

IV. そ の 他 の 成 果 物

と畜場 HACCP システムの妥当性検証試験

令和元年度 実施依頼プロトコール <牛・豚>

平成 30 年の食品衛生法を改正する法律の施行で、食肉や食鳥事業を含めた食品事業のすべてに、HACCP あるいは HACCP の考え方に基づく衛生管理法の導入が義務付けられた。HACCP システムには、導入したシステムが、科学的妥当性を持って運行されているのかを検証し、不十分であれば、システムを見直す工程も含まれている。往々にして HACCP 導入に至ったことで、その妥当性を検証する試験を実施せず、従ってシステムの健全性の維持や改善を一定の基準でもって行うことを放置する傾向がある。厚生労働省は、食肉処理場および大規模食鳥処理場における HACCP システムの妥当性を検証する上で必要となる科学的な手法を国際基準に則った形で開発確立し、牛、豚、および鶏肉の更なる安全性を担保するために厚生労働科学研究を遂行している。

と畜場に導入された HACCP システムが科学的妥当性を持って運行されているのかを検証することは非常に重要となる。欧米では、HACCP 妥当性検証試験の方法が確立され、HACCP システム運用状況を科学的にモニタリングしている。国内でも、対米（および EU）輸出を行う施設においては、SPS 協定に基づき、各国で実施されている HACCP 妥当性検証試験を踏襲した「内部検証」と「外部検証」が実施されている（図 1）。すなわち、対米施設では、冷蔵庫に搬入後 12 時間以上経過した枝肉について内部検証として大腸菌検査を、外部検証として食肉衛生検査所によるサルモネラ検査（加えて外部検証として洗浄前の枝肉のゼロトレランスの検証）をそれぞれ実施している。

対 EU 施設では冷蔵庫に搬入される前の枝肉について、内部検証として一般生菌数、腸内細菌科菌群、サルモネラ検査を、外部検証として最終洗浄前の枝肉の衛生検査を実施している。

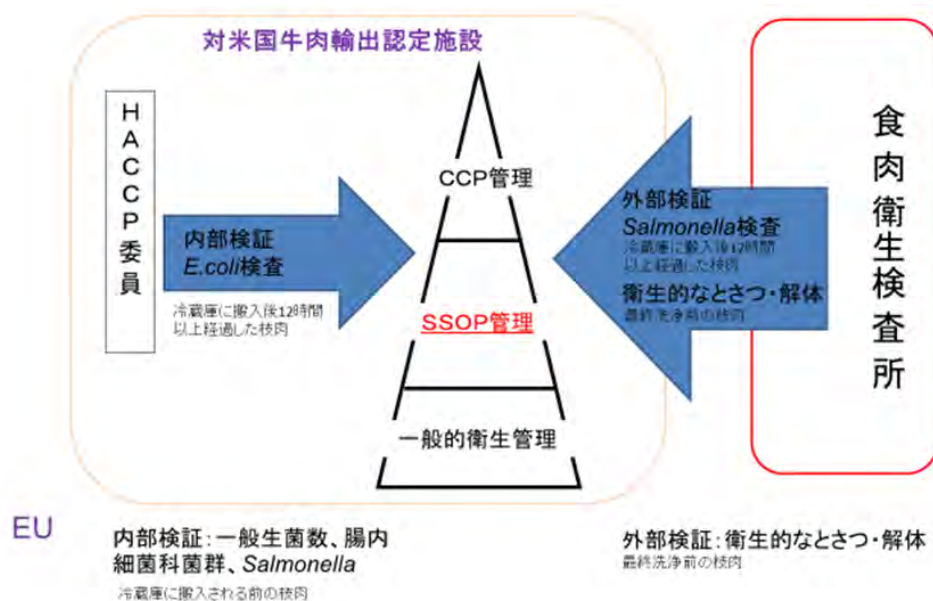


図 1. 米国・EU に食肉を輸出する食肉処理施設が参考にすべき内部及び外部検証法

EU ではと畜場に導入された HACCP システムについて外部検証として細菌検査が実施され、HACCP システムの妥当性を担保するとともに、基準値との比較から、HACCP の監視や改良の指針を提供している。以下に EU の食肉・食鳥処理工程における HACCP システム妥当性検証プロトコール実施で得られる細菌数の基準値を示す。

検証にあたっての適正範囲			
牛：一般生菌数	m=	3.5 log cfu/cm ²	M= 5.0 log cfu/cm ²
腸内細菌科菌群数	m=	1.5 log cfu/cm ²	M= 2.5 log cfu/cm ²
豚：一般生菌数	m=	4.0 log cfu/cm ²	M= 5.0 log cfu/cm ²

