

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品微生物試験法の国際調和に関する研究

分担研究報告書

衛生指標菌試験法作成並びに標準試験法改訂に関する研究

研究代表者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
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
研究協力者	五十君静信	東京農業大学	
	大嶋 秀克	公益財団法人	日本乳業技術協会
	小久保 彌太郎	公益社団法人	日本食品衛生協会
	小高 秀正	コダカマイクロバイオロジーアンドサイエンス	
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター	
	鈴木 穂高	茨城大学	
	下島 優香子	東京都健康安全研究センター	
	福田 理恵	東京都健康安全研究センター	
	森田 加奈	東京都健康安全研究センター	
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター	
	土屋 禎	一般財団法人	日本食品分析センター
	廣田 雅光	一般財団法人	日本食品検査
	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

## 研究要旨

衛生指標菌は様々な食品の製造工程管理や成分規格に採用されており、わが国では主に細菌数及び大腸菌群が用いられている。一方、国際的には食肉（製品）、乳（乳製品）等の製造工程管理や成分規格等に腸内細菌科菌群が多く採用される現状を踏まえ、衛生指標菌作業部会を開催し、わが国の衛生指標に関する議論を行い、乳・乳製品の製造工程管理には細菌数及び腸内細菌科菌群を、成分規格には細菌数のほか、大腸菌または腸内細菌科菌群を設定することが国際整合性及び実行性を踏まえた形として望ましいとの意見で集約された。これを受け、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、腸内細菌科菌群定性試験法 NIHSJ-15 を ISO 21528-1:2017 に基づく改訂を行い、国際調和を図った。また、同委員会では、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法を討議し、直接的な糞便汚染指標である大腸菌の試験法をフィルターろ過の必要性の有無により分類して検討を行うこととなったほか、これまでに作定されたサルモネラ属菌試験法（NIHSJ-01）及びカンピロバクター試験法（NIHSJ-02）について、国際調和と実行可能性の向上に資する形とするべく、ISO 法改訂に応じた見直しを行った。

### A. 研究目的

現在、日本国内では、乳および乳製品、冷

凍食品等多くの食品種の微生物汚染指標に

大腸菌群が設定されている。ここでいう大腸

菌群とは、「乳糖を分解して酸とガスを産生する、好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞形成の桿菌群」を指し、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* 属等の *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科菌群) に属する菌が多く含まれる。一方、大腸菌群には、腸内細菌科菌群に属さない *Aeromonas* 属等も含まれており、微生物学上の分類とは必ずしも一致しない側面がある。

現在、EU をはじめとする諸外国の多くでは、食肉や乳製品等の製造工程管理に腸内細菌科菌群が糞便汚染指標として採用され、検体数や合格基準等を定めたサンプリングプランを設定し、運用している状況にある。腸内細菌科菌群は、「プロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱エンテロバクター目に属し、通性嫌気性でブドウ糖を発酵してガスと酸を産生するグラム陰性桿菌」と定義づけられることから、分類学との整合も併せ持っている。

食品の国際間流通が加速化を呈する現状においては、国内における食品の衛生指標に関しても、国際調和を踏まえた形とすることが必要不可欠な状況にあると思われる。そのため、本研究では、国内における、衛生指標の考え方並びに試験法等に関する検討を行うこととし、衛生指標菌作業部会、バリデーション作業部会等を開催し、意見を集約した上で、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において議題として提起を行い、食品微生物学専門家の意見として取り纏めることとしたので、報告する。

## B. 研究方法

### 1) 衛生指標菌の設定及び試験法に係る検討

現在、わが国では、乳等省令に基づき、細

菌数と大腸菌群を乳及び乳製品の微生物成分規格として設定されている。一方、その科学的妥当性と国際整合性については定かではない。これらの点を鑑みて、衛生指標菌作業部会を開催し、今後食品中の衛生指標として用い得る試験項目について討議した。

### 2) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法の検討

ミネラルウォーター類の微生物規格については、世界保健機関の飲料水水質ガイドラインや水道法とは異なる指標菌が対象として運用されている。この点に係る整合性を科学的観点から検討するため、ミネラルウォーター類における大腸菌試験法について衛生指標菌作業部会で検討を行い、検討委員会で試験法の討議を行うこととした。

### 3) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1-ST4:2009 (サルモネラ属菌定性試験法) と本試験法を基に発出されるサルモネラ属菌の通知試験法(食安発0729第4号) では、使用する緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water, BPW) の pH に差異がみられることを探知し、その整合に向けてバリデーション作業部会を開催した上で、検討委員会に改定案を提起することとした。

### 4) カンピロバクター試験法の改訂

NIHJS-2-ST4:2012 (カンピロバクター試験法) で示される増菌培地の添加剤成分としてはシクロヘキシミド (抗真菌剤) が用いられているが、その発癌毒性を踏まえ、本年度に入り、国内での同培地の入手が不可能な状況となった状況を探知した。そこで、ISO 法の改訂状況を確認すると共に、国内での実施

体制の確保に向けた試験法整備を行うため、改訂案を作成し、検討委員会で討議を行うこととした。

## C. 研究結果

### 1) 乳及び乳製品の衛生指標に関する検討

衛生指標菌作業部会を開催し、EU における乳・乳製品の食品分類ごとに設定される衛生指標菌試験項目及び試験内容を確認し、整理を行った(表1)。その上で、乳及び乳製品に係る微生物規格基準に関して、(1)製造工程管理にあたっては、加熱殺菌後の工程において、細菌数及び腸内細菌科菌群を採用することが国際整合上、有用との意見で集約された。また、(2)製品の規格としては、細菌数に加え、腸内細菌科菌群もしくはβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌(いわゆる衛生指標としての大腸菌)の何れかを採用することが望ましい、(3)チーズ等の乳製品の成分規格としてリステリア・モノサイトゲネスを設定する国もあるが、製造工程管理にリステリア属菌を指標菌としてモニタリングする動きもある、等の意見が出された。

