると検体の採取量がそれぞれ異なっている。選択培地では ISO 7932 : 2004 法が MYP 培地、BAM 法では MYP 培地と BAKARA 培地、検査指針法では MYP 培地、PEMBA 培地、NGKG 培地が用いられており、培養条件は検査指針法が 32°C で他が 30°C である。集落判定もそれぞれ異なるがレンチナーゼ反応が主体で発色剤により集落の色合いが異なる傾向が認められる。各培地の確認試験はそれぞれ特徴があり ISO 7932 : 2004 法では溶血反応を、BAM 法や検査指針法では比較的多くの性状で確認を行っている。

Table 2 はセレウス菌試験法の最確数法の概略を記載したものである。

ここでは ISO 21871 : 2006 法、BAM 2012 法、食品衛生検査指針法 (2014) を記載した。ISO 21871 : 2006 法が前述の平板法と異なるものの、他の2方法は平板法と同様に記載されている方法である。

相違点は平板法とほぼ同様で、検体の採取量、増菌培養、培養条件である温度、選択培地、集落判定、確認試験等が異なる。特に ISO 21871 : 2006 法では MYP 培地のみでなく PEMBA 培地が追加され、培養温度も 37°C で

違いがみられる。各培地の確認試験は ISO 21871 : 2006 法では溶血反応を、BAM 法や検査指針法では比較的多くの性状で確認を行っている。

これらのセレウス菌概略表 (Table 1, 2) を食品からの微生物標準試験法検討委員会、第 48 回検討委員会に提案した結果、最確数法の ISO 21871 : 2006 法ではなく、平板計測法である ISO 7932 : 2004 法の試験法を中心に進めていくことになった。

委員会の結果を踏まえ、次に ISO 7932 : 2004 法のセレウス菌試験法のプロトコールの作成を行った (図 1)。

このプロトコールは、ISO 7932 : 2004 法をベースに作成したものである。内容としては、検体をストマッカーで 10 倍乳剤とした試料液を MYP 寒天培地で 30°C、18~24 時間培養し、発育した提携集落 (ピンクで大きく、マンニト非分解、卵黄反応陽性の集落を計測するもので、5 個の集落を純粋分離後、羊血液寒天培地で溶血反応を確認して、最終的に集落数を確定するものである。

このプロトコールは第 51 回検討委員会の試験法委員会に提出し、セレウス菌試験法のプロトコールとして提案を行った。審議の結果、確認試験の際には必要に応じてクリスタルトキシンの非産生を確認することを追加して、ISO 7932 : 2004 法のセレウス菌試験法を中心に試験法の検討を行うこととなった。

今後、試験法の検討を行うに当たり、ISO 7932 : 2004 法、ISO 21871 : 2006 法、BAM 法や関連学会の文献から、セレウス菌の試験法で使用される選択培地の調査を行った。現在、日本において入手可能な培地について図 2 に示した。

D. 結論

国際的に互換性のある食品からのセレウス

菌試験法として ISO 7932 : 2004 を基礎とする標準試験法案を作成した。現在、日本で入手可能な選択培地を収集し、次年度は作成したプロトコールに準じてセレウス菌試験法の評価を行う予定である。