腸内細菌科菌群数 $m = 2.0 \log \text{cfu/cm}^2$ $M = 3.0 \log \text{cfu/cm}^2$

m : 基準値

M : 条件付き合格と判定する基準となる菌数限度、それ以上の菌数は不許可とする。

基準値を越えた場合には再検査を行う。不許可レベル以上の細菌数を示した場合、HACCP システムの見直しと改善を行った上で、再検証を行う。

平成 29 年度の本厚生労働科学研究の成績は、「食肉を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究」の表題で、厚生労働省研究報告データベースに公開されている。

<https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=201723023A>

平成 30 年度の本研究の成績は別途郵送する。

貴検査機関においては、我が国の食肉の衛生管理レベルを世界と同等のものとし、国際競争力を持つ食肉の供給と、平順化された手法として全国に展開できると畜場 HACCP システム妥当性検証プロトコールの確立に協力を願いたい。本プロトコールは、と畜場 HACCP システムの妥当性への外部検証法に相当する。令和元年におけるプロトコール試行に協力を賜りたく、ここに試行を依頼する次第である。

<牛>

1) 特に準備するもの

- ・滅菌ステンレス製枠板：内寸 5 cm x 5 cm（スギヤマゲン）。アルミホイル等に包み、事前にオートクレーブしておく。
- ・滅菌ストマッカー袋
- ・外科手術用メス（滅菌済みのもの）
- ・ピンセット（滅菌済みのもの）

2) 採材タイミング

予備冷蔵から本冷蔵に入る時点、すなわち本冷蔵庫搬入直前とする。

採材はと畜検査中あるいは検査後でもよい。

あるいは、本冷蔵に入った直後で、と体の温度が低下する前に採材する。

採材時刻は指定しない。

3) 採材頻度

1 回に 5 検体、1 週間に 1 回、連続した 6 週とする。

一定の曜日に集中することを避ける。施設開場日に限定があるなど、各施設で種々の状況があるだろうが、可能なら、採材する曜日を別々の曜日とする。

合計 30 検体を採取する。

4) 採材部位

ともばら部分の、5 cm x 5 cm (25 cm²) を採取し、1 検体とする（図 1 参照）。

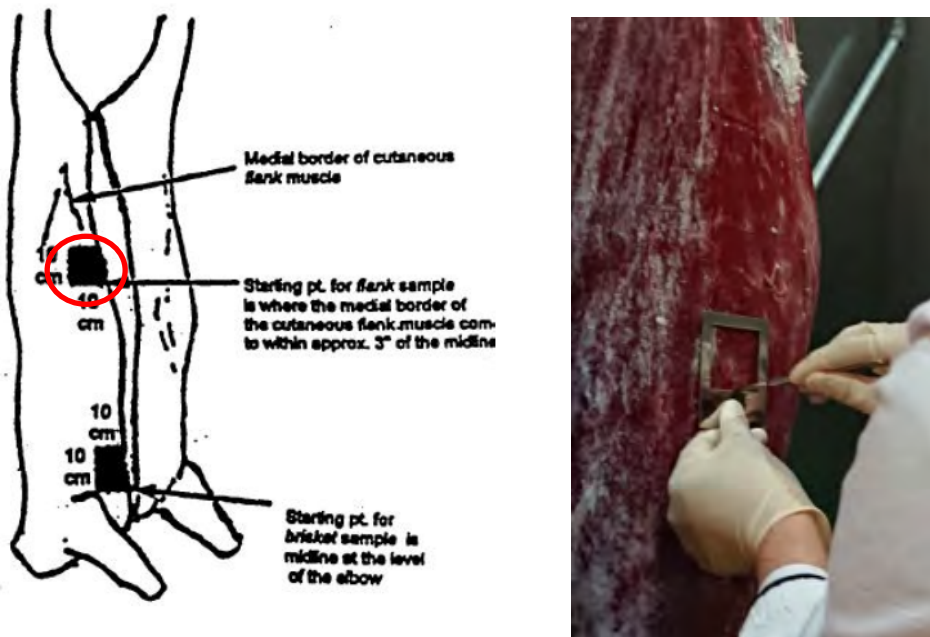


図 2 左：切除部位：ともばら。赤丸部分。5 cm x 5 cm (25 cm²)。

右：切除の様子

5) 採材方法

- ① 手指を洗浄後、アルコール消毒を実施する。
- ② 使い捨て手袋を装着し、使い捨て手袋の上からアルコール消毒を実施する。
- ③ 以下、右利きを想定して記載する。滅菌ステンレス製枠板を左手で持つ。左手の枠板を、ともばら部分に置き、固定する。
- ④ 右手で滅菌済み外科手術用メスを持ち、枠板の内径に沿って深さ 2 mm ほど切れ込みを入れる。
- ⑤ 左手を枠板から滅菌ピンセットに持ちかえる。
- ⑥ ピンセットと外科手術用メスで 5 cm x 5 cm、深さ 2 mm の組織を切除する。深さは目標値であり、特段に拘泥するものでない。