各衛生指標菌試験の実行可能性を考慮するため、国際的な第三者認証を取得している簡易法を含めて整理を行った。判定に要する時間について、簡易法では確認試験が省略されていることが試験開始翌日に判定できる背景にあることを確認した。

### 2) 腸内細菌科菌群試験法の改訂

上項の議論を通じ、腸内細菌科菌群試験法については速やかな確認と検討を行う必要性が提起されたことから、次に衛生指標菌作業部会において、関連する ISO 法最新文書を入手し、内容を確認した。結果として、同試

験法は 2017 年に(1)EE 培地による二次増菌の削除、並びに(2)確認試験で用いる培地の変更(グルコース寒天培地からグルコース OF 培地)が行われている状況を確認した。これらの変更点は実行可能性を高める利点があると考えられたこと、更に国際整合をより高める点も鑑みて、第 68 回検討委員会において、NIHSJ-15 法改定案を提案し、討議を経て、同委員会の承認を得た。その後、NIHSJ-15:2019 として改訂版を作成した。なお、本試験法の詳細については版權を考慮し、非公開とした。

更に、同委員会ではこれまで ISO 法改訂に伴う変更・改訂作業については定義がなされていなかったことから、本委員会における、ISO 法見直しに伴う NIHSJ 法改訂の基本方針を定めることとした。その概要は以下のとおりである。

#### 【基本方針】

ISO 法見直しが major revision である場合  
・前増菌、増菌及び選択分離培養における培養温度、培養時間及び使用培地の変更等は原則として major revision とする。但し、同等性が既出の科学論文等で確認可能な場合には、minor revision として差し支えない。

・その場合、NIHSJ 法と改訂 ISO 法について、現在成分規格が設定されている食品及び将来的に設定されうる食品について、標準菌株を用いた添加回収試験(病原菌の場合)又は自然汚染食品を用いた試験(衛生指標菌の場合)を 1 試験所で実施し、得られた成績を検討委員会に提出することとする。

・ISO/TC34 より、改訂時の評価成績等を入手可能な場合には、検討委員会で評価を行う際の資料として活用できるものとする。

ISO 法改訂が minor revision の場合

・確認試験における使用培地の変更、前増菌、増菌及び選択分離培養における従来の使用培地組成の一部の変更等は minor revision とする。

・その場合、当該培地を用いた際に国内分離株数株によって典型的な性状が得られることの確認を 1 試験所で評価し、その成績を検討委員会に提出する。

・ISO/TC34 より、改訂時の評価成績等を入手可能な場合には、検討委員会で評価を行う際の資料として活用できるものとする。

改訂後の試験法名について

・改訂を行った試験法については、試験法名の最後尾に改訂年を追記する。

・新たに作成した試験法についても、作成年を最後尾に付記することとする。

### 3) ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法に関する検討

平成 30 年 2 月 27 日に開催された、厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会では、「食品製造用水」及び「清涼飲料水（ミネラルウォーター類のうち殺菌又は除菌を行うもの）」に関する微生物規格について議論が行われ、世界保健機構が発出した飲料水水質ガイドライン（Guidelines for drinking water quality, fourth edition, [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_guidelines/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/)）に基づき、上水については特定酵素基質培地を用いた大腸菌定性試験法が厚生労働省令第 101 号で定められていることを踏まえ、国際・国内での整合を図る意味合いから、大腸菌を微生物規格の対象指標菌とすべきとの提言がなされ

た。一方、同試験法については別途検討することとなった。こうした背景を踏まえ、本研究班では第 36 回バリデーション作業部会で試験法の検討を行う上の留意点を整理した上で、第 67 回検討委員会を開催し、同法について討議を行った。

検討の結果、ミネラルウォーター類の衛生指標菌の試験法としては、前処理に用いるフィルターろ過が可能なもの（すなわち固形成分等によるフィルター目詰まりや通過障害等が生じないもの）を適用範囲として、ISO 9308-1:2014（メンブランフィルターを用いた大腸菌試験法）に準拠した試験法を NIHSJ-30-ST1 として、水道法試験法（厚生労働省令 101 号）に準拠した試験法を NIHSJ-31-ST1 としてそれぞれ検討を行うこととし、承認された（表 3）。

### 4) サルモネラ属菌標準試験法の改訂

NIHSJ-1: 2009（サルモネラ属菌定性試験法）では、希釈水である緩衝ペプトン水（Buffered peptone water, BPW）の pH が  $7.2 \pm 0.2$  とされている。一方で、本試験法に基づいて発出されたサルモネラ属菌試験法（食安発 0729 第 4 号「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」）で示される BPW の pH は  $7.0 \pm 0.2$  とされている状況を探知した。ISO 文書を確認したところ、ISO 6579: 2002 (Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.)、ISO 6887-1: 1999 及び 2017 (General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilution) で用いられる BPW はいずれも pH  $7.0 \pm 0.2$  と記載されている状況を探知した。

上記の背景を受け、国際調和の観点から、

NIHJS-1 に記載される BPW の pH を  $7.0 \pm 0.2$  と変更することを第 36 回バリデーション作業部会及び第 67 回検討委員会に提案し、変更履歴及びその理由を末尾に示す形で、NIHSJ-01: 2018 とすることについて承認を受け、その内容を検討委員会ホームページ上に掲載することとした（別添 1）。

#### 5) カンピロバクター試験法の改訂

NIHJS-2-ST4:2012（カンピロバクター定性試験法）では、プレストン培地添加成分としてシクロヘキシミド（抗真菌剤）が用いられていたが、その発癌毒性を踏まえ、ISO 法では代替としてアンフォテリシン B が採用されている状況が生じ、これに応じた形で培地製造事業者もシクロヘキシミドを含む増菌培地の国内供給が本年度停止されたことを受けて、NIHSJ 法に基づく試験実施体制の確保を目的として、ISO 法の変更内容を確認・整理した上で、検討委員会へ改定案を提起した。文献検索を通じ、両添加剤は食品及び水からのカンピロバクター検出能力が同等であることを示す報告内容を確認した（Lett Appl Microbiol. 2002;34(2):124-9.）また、製造事業者に照会を行い、今後もシクロヘキシミドを含む増菌培地の供給体制を確保できる予定がない状況を確認した。