E. 健康危機情報

なし

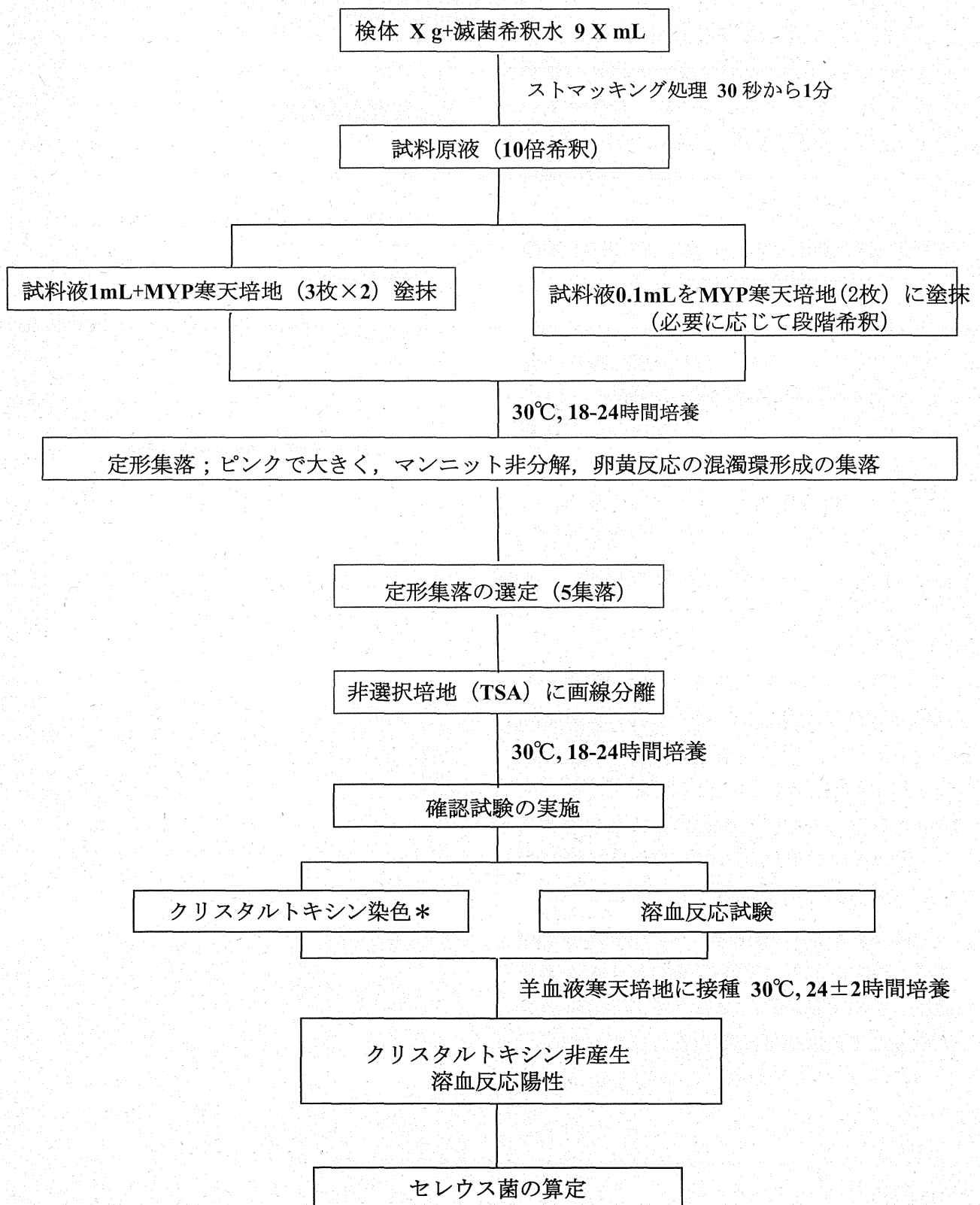
F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図1 セレウス菌標準試験法（集落計数法）のフローチャート



* : 別途参照

図2 セレウス菌標準試験法 選択培地の検討

セレウス菌標準試験法の選択培地の検討

ISO7932：2004では卵黄を添加したMYP培地が用いられている。他の検査法では卵黄添加選択培地にはPEMBA培地とNGKG培地があり、さらに新しく開発された培地には酵素基質培地を利用したXBC培地とCBC培地が市販されている。

そこで作業部会としては、ISO7932に使用されているMYP培地を中心に以下の培地について選択培地の有効性評価を行う予定である。

非選択培地

TSA培地 (TSA ; Trypticase soy agar, BD社)

卵黄添加培地

MYP培地 (MYP ; Mannitol egg york polymyxin agar, Merck社製)

PEMBA培地 (PEM ; Bacillus cereus selective agar, OXOID社製)