- ⑦ 切除した組織を滅菌ストマッカー袋に入れる。重量（g）を、小数点以下1位まで求め、記録する。
- ⑧ 組織を入れた滅菌ストマッカー袋は4℃の冷蔵庫、あるいは氷上に一時保管する。冷凍しない。冷蔵状態で検査室に搬送する。速やかに細菌検査に付する。

<豚>

1) 特に準備するもの

- ・滅菌ステンレス製枠板：内寸 5 cm x 5 cm（スギヤマゲン）。アルミホイル等に包み、事前にオートクレーブしておく。
- ・滅菌ストマッカー袋
- ・外科手術用メス（滅菌済みのもの）
- ・ピンセット（滅菌済みのもの）

2) 採材タイミング

冷蔵庫搬入直前の枝肉。

採材はと畜検査中あるいは検査後でもよい。予備冷蔵から本冷蔵に入る過程で採材する。あるいは、本冷蔵に入った直後で、と体の温度が低下する前に採材する。採材時刻は指定しない。

3) 採材頻度

1 回に 5 検体、1 週間に 1 回、連続した 6 週とする。

一定の曜日に集中することを避ける。施設開場日に限定があるなど、各施設で種々の状況があるだろうが、可能なら、採材する曜日を別々の曜日とする。

合計 30 検体を採取する。

4) 採材部位

胸部の 5 cm x 5 cm (25 cm²) を採取し、1 検体とする（図 2 参照）。

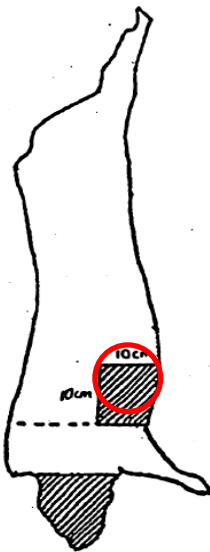


図 3 左：切除部位：胸部。（赤丸）を 5 cm x 5 cm (25 cm²)

右：切除の様子

5) 採材方法

- ① 手指を洗浄後、アルコール消毒を実施する。
- ② 使い捨て手袋を装着し、使い捨て手袋の上からアルコール消毒を実施する。
- ③ 以下、右利きを想定して記載する。滅菌ステンレス製枠板を左手で持つ。左手の枠板を、と体の胸部に置き、固定する。
- ④ 右手で滅菌している外科手術用メスを持ち、枠板の内径に沿って深さ 2mm ほど切れ込みを入れる。
- ⑤ 左手を枠板から滅菌ピンセットに持ちかえる。
- ⑥ ピンセットと外科手術用メスで約 5 cm x 5 cm 深さ 2 mm の組織を切除する。深さは目標値であり、特段に拘泥するものでない。
- ⑦ 切除した組織を滅菌ストマッカー袋に入れる。重量 (g) を、小数点以下 1 位まで求め、記録する。
- ⑧ 組織を入れた滅菌ストマッカー袋は 4°C の冷蔵庫、あるいは氷上に一時保管する。冷凍しない。冷

蔵状態で検査室に搬送する。速やかに細菌検査に付する。

と畜場衛生管理評価のためのペトリフィルム法による衛生指標菌数の測定
 <一般細菌数と腸内細菌科菌群数>

1) 準備

- ペトリフィルム：3M™ Petrifilm
 - ・一般細菌数（生菌数）測定用：ACプレート（cat#:6400AC）
 - ・腸内細菌科菌群：EBプレート（cat#:6420EB）
- スプレッダー
- 滅菌リン酸緩衝生理食塩水（90 ml，9 ml，0.90% NaCl）
- 無鉤ピンセット
- アルコール綿
- 1 ml チップ
- 遠沈管用ラック
- 1000 μl ピペット
- 電動ピペッター
- ボルテックス
- 培養用ボックス
- 滅菌缶と滅菌袋