これらの状況を踏まえ、NIHSJ-2 で培地添加剤に含まれるシクロヘキシミドの代替として、アンフォテリシン B が使用可能となるよう NIHSJ-2 改訂案を第 36 回バリデーション作業部会に提案し、了承を得た。その後、第 67 回検討委員会での討議を経て了承を受け、変更履歴を末尾に示す形で NIHSJ-02: 2018 として、検討委員会ホームページ上に掲載することとした（別添 2）。

#### D. 考察

本研究では、ISO 法を基とした国際調和のとれた試験法の整備に主眼を置き、食品毎の衛生指標菌設定の現状を把握した上で、乳・乳製品を対象とした場合の衛生指標菌の設定に関する意見を、製造関係者を含めた専門家から構成される衛生指標菌作業部会において議論し、製造工程管理と製品の規格の 2 点において、それぞれの試験項目案の作成に至った。また、実行可能性からは簡易法の適用箇所についても探索を行う必要性が提起された。

また、ミネラルウォーター類の試験法として、新たに NIHSJ-30-ST1 及び 31-ST1 を設け、ISO 9308-1:2014 及び水道法試験法に準拠して検討を行うこととした。ST1 案の了承を受けたことから、次年度以降には、作業部会で ST2 案を作成し、添加回収試験等を通じた試験成績の妥当性評価を通じ、試験法を確定させる予定である。

加えて、本委員会では、国際調和と実行性の向上に資するため、これ迄に作成された標準試験法のうち、サルモネラ属菌、カンピロバクター及び腸内細菌科菌群試験法の改訂を行った。本委員会では国際整合性を踏まえ、主として ISO 法に準拠した試験法の作成・検討にあたっているが、これまで ISO 法見直しにあわせた NIHSJ 法改訂の在り方については議論がなされていない状況であった。本年度の活動として、その方針を定めることができたことは今後の国際情勢に合わせた速やかな検討を進める上で有意義と解される。次年度以降も、こうした観点から重要性・緊急性に応じた形で、標準試験法の改訂や作成にあたる予定である。具体例として、現在公定法で採用されている、リステリア・モノサイ

トゲネス試験法は本年度にISO法が改訂され、判定時間が短縮されたとの情報を得ており、今後、同様の見直し作業を速やかに実施する一候補となるものと考えられる。また、カンピロバクター試験法については現在定性法のみが定められているが、近年の国際動向としては、同菌のリスク評価・管理に定量成績の創出が求められているところであることから、ISO法を基とした新たな定量試験法の作成についても本委員会が行うべき課題と思われる。

#### **E. 結論**

本研究では、「食品からの標準試験法検討委員会」のNIHSJ法改訂の基本方針を作成すると共に、腸内細菌科菌群（NIHSJ-15）、サルモネラ属菌（NIHSJ-1）及びカンピロバクター（NIHSJ-2）の標準試験法を改訂し、実行可能性と国際整合性の向上を図った。また、乳の製造工程基準及び成分規格に関する意見集約を行うと共に、ミネラルウォーター類の衛生指標菌試験法案 NIHSJ-30-ST1 及び NIHSJ-31-ST1 を作成・提起した。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

1) 朝倉宏・食品微生物試験法の国際調和・平成30年度食品薬品安全センター食品衛生精度管理セミナー・2018年6月29日・東京・

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1-1. 乳・乳製品に対して EU で設定される微生物成分規格概要

( 出典 : COMMISSION REGULATION (EU) No 365/2010 of 28 April 2010 amending Regulation (EC) No 2073/2005 )

食品分類	対象微生物等	サンプリングプラン†		基準値	試験法	適用箇所
		n	c	M		
生乳または不十分な加熱処理乳より製造されたチーズ、バター及びクリーム	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
粉乳およびホエイパウダー	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
アイスクリーム( 製造工程もしくは製品の組成によってサルモネラのリスクを排除できるものを除く )	サルモネラ属菌	5	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
チーズ、粉乳、ホエイパウダー	黄色ブドウ球菌エンテロトキシン	5	0	不検出/ 25g	European screening method *1	販売時
調製粉乳及び乾燥食品*2	サルモネラ属菌	30	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
フォローアップミルク	サルモネラ属菌	30	0	陰性/ 25g	EN/ISO 6579	販売時
調製粉乳および乾燥食品*2	クロノバクタ 属菌	30	0	陰性/ 10g	ISO/TS 22964	販売時

\*1 Community reference laboratory for coagulase positive staphylococci. European screening method for the detection of staphylococcal enterotoxins in milk and milk products.

\*2 6 ヶ月未満の乳児のための特定医療目的のもの

† n = 検体数、c = ロットの合格基準、基準値 m と M の間の数値を示す検体数。

【補足】ロットから n 個のサンプルを抜き取ったとき、

- 1) 菌数が m を超える不良品がなければ当該ロットは合格。
- 2) 菌数が m ~ M の不良品が c 個以下なら、条件付き合格。
- 3) 菌数が M を超える不良品がある場合は、不合格。