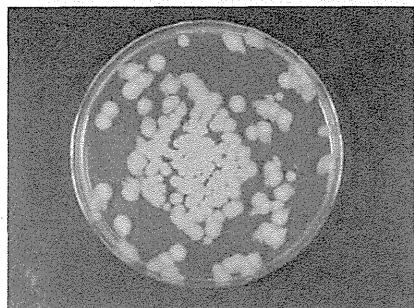
NGKG培地 (NGK ; NaCl Glycine Kim and Goepfert寒天培地, 日水社製)

酵素基質培地

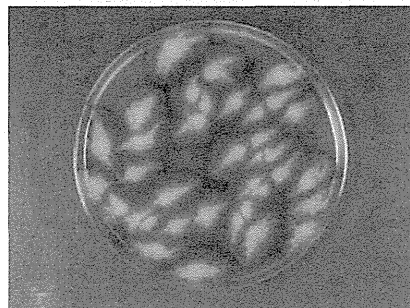
XBC培地 (XBC ; X-BC寒天培地, 日水社製)

CBC培地 (CBC ; CHROMagar B.cereus, CHROMagar社製)

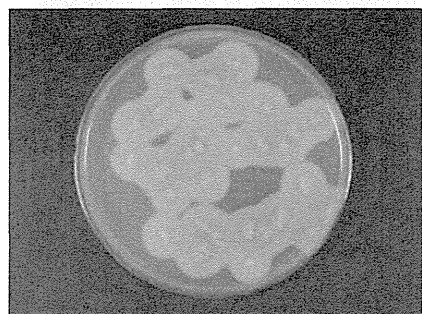
Bacillus cereus ATCC 33019 発育結果



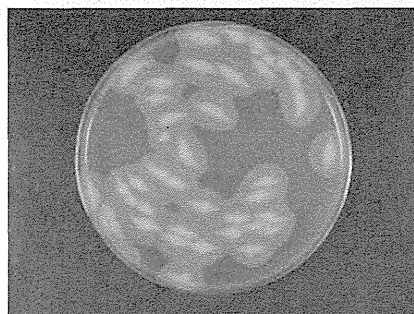
TSA



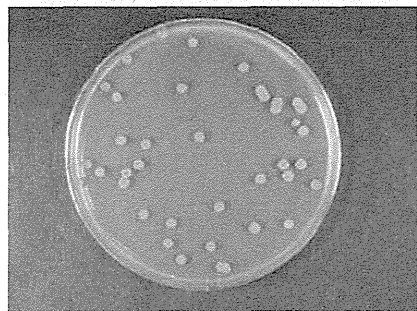
PEMBA培地



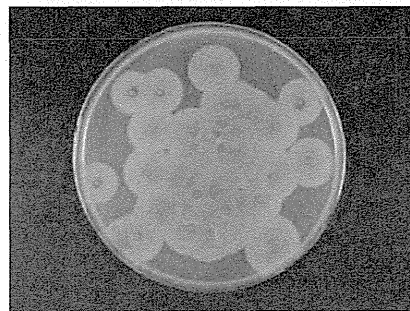
MYP培地



NGKG培地



XBC培地



CBC培地

No.1

Table 1 *Bacillus cereus* 試験法の比較: 平板法

	ISO (ISO 7932:2004)	FDA (BAM:2012)	食品衛生検査指針(2014)
試験液の調製	検体 X g / mL + 9 × X / mL (TS or BPW)	検体50g+450mL (BPD)	検体10 or 25 g + 90 or 225 mL (リン酸緩衝液 or 生理食塩水)
選択培地	MYP (0.1mL, 2 plates) or (1.0mL to 3 plates ; duplicate) (1.0mL, 2 plates ; duplicate, 140mm petri dish)	MYP or BAKARA (0.1mL, 2plates)	NGKG, MYP, PEMBA (0.1mL, 2 plates)
培養条件	30°C, 18~24 (48)h	30°C, 18~24h	32°C, 24~48h
集落判定	MYP : レシチナーゼ反応陽性・ピンク色集落	MYP : レシチナーゼ反応陽性・ピンク色集落	非マンニト分解、レシチナーゼ反応陽性
	疑わしい集落5個釣菌	疑わしい集落5個又はそれ以上釣菌	灰色~暗灰色ワックス状集落
確認試験	・Sheep Blood Agarによる溶血性試験	<ul style="list-style-type: none"> ・嫌気条件下でのグルコースからの酸産生 ・亜硝酸塩の還元試験 ・VP試験 ・チロシン分解能 ・リゾチーム存在下での発育 ・MYPでの発育 	・集落をかき取ってレシチナーゼ反応を確認
試験期間	1~4日程度	1~4日程度	1~2日程度