2) 手技

- ① 組織を入れた滅菌ストマッカー袋を軽量し、組織の重量を記録する。
- ② 組織を入れた滅菌ストマッカー袋に滅菌リン酸緩衝生理食塩水 90 ml を加え、ストマッカー処理を実施する。
- ③ 1 検体につき、滅菌緩衝生理食塩水 9 ml 3 本を準備する。
- ④ 滅菌生食水 9ml に上記懸濁液 1ml を加え、攪拌することで、10 倍階段希釈を作製する。必要に応じ、100 倍階段希釈液も同様に調整する。試験が進行して結果が出始めたら、その結果に基づいて③④の希釈段階を調整することで効率を上げることができる。
- ⑤ ペトリフィルムを平らなところに設置し、上部のフィルムを持ち上げ、希釈液及び各階段希釈液 1 ml を培地中央部に滴下する。各希釈段階を 2 枚ずつペトリフィルムに接種する。
 - ・一般細菌数：ストマッキング処理原液、及び同階段希釈液（x10、x100、x1,000）
 - ・腸内細菌科菌群：ストマッキング処理原液、及び同階段希釈液（x10、x100）
- ⑥ 希釈液を滴下後は、気泡が入らないよう上部フィルムをそとつかぶせ、専用スプレッダーを用いて菌液を均等に広げる。専用スプレッダーは軽く押し付ける程度とする。
- ⑦ フィルムは 1 分間以上静置し、ゲル化させた後、培養用ボックスに移動する。同一種のフィルムは最大 20 枚まで積み重ねることができる。

ペトリフィルム使用法の詳細は、3M Science. Applied to Life.™ のホームページを参考にされたい。

3) 培養上の条件、判定、適正範囲

ペトリフィルムの種類に応じて、培養条件は異なる。以下を参照されたい。

	AC（一般生菌）	EB（腸内細菌科菌群）
--	----------	-------------

培養条件	35±1℃、48±3 時間	37±1℃、24±2 時間
適正測定範囲 (1 枚あたり)	1 フィルムにつき、 25～250 コロニー	1 フィルムにつき、 15～150 コロニー
判定	● 赤色コロニー	● 気泡をともなう赤色コロニー ● 黄色の変色域を伴う赤色コロニー ● 気泡と黄色の変色域をともなう赤色コロニー

該当するコロニーを計数する。

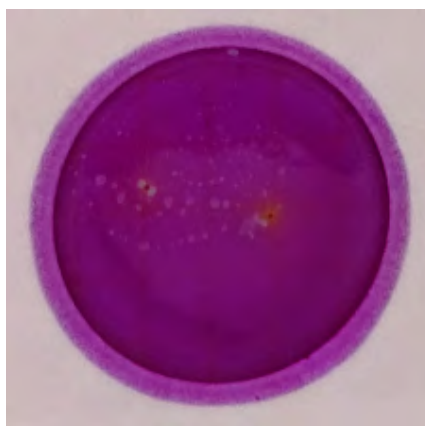
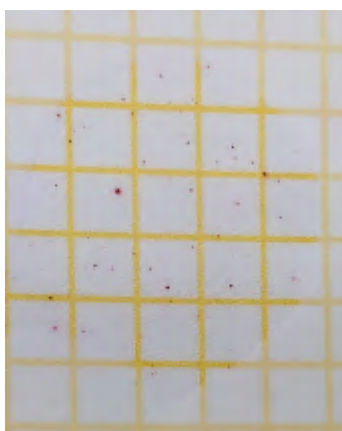


写真 1 AC フィルム上の集落 写真 2 EB フィルム上の集落

4) 細菌数の計算

食品衛生検査指針 微生物編 2018（厚生労働省監修、日本食品衛生協会）第 2 章 3) 集落数の算定』を参考に、以下の方法で菌数を計算する。

4-1) ペトリフィルム上のコロニー数の計算

- ① 1 段階の希釈にのみ適正範囲数のコロニー数が認められるとき、2 枚のフィルムのコロニー数の算術平均を求める。
- ② - 1) 連続した 2 段階の希釈に適正範囲数のコロニー数が得られた場合、各希釈ごとに 2 枚のフィルムの算術平均を算定し、両者の比を求める。
- ② - 2) 両者の比が 2 倍未満の時は、以下の計算式により、連続する 2 段階の希釈平板のコロニー数から菌数を算定する。

$$N = \left[\frac{A+B}{2d_1} + \frac{C+D}{2d_2} \right] / 2$$

A, B : 低希釈の集落数

C, D : 高希釈の集落数

d_1 : 希釈が低いほうの希釈倍率

d_2 : 希釈が高いほうの希釈倍率

例えば、 10^2 希釈で集落数が 295 と 285、 10^3 希釈で 32 と 34 であったとすれば、

$$N = \frac{(295 + 285)}{2 \times 10^{-2}} + \frac{(32 + 34)}{2 \times 10^{-3}} / 2 = \frac{580}{0.02} + \frac{66}{0.002} / 2 = 31,000$$

② - 3) 両者の比が 2 倍を越えたときは、希釈段階の低いほうのコロニー数の算術平均を求める。

4 - 2) 検体 cm^2 への換算

ストマッキング処理原液 (1 ml) のフィルムで、 X cfu が計数されたとする。希釈液は 90 ml、切除片の重量を Y g とする。

$X \times (90 + Y) = 1$ 検体中の菌数 (g ベースで計算する)