表 1-2. 乳・乳製品に対して EU で設定される微生物基準の概要

食品分類	対象微生物等	サンプリングプラン		基準値		試験法	適用箇所	逸脱時の措置
		n	c	m	M			
低温殺菌乳及び乳飲料	腸内細菌科菌群	5	0	10 cfu/ ml		ISO 21528-2	最終製品	加熱殺菌工程、殺菌後二次汚染予防措置、原材料微生物学的品質等確認
加熱殺菌乳・ホエイより製造されたチーズ	<i>E. coli</i>	5	2	100 cfu/ g	1,000 cfu/ g	ISO 16649-1/2	最高汚染想定箇所	製造工程管理及び原料選択による改善措置
生乳より製造されたチーズ	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 <sup>4</sup> cfu/ g	10 <sup>5</sup> cfu/ g	EN/ISO 6888-2	最高汚染想定箇所	製造工程管理及び原料選択による改善措置を実施し、10 <sup>5</sup> cfu/ g を超えるロットはエンテロトキシンの検査も実施
低温/高温殺菌乳及びホエイより製造されたフレッシュチーズ	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	EN/ISO6888-1/2	最終製品	製造工程管理改善措置を経ても、10 <sup>5</sup> cfu/ g を超えたロットはエンテロトキシン検査を実施
生乳/不十分な加熱処理乳より製造されたバター・クリーム	<i>E. coli</i>	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	ISO 16649-1/2	最終製品	製造工程管理及び原料選択による改善措置
粉乳及びホエイパウダー	腸内細菌科菌群	5	0	10 cfu/ g		ISO 21528-2	最終製品	加熱殺菌工程と再汚染予防措置の確認
	コアグラージェ陽性 staphylococci	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	EN/ISO6888-1/2	最終製品	製造工程管理改善措置を経ても、10 <sup>5</sup> cfu/ g を超えたロットはエンテロトキシン検査を実施
アイスクリーム及び乳を含む氷菓	腸内細菌科菌群	5	2	10 cfu/ g	100 cfu/ g	ISO 21528-2	最終製品	製造工程管理の改善
調製粉乳及び乾燥食品*	腸内細菌科菌群	10	0	陰性/ 10g		ISO 21528-1	最終製品	製造工程管理の改善



フォローアップミルク	腸内細菌科菌群	5	0	陰性/ 10g		ISO 21528-1	最終製品	製造工程管理の改善
調製粉乳及び乾燥食品*	推定セレウス菌	5	1	50 cfu/ g	500 cfu/ g	EN/ISO 7932	最終製品	製造工程管理の改善、再汚染予防策、原材料の確認

\* 6ヶ月未満の乳児のための特定医療目的のもの。

表2. 乳・乳製品に対する衛生指標菌試験法の概要

対象	試験法	培養温度	検出感度	最短所要時間・日数 (陰性判定時)	最長所要時間・日数 (陽性判定時)
細菌数	公定法	32	10 個/mL	2 日	2 日
	ISO 法 ( ISO 4833-1 )	30	10 個/mL	3 日	3 日
	簡易法	30/32	1 個/mL	1 ~ 2 日	2 ~ 3 日
大腸菌群	公定法	35	1 個/2.22mL	48 時間	6 日
	簡易法	35	1 個/mL	24 時間	24 時間
	ISO 法 ( ISO 4832 )	30/37	10 個/mL	24 時間	3 日
腸内細菌科菌群	生食用食肉通知法	37	1 個/mL	24 時間	3 日
	ISO 法 ( ISO 21528-1 )	37	1 個/10mL	48 時間	4 日
	簡易法	37	1 個/mL	24 時間	24 時間
大腸菌	糞便系大腸菌群 ( E.coli ) 試験法	44.5	1 個/3mL	24 時間	7 日
	ISO 法 ( ISO 16649-2 )	44	1 個/mL	24 時間	24 時間
	簡易法	44	1 個/mL	24 時間	24 時間

注記：ここでいう簡易法とは、特定の簡易迅速キット製品を指すものではないが、国際的な第三者認証機関の認証を受けた、国内で入手可能な代表製品の情報を基に、総合的に勘案して示した内容となっている。なお、使用可能な製品例については、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」ホームページ上に掲載しているので適宜参照されたい。また、対象とする指標菌のうち、大腸菌群については、公定法と ISO 法及び簡易法の間で定義が異なること、同様に大腸菌については国内外で定義が異なることに留意が必要である。

表3. ミネラルウォーター類における大腸菌（群）試験法に関する比較対象表

日数	公定法 (清涼飲料水の大腸菌群試験法)	ISO 9308-1:2014 (大腸菌試験法)	厚生労働省令 101 号 (上水の大腸菌試験法)	
1	試料原液 10mL 及び 1mL、10 倍希釈液 1mL を BTB 加乳糖ブイヨン発酵管に接種	試料原液又は希釈液 100 mL をメンブランフィルターでろ過	試料原液 100 mL	
		フィルターを CCA 培地に設置	特定酵素基質培地に添加	
	35 ± 1 で最大 48 ± 3 時間培養	36 ± 2 で 21 ± 3 時間培養	36 ± 2 で 26 ± 2 時間培養	
2		ピンク～赤色集落は大腸菌群と判定	濃青～紫色集落は大腸菌陽性と判定	蛍光発色に基づく、定性判定
3	ガス産生の確認			
	陽性試験管から EMB 培地に接種	ガス産生 ( - ) なら陰性		
	35 ± 1 24 時間			
4	定型集落 (なければ 2 個以上の非定型集落) を釣菌			
	乳糖ブイヨン発酵管に接種	普通寒天培地に塗抹		
	35 ± 1 / 48 ± 3 時間培養	35 ± 1 / 48 ± 3 時間培養		
5				
6	ガス産生の確認	グラム染色		
	ガス産生をみた場合、陽性判定	グラム陰性無芽胞桿菌があれば、陽性判定		

別添 1 . サルモネラ属菌試験法

## サルモネラ属菌標準試験法

NIHSJ-01: 2019

## サルモネラ試験法

NIHSJ-01:2019

### 1. はじめに

本試験法で述べるサルモネラ属菌とは、以下の試験法で *Salmonella* spp. と同定されたものとする。

### 2. 試験法の概要

試験試料 25 g をストマッキング袋等に無菌的にとりわけ、緩衝ペプトン水 (BPW) 225 mL を加え、ストマッカーなどで均質化し、培養する。その培養液の一部を RV (Rappaport-Vassiliadis) 培地と TT (Tetrathionate) 培地で選択増菌培養後、2 種類の分離寒天培地 (硫化水素産生性で検出する培地と硫化水素産生性に関係なくサルモネラを検出する培地、それぞれ 1 種類) に塗抹培養し、集落の形成を観察する。サルモネラと疑われる集落 3 個を TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地および LIM (Lysine Indole Motility) 培地に接種し、生化学的性状の確認を行う。さらに、抗 O 血清による凝集反応により O 抗原の血清型別を実施してサルモネラ属菌と確定する。