TS : Tryptone Salt
 BPW : Buffered Peptone Water
 BPD : Butterfield's Phosphate Diluent Water

MYP: Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar
 NGKG: NaCl-Glycine-Kim and Goopfet Agar
 PEMBA: Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol Blue Agar

Table 2 *Bacillus cereus* 試験法の比較：最確数法

	ISO (ISO21871:2006)	FDA (BAM : 2012)	食品衛生検査指針 (2014)
試験液の調製	検体 X g/mL + 9 × X mL (TS or BPW)	検体50 g + 450 mL (BPW)	検体10 or 25 g + 90 or 225 mL (リン酸緩衝液 or 生理食塩水)
増菌培養 (希釈段階)	Tryptone Soya Polymyxin Broth : 10mL (3 tubes double-strength), 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength) (10 ⁰ , 10 ⁻¹ , 10 ⁻²)	Trypticase Soy-Polymyxin Broth : 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength), (10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³)	Trypticase Soy-Polymyxin Broth : 10mL (3 tubes double-strength), 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength), 1mL (3 tubes single-strength), (10 ⁰ , 10 ⁻¹ , 10 ⁻²)
培養条件	30°C, 48±4h	30°C±2°C, 48±2h	32°C, 24± h
選択分離培地 培養条件	PEMBA に画線, 37°C, で18~24h培養 MYPに画線, 30°Cで18-24h培養	MYP or BAKARAに画線, 30°C, 18~24h培養	NGKG, MYP, PEMBAに画線, 32°C, 24~48h 培養
集落判定	PEMBA : レシチナーゼ反応陽性・光沢のある 青色~青緑色集落	MYP : レシチナーゼ反応陽性・ピンク色集落	非マンニット分解, レシチナーゼ反応陽性,
	MYP : レシチナーゼ反応陽性・ピンク色集落	BAKARA : ピンク・ピンク-オレンジ色集落集落	
	疑わしい集落3個鈎菌	疑わしい集落5個又はそれ以上鈎菌	
確認試験	PEMBA : ・Sheep Blood Agarによる溶血性試験 ・鏡検 MYP : ・Sheep Blood Agar による溶血性試験	・嫌気条件下でのグルコースからの酸産生 ・亜硝酸塩の還元試験 ・VP試験 ・チロシン分解能 ・リゾチーム存在下での発育 ・MYPでの発育	・鏡検, 空胞形成 ・カタラーゼ産生能 ・VP試験 ・嫌気条件下での発育能 ・pH5.7での発育能
試験期間	2~4日程度	2~5日程度	2~5日程度

TS : Tryptone Salt
BPW : Buffered Peptone Water
BPD : Butterfield's phosphate diluent water
TSPB : Tryptone soya polymyxin broth

PEMBA : Polymyxin pyruvate egg yolk mannitol bromothymol blue agar
MYP : Mannitol egg yolk polymyxin agar
NGKG:NaCl-Glycine-Kim and Goopfet Agar

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Yersinia の標準試験法に関する研究

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	第三室長
研究協力者	百瀬愛佳	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	主任研究官
	吉田麻利江	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部	
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部	
	石塚理恵	東京都健康安全研究センター微生物部	