1 検体は 25 cm^2 なので、上記を 25 で除し、 cm^2 当たりに換算する。

最終表示 : $\square. \square \times 10^\square \text{ cfu/cm}^2$

5) 検証としての適正範囲

EU の規格を示す。今回の試行では、EU 基準値を越えても再検討等を実施するものではない。

参考 : EU の規格値と対応

牛 : 一般細菌数	$m = 3.5 \log \text{ cfu/cm}^2$	$M = 5.0 \log \text{ cfu/cm}^2$
腸内細菌科菌群数	$m = 1.5 \log \text{ cfu/cm}^2$	$M = 2.5 \log \text{ cfu/cm}^2$
豚 : 一般細菌数	$m = 4.0 \log \text{ cfu/cm}^2$	$M = 5.0 \log \text{ cfu/cm}^2$
腸内細菌科菌群数	$m = 2.0 \log \text{ cfu/cm}^2$	$M = 3.0 \log \text{ cfu/cm}^2$

m : 基準値

M : 条件付き合格と判定する基準となる菌数限界、それ以上の菌数は逸脱と見做す。

基準値 m を越えた菌数を認めただけの場合には再検査を行う。 M を超える菌数を認めただけの場合には、HACCP システムの再検討を行う。

以上

食鳥処理場における HACCP システム妥当性評価試験法プロトコール

6) 準備すべき器具・設備等

- ①検体の採材・輸送工程 (③及び④に共通)
 - ・滅菌済メスまたは鋏
 - ・滅菌済ピンセット
 - ・滅菌済プラスチックシャーレ (85~100 mm径のもの)
- ②検体調整工程 (③及び④に共通)
 - ・滅菌済ストマッカー袋 (250ml 容量に対応するもの)
 - ・ストマッカー
 - ・ボルテックス
 - ・ピペット及びピペットチップ (1000 μ L, 200 μ L の 2 種類)
 - ・電動ピペッター及び 10mL メスピペット
- ③衛生指標菌試験
 - ・恒温槽
- ④カンピロバクター試験 (任意)
 - ・微好気培養容器 (微好気ガス雰囲気を密封できるもの)
 - ・恒温槽
 - ・PCR 装置 (heat-lid 機能を有するものが望ましい)
 - ・アガロースゲル電気泳動槽
 - ・撮影装置
 - ・オートクレーブ (121 $^{\circ}$ C, 15 分以上の高圧蒸気殺菌が可能なもの)
 - ・冷蔵保管庫 (検体を一時的に 4 $^{\circ}$ C で保管できる環境)
 - ・顕微鏡

7) 準備すべき試薬・消耗品等

- ①採材及び検体調整工程 (②及び③に共通)
 - ・アルコール綿、アルコール系消毒剤
 - ・アルミ箔
 - ・緩衝ペプトン水
 - ・滅菌袋または滅菌缶
- ②衛生指標菌試験
 - ・ペトリフィルム (一般細菌数測定用 AC プレート (6400AC), 及び腸内細菌科菌群測定用 EB プレート (6420EB) 等)
 - ・ペトリフィルム用スプレッダー
 - ・パラフィルムやテープ等, シャーレを密封できるもの
- ③カンピロバクター試験 (任意)
 - (培養工程)
 - ・mCCDA 寒天培地 (ISO 処方)
 - ・微好気ガスパック
 - ・滅菌済遠心管 (1 検体につき、15ml 容を 4 本、50ml 容を 1 本)
 - ・滅菌済コンラージ棒 (スプレッダー)
 - ・滅菌済白金耳 (釣菌用)
 - ・血液寒天培地 (純培養用)
 - (確認試験工程)
 - 確認試験①を採用する場合
 - ・PCR マスターミックス

- ・オリゴヌクレオチドプライマー
 - ・PCR チューブまたはプレート
- 確認試験②を採用する場合
- ・チトクローム・オキシダーゼ試験用濾紙

3) 検体の採取工程

本冷却工程後の食鳥とたいを対象とする。具体的には、冷却後水切りを行った段階あるいは、カット加工場を併設する施設ではカット工程に移行する前の段階で衛生的に採取する。採材時刻は指定しないが、食鳥処理のはじめのロットは可能な限り避けることとする（処理半ばのとたいを採材することが望ましい）。ここでいうロットとは同一農場・同一鶏舎の鶏群を指す。

補足：水切りについては、冷却後食鳥とたいで一定程度水分が落ちているものとする。また、水切りの手間は特に規定しない（処理場が通常行っている工程に新たに追加する必要はない）。

なお、中抜き食鳥とたいの採材場所として冷却直後が施設設備の構造上、適切でないと判断される場合には、以下の点に留意されたい。

- ・食鳥処理場の HACCP 管理の検証が目的であるため、中抜きとたいの状態にあるものを採材対象とすることを遵守する。
- ・但し、製造ラインの作りに違いがあるので、冷却直後に限定はせず、冷却後～上半身下半身の切り離し等のカット工程の直前で、出来るだけ水の切れている地点で採材すればよい。