### 3. 使用器具、装置

滅菌ハサミ  
滅菌ピンセット  
滅菌装置  
ストマッカー  
ストマッキング袋  
三角フラスコ  
自動秤量分注装置または秤量器  
pH 計  
滅菌ピペットまたはマイクロピペットと滅菌チップ  
メスシリンダー  
小試験管  
中試験管  
試験管立て  
白金耳  
高圧蒸気滅菌器 (滅菌のインジケーター必要)  
乾熱滅菌器 (滅菌のインジケーター)  
恒温槽または恒温水槽 (37 ±1 と 42.0 ±0.5 の制御)  
滅菌シャーレ

### 4. 培地、試薬および抗血清

前増菌用培地緩衝ペプトン水 (BPW) ISO 処方 : 加温溶解後、121 で 15 分間滅菌する。

選択増菌用培地

Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地 : 加温溶解後、10 mL ずつ中試験管に分注し、115 、15 分間滅菌す

る。作製後は冷蔵庫で数週間保存可能。

Tetrathionate (TT) 培地：沸騰まで加温混和後、45℃以下に冷却する。ヨウ素溶液 20 mL を培地 1 L に加え、よく攪拌する。さらに攪拌しながら、10 mL ずつ滅菌中試験管に分注する。TT 基礎培地は作製後冷蔵庫で保存可能であるが、ヨウ素溶液添加後には作製当日に使用すること。

#### 分離寒天培地

硫化水素の産生により判定する培地：MLCB、DHL と XLD から 1 種類。使用説明書に従って作製する。  
硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地：BGS(プリリアントグリーン+スルファピリジン)、CHS(クロモアガーサルモネラ)、ES II (ES サルモネラ寒天培地 II) , SM2 から 1 種類。使用説明書に従って作製する。

#### 確認用培地

TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層斜面とする。

LIM (Lysine Indole Motility) 培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層に固める。

#### O 群別確認血清

サルモネラ免疫血清 O 多価、O1 多価および O 群血清

#### 生化学的性状確認培地と試薬等

シモンズクエン酸ナトリウム培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、斜面とする。

VP 半流動培地：加温溶解後、小試験管に分注、121℃で 15 分間滅菌し、高層に固める。

#### インドール試薬

#### VP 用試薬

#### チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙

#### ONPG ディスク

## 5. 試験手順

### 1) 前増菌培養

BPW を約 37℃となるよう温めておく。

試料 25 g に BPW225 mL を加え、1 分間ストマッカー処理する。

37℃、22±2 時間前増菌培養する。

### 2) 選択増菌培養

RV 培地および TT 培地を約 42℃となるように温めておく。

BPW で前培養した培養液 0.1 mL を RV 培地 10 mL に接種する。

BPW で前培養した培養液 1 mL を TT 培地 10 mL に接種する。

接種した RV 及び TT 培地を 42℃、22±2 時間培養する。

### 3) 選択分離培養

培養後の RV および TT 培地をよく攪拌する。

1 白金耳量を、以下の(ア)硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地および(イ)硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹する。

(ア) 硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地 (1 種類選択)

I. MLCB

II. DHL

III. XLD

(イ) 硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地（1種類選択）

I. BGS（ブリリアントグリーン＋スルファピリジン）

II. CHS（クロモアガーサルモネラ）

III. ESII（ESサルモネラ寒天培地II）

IV. SM2（chromID Salmonella Agar）

接種した培地を 37℃、22±2 時間培養する。

注意：サルモネラを釣菌する際、集落の色については、硫化水素により判定する培地では黒色集落をサルモネラと推定し、硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する培地の BGS では無色透明で培地色が赤色になったもの、CHS では藤色、ESII ではピンクそして SM2 ではピンクをサルモネラと推定する。分離用寒天培地上でのサルモネラ集落の色についてはあらかじめ検証後に試験に使用すること。

#### 4) 確認培養

各分離寒天培地に形成された定型集落（各培地の上記注意を参照）を 3 個ずつ釣菌して、TSI 寒天培地と LIM 培地に接種する。

TSI 寒天培地には白金線で高層に穿刺し、斜面に塗抹する。

LIM 培地は高層に穿刺する。

接種した培地は 37℃、22±2 時間培養する。

培養後、以下の結果が得られたものは定型的サルモネラの性状である。

(ア) TSI 寒天培地：高層部黄変・黒変・ガス産生（高層部における気泡または亀裂の発生）および斜面部が鮮やかに赤変したもの。

(イ) LIM 培地：培地全体が紫変（リジン陽性）、運動性陽性、

上記性状確認後にインドール反応を検討する。サルモネラはインドール反応陰性（色の变化無し）、定型的なサルモネラの性状と確認された菌株は、5) に示す O 抗原の血清学的試験を行い、サルモネラであることの確定および O 抗原群について決定する。

サルモネラには、硫化水素非産生性、運動性の弱いもの、リジン陰性といった非定型的性状を示すものがあり、また、市販の O 血清に凝集の弱い O 群型別不能のサルモネラも知られている。

- により、サルモネラの確認は可能であると考えるが、定型的性状を示さない場合は 6) に示す生化学的性状試験も検討し、サルモネラの確認をする。

#### 5) O 血清群別

サルモネラと疑われ釣菌された菌株についてサルモネラ免疫血清を用いたスライド凝集法による O 血清群別試験を TSI 寒天培地斜面上から菌を採取して実施する。

(ア) O 多価血清および O1 多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が見られた O 群血清を用いて当該菌の O 群を決定する。

(イ) サルモネラの定型的な生化学的性状を示したにもかかわらず、いずれの血清にも凝集が認められないときは O 群型別不能とする。

#### 6) 生化学的性状

非定型的サルモネラが疑われるときは（ア）～（エ）に示した生化学的性状を実施する。  
同定キットの使用も可とする。

（ア） オキシダーゼ試験：チトクロームオキシダーゼ試験用紙に菌を塗布して1分間以内に深青色になれば陽性とする。

（イ） クエン酸：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、37℃、22±2時間培養する。  
培地が深青色になれば陽性とする。