研究要旨

食品媒介感染症としてのエルシニアには *Yersinia enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種が挙げられる。本菌による人の感染症は下痢、腹痛、発熱等を主な症状とし、食中毒事例の原因食品としては乳製品や加熱不十分な食肉等が挙げられている。現在日本国内では、食品から本菌を検出するための告示法、通知法等が定められていないため、国際的な試験法と互換性のある、食品からエルシニアを分離するための標準試験法を策定する必要がある。本研究では、エルシニア標準試験法検討のステージ 1 として、現在海外で用いられている標準的な本菌の試験方法及び食品衛生検査指針（2004 年）に記載された方法の比較検討を行い、「食品からの標準試験法検討委員会」において討議した。その結果、ISO 10273：2003 法を中心にステージ 1 としての検討を行うことを決定した。

A. 研究目的

Yersinia 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、ペストの原因菌である *Yersinia pestis* を発見した Yersin にちなんで命名された。*Yersinia* 属の中で人に病原性を示すのは *Y. pestis* の他、*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の 2 菌種であり、これらは食品による媒介が知られている。食品媒介エルシニア症の原因食品としては、生あるいは加熱不十分な豚肉や乳製品、本菌を保有するげっ歯類の糞便等に汚染された水等が知られている。本菌は、4℃

以下でも増殖が可能な低温増殖菌であり、冷蔵庫内で保存している食品内で増殖する可能性がある。エルシニア症の集団事例は、北米、EU 諸国、中東、オーストラリア等世界各国で報告されており、日本国内でも発生が知られている。本菌の国際的な標準試験法としては、International Standard Organization (ISO) が定める定性的試験法 (ISO 10273：2003) と、アメリカ合衆国の Food and Drug Administration (FDA) による BAM 法 (2007 年)、同じく米国の USDA FSIS の試験法 (1998 年) がある。現在、国内では本菌の公的試験法は

制定されておらず、2004年に発行された食品衛生検査指針において独自の方法が紹介されている。本研究では、食品からエルシニアを分離するための、国際的な試験法と互換性のある標準試験法を策定することを目的として、国際的標準試験法に関する情報を収集し、それらの比較検討を行い、

B. 研究方法

1) 国際的試験法と食品衛生検査指針(2004)の比較検討

ISO 10273:2003とBAM法(2007年)、USDA FSISの試験法(1998年)について、概要を翻訳した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーショナル作業部会」による用語集に則って行った。食品衛生検査指針(2004)の方法を含めた4つの試験法に関して、増菌培養の温度及び時間、使用培地等についてその内容を比較検討し、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」においてステージ1の提案を行った。

C. 研究結果

1) 国際的試験法と食品衛生検査指針(2004)の比較検討

図1~4に、ISO 10273:2003(以下ISO法)とBAM法(2007年)、USDA FSISの試験法(1998年、以下USDA法)及び食品衛生検査指針(2004)の方法(以下検査指針)についての概要を示した。また、各試験法で使用される培地を表1に示した。各試験法の試験対象は、ISO法が食品及び動物用飼料、検査指針が食品・環境ふき取り・水・糞便、USDA法が食肉及び食鳥肉製品であった。BAM法は対象

を規定していなかった。希釈水は、BAM法と検査指針ではPhosphate Buffered Saline(PBS)を、USDA法では0.01M PBSを、ISO法ではPeptone Sorbitol Bile salts broth(PSBB)を用いていた。増菌培養前の選択分離培養は、BAM法と検査指針で行われていた。増菌培養はBAM法が10°C10日、USDA法が希釈水をITCブロスに接種して25°C2日間培養するもの、希釈水上清をTSBに接種して25°C24時間培養後に、更にBOSに接種して25°C3日間培養する2段階増菌、及び希釈水の残りを4°C14日間培養する3通りの増菌培養を用いていた。ISO法では希釈水をITCブロスに接種し25°C48時間培養と、希釈水を22~25°C2~3日振盪培養(あるいは5日間静置培養)する2通りの増菌培養を用いていた。検査指針の方法では、希釈水を4~9°Cで3~4週間培養し、1週間ごとにその一部をアルカリ処理して分離培養を行う低温培養法を用いていた。いずれの試験方法でも、検体希釈液或いは増菌培養液について、アルカリ処理を行うものを行わないものの両方を選択分離培養に用いることとされていた。選択分離培地はBAM法がCefsulodin, Irgasan and novobiocin(CIN)寒天培地とマッコンキー寒天培地を、USDA法がCIN寒天培地と*Salmonella/Shigella* agar with sodium desoxycholate and calcium chloride(SSDC)培地を、ISO法がCIN寒天培地とSSDC培地を、検査指針がIN寒天培地(CIN寒天培地からCefsulodinを除いたもの)及びエスクリン加IN寒天培地を用いていた。選択分離培地の培養時間は、BAM法が30°C1-2日、USDA法がSSDC培地の培養温度が30°C24時間、CIN培地が32°C18時間であった。ISO法はCIN培地、SSDC培地共に30°C24~48時間、検査指針で