4) 採材頻度及び検体数（定義を含む）

1 週間あたり 1 稼働日を選定し、同日に処理された冷却後の食鳥とたい計 25 羽を対象として、5 羽より首皮を計 25g 以上採材し、これをプールして 1 検体とする。すなわち、1 実施日につき、5 検体を採材することとなる。同様の作業を 6 週連続的に実施し、計 30 検体を採材するものとする。なお、可能な範囲で、採材対象となる農家が異なるよう、調整することが望ましい。

5) 採材部位及び方法

原則として、食鳥とたいの首皮を採材部位とする（図 1 参照）。但し、本冷却工程前に首皮を既に切除している施設においては、ムネ部分の皮としても良い。何れの場合も、計 5 羽の食鳥と体の首皮（またはムネ皮）を集め、計 25 g とする。採材方法は以下の通り。

- ① 石鹼等を用いて手指を十分に洗浄後、アルコール系消毒剤等を噴霧し、消毒を行う。
- ② 使い捨て手袋を手指に装着し、その上から再度アルコール系消毒剤等を噴霧する。
- ③ 平らな作業台等の上にアルミ箔等を敷き、その上に食鳥と体を静置する（5 羽同時でも 1 羽ずつでも良い）。
- ④ 滅菌ピンセットと滅菌メスあるいは鉗を用いて、食鳥とたいより検体を可能な限り無菌的に切除し、滅菌済プラスチックシャーレに入れる（5 羽分の鶏皮を 1 つのシャーレに入れる。この際、5 羽の重量がなるべく均等となるよう考慮すること）。
- ⑤ 鶏皮を入れた滅菌プラスチック製シャーレは、交叉汚染等が生じないように、パラフィルムやテープ等で密封した後、2～4℃の冷蔵庫、あるいは氷上に一時保管する（冷凍はしない）。採材から最長 48 時間以内に冷蔵状態で検査室に搬送し、試験に供する。



図1 食鳥とたいからの採材部位（首皮）の例

6) 採材検体の前調整

以下の操作に従って、検体の前調整を行う。

- ① 滅菌シャーレ中の検体を滅菌済鋏及びピンセットを用いて細切した後、25 g を計量する。
- ② 上項の計量済検体を、予め 225ml の緩衝ペプトン水を入れた滅菌フィルター付ストマッカー袋に加え、1 分間ストマッキング処理を行う。
- ③ 1 検体につき、滅菌生理食塩水 9ml を含む 15ml 容遠心管 4 本を準備する。
- ④ ストマッキング処理後の検体懸濁原液（上項②の操作を経たものを指す）を、ストマッカー袋付属のフィルターを通じて 50ml 遠心管に回収する。
- ⑤ 上記懸濁原液 1ml を、上項③で準備した滅菌生食水 9ml に加え、10～20 秒間ボルテックスにより攪拌を行い、10 倍、100 倍、1,000 倍階段希釈液を順に作製する。なお、試験の進行に伴い、結果に基づいて、③及び⑤の希釈段階を調整し、作業効率を上げることができる。
- ⑥ 以上の操作は 1 検体につき 30 分以内に終え、次の操作 7) へと進める必要がある。

7) 衛生指標菌定量検出試験

- (ア) ペトリフィルム AC プレート及び EB プレートを冷蔵庫から取り出し、平らな作業台・実験台等に設置して常温に戻す。
- (イ) 上部のフィルムを持ち上げ、検体希釈原液及び同階段希釈液 1 mL を培地中央部に滴下する。
- (ウ) 気泡が入らないよう、上部フィルムをそっとかぶせ、スプレッダーを用いて菌液を均等に広げる。スプレッダーは軽く押し付ける程度とする。
- (エ) フィルムは 1 分間以上静置してゲル化させた後、恒温槽内に設置し、培養を行う。なお、同一種のフィルムは最大 20 枚まで積み重ねることができる。

備考：ペトリフィルムは、検体及び希釈段階の別にそれぞれ 2 枚を使用する。希釈倍率は各施設での対象検体の衛生状況により変動するが、初めて検討する場合には以下の条件を参照されたい。

- ・ AC プレート：検体懸濁原液 (x 1)、及び同階段希釈液 (x 10, x 100, x 1,000)
- ・ EB プレート：検体懸濁原液 (x 1)、及び同階段希釈液 (x 10, x 100)