（ウ） VP:VP 半流動培地に菌を穿刺し、37℃、22±2時間培養後、VP 用試薬 A,B を滴下する。  
陽性の時は数分後に試薬が赤色となる。1時間後も赤色とならなければ陰性とする。

（エ） ONPG：ONPG ディスク1枚を小試験管にとり、滅菌精製水1mLを加える。  
新鮮培養菌を1白金耳接種し、混和後37℃、18-24時間培養し、液色で判定する

（早いものは1-2時間で判定可能）。液色が黄色となったものを陽性とする。液色が変化しないものは陰性である。

注意：サルモネラはオキシダーゼ陰性、クエン酸陽性、VP 陰性、ONPG 陰性である。

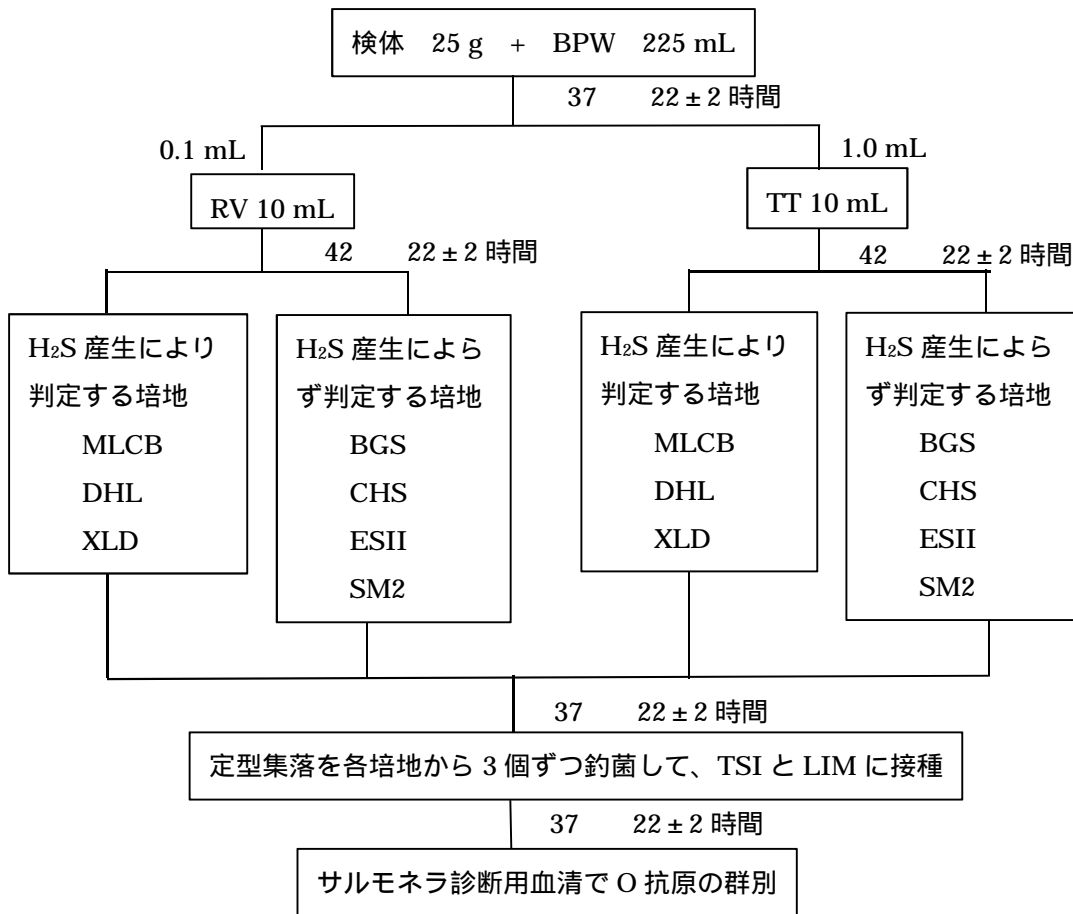
#### 7) 試験成績の結果表示

以上の試験によりサルモネラの検出された場合は、“陽性 / 25 g”と記載する。

検出されなかった場合は、“陰性 / 25 g”と記載する。

6. フローチャート

サルモネラ試験法





## 7. 培地組成（参考例）および作製方法

緩衝ペプトン水 (Buffered peptone water: BPW) ISO 処方

組成：1,000 mL あたり

カゼイン酵素分解産物	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
リン酸水素二ナトリウム (12 水和物)	9.0 g
精製水	1,000 mL

\* オートクレーブ滅菌 121 、15 分間、pH 7.0±0.2

ラパポート - バシリアディス液体培地

(Rappaport-Vassiliadis: RV)

組成：1,000 mL あたり

ソイペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸二水素カリウム (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.4 g
リン酸水素二ナトリウム (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.2 g
塩化マグネシウム六水和物 (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	40.0 g
マラカイトグリーン	0.04 g
精製水	1,000 mL

\* オートクレーブ滅菌 115 、15 分間、pH 5.2±0.2

テトラチオネート液体培地 (Tetrathionate USA: TT)

組成：1,000 mL あたり

カゼインペプトン	2.5 g
肉ペプトン	2.5 g
胆汁酸塩	1.0 g
炭酸カルシウム	10.0 g
チオ硫酸ナトリウム	30.0 g
精製水	1,000 mL

pH 8.0±0.2

\* 煮沸するまで混和加熱する。この液体培地は 4 で数週間保存可能である。

この溶液を 45 以下に冷却後、1,000 mL に対して下記に示すヨウ素溶液 20 mL を添加した後、混和する。よく混和しながら、10 mL ずつ滅菌した試験管に分注する。