は IN 培地とエスクリン加 IN 培地の双方で 30℃24 時間の培養時間であった。確認試験については、4 つの試験法すべてで尿素分解性を確認することとしていた。それ以外には、BAM 法では Lysine arginine iron agar (LAIA) 斜面培地を用いてリジン及びアルギニンの脱炭酸性状、ガス非産生、硫化水素非産生を確認すると共に、Bile esculin agar を用いてエスクリン非分解の確認を行うものであった。USDA 法では、シモンズクエン酸培地を用いてクエン酸陰性を、クリグラー鉄寒天を用いてブドウ糖の発酵とガス及び硫化水素の非産生を確認するとされていた。ISO 法ではクリグラー鉄寒天を用いると共に、オキシダーゼ陰性を確認することとなっていた。検査指針の方法では、グラム染色、オキシダーゼ陰性、オルニチン及びラムノースの分解を確認することとしていた。

各試験法での、分離培養で定型集落を得るまでの最長所要時間は、BAM 法が 11~12 日間、USDA 法が 15 日間、ISO 法が 7 日間、検査指針の方法が 4 週間 1 日であった。

D. 考察

国際的に整合性のある食品からの *Yersinia* 試験法を策定するに当たり、3 種の国際的な標準試験方法と国内で用いられている食品衛生検査指針の方法の比較検討を行った。現時点で、海外で用いられている標準的試験方法である ISO 法、BAM 法及び USDA 法では試験法の対象菌を *Y. enterocolitica* に限定していた。一方、食品衛生検査指針の方法は *Y. enterocolitica* に加え *Y. pseudotuberculosis* も検出する試験法となっていた。しかしながら、各試験法とも低温増殖性という *Yersinia* の特性を生かした

増菌培養法を採用していることもあり、定型集落を得るまでの所用時間が最も短い ISO 法で 1 週間、最も長い検査指針の方法では 4 週間以上と、一般的な微生物試験と比較して大変長時間を要するものであった。これらの試験方法は、夾雑菌や非病原性エルシニアが多く存在する検体から病原性エルシニアを分離するために必要な方法であり、食中毒発生時の原因食品の同定等には、長期間の低温増菌が必須となると思われる。一方、本菌による食中毒の原因食品として乳製品や豚肉が多く挙げられていることから、本菌試験法がそれらの食品に対して実施される可能性が高く、品質保持期限とのかかわりからも、日常的な食品の微生物試験においては、所用時間が比較的短い試験方法が望ましいと思われた。そのため、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」の討議を経て、最も所要時間の短かった ISO 法を基礎として、ステージ 2 の検討を実施する結論となった。ただし、低温増菌培養の時間が短い本方法で夾雑菌の多い食肉検体等からの本菌の分離が確実にできるか否かを、食肉への添加回収試験により確認することが望ましく、次年度に実行することとなった。また、ISO 法で使用されている培地には現在国内で一般的に流通していないものがあり、国内で入手可能な培地との比較検討も必要であると思われた。

E. 結論

国際的標準試験法と互換性のある食品からの *Yersinia* 試験法として、今回検討した中で最も所要時間が短かった ISO 10273 : 2003 を基礎とした標準試験法案を作成・検討することとなった。次年度は、現在国内で通常販売されていない ISO10273 : 2003 での使