(オ) 培養条件及び判定基準等については、フィルムの種別により異なる。以下を参照されたい。

項目	AC プレート（一般細菌数）	EB プレート（腸内細菌科菌群）
培養条件	35±1°C、48±3 時間	37±1°C、24±2 時間
適正測定範囲 (1 枚あたり)	25～250 集落	15～150 集落

陽性判定基準	<ul style="list-style-type: none"> ● 赤色集落（集落の大きさや色調は判断基準としな い） 	<ul style="list-style-type: none"> ● 気泡をともなう赤色集落 ● 黄色の変色域を伴う赤色集落 ● 気泡と黄色の変色域を伴う赤色集落
--------	---	--

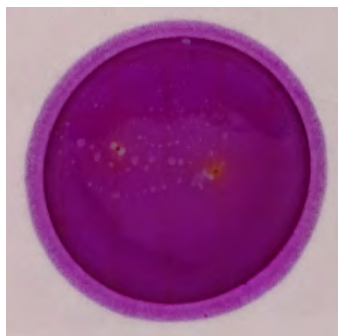
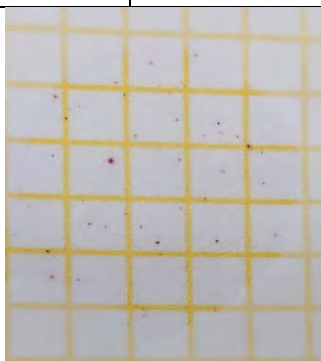


図 2. AC プレート上の集落例

図 3. EB プレート上の集落例

(カ) 結果の判定（各プレートにおける結果判定）

検体 1g あたりの一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、プレートの種別に拠らず、以下の計算式によって求められる。なお、検体・希釈倍率の別に 2 枚ずつ用いるが、プレート上の集落数成績も記録・保管しておくこと。

- ① 検体懸濁希釈液（x10 倍希釈列）1mL を滴下し、培養後にプレート上に発育した集落数が 25CFU であった場合

$$25 \text{ (CFU/プレート)} \times 10 \text{ (希釈倍率)} \times 10 \text{ (検体懸濁原液総重量 250g/採材検体重量 25g)}$$

$$= 25,000 \text{ CFU/g}$$
- ② 検体懸濁原液 1mL を滴下し、培養後にプレート上に発育した集落数が 85CFU であった場合

$$85 \text{ (CFU/プレート)} \times 1 \text{ (希釈倍率)} \times 10 \text{ (検体懸濁原液総重量 250g/採材検体重量 25g)} = 850 \text{ CFU/g}$$

なお、ペトリフィルム製品の使用に係る詳細は、製造元のホームページや製品指示書を参照されたい。

(キ) 結果の換算・記録

食品衛生検査指針微生物編 2018（厚生労働省監修、日本食品衛生協会出版）第 2 章 3）集落数の算定』を参考に、以下の方法で検体 1g あたりの指標菌数を計算する。

- ① 1 段階の希釈列にのみ適正範囲数の集落数が認められる場合、2 枚のフィルムのコロニー数の算術平均を求め、結果を記録・保存する。
- ② 連続した 2 段階の希釈に適正範囲数の集落数が得られた場合、各希釈列毎に 2 枚のフィルムの算術平均を算定し、両者の比を求める。両者の比が 2 倍未満の時は、以下の計算式により、連続する 2 段階の希釈平板の集落数から菌数を算定する。その結果、両者の比が 2 倍を越えたときは、希釈倍率の低いほうの集落数の算術平均を求め、結果を記録・保存する。

$$N = \left[\frac{A+B}{2d_1} + \frac{C+D}{2d_2} \right] / 2$$

A, B : 低希釈の集落数

C, D : 高希釈の集落数

d₁ : 希釈が低いほうの希釈倍率

d₂ : 希釈が高いほうの希釈倍率

例えば、10⁷ 希釈で集落数が 295 と 285、10¹ 希釈で 32 と 34 であったとすれば、

$$N = \frac{(295 + 285)}{2 \times 10^{-2}} + \frac{(32 + 34)}{2 \times 10^{-3}} / 2 = \frac{580}{0.02} + \frac{66}{0.002} / 2 = 31,000$$

8) カンピロバクター定量試験法

- ① 上述の検体懸濁原液及び 10 倍階段希釈液を検査対象とする。本定量試験は、希釈段階を調製後、第一に実施する。後述の衛生指標菌定量試験の後には実施しない。
- ② 試験実施前に mCCDA 寒天培地を冷蔵庫から取り出し、検査室の実験台や恒温器内に静置して培地表面の過剰な水分を蒸散させてから使用する。なお、必要とする培地の枚数は 1 検体・1 希釈倍率につき 5 枚であることに留意されたい。
- ③ 検体懸濁原液及び 10 倍階段希釈液 0.2mL を mCCDA 寒天培地 1 枚にコンラージ棒を用いて塗抹する。なお、塗抹量は 1 検体・1 希釈倍率につき 1mL となる。可能であれば事前の予備試験を設定し、10 倍階段希釈列の必要性を判断しておくことが望ましい（その必要性がないと判断された場合には、原液のみを用いた試験としても差し支えない）。
- ④ ガスパックと培養容器を用いて微好気培養を行う。培養温度は 41.5±1.0°C、培養時間は 44±4 時間とする。
- ⑤ 培養後、選択分離培地上に発育した定型あるいは疑わしい集落を計数すると共に、1 検体・1 希釈列につき 5 集落を釣菌し、確認試験に供する。
- ⑥ カンピロバクター確認試験