ヨウ素溶液を添加した後は直ちに使用する。

ヨウ素溶液組成

ヨウ素	6.0 g
ヨウ化カリウム	5.0 g
精製水	20.0 mL

硫化水素産生により判定する分離寒天平板培地

## MLCB

組成：1,000 mL あたり

酵母エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
ハートエキス末	2.0 g
塩化ナトリウム	4.0 g
マンニット	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム	4.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
クリスタルバイオレット	0.01 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 6.8±0.2

\* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

## DHL

組成：1,000 mL あたり

肉エキス	3.0 g
ペプトン	20.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	2.3 g
クエン酸ナトリウム	1.0 g
クエン酸鉄アンモニウム	1.0 g
中性紅	0.03 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4±0.2

\* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

## XLD

組成：1,000 mL あたり

酵母エキス	3.0 g
L-リジン塩酸塩	5.0 g
キシロース	3.75 g
乳糖	7.5 g
白糖	7.5 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g

チオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸第二鉄アンモニウム	0.8 g
フェノールレッド	0.08 g
寒天	12.5 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4 ±0.2

\* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

#### 硫化水素産生によらずサルモネラ判定する分離寒天平板培地

BGS

BGA (ブリリアントグリーン寒天培地)

組成：1,000 mL あたり

プロテオース ペプトン	10.0 g
酵母エキス	3.0 g
乳糖	10.0 g
白糖	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
フェノールレッド	0.08 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
寒天	12.0 g
精製水	1,000 mL

pH 6.9 ±0.2

\* 上記 BGA をオートクレーブ滅菌 121、15 分間後、液温を約 70 に下げ、その温度に保って、下記のスルファピリジン溶液を添加し、混和する。

培地の温度が 60 以下の場合では、結晶が析出するので注意する。

混和後、溶液温度を 60 前後に冷却し、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

#### スルファピリジン溶液の作製方法

ジメチルホルムアミド 2 mL にスルファピリジン 1 g を加えて溶解する。

CHS (クロモアガーサルモネラ)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
塩化ナトリウム	0.8 g
その他塩類	7.2 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.6±0.2

\* 加温溶解後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

ESII (ES サルモネラ寒天培地 II)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
マンニット	15.0 g
中性紅	0.03 g
合成酵素基質	0.45 g
ノボビオシン	0.02 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.4±0.2

\* オートクレーブ滅菌 121 、15 分間滅菌後、シャーレに約 20 mL ずつ分注し平板とする。

SM2 (chromID Salmonella Agar)

組成：1,000 mL あたり

ペプトン	6.25 g
トリス	0.16 g
乳糖	6.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
発色基質混合物	0.03 g
塩化ナトリウム	5.0 g
選択剤混合物	0.03 g
寒天	14.0 g
精製水	1,000 mL

pH 7.3±0.2

\* 組成は上記の通りだが、生培地以外では販売していない。

TSI、LIM、インドール試薬や生化学的性状試験に使用する試薬についてはサルモネラ確認にのみ用いるものではないので、製品情報に従って作製し、用いること。

7. 改訂の履歴

日付	項目	内容
2009年2月18日	初版発行	-
2009年6月23日	文言の一部修正	「0血清型別」を「0血清群別」に修正した
2009年10月14日	培養温度の変更	・35±1 で培養していた箇所を 37±1 へと変更した(ISO法への合流)。

<p>2019年2月25日</p>	<p>緩衝ペプトン水の pH の変更、及び文言の一部修正</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・緩衝ペプトン水の pH を <math>7.2 \pm 0.2</math> から <math>7.0 \pm 0.2</math> へ変更した (ISO 法への合流)。</li> <li>・下記の文言等を修正した。</li> <li>【2. はじめに】</li> <li>「集落の産生を検討」 「集落の形成を観察」</li> <li>【4. 培地、試薬および抗血清、 選択増菌用培地、Tetrathionate (TT) 培地】</li> <li>「40 以下」 「45 以下」</li> <li>【5. 試験手順、4)確認培養及び6. フローチャート】</li> <li>「定型的集落」 「定型集落」</li> </ul>
-------------------	----------------------------------	---

別添 2 . カンピロバクター試験法

## カンピロバクター試験法 ( 定性法 )

NIHSJ-02: 2019

## カンピロバクター・ジェジュニ/コリ標準試験法

NIHSJ-02: 2019

### はじめに

本試験法でいうカンピロバクター・ジェジュニ/コリは、ISO 10272-1:2006 で述べる選択分離培地上で微好気培養を行った場合、25 では集落を形成せず、 $42 \pm 1$  で特徴的な集落を形成する細菌で、運動性を持ち、ISO 10272-1:2006 で述べる生化学的性状と一致するものをいう。

### 1. 試験の概要

本試験は、試料中にカンピロバクター・ジェジュニ/コリが存在するかを、選択増菌培地にて増菌させた後、選択分離培地上に画線塗抹し、形成されたカンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を確認することによって判定する定性試験法である。試料を 25 g 秤量し、プレストン増菌培地 100 ml を加えて均質化し、微好気培養により増菌した後、その 1 白金耳量を各 1 枚ずつ 2 種類の選択分離培地に塗抹、微好気培養し、カンピロバクター・ジェジュニ/コリの集落を形成させる。選択分離培地として、mCCDA 培地ならびに第二選択分離培地<sup>1</sup>の 2 種類を用いる。選択分離培地上に形成された疑わしい集落は、純培養を行った後、生化学性状を確認し同定する。

### 2. 使用機器、器具

乾熱滅菌器、オートクレーブ

ふらん器 ( $37 \pm 1$ 、 $42 \pm 1$ ) この場合は市販の微好気用ガスケットを利用する  
または微好気培養のできるふらん器 ( $37 \pm 1$ 、 $42 \pm 1$ ) を用いる。

寒天平板用乾燥器あるいはふらん器 (25 ~ 50 )

pH メーター

天秤

メスシリンダー

除菌フィルター (0.22  $\mu$ m)

ストマッカー、ストマッカー袋

ハサミ、ピンセット

試験管、試験管立て

三角フラスコ

滅菌シャーレ (直径 85 ~ 100mm)