以下の(1)または(2)のいずれかを用いて、*C. jejuni*または*C. coli*であることを確認する。

- (1) 遺伝学的確認試験：ここでは、国際的に汎用される PCR 法を一例として紹介する。このほかにも、市販の（リアルタイム）PCR キット製品や LAMP キット製品、或いは自主的に開発・妥当性を評価したプロトコール等を使用しても差し支えない。なお、製品を選択する際には以下のリンクを適宜参照してもよい。

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/a18d541e-77d2-40cf-a045-b2d2d13b070d/Microbiological-Testing-Raw-Poultry.pdf?MOD=AJPERES#page=26>

【1】 以下のオリゴヌクレオチドプライマーを準備する。

対象菌種 (対象遺伝子)	プライマー名	配列 (5' — 3')	増幅サイズ (bp)
<i>C. jejuni</i> (<i>hipO</i>)	CJF	ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC	323
	CJR	GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC	
<i>C. coli</i> (<i>glyA</i>)	CCF	GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG	126
	CCR	TCC AGC AAT GTG TGC AAT G	
<i>Campylobacter</i> spp.	23SF	TAT ACC GGT AAG GAG TGC TGG AG	650

(23S rRNA)	23SR	ATC AAT TAA CCT TCG AGC ACC G	
------------	------	-------------------------------	--

注記： *Campylobacter* spp. (23S rRNA) は内部標準 (IAC) 用としても用いることができる。その場合には、内部標準鋳型 DNA を人工合成して適用することが望ましい。

【2】新しい PCR チューブを用意し、2 x PCR マスターミックス 25 μ L、釣菌コロニー (200 μ L チップ等で釣菌したもの)、上記プライマー溶液 (100 μ M) 各 0.2 μ L (50nmol)、滅菌精製水 24 μ L を加える。また、陽性対照としては、*C. jejuni* 及び *C. coli* 鋳型 DNA 混合溶液 1 μ L を釣菌コロニーの代替として加えたものを独立して準備する。

【3】調整した反応溶液を、以下の反応条件に供する。

反応工程	サイクル数	反応条件 (温度・時間)
①	1	95°C, 6 分
②	30	95°C, 30 秒; 59°C, 30 秒; 72°C, 30 秒
③	1	72°C, 7 分
④	1	20°C以下 (通常 4°C) まで急冷

【4】増幅産物の確認は、アガロースゲル電気泳動により行う。この際使用するアガロース濃度は 2.0% とする。323bp または/及び 126bp 付近に増幅産物を認めた場合、同集落は陽性と判定し、1 検体・1 希釈率当りの陽性数を求め、別添様式に記録する。なお、650bp 付近に増幅産物を認めるものの、先述のサイズの増幅産物を認めない場合には陰性と判定し、結果を記録する。

(2) 形態及び生化学性状試験

釣菌した集落を血液寒天培地上で 41.5 \pm 1°C で 24-48 時間微好気培養後、以下の試験を行う。

- 【1】顕微鏡観察により、運動性を有するらせん状菌が確認されること。
- 【2】オキシダーゼ試験を行い、陽性反応を示すこと。操作方法は製品の指示書に従うこと。
- 【3】新たに血液寒天培地に接種し、25°C で 44 \pm 4 時間の好気培養により、集落の発育が認められないこと。

上記の性状を満たす集落を陽性と判定し、1 検体・1 希釈率当りの陽性数を求め、記録する。

(3) 定量成績の算出 (菌数計算)

①一例として、検体懸濁原液 1mL を計 5 枚の mCCDA 寒天培地に塗抹・培養し、5 枚の培地上に発育した定型集落数が計 125 であり、釣菌した 5 集落のうち、4 集落が *C. jejuni* または *C. coli* と判定された場合、検体 1g あたりのカンピロバクター菌数は、以下の式により求められる。

125 (定型集落数/5 枚) \times (4/5) (確認試験陽性数/同供試数) \times 10(検体懸濁原液重量 250g/採材検体重量 25g) = 1,000 cfu/g

③ 結果の記録

検体 1g あたりの菌数を記録・保管する。

以上