パスツールピペット、滅菌ピペット

白金耳、白金線、ガラス棒

<sup>1</sup> 第二選択分離培地: その試験法において共通に用いる、培地組成が明示された選択分離培地 (ここでは mCCDA 培地を指す) に追加することによって、当該微生物の分離を補助する効果が期待できると思われる選択分離培地。試験所または試験者が選択メカニズムなどの相違を考慮し選択することができる。

#### 4. 試験手順

##### 1) 増菌培養法

###### 試料調製

試料 25 g をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー袋に入れ、100 ml のプレストン増菌培地を加え、1 分間ストマッキング処理を行う。

###### 増菌培養

微好気条件下にて  $42 \pm 1$  にて 24 ~ 48 時間培養する。

##### 2) 微好気培養方法

微好気条件は、下記の方法によって実現する。

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を使用する。微好気条件とは、酸素  $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス  $10 \pm 3\%$ 、残りはチッ素を基本とする。水素を添加する場合には、酸素  $5 \pm 2\%$ 、二酸化炭素ガス  $10 \pm 3\%$ 、水素 10% 以下、残りはチッ素とする。

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。

##### 3) 選択分離培養

選択分離培地に、24 時間後と 48 時間後の増菌培養液を画線塗抹し、 $42 \pm 1$  にて 24 ~ 48 時間微好気培養する。選択分離培地は、mCCDA 培地および第二選択分離培地の 2 種類を用いる（第二選択分離培地の例：バツラー寒天培地、スキロー寒天培地、プレストン寒天培地、カルマリー寒天培地など）。培養液は油層を出来る限り避けて採取し、選択分離培地に塗抹する。

##### 4) 確認試験

###### 集落の観察および採取

選択分離培地上に発育した集落のうち、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと思われる集落を各平板につき 1 個を釣菌し、鑑別同定を行う。判定の結果カンピロバクター・ジェジュニ/コリでなかった場合は、4 個の集落について鑑別同定を行う。鑑別同定を行う集落は、非選択寒天培地に継代し、純培養を行う。 $37 \pm 1$  で  $22 \pm 2$  時間微好気培養する。

グラム染色などによる菌形の確認：ラセン状のグラム陰性桿菌（球状 [コッコイド] の場合もある）

###### カタラーゼ試験

単離集落の 1 白金耳量をスライドガラス上に取り、3% 過酸化水素水 1 滴を滴下する。30 秒以内に気泡の発生が確認された場合、カタラーゼ反応陽性と判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。

###### オキシダーゼ試験

白金耳、白金線またはガラス棒を用いて単離集落の一部を取り、オキシダーゼ試薬を含ませたる紙または市販のオキシダーゼ試験用紙の上に塗抹する。なお、ニクロム線を用いて塗抹してはならない。10 秒以内の紙が暗色化した場合、オキシダーゼ反応陽性と判定する。また、市販のオキシダーゼ試験用紙を使用する場合は製造業者の使用説明書に従って判定する。カンピロバクター・ジェジュニ/コリは陽性である。判定に迷う場合は、必要に応じて以下を追加して行う。

## ラテックス凝集テスト

市販のラテックス凝集試験用キットを使用し、製造業者の使用説明書に従って判定する。

### TSI 培地などで生化学性状試験

菌種を決定する場合は、以下を追加して行う。

馬尿酸塩加水分解試験 (*C. jejuni* [ + ] *C. coli* [ - ])

インドキシル酢酸塩加水分解陽性 (*C. jejuni* [ + ] *C. coli* [ + ])

PCR 法によるジェジュニ/コリの判別

## 5. 培地および試薬

### プレストン増菌培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121 にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25 でのpHが $7.5 \pm 0.2$ となるよう調整する。ウマ溶血液、および選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加して使用する。

基礎組成: 1,000 ml あたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
メタ重亜硫酸ナトリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	0.25 g
精製水	940 ml

\* 獣肉ペプトンなど

血液添加量: 基礎培地 1,000 ml あたり

馬無菌溶血液	50 ml
--------	-------

選択剤組成: 基礎培地 1,000 ml あたり

ポリミキシシン B	5,000 IU
リファンピシン	10 mg
トリメトプリム乳酸塩	10 mg
アンホテリシン B	10 mg
95%エタノール	10 ml

### mCCDA 培地

基礎培地の各成分または乾燥培地を加温溶解し、121 にて15分間高圧蒸気滅菌を行う。必要であれば、滅菌後に25 でのpHが $7.4 \pm 0.2$ となるよう調整する。フィルター滅菌した選択剤を、高圧蒸気滅菌後の基礎培地に添加し、寒天平板として使用する。

基礎培地組成: 1,000 ml あたり

肉エキス	10 g
動物組織の酵素消化物*	10 g
塩化ナトリウム	5 g
活性炭	4 g



カゼインの酵素消化物**	3 g
デオキシコール酸ナトリウム	1 g
硫酸鉄( ) (硫酸第一鉄)	0.25 g
ピルビン酸ナトリウム	0.25 g
寒天	8 ~ 18 g***
精製水	1,000 ml

\* 獣肉ペプトンなど

\*\* カゼインペプトンなど

\*\*\* 寒天のゲル強度による

選択剤組成: 基礎培地 1,000 ml あたり

セフォペラゾン	32 mg
アンホテリシン B	10 mg
精製水	5 ml

(参考文献 : ISO 10272-1:2006)

#### オキシダーゼ試薬

用事調整して使用する。市販のオキシダーゼ試験用紙を用いても良い。

<i>N,N,N',N'</i> -テトラメチル- <i>p</i> -フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド	1 g
精製水	100 ml

#### 6. 改訂の履歴

日付	項目	内容 (改訂理由)
2012年7月31日	初版発行	-
2019年2月25日	プレストン増菌培地及び mCCDA 寒天培地に加える 添加剤の変更	プレストン増菌培地及び mCCDA 寒天培地 1L 当たりシクロヘキシミド 100 mg からアンホテリシン B 10mg へ変更 (ISO 法への合流, 及びシクロヘキシミド含有添加剤の国内販売停止